

MOLECULAIRE ARCHEOLOGIE

Verklikkers van het verleden

De eerste oude munten en vazen die eeuwen geleden door schatgravers werden opgegraven verdwenen in de kast van rijke verzamelaars. Nog steeds worden nieuwe vindplaatsen ontdekt bij het aanleggen van wegen, spoorlijnen en woonwijken. Laagje voor laagje struinen archeologen de bodem af met troffel, schep en metaaldetector, op zoek naar overblijfselen die menselijke activiteit verraden: botresten, scherven, zaden en stenen bijltjes. Heel voorzichtig. Sporen in de grond wordt gecoupeerd, getekend en gefotografeerd. Want opgraven is vernielen: het kan maar één keer.

Archeologie is echter meer dan opgraven alleen. Aan de hand van de gevonden overblijfselen probeert de archeoloog te achterhalen hoe we vroeger leefden. Bij dit werk zijn

(bio)chemische, fysische en moleculaire analysetechnieken tegenwoordig niet meer weg te denken. Dankzij sporen- en isotopenanalyse kunnen specialisten de ouderdom van botten vaststellen, of de leef- en eetgewoonten van onze verre voorouders en van uitgestorven dieren. Maar écht hot is het zoeken naar overgebleven DNA – liefst zo oud mogelijk.

In deze Chemische Feitelijkheid

- De Context: Welke rol speelt de bètawetenschap in de archeologie? En is de bodem wel zo'n goede bewaarplaats?
- De Basis: Hoe kun je met radioactief koolstof de ouderdom van voorwerpen bepalen?
- De Diepte: DNA heeft niet het eeuwige leven. Hoe betrouwbaar zijn de sensationele claims rond dino-DNA?

Overblijfselen in de bodem zijn het studiemateriaal van archeologen. Langzaam maar zeker dringt de bèta-benadering door bij de analyse van deze bodemschatten. Hoogste tijd, want de kwaliteit van het bodemarchief holt hard achteruit.

Bodemschatten onder de loep

Op zijn motorfiets doorkruiste professor Van Giffen begin vorige eeuw het Groninger en Friese landschap op zoek naar grafvelden, terpen en wierden. Terwijl boeren hem als lastpost van hun erf joegen, groeide hij uit tot het icoon voor de natuurwetenschappelijke benadering van de archeologie. In 1922 richtte hij in Groningen het Biologisch Archeologisch Instituut op. Daarmee deden de botanie en zoölogie hun intrede binnen de archeologie, dat van oudsher het domein van de Letteren is. Tot dan toe werd de kalender van het verleden ingevuld op basis van geschreven bronnen in het Grieks, Latijn en Egyptisch, zoals koningslijsten, kleitabletten, aardewerkchronologieën en uiteraard de bijbel.

Het chemisch-fysische en biomoleculaire onderzoek aan opgegraven materialen is pas van de laatste tijd. In 2003 richtte de Vrije Universiteit in Amsterdam bijvoorbeeld het Instituut voor Geo- en Bioarcheologie op, dat net als het onderzoeksinstituut in Groningen een bèta-benadering heeft van de archeologie. Ook de universiteiten van Delft en Leiden



Het verleden als legpuzzel.

timmeren met nieuwe onderzoeksinitiatieven de laatste jaren op dit terrein flink aan de weg.

BOEIEND AFVAL

Klassieke archeologen speuren in de modder naar materiële overblijfselen, zoals potscherven, bijltjes en pijlen, boten, zaden en pollen. Op die manier achterhalen ze hoe onze voorouders leefden, zich ontwikkelden en elkaar beïnvloedden. Archeologen zijn verhalenvertellers. Uit het opgraven van een kippenbotje

concluderen ze niet alleen dat er op die plek ooit kippen werden gehouden. Nee, er komt een hele verhandeling bij over de invloed van de Romeinen en veranderingen van de plaatselijke keuken.

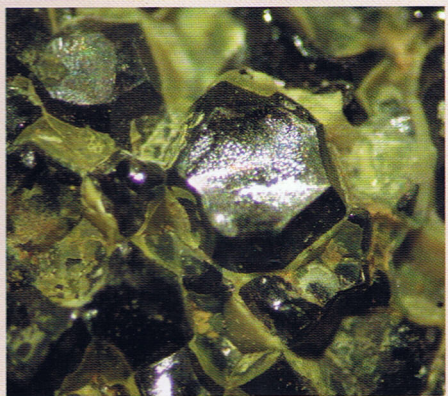
Overigens beginnen archeologen niet zomaar ergens te graven. Na het nodige bureauwerk volgt eerst verkennend veldonderzoek met enkele proefboringen, waarbij ze speuren naar archeologische indicatoren, zoals scherven, vuursteen, hout of gewoon verkleuring in de bodem. Allemaal tekenen van bewoning. Zo'n verkenning kan ook zonder de aarde te beroeren. Aardewerk heeft magnetische eigenschappen, waardoor het met een magnetometer al scannend boven het land kan worden opgespoord. Dit kan ook vanuit vliegtuigen of satellieten (*remote sensing*).

Pas als er een zogeheten cultuurlaag is gevonden wordt er flink doorgespit. Dit vervolgonderzoek zoomt in van groot naar klein. Archeologen bepalen eerst uit welke tijd een gevonden voorwerp afkomstig is en welke functie het heeft gehad. Daarna maken mineralogen en petrologen zogeheten slijpplatten, waarmee ze bodemonsters microscopisch kunnen onderzoeken. Vervolgens beschikken archeologen over een scala aan analysetechnieken die ze kunnen inzetten. Voor ouderdomsbepaling zijn radioactieve koolstofdatering (^{14}C) en de dendrochronologie (het tellen van jaarringen) het belangrijkste. Sinds kort is daar luminescentiedatering aan toegevoegd. Om te bepalen uit welke elementen een materiaal bestaat, zijn technieken voorhanden als atomaire absorptiespectrometrie, röntgenfluorescentiespectrometrie, massaspectrometrie en recent neutronenactivering voor sporenelementenanalyse.

Maar ook een relatief eenvoudige fosfaatbepaling helpt bij het in kaart brengen

EEUWENOUDE GLIMMERS

In 3200 jaar oud geglaazuurd keramiek uit het Midden-Oosten ontdekte een team van Leidse archeologen en Delftse materiaalkundigen het mineraal chromiet. Dit mineraal zorgt voor een grijsachtige kleuring van het glazuur en dient als kristallisatiekern voor augiet, waardoor in de glazuurlaag een fonkelend optisch effect ontstaat. Al in de late bronstijd slaagde men er zo in om potten van een metaalachtige glans te voorzien. Dat is 1200 jaar eerder dan historici dachten, want de ontwikkeling van deze techniek werd tot nu toe toegeschreven aan de Romeinen. |





Het in 2003 opgerichte Nederlands Centrum voor Luminescentiedatering in Delft analyseert oude monsters met behulp van optisch gestimuleerde luminescentie. Met deze variant op thermoluminescentie kunnen archeologen en aardwetenschappers de leeftijd bepalen van aardewerk en zanderige afzettingen. Daardoor kan de ouderdom van sedimenten, potscherven en gebouwen worden bepaald tot 150.000 jaar geleden. De techniek maakt gebruik van de natuurlijke radioactiviteit uit de omgeving: door deze stralingsenergie ontstaat in zandkorrels spanning in het kristalrooster. Wanneer de zandkorrels worden belicht of verhit, komt die energie weer vrij in de vorm van een lichtsignaal. De intensiteit daarvan is een maat voor de ouderdom.

van een vindplaats: waar mensen zijn geweest, is immers afval. Het merendeel is vergaan door microbiële of chemische afbraakprocessen, maar de afvalresten zitten vastgehecht aan bodemdeeltjes, waardoor de bodem afwijkt van de natuurlijke bodemlagen. Fosfaat zit in hoge concentratie in urine, maar ook in bot en poep. De kunst is deze antropogene signalen terug te vinden en zo bewoning te lokaliseren. Naast fosfaat hechten ook organische moleculen zoals vetten en eiwitten zich aan bodemdeeltjes. Of aan de binnenkant van aardewerk. Zo kunnen bioarcheologen oude eetpatronen afleiden via vastgekoekte eiwit- en vetresten. Grootste buzzword binnen de biomoleculaire archeologie is tegenwoordig 'oud DNA'. Daarmee kunnen de moderne archeologen niet alleen verwantschappen aantonen tussen soorten, maar bijvoorbeeld ook de migratie van volkeren volgen en de aanwezigheid van erfelijke ziekten opsporen.

DEGRADATIE

Hoe verfijnd de opsporingsmethoden ook zijn, opgraven kan maar één keer. Dus als het niet hoeft: afblijven. Zo luidde altijd het adagium, want de bodem was een goede bewaarplaats voor (pre)historische schatten. Tegenwoordig bestaat daar echter de nodige discussie

over. Als gevolg van industrialisatie, intensieve akkerbouw en klimaatverandering is het chemische evenwicht in de bodem verstoord geraakt en holt de kwaliteit van het bodemarchief achteruit. Door wisselingen in de grondwaterstand veranderen bijvoorbeeld de zuurstofspanning, zuurgraad (pH), temperatuur en de activiteit van bacteriën en schimmels. Het gevolg van grondwaterstroming heeft veel weg van theezetten: het archeologisch materiaal wordt opgelost, waarna het wordt meegevoerd met het grondwater. Bovendien komt door het zakken van het grondwater materiaal droog te liggen, waardoor het oxideert.

Sinds een jaar of tien proberen geo- en bioarcheologen te begrijpen hoe snel het bodemarchief precies degradeert. In Amsterdam heeft men onder meer onderzoek gedaan naar de structuur (histologie) van opgegraven botten, om te achterhalen hoe ver de degradatie is gevorderd en of het bot nog geschikt is voor radioactieve koolstofdatering of DNA-analyse. Wanneer botten vergaan, sijpelt het eiwit collageen eruit en neemt gelijk het DNA met zich mee. Hoe snel dat gaat, hangt af van de bodemtemperatuur. Bij 10 °C ligt de bewaargrens van bot rond de 20.000 jaar, zo voorspelt het Amsterdamse rekenmodel. Dit betekent dat het DNA van neanderthalers op bijna alle vindplaatsen verdwenen is.

IN DE LIFT

Dergelijke kennis is belangrijk om de waarde van een vindplaats te bepalen. Heeft het behoud ervan zin voor toekomstig onderzoek? Of kunnen de bulldozers morgen al beginnen? Tegenwoordig moeten alle bedrijven en instanties die in de grond willen wroeten, nagaan of er geen belangrijke archeologische vondsten in de grond zitten. Dat is het gevolg van het Europese verdrag van Malta, dat Nederland in 1992 heeft ondertekend. Voor de uitvoering is de Monumentenwet uit 1988 aangepast, waardoor ook commerciële bedrijven ingeschakeld mogen worden voor het archeologische spitwerk. De overheid hoopt zo de kosten te drukken. Het is wettelijk namelijk hetzelfde geregeld als voor het milieu: de verstoorder betaalt. In de praktijk is dit meestal de gemeente of een projectontwikkelaar die grond bouwrijp wil maken.

Sinds het verdrag van Malta zit de Nederlandse archeologie behoorlijk in de lift. Waren er twintig jaar geleden nog maar zo'n honderd archeologen actief

DODE DODO'S

Nederlanders worden al eeuwen beschuldigd van het opeten van de laatste dodo, en dat terwijl het vlees bepaald niet smakelijk was. Het werd niet voor niets de 'Walghvogel' genoemd. Harde bewijzen voor die beschuldiging ontbreken echter en ook opgravingen op het hoofdkwartier van de Verenigde Oost-Indische Compagnie (VOC) op het eiland Mauritius leverden geen enkel dodo-botje op. Wetenschappers denken dat de vogel is uitgestorven door toedoen van ratten, varkens, honden en katten. Bij gebrek aan natuurlijke vijanden was het tamme beest een makkelijke prooi. Net als zijn eieren, die in een nest op de grond lagen.



Eind 2005 werd in een moeras op Mauritius een unieke ontdekking gedaan: een massagraf met botten van dodo's en andere dieren en planten. Het materiaal is misschien wel enkele duizenden jaren oud. Hiermee kan voor het eerst een reconstructie gemaakt worden van de dodo-biotoop vóórdat de westerse mens voet aan land zette. Ook willen de onderzoekers achterhalen wat de oorzaak is van het verdwijnen van de dodo. Een team van Nederlandse, Britse en lokale experts graaft op Mauritius verder in de fossiellagen en neemt monsters – zowel voor ouderdomsbepalingen als voor isotopen- en DNA-onderzoek.

(voornamelijk bij de Rijksdienst voor het Oudheidkundig Bodemonderzoek en enkele gemeenten), nu zijn dat er meer dan duizend. Een ander belangrijk voordeel is dat van al dat graafwerk verplicht rapporten moeten verschijnen die voor iedereen toegankelijk zijn. Een gunstige ontwikkeling, want veel archeologisch veldwerk uit het verleden is nooit goed beschreven. Er kleeftechter ook een nadeel aan: stukken land waar niet gebouwd wordt blijven nu onbekeken, waardoor niet alle onderzoeksvragen kunnen worden beantwoord. Daarnaast bestaat het gevaar van sluipende erosie: door bouwactiviteiten kan de grondwaterstand in het naastgelegen gebied veranderen, met soms desastreuze gevolgen voor archeologen.

Aan een stukje bot kan ook een archeoloog niet zomaar aflezen of het 1000 of 10.000 jaar oud is. Dankzij de **radioactieve isotoop** van koolstof lukt dat wel. De ^{14}C -bepaling heeft daardoor een unieke plaats veroverd voor het dateren van vondsten.

De ^{14}C klok tikt

Vrijwel maandelijks staan er berichten in de krant over nieuwe archeologische vondsten. Variërend van muurschilderingen uit 1650 voor Christus tot een mammoet van 8.000 jaar oud: de ene vondst nog ouder dan de ander. Maar hoe weet men dat? Een archeoloog gespecialiseerd in aardewerk kan op basis van een potscherf een tijdschatting geven, maar de enige échte tijdsklok is radioactief koolstof ofwel ^{14}C . Via deze isotoop kunnen onderzoekers 50.000 jaar terug in de tijd kijken.

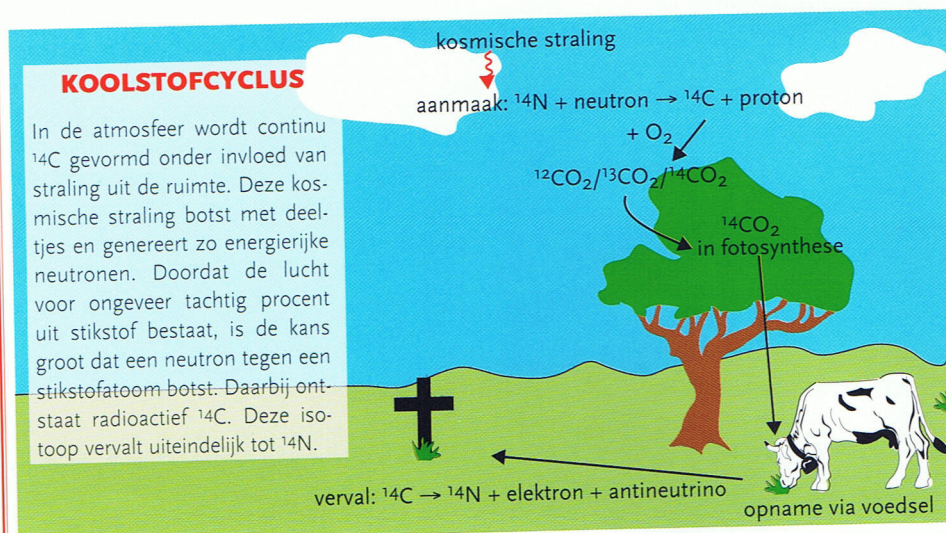
Radioactief koolstof wordt continu in de atmosfeer gevormd onder invloed van kosmische straling. Het vormt echter slechts een kleine fractie van de totale hoeveelheid koolstof op aarde. Het overgrote deel bestaat uit niet-radioactief koolstof ^{12}C , aangevuld met zijn stabiele broertje ^{13}C . De onderlinge verhouding van de drie isotopen ^{12}C , ^{13}C en ^{14}C is 1 : 0,01 : 0,000000000012.

Maar hoe weinig ook, het radioactieve ^{14}C draait gewoon mee met de koolstof-

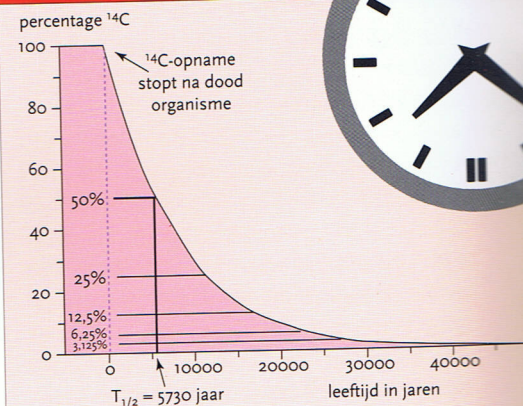
cyclus op aarde. Al het organische materiaal – alles wat leeft en heeft geleefd – bevat daardoor ^{14}C . Tijdens de groei wordt koolstof uit CO_2 via de fotosynthese vastgelegd in plantenmateriaal, zaden en bomen. Via het voedsel komt het uiteindelijk ook in mensen en dieren terecht. De verhouding van de koolstofisotopen in het organisch materiaal is door continue uitwisseling hetzelfde als in de atmosfeer.

ATOMEN TELLEN

Zodra een organisme sterft, stopt de inname van voedsel en dus van nieuw ^{14}C . Op dat moment treedt alleen nog radioactief verval op en start de ^{14}C klok. Het aanwezige ^{14}C begint te vervallen met een halveringstijd van 5730 jaar, terwijl de hoeveelheid ^{12}C gelijk blijft. Anders gezegd: als je start met één gram van de radioactieve isotoop, vind je over 5730 jaar nog een halve gram terug. Dit proces is nauwkeurig te meten met radio-metrie: het tellen van het aantal atomen dat vervalt. Door in een archeologische



HOE LANG AL?



^{14}C -datering is één van de weinige methoden waarmee direct kan worden gemeten aan het verleden. Uit de halveringstijd van ^{14}C valt de ouderdom van een monster af te lezen: na 5730 jaar is de helft van dit radioactieve isotoop over, na 11.460 jaar een kwart, enzovoorts.

vondst de $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ -verhouding te meten en die te vergelijken met de huidige isotopenverhouding, kan men vervolgens de ouderdom bepalen. Deze methode werd in 1949 door de Amerikaan Willard Libby en zijn collega's ontwikkeld aan de University of Chicago. Voor deze ontdekking ontving Libby in 1960 de Nobelprijs voor scheikunde.

De koolstofdatering is bij al het materiaal van biologische oorsprong mogelijk, zoals plantenresten, botten, schelpen (carbonaat), kleding en hout. Maar ook voor andere materialen, zolang er maar koolstof in zit: oud water met opgelost koolstofdioxide bijvoorbeeld, of ijskernen met ingevangen lucht of methaangas. 'Eenjarige' materialen zoals zaden, granen, boomringen en haren hebben overigens de voorkeur. Dit geeft een exacte tijd aan. Materialen als hout hebben een langere groeiperiode en werden vaak her-

MODERNE MASSASPECTROMETRIE

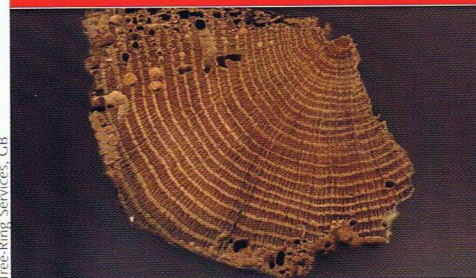


Seoul National University, Zuid-Korea

Door *accelerator mass spectrometry* (AMS) kunnen onderzoekers de ouderdom van archeologische monsters bepalen. Daartoe wordt eerst een kleine hoeveelheid van het monster verbrand, waarbij CO_2 ontstaat. Van dit CO_2 wordt grafiet gemaakt, dat vervolgens wordt gebombardeerd met caesiumionen waardoor er negatief geladen ionen ontstaan. Dit is van belang omdat ^{14}N , het isobaar van ^{14}C , geen negatieve ionen kan vormen. Vervolgens gaat het monster een deeltjesversneller in, waarna met behulp van elektrische en magnetische velden ionen met atoommassa 12, 13 en 14 van elkaar worden gescheiden. Bij het versnellen worden isobare moleculen (zoals $^{12}\text{CH}_2^-$ en $^{13}\text{CH}^-$) opgebroken. Anders dan bij klassieke radiometrie wordt met deze aanpak niet het verval gemeten van ^{14}C -kernen, maar bepaalt men de $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ verhouding waaruit de ouderdom kan worden afgeleid. Groot voordeel van AMS is – naast de snelheid – de geringe hoeveelheid materiaal die nodig is voor een bepaling.

Tree-Ring Services, GB

IJKEN MET BOMEN



De samenstelling van de atmosfeer is in de loop der eeuwen niet constant geweest. Door veranderingen in de zonneactiviteit (en daarmee de hoeveelheid invallende kosmische straling) kwam er soms méér of juist minder ^{14}C in de atmosfeer voor. Daarnaast is het ^{14}C -gehalte onder meer afhankelijk van het CO_2 -evenwicht tussen de oceanen en de atmosfeer. Om het resultaat van een ^{14}C -meting voor deze schommelingen te corrigeren, hebben wetenschappers een ijkgrafiek gemaakt met behulp van boomjaarringen: door alsmaar overlappende boomringen aan elkaar te passen slaagden dendrochronologen erin een historische kalender samen te stellen. Door van vele jaarringen het ^{14}C -gehalte te bepalen, kreeg men de ijkgrafiek in handen die 14.000 jaar terugloopt. Voor vroegere periodes schieten de boomringen tekort, omdat het toen door de ijstijd te koud was. De ijkgrafiek is in 2004 verder ingevuld met ^{14}C -metingen aan kalkafzettingen van koralen en foraminiferen.

gebruikt, waardoor de ouderdom van het hout en de vindplaats sterk kunnen verschillen.

CORRIGEREN

Het dateren met koolstof klinkt misschien eenvoudig, maar in de praktijk maakt een aantal fysische en biologische factoren deze methode vrij gecompliceerd. Zo is de radioactiviteit van ^{14}C extreem laag: vergelijkbaar met de natuurlijke radioactieve achtergrondstraling op aarde. Daar komt bij dat de energie van de elektronen die bij het verval worden uitgestoten erg laag is en dat de bepaling wordt verstoord door het verval van andere radio-isotopen, met name radon (^{222}Rn).

Verder speelt het verschijnsel dat organismen bepaalde isotopen selectief opne-

men. Biologische processen in de cel hebben een voorkeur voor de lichtere koolstof-isotoop ^{12}C , waardoor er minder ^{14}C wordt opgenomen dan er verhoudingsgewijs in de atmosfeer zit. Dit zou een vondst verder terug in de tijd plaatsen dan werkelijk het geval is. Omdat die selectieve opname ook geldt voor ^{13}C kunnen onderzoekers de meetwaarde corrigeren.

OPOFFEREN

De ^{14}C -methode is helaas een destructieve methode en bovendien moet door de geringe hoeveelheid ^{14}C veel materiaal opgeofferd worden om één bepaling te kunnen doen. Dat ligt natuurlijk lastig bij unieke vondsten en relikwieën, zoals zeldzame botten van uitgestorven dieren, mummies, neanderthalers en de veenlijken in Drenthe.

BOT VANGEN

Niet al het oude organische materiaal is geschikt voor ^{14}C -datering. Het gaat om de juiste fractie van een monster. Bot bestaat uit collageen (30%), een vezelachtig eiwit dat zorgt voor de stevigheid, en het anorganische mineraal apatiet (70%). In dit mineraal zit voornamelijk calciumfosfaat $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ en calciumcarbonaat (CaCO_3). Collageen is het dateerbare bestanddeel van bot, want dit eiwit is ongevoelig voor vervuiling met koolstof. Het apatiet wisselt daarentegen koolstof uit met de omgeving, waardoor metingen weinig zeggen over de werkelijke ouderdom.

Met verbrande of gecremeerde botten konden wetenschappers vroeger weinig beginnen, aangezien het collageen daar compleet uit verdwenen is. Totdat enkele jaren geleden bleek dat het apatiet uit bot toch gebruikt kan worden voor ^{14}C -analyse, mits het in het verleden tot 600 °C is verhit. Het koolstof is dan gefixeerd in een nieuwe stabiele fase. Kampvuurtjes komen maar tot 300 °C, maar brandstapels die in de bronstijd veel werden toegepast halen deze temperaturen wel. Ook aardewerk dat bij hunebedden is gevonden bevat gecremeerd botmateriaal.

Sinds de komst van deeltjesversneller massaspectrometrie (*accelerator mass spectrometry*, AMS) een tiental jaren geleden is er veel verbeterd. Was bij de klassieke telmethode minstens een half dijbeen nodig om voldoende ^{14}C te vergaren, bij AMS volstaat al een stukje bot van vijftig milligram. Dat scheelt een factor 1000. De AMS meet zo gevoelig doordat het apparaat direct de individuele atomen telt. Praktisch voordeel is bovendien dat de bepaling slechts een uur tijd kost. Het klassieke tellen van het ^{14}C -verval neemt daarentegen twee tot drie dagen in beslag. Deze geavanceerde apparatuur staat bij het Centrum voor Isotopen Onderzoek van de Rijksuniversiteit Groningen.

De grens van de ^{14}C -methode lijkt voorlopig trouwens bereikt. Voorwerpen die ouder zijn dan 50.000 jaar kunnen momenteel niet met ^{14}C worden gedateerd. Hoewel onderzoekers al wel pogingen hebben ondernomen, blijkt de hoeveelheid radioactief koolstof na zoveel tijd toch echt te klein. De tijd zal leren of dat zo blijft.

Onderzoek aan DNA uit historische resten levert een reconstructie op van het evolutionaire verleden. Grootste knelpunt is echter dat DNA snel **degradeert**. Hoe betrouwbaar zijn de resultaten?

DNA uit de oude doos

In het bloed van stokoude muggen vinden wetenschappers stukjes DNA van dinosaurussen. De ontbrekende fragmenten vullen ze aan met kikker-DNA en de wederopstanding van miljoenen jaren geleden uitgestorven dieren is een feit. Ziedaar het scenario van Steven Spielbergs *Jurassic Park*. De film was een grote hit, maar heeft het onderzoek naar oud DNA een slechte naam gegeven. DNA van miljoenen jaren oud bestaat eenvoudigweg niet. De maximale grens is momenteel 50.000 tot 100.000 jaar. Alleen bij uitzonderlijke bewaarcondities kan DNA langer 'overleven'.

Het onderzoek naar oud DNA werd eind jaren tachtig gestart door onderzoeker Svante Pääbo van het Max Planck Instituut in Leipzig, die DNA-analyses deed bij Egyptische mummies. Toen enkele jaren later de PCR-techniek (*poly-*



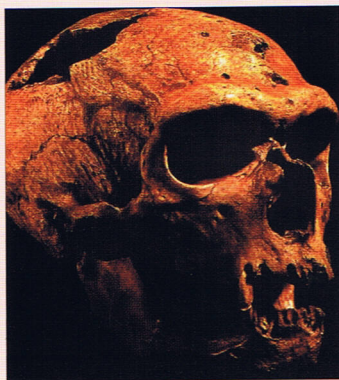
merase chain reaction) breed beschikbaar kwam en laboratoria daardoor snel DNA konden vermenigvuldigen, nam dit soort onderzoek een hoge vlucht. Het werd een ware wedren: de eerste onderzoeksgroep meldde de isolatie van DNA van één miljoen jaar oud, maar werd snel overtroefd door de volgende met DNA dat nog enkele miljoenen jaren ouder zou zijn. In hun jacht op wetenschappelijke roem zagen

onderzoekers eenvoudige controle-experimenten over het hoofd. Spectaculaire claims, zoals van de Amerikaanse microbioloog Scott Woodward die in 1994 meende het DNA geïsoleerd te hebben van dinosaurussen van tachtig miljoen jaar oud, bleken niets meer dan hedendaagse contaminaties. Waarschijnlijk een stukje DNA van de onderzoekers zelf.

PCR is een krachtig instrument omdat het in theorie maar één DNA molecuul nodig heeft om miljoenen kopieën te maken. Die kracht is tegelijk een valkuil bij het onderzoek naar *ancient* DNA. Menselijk DNA zit op letterlijk alles wat we aanraken. In competitie met enkele kleine DNA-fragmenten uit historisch materiaal 'wint' dat DNA het gemakkelijk in een PCR-apparaat. Dit maakt het onderzoek aan oud DNA van menselijke oorsprong extreem moeilijk. Als een gevonden sequentie anders is dan bij humaan DNA is de kans groot dat het authentiek is. Onderzoekresultaten met grote DNA-veranderingen wekken argwaan, net als het aantreffen van lange fragmenten *ancient* DNA. Doorgaans zijn de overgebleven DNA-fragmenten hoogstens 150 tot 200 basenparen lang.

EVOLUTIE VAN DE NEANDERTHALER

Onderzoekers van de Universiteit van München analyseerden in 1997 het mitochondriaal DNA van een 40.000 jaar oud bot, afkomstig van een neanderthaler die in 1856 in West-Duitsland werd gevonden. Dit DNA verschildte zó sterk met dat van de moderne Europese mens, dat de vondst de theorie omver wierp dat neanderthalers onze Europese voorouders zijn. Op basis van



dit onderzoek scheidden de evolutionaire wegen van de huidige Europeaan en de neanderthaler zich al 600.000 jaar geleden. Ter vergelijking: tussen chimpansees en de mens gebeurde dat vijf miljoen jaar geleden, terwijl het DNA van de chimpansee nog voor 98,7 procent overeenkomt

met dat van ons.

De vraag waarom het DNA van de neanderthaler zo weinig uitgewisseld is met dat van de moderne mens, houdt onderzoekers al langer bezig. Waarschijnlijk hebben ze wel naast elkaar geleefd, maar hebben ze nooit samen nakomelingen gekregen. Bij het Max Planck Instituut in Leipzig onderzoekt men de hypothese of dat misschien komt doordat de neanderthaler niet kon praten. Moderne mensen die 'stom' zijn hebben in het zogeheten FOXP2-gen twee mutaties zitten. De Duitse onderzoekers gaan nu in het DNA van neanderthalers op zoek naar dit gen, in de hoop daar soortgelijke mutaties aan te treffen. |

CONTROLES

Alle commotie heeft geleid tot criteria waaraan wetenschappelijk onderzoek naar oud DNA moet voldoen. Dat begint met procedures, zoals het reproduceren van de resultaten en het uitvoeren van controles. Dit geldt zowel voor de DNA-extractie als voor de PCR. Beide technieken moeten in aparte en steriele ruimten uitgevoerd worden. In Nederland is in 2005 het Leidse Ancient DNA-laboratorium geopend, dat onderzoekers *clean room* faciliteiten biedt voor studies aan oud DNA.

Voor de PCR-reactie moet ook de juiste primer beschikbaar zijn. Een primer

CHEMISCHE AFBRAAK



De DNA-helix bestaat uit adenosine (A), cytosine (C), guanine (G) en thymine (T), die paarsgewijs aan elkaar binden. Depurinatie, oxidatie en hydrolyse beschadigen de helix.

Zodra een plant, dier of mens sterft begint het DNA te degraderen. Zelfs na een historische korte periode van een paar jaar is het DNA in gemummificeerd materiaal bij kamertemperatuur al uit elkaar gevallen in kleine fragmenten van 100 tot 200 basenparen. Dit maakt de speurtocht naar oud DNA lastig. De snelheid waarmee DNA degenerereert hangt sterk af van de bewaarcondities. In koele, droge en donkere omstandigheden kunnen nog DNA-resten van 100.000 jaar geleden worden gevonden. Blootstelling aan water, zuurstof, warmte en licht is echter funest. Onderzoekers graven daarom nu in ijs, permafrost, diepzee-sedimenten en zout voor oud DNA uit organismen.

Chemisch gezien staat DNA aan spontane degradatie bloot door hydrolyse en oxidatie. Bij hydrolyse breekt de suikerketen van het DNA-molecuul in stukken en splitsen aminogroepen en basen af – met name de twee purines (adenine en guanine). Oxidatiereacties verstoren de DNA-structuur op plaatsen met een dubbele binding, zowel in de pyrimidines (cytosine en thymine) als de purines.

Ook de suikerketen kan doelwit van oxidatiereacties zijn. Verder treden nog modificaties van het DNA op door zogeheten cross-linking: condensatiereacties die niet alleen plaatsvinden tussen DNA en eiwitten, maar ook tussen DNA-moleculen onderling.

Deze chemische reacties stellen onderzoekers naar oud DNA voor problemen. Plekken in het DNA die beschadigd zijn door oxidatie blokkeren bijvoorbeeld de werking van het enzym polymerase tijdens een PCR. Door degeneratie is er bovendien minder DNA voorhanden, zijn de resterende fragmenten heel kort en worden er door chemische veranderingen leesfouten veroorzaakt in de sequentie. Dat laatste komt het meest voor bij cytosine. Door deaminering van cytosine lijkt het bij sequentie-bepalingen alsof er een thymine op die plek zit. Dergelijke fouten zijn er overigens uit te filteren door bij het geïsoleerde DNA meerdere PCR's en kloneringsanalyses uit te voeren. Niet alle cytosines zijn namelijk gedeamineerd, en vaak ook niet op exact dezelfde plaats.

is een kort stukje DNA dat het geïsoleerde DNA herkent en dat het startpunt vormt voor replicatie. Omdat de DNA-sequenties van uitgestorven soorten onbekend zijn, nemen wetenschappers de primers van de meest verwante nog levende soort. Zo zijn voor het sequencen van mammoet-DNA primers gebruikt die afkomstig waren van olifanten. Voor het DNA uit 20.000 jaar oude kaken van Russische woelmuizen gebruiken Leidse onderzoekers echter specifieke woelmuisenprimers, omdat deze soort ook nu nog bestaat.

Niet alleen controles tijdens de analyse zijn noodzakelijk, ook tijdens de monsternamen bestaat kans op besmetting van het materiaal. Onderzoekers die begin 2006 in Eindhoven goedbewaarde skeletten uit de periode 1200-1850 opgroeven, gingen daarom op een overkapte locatie aan de slag in steriele witte pakken en

handschoenen. De opgegraven tanden en kiezen gingen direct in de vriezer voor verder onderzoek.

DNA-SOORTEN

Doordat botten, tanden en kiezen een van de beste bronnen vormen voor oud DNA, hebben bioarcheologen hun oog laten vallen op museumcollecties. Die bevatten immers een schat aan zeldzame of uitgestorven dieren, zoals de dodo en de mammoet. Maar ook oude overblijfselen zoals maaginhoud en uitwerpselen (zogeheten *coprolieten*) hebben de interesse gewekt. Conservatoren van musea staan echter niet te springen om hun collectie door onderzoekers tot pulp te laten vermalen om de laatste overgebleven resten DNA eruit te extraheren. Daarom wordt naarstig gezocht naar methodes die DNA op een niet-destructieve manier isoleren. Biologen van het

Nationaal Herbarium Nederland dompelden bijvoorbeeld complete insecten onder in een extractievloeistof om orchideeë-DNA los te weken uit stuifmeelzakjes op de kop van de beestjes.

Eenmaal geïsoleerd is het belangrijk om wat voor soort DNA het gaat. Dierlijke cellen bevatten namelijk twee typen DNA: mitochondriaal en nucleair. Planten bevatten daarnaast nog DNA uit chloroplasten. De hoeveelheid mitochondriaal en chloroplast DNA is een factor 100 tot 1000 hoger dan het DNA uit de celkern. Omdat van het mitochondriaal DNA het meeste overblijft zijn alle studies hierop gebaseerd. Nadeel is wel dat dit DNA alléén de informatie bevat voor de energiehuishouding: bij zoogdieren gaat het daarbij om ongeveer 37 genen. Verwantschap tussen soorten zijn wel met mitochondriaal DNA te achterhalen, maar de code voor interessante eigenschappen die de morfologie, fysiologie en het gedrag bepalen, zit in het nucleaire DNA.

Voor *ancient DNA*-analyse is er recent een nieuwe machine op de markt gekomen. Dit apparaat is in staat de sequentie te bepalen van één enkel DNA-fragment van circa 100 baseparen. Dit is ideaal voor oud nucleair DNA, waardoor wetenschappers straks ook naar andere eigenschappen kunnen kijken. Het Max Planck Instituut in Leipzig is al bezig om het nucleaire DNA van de mammoet te analyseren. Ook hun volgende kandidaat is al bekend: de neanderthaler.

1 isoleren oud DNA

2 PCR

3 DNA-sequencing

Oude genen krijg je niet zomaar in handen. Om verontreiniging met 'modern' DNA te voorkomen moet het *ancient DNA* eerst zorgvuldig worden geïsoleerd. Vervolgens wordt het met behulp van de polymerase ketting reactie (PCR) geamplificeerd, waarna tot slot DNA-sequencing plaatsvindt om de precieze volgorde van de DNA-bouwstenen te bepalen.

Meer weten

AANBEVOLEN LITERATUUR

- Martin Jones, *The Molecule Hunt, Archaeology and the Search for Ancient DNA*, (2002) Penguin UK
- *Traces of the Past: Unraveling the Secrets of Archaeology Through Chemistry*, Joseph B. Lambert, Perseus Books Group (1997)
- *Archaeological Chemistry*: Mark Pollard and Carl Heron, The Royal Society of Chemistry (1996)

AANBEVOLEN WEBSITES

- www.archis.nl: Rijksdienst voor Oudheidkundig Bodemonderzoek
- www.archis.nl/noaa/: Nationale Onderzoeksagenda Archeologie, met hoofdstukken over natuurwetenschappelijke onderzoeksmethoden
- www.archeonet.nl, www.archeonieuws.nl, www.geo.uu.nl: nieuws over archeologie
- www.vpro.nl/programma/madiwodo/dossiers/10847015/: een week lang graven in de archeologie, radioprogramma Madiwodo uit 2003
- www.c14dating.com: dateren van materiaal met ^{14}C

VOOR OP SCHOOL

1. Optisch gestimuleerde luminescentie wordt gebruikt voor het dateren van anorganisch materiaal. Het is een variant op thermische luminescentie. Leg uit hoe beide technieken werken en wat de verschillen/overeenkomsten zijn.
2. Fosfaten hechten aan bodemdeeltjes en kunnen daardoor duiden op de aanwezigheid van vergane botten. Wat maakt nitraten ongeschikt als indicator voor ontlede lichamen in de grond?
3. Sommige beekjes en meertjes hebben een waterdoorlaatbare bodem van ijzeroer (Fe_2O_3). Onder zuurstofvrije omstandigheden is Fe^{2+} stabiel en vormt het matig oplosbare zouten. In aanwezigheid van zuurstof ontstaan echter



De ^{14}C -datering zette de historie van het beroemde Paaseiland op losse schroeven. Wat bleek? De bewoning en ontbossing door Polynesiërs dateren van na 1200, en niet zoals eerder gedacht werd van het jaar 400.

slecht oplosbare zouten met Fe^{3+} . Geef aan hoe door wisseling van de grondwaterstand een 'ijzeren' bodem kan ontstaan.

4. Noem enkele randvoorwaarden die bomen geschikt maken voor de datering van vondsten uit een ver verleden.
5. Calciumcarbonaat in botten verliest minder ^{14}C dan verwacht door uitwisseling met opgelost koolstofdioxide in (bodem)water. Geef de evenwichtsvergelijkingen om dit te illustreren.
6. Teken schematisch een dwarsdoorsnede van een bot en geef aan uit welke componenten het bestaat.
7. Maak een model waarmee je met overlappende jaarringen van bomen een tijdbalk vormt.
8. Volgens welke reactievergelijkingen verloopt de hydrolyse van een DNA-fragment in een waterig (zuur, basisch of neutraal) milieu?
9. Geef de vergelijking voor de deaminering van de DNA-bouwsteen cytosine, waarbij uracil ontstaat. Waardoor lijkt op de plek van cytosine een thymine aanwezig te zijn?
10. Stel je hebt een enkelstrengs DNA-fragment dat bestaat uit ATT TCC GTT AAC GTA. Wat is het effect bij vermeerdering van dit fragment met PCR als cytosine (C) een aminegroep kwijt is? Kies als startfragment TAAAG en teken het gevormde dubbelstrengs DNA.

COLOFON

Chemische Feitelijkheden: actuele encyclopedie over moleculen, mensen, materialen en milieu. Losbladige uitgave van de KNCV, verschijnt drie maal per jaar met in totaal tien onderwerpen.

Redactie:
Alexander Duyndam (C2W)
Marian van Opstal (Bèta Communicaties)
Arthur van Zuylen (Bèta Communicaties)
Gerard Stout (Noordelijke Hogeschool Leeuwarden)

Basisontwerp: Menno Landstra

Redactie en realisatie:
Bèta Communicaties
tel. 070-306 07 26
betacom@planet.nl

Uitgever:
Roeland Dobbelaar
Bèta Publishers
Postbus 249, 2260 AE Leidschendam
tel. 070-444 06 00
fax 070-337 87 99
info@betapublishers.nl

Abonnementen opgeven:
Abonnementenland
De Trompet 1739, 1967 DB Heemskerk
tel. 0251-31 39 39
fax 0251-31 04 05
aboservice@aboland.nl

Abonnementen kunnen elk moment ingaan. Abonnementen worden automatisch verlengd tenzij vóór 1 november van het lopende jaar een schriftelijke opzegging is ontvangen.

Abonnementen:
• papieren editie en toegang tot digitaal archief op internet: eerste jaar (inclusief verzamelmap): € 90,-
KNCV- en KVCV-leden: € 80,-
tweede jaar en verder: € 56,-
KNCV- en KVCV-leden: € 46,-

• alleen toegang tot digitaal archief op internet:
eerste jaar: € 70,-
KNCV- en KVCV-leden: € 60,-
tweede jaar en verder: € 45,-
KNCV- en KVCV-leden: € 40,-

MOLECULAIRE ARCHEOLOGIE

editie 51
nummer 231
november 2006

Met dank aan:

- Prof.dr. Henk Kars, Vrije Universiteit Amsterdam, e-mail henk.kars@falw.vu.nl
- Prof.dr.ir Hans van der Plicht, Centrum voor Isotopenonderzoek Groningen (RuG), e-mail: j.van.der.plicht@rug.nl
- Dr. Klaas Vrieling, Universiteit Leiden, e-mail: vrieling@rulsfb.leidenuniv.nl