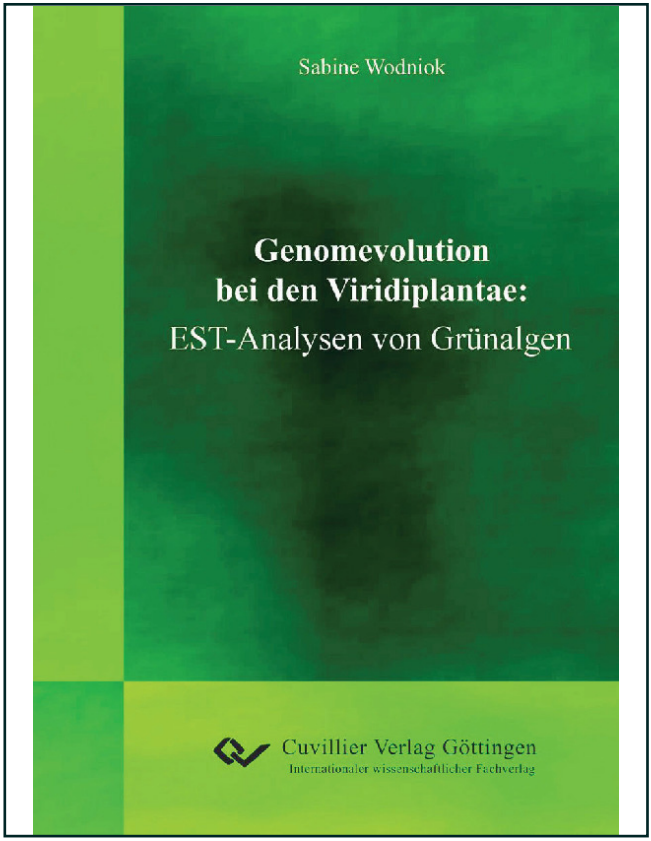
Sabine Wodniok (Autor)

Genomevolution bei den Viridiplantae

EST-Analysen von Grünalgen



https://cuvillier.de/de/shop/publications/961

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: https://cuvillier.de

2 Einleitung

Die Entstehung der Landpflanzen (Embryophyta) gehört zu den wichtigsten Evolutionsschritten auf der Erde. Die Kolonisierung der terrestrischen Habitate ereignete sich vor ca. 450-470 Millionen Jahren (Sanderson, 2003); dieser Schritt ebnete den Weg für die Evolution mannigfaltiger Gruppen der Landpflanzen (Embryophyta = Bryophyta, Pteridophyta und Spermatophyta), die viele unserer gegenwärtigen terrestrischen Ökosysteme dominieren (Waters, 2003).

Die Viridiplantae (Abb. 1), zu welchen alle Grünalgen und Landpflanzen gehören, repräsentieren eine monophyletische Gruppe von Organismen, welche eine überraschende Vielfalt im Hinblick auf Morphologie, Zellarchitektur, Lebenszyklus, Fortpflanzung und in ihrer Biochemie zeigen. Die Viridiplantae bestehen aus zwei monophyletischen Linien: den Chlorophyta und den Streptophyta (Bremer, 1985) (Abb. 1).

Die Chlorophyten umfassen die überwiegende Mehrheit der Grünalgen einschließlich der meisten Schuppen-tragenden grünen Flagellaten (z.B. *Pyramimonas*, *Tetraselmis*), der Ulvophyceae (z.B. *Ulva*, *Acetabularia*), der Chlorophyceae (z.B. *Chlamydomonas*, *Volvox*) und der Trebouxiophyceae (z.B. *Chlorella*) (Nakayama et al., 1998; Mattox und Stewart, 1984; Lewis und McCourt, 2004). Die **U**lvophyceae, **T**rebouxiophyceae und **C**hlorophyceae bilden zusammen den „UTC clade“ (Abb. 1). An der Basis der Viridiplantae (sowohl der Chlorophyta als auch der Streptophyta) stehen Schuppen-tragende Flagellaten (früher Prasinophyceae) (Abb. 1).

Zu den Streptophyten gehören alle Landpflanzen (Embryophyten) und eine diverse paraphyletische Ansammlung von Süßwassergrünalgen, die Mesostigmatales, Chlorokybales, Klebsormidiales, Zygnematales, Coleochaetales und Charales (Lewis und McCourt, 2004; Huss und Kranz, 1997) (Abb. 1). Die Charales werden meistens als die Schwestergruppe der Embryophyta bezeichnet. Dies legt nahe, dass die Evolution der „richtigen“ Landpflanzen bereits mit einem komplexen Organismus gestartet ist (Karol et al., 2001). Die Position der Charales ist jedoch immer noch umstritten (Turmel et al., 2006). Alternativ werden die Coleochaetales oder Zygnematales als mögliche nächste Verwandte zu den Landpflanzen vorgeschlagen (McCourt et al., 2004; Turmel et al., 2007). Es konnte nur ein einzelliger Schuppen-tragender grüner Flagellat, *Mesostigma viride* Lauterborn, gefunden werden, der ebenfalls zu den Streptophyten gehört (Lemieux et al., 2007; Simon et al., 2006; Rodriguez-Ezpeleta et al, 2007; Melkonian et al., 1995).

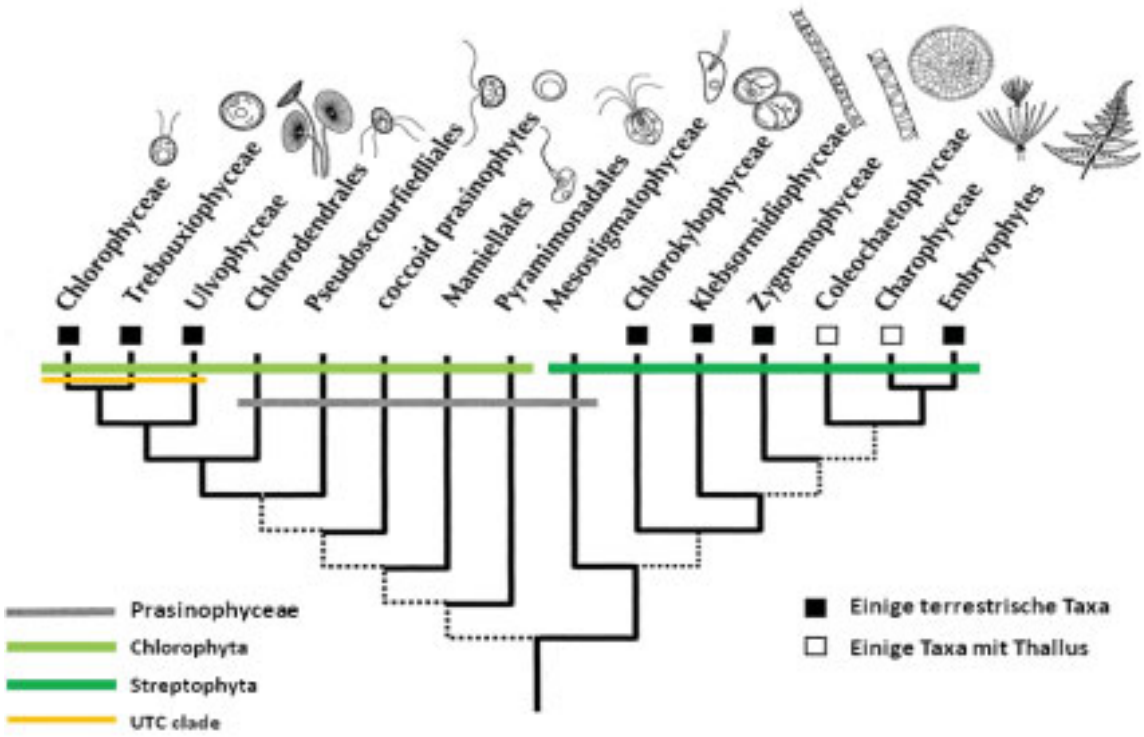


Abbildung 1: **Vereinfachte Darstellung der Evolution der Viridiplantae.** Ein Stammbaum der Viridiplantae, verändert nach Lewis und McCourt (2004). Gepunktete Linien zeigen die Verwandtschaftsverhältnisse, die nur schwach durch molekulare Analysen unterstützt werden.

Die Embryophyta haben sich aus den Vorläufern der rezenten streptophytischen Grünalgen (früher Charophyceae) entwickelt. Viele typische Merkmale und Eigenschaften der Embryophyten sind in dieser Gruppe von Süßwassergrünalgen entstanden. Von Graham et al. (2000) werden dabei folgende wichtige Errungenschaften der streptophytischen Algen für die Evolution der Landpflanzen genannt: u.a. Cellulosezellwand, Vielzelligkeit, Zellteilung mittels Phragmoplasten, Plasmodesmata, apikales Wachstum, apikale Verzweigung, dreidimensionale Gewebe, asymmetrische Zellteilung und Zelldifferenzierung, Zygoten Retention und Plazenta (Pickett-Heaps 1975; Graham, 1993; Graham et al., 2000). All diese Merkmale finden sich noch bei rezenten Vertretern der Landpflanzen. Betrachtet man die Biochemie, so findet man auch viele Gemeinsamkeiten zwischen den Embryophyten und den streptophytischen Algen z.B. die Art der Photorespiration (Raven, 2000; Stabenau und Winkler, 2005; Simon et al., 2006), das Vorhandensein von plastidärer GABDH B (Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, beta), welche durch das Thioredoxin reguliert wird (Petersen et al., 2006), und der MKC^{c}-Typ der MADS-box Proteine (Tanabe et al., 2005).

Ein weiterer wichtiger Punkt in der Evolution der Landpflanzen war die Kolonisation der terrestrischen Habitate. Die damit verbundene Luftexposition, die erhöhte Sonneneinstrahlung und ein Leben in einem trockenen Milieu führten zu einer Adaptation von Zellarchitektur, Metabolismus und Körperbau, um in einem terrestrischen Ökosystem überleben zu können (Waters, 2003). Die evolutionäre Entwicklung dieser Adaptationen ist bis jetzt noch unbekannt.

2.1 Gen- und Genomevolution bei den Streptophyta

Über die Gen- und Genomevolution während der Entstehung/Evolution der Landpflanzen ist wenig bekannt. Zwar sind die Genome einiger Embryophyten (z. B. *Arabidopsis thaliana, Oryza sativa, Vitis vinifera, Populus balsamifera trichocarpa* und *Physcomitrella patens*) und einiger Chlorophyten (z.B. *Chlamydomonas reinhardtii, Ostreococcus lucimarinus, Ostreococcus tauri, Chlorella sp. NC64A* und *Volvox carteri*) veröffentlicht worden, jedoch gibt es bisher nur zwei EST-Projekte von streptophytischen Algen (*Closterium peracerosum-strigosum-littorale* und *Mesostigma viride*). Damit fehlt ein direkter Vergleich eines möglichen nächsten Verwandten zu den Landpflanzen (z.B. *Coleochaete scutata* oder *Chara vulgaris*). Nur eine vergleichende Untersuchung der Genome, die die streptophytischen Grünalgen einschließt, wird Hinweise darauf geben können, welche wichtigen Gene bzw. Genfamilien während der Evolution der Viridiplantae auftreten oder verlorengegangen sind und damit wichtig für das Verständnis der Entstehung der Landpflanzen sein.

2.1.1 Die Sequenzierung kompletter Genome

Im Jahre 1995 wurde das erste vollständig sequenzierte Bakteriengenom, das Genom des humanen Krankheitserregers *Haemophilus influenzae*, veröffentlicht (Fleischmann et al., 1995). Erstmals konnte man ein komplettes Genom inklusive aller Gene sowie deren regulatorischen Bereiche analysieren. Bereits 1996 wurde dann der erste Eukaryot (*Saccharomyces cervisiae*) vollständig sequenziert (Goffeau et al., 1996). Zwei Jahre später (1998) war die vollständige Sequenzierung des Genoms von *Caenorhabditis* (Fadenwurm) abgeschlossen (Hodgkin und Herman, 1998). *Arabidopsis thaliana* war im Jahr 2000 die erste Pflanze, deren Genom vollständig bekannt wurde (The *Arabidopsis* Initiative, 2000). Seither wurden weitere Genome von verschiedenen Prokaryoten und Eukaryoten sequenziert und analysiert. Eine genaue Auflistung, der fertigen Genome bzw. laufender Projekte kann auf der

Internetseite http://www.genomesonline.org/ gefunden werden. Die vollständigen Genome geben Aufschluss über die Genomgröße und -struktur in unterschiedlichen Organismen. Zum Beispiel zeigten die ersten Vergleiche zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Genomen, dass bei Bakterien die Gene einen Großteil des Genoms ausmachen, während proteinkodierende Gene in eukaryotischen Genomen einen kleineren Teil des Gesamtgenoms ausmachen. Weiterhin kann verglichen werden, welche Gene für eine bestimmte Organismen-Gruppe charakteristisch sind.

2.1.2 „Expressed Sequence Tags“ (ESTs)

Die vollständige Sequenzierung von eukaryotischen Genomen ist auch heute noch ein aufwendiges und kostenintensives Unterfangen. Eine Alternative dazu ist die systematische Sequenzierung von cDNA-Klonen. Da cDNA-Klone von exprimierten Genen abstammen, werden diese Sequenzen als „Expressed Sequence Tags“ (ESTs) bezeichnet (Boguski, 1995; Claverie, 1995). Diese Teilsequenzen eignen sich zur Entdeckung neuer Gene (Adams et al., 1991). Die meisten Eukaryoten enthalten große, nicht-kodierende Regionen in ihren Genomen, die es erschweren, die Primärstruktur der Proteine zu bestimmen (Erkennung der Intron/Exon-Grenzen). ESTs dagegen enthalten die Information, wann und unter welchen Bedingungen das Protein exprimiert wurde. ESTs werden verwendet, um vollständige cDNAs zu isolieren, sowie für die Erkennung der Intron/Exon-Grenzen und die Entwicklung genetischer Karten. ESTs ohne Homologie zu bekannten Proteinen sind darüber hinaus oft der erste Hinweis auf neue Proteine.

Das Ziel vieler heutiger struktureller Genomprojekte ist nicht mehr eine vollständig lückenfreie genomische Sequenz zu erstellen. Schon Teilmengen an Sequenzen können die nahezu vollständige Information über ein Genom repräsentieren. Zur allgemeinen Charakterisierung eines Genoms hinsichtlich Größe, amplifizierten Bereichen und des Gehalts an repetetiven Elementen und Genfamilien sind wesentlich weniger Sequenzen nötig (Glöckner et al., 2001).

Es wird jedoch bemängelt, dass bei der alleinigen Sequenzierung von cDNAs wichtige regulatorische Bereiche von Genen außer acht gelassen werden. Weiterhin wird kritisiert, dass manche ESTs zu kurz sind, um dem Genprodukt eine Funktion zuzuordnen. Einer der wichtigsten Kritikpunkte ist die Qualität der Sequenzen. Durch das automatisierte Generieren der ESTs treten Fehler auf, z.B. Nukleotidaustausche, auch Insertionen und Deletionen, was zwangsläufig zu „Frameshift“-Mutationen führt.

Trotz der Kritiken wurden in den letzten Jahren Millionen ESTs von verschiedenen Organismen in die öffentlichen Datenbanken eingegeben.

2.2 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Algen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Genomevolution der Viridiplantae untersucht werden. Genome bzw. Proteome sind sowohl von verschiedenen chlorophytischen Algen als auch von verschiedenen Embryophyten (Moose, Farne und Samenpflanzen) vorhanden, jedoch gibt es nur zwei EST-Projekte von streptophytischen Algen. Zum einen von *Mesostigma viride* (Simon et al., 2006), einem ursprünglichen Vertreter der Streptophyten und von *Closterium* (Sekimoto et al., 2003). Aus diesem Grund sollte von weiteren Vertretern der streptophytischen Algen EST-Banken hergestellt werden. Drei streptophytische und eine chlorophytische Grünalge wurden ausgewählt. Zu den streptophytischen Grünalgen gehören *Klebsormidium subtile*, eine filamentöse Alge, *Coleochaete scutata*, ebenfalls eine filamentöse Alge, die aber Verzweigungen und apikales Wachstum aufweist und *Chara vulgaris*, die eine sehr hoch organisierte streptophytische Alge repräsentiert. Für die Auswertung der streptophytischen ESTs sollte ein möglichst ursprünglicher Vertreter der Chlorophyten in die Analyse einbezogen werden, da bisher nur sequenzierte Genome von z.B. *Chlamydomonas, Ostreococcus, Chlorella* und *Volvox* vorhanden sind. Daher wurde auch eine EST-Bank aus der einzelligen Grünalge *Pyramimonas parkeae*, die an der Basis der Evolution der Chlorophyten steht (Lewis und McCourt, 2004), etabliert.

Im Folgenden werden die morphologischen Besonderheiten der in dieser Arbeit verwendeten Chlorophyten und Streptophyten vorgestellt.

2.2.1 *Pyramimonas parkeae*

Diese einzellige Grünalge gehört zu den Chlorophyta. *Pyramimonas parkeae* ist ein schuppenbildender mariner Flagellat (Noris und Pearson, 1975), der in einer frühen Evolutionslinie der Chlorophyten steht und damit das Gegenmodell der Chlorophyta zu *Mesostigma* repräsentiert (Lewis und McCourt, 2004). Die Gattung *Pyramimonas* wurde von Schmarda 1850 beschrieben.

Pyramimonas besitzt vier Geißeln die in einer tiefen, apikalen Geißelgrube inserieren (Pearson und Norris, 1975). Die Zellen (ca. 20 µm lang) von *Pyramimonas* erscheinen in Seitenansicht

umgedreht pyramidenförmig bis verkehrt eiförmig, wobei die Geißeln in der Geißelgrube inserieren (Abb. 2). Der Chloroplast füllt das hintere Ende der Zelle vollständig aus, wo meist ein großes Pyrenoid liegt. *Pyramimonas* besitzt einen Augenfleck (Abb. 2). Eine Besonderheit bei *Pyramimonas* stellen die vier verschiedenen Typen organischer Schuppen auf der Zelloberfläche dar, sowie weitere Schuppentypen und kompliziert aufgebaute Haare auf der Geißeloberfläche (Norris und Pearson, 1975; Pennick, 1984; Marin und Melkonian, 1994). Es ist nur eine ungeschlechtliche Fortpflanzung bekannt.

Abbildung 2: **Lichtmikroskopische Aufnahme von *Pyramimonas parkeae*** (Mikroskop: Zeiss MC 63; Kamera: Canon EOS 40 D; Blitz: Metz Mecablitz 36 AF-4).

2.2.2 *Klebsormidium subtile*

Als Gattung *Hormidium* wurden filamentöse Grünalgen von Kützinger in seiner „Phycologia generalis“ (1843) beschrieben. Die Gattung wurde von Pascher (1914) und Printz (1964) unter demselben Namen weitergeführt. Erst 1972 erfolgte die Umbenennung in *Klebsormidium* (Silva et al., 1972).

Die unverzweigte, einzellreihige Alge (Abb. 3) gehört zu den Streptophyten (Bhattacharyo und Medlin, 1998; Katana et al., 2001; Karol et al., 2001; Turmel et al., 2002; McCourt et al., 2004). Die zylindrischen Zellen enthalten je einen wandständigen Chloroplasten mit einem Pyrenoid. Innerhalb des Fadens findet ein Wachstum durch Zellteilung statt. Die Fäden können in wenigzellige Teilfäden oder Einzelzellen zerfallen

(Lokhorst, 1996). Die Zellteilung von *Klebsormidium* stellt eine Zwischenstufe in der Entwicklung des Phragmoplasten dar (Pickett-Heaps, 1975). Neben der Fragmentation ist die Bildung von zweigeißeligen Zoosporen bekannt, die zu einem neuen Zellfaden auskeimen. Sexuelle Fortpflanzung ist nicht bekannt.
Klebsormidium siedelt auf feuchten Böden und in stehenden oder fließenden Gewässern.

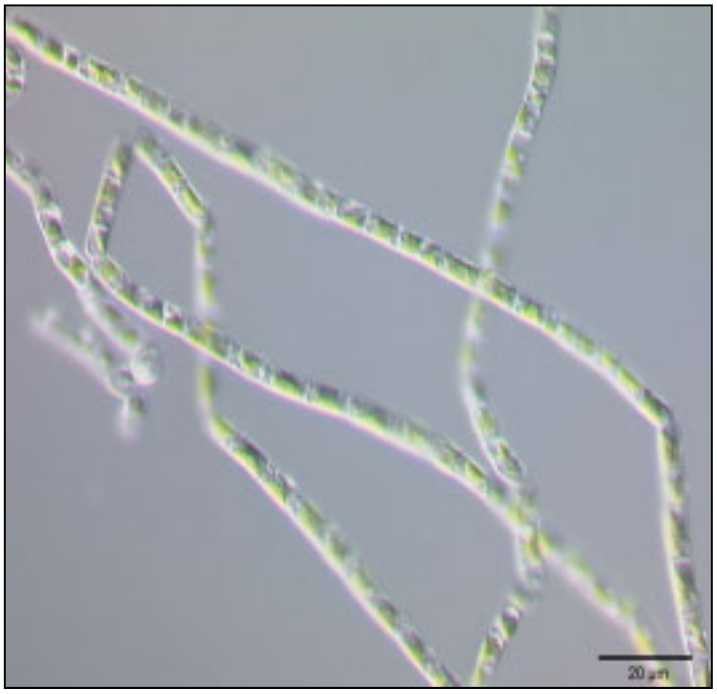


Abbildung 3: **Lichtmikroskopische Aufnahme von *Klebsormidium subtile*** (Mikroskop: Zeiss).

2.2.3 *Coleochaete scutata*

Pringsheim beschrieb 1860 in „Beitrag zur Morphologie und Systematik der Algen“ die Morphologie, die Fortpflanzung und die systematische Einordnung der Gattung *Coleochaete*. In den folgenden Jahren untersuchte und ergänzte Jost (1895) diese Erkenntnisse. Wesley beschäftigte sich 1928 und 1930 mit der asexuellen Fortpflanzung in *Coleochaete* (Wesley, 1928, 1930). Die sexuelle Fortpflanzung wurde in den Jahren 1960-1962 von Geitler ausführlich untersucht (Geitler 1960, 1960a, 1960b, 1962, 1962a). Bis heute ist *Coleochaete* ein beliebtes Untersuchungsobjekt in Hinsicht auf ihre Morphologie, Fortpflanzung und ihre Beziehung zu Landpflanzen (z.B. Graham und McBride, 1979; Graham, 1982; Graham und Willcox, 1983; Graham und Wedemayer, 1984; Graham und Taylor, 1986; Graham et al., 1986; Delwiche et. al., 1989; Graham et al 2000a).

Die einzelnen vegetativen *Coleochaete*-Zellen (5-20 µm) sind in verzweigten Filamenten organisiert, welche zusammen einen bis zu 2 mm (Durchmesser) großen Thallus ausbilden (Abb. 4). Einige Arten wie *Coleochaete* bilden einen zirkulären Thallus ohne Zwischenräume aus (Pseudoparenchym) (Pringsheim, 1860; Wesley, 1928.; Graham, 1982) Plasmodesmata sind in den Querwänden zwischen Zellen des gleichen Filaments vorhanden. Bei der Zellteilung wird ein komplexes Netz aus Mikrotubuli und Membranvesikeln (Phragmoplast) wie bei den Landpflanzen beobachtet (Pickett-Heaps und Marchant, 1972).

Coleochaete pflanzt sich asexuell durch Produktion von beweglichen Zoosporen aus vegetativen Zellen fort. Die Zoosporen haften sich an ein Substrat. Nachdem ein anfänglicher Ring aus acht Zellen entwickelt wurde, setzen nur noch die äußeren Zellen die Teilung fort. Die äußeren Zellen teilen sich abwechselnd tangential und radiär bis zu einem Durchmesser des Thallus von 2 mm (Abb. 4) (Wesley, 1928).

Die sexuelle Fortpflanzung findet durch Oogamie statt. Die Oogonien unterscheiden sich optisch nicht von den vegetativen Zellen. Sie werden nicht freigesetzt, sondern verbleiben im Thallus bis nach der Fertilisation und Ausbildung der Zygoten (Geitler 1960, 1960a, 1960b, 1962, 1962a). Die Oocyten sind bereits vor der Befruchtung von sterilen Zellen mit verdickten und unregelmäßigen gefurchten Zellwänden umgeben, die ähnlich den „Transferzellen“ um die Eier in den Archegonien der Moose und Farne sind (Graham und Taylor, 1986). Die beweglichen männlichen Gameten (Spermatozoide) werden einzeln in vegetativen Zellen gebildet, die als Antheridien funktionieren.

Coleochaete sitzt oft auf Pflanzenstängeln oder größeren Algen in sauberen bis mäßig mit Nährstoffen belasteten stehenden oder langsam fließenden Gewässern.