

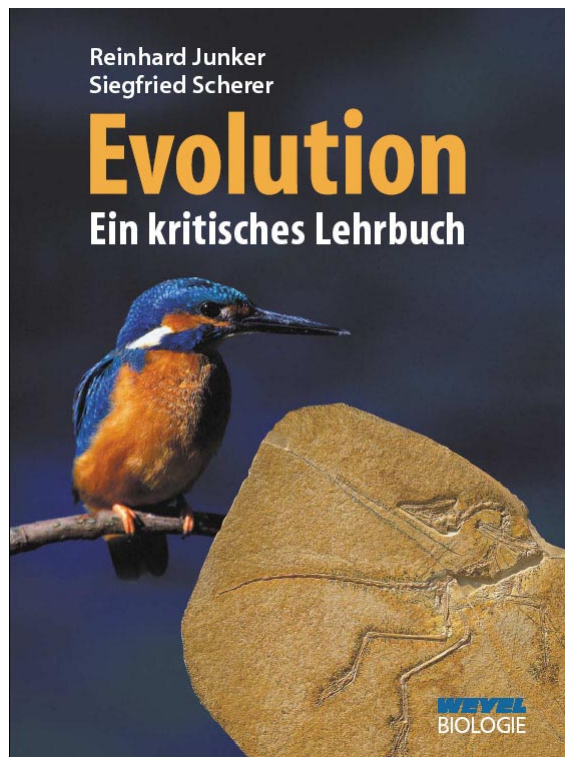
Hypothesen zur Evolution von Bakteriophagen-Holinen

von Siegfried Scherer

Ergänzung zum Abschnitt VII.16.6.2 „Überlappende Gene“
von „Evolution – ein kritisches Lehrbuch“

Stand: Juni 2008

© 2008 Studiengemeinschaft Wort und Wissen e. V.
www.evolutionslehrbuch.info



Hypothesen zur Evolution von Bakteriophagen-Holinen

Siegfried Scherer
 Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie
 Department für Grundlagen der Biowissenschaften
 Technische Universität München
 Weihenstephaner Berg 3
 D-85354 Freising

„Holins are remarkable proteins, honed by powerful evolutionary forces to be the simplest and most adjustable [...] biological timers. [...] However, there is very little mechanistic insight into how holins work, however elegant and amusing the phenomenology.“ YOUNG & WANG, 2006

Zusammenfassung

Bakteriophagen sind Viren, welche Bakterienzellen befallen und sich auf Kosten dieser Wirtszellen vermehren. Die Zelle wird am Ende des Infektionszyklus lysiert und die Bakteriophagen-Nachkommen werden freigesetzt. Die Lyse der Wirtszelle hängt häufig von einem Holinprotein ab, welches Läsionen in der Cytoplasmamembran erzeugt. Durch diese „Löcher“ können zellwandlytische Endolysine des Bakteriophagen die Zellwand erreichen und zerstören, was dann zur schnellen Zellyse führt. Holine sind eine diverse Gruppe von Membranproteinen mit mehr als 50 Familien, was als Beleg für eine einfache Evolvierbarkeit angesehen wurde. Allerdings sind Bakteriophagen auch hinsichtlich der anderen Proteine die diverseste Gruppe aller „Lebewesen“.

Sind natürliche Prozesse bekannt, welche eine Entstehung von Holinen plausi-

bel erscheinen lassen? Und wie könnte man sich die Entstehung eines Holingens erklären, welches komplett in das Gen eines zellwandlytischen Proteins eingebettet ist, aber in einem anderen Leseraster („out-of-frame“) abgelesen wird? Am Beispiel bekannter Holinstrukturen wird eine phantasievolle evolutionäre Geschichte zur Entstehung dieser Proteine erzählt. Diese Geschichte wird dann anhand verfügbarer experimenteller Daten zur Struktur-Funktionsbeziehung von Holinen einem „reality check“ unterworfen. Dabei ergibt sich, dass die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Holinen durch bekannte biologische Prozesse sehr klein ist. Aufgrund von Datenmangel ist aber selbst eine semi-quantitative Abschätzung der Entstehungswahrscheinlichkeit nicht sinnvoll möglich. Deshalb kann derzeit nur festgestellt werden, dass man nicht weiß, wie ein Holin-Gen *de novo* entstanden sein könnte. Diese Schlussfolgerung gilt auch für das Holin-ähnliche Protein Hol187 des *Staphylococcus aureus* Phagen 187, das in einem anderen Leseraster innerhalb eines Gens völlig verschiedener Funktion codiert wird.

Die Erzählung einer evolutionären Geschichte zur Holin-Entstehung ist ein wichtiger Teil des wissenschaftlichen Erkenntnisprozesses, weil sie zur Konzeption von Experimenten führen kann, welche die Geschichte bestätigen oder zum Widerspruch führen. Die experimentelle Prüfung steht bezüglich der Holine noch weitgehend aus. Es liegt eine Wissenslücke der Evolutionsbiologie vor. Wissenslücken sind jedoch nicht geeignet, um die „Unmöglichkeit“ eines postulierten Evolutionsprozesses zu beweisen.

Einleitung

Jede DNA Sequenz kann theoretisch in sechs verschiedenen Leserastern in eine Proteinsequenz übersetzt werden. Normalerweise wird davon nur ein Leseraster benutzt, dieses wird als das codierende Leseraster bezeichnet. In einigen Fällen wurde jedoch beobachtet, dass DNA Sequenzen für mehr als ein Protein codieren, wobei verschiedene Leseraster benutzt werden. Solche Gene nennt man auch **überlappende Gene**. Wenn ein Leseraster komplett in einem anderen Leseraster liegt, nennen wir das ein **eingebettetes Gen**. Diesen Befund kennt man schon lange von Bakteriophagen¹. Sie kommen aber auch bei anderen Viren, die eukaryotische Zellen befallen, vor. Überlappende Gene findet man auch in bakteriellen und eukaryotischen Genomen. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass überlappende Gene insgesamt recht häufig vorkommen, allerdings sind außerhalb von Viren bisher nur wenige eingebettete Gene nachgewiesen (WINKLER, 2008).

Im Rahmen der Charakterisierung von Mechanismen, wie Bakteriophagen nach erfolgreicher Infektion der Wirtszelle und Synthese der Viren-Nachkommen aus der Wirtszelle entkommen, wurden in meiner Arbeitsgruppe mehrere Phagen von bakteriellen Krankheitserregern, wie *Staphylococcus aureus* (LOESSNER et al., 1998; LOESSNER et al., 1999), *Listeria monocytogenes* (LOESSNER & SCHERER, 1995; LOESSNER et al., 2000), *Bacillus cereus* (LOESSNER et al., 1997) und *Clostridium perfringens* (ZIMMER et al., 2002) untersucht. In der Regel fanden wir die schon länger bekannten Holin-Endolysin-Systeme (YOUNG et al., 2000). Dabei stand zunächst eine biotechnologische Anwendung dieser lytischen Systeme im Vordergrund (LOESSNER, 2005), später begannen wir anhand von *Listeria monocytogenes* Phagen auch die Funktion der Holine zu untersuchen (VUKOV et al., 2000; VUKOV et al., 2003).

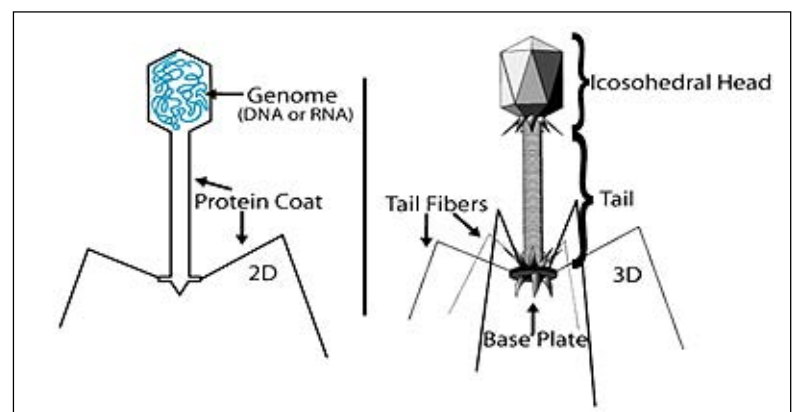
Unsere außergewöhnlichste Beobachtung war vielleicht der Befund, dass ein Gen in einem +1 Leseraster in dem zellwandlytischen Gen des *Staphylococcus* Bakteriophagen 187 eingebettet ist (LOESSNER et al., 1999), welches wir als Klasse II Holin-Gen interpretiert haben. Solche Befunde geben Anlass zu der Frage, ob ein

solches Konstrukt durch bekannte Evolutionsprozesse entstehen kann. Diese Frage wird in (JUNKER & SCHERER, 2006) kritisch, aber nur kurz diskutiert. Eine umfassendere Literaturübersicht zu überlappenden Genen gibt WINKLER (2008). In der vorliegenden Arbeit wird die Entstehung von Holinen im Allgemeinen und des überlappenden Gens *hol187* des *Staphylococcus*-Phagen 187 im speziellen vertieft diskutiert. Dafür ist es notwendig, zunächst eine Einführung in die Lebenszyklen von Bakteriophagen zu geben (Näheres dazu in jedem Mikrobiologielehrbuch, z.B. MADIGAN & MARTINKO, 2006). Darauf aufbauend werde ich die Funktion der Holin-Endolysin-Systeme von Bakteriophagen, die molekulare Struktur und Funktion eines besonderen Klasse II Holins und eine an molekularbiologischen Daten orientierte Hypothese zur Evolution der Holin-Endolysin-Systeme diskutieren. Auf dieser Grundlage werden dann Randbedingungen für die Entstehung eines *out-of-frame* codierten Gens wie *hol187* formuliert.

Lebenszyklen von Bakteriophagen

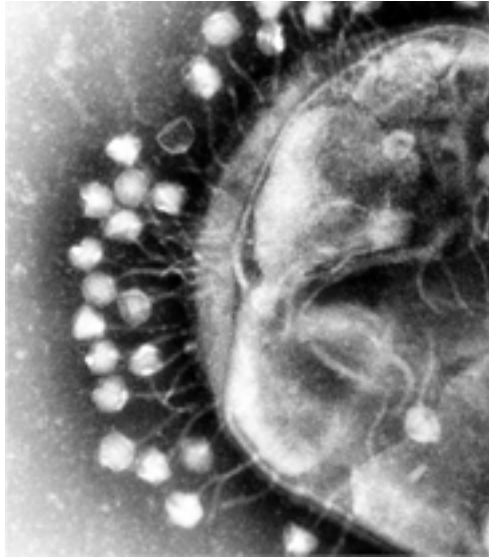
Bakteriophagen sind Proteinpartikel, welche Erbsubstanz (DNA oder RNA) enthalten. Eine häufige Grundstruktur ist in Abb. 1 dargestellt. Die Proteinpartikel binden mit Rezeptoren an die Oberfläche von Bakterienwirtszellen (Abb. 2) und injizieren dann ihre Erbsubstanz in den Wirt. Viele Bakteriophagen haben zwei Lebenszyklen, welche verschiedenen Überlebensstrategien entsprechen. Im lysogenen Zyklus wird die meist lineare DNA der Phagen nach der Bindung an die Zelloberfläche der Bakterien in die Wirtszelle injiziert und im Cytoplasma zu einem Ring geschlossen. Über homologe Re-

Abb 1: Schemazeichnung eines *E. coli* „T-even“ Bakteriophagen (public domain)



¹ Bakteriophage heißt soviel wie „Bakterienfresser“, es handelt sich um Viren, welche Bakterien befallen.

Abb 2: Bakteriophagen binden an die Zelloberfläche eines Bakteriums (public domain)



kombination wird die ringförmige Phagen DNA an der *attachment site* in das Wirtsgenom eingebaut (Integration durch ein besonderes Phagenenzym), verbleibt dort inaktiv auf unbestimmte Zeit und die Phagen DNA vermehrt sich nur durch die Verdopplung der Wirtszelle. Aufgrund äußerer Umstände (Stress) oder auch spontan durch Excision (Ausschneiden der Phagen DNA aus dem Wirtsgenom) kann der Phage vom lysogenen Zyklus in seinen lytischen Zyklus wechseln. In einem zeitlich sehr genau gesteuerten Prozess der differentiellen Genexpression wird zunächst die DNA des Phagen repliziert, danach werden die Phagenköpfe (Capside) zusammengebaut und dann wird das Erbgut des Phagen in den Kopf verpackt. Nun ist die Wirtszelle mit fertigen Phagen-Nachkommen angefüllt, die freigesetzt werden müssen, damit weitere Wirtszellen infiziert werden können. Diese Freisetzung bezeichnet man als Lyse, dabei werden Cytoplasma-Membran und Zellwand der Wirtszelle gezielt zerstört. Für die Lyse dieser beiden Strukturen in der Zellhülle benutzen Bakteriophagen verschiedene Strategien (YOUNG et al., 2000; YOUNG & WANG, 2006), welche im nächsten Abschnitt kurz beschrieben werden.

Strategien zur Lyse der Wirtszellwand

I) Hemmung der Zellwandsynthese

Eine eher selten vorkommende Strategie besteht in der Bildung von Hemmstoffen, die wie

Antibiotika wirken, aber Proteine sind. Sie hemmen die Zellwandsynthese von Bakterien; der Effekt entspricht in etwa der Wirkung des Antibiotikums Penicillin, obwohl der molekulare Mechanismus anders ist (BERNHARDT et al., 2002). Dadurch lysiert die Wirtszelle und stirbt ab, was gegen Ende des lytischen Zyklus geschieht. Der Zeitpunkt der Synthese und die Aktivität des Hemmstoffes muss so gesteuert sein, dass die Auflösung des Bakteriums erst nach dem Zusammenbau der Bakteriophagen erfolgt.

II) Sekretion von zellwandlytischen Enzymen

Bakterielle Zellwände können durch spezialisierte lytische Enzyme aufgebrochen werden. Bakterien produzieren solche Proteine, die sie beispielsweise beim Wachstum zur Ausdehnung der Zellwand benötigen (autolytische Enzyme). Aber auch Eukaryoten nutzen sie zur Abwehr von Bakterien (z.B. das bekannte Lysozym in der Tränenflüssigkeit oder im Eiklar). Manche Bakteriophagen tragen ein Gen für ein zellwandlytisches Enzym (kurz: **Endolysin**), um die Bakterien von innen heraus zerstören zu können. Endolysine müssen durch die Cytoplasmamembran an die Zellwand gelangen können. Bakterien verwenden allgemein einen Sec-System genannten Sekretionsapparat für Proteine, die durch die Cytoplasmamembran transportiert werden müssen. Bei der Proteinsynthese im Cytoplasma wird am N-Terminus des Proteins eine spezifische, kurze Aminosäuresequenz synthetisiert, die man Signalsequenz nennt. Diese wird vom Sec-System erkannt und das Protein wird dann über eine komplex aufgebaute Transportpore aus der Zelle hinaus transportiert. Manche Endolysine nutzen diesen Transportweg und besitzen somit ebenfalls eine Signalsequenz. Nach dem Transport haben sie Zugang zur Zellwand und können diese zerstören. Synthese und Transport des Endolysins müssen zwingend so gesteuert werden, dass die Zellyse erst nach dem Zusammenbau der Nachkommenphagen erfolgt. Etwa ein Drittel der Phagen verfügt über sekretierte Endolysine (YOUNG & WANG, 2006).

III) Holin / Endolysinsysteme: Freisetzung von Endolysinen durch Membranläsionen

Die am weitesten verbreitete Form der Lyse von Wirtszellen durch Bakteriophagen ist ein System aus zwei Komponenten, die auch als Lysisproteine bezeichnet werden. Eine Kom-

ponente ist das Holin, ein kleines Membranprotein, welches in der Lage ist in die Cytoplasmamembran zu integrieren und diese dadurch zu perforieren. Holine werden nach ihrer Proteinsekundärstruktur in mindestens drei verschiedene Klassen aufgeteilt. Die durch Holine entstehenden Löcher sind groß genug, um dem im Cytoplasma gebildeten Endolysin den Zutritt zur Zellwand aus Peptidoglykan zu erlauben und diese dann zu zerstören. Endolysine können unterschiedliche zellwandlytische Reaktionen katalysieren, die Spezifität hängt unter anderem vom Zellwandtyp der Wirtszelle ab. Die Endolysine im Holin/Endolysin-System verfügen nicht über eine Signalsequenz für den Transport über das Sec-System. Die Funktion der beiden Lysisproteine ist fein aufeinander abgestimmt, deshalb verwundert es nicht, dass sie, bedingt durch ihre genetische Organisation, eine gemeinsame Genregulation aufweisen, die auf verschiedene Art verwirklicht ist. Nicht selten sind die Gene der beiden Lysisproteine direkt hintereinander geschaltet, wobei das down-stream (3') Ende des Holin-Gens kurz vor dem Upstream-Ende (5') des Endolysin-Gens liegt, zuweilen auch eine kurze Überlappung zeigt (für Details siehe WINKLER, 2008). Die führt zu einer engen Koppelung der Expression beider Gene. Im Folgenden werden vor allem Holin/Endolysin-Systeme weiter diskutiert.

Struktur von Holinen und Zeitpunkt der Zell-Lyse

Holine sind integrale Membranproteine. Die Insertion in die Cytoplasmamembran erfolgt durch Transmembrandomänen (=TMD, Abb. 3). Diese werden durch eine Folge von etwa 16 vorwiegend hydrophoben Aminosäuren gebildet, die insgesamt keine Nettoladung tragen. Diese Struktur inseriert in die lipophile Cytoplasmamembran und bildet dort eine transmembrane α -Helix, deren geladene Enden entweder nach innen zum Cytoplasma oder nach außen in das Periplasma weisen. Man unterscheidet drei Hauptklassen von Holinen (Abb. 4). Klasse I Holine haben drei TMDs, Klasse II Holine besitzen zwei TMDs und Klasse III Holine haben ebenfalls zwei TMDs, aber dazu einen sehr großen Endabschnitt (Carboxyterminus), der in das Periplasma lokalisiert. Schließlich gibt es einige Holine, die sich keiner dieser Klassen zuordnen lassen.

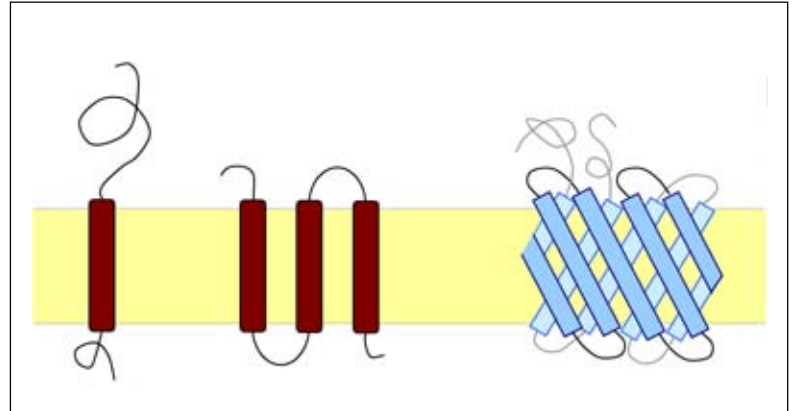
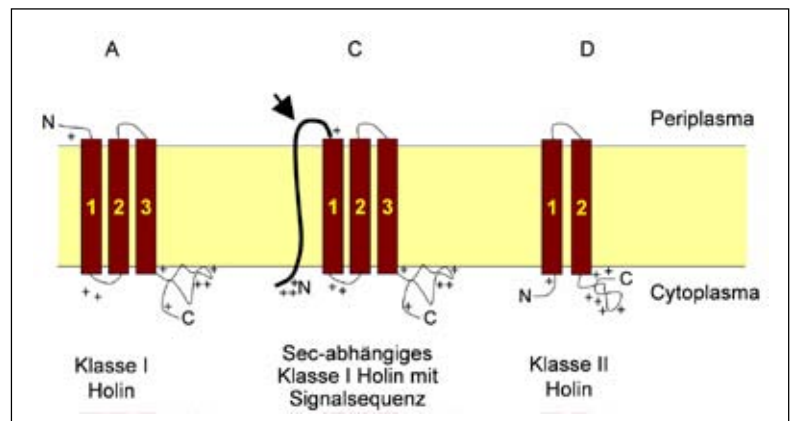


Abb 3: Die Einlagerung von Proteinen in Membranen ist auf verschiedene Weise möglich. 1, Einzelne Transmembran- α -Helix (TMD). 2, Interagierende TMD. 3, β -barrel-Transmembranstruktur.

Der Zeitpunkt der Zellyse ist für die Fitness eines Phagen außerordentlich bedeutsam (HEINEMAN & BULL, 2007; RYAN & RUTENBERG, 2007), denn davon hängt die Zahl der produzierten Phagen-Nachkommen ab. Erfolgt die Lyse zu früh, gibt es weniger oder im schlimmsten Fall gar keine Nachkommen, weil der Zusammenbau der Phagenpartikel noch nicht beendet ist. Wenn die Lyse zu spät erfolgt, dann bleiben die Phagen zu lange in der Zelle eingeschlossen und die Phagen werden daran gehindert, neue Wirte zu befallen. Das entspricht einer Verlängerung der Generationszeit und verlangsamt so die Neuinfektionsrate. Es verwundert daher nicht, dass die Steuerung für die Bildung von Membranläsionen auf verschiedenen Ebenen erfolgt, die in Tab. 1 zusammengestellt sind. Sie werden im Laufe des Textes noch näher erklärt.

Eine verbreitete Regulation erfolgt über **Anti-Holine**. Das sind Proteine, welche die Porenbildung durch Holine auf einer weiteren Ebene kontrollieren. Dabei wird das Anti-Holin *in frame* vom gleichen Gen abgelesen wie das Holin, ist aber am N-Terminus des Proteins um

Abb 4: Drei Holinklassen mit drei oder zwei Transmembrandomänen (TMD). Nach YOUNG & WANG (2006), verändert. Der Pfeil bezeichnet die Schnittstelle, an der die Signalsequenz abgeschnitten wird.



- Regulation des Zeitpunktes der Expression des Hologens über die Steuerung des beteiligten Promoters (Repressor/Aktivatorelemente)
- Transkriptionelle Regulation der Menge von gebildeten Holinproteinen über die Stärke des Promoters
- Translationale Regulation der Bildungsgeschwindigkeit von Holinmonomeren über die Stabilität der mRNA sowie über deren Struktur (Codonusage, Shine Dalgarno Sequenz)
- Regulation der Assoziation der Monomere in der Cytoplasmamembran über die Interaktion der Transmembrandomänen
- Regulation der Konformationsänderungen, die zu Membranläsionen führen, über die Potentialsensitivität der Holine
- Regulation über Anti-Holine (siehe Text)

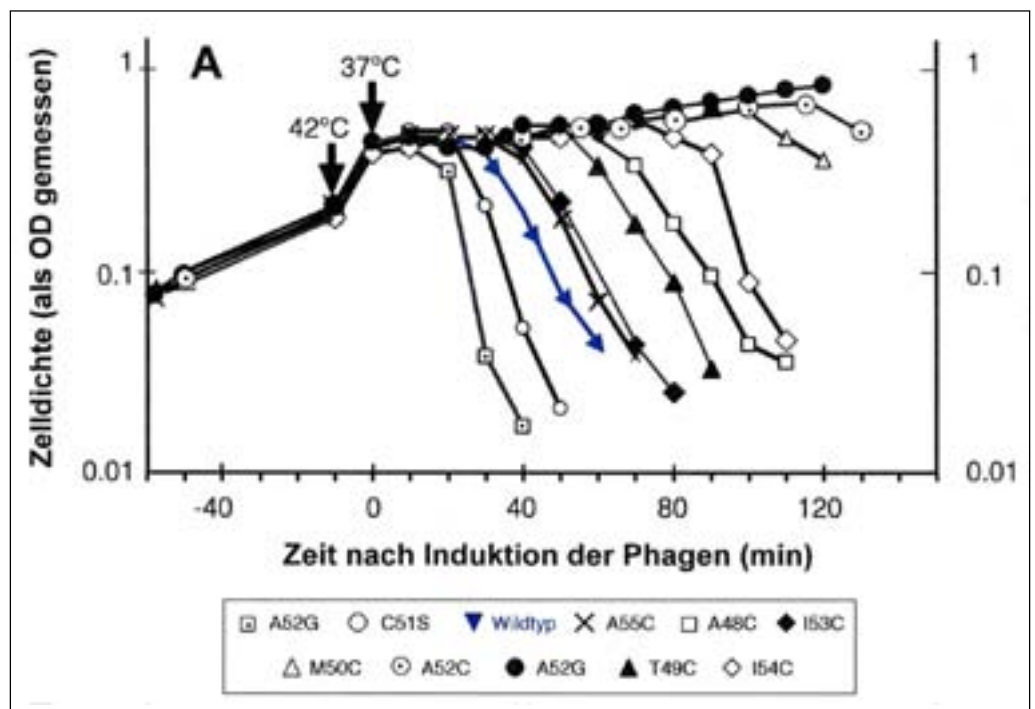
Tab. 1: Verschiedene Ebenen, auf denen die Expression und Funktion von Holinen reguliert wird.

einige wenige Aminosäuren verlängert. Das wird durch ein zweites, vorgeschaltetes Methionin-Startcodon erreicht („double-start motif“). Abgesehen von diesen wenigen Aminosäuren sind Holin und Anti-Holin identisch. Man weiß schon länger, dass das Anti-Holin die Wirkung des zugehörigen Holins hemmt. Lange Zeit war unklar, warum ein nur unwesentlich längeres Anti-Holin mit dual-start Motif als Lysis-Inhibitor fungieren kann.

Es sieht nach derzeitigen Daten so aus, dass der Zeitpunkt der Zelllyse fast ausschließlich durch die Holinstruktur programmiert ist, wobei eine bestimmte Transmembrandomäne von besonderer Bedeutung ist. GRÜNDLING et al., (2000) erzeugten eine Reihe von Punktmutatio-

nen in einem Holin-Gen und konnten zeigen, dass die Transmembrandomäne 2 des λ -Phagen Holins einen großen Einfluss auf die Zeitsteuerung der Lyse hat (Abb. 5). Die meisten Mutationen führten zu einer Verzögerung der Lyse, aber einige wenige verursachten eine teilweise drastische Verkürzung (vgl. (JOHNSON-BOAZ et al., 1994). Trotz der Wichtigkeit der Transmembrandomäne 2 spielt diese nicht die alleinige Rolle, sondern auch andere Teile des Holins sind für das Lyse-timing wichtig, obgleich diese deutlich variabler sind (BLÄSI et al., 1999; RYDMAN & BAMFORD, 2003; VUKOV et al., 2000). Insgesamt ist das Holin so konstruiert, dass über zahlreiche einzelne Aminosäureaustausche eine Feinprogrammierung des Lysezeit möglich ist.

Abb 5: Wirkung von Punktmutationen auf den Zeitpunkt der Lyse. Nach JOHNSON et al. (1994) und GRÜNDLING et al. (2000), verändert.



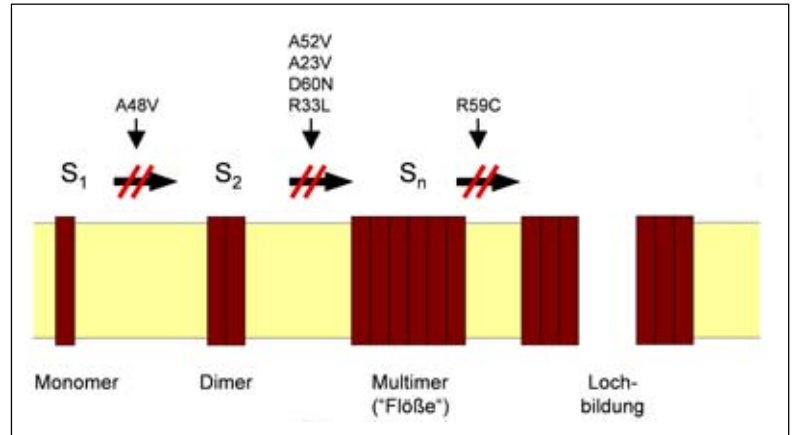
Vermutlich kann sich durch diese Konstruktion das Zeitprogramm des lytischen Zyklus eines Phagen über evolutive Feinjustierung bei Wirtswechseln an den jeweiligen Wirt anpassen.

Die Mutationsanalyse hat auch gezeigt, dass die verschiedenen Schritte der Holinaggregation in der Membran wie Dimerbildung, Oligomerbildung und schließlich Lochbildung von spezifischen Aminosäurepositionen und deren Besetzung abhängig sind (Abb. 6), denn die jeweiligen Schritte konnten durch Punktmutationen gehemmt werden (GRÜNDLING et al., 2000).

Es ist festzuhalten, dass zum einen bestimmte Punktmutationen die Lysezeit spezifizieren und andere – insbesondere wenn die Oligomerbildung betroffen ist – zu einer Funktionsminderung oder gar einem Funktionsverlust führen. Vermutlich sind aber sehr viele Mutationen neutral. Aus diesen und anderen Mutationsexperimenten der bisher untersuchten Holinproteine kann geschlossen werden, dass trotz der erheblichen Variabilität der Holine spezifische Struktur-Funktionsbeziehungen vorliegen. Allerdings beruht diese Schlussfolgerung auf dem experimentellen Studium nur weniger Holine.

Molekulares Funktionsmodell des S²¹ Holins

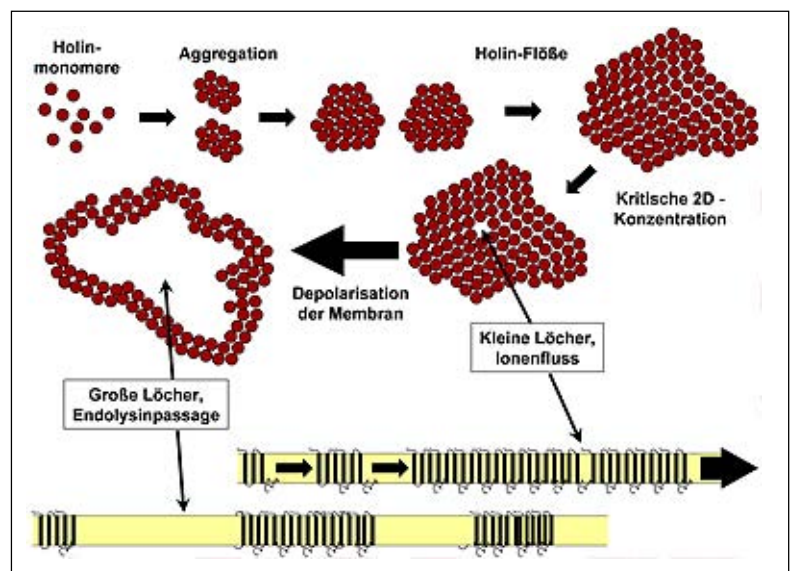
Alle Holine bilden schlussendlich, um die Lyse der Zelle zu ermöglichen, Läsionen in der Cytoplasmamembran. Ein hypothetisches Modell nach WANG (2003) sieht folgendermaßen aus (Abb. 7): Wenn der Bakteriophage die Holinsynthese startet, beginnen sich die monomeren Holinproteine in der Cytoplasmamembran im Verlaufe des Infektionszyklus anzureichern. Sie bilden bei hinreichender Konzentration durch Interaktion „Holinflöße“ in der Membran. Bei kritischen Dichten (sozusagen zweidimensionale „Konzentrationen“) wechselwirken die Transmembrandomänen lateral (seitwärts), so dass kleine Poren entstehen („pin holes“), diese führen zur Erniedrigung des Membranpotentials durch Ionenleckfluss. Holinproteine sind gleichzeitig empfindliche Sensoren für das Membranpotential. Wenn sich dieses durch den Ionenleckfluss erniedrigt, reagieren sie mit der Bildung von großen Poren, welche dann den Lysin den Durchtritt durch die Membran gestatten. Wie die Porenbildung genau vor sich geht, ist Gegenstand aktueller Forschung und unterscheidet sich vielleicht bei den verschiedenen Holinen.



Eine kürzlich erschienene Studie über ein besonderes Holin hat zu einer interessanten Hypothese seiner Funktion geführt. PARK et al. (2006) untersuchten das Klasse II Holin des *E. coli* Phagen 21. Dieser Phage zeichnet sich dadurch aus, dass er sein zellwandlytisches Enzym über die Proteinsekretion des Sec-Weges in den periplasmatischen Raum transportieren lässt, sein Holin, welches er trotzdem besitzt, ist also nicht notwendig um dem Lysin den Zutritt zur Zellwand zu ermöglichen. Außerdem handelt es sich bei diesem Lysin insofern um ein besonderes Protein, als dass es nach dem Export zunächst mit einer SAR-Transmembrandomäne als inaktives Molekül in der Cytoplasmamembran verankert bleibt. SAR bedeutet „Signal Anchor Release Domain“ (XU et al., 2005). Diese Transmembrandomäne kann, ausgelöst durch Membrandepolarisation, die Mem-

Abb 6: Wirkung von Punktmutationen auf die Aggregation von Holin-Monomeren in der Membran. Die bezeichneten Mutationen verhindern den angegebenen Schritt. Nach GRÜNDLING et al. (2000), verändert.

Abb 7: Schematische Darstellung der Aggregation von Holin-Monomeren und Bildung von kleinen und großen Läsionen. Oben: Aufsicht auf die Membran. Unten: Querschnitt durch die Membran. Nach WANG et al. (2003), verändert.



bran verlassen und das Protein freisetzen. Die Sekretion alleine ist also nicht ausreichend, um die Zellwand zu zerstören. Erst durch eine Membrandepolarisation, ausgelöst durch das Holin (s.u.), löst sich die SAR-Transmembrandomäne auf nicht ganz geklärte Weise aus der Cytoplasmamembran. Das dadurch freigesetzte Endolysin führt zur Zellwandhydrolyse.

Das Holin des Phagen 21 heißt S^{2168} , das dazugehörige Antiholin S^{2171} . Beide Proteine haben zwei Transmembrandomänen TMD1 und TMD2. Das S^{21} Holin wurde als Pinholin bezeichnet, weil es nur sehr kleine Poren bildet, durch die keine Proteine hindurch diffundieren können (PARK et al., 2007). Das ist auch nicht nötig, weil das Endolysin durch den Sec-Sekretionsweg direkt über die Cytoplasmamembran geschleust wird (s.o.). Das Pinholin hat offenbar eine andere Aufgabe: Die verfügbaren Daten sprechen dafür, dass durch die kleinen Poren des Pinholins Ionen transportiert werden, welche zu einer Depolarisation der Membran und dadurch zu einer Aktivierung des sekretierten SAR-Domänenendolysins führen. Um die Funktion besser zu verstehen, wurden die beiden Transmembrandomänen des Holins genauer untersucht. PARK et al. (2006) zeigten, dass die erste TMD1 deletiert werden kann, das verbliebene Rudiment von 44 AS Länge funktionierte auch dann als Phagenholin, wenn nur TMD2 vorhanden war. Diese Befunde werden derzeit wie folgt diskutiert:

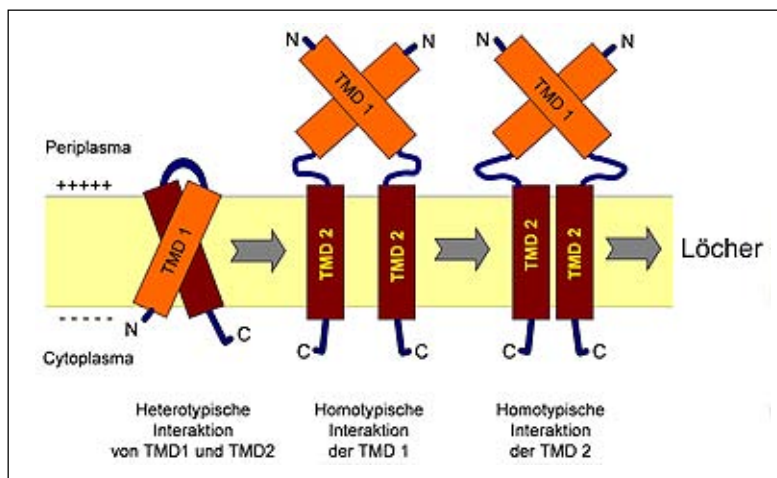
Das Holinprotein sowie das Lysin werden im lytischen Zustand nach Aktivierung des Promotors stetig produziert. Wie in Abb. 8 gezeigt, lagert sich das Holinprotein mit seinen beiden unterschiedlichen TMD in die Cytoplasmamembran ein. Bei niedriger Holinkonzentration inter-

agieren TMD1 und TMD2 miteinander (heterotypische Interaktion). In dieser Konformation ist das Holinprotein inaktiv. Aus unbekanntem Anlass kann sich die TMD1, welche nicht stark hydrophob ist, aus der Membran lösen und lokalisiert in den periplasmatischen Raum. Nun werden zwei Faktoren postuliert: Es kommt erstens zur homotypischen Interaktion der periplasmatischen, ehemals membranintegrierten TMD1-Domänen verschiedener Holin-Moleküle, was anschließend die ebenfalls homotypische Interaktion der weiterhin membranständigen TMD2 Domänen mehrerer Holine erleichtert. Die Interaktion der TMD2 Domänen führt zur Bildung von Poren in der Membran, dadurch zum Leckfluss von Ionen, damit zur Aktivierung des SAR-Typ Endolysinproteins im periplasmatischen Raum und endlich zur Lyse der Zelle.

Die Funktion des Antiholins könnte darin bestehen, dass die zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus die Verlagerung der TMD1 von der Membran in das Periplasma verzögert und durch die heterotypische Interaktion von TMD1 und TMD2 (= keine Poren) die homotypische Interaktion von TMD2 Domänen (= Porenbildung) länger gehemmt wird. Das Modell erklärt auch, warum bei Abwesenheit von TMD1 und bei Abwesenheit des Antiholins trotzdem eine Lyse erfolgt, wenn auch der Lebenszyklus verzögert wird.

Die mit dem anfänglichen Leckfluss der Ionen verbundene Depolarisation der Membran begünstigt die Bewegung der TMD1, sowohl vom Antiholin als auch vom Holin, in das Periplasma (sozusagen ein autokatalytischer Effekt). Damit erfolgt die Bildung von Poren, zu denen in diesem Fall dann sowohl Holine als auch Antiholine beitragen, auf eine katastrophische Weise. Dies führt zu der beobachteten sehr schnellen Phagenfreisetzung (GRÜNDLING et al., 2001). Die Präsenz von Antiholinen erlaubt vermutlich, über den oben genannten Verzögerungsmechanismus, eine Einlagerung von höheren Holinmengen in die Membran, ohne dass eine Porenbildung erfolgt, was anschließend zu einer effektiveren katastrophischen Lyse nach einer anfänglichen Membrandepolarisation führen könnte (RYAN & RUTENBERG, 2007).

Abb 8: Postulierte Funktion der beiden Transmembrandomänen des S^{21} Holins. Nach PARK et al. (2006), verändert.



Diversität von Holinen

Die Proteinklasse der Holine ist sehr divers. Über 50 Familien, die keine wesentliche Sequenzähnlichkeit zueinander haben sind bekannt

(YOUNG & WANG 2006). Unter diesen Familien gibt es mindestens 3 Klassen mit unterschiedlichen Membrantopologien (vgl. Abb 4), trotzdem haben sie alle die gleiche Funktion der Läsionsbildung in der Membran. YOUNG & WANG, (2006) meinen: „[...] evolving into a holin sequence must be relatively easy.“ Diese Meinung kann einen zweifachen Hintergrund haben. Zunächst wird in solchen Fällen oft folgendermaßen argumentiert: Wenn eine Funktion als mehrfach im Evolutionsprozess aufgetreten gedacht werden muss, ist ihre Entstehung offensichtlich einfach möglich. Das könnte richtig sein, aber dieser Gedankengang setzt den zu erklärenden Evolutionsprozess bereits voraus und erklärt ihn daher nicht. Mit dieser Begründung werde ich mich nicht weiter befassen. Ein anderes Argument geht davon aus, dass die Holinfunktion grundsätzlich destruktiv ist und die zu bildende Läsion deshalb vermutlich keine hoch organisierte Struktur darstellen muss, wie man sie beim spezifischen Membrantransport von verschiedenen Stoffen durch spezifische Poren kennt. Mit anderen Worten: Die Kopplung von Struktur und Funktion ist im Fall der Holine so schwach, dass deren parallele, hinsichtlich der Funktion mehr als 50fach konvergente Evolution begründbar ist. Das ist eine funktionale, bedenkenswerte Begründung. Um sie naturwissenschaftlich zu beurteilen, muss man wissen, welche Eigenschaften eines Gens notwendig sind, um eine anfängliche (selektierbare) Holin-Funktion zu codieren.

Die zweifellos vorhandene, außerordentliche Diversität der Holine könnte also einerseits zeigen, dass Struktur und Funktion nicht sehr eng gekoppelt sind. Sind möglicherweise aber auch andere Ursachen für die beobachtete Vielfalt denkbar? Eine davon könnte in der Diversität von Phagen liegen. Man schätzt die Gesamtzahl der Bakteriophagenpopulation der Welt auf 10^{31} Phagen (SUTTLE, 2005; WOMMACK & COLWELL, 2000), dabei wird eine Generationszeit von einigen Wochen angenommen (BREITBART et al., 2004; WILHELM et al., 2002). Darin liegt eine extrem hohe Vielfalt. Dazu kommt, dass Bakteriophagen eine extreme Neigung zum horizontalen Gentransfer und zur Rekombination zeigen, allerdings vor allem an festgelegten Erkennungssequenzen zwischen Genen (HENDRIX, 2005). Nicht nur ganze Gene werden so ausgetauscht, sondern vermutlich auch einzelne Teile von Genen, die z. B. für Proteindomänen kodieren. Dadurch entstehen Mosaikgenome und vielleicht auch Mosaikgene, die sich

regelmäßig in Phagen nachweisen lassen (BAMFORD et al., 2002; HENDRIX, 2003). Das ist nicht nur ein Zufallsprozess, Phagen sind sozusagen auf Evolution programmiert. Wenn Phagen für lange Zeit evolvieren (und Phagen werden für phylogenetisch sehr alt gehalten), werden nach einiger Zeit die gemeinsamen Ursprünge möglicherweise komplett verwischt und man findet schließlich verschiedene Genfamilien vor. Es gibt eine ganze Reihe von Proteinen, die keine Sequenzähnlichkeit zeigen und die man sich doch so entstanden denkt. Diese Überlegung wird durch folgende, aus neueren Genomsequenzierungsprojekten kommende Beobachtungen gestützt.

Die Diversität der Gene in der weltweiten Phagenpopulation ist extrem hoch, zwischen 50 und 75% der detektierten ORFs in neusequenzierten Phagen ergeben keinen Treffer in den Datenbanken (HATFULL et al., 2006; KWAN et al., 2005; KWAN et al., 2006), d.h. es handelt sich um neue Genfamilien. Kürzlich wurde die komplette Sequenz von 30 Mycobakteriophagen publiziert, die zusammen 3357 proteincodierende Gene enthielten (HATFULL et al., 2006). Die Autoren berichten, dass diese Proteine zu 1536 Familien gehören, wie die Autoren diese Gruppen nennen. Damit enthält jede Proteinfamilie in diesem Fall im Schnitt nur etwas mehr als zwei Sequenzen. Von den 1536 „Familien“ zeigen nur 230 (=15%!) eine Aminosäuresequenzähnlichkeit zu bekannten Proteinen, was die enorme genetische Diversität der Phagenproteine belegt.

Es wäre also aufgrund der vorliegenden Daten nicht abwegig zu vermuten, dass die extreme Holindiversität wesentlich mit der extremen Biodiversität von Phagen im Allgemeinen und deren außergewöhnlich hoher Evolutionsrate im Besonderen zusammenhängt. Das ist als solches aber kein Argument gegen eine möglicherweise schwache Kopplung von Struktur und Funktion, die eine leichte evolutionäre Entstehung ermöglichen könnte. Dieses Argument wird Gegenstand der folgenden Diskussion sein.

Eine kurze evolutionäre Geschichte zur Entstehung eines Holin-Lysin Systems

Es ist nicht bekannt, wie das sehr weit verbreitete Holin-Lysin-System evolutionär entstan-

den ist. Im Dezember 2007 haben PARK et al. (2007) aufgrund der o.g. Befunde zum S21 Holin vermutet, dass es sich dabei um einen evolutionären Zwischenzustand handeln könnte. Im Sinne einer evolutionären Geschichte (s.u.) schlage ich, in Anlehnung und Erweiterung an PARK et al. (2007), folgenden Evolutionsweg vor, wohl wissend, dass dies nur eine von mehreren Möglichkeiten ist, die Geschichte zu erzählen.

Am Anfang

Ausgangspunkt ist ein Bakteriophage, der sich in einem Infektionszyklus vermehren kann und somit über die Minimalausstattung eines Phagen verfügt (Capsidproteine, Erbsubstanz, Rezeptor für die Wirtszelladhäsion, Mechanismus für die Einbringung der Erbsubstanz in die Wirtszelle, Assemblierungsweg), jedoch ohne über ein lytisches System zu verfügen. Es ist unbekannt wie dieser Bakteriophage entstanden ist. Dieser Phage würde mehr oder weniger zögerlich aus der „verbrauchten“ Bakterienzelle freigesetzt, wenn diese autolytisch (was verschiedene Gründe haben kann). Im Vergleich zu Phagen mit optimierten lytischen Systemen wäre er zwar nicht konkurrenzfähig, doch wenn solche als Konkurrenz (noch) nicht vorhanden sind, dann ist es nicht ausgeschlossen, dass ein derartiger Bakteriophage sich fortpflanzen und demzufolge auch evolvieren kann.

Evolutionsschritt 1

Nun könnte man sich vorstellen, dass während eines Infektionszyklus ein Autolysin-Gen aus dem Wirtsgenom (dies wird von Bakterien benötigt, um ihre Zellwand modifizieren zu können) in das Phagengenom irgendeines Phagen-Nachkommen gelangt. Autolysine sind in der Lage, die Zellwand eines Bakteriums spezifisch abzubauen. Man weiß, dass Autolysine oft über eine Signalsequenz verfügen, mit deren Hilfe sie über das Sec-System in das Periplasma ausgeschieden werden und so an die Zellwand gelangen können. Man könnte sich weiter denken, dass dieses Autolysin über ein Sekretionssignal vom SAR Typ verfügte, und daher zunächst inaktiv in der Cytoplasmamembran verankert wurde. Die Freisetzung des Autolysins erfolgte zunächst langsam und zufällig. Da dieses Enzym nicht mehr unter der Kontrolle der Wirtszelle stünde, würde seine Sekretion im Laufe des Infektionszyklus zu einer unkontrollierten Hy-

drolyse der Zellwand, damit zu einer Destabilisierung der Zelle und schließlich zu einem erleichterten Platzen der Wirtszelle führen. Wenn die Hydrolyse nicht zu schnell erfolgt, wäre dies vielleicht ein Selektionsvorteil. Durch den SAR-Typ des Autolysins wäre einer verfrühten Lyse der Wirtszelle entgegengewirkt.

Evolutionsschritt 2

Ein binäres Holin-Endolysin-System hätte allerdings erhebliche Selektionsvorteile gegenüber einem reinen SAR-Endolysin-System, wie PARK et al. (2007, Seite 9137) überzeugend darlegen. Es geht vor allem um die notwendige zeitliche Koordinierung der Wirtszellyse, die ein wesentliches Kriterium für die Fitness eines Phagen ist (HEINEMAN & BULL, 2007). Ein nächster Schritt wäre also der Erwerb eines Holins. Zunächst müsste das Holin nicht für den Durchtritt von Endolysinen durch die Cytoplasmamembran verantwortlich sein, denn diese geschähe beim SAR Autolysin ja durch Sekretion, sondern es wäre für die Zeitsteuerung der Lyse zuständig. Wir stellen uns vor, dass zufällig irgendein kleines Genstück, welches bereits für eine Transmembrandomäne aus einem anderen Funktionszusammenhang im Wirtsgenom codiert, bei einer Infektion durch heterologe Rekombination in das Phagengenom wandert und unter die Kontrolle desjenigen Phagenpromoters gerät, welcher bereits die Endolysinsynthese steuert, und dass dieses Fragment zufällig als Pinholin funktioniert (s.u.). Bei hinreichender Konzentration würde es zu einer Depolarisation der Membran führen und das sinkende Membranpotential würde das SAR-Typ Endolysin vom membranengebundenen Zustand in den freien, aktiven Zustand versetzen. Bei passender zeitlicher Steuerung dieser Prozesse wäre ein Selektionsvorteil gegeben, weil die fertigen Phagen die Zelle zum richtigen Zeitpunkt verlassen können.

Evolutionsschritt 3

Durch weitere (unbekannte) Mutationen im Pinholin-Gen würde zum einen eine Potentialsensitivität des Holins entstehen, sowie die Fähigkeit bei Depolarisation der Cytoplasmamembran die Konformation so zu verändern, dass sich größere Läsionen als nur Pinholes bilden. Derartige große Läsionen würden den direkten Durchtritt des SAR-Typ Endolysins durch die Cytoplasmamembran erlauben. Damit wäre ein zweiter Mechanismus für die Endolysinfreiset-

zung entstanden, der vom Sec-System unabhängig und direkt an die Holin-basierte Zeitsteuerung der Lyse gebunden ist. Als Erzähler der Geschichte darf ich voraussetzen, dass dieser Übergangszustand mit zwei Holin-Freisetzungsmechanismen einen nicht näher benannten Selektionsvorteil aufweist.

Evolutionsschritt 4

Sicherlich wäre es ein Selektionsvorteil, wenn die Freisetzung des Endolysins nicht durch zwei verschiedene Mechanismen (Holin und Sec-System) erfolgen würde, denn das erschwert eine kontrollierte Lyse. Da am Ende unserer Geschichte ein Holin-Lysin System stehen soll, würde als nächstes die SAR-Domäne des Endolysins deletiert werden. Die dafür notwendigen molekularen Mechanismen sind bekannt. Nun würde die Freisetzung des Endolysins und damit die Zeitsteuerung der Lyse ausschließlich vom Holin kontrolliert.

Evolutionsschritte 5 und folgende

Je nach Wirtszelle und Umgebung würde das Holin-Gen anschließend so mutieren, dass alle notwendigen Parameter stufenweise optimiert werden, bis die heute bekannten, ausgeklügelten dualen Lysis-Systeme entstanden wären. Der Darwinsche Mechanismus ist ein derart geniales Optimierungsverfahren, dass auf der Grundlage eines nur rudimentär funktionalen Holins vielleicht auch die Anpassung der timing Funktion an verschiedene Wirte und Umweltbedingungen durch Mikroevolution erfolgen kann. Das wäre aber im einzelnen noch zu prüfen, wenn weiteres Detailwissen über die Grundlage des timing vorliegen. Unter die noch zu fordernden Evolutionsschritte fiele auch die besonders spannende Entstehung eines Antiholins aus dem Holin-Gen auf unbekannte Weise.

Evolutionäre Geschichten: Ein „reality check“

Das hier entworfene Szenario ist zunächst einmal eine phantasievolle Geschichte (mehr zu evolutionären Geschichten s.u.). Wie bei allen gängigen evolutionären Geschichten beruht das Argument auf der Nennung selektionspositiver Zwischen- und Endstufen des hypothetischen Evolutionsweges. Die Tatsache, dass eine Struktur die Fitness ihres Trägers erhöht, ist zwar eine

notwendige², keineswegs aber eine hinreichende Bedingung dafür, dass sie durch Evolution entstehen kann. Man muss solche Geschichten deshalb einem „reality check“ unterwerfen. Dieser sieht so aus, dass die verschiedenen notwendigen Voraussetzungen für einen postulierten Evolutionsschritt so genau wie möglich erfasst und die Wahrscheinlichkeit der evolutionären Übergänge – soweit möglich – unter Berücksichtigung molekularbiologischer und populationsgenetischer Rahmenbedingungen abgeschätzt werden.

Als Beispiel soll zunächst Evolutionsschritt 1 dienen, weil ein solcher Evolutionsschritt wie folgt begründet werden könnte: (i) Ein reproduktionsfähiger Phage ist vorhanden, (ii) dessen Wirtsbakterien verfügen über Autolysine, (iii) bei manchen Phagen-Endolysinen sind deutliche Sequenzähnlichkeiten zu Autolysinen ihrer Wirtsbakteriengenera gefunden worden (FOSTER, 1995; HEILMANN ET AL., 1997; OSHIDA ET AL., 1995), (iv) Sequenzähnlichkeiten legen nahe, dass Bakteriophagen Gene aus dem Genom ihrer Wirte aufnehmen können und (v) molekulare Mechanismen für diesen horizontalen Gentransfer sind grundsätzlich bekannt. Außerdem erscheint dieser Evolutionsschritt recht einfach, geht es doch nur um den Transfer eines schon existierenden Gens.

Wie könnte man sich vorstellen, dass ein Bakteriophage ein neues Endolysingen erwirbt? In Abb. 9 sind eine Reihe von Rahmenbedingungen für Evolutionsschritt 1 zusammen gestellt, die beim Erwerb eines neuen Endolysingens eines Bakteriophagen wichtig erscheinen. Die einzelnen Teilprozesse sind nach meiner Einschätzung nicht unvorstellbar, allerdings ist es schwierig, dafür konkrete, belastbare Eintrittswahrscheinlichkeiten (P_1 - P_6) anzugeben. Vermutlich wird sich das mit zunehmendem Wissen ändern. Es ist zu vermuten, dass die o.g. Prozesse künftig so modelliert werden können, dass man datenbasiert beurteilen kann, wie plausibel der Gesamtvorgang von Evolutionsschritt 1 ist. Der Schritt mit niedrigster Wahrscheinlichkeit dürfte die erforderliche doppelte illegitime Rekombination beim Gentransfer sein

² Hier ist von Darwinscher Evolution die Rede; neutrale Evolution ist ein wichtiges, aber noch immer kein gängiges Konzept und wird an anderer Stelle diskutiert (JUNKER & SCHERER 2006, Seite 139f und S. 162; sowie SCHERER 2008, in Vorbereitung).

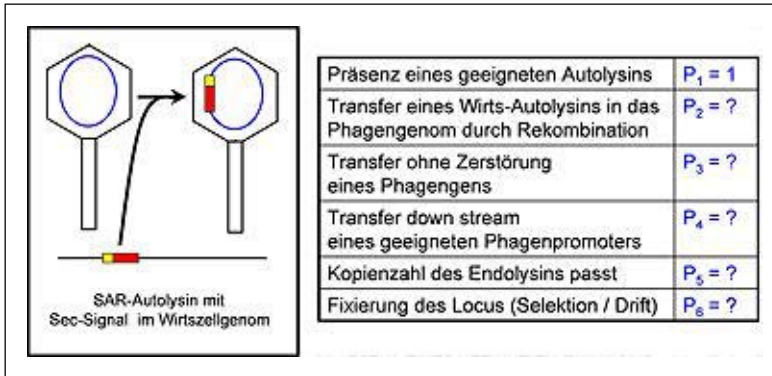


Abb 9: Hypothetischer erster Evolutionsschritt zur Entstehung eines Endolysins (links) und dafür notwendige Rahmenbedingungen (rechts).

(vgl. Abb. 10 und Kasten „Rekombination“).
 Über Evolutionsschritt 2, die *de novo* Entstehung eines Holins, ist dagegen weniger bekannt. In Tabelle 2 sind notwendige Anforderungen an vorhandene Strukturen ($S_1 - S_5$) und Ereignisse ($E_1 - E_5$) zusammen gestellt. Neben einem Gentransfer durch doppelte illegitime Rekombination wie in Evolutionsschritt 1 ist zusätzlich die Erzeugung einer Holinfunktion *de novo* erforderlich. Weil Struktur-Funktionsbeziehungen von Holinen nicht sehr gut untersucht sind, können für die zufällige Präsenz oder Entstehung solcher Strukturen teilweise (insbesondere $S_4 - S_5$) noch keine belastbaren Häufigkeitsabschätzungen angegeben werden. Das gilt leider auch für die Ereignisse E_1, E_2, E_4 und E_5 .

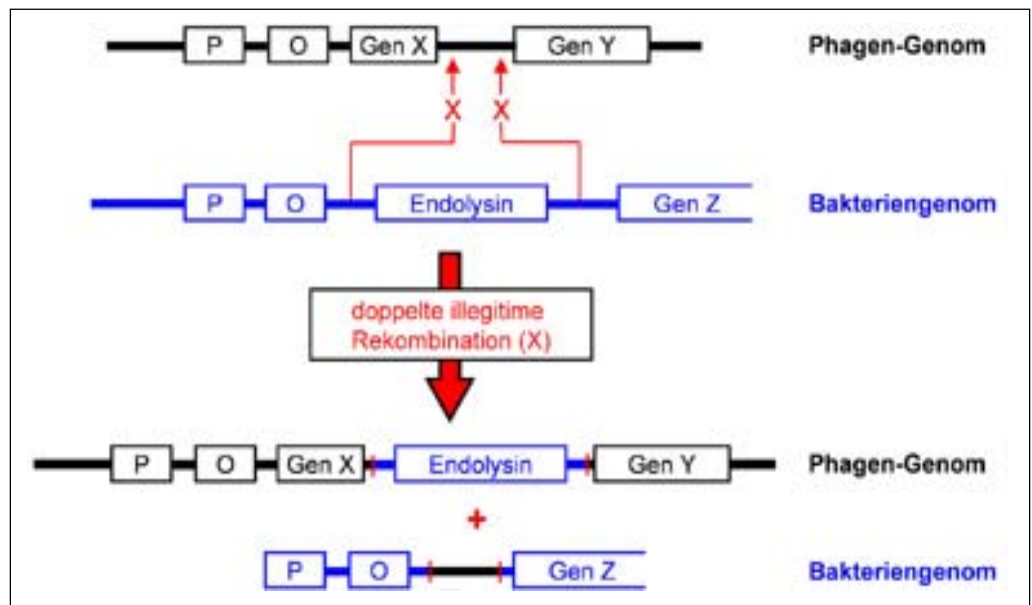
Es ist nicht selbstverständlich, dass eine lipophile Aminosäuresequenz, wenn sie gesondert exprimiert wird, auch in die Membran in-

serieren kann (S_4). Dafür sind Aminosäuresequenzmerkmale erforderlich, so dass das am Ribosom synthetisierte Protein im Fall von α -helikalen TMDs cotranslational an das Sec-Translocon koppelt und während des Sekretionsprozesses aufgrund der Konstruktion des Translocons nicht in den Außenraum der Zelle sekretiert wird, sondern in die Cytoplasmamembran partitioniert (ELOFSSON & VON HEIJNE, 2007).

Die Häufigkeiten P_2 bis P_4 könnten aber 1 sein, wenn die illegitime Rekombination E_1 zuvor passgenau den späteren N-terminalen Bereich eines vorhandenen Membranproteingens transferiert, in welchem SD-Sequenz, Startcodon und Signalsequenzen bereits enthalten sind (Abb. 11). Je passgenauer und spezifischer eine doppelte illegitime Rekombination jedoch sein muss, desto unwahrscheinlicher ist sie.

Eine doppelte illegitime Rekombination E_1 ist so selten, dass sie meines Wissen nur einmal unter kontrollierten experimentellen Bedingungen beobachtet wurde: Das Gen *nptII* wurde in einem speziell konstruierten Experiment in das Genom von *Acinetobacter baylyi* durch zwei illegitime Rekombinationsereignisse eingebaut, die Autoren fanden dabei insgesamt eine einzige Rekombinante. Die Frequenz des Auftretens geben HULTER & WACKERNAGEL (2008) mit etwa 10^{-12} an. Dies gilt für einen Gentransfer, der hinsichtlich des Rekombinationsortes weder in der Donor-DNA noch in der Wirts-DNA beschränkt war. *nptII* konnte mit beliebigen flankierenden Sequenzen in einen beliebigen Lo-

Abb 10: Transfer eines Endolysingens aus dem Wirtsgenom in das Phagen-genom durch doppelte illegitime Rekombination.



cus der Wirt DNA transferieren, solange dadurch kein essentielles Gen im Wirtsorganismus zerstört wurde. Wenn – wie im Falle von E_1 – hinsichtlich der flankierenden Sequenzen sowohl der Donor- als auch der Wirts-DNA zwei relativ spezifische illegitime Rekombinationen notwendig sind, dann wird sich deren Häufigkeit deutlich erniedrigen.

Welche Veränderungen müssen bei E_4 an zwei willkürlich aus Proteinen anderer Funktion ausgeschnittenen Membrandomäne durch Punktmutationen auftreten, damit sie sich in eine primitives Pinholin verwandeln? Muss man 2, 4 oder mehr Punktmutationen fordern? Mangels experimenteller Daten kann derzeit nicht sinnvoll spekuliert werden, doch ist eine derartige, belastbare Aussage unverzichtbar für jede Abschätzung der Wahrscheinlichkeit einer Pinholin-Entstehung.

Angenommen, die in Tab. 2 zusammen gestellten Ereignisse haben stattgefunden und ein primitives Holin wurde erzeugt, dann muss sich der so entstandene Phage in der Phagenpopulation noch durchsetzen. Das ist keineswegs selbstverständlich. Die größte Gefahr besteht darin, dass das neue Genkonstrukt durch Drift kurz nach seiner Entstehung wieder verloren geht. Die meisten Bakteriophagen finden beispielsweise keine neue Wirtszelle zur Vermehrung und gehen damit verloren. Es könnte auch sein, dass eine Wirtszelle zwar gefunden wird, diese aber nach der Infektion zugrunde geht, indem sie beispielsweise von einem Protozoon gefressen wird, usw. Wie groß die Chance ist,

Rekombination

Die Insertion eines Endolysingens in die Phagen-DNA durch eine doppelte Rekombination ist in Abb. 10 skizziert.

Die Häufigkeit (Frequenz) von homologer Rekombination, die zwischen identischen oder relativ ähnlichen und mehr als 100 - 200 Nukleotide langen Sequenzen erfolgt, ist sehr häufig. Solche Ereignisse kommen mit einer Frequenz von bis zu 10^{-3} vor. Je weniger ausgeprägt die Sequenzähnlichkeiten von Donor und Rezipient sind, desto seltener findet Rekombination statt. Man beobachtet einen exponentiellen Abfall der Rekombinationshäufigkeit mit abnehmender Sequenzhomologie (z.B. MAJEWSKI et al., 2000).

Illegitime (oder heterologe) Rekombination ist die Verbindung von zwei DNA Sequenzen, die keine Ähnlichkeit oder nur sehr kurze (4-10 nt) Abschnitte ähnlicher Sequenzen aufweisen (Mikrohomologie). Sie wird von sehr unterschiedlichen Mechanismen katalysiert (EHRlich 1989) und die Frequenz ist von mehreren Faktoren wie beispielsweise Ultraviolettstrahlung, Stress oder DNA Sequenz beeinflusst, so dass über die Frequenz nur statistische Aussagen möglich sind (z.B. ARBER, 2000). Die Frequenz illegitimer Rekombination ist um mehrere Zehnerpotenzen niedriger als homologe Rekombination (HÜLTER & WACKERNAGEL, 2008).

Die Häufigkeit für eine Insertion eines Fremdgens durch illegitime Rekombination wird erhöht, wenn eines der beiden notwendigen Rekombinationsereignisse zunächst in einem homologen Bereich erfolgt, der zufällig flankierend auf dem Phagen genom vorkommt. Dieser kann dann als „Anker“ dienen, der die zweite, illegitime Rekombination erleichtert (MEIER & WACKERNAGEL, 2003).

dass der neu entstandene Phage durch Drift verloren geht, hängt auch davon ab, wie groß sein Fitness-Vorteil gegenüber den Wildtyp-Phagen ist. Die mit der Durchsetzung des neuen Pha-

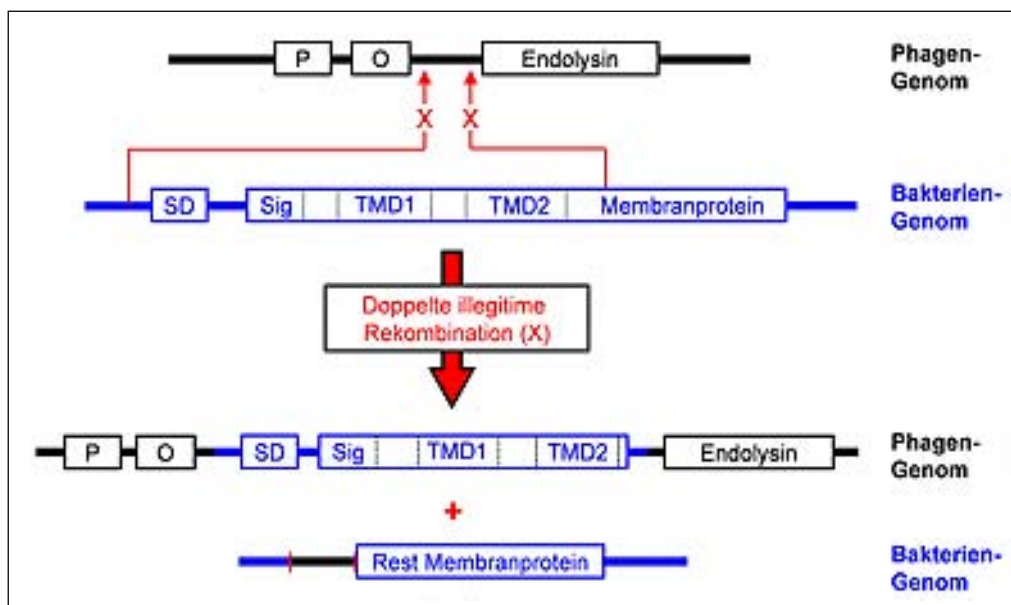


Abb 11: Transfer einer Teilsequenz aus einem Membranproteingen des Wirtsgenoms in das Phagen genom durch doppelte illegitime Rekombination. Es wäre auch denkbar, dass das durch Rekombination übertragene Genstück nur TMD1 umfasst (vgl. die Diskussion zu S21).

gen verbundenen Unwägbarkeiten sind aber groß, eine Modellierung des Prozesses und eine Abschätzung von P_{10} wäre komplex und aufgrund von unklaren Randbedingungen derzeit wenig aussagekräftig.

Bezüglich des Erwerbs fremder Gene durch Bakteriophagen meint (LITTLE, 2005): „What is their source, and how do they become inserted into the genomes of temperate phages? Answers to these questions are at best tentative, in most cases. [...] Mechanisms by which these genes move are likewise obscure.“ Roger HENDRIX diskutiert die „Moron-Hypothese“ der Phagenevolution, die postuliert, dass Phagen fremde funktionelle Gene aufgenommen haben, die jeweils über Transkriptionssignale (eigener Promoter, Ribosomenbindestelle und rho unabhängigen Terminator) verfügen und daher autonom transkribiert werden. Die Aufnahme solcher „Morons“ aus dem Genom der Wirtszelle wird durch Sequenzvergleiche begründet. Allerdings meint auch HENDRIX bezüglich des zugrunde liegenden Mechanismus: „[...] the mechanism of that [gene] movement is completely obscure“ (HENDRIX et al., 2000). Die Tatsache, dass ein Mechanismus unbekannt ist, sagt jedoch nichts darüber aus, ob er existiert.

Die Aufgabe der Evolutionsforschung besteht darin, dem Auftreten der in Tabelle 2 genannten Strukturen und Ereignissen Wahrscheinlichkeiten zuzuordnen, die durch experimentelle Daten oder belastbare theoretische Erwägungen gestützt sind. Zweifellos ist das Zusammentreffen der in Tab. 2 genannten Ereignisse sehr unwahrscheinlich. Auch HENDRIX (2000) hält Einzelereignisse in der Evolution der Phagen für sehr unwahrscheinlich. Unter Berücksichtigung der extrem hohen Zahl von Bakteriophagen auf unserem Planeten, ihrer Biologie und ihrer vermuteten 3 Milliarden Jahre währenden Evolutionsgeschichte seien jedoch auch Serien von unwahrscheinlichen Einzelereignissen plausibel (HENDRIX, 2005). Ob diese Einschätzung auf die skizzierte Hypothese zur Holinentstehung zutrifft oder nicht wird zukünftige Forschung zeigen.

Insgesamt komme ich zu dem Zwischenergebnis, dass derzeit unbekannt ist, ob, wie und ggf. wie häufig ein Holin auf dem oben skizzierten Wege durch bekannte Prozesse hätte entstehen können. Es handelt sich damit um eine ungelöste Frage der Evolutionsbiologie. Die sich aus solchen ungelösten Fragen ergebenden Konsequenzen werden weiter unten diskutiert (vgl. auch SCHERER, 2008).

S_1	Präsenz von zwei interagierenden TMDs im Wirtsgenom ist trivial	$P_1 = 1$
S_2	Präsenz eines Startcodons im Ursprungsgen	$P_2 = ?$
S_3	Präsenz einer Shine-Dalgarno-Sequenz im Ursprungsgen	$P_3 = ?$
S_4	Fähigkeit der separat exprimierten TMDs zur Integration in die Membran	$P_4 = ?$
S_5	Produktion einer geeigneten Zahl von Holin-Monomeren (geeigneter Promoter, Stabilität der mRNA, Codon usage, geeignete Passung der SD-Sequenz)	$P_5 = ?$
E_1	Transfer eines geeigneten Ausschnitts des Duplikats in das Phagengenom durch doppelte illegitime Rekombination	$P_6 = 1$
E_2	Transfer <i>down stream</i> des Promoters vom Endolysingen ohne Zerstörung eines Phagengens	$P_7 = ?$
E_3	Entstehung einer Stopcodons im oder nach dem transferierten Gen durch eine Punktmutation (der Ort muss nicht genau festgelegt sein)	$P_8 = ?$
E_4	Modifikation der TMDs durch Punktmutationen, so dass das primitive Holin einen Ionenleckfluss zum richtigen Zeitpunkt induzieren kann	$P_9 = ?$
E_5	Fixierung des neuen Locus in der Phagenpopulation	$P_{10} = ?$

Tab. 2: Anforderungen an die Struktur (S_1 - S_5) eines hypothetischen Ausgangs-Gens in einer Bakterienwirtszelle, welches als neues Pinholin-Gen fungieren soll. Die für die Entstehung notwendigen Ereignisse sind unter E_1 - E_5 zusammen gefasst.

Ist *hol187* das Holin des Staphylococcus-Phagen 187?

In silico-Analysen können nicht beweisen, ob die Sequenz von *hol187* aus dem Phagen 187 wirklich für ein funktionales Holin codiert. Aus diesem Grund haben wir eine ganze Reihe von Experimenten durchgeführt und damit gezeigt, dass es sich tatsächlich um ein funktionales, *in vivo* exprimiertes und in der Cytoplasma-Membran lokalisiertes Protein handelt, welches eine zellwandlytische Funktion hat und heterolog im Bakteriophagen wirklich als Holin fungieren kann (LOESSNER et al. 1999). Inzwischen wissen wir, dass auch in verwandten Staphylococcus-Phagen Homologe zu *hol187 out-of-frame* konserviert sind (WINKLER et al., unveröffentlicht), was ein weiterer, unabhängiger Hinweis auf eine biologische Funktion ist.

Einige Jahre später wurde von KWAN et al. (2006) zusammen mit über 26 anderen *Staphylococcus*-Phagen auch die vollständige genomische Sequenz des Bakteriophagen 187 publiziert. Die Überraschung war groß, als sich herausstellte, dass dieser Phage ein klassisches duales Lysis-System aus Holin und Lysin trägt (Dieser Sachverhalt war mir bei der Überarbeitung der 2006 erschienenen 6. Auflage von „Evolution ein kritisches Lehrbuch“ noch unbekannt). Dieses Lysinsystem ist nicht mit *Hol187* und *Ply187* identisch, trotzdem werden beide exprimiert und haben lytische Funktion. Möglicherweise codiert *ply187* für ein zellwandlytisches Enzym, welches beim Eintritt des Phagen in den Wirt wichtig ist? Doch welche Funktion könnte dann *Hol187* haben? Sind die Lysefunktionen

des Phagen 187 komplexer als angenommen? Young (2005) argumentiert in diese Richtung wenn er meint, dass die Analyse des Lysis-Systems dieses wenig untersuchten Phagen herausfordernd sei.

Möglicherweise verfügen Phagen hinsichtlich verschiedener Funktionen über bak-kupssysteme, die bei Ausfall eines Gens für Ersatz sorgen. HEINEMANN et al. (2005) haben das als *evolutionary robustness* bezeichnet und am Beispiel der gezielten Deletion eines Lysingens des Phagen T7 beschrieben. Im Laufe der *in vitro* Evolution mutierte ein zweites zellwandlytisches Gen des Bakteriophagen und ersetzte das deletierte Lysingen.

Oder steht *Hol187* in einem völlig anderen Funktionszusammenhang? Vor einigen Jahren wurde vermutet, dass Holine für die Freisetzung von hochmolekularen Toxinen des Krankheitserregers *Clostridium difficile* zuständig sind (GOH et al., 2005; TAN et al., 2001; VOTH & BALLARD, 2005). Ähnliches könnte auch für insektizide Toxine des Erregers *Yersinia enterocolitica* gelten (FUCHS et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Nun ist *Staphylococcus* auch ein Toxinbildner und man hat Hinweise darauf gefunden, dass *Staphylococcus*-Phagen in einem der Toxin-Gene des Wirtes inserieren (IANDOLO et al., 2002) und dass der temperente *Staphylococcus*-Phage *_ETA* das Gen für das Toxin *Eta* trägt (YAMAGUCHI et al., 2000). Bei anderen Erregern ist schon länger bekannt, dass deren Phagen Toxingene transportieren können (WALDOR et al., 2005).

der Gene wird durch „*overprinting*“ erklärt (WINKLER, 2008). Dabei nehme ich für den einfachsten Fall an (Abb. 14), dass in einem vorhandenen Gen durch Mutationen zunächst Stopcodons in der Region des neuen Leserahmens entfallen, welcher später einmal das neue Protein codieren soll. Dann entsteht durch eine weitere Mutation ein Startcodon an einer geeigneten Stelle des ORF. Bis zu diesem Stadium sind die aufgetretenen Mutationen, falls nicht die Kodierung für das Endolysin mitbetroffen sein sollte, für die Selektion unsichtbar. Erst durch die Bildung einer Ribosomenbindestelle im geeigneten Abstand vor dem Startcodon durch weitere Mutationen entsteht ein ablesbares Gen, welches in einem anderen Leseraster ein vom Muttergen komplett verschie-

denes Protein kodiert. Die Entstehung eines Promoters ist nicht notwendig, da das Muttergen bereits einen solchen besitzt und dadurch abgelesen wird. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein derartiger ORF zufällig außerhalb des ursprünglichen Leserahmens (*out-of-frame*) vorkommt oder Stoppcodons durch Mutationen im neuen Leseraster entfallen, dürfte nicht so klein sein, dass man ein solches Ereignis in der Erdgeschichte nicht ab und zu erwarten würde. Auch die Entstehung einer Ribosomenbindestelle vor einem neuen Startcodon ist sicher nicht sehr unwahrscheinlich. Mit anderen Worten, die zufällige Entstehung eines translitierbaren ORF in einem vorhandenen Gen wird vermutlich ab und zu vorkommen. Damit wird also tatsächlich eine völlig neuartige Amino-

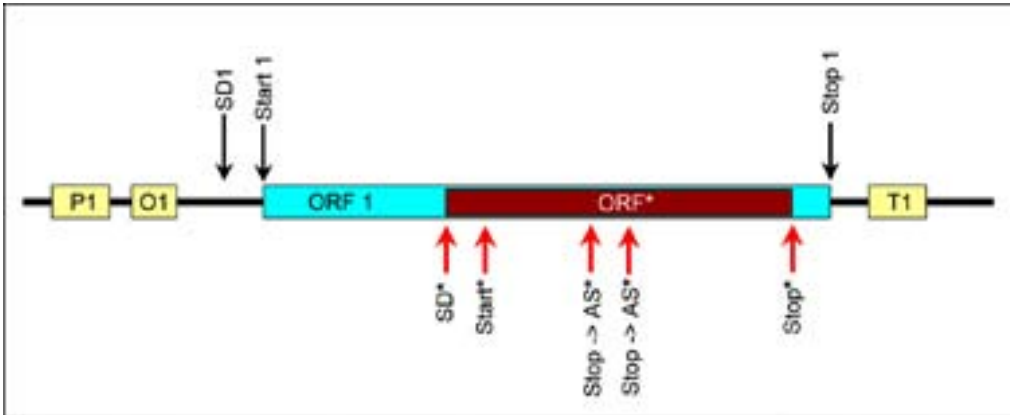


Abb 14: Entstehung eines neuen ORF (offenes Leseraster, rot) aus einem vorhandenen Gen (gelb). Wenn die entsprechenden Nukleotidpositionen nicht schon zufällig richtig besetzt sind, müssen sich die mit Stern und rotem Pfeil markierten Mutationen ereignen, um ein funktionsfähiges ORF* zu bilden, das in den ursprünglichen ORF 1 eingebettet und in einem anderen Leseraster codiert ist. Durch geeignete Datenanalyse könnte die Wahrscheinlichkeit für deren Auftreten abgeschätzt werden. Es wurde der einfachste Fall gewählt, in dem der neue ORF im +1 oder +2 Leseraster translatiert wird, weil dann alle regulatorischen Elemente des ursprünglichen Gens (hellblau) auch vom neuen ORF genutzt werden können. Damit ist allerdings noch nichts über die Funktionsfähigkeit der codierten Aminosäuresequenz ausgesagt, notwendige Randbedingungen für ein Pinholin sind in Tab. 2 und Abb. 15 zusammengefasst. P = Promoter; O = Operator; T = Terminator; SD = Ribosomenbindestelle; Start = Startcodon; Stop = Stopcodon; AS = Aminosäure

säuresequenz erzeugt. Doch kann man erwarten, dass ein solches Protein auch eine Funktion trägt, die der Zelle oder dem Phagen einen Selektionsvorteil verschafft?

Das Hol187 ist ein idealer Fall, um diese Frage zu erörtern: Das Protein ist mit 57 Aminosäuren sehr kurz, das dafür nötige offene Leseraster ist also nur 171 Nukleotide lang. Wenn man eine Entstehung durch *overprinting* wahrscheinlich machen kann, dann vielleicht in einem solchen Fall. Andere eingebettete virale Gene sind länger. Zunächst muss man diskutieren, was die minimalen gemeinsamen Eigenschaften von Holinen sind, die *pinholes* bilden. YOUNG & WANG (2006) wissen das nicht genau, tragen aber einige Merkmale zusammen, zu denen ich weitere hinzugefügt habe (Tab. 3, vgl. auch Abb. 15).

Für ein Holin, welches große Läsionen für den Durchtritt von Endolysinen bildet (und das gilt für Holin187), sind weitere, möglicherweise komplexe Eigenschaften nötig (Evolutions-

schrift 3, vgl. YOUNG & WANG 2006), die hier aber nicht weiter diskutiert werden sollen, da wir von einem minimalen Anfangszustand ausgehen möchten. Auch das beobachtete *double-start-motif* soll nicht berücksichtigt werden. Wenn es aktiv wäre (was wir nicht experimentell gezeigt haben), dann könnte dies darauf hinweisen, dass es eine Feinabstimmung zwischen heterotypischer und homotypischer TMD-Interaktion gibt. (Vgl. die Diskussion um das S21 Holin).

Im vorliegenden Fall des Hol187 und aufgrund der oben erzählten Evolutionsgeschichte wird man annehmen, dass das Endolysingen zuerst vorhanden war und dass das Holingen durch *overprinting* später gebildet wurde. Man kann also eine im Vergleich zu Evolutionsschritt 2 (s.o.) leicht abgewandelte Geschichte zur Entstehung eines Holins erzählen: Grundlage ist nicht eine bereits vorhandene Transmembrandomäne, sondern ein in das Endolysingen zufällig eingebetteter ORF, der – wie oben beschrieben – aktiviert wird.

-
- Besitz einer lipophilen Transmembrandomäne (TMD)
 - Fähigkeit zur Insertion in die Membran
 - Fähigkeit der TMD zur Dimerisierung
 - Fähigkeit der TMD zur Oligomerisierung und Floßbildung (Protein-Protein-Interaktionen dominieren über Protein-Lipid-Interaktionen)
 - Pinhole Bildung ab bestimmten Floßgrößen (lokale Depolarisation des Membranpotentials)
-

Tab. 3: Minimale Eigenschaften, die ein Holin für eine initiale Funktion aufweisen sollte, um dem betreffenden Phagen einen Evolutionsvorteil zu verschaffen.

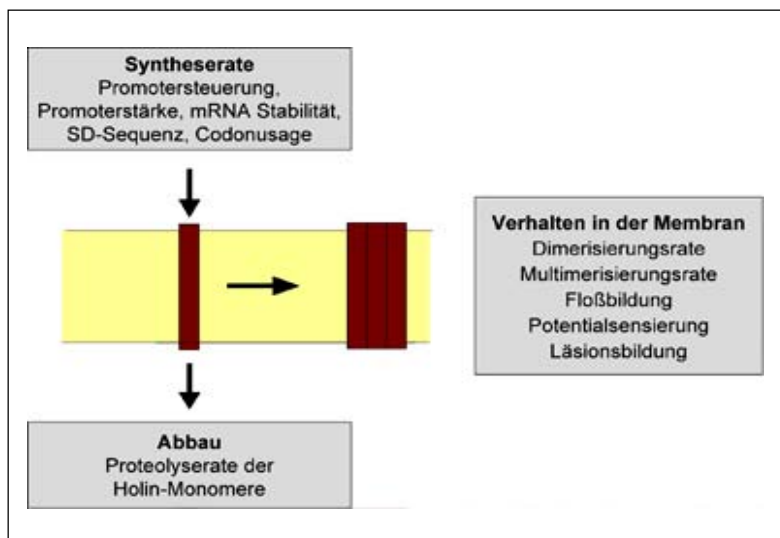


Abb 15: Einflussfaktoren auf die Funktion eines Pinholins.

Wahrscheinlich oder unwahrscheinlich?

Wie groß ist die Chance, dass ein zufällig gewähltes ORF, das aus einem vorhandenen Gen hervorgeht, eine Transmembrandomäne von etwa 16 lipophilen Aminosäuren besitzt, die sich grundsätzlich in eine Membran einlagern könnten? Wie groß ist die Chance, dass die Folge der Aminosäuren eine Transmembrandomäne bildet, die homotypisch interagieren kann? Wie groß ist die Chance, dass diese homotypische Interaktion zur Bildung von Membranflößen führt? Wie groß ist die Chance, dass die in Hol187 beobachtete zweite, potentielle Transmembrandomäne vorkommt und wie groß ist die Chance, dass die beiden durch eine geeignete Linker-Sequenz verbunden sind? Wie groß ist die Chance, dass sich bei geeigneter Konzentration der Holine Pinholes bilden?

Schließlich: Wie groß ist die Chance, dass das Holin in der richtigen Menge und zur richtigen Zeit gebildet wird? Die passende Zahl von Endolysinmolekülen und vor allem die passende Zahl von Holinmolekülen muss von der gleichen mRNA translatiert werden. Das ist keineswegs trivial, denn die beiden Translationsprozesse interagieren miteinander und stören sich gegenseitig (translationale Interferenz, YU et al., (2007)). Wenn zuwenig Holin gebildet würde, käme es nicht zur Pinholebildung, und damit besteht kein Selektionsvorteil. Wenn aber zu viel Holin gebildet wird, besteht die Gefahr der frühzeitigen Membrandepolarisation und damit des Abbruchs der Phagenas-

semblierung, der betreffende Phage hätte keine Nachkommen.

Um funktionieren zu können, muss die durch *overprinting* entstandene Sequenz also die o.g. Eigenschaften aufweisen, die nochmals in Tab. 4 zusammengestellt sind. Dabei muss die Funktion nicht perfekt sein. Wenn die Eigenschaften nur grundsätzlich und unvollkommen vorhanden sind, kann der leistungsfähige Darwinsche Mechanismus zu einer mikroevolutiven Optimierung der einmal vorhandenen, wenn auch anfangs nur schwach funktionalen Struktur führen. Da eine ganze Reihe von Ereignissen zusammen kommen muss, darf man annehmen, dass die Entstehungswahrscheinlichkeit eines auch nur rudimentär funktionierenden Holins sehr klein ist. Aber wie klein ist sehr klein?

Die verfügbaren Daten lassen eine belastbare, einfache Abschätzung der genannten Wahrscheinlichkeiten P_1 bis P_{10} meines Erachtens nicht zu. Gleichwohl wären bei P_1 bis P_4 solche Abschätzungen grundsätzlich jetzt schon möglich, doch ist hierfür ein nicht unerheblicher Forschungsaufwand erforderlich. Es wäre beispielsweise ein interessantes bioinformatisches Forschungsprojekt, durch Analyse vorhandener Genome die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung eingebetteter ORFs verschiedener Länge zu untersuchen (P_i). Das dafür notwendige Wissen liegt vor.

Zu P_5 existieren wenigstens einige experimentelle Untersuchungen, wenn auch nicht an Holin-TMDs. Ein Beispiel: Eine 16 AS lange, funktionale TMD wurde an 8 Positionen mit allen biologisch vorkommenden Aminosäuren randomisiert. Das ergibt eine theoretische Zahl von über 10^{10} Varianten. Die erstellte Bibliothek verschiedener Varianten enthielt etwa 10^7 Klone. Davon inserieren rund 10% in die Membran. Von diesen interagiert wiederum nur ein kleiner Prozentsatz stabil miteinander (RIDDER et al., 2005; UNTERREITMEIER et al., 2007), was experimentell durch ein Reporter-gen studiert wurde. Nach meiner Kenntnis kann auf diese Daten derzeit zwar noch keine belastbare Abschätzung von Wahrscheinlichkeiten aufgebaut werden, doch grundsätzlich könnten weitere experimentelle Arbeiten die notwendige Datengrundlage liefern, um dieses spezifische Problem wenigstens semi-quantitativ zu fassen. Das Problem ist ähnlich gelagert wie die Frage nach der *de novo* Entstehung von Proteinen in Ursuppen (vgl. JUNKER und SCHERER, 2006, Seiten 125-128) und wird an anderer

Ereignis	Wahrscheinlichkeit	P semiquantitativ abschätzbar?
Entstehung eines passenden ORF	$P_1 = ?$	ja
Transmembrandomäne 1 vorhanden	$P_2 = ?$	(ja)
Transmembrandomäne 2 vorhanden	$P_3 = ?$	(ja)
Linkerpeptid vorhanden	$P_4 = ?$	ja
Homotypische Interaktion der TMD	$P_5 = ?$	(ja)
Fähigkeit zur Dimerisierung	$P_1 = ?$	nein
Fähigkeit zur Floßbildung	$P_2 = ?$	nein
Fähigkeit zur Pinhole-Bildung	$P_3 = ?$	nein
Holin wird in der richtigen Menge gebildet	$P_4 = ?$	nein
Passendes Timing der Pinhole-Bindung	$P_5 = ?$	nein

Tab. 4: Zusammenstellung der Bedingungen, die für die Entstehung eines Hol187-Holinproteins durch erfolgreiches overprinting vermutlich gegeben sein müssen. Die semiquantitative Abschätzung erscheint in einigen Bereichen möglich, bedarf aber eines erheblichen Forschungsaufwandes.

Stelle vertieft diskutiert werden (SCHERER, in Vorbereitung).

Insgesamt komme ich zu dem Schluss, dass die Entstehung des kleinen, überlappenden Holinähnlichen Proteins Hol187 zur Zeit unbekannt ist. Künftige Forschung könnte diesen Schluss bestätigen, aber es ist nicht auszuschließen, dass künftige biologische Daten geeignet sein werden, die Entstehung irgend eines Holins oder auch von Hol187 plausibel zu machen.

„Molecular Evolutionary Storytelling“

Abschließend noch ein Wort zu meiner oben erzählten, kurzen Evolutionsgeschichte. Egbert LEIGH setzte sich in einem lesenwerten Artikel mit der auch heute noch in Evolutionslehrbüchern sehr weit verbreiteten Ansicht, dass natürliche Selektion zufälliger Mutanten die Evolution des Lebens hinreichend erkläre, bemerkenswert kritisch auseinander (LEIGH, 1999). Er zitiert zunächst Antnonovics (1987): „Too many biologists behaved as if to imagine a use for an organ is [...] equivalent to explaining its origin by natural selection without further inquiry“ und dann GOULD & LEWONTIN (1979), die diesen Ansatz als „adaptive storytelling“ bezeichneten. GOULD und LEWONTIN machten sich mit dieser Bezeichnung wohl ein wenig über den „Allmachtsanspruch“ der Selektionstheorie lustig. Das ist nicht meine Absicht, wenn ich hier den

Begriff des Molecular Evolutionary Storytelling am Beispiel des Problems der Evolution der Phagenholine benutze.

Erst heutige Kenntnisse der Biologie der Bakteriophagen auf molekularer Grundlage erlauben es überhaupt, derartige *ad hoc* Geschichten in akzeptablem Detail zu erzählen. Das war vor 10 Jahren noch gar nicht möglich. Darin liegt ein bedeutender Fortschritt nicht nur der Phagenbiologie, sondern auch der Evolutionsbiologie: Je konkreter eine Evolutionsgeschichte erzählt werden kann, d.h., je mehr durch Experimentalwissen gedeckte molekularbiologische und genetische Details man in die Geschichte einbauen kann, desto besser kann sie auf theoretischer oder, viel wichtiger, auch auf experimenteller Ebene getestet werden. Es gehört eine Fülle biologischen Detailwissens dazu, derartige evolutionäre Geschichten so zu erzählen, dass man daraus testbare Hypothesen und Forschungsprogramme ableiten kann. Ein Beispiel: Welche Änderungen sind notwendig, um ein Pinholin in ein membranpotential-sensitives Holin umzuwandeln, welches beim Zusammenbruch des Membranpotentials seine Konformation ändert und große Löcher in der Membran verursacht? Die molekularbiologischen Werkzeuge sind grundsätzlich verfügbar, um diese und andere, sich aus der erzählten Geschichte ergebende Fragen experimentell (z.B. durch mutagenetisch erzeugte Proteinbibliotheken) zu klären. *Storytelling* ist also keineswegs überflüssig. Es ist im Gegenteil sogar ein wichtiges Element nicht

nur der Evolutionsbiologie, sondern der Naturwissenschaft insgesamt⁴.

Bezüglich der Evolution von Holin-Endolysin-Systemen können wir heute immerhin teilweise sinnvolle, molekularbiologisch und genetisch begründete Geschichten erzählen. Man kann die obige Geschichte auch mit weiteren Details ausschmücken. Das ändert nichts daran, dass wir derzeit nicht wissen, ob diese spezielle Geschichte haltbar ist und ob es überhaupt plausible evolutionäre Wege gibt, um Holine durch natürliche Prozesse entstehen zu lassen. Allerdings ist zu hoffen, dass die zu generierenden Forschungsprogramme diese Frage früher oder später klären werden.

Damit der Leser nun aber nicht in die Irre geführt wird, weise ich nochmals auf folgenden wichtigen Aspekt der Sache explizit hin: Eine Geschichte ist nicht die Wirklichkeit, und es wäre ein Fehler eine phantasievolle evolutionäre Geschichte mit einer wissenschaftlichen Erklärung zu verwechseln. Die von ANTONOVICS (1987) sowie GOULD & LEWONTIN (1979) beanstandete, eigentlich ziemlich erstaunliche Idee⁵, wenn eine Struktur einen Selektionsvorteil aufweise, dann stehe ihre evolutionäre Entstehung gänzlich außer Zweifel, ist auch heute noch aktuell. Evolutionäre Geschichten, wie die von mir erzählte Holin-Entstehungs-Geschichte, werden von dem einen oder anderen irrtümlich vielleicht doch als valide wissenschaftliche Erklärung angesehen. Dem will ich mit meiner Geschichte keinen Vorschub leisten. Meine Geschichte gefällt mir zwar recht gut und ich erachte sie für nützlich, denn sie kann Experimente generieren. Doch wenn ich sie für eine wissenschaftliche Erklärung der Entstehung eines Holins hielte, oder diesem Eindruck nicht wenigstens entschieden entgegen träte, dann müsste ich die an GOULD & LEWONTIN angelehnte, etwas respektlos gewählte Bezeichnung *molecular evolutionary storytelling* wohl auch auf mich selber beziehen.

⁴ Wer experimentell arbeitet weiß, dass viele bedeutende Entdeckungen mit teilweise abenteuerlichen, phantasievollen Geschichten begonnen haben.

⁵ Auf eine gewisse Weise ist das nun auch wieder nicht so erstaunlich: Wenn Evolution als natürlicher „Schöpfungs“prozess grundsätzlich und bedingungslos vorausgesetzt wird, dann kann aus allen Überlegungen am Ende auch nur Evolution hervorgehen.

Glücklicherweise weiß aber jeder Fachmann, dass evolutionäre Geschichten zunächst nichts anderes sind als eben dieses: Nämlich Geschichten. Und wie das mit Geschichten so ist: Für bare Münze sollte man sie ohne eingehende Prüfung lieber nicht nehmen. Aber wenn sie gut sind, werden sie die Phantasie anregen und Experimente generieren, die eine Abschätzung ihrer Plausibilität zulassen. Am Ende könnte sich eine zunächst nur erfundene, phantasievolle Geschichte als plausibles Modell für einen Prozess erweisen, der sich vielleicht so oder ähnlich tatsächlich in der Vergangenheit abgespielt hat. Oder sie erweist sich nach eingehender Prüfung eben nur als eine phantasievolle Geschichte, als ein in biologischer Fachsprache verfasstes Märchen, das keine echte Entsprechung zur empirisch fassbaren Wirklichkeit hat. Was auch immer das Ergebnis einer solchen daten-basierten Prüfung sein wird: In jedem Fall wird die Erzählung der Geschichte zur Erweiterung unseres Wissen geführt haben und damit fruchtbar geworden sein. Vorausgesetzt, wie gesagt, sie wurde kritisch geprüft.

Wissenslücken und Grenzüberschreitungen

In JUNKER & SCHERER (2006) wurde das Holin-Gen stellvertretend für andere derartige eingebettete Gene auf eine gänzlich nicht-biologische Weise als Design-Signal gedeutet. Diese Deutung erfolgte aus gutem Grund im letzten Kapitel des Buches, welches mit „Grenzüberschreitungen“ überschrieben ist. Damit wurde eindeutig und für jedermann erkennbar zum Ausdruck gebracht, dass diese Deutung den naturwissenschaftlichen Rahmen bewusst überschreitet. Eine solche Deutung ist weltanschaulich begründet, aber sie könnte durch geeignete experimentelle Daten durchaus relativiert werden. Sollte sich nämlich zeigen, dass eine evolutionäre Entstehung dieses und anderer, komplexer eingebetteter Gene datenbasiert plausibel gemacht werden kann, dann bliebe jedenfalls für mich wenig Ursache, solche Strukturen als Design-Signal zu deuten.

Wissenslücken, wie sie bezüglich der evolutionären Entstehung eines Holingens (und zahlreicher anderer biologischer Strukturen) bestehen, sind kein Beweis dafür, dass solche Strukturen nicht durch Evolution entstanden sein könnten. „Nichterklärtheit“ ist etwas anderes als „Nichterklärbarkeit“. Ersteres kann

durch naturwissenschaftliche Befunde begründet und möglicherweise auch widerlegt werden, das zweite ist eine weltanschaulich motivierte und naturwissenschaftlich nicht schlüssig zu belegende Vermutung (SCHERER, 2008). Ich bin ein entschiedener Befürworter der evolutionsbiologischen Forschung, die nötig ist, um Erklärungslücken der Evolutionsbiologie – wo möglich – zu schließen. Allerdings, solide datengestützt müssen akzeptable evolutionsbiologische Erklärungen schon sein. Mit Weniger kann man sich als Empiriker eigentlich nicht zufrieden geben.

Literatur

- ANTONOVICS, J. (1987). The evolutionary dys-synthesis: Which bottles for which wine? *American Naturalist* 129, 321-331.
- ARBER, W. (2000). Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol Rev* 24, 1-7.
- BAMFORD, D. H., BURNETT, R. M. & STUART, D. I. (2002). Evolution of viral structure. *Theor Popul Biol* 61, 461-470.
- BERNHARDT, T. G., WANG, I. N., STRUCK, D. K. & YOUNG, R. (2002). Breaking free: „protein antibiotics“ and phage lysis. *Res Microbiol* 153, 493-501.
- BLÁSI, U., FRAISL, P., CHANG, C. Y., ZHANG, N. & YOUNG, R. (1999). The C-terminal sequence of the lambda holin constitutes a cytoplasmic regulatory domain. *J Bacteriol* 181, 2922-2929.
- BREITBART, M., WEGLEY, L., LEEDS, S., SCHOENFELD, T. & ROHWER, F. (2004). Phage community dynamics in hot springs. *Appl Environ Microbiol* 70, 1633-1640.
- ELOFSSON, A. & VON HEIJNE, G. (2007). Membrane protein structure: prediction versus reality. *Annu Rev Biochem* 76, 125-140.
- FOSTER, S. J. (1995). Molecular characterization and functional analysis of the major autolysin of *Staphylococcus aureus* 8325/4. *J Bacteriol* 177, 5723-5725.
- GOH, S., CHANG, B. J. & RILEY, T. V. (2005). Effect of phage infection on toxin production by *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 54, 129-135.
- GOULD, S. J. & LEWONTIN, R. C. (1979). The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 205, 581-598.
- GRÜNDLING, A., BLÁSI, U. & YOUNG, R. (2000). Genetic and biochemical analysis of dimer and oligomer interactions of the lambda S holin. *J Bacteriol* 182, 6082-6090.
- GRÜNDLING, A., MANSON, M. D. & YOUNG, R. (2001). Holins kill without warning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9348-9352.
- HATFULL, G. F., PEDULLA, M. L., JACOBS-SERA, D. & other authors (2006). Exploring the mycobacteriophage metaproteome: phage genomics as an educational platform. *PLoS Genet* 2, e92.
- HEILMANN, C., HUSSAIN, M., PETERS, G. & GOTZ, F. (1997). Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* 24, 1013-1024.
- HEINEMAN RH, MOLINEUX IJ, BULL JJ (2005) Evolutionary robustness of an optimal phenotype: Re-evolution of lysis in a bacteriophage deleted for its lysin. *J. Mol. Evol.* 61,181-191.
- HEINEMAN, R. H. & BULL, J. J. (2007). Testing optimality with experimental evolution: lysis time in a bacteriophage. *Evolution Int J Org Evolution* 61, 1695-1709.
- HENDRIX, R. W., LAWRENCE, J. G., HATFULL, G. F. & CASJENS, S. (2000). The origins and ongoing evolution of viruses. *Trends Microbiol* 8, 504-508.
- HENDRIX, R. W. (2003). Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol* 6, 506-511.
- HENDRIX, R. W. (2005). Bacteriophage evolution and the role of phages in host evolution. In: *Phages; Their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*, pp. 55-65. Edited by M. L. Waldor, D. I. Friedman & S. L. Adhy. Washington: ASM Press.
- HULTER, N. & WACKERNAGEL, W. (2008). Double illegitimate recombination events integrate DNA segments through two different mechanisms during natural transformation of *Acinetobacter baylyi*. *Mol Microbiol* 67, 984-995.
- IANDOLO, J. J., WORRELL, V., GROICHER, K. H. & other authors (2002). Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages phi 11, phi 12 and phi 13 of *Staphylococcus aureus* 8325. *Gene* 289, 109-118.
- JOHNSON-BOAZ, R., CHANG, C. Y. & YOUNG, R. (1994). A dominant mutation in the bacteriophage lambda S gene causes premature lysis and an absolute defective plating phenotype. *Mol Microbiol* 13, 495-504.
- JUNKER, R. & SCHERER, S. (2006). *Evolution ein kritisches Lehrbuch*, 3rd edn. Gießen: Weyel.
- KWAN, T., LIU, J., DUBOW, M., GROS, P. & PELLETIER, J. (2005). The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5174-5179.
- KWAN, T., LIU, J., DUBOW, M., GROS, P. & PELLETIER, J. (2006). Comparative genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *J Bacteriol* 188, 1184-1187.
- LEIGH, E. G., Jr. (1999). The modern synthesis, Ronald Fisher and creationism. *Trends Ecol Evol* 14, 495-498.
- LITTLE, J. W. (2005). Lysogeny, prophage induction, and lysogenic conversion. In: *Phages; Their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*, pp. 37-54. Edited by M. L. Waldor, D. I. Friedman & S. L. Adhy. Washington: ASM Press.
- LOESSNER, M. J. & SCHERER, S. (1995). Organization

- and transcriptional analysis of the *Listeria* phage A511 late gene region comprising the major capsid and tail sheath protein genes *cps* and *tsh*. *J Bacteriol* **177**, 6601-6609.
- LOESSNER, M. J., MAIER, S. K., DAUBEK-PUZA, H., WENDLINGER, G. & SCHERER, S. (1997). Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli. *J Bacteriol* **179**, 2845-2851.
- LOESSNER, M. J., GAENG, S., WENDLINGER, G., MAIER, S. K. & SCHERER, S. (1998). The two-component lysis system of *Staphylococcus aureus* bacteriophage Twort: a large TTG-start holin and an associated amidase endolysin. *FEMS Microbiol Lett* **162**, 265-274.
- LOESSNER, M. J., GAENG, S. & SCHERER, S. (1999). Evidence for a holin-like protein gene fully embedded out of frame in the endolysin gene of *Staphylococcus aureus* bacteriophage 187. *J Bacteriol* **181**, 4452-4460.
- LOESSNER, M. J., INMAN, R. B., LAUER, P. & CALENDAR, R. (2000). Complete nucleotide sequence, molecular analysis and genome structure of bacteriophage A118 of *Listeria monocytogenes*: implications for phage evolution. *Mol Microbiol* **35**, 324-340.
- LOESSNER, M. J. (2005). Bacteriophage endolysins—current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol* **8**, 480-487.
- MADIGAN, T. & MARTINKO, J. M. (2006). *Brock Mikrobiologie*. München: Pearson.
- MAJEWSKI, J., ZAWADZKI, P., PICKERILL, P., COHAN, F. M. & DOWSON, C. G. (2000). Barriers to genetic exchange between bacterial species: *Streptococcus pneumoniae* transformation. *J Bacteriol* **182**, 1016-1023.
- MEIER, P. & WACKERNAGEL, W. (2003). Mechanisms of homology-facilitated illegitimate recombination for foreign DNA acquisition in transformable *Pseudomonas stutzeri*. *Mol Microbiol* **48**, 1107-1118.
- ORGEL, L. E. (2008). The implausibility of metabolic cycles on the prebiotic Earth. *PLoS Biol* **6**, e18.
- OSHIDA, T., SUGAI, M., KOMATSUZAWA, H., HONG, Y. M., SUGINAKA, H. & TOMASZ, A. (1995). A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo-beta-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 285-289.
- PARK, T., STRUCK, D. K., DEATON, J. F. & YOUNG, R. (2006). Topological dynamics of holins in programmed bacterial lysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 19713-19718.
- PARK, T., STRUCK, D. K., DANKENBRING, C. A. & YOUNG, R. (2007). The pinholin of lambdaoid phage 21: control of lysis by membrane depolarization. *J Bacteriol* **189**, 9135-9139.
- RIDDER, A., SKUPJEN, P., UNTERREITMEIER, S. & LANGOSCH, D. (2005). Tryptophan supports interaction of transmembrane helices. *J Mol Biol* **354**, 894-902.
- RYAN, G. L. & RUTENBERG, A. D. (2007). Clocking out: modeling phage-induced lysis of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**, 4749-4755.
- RYDMAN, P. S. & BAMFORD, D. H. (2003). Identification and mutational analysis of bacteriophage PRD1 holin protein P35. *J Bacteriol* **185**, 3795-3803.
- SCHERER, S. (2008). „Intelligent Design“ ist keine naturwissenschaftliche Alternative zu biologischen Evolutionstheorien. <http://www.siegfriedscherer.de/idhtml> 20. April 2008.
- SUTTLE, C. A. (2005). Viruses in the sea. *Nature* **437**, 356-361.
- TAN, K. S., WEE, B. Y. & SONG, K. P. (2001). Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* **50**, 613-619.
- UNTERREITMEIER, S., FUCHS, A., SCHAFFLER, T., HEYM, R. G., FRISHMAN, D. & LANGOSCH, D. (2007). Phenylalanine promotes interaction of transmembrane domains via GxxxG motifs. *J Mol Biol* **374**, 705-718.
- VOTH, D. E. & BALLARD, J. D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* **18**, 247-263.
- VUKOV, N., SCHERER, S., HIBBERT, E. & LOESSNER, M. J. (2000). Functional analysis of heterologous holin proteins in a lambdaDeltaS genetic background. *FEMS Microbiol Lett* **184**, 179-186.
- VUKOV, N., MOLL, I., BLÄSI, U., SCHERER, S. & LOESSNER, M. J. (2003). Functional regulation of the *Listeria monocytogenes* bacteriophage A118 holin by an intragenic inhibitor lacking the first transmembrane domain. *Mol Microbiol* **48**, 173-186.
- WALDOR, M. K., FRIEDMAN, D. I. & ADHYA, S. L. (2005). Phages, their role in bacterial pathogenesis and biotechnology. Washington: ASM Press.
- WILHELM, S. W., BRIGDEN, S. M. & SUTTLE, C. A. (2002). A dilution technique for the direct measurement of viral production: a comparison in stratified and tidally mixed coastal waters. *Microb Ecol* **43**, 168-173.
- WINKLER, N. (2008). Überlappende Gene - Herausforderung für die Evolutionstheorie. im Druck.
- WOMMACK, K. E. & COLWELL, R. R. (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 69-114.
- XU, M., ARULANDU, A., STRUCK, D. K., SWANSON, S., SACCHETTINI, J. C. & YOUNG, R. (2005). Disulfide isomerization after membrane release of its SAR domain activates P1 lysozyme. *Science*, 113-117.
- YAMAGUCHI, T., HAYASHI, T., TAKAMI, H., NAKASONE, K., OHNISHI, M., NAKAYAMA, K., YAMADA, S., KOMATSUZAWA, H. & SUGAI, M. (2000). Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **38**, 694-705.
- YOUNG, I., WANG, I. & ROOF, W. D. (2000). Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol* **8**, 120-128.
- YOUNG, R. (2002). Bacteriophage holins: deadly diversity. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 21-36.
- YOUNG, R. (2005). Phage lysis. In: Phages; Their role in bacterial pathogenesis and biotechnology, pp. 92-

127. Edited by M. K. Waldor, D. I. Friedman & S. L. Adhya. Washington: ASM Press.
- YOUNG, R. Y. & WANG, I. N. (2006). Phage lysis. In: *The Bacteriophages*, pp. 104-125. Edited by R. Calendar. Oxford: Oxford University Press.
- YU, J. S., KOKOSKA, R. J., KHEMICI, V. & STEEGE, D. A. (2007). In-frame overlapping genes: the challenges for regulating gene expression. *Mol Microbiol* *63*, 1158-1172.
- ZIMMER, M., VUKOV, N., SCHERER, S. & LOESSNER, M. J. (2002). The murein hydrolase of the bacteriophage phi3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Appl Environ Microbiol* *68*, 5311-5317.