

Komplexitätszunahme in einer molekularen Maschine

Wiedererweckte Proteine werfen Licht auf die Evolution

TOBIAS KLÖS

Es ist ein Hauch von JURASSIC PARK, was Evolutionsbiologen mit Proteinen, die vor Millionen Jahren aktiv waren, gelungen ist. Evolutionsbiologen haben ursprüngliche Formen einer molekularen Maschine wieder "zum Leben erweckt" (FINNIGAN et al. 2012a). Ermöglicht wurden die Experimente durch die Entwicklung von Methoden zur Rekonstruktion stammesgeschichtlich alter (anzestraler) DNA-Sequenzen und durch die Fortschritte chemischer und molekularbiologischer Techniken. Heute können automatisiert Oligonukleotide synthetisiert und dann stückweise mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu einem Gen zusammengesetzt werden (THORNTON 2004; CHANG et al. 2002b). Anschließend kann man das Gen exprimieren und die Funktion des ursprünglichen Proteins charakterisieren. Auf diese Weise ließ sich rekonstruieren, in welchen evolutionären Schritten die molekulare Maschine zu ihrer heutigen Komplexität gelangte. In diesem Beitrag werden die neuen Ergebnisse vorgestellt und anschließend die Evolution der komplexen Struktur (V-ATPase) im Ganzen betrachtet.

Die Rekonstruktion ursprünglicher Sequenzen

Die Sequenzen, die für die Synthese der ursprünglichen Gene benötigt werden, erhält man durch angewandte Bioinformatik. In den letzten Jahrzehnten wurden im Zuge der Entwicklung der phylogenetischen Methoden auch die Methoden zur Rekonstruktion ursprünglicher Sequenzen entwickelt. Dabei werden die betreffenden DNA- bzw. Proteinsequenzen auf der Basis der heutigen (in Datenbanken abgespeicherten) Nachfahrensequenzen rekonstruiert. Zunächst werden heutige Sequenzen verschiedener Lebewesen sinnvoll (d.h. u.a. repräsentativ für möglichst viele Nachfahren-Linien) ausgewählt und in einem Alignment angeordnet. Mit entsprechenden Außengruppensequenzen¹ wird dann ein Stammbaum rekonstruiert. Daraufhin können die Forscher die ursprünglichen Sequenzen in Verzweigungspunkten des Stammbaums, für die sie sich interessieren, ermitteln.

In den Anfangsjahren wurde zu dieser Rekonstruktion das *Prinzip der maximalen Sparsamkeit* (PARSIMONY-Prinzip) verwendet (JERMANN et al. 1995), während ab

¹ D.h. Sequenzen, die sich noch vor der zu untersuchenden Sequenz abgespalten haben: Dazu werden Genen aus anderen Organismen-Gruppen verwendet oder solche, die sich bereits vorher verdoppelt – dupliziert – haben, so dass diese als "Schwester-Sequenzen" zum Vergleich verwendet werden können.

Evolution: Komplexitätszunahme in einer molekularen Maschine

der Mitte der 90er Jahre das von Ziheng YANG entwickelte Programmpaket PAML, das auf der MAXIMUM-LIKELIHOOD-Methode basiert, immer beliebter wurde (YANG et al. 1995; KOSHI UND GOLDSTEIN 1996; YANG 1997; THORNTON 2004; YANG et al. 2007). Bei der MAXIMUM-LIKELIHOOD-Methode können wichtige *zusätzliche* Informationen über den molekularen Evolutionsprozess in die Rekonstruktion einfließen. So erhalten die Wissenschaftler mit dieser Methode, nachdem ein Stammbaum mit Astlängen konstruiert wurde und unter der Verwendung eines geeigneten Evolutionsmodells (Modell zur Sequenzevolution)², die ursprünglichen hypothetischen Sequenzen, die statistisch die größte Wahrscheinlichkeit haben. In den letzten Jahren wurden außerdem BAYESSche-Verfahren eingesetzt, um ursprüngliche Sequenzen zu rekonstruieren (THORNTON et al. 2004).

Natürlich können fehlerhafte Annahmen (wie Alignment, Stammbaum, Evolutionsmodell bzw. Modellparameter) negative Auswirkungen auf die Rekonstruktion haben. Jede Rekonstruktion ist ganz grundsätzlich mit Unsicherheiten behaftet, welche die Forscher sorgfältig abschätzen und bewerten müssen. Um die Unsicherheiten zu minimieren, wurden verschiedene Strategien entwickelt. Ein erfolgreiches Verfahren ist u. a., dass die Forscher nicht nur *eine* Vorfahrensequenz herstellen und testen, sondern *mehrere* plausible Sequenzen, die sich in an unklaren Stellen unterscheiden (JERMANN et al. 1995; THORNTON 2004). Grundsätzlich funktionieren die Methoden zur Rekonstruktion der ursprünglichen Sequenzen gut, wobei selbstverständlich eine sorgfältige und kritische Herangehensweise Voraussetzung ist, um keine fehlerhaften Schlussfolgerungen zu ziehen (KOSHI UND GOLDSTEIN 1996; ZHANG UND NEI 1997; CAI et al. 2004; HALL 2006; WILLIAMS et al. 2006; LIBERLES 2007; HANSON-SMITH et al. 2010).

² Ein statistischer Test (LIKELIHOOD-RATIO-TEST) und das AKAIKE-Informationskriterium (AIC) können verwendet werden, um das am besten geeignete Modell zu ermitteln.



Joseph W. Thornton

"By reconstruction the machine's components as they existed in the deep past...we were able to establish exactly how each protein's function changed over time and identify the specific genetic mutations that caused the machine to become more elaborate."

"Complexity increased because protein functions were lost, not gained. Just as in society, complexity increases when individuals and institutions forget how to be generalists and come to depend on specialists with increasingly narrow capacities"

Wiedererweckte Proteine werfen Licht auf die Evolution

1965 konnten PAULING und ZUCKERKANDL über die Möglichkeit der Rekonstruktion ursprünglicher Proteine nur spekulieren (PAULING UND ZUCKERKANDL 1963). Das änderte sich grundlegend. In den letzten Jahren erfolgten zahlreiche Rekonstruktionen von ursprünglichen Proteinen, um evolutionsbiologische und ökologische Hypothesen zu testen (LIBERLES 2007; THORNTON 2004; DEAN UND THORNTON 2007). Darunter befindet sich eine 240 Millionen Jahre alte DNA-Sequenz, die für ein ursprüngliches Rhodopsin-Molekül kodiert (CHANG et al. 2002a). Noch weiter zurück reicht die Rekonstruktion des ursprünglichen Elongationsfaktors EF-Tu (ein wichtiges Protein bei der Proteinbiosynthese), der vor über 2 Milliarden Jahren im gemeinsamen Vorfahren aller Bakterien aktiv war. Die Rekonstruktion von GAUCHER et al. (2003) wirft Licht auf die Evolution und die Umwelt der ersten Lebensformen. So beträgt die optimale GDP-Bindungstemperatur des rekonstruierten ursprünglichen Proteins 65 °C. Dieses Ergebnis bekräftigt die Hypothese, dass der gemeinsame Vorfahre der Bakterien in einer warmen Umgebung evolvierte und somit den thermophilen Organismen zuzurechnen ist. GAUCHER und seine Kollegen konnten diese Untersuchungen noch ausweiten, indem sie die optimalen Temperaturen der Elongationsfaktoren an unterschiedlichen Verzweigungspunkten des Stammbaums ermittelten. Diese Untersuchungsergebnisse zeigen, dass zwischen 3,5 bis 0,5 Milliarden Jahren vor unserer Zeit eine Abkühlung erfolgte, die ebenfalls durch physikalische Methoden nachgewiesen werden konnte (GAUCHER et al. 2008). Dieser festgestellte Abkühlungstrend wird auch durch Versuche an *wiedererweckten* Thioredoxin-Enzymen (Trx) untermauert (PEREZ-JIMENEZ et al. 2011). Zahlreiche weitere Rekonstruktionen wurden in der vergangenen Jahren vorgenommen. Zum Beispiel wurden ursprüngliche Steroidhormonrezeptoren (THORNTON et al. 2003; BRIDGHAM et al. 2006; BRIDGHAM et al. 2009; ORTLUND et al. 2007), GFP-ähnliche Proteine (UGALDE et al. 2004; FIELD UND MATZ 2010) und eine ursprüngliche Alkoholdehydrogenase (THOMSON et al. 2005) näher untersucht. Die Methoden zur Rekonstruktion und Analyse von ursprünglichen Proteinen sind mittlerweile etabliert und stimulieren die moderne Evolutionsbiologie und Ökologie enorm. Darüber hinaus verstärken sie die Verbindung zwischen Evolutionsbiologie, Biochemie, synthetischer Biologie und Biomedizin (THORNTON 2004; LIBERLES 2007; HARMS UND THORNTON 2010).

Die V-ATPase der Pilze – Entstehung und Differenzierung eines komplexen Proteinrings

Die jüngsten Rekonstruktionsuntersuchungen von FINNIGAN et al. (2012a) gestatten es nun zu zeigen, wie die Komplexität in einer molekularen Maschine im

Laufe der Evolution zunahm (Abb. 1). Dabei handelt es sich um den aus 6 Proteinen bestehenden V_0 -Ring des Multiproteinkomplexes der vakuolären H^+ -ATPase (V-ATPase). Die V-ATPase, die praktisch ein molekularer Motor ist, ist in allen Eukaryoten vorhanden. Sie ist aus zwei großen Komplexen aufgebaut, dem V_0 - und V_1 -Komplex. Der periphere V_1 -Komplex wird für die Aufspaltung (Hydrolyse) des Energieträgers ATP benötigt, wobei der V_1 -Komplex wie ein Rotationsmotor in Drehung versetzt wird. Der integrale V_0 -Ring (*Protonenkanal*) wiederum ist dafür verantwortlich, Protonen (H^+) über die Membran zu leiten, was durch die ATP-abhängige Rotation des V_0 -Komplexes bewerkstelligt wird. Die multifunktionale V-ATPase verursacht so die Ansäuerung von intrazellulären Kompartimenten (NISHI UND FORGAC 2002).

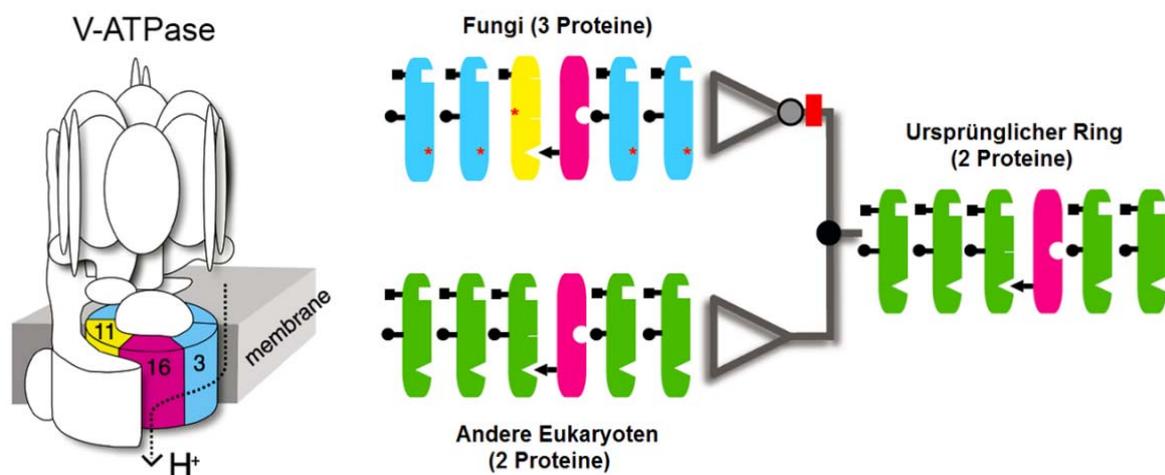


Abb. 1: Links: Die V-ATPase mit den zwei Komplexen (V_0 und V_1). Die drei Proteintypen (3, 11, 16) im V_0 -Proteinring sind farblich gekennzeichnet (links). Schema: Der ursprüngliche Proteinring des gemeinsamen Vorfahren (ganz rechts) und die von ihm abstammenden rezenten Formen (in der Mitte abgebildet). Während der Ring bei den meisten Eukaryoten aus 6 Kopien mit zwei unterschiedlichen Proteinen (pink, grün) besteht, funktioniert in der Hefe und anderen Pilzen (Fungi) der Ring mit 6 Kopien, die 3 verschiedene Proteine aufweisen (pink, blau, gelb). Für den Zusammenbau der Proteinringe sind spezifische Interaktionen zwischen den Proteinen nötig, die hier durch Quadrate (P), Dreiecke (R) und Kreise (Q) symbolisiert werden. Die Komplexitätszunahme (rote Markierung) geht mit dem Verlust von Interaktionsmöglichkeiten einher. Als Folge wurden zwei Proteine (blau und gelb) positionell spezialisiert und dadurch unentbehrlich für das Funktionieren der komplexeren Maschine der heutigen Hefezellen (FINNIGAN et al. 2012a; THORNTON 2012) – ein "nicht reduzierbar komplexes" Drei-Komponentensystem war entstanden.

Während der membrangebundene V_0 -Ring in den meisten Eukaryoten aus zwei Komponenten besteht, den Untereinheiten Vma3 und Vma16, weist der V_0 -Ring in allen Pilzen (Fungi) drei Komponenten, die Untereinheiten Vma3, Vma16 und Vma11, auf (Abb. 1). Alle drei Komponenten werden für die Funktion der V-ATPase in der Hefezelle benötigt (HIRATA et al. 1997). Wenn man nur eine Komponente des Rings entfernt, funktioniert die V-ATPase nicht mehr. Wie also kann-

te der aus drei Komponenten bestehende Ring entstehen? Zur Klärung dieser offenen Frage erweckte das Forscherteam um Joseph THORNTON die ursprünglichen V_0 -Proteine kurz vor und nach der Komplexitätszunahme wieder zum Leben und charakterisierten die Funktion in der Hefe, indem sie die synthetisierten ursprünglichen Sequenzen in Hefemutanten transformierten, denen eine oder mehrere der drei heutigen Gene fehlten. Es stellte sich heraus, dass die molekulare Maschine durch die Expression der *ursprünglichen* Gene ihre Funktion wiedererlangte. Die ursprünglichen Proteine, die Hunderte von Millionen Jahre alt sind, bauten sich also zu einer funktionierenden Protonenpumpe zusammen, die unter ATP-Hydrolyse intrazelluläre Kompartimente ansäuert. Die gut durchdachten Experimente von FINNIGAN et al. (2012a) zeigten ebenfalls, dass der V_0 -Ring während der Komplexitätszunahme keine neue Funktion evolvierte. Die komplexere Maschine aus drei Komponenten arbeitet auch nicht besser als die ursprüngliche einfachere Maschine mit 2 Ringkomponenten. Die Komplexitätszunahme ging offenbar – zunächst jedenfalls – ohne einen signifikanten Selektionsvorteil einher.

Komplexitätszunahme durch Verluste

Mit den Konstruktionen der ursprünglichen Gene konnten die Forscher außerdem aufklären, wie es dazu kam, dass im Laufe der Evolution die drei Komponenten für die Funktionsfähigkeit der V-ATPase unentbehrlich wurden. Ursprünglich bestand der Ring nur aus zwei Komponenten (fünf Kopien namens Anc.3-11 und eine namens Anc.16). Nach der Duplikation von Anc.3-11 (die Sequenz des gemeinsamen Vorfahren) entstanden daraus Anc.3 und Anc.11, die beide zusammen mit Anc.16 den aus drei Komponenten bestehenden Ring bildeten (Abb. 2).

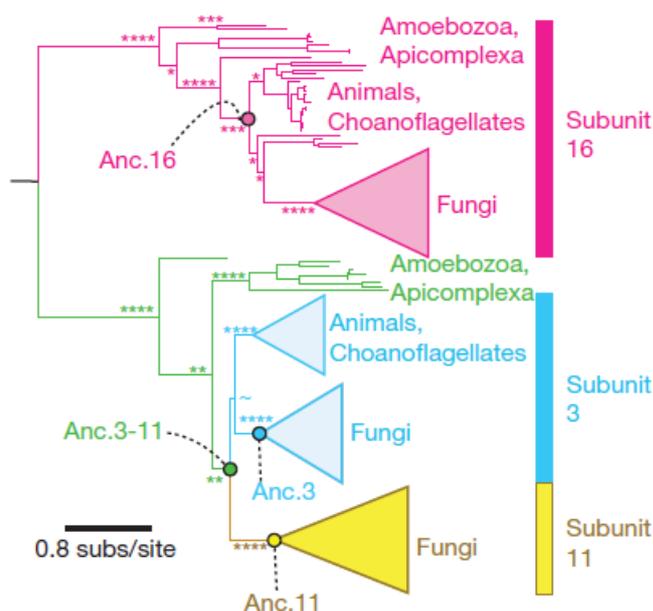


Abb. 2: Phylogenetische Rekonstruktion der Untereinheiten (11, 3, 16). 139 verschiedenen Eukaryoten wurden von den Forschern ausgewählt, um einen phylogenetischen Baum der Proteinfamilie der drei Ringkomponenten (16, 3, 11) zu erstellen. Die ursprünglichen Sequenzen erhielten die Forscher mittels modernen bioinformatischen Methoden. Die Kreise (Anc.11, Anc.3-11, Anc.3, Anc.16) stehen für die Proteine, die die Forscher wieder "zum Leben erweckten" (FINNIGAN et al. 2012a).

Genduplikationen sorgen dafür, dass neue zusätzliche Genkopien entstehen. In der neuen Genkopie können sich dann Mutationen ansammeln, die das Gen modifizieren, ohne dass das Risiko besteht, dass das andere (ursprüngliche) Gen seine Funktion verliert. In der von FINNIGAN et al. (2012a) untersuchten molekularen Maschine verloren Anc.3 und Anc.11 nach der Duplikation die drei Interaktionsmöglichkeiten von Anc.3-11 (P, Q, R). Durch den komplementären Interaktionsverlust zu anderen Ringkomponenten konnten sich die Proteine nicht mehr überall im Ring platzieren. Sie wurden räumlich spezifiziert (Abb. 1). Daher stößt man heute bei den Pilzen auf ein Ringsystem aus drei zusammenpassenden und zusammenwirkenden Komponenten, die alle unverzichtbar für die Funktion der molekularen Maschine sind.

Nur wenige Mutationen waren nötig

Um die genetische Grundlage der Differenzierung von Anc.3 und Anc.11 nach der Duplikation von Anc.3-11 besser zu verstehen, führten die Forscher außerdem "historische" Mutationen in Anc.3 und Anc.11 ein. Sie fanden heraus, dass wenige, relativ wahrscheinliche Mutationen ausreichten, um die ursprünglichen Interaktionsmöglichkeiten zu vermindern und dabei *gleichzeitig* andere wichtige Funktionen zur Interaktion intakt zu lassen (Abb. 1). Die Forscher konnten somit aufklären, dass und auf welche Weise das System durch einfache bekannte evolutionäre Prozesse (Genduplikationen und Mutationen), selektionsneutral und einhergehend mit Funktionsverlusten, zu der heutigen Komplexität getrieben wurde. Obwohl man Selektionsvorteile nicht völlig ausschließen kann, stärken die Experimente evolutionsbiologische Konzepte, mit denen man die Evolution komplexer Systeme (zumindest etappenweise) durch neutrale Prozesse zu erklären versucht (STOLTZFUS 1999; FORCE et al. 1999; GRAY et al. 2010; LUKES et al. 2011). Um feststellen zu können, wie verbreitet die beschriebenen evolutionären Mechanismen sind, sind freilich noch weitere Forschungen an komplexen molekularen Systemen nötig.

Die Evolution der V-ATPase im Ganzen gesehen

Heute erfüllt die V-ATPase in verschiedenen Organellen, Organen und Organismen diverse Aufgaben und ist auch im Aufbau, wie wir gesehen haben, nicht uniform. Welchen evolutionären Ursprung hat dieser Enzymkomplex als Ganzes? Gibt es verwandte Enzymkomplexe, mit denen die V-ATPase einen gemeinsamen Vorfahren hat? Kann man Aussagen über molekulare Evolutionsmechanismen treffen? Und was lässt sich zur Evolution der anderen Untereinheiten sagen?

Man kennt schon seit längerer Zeit Enzymkomplexe, die mit der V-ATPase verwandt sind. Dazu gehören die archaischen A-ATPasen und die F-ATPasen, die man in der Membran von Prokaryoten, Mitochondrien und Chloroplasten findet³. Diese ATPasen sind sich alle sehr ähnlich. Das fällt bereits ins Auge, wenn man mittels Elektronenmikroskop den ähnlichen, aus zwei Strukturbereichen bestehenden Aufbau – den Transmembrankanal und den darauf sitzenden, symmetrischen "Kopf" (Hexamer) – betrachtet. Es verwundert daher nicht, dass die jeweils aus sechs Molekülen bestehenden $V_1/A_1/F_1$ -Strukturen *homologe* Ähnlichkeiten zeigen (GOGARTEN UND TAIZ 1992; MULKIDJANIAN et al. 2007). Dabei liegen die zwei Untereinheiten (A/B bzw. α/β) alternierend in je drei Kopien ringförmig als Hexamer vor. Die homologe Ähnlichkeit bezeugt die gemeinsame Herkunft der Strukturen. Außerdem weist nicht nur der V_1 -Komplex homologe Ähnlichkeiten auf, sondern ebenso der membrangebundenen A_0/V_0 - und F_0 -Komplex. Allerdings sind auch Untereinheiten feststellbar, die nicht homolog sind. Insbesondere besteht bei dem *zentralen* Verbindungsstück, den γ - und ϵ - Untereinheiten (wie sie bei der F-ATPase genannt werden), also *zwischen* dem membrangebundenen V_0/F_0 -Komplex und der ringförmigen hexameren Struktur, keine homologe Ähnlichkeit (MULKIDJANIAN et al. 2007). Auch funktionell *können* sich die ATPasen unterscheiden. Die F-ATPase und die A-ATPase sind dafür bekannt, dass sie in allen drei Domänen des Lebens den universellen Energieträger Adenosintri-phosphat *synthetisieren*, während die V-ATPase in lebenden Zellen normalerweise Adenosintri-phosphat *hydrolysiert* (GRÜBER UND MARSHANSKY 2008).

Trotz aller Unterschiede, die zwischen diesen ATPasen auch bestehen können: Die Struktur- und Sequenzvergleiche zwischen ihnen lassen darauf schließen, dass sie einen gemeinsamen Ursprung haben und sich im Laufe der Evolution strukturell und funktionell differenzierten (MÜLLER et al. 2005). Der evolutionäre Ursprung reicht sehr weit zurück, in den Zeitraum, bevor der letzte gemeinsame Vorfahre aller Lebewesen (LUCA) entstand. Tatsächlich ist es schwierig etwas Genaueres über den Vorfahren der ATPasen und dessen Evolution herauszufinden, da es bekanntermaßen keine "fossilen Überlieferungen" von den ursprünglichen molekularen Maschinen gibt. Untersuchungen von MULKIDJANIAN und seinen Mitarbeitern legen allerdings nahe, dass der Vorfahre der F- und V/A-ATPasen eine Bindestelle für Natrium-Ionen hatte (MULKIDJANIAN et al. 2008a;

³ Die ATPasen kann man jedoch nicht exakt den jeweiligen Domänen zuordnen. Zum Beispiel findet man in Bakterien auch archaische und vakuläre ATPasen. Außerdem ist es möglich, dass F-ATPasen auch bei den *Archaea* auftreten. Wahrscheinlich ist dies auf einen regen *horizontalen Gentransfer* (HGT) zurückzuführen.

MULKIDJANIAN et al. 2008b; MULKIDJANIAN et al. 2009). Demnach könnte der gemeinsame Vorfahre, in einer Zeit, als die Membranen möglicherweise durchlässig

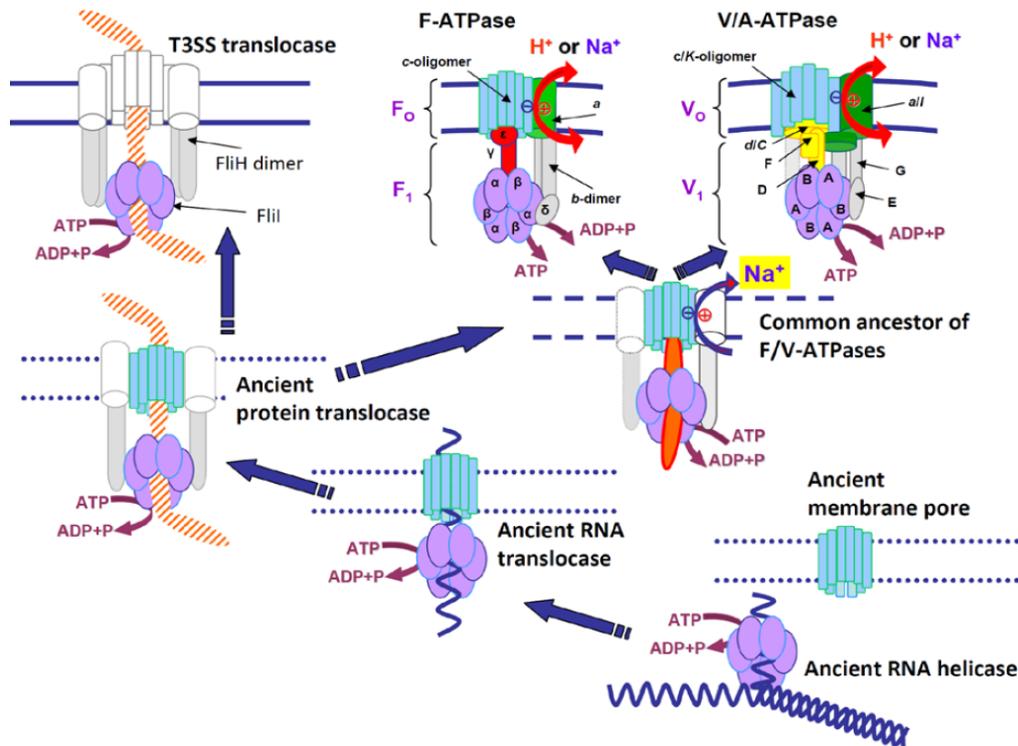


Abb. 3: Ein hypothetisches Szenario zur Evolution der ATPasen. Danach entwickelten sich die heutigen V/A/F-ATPasen sowie die T3SS-Translokase (Typ-3-Sekretionssystem) ausgehend von einem ursprünglichen Membrankanal und einer ursprünglichen RNA-Helikase (WALKER 1998). Als Zwischenstadien werden RNA- und Proteintranslokasen angenommen. Gestützt wird das Szenario durch Homologievergleiche (MULKIDJANIAN et al. 2007; PALLÉN et al. 2006). Es ist kompatibel mit der Erkenntnis, dass die katalytischen hexameren Strukturen der V- und F-ATPasen homologe Ähnlichkeiten zu den hexameren Helikasen (Rho) zeigen (PATEL und PÍCHA 2000). Die als Zwischenstufe angenommene RNA-Translokase könnte ähnlich wie etwa die strukturähnliche hexamere P4-ATPase funktioniert haben.

- Der ähnliche Komplex (P4-ATPase) existiert heute in RNA-Bakteriophagen: Dieser relativ einfache Verpackungsmotor transferiert dort RNA-Moleküle (MANCINI et al. 2004; KAINOV et al. 2006). Es wird angenommen, dass in der frühen Evolutionsphase *horizontaler Gentransfer* die Evolution maßgeblich vorantrieb. Dementsprechend könnten Nukleinsäure-Translokasen in den ersten sich selbst replizierenden Einheiten, die von ursprünglichen Membranen umhüllt waren, eine wichtige Rolle in der RNA-dominierten Welt beim Austausch von RNA gespielt haben (MULKIDJANIAN et al. 2007; MULKIDJANIAN et al. 2009).
- Auch heute noch existieren F₁-ATPase-ähnliche DNA-Translokasen während der bakteriellen Konjugation (GOMIS-RUTH et al. 2001).
- Daneben sind auch andere Wege denkbar, z.B. von einer RNA-Helikase (RNA-Unwinding/Unfolding) zur Protein-Unfoldase (ähnlich den AAA+ Unfoldasen oder den Clp/Hsp100-Chaperonen) und zur Proteintranslokase.

Orthologe (d.h. einander im Stammbaum und meist funktional entsprechende) Untereinheiten sind mit der gleichen Farbe gekennzeichnet, während nicht-homologe (jedoch ggf. funktionell analoge) Untereinheiten unterschiedliche Farben tragen. Das Szenario kann erklären, warum die *zentralen* Untereinheiten (rot/gelb) der ATPasen keine Homologie aufweisen. Außerdem integriert das Szenario aktuelle evolutionsbiologische Überlegungen zur Membranevolution (MULKIDJANIAN und GALPERIN 2010; MULKIDJANIAN et al. 2007).

für Protonen (H^+) waren, aber nicht für Natrium (Na^+), einen Natriumgradienten genutzt haben, um ATP zu synthetisieren. Darüber hinaus gehen die Forscher zeitlich noch weiter zurück. MULKIDJANIAN et al. 2007 haben ein hypothetisches Szenario vorgelegt, das – unter Berücksichtigung der homologen und nicht-homologen Komponenten sowie der Membranevolution – die Evolution der ATP-asen ausgehend von einem Membrankanal und einer hexameren Helikase über RNA- und Proteintranslokasen als Zwischenstufen erklärt. Dieses Szenario ist gänzlich hypothetisch, aber gleichwohl plausibel und von Sequenzdaten recht gut untermauert (Abb. 3). Das vorgeschlagene Szenario bietet trotz allen Schwierigkeiten, die im Hinblick auf die weit zurückliegenden Evolutionsereignisse bestehen, ein evolutionsbiologisches Erklärungsmodell, das neue Anknüpfungspunkte und überprüfbare Hypothesen für die Forschung liefert (MULKIDJANIAN et al. 2007).

Bereits jetzt lässt sich sagen, dass Duplikationsereignisse mit anschließender Diversifikation eine wichtige Rolle bei der molekularen Evolution spielen (INNAN UND KONDRASHOV 2010; CONANT UND WOLFE 2008). Dies ist offensichtlich nicht nur – wie oben erläutert – bei dem V_0 -Ring der Fall, sondern auch bei anderen Untereinheiten der V-ATPase (FINNIGAN et al. 2011; CROSS UND MÜLLER 2004; MÜLLER UND GRÜBER 2003). Zum Beispiel trifft das auf die Untereinheiten A und B des V_1 -Komplexes und die Isoformen der V-ATPase-Untereinheit **a** zu (Abb. 4).

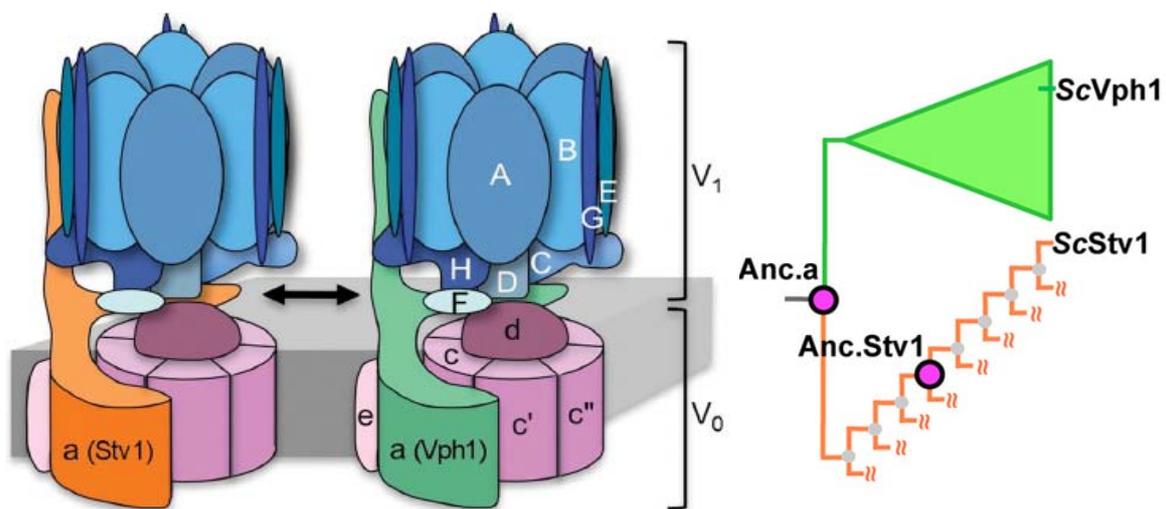


Abb. 4: Die V-ATPase-Untereinheit **a** der Isoformen Stv1 (orange) und Vph1 (grün) gehört zum membrangebundenen Strukturbereich (V_0). Die Isoformen sind für die subzelluläre Lokalisierung der V-ATPase in der Hefezelle verantwortlich (FINNIGAN et al. 2011). Rechts ist die Phylogenie der V-ATPase Untereinheit **a** (Fungi) dargestellt. Sowohl die ursprüngliche (vor der Genduplikation vorhandene) Isoform **a** (Anc.a) als auch die erste evolutionäre Zwischenform (Anc.Stv1), die das Sortierungssignal $W^{83}KY$ enthält, wurden von den Forschern rekonstruiert. Das Sortierungssignal $W^{83}KY$ ist für die Stv1-Lokalisierung notwendig (FINNIGAN et al. 2012b).

Den evolutionären Ursprung der Isoformen Stv1p (am Golgi/Endosom lokalisiert) und Vph1p (Vakuolenmembran) der Hefe konnte die Arbeitsgruppe um den Biochemiker Tom H. Stevens bereits durch die Wiedererweckung der ursprünglichen Proteine (Anc.a und Anc.Stv1) genauer erforschen (FINNIGAN et al. 2011; FINNIGAN et al. 2012b). Joseph W. THORNTON hat sich das Ziel gesetzt die Evolution eines komplexen, fein abgestimmten molekularen Systems vollständig mechanistisch zu erklären. In den kommenden Jahren sind durch die Techniken zur Rekonstruktion und Synthese ursprünglicher Gensequenzen weitere interessante Resultate zu erwarten, die Licht auf die Evolution komplexer Merkmale werfen. Die Experimente fordern auch Befürworter von Intelligent Design heraus, die behaupten, komplexe biologische Systeme konnten nicht ohne "intelligente Eingriffe" entstehen.⁴

⁴ BEHE (2012) diskutiert die Ergebnisse von FINNIGAN et al. (2012a) aus der Sicht von "Intelligent Design" und marginalisiert erwartungsgemäß ihre evolutionsbiologische Bedeutung. Er übersieht dabei offensichtlich, dass der hier vorgestellte Mechanismus, der auf einem selektionsneutralen Pfad (*zunächst!*) zu einem Verlust an Interaktionsmöglichkeiten der Ringkomponenten führt, gerade die Evolution "irreduzibel komplexer" Systeme erklären könnte: Es ist zwar richtig, dass der V_0 -Ring in der V-ATPase der Pilze nach wie vor als Protonenkanal fungiert, dass also, wie BEHE zu Recht anmerkt, noch keine grundlegend *neue* Funktion entstanden ist. Dieser Protonenkanal besteht nun aber aus **drei** essentiellen Komponenten statt aus **zweien**, die zusammen eine *nicht reduzierbare funktionelle* (Unter-) Einheit bilden: Wird nur ein einziger Teil des Rings entfernt, funktioniert der Komplex nicht mehr. Wie erwartet ist dieses irreduzible V_0 -Dreikomponentensystem nicht in einem evolutionären Quantensprung entstanden. So wie bei anderen evolutionären Veränderungen schufen vorhandene Gene und Strukturen die Voraussetzung für die Komplexitätszunahme. Und wie FINNIGAN et al. (2012a) plausibel aufzeigen konnten, ist der Weg von dem V_0 -Zweikomponentensystem zu dem V_0 -Dreikomponentensystem durch molekulare Evolutionsmechanismen überbrückbar.

Von einer strukturellen und funktionellen "*Degradierung*" des V_0 -Rings, von der BEHE spricht, kann auch nicht die Rede sein, da der Ring *unter Beibehaltung der ursprünglichen Gesamtfunktion* an Komplexität zunahm. Die *einzelnen* Komponenten haben sich zwar nach der Genduplikation durch *Subfunktionalisierung* auf Teile ihrer ursprünglichen Funktionen beschränkt. Allerdings wurde dabei ein *komplementärer* Verlust durchlaufen. Dieses Duplikations-Degenerations-Komplementations (**DDC**)-Modell erklärt, wie sich die einzelnen Ringkomponenten, so wie es auch häufig bei den Individuen oder Institutionen in unserer Gesellschaft der Fall ist, durch Differenzierung *spezialisiert* haben und dadurch gerade jene gegenseitigen Abhängigkeiten aufweisen, die ein "irreduzibel komplexes" System prägen. Man kann sich leicht vorstellen, wie ein solcher Mechanismus im Lauf der Zeit, kombiniert mit *Neofunktionalisierungen* bzw. weiteren Mechanismen, die in der Lage sind evolutionäre Neuheiten zu generieren (NÄSVALL et al. 2012; CARVUNIS et al. 2012; KATJU 2012; SOSKINE UND TAWFIK 2010), noch komplexere Systeme hervorbringen *könnte*: Wechselt oder erweitert ein solcher Strukturkomplex seine Funktion, stehen der Evolution wiederum neue Entwicklungs- und Interaktionsmöglichkeiten offen, die im Rahmen von Wahrscheinlichkeitsüberlegungen schwer abgeschätzt werden können. Zum Beispiel verdeutlicht das in Abb. 3 vorgestellte *hypothetische* Szenario, das mit den biologischen Fakten gut übereinstimmt, sehr anschaulich, wie die komplexe V-ATPase der Pilze, ausgehend von einer ursprünglichen RNA-Helikase und einem Membrankanal, in mehreren Schritten evolviert sein könnte.

Weiterführende Informationen

Weitere Informationen über die Forschung von Joseph W. THORNTON findet man auf der folgenden Seite. Dort hat man auch direkten Zugriff auf zahlreiche wissenschaftliche Fachartikel.

Hauptseite: <http://pages.uoregon.edu/joet/> (Stand 2012)

Veröffentlichungen: <http://pages.uoregon.edu/joet/pubs.htm> (Stand 2012)

Begriffserklärungen

Alignment: Das Sequenzalignment ist ein wichtiges Werkzeug von Bioinformatikern. Dabei werden homologe Positionen von Nukleotidsequenzen bzw. Proteinsequenzen untereinander gestellt. In der Regel werden mehr als zwei Sequenzen verglichen (multiples Alignment). Durch Einführen von Gaps (Lücken) in die Sequenzen werden Mutationen ausgeglichen, die die Länge der Sequenzen verändert haben. Der Einbau von wenigen Lücken wird belohnt. Computerprogramme ermöglichen so den Abgleich von homologen Sequenzabschnitten, die eine unterschiedliche Länge haben.

BAYESIANISCHE VERFAHREN: Ist eine Rekonstruktion von Stammbäumen, die auf BAYESIANISCHER STATISTIK basiert. Dabei wird die Wahrscheinlichkeit des Stammbaums bei gegebenen Daten betrachtet.

Chaperone: Proteine, die bei der Faltung von Proteinen „helfen“ oder die Aggregatbildung von fehlgefalteten Proteinen bzw. noch nicht gefalteten Proteinen verhindern.

Elongationsfaktor: Es handelt sich um Faktoren (Proteine), die bei der Verlängerung der Aminosäurekette während der Bildung der Proteine (Translation) beteiligt sind. Bei dem untersuchten Elongationsfaktor EF-Tu handelt es sich um eine GTPase. Damit EF-Tu funktioniert braucht der Elongationsfaktor ein gebundenes GTP (Guanosintriphosphat). EF-Tu-GDP muss GDP (Guanosindiphosphat) gegen GTP austauschen, um am Elongationsschritt teilnehmen zu können.

Expression/Exprimierung: Die Umsetzung der genetischen Information (DNA) in RNA und Proteine.

Genduplikationen: Bei genetischen Innovationen spielen Genduplikationen eine wichtige Rolle. Neue Gene können aus bereits vorhandenen entstehen. Ein vorhandenes Gen kann verdoppelt werden. Dadurch entsteht ein Paar nächstverwandter Gene (Paraloge). Durch Genduplikationen sind im Laufe der Evolution ganze Genfamilien entstanden.

Helikasen: Helikasen sind Enzyme, die in allen Lebewesen vorkommen. Sie sind hochkonserviert. Sie trennen unter Hydrolyse von Nucleosidtriphosphaten (meist unter ATP-Verbrauch) die Basenpaarung zwischen zwei DNA bzw. RNA-Strängen. Typischerweise sind DNA- und RNA-Helikasen hexamere ringförmige Proteinkomplexe.

Homolog: Bezeichnung von Molekülen oder Organen, die sich ähnlich sind, weil sie von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen.

Isoform: Isoformen sind im molekularbiologischen Sprachgebrauch unterschiedliche Formen von Proteinen, die sich ähnlich sind. Verschiedene Isoformen eines Proteins weisen dabei leichte bis größere Unterschiede untereinander auf. Alternatives Spleißen kann aus einem Gen unterschiedliche Produkte, also Isoformen, hervorbringen. Isoformen können auch durch Genduplikationen entstehen.

Maximum Likelihood: Ist eine Methode, die den Stammbaum sucht, der unter einem gegebenen Evolutionsmodell der Sequenzevolution mit höchster Wahrscheinlichkeit die gegebenen Daten generiert. Ausgangspunkt des Ansatzes ist ein multiples Sequenzalignment.

Maximum Parsimony: Stellt eine Klasse von Algorithmen zur phylogenetischen Rekonstruktion da. Dieser gebräuchliche Ansatz bewertet das Vorkommen von Charakteristiken. So wird ein Stammbaum ermittelt, der die Sequenzdaten mit der geringsten Anzahl an Veränderungsannahmen erklärt ("maximale Sparsamkeit").

Neofunktionalisierung: Duplizierte Gene entwickeln sich auseinander. Ein Gen nimmt dabei eine neue Funktion an.

Oligonukleotide: Das sind Oligomere aus wenigen Nukleotiden. Solche kurze DNA-Stränge lassen sich heute in Synthesemaschinen relativ leicht sequenzgenau und mit guter Ausbeute herstellen.

PAML: Steht für "Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood". PAML (aktuell Version 4) ist ein Programmpaket für phylogenetische Analyse von DNA- und Proteinsequenzen. Eine Stärke ist das große Repertoire Evolutionsmodelle zu implementieren.

Weitere Informationen:

www.molcularevolution.org/software/phylogenetics/paml

PCR: Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Standardmethode der Molekularbiologie. Durch sie können DNA-Abschnitte *in vitro* stark vervielfältigt werden.

Protonenpumpe: Protonenpumpen sind Transmembranproteine, die den Transport von Protonen ("Wasserstoffionen" H^+) über eine Membran fördern.

Subfunktionalisierung: Duplizierte Gene durchlaufen komplementäre degenerative Mutationen. Dabei geht eine von zwei bzw. mehreren Funktionen verloren, die beim Vorläufergen vorhanden waren. Jedes Duplikat hat schließlich eine der ursprünglichen Genfunktionen.

Thermophil: Thermophile Organismen bevorzugen eine hohe Temperatur (45 – 80 °C) zum Leben.

Translokasen: Proteine, die den spezifischen Transport von Molekülen (z.B. DNA, Proteine), in der Regel über eine Membran, bewerkstelligen.

Literatur

- BEHE, M.J. (2012) A Blind Man Carrying a Legless Man Can Safely Cross the Street <http://behe.uncommondescent.com> (Zugr. a. 15.08.2012.)
- BRIDGHAM, J.T. et al. (2006) Evolution of hormone-receptor complexity by molecular exploitation. *Science* 312, 97–101.
- BRIDGHAM, J.T. et al. (2009) An epistatic ratchet constrains the direction of glucocorticoid receptor evolution. *Nature* 461, 515–519.
- CAI, W. et al. (2004) Reconstruction of ancestral protein sequences and its applications. *BMC Evol. Biol.* 4, 33.
- CHANG, B.S.W. et al. (2002a) Recreating a functional ancestral archosaur visual pigment. *Mol. Biol. Evol.* 19, 1483–1489.
- CHANG, B.S.W. et al. (2002b) Synthetic gene technology: Applications to ancestral gene reconstruction and structure-function studies of receptors. *Methods in Enzymology* 343, 274–94.
- CONANT, G.C. und WOLFE, K.H. (2008) Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nat. Rev. Genet.* 9, 938–950.
- CROSS, R.L. und MÜLLER, V. (2004) The evolution of the A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H⁺/ATP coupling ratio. *FEBS Lett.* 576, 1–4.
- DEAN, A.M. und THORNTON, J.W. (2007) Mechanistic approaches to the study of evolution: the functional synthesis. *Nat. Rev. Genet.* 8, 675–688.
- FIELD, S.F. und MATZ, M.V. (2010) Retracing evolution of red fluorescence in GFP-like proteins from Faviina corals. *Mol. Biol. Evol.* 27, 225–233.
- FINNIGAN, G.C. et al. (2011) The reconstructed ancestral subunit functions as both V-ATPase isoforms Vph1p and Stv1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 22, 3176–3191.
- FINNIGAN, G.C. et al. (2012a) Evolution of increased complexity in a molecular machine. *Nature* 481, 360–365.
- FINNIGAN, G.C. et al. (2012b) Sorting of the Yeast Vacuolar-type, Proton-translocating ATPase Enzyme Complex (V-ATPase): identification of a necessary and sufficient Golgi/endosomal retention signal in Stv1p. *J. Biol. Chem.* 287, 19487–19500.

- FORCE, A. et al. (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151, 1531–1545.
- CARVUNIS, A. et al. (2012) Proto-genes and *de novo* gene birth. *Nature* 487, 370–374.
- GAUCHER, E.A. et al. (2003) Inferring the palaeoenvironment of ancient bacteria on the basis of resurrected proteins. *Nature* 425, 285–288.
- GAUCHER, E.A. et al. (2008) Palaeotemperature trend for precambrian life inferred from resurrected proteins. *Nature* 451, 704–708.
- GOMIS-RUTH, F. X. et al. (2001) The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F_1 -ATPase. *Nature* 409, 637–641.
- GRAY, M.W. et al. (2010) Cell biology—irremediable complexity? *Science* 330, 920–921.
- GRÜBER, G. und MARSHANSKY, V. (2008) New insights into structure-function relationships between archeal ATP synthase (A_1A_0) and vacuolar type ATPase (V_1V_0). *BioEssays* 30, 1096–1109.
- HALL, B.G. (2006) Simple and accurate estimation of ancestral protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 5431–5436.
- HANSON-SMITH, V. et al. (2010) Robustness of ancestral sequence reconstruction to phylogenetic uncertainty. *Mol. Biol. and Evol.* 27, 1988–1999.
- HARMS, M.J. und THORNTON, J.W. (2010) Analyzing protein structure and function using ancestral gene reconstruction. *Current Opinion in Structural Biology* 20, 360–366.
- HIRATA, R. et al. (1997) VMA11 and VMA16 encode the second and third proteolipid subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane H^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 272, 4795–4803.
- INNAN, H. und KONDRASHOV, F. (2010) The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. *Nat. Rev. Genet.* 11, 97–108.
- JERMANN, T.M. et al. (1995) Reconstructing the evolutionary history of the artiodactyl ribonuclease superfamily. *Nature* 374, 57–59.
- KAINOV, D. E. et al. (2006) Hexameric molecular motors: P4 packaging ATPase unravels the mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1095–1105.
- KOSHI, J.M. und GOLDSTEIN, R.A. (1996) Probabilistic reconstruction of ancestral protein sequences. *J. Mol. Evol.* 42, 313–320.
- KATJU, V. (2012) In with the old, in with the new: the promiscuity of the duplication process engenders diverse pathways for novel gene creation. *Int. J. Evol. Biol.* Article ID 341932, 24 pages
- LUKES, J. et al. (2011). How a neutral evolutionary ratchet can build cellular complexity. *IUBMB Life* 63, 528–537.
- LIBERLES, D.A. (2007). *Ancestral Sequence Reconstruction*. Oxford, Oxford University Press.
- MANCINI, E.J. et al. (2004) Atomic snapshots of an RNA packaging motor reveal conformational changes linking ATP hydrolysis to RNA translocation. *Cell* 118, 743–755.

- MULKIDJANIAN, A.Y. et al. (2007) Inventing the dynamo machine: the evolution of the F-type and V-type ATPases. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 892-899.
- MULKIDJANIAN, A.Y. et al. (2008a) The past and present of sodium energetics: may the sodium-motive force be with you. *Biochimica et Biophysica Acta* 1777, 985-992.
- MULKIDJANIAN, A.Y. et al. (2008b) Evolutionary primacy of sodium bioenergetics. *Biology Direct* 3, 13.
- MULKIDJANIAN, A.Y. et al. (2009) Co-evolution of primordial membranes and membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* 34, 206-215.
- MULKIDJANIAN, A.Y. und GALPERIN, M.Y. (2010) Evolutionary origins of membrane proteins. In: Frishman, D. (Hg.) *Structural bioinformatics of membrane proteins*. Wien, Springer, 1-28.
- MÜLLER, V. und GRÜBER, G. (2003) ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 474-494.
- MÜLLER, V. et al. (2005) ATP Synthases With Novel Rotor Subunits: New Insights into Structure, Function and Evolution of ATPases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 37, 455-460.
- NÄSVALL et al. (2012) Real-Time Evolution of New Genes by Innovation, Amplification, and Divergence. *Science* 338, 384-387.
- NISHI, T. und FORGAC, M. (2002) The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 94-103.
- ORTLUND, E.A. et al. (2007) Crystal structure of an ancient protein: evolution by conformational epistasis. *Science* 317, 1544-1548.
- PALLEN, M.J. et al. (2006) Evolutionary links between FliH/YscL-like proteins from bacterial type III secretion systems and second-stalk components of the F₀F₁ and vacuolar ATPases. *Protein Science* 15, 935-940.
- PATEL, S.S. und PICHA, K.M. (2000) Structure and function of hexameric helicases. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 651-697.
- PAULING, L. und ZUCKERKANDL, E. (1963) Chemical paleogenetics molecular restoration studies of extinct forms of life. *Acta Chem. Scand.* 17, 9-16.
- PEREZ-JIMENEZ, R. et al. (2011) Single-molecule paleoenzymology probes the chemistry of resurrected enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 592-596.
- SOSKINE, M. und TAWFIK, D. (2010) Mutational effects and the evolution of new protein functions. *Nature Reviews Genetics* 11, 572-582.
- STOLTZFUS, A. (1999) On the possibility of constructive neutral evolution. *J. Mol. Evol.* 49, 169-181.
- THOMSON, J.M. et al. (2005) Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nat. Genet.* 37, 630-635.
- THORNTON, J.W. et al. (2003) Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science* 301, 1714-1717.
- THORNTON, J.W. (2004) Resurrecting ancient genes: Experimental analysis of extinct molecules. *Nat. Rev. Genet.* 5, 366-375.
- THORNTON, J.W. (2012) Evolution of complexity reconstructed using 'molecular time travel' <http://uonews.uoregon.edu/archive/news->

- release/2012/1/evolution-complexity-reconstructed-using-molecular-time-travel (Zugr. a. 16.07.2012.)
- UGALDE, J.A. et al. (2004) Evolution of coral pigments recreated. *Science* 305, 1433.
- WALKER, J.E. (1998) ATP synthesis by rotary catalysis. *Angew. Chem.* 37, 2309–2319.
- WILLIAMS, P.D. et al. (2006) Assessing the accuracy of ancestral protein reconstruction methods. *PLoS Comput. Biol.* 2, 69.
- YANG, Z. et al. (1995) A new method of inference of ancestral nucleotide and amino acid sequences. *Genetics* 141, 1641–1650.
- YANG, Z. (1997) PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Bioinformatics* 13, 555–556.
- YANG, Z. et al. (2007) PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1586–1591.
- ZHANG, J. und NEI, M. (1997) Accuracies of ancestral amino acid sequences inferred by the parsimony, likelihood, and distance methods. *J. Mol. Evol.* 44, 139–146.

Autor: Tobias Klös, 16.11.2012

