

1. Einleitung

"In cosmic dimensions, the biosphere of this planet is little more than a flimsy layer on its surface. The vast number of individuals of far more than one million species are crowded within that layer. Consequently, living organisms constitute a considerable part of the environment of other organisms."

Peter Sitte (1993)

1.1. Entstehung der Eucyte

Stromatolithen sind Zeugnisse der Entwicklung des Lebens auf diesem Planeten. Sie stellen kissenförmige Kalkablagerungen dar, die von Cyanobakterien gebildet werden. Fossile Stromatolithen können bis etwa 3.5 Milliarden Jahre zurückdatiert werden. Seit diesem Zeitraum existieren prokaryotische Organismen mit oxygener Photosynthese.

Die Evolution der Eucyten ist dagegen kryptisch verlaufen. Es gibt keine fossilen Belege, die einen Schluss darauf zulassen, wie die frühe Evolution dieser organellhaltigen, vielfach kompartmentierten Zellen ablief. Fast alle eukaryotischen Organismen besitzen Mitochondrien. Amitochondriale Eukaryoten (Cavalier-Smith, 1987), wie etwa Diplomonaden (z.B. *Giardia lamblia*) und Entamoeben, sind nachweislich als sekundäre Entwicklung entstanden, da sich in den Nuclei dieser früher als primitiv geltenden Zellen Gene eines definitiv mitochondrialen Ursprungs identifizieren lassen (Clark und Rogers, 1995; Hashimoto et al., 1998). Andere amitochondriale Organismen besitzen Hydrogenosomen (Müller, 1993). Diese Organellen von Trichomonaden, einigen Ciliaten und Pilzen, besitzen kein eigenes Genom und sind an der Energiegewinnung der anaeroben Protisten beteiligt, wobei molekularer Wasserstoff gebildet wird. Aufgrund ihrer Proteinausstattung konnte allerdings eindeutig gezeigt werden, dass Hydrogenosomen mitochondriale Derivate sind (Bui et al., 1996; Germot et al., 1998). Daher gibt es keine Anzeichen, die die Existenz eines amitochondrialen Ur-Karyoten belegen.

Untersucht man in phylogenetischen Analysen proteincodierende Sequenzen aus Eukaryoten und Prokaryoten, so zeigen Komponenten des Transkriptions- und Translationsapparates in Eukaryoten eindeutige Affinitäten zu archaealen Sequenzen, während Komponenten des Metabolismus der Zelle mit den Aminosäuresequenzen der eubakteriellen Vertreter assoziiert sind. Daraus schlossen Gupta und Golding (1996), dass der Zellnucleus selbst direkt aus einem Endosymbioseereignis durch die Aufnahme eines Archaeons von einem Eubakterium entstanden ist. Problematisch an dieser Hypothese ist die Tatsache, dass alle rezenten kultivierbaren Prokaryoten kein Cytoskelett enthalten, welches eine phagotrophe Aufnahme des Archaeons hätte bewerkstelligen können. Die bakterielle Zellwand ist ausserdem zu rigide, um einer solchen Phagotrophie gerecht zu werden.

Martin und Müller (1998) entwarfen ein alternatives Szenario. In ihrer "Hydrogenhypothese" der Entstehung der ersten mitochondrialen Organismen evolviert die Ur-Eucyte aus der Syntrophie eines methanogenen Archaeons (dem Wirt) mit einem fakultativ anaeroben, eubakteriellen H₂-Produzenten (dem Symbionten). Durch "Umwachsen" des Symbionten -und nicht durch Phagocytose- erreicht der Wirt ein maximales *Interface* zwischen beiden Organismen, sodass das Archaeon auch unabhängig von exogenem Wasserstoff existieren kann. Die Fähigkeit des Symbionten zur aeroben Lebensweise könnte toxisches O₂ innerhalb der Chimäre entgiften. Die Sauerstoff-Toleranz hätte sich bei dem globalen Anstieg der atmosphärischen O₂-Menge vor rund 2 Milliarden Jahren als evolutionärer Vorteil erwiesen.

1.2. Entstehung phototropher Eukaryoten

Im Gegensatz zu der vielfach diskutierten Entstehung mitochondrialer Eukaryoten gilt die Evolution phototropher Eukaryoten heute als verstanden (Gray, 1992). Schimper stellte schon 1883 fest, dass "Chlorophyllkörner" (die Plastiden) immer aus ihresgleichen hervorgehen und nie *de novo* gebildet werden. Mereschkowsky (1905) erkannte zudem die morphologische und physiologische Ähnlichkeit der Plastiden zu freilebenden Cyanobakterien und formulierte die Endosymbionten-Theorie in ihren Grundzügen. Diese Theorie wurde erst 1970 wiederentdeckt von Lynn Margulis (Margulis, 1970). Sie ist heute generell akzeptiert und beschreibt plausibel die Entstehung der photosynthetisch aktiven,

eukaryoten Zelle mit ihren Doppelmembran-begrenzten semiautONOMEN Plastiden durch endocytische Aufnahme ancestraler Vorläufer der Cyanobakterien.

1.3. Sekundäre Endocytobiose

Die Endosymbiontentheorie vermag die Entstehung von Plastiden zu erklären, die von zwei Membranen umgeben sind (in den Rhodophyta, Glaucocystophyta und Chlorobionta). Der Grossteil der heute beschriebenen Algengruppen jedoch besitzt Plastiden, die von vier Membranen begrenzt werden. Sitte (1993) benannte Plastiden, die sich durch mehr als zwei umgebende Membranen auszeichnen als "Komplexe Plastiden". Deren Entstehung lässt sich nicht mehr durch ein einzelnes endosymbiotisches Ereignis erklären, vielmehr müssen die zusätzlichen, plastiden-umspannenden Lipiddoppelschichten aus einem zweiten, sekundären Endosymbiose-Ereignis hervorgegangen sein.

Die Theorie der Sekundären Endocytobiose besagt, dass eine phototrophe Eucycte, die in einem primären endosymbiotischen Prozess entstand, durch eine weitere eukaryotische Zelle phagocytiert und nachfolgend als photosynthetisch aktiver Endosymbiont integriert wurde. Der schematische Verlauf eines sekundären Endocytobiose-Ereignisses ist in Abbildung 1-1 dargestellt. Das Ergebnis dieser intertaxonischen Kombination (Sitte, 1993) war eine evolutionäre Chimäre aus zwei Zellen. Die resultierende Superzelle besass ein redundantes Cytosol mit Mitochondrien und dem Zellnucleus des Symbionten (Abb. 1-1B). Dieses wurde sukzessive in der Evolution eliminiert (Abb. 1-1C), wobei schließlich Plastiden entstanden, bei denen nur noch ein zusätzlich vorhandenes Membranpaar auf den ursprünglichen Endosymbionten hinweist (Abb. 1-1D). Diese Form von Plastiden findet man in den heterokonten Algen, Haptophyten und neuere Befunde belegen die Existenz komplexer, jedoch photosynthetisch inaktiver Plastiden in den Apicomplexa (McFadden und Waller, 1997; MacFadden et al., 1996), zu denen die humanpathogenen, obligat intrazellulären Parasiten *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* gehören. Es existieren jedoch mindestens zwei Algengruppen, die sich auf Stufe C der in Abbildung 1-1 dargestellten Entwicklungsreihe befinden. Chlorarachniophyten (Ludwig und Gibbs, 1989; Hibberd und Norris, 1984) und Cryptomonaden (Fraunholz et al., 1997; Gillot, 1990) besitzen ein restliches Cytosol (periplastidäres Kompartiment) des Symbionten zwischen dem äußeren und inneren Membranpaar ihrer komplexen Plastide. In diesem Cytosol liegt ein von einer Doppelmembran umgrenztes Nucleinsäure-haltiges Organell, das Nucleomorph (Greenwood, 1974). Das Nucleomorph ist das Zellkernrelikt des ehemals freilebenden Symbionten (Gibbs, 1983; Ludwig und Gibbs, 1987 und 1989).

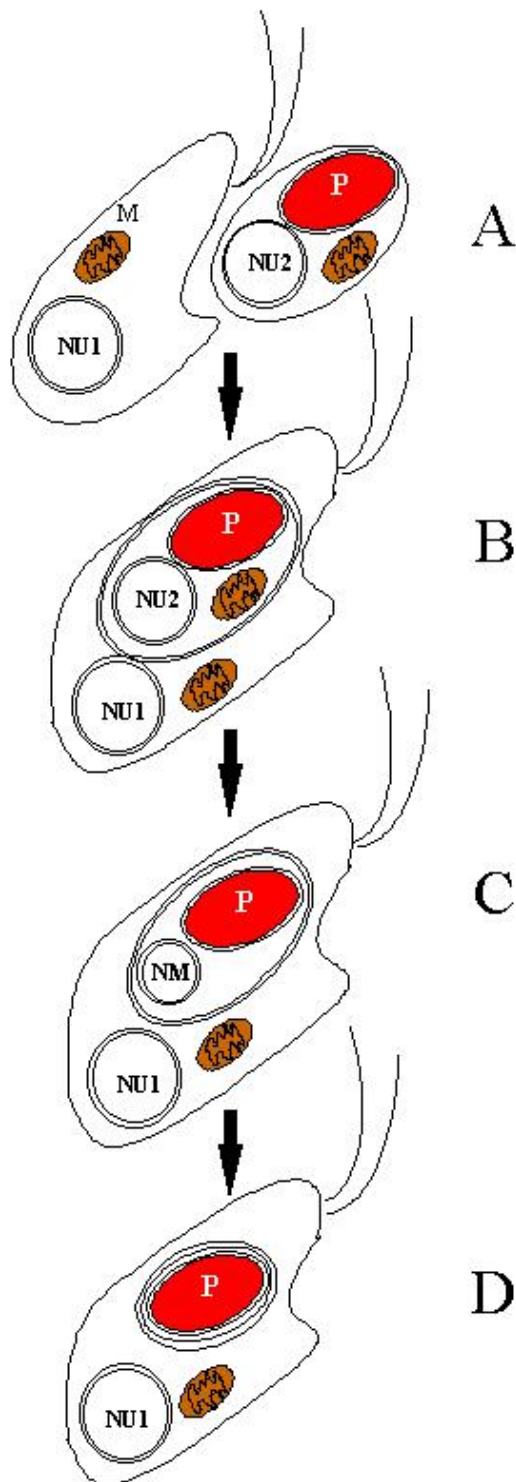


Abb. 1-1: Evolution von komplexen Plastiden.

A) Ein phototropher Protist mit einer primären (Doppelmembran-umgrenzten) Plastide wird von einer weiteren Eukaryote phagocytiert. **B)** Die resultierende Chimäre besitzt im Symbionten redundante Komponenten, die sukzessive reduziert werden. **C)** Ein minimierter Restzellkern des Symbionten (Nucleomorph) existiert als einziges identifizierbares Organell in dem periplastidären Cytoplasma. **D)** Nach der vollständigen Reduktion des peri-plastidären Kompartiments weist nur ein zusätzliches Membranpaar um die Plastide diese als sekundären Endocytobionten aus.

NU1 Nucleus der Wirtszelle, NU2 Nucleus des phagocytierten Symbionten, NM Nucleomorph, M Mitochondrium, P primäre Plastide des Symbionten.

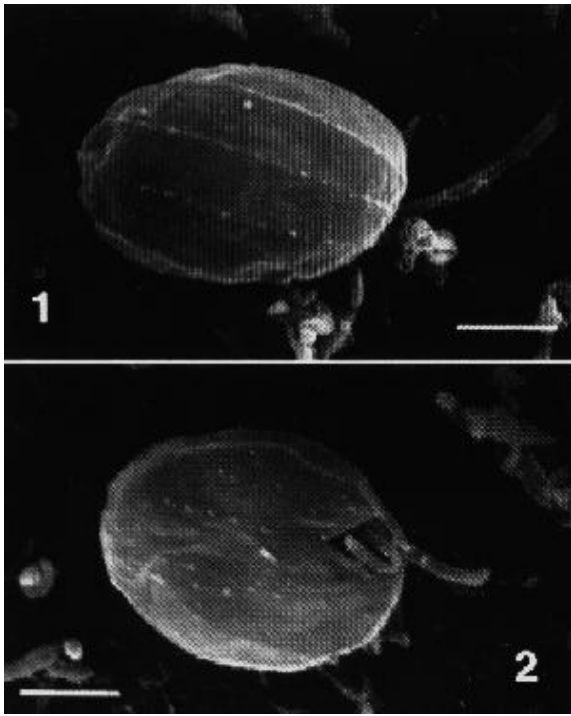


Abb. 1-2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Guillardia theta*.
 1) Deutlich zu erkennen ist die longitudinale Anordnung der Proteinplatten des Periplasten. 2) Aus einer Einbuchtung der Zelloberfläche (*gullet*) entspringen die zwei Flagellen.
 Balken = 2 μ m (aus Deane et al., 1998).

Die Cryptomonaden sind einzellige Flagellaten, die in marinen und limnischen Habitaten vorkommen. Sie pflanzen sich durch Zweiteilung fort (Klaveness, 1981) und besitzen im allgemeinen zwei Flagellen, die in einer Einbuchtung der Zelloberfläche inseriert sind (Gillot und Gibbs, 1980). Die Zellen werden von einem Periplasten umhüllt, der aus Proteinplatten besteht, welche der Cytoplasmamembran innen aufgelagert sind (Hibberd et al, 1971; Abb. 1-2). Die Photopigment-Ausstattung der Cryptomonaden umfaßt Chlorophyll *a* und *c*₂ und ähnelt daher der Pigmentierung der heterokonten Algen. Je nach untersuchter Spezies enthalten Cryptomonaden zusätzlich eines der Phycobiline Phycocyanin oder Phycoerythrin (Gantt, 1979). Diese akzessorischen Pigmente sind ausser in Cryptomonaden nur in Rhodophyten und Cyanobakterien identifiziert worden. Allerdings sind die Phycobiline im Gegensatz zu denen der Rhodophyta nicht in Phycobilisomen organisiert, sondern liegen dicht gepackt im Lumen der paarweise angeordneten Thylakoidmembranen vor (Spear-Bernstein und Miller, 1989). Cryptomonaden nutzen Amylopektin als Speicherstärke. Dieses wird im periplastidären Kompartiment in Form von Stärkekörnern oder haubenähnlich um das Pyrenoid der Plastide abgelagert (Gillot und Gibbs, 1980). In primitiveren Taxa der Rhodophyceen kommt Amylose als Reserveprodukt vor und unterstützt den Ursprung des Endosymbionten der Cryptomonaden innerhalb dieser Organismengruppe.

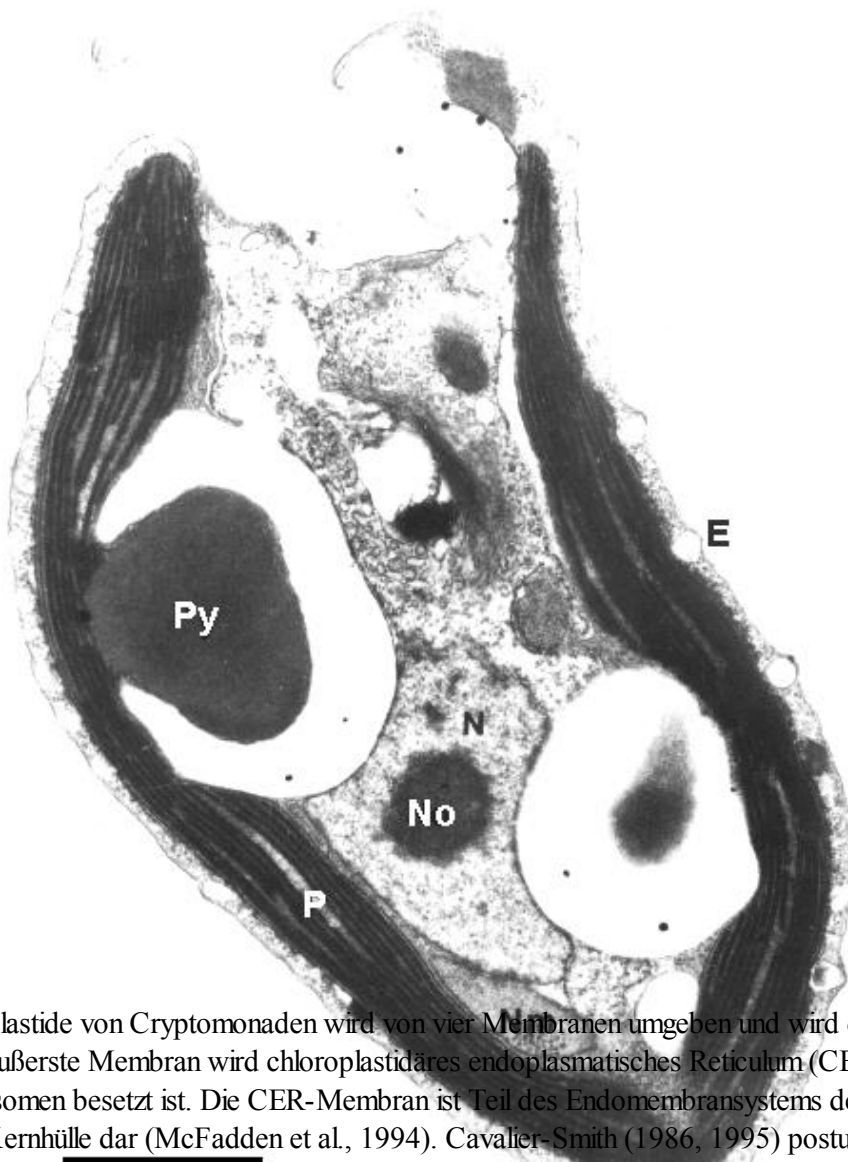


Abb. 1-3:
Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von *G. theta*. Die Plastide umfasst becherförmig annähernd die gesamte Zelle. N Nucleus, No Nucleolus, Nm Nucleomorph, P Plastide, Py Pyrenoid, E Ejectosom.
 Balken 1 μm (aus Fraunholz et al., 1997)

Die Plastide von Cryptomonaden wird von vier Membranen umgeben und wird deshalb als komplexe Plastide bezeichnet. Die äußerste Membran wird chloroplastidäres endoplasmatisches Reticulum (CER) genannt, da sie von cytosolischen 80S Ribosomen besetzt ist. Die CER-Membran ist Teil des Endomembransystems der Wirtszelle und stellt ein Kontinuum mit der Kernhülle dar (McFadden et al., 1994). Cavalier-Smith (1986, 1995) postulierte, dass die phagotrophe Vacuole bei der Aufnahme des Symbionten mit dem ER der Wirtszelle verschmolz, sodass der Symbiont der Cryptomonaden im Lumen des ER positioniert wurde. Die zweite Membran der komplexen Plastide ist vermutlich die Plasmamembran der aufgenommenen symbiontischen Zelle. Die dritte und vierte Membran gehen auf die äußere und innere Membran der Zellwand des Cyanobakteriums zurück (Bolter et al., 1998; Reumann et al., 1999; Pfanzagl et al., 1996), das nach der Endosymbiosetheorie als Plastide in Eukaryoten etabliert wurde. Zwischen der zweiten und dritten Membran befindet sich ein dünnes periplastidäres Cytosol mit einem nucleinsäurehaltigem Zellkernäquivalent, dem Nucleomorph (Hansmann et al., 1986; Hansmann, 1988). Das periplastidäre Kompartiment besitzt eigene Ribosomen vom eukaryotischen 80S-Typ (McFadden et al., 1994), sodass die Cryptomonaden vier verschiedene Spezies von Ribosomen aufweisen. Weitere erkennbare Strukturen sind Stärkekörner, Vesikel und Mikrotubuli (Gillot und Gibbs, 1980).

Das Nucleomorph ist von einer mit Poren durchsetzten Doppelmembran, ähnlich einer Kernhülle, umgeben. Diese Poren sind jedoch nicht kreisrund, wie in den Nuclei üblich, sondern bestehen aus länglichen Schlitzern (Gillot und Gibbs, 1980). Analog einem Zellkern besitzt auch das Nucleomorph Nucleoli. Diese werden gemäss ihrer Erscheinung im elektronenmikroskopischen Bild als sphärische fibrillogranuläre Körper beschrieben (Gillot und Gibbs, 1980). Hansmann und Eschbach (1990) isolierten Nucleomorph-Pyrenoid-Komplexe aus der Cryptomonade *Rhodomonas salina*, wobei sie demonstrierten, dass das Genom des Nucleomorphs aus drei linearen Chromosomen besteht, die durch Pulsfeld-Gelelektrophorese voneinander separiert werden können. Rensing et al. (1994) konnten zeigen, dass alle bisher untersuchten Cryptomonaden generell drei Chromosomen in ihren Nucleomorphen beherbergen, auf denen ausnahmslos Gene für ribosomale RNA lokalisiert sind (siehe Abbildung 1-4). Im Falle von *Guillardia theta* (Hill und Wetherbee, 1990) weist das Nucleomorph-Genom eine Gesamtcodierungskapazität von etwa 535 kb auf (Chromosom I 190 kb, Chromosom II 175 kb und Chromosom III 170 kb; Abb. 1-5) und ist somit eines der kleinsten eukaryotisch organisierten Genome. Maier et al. (1991) und Douglas et al. (1991) belegten, dass sich die 18S rRNA-Gene des Nucleomorphs grundlegend in ihrer Sequenz von denen des Zellnucleus unterscheiden. Aus den Sequenzen beider Nuclei aus *Guillardia*

theta berechneten Van de Peer et al. (1996) eine Phylogenie der SSU-rRNA, welche belegte, dass die Nucleomorph-Sequenz aus *G. theta* mit den Sequenzen rezenter Rotalgen verwandt sind, während nucleär codierte SSU rRNA eindeutig eine Ähnlichkeit zu den aus Glaucocystophyten gewonnenen Sequenzdaten aufweist (Abb. 1-6). Für die sekundären Endocytobionten der Chlorarachniophyten ergab sich ein anderes Bild. So entstammen die Symbionten der Chlorarachniophyten aus der Linie der Chlorophyll a/b haltigen Organismen, was durch die identifizierten Photosynthesepigmente in diesen Algengruppen unterstützt wird (Hibberd, 1990). Chlorarachniophyten und Cryptomonaden sind also unabhängig voneinander aus zwei unterschiedlichen sekundären Endocytobiosen hervorgegangen.

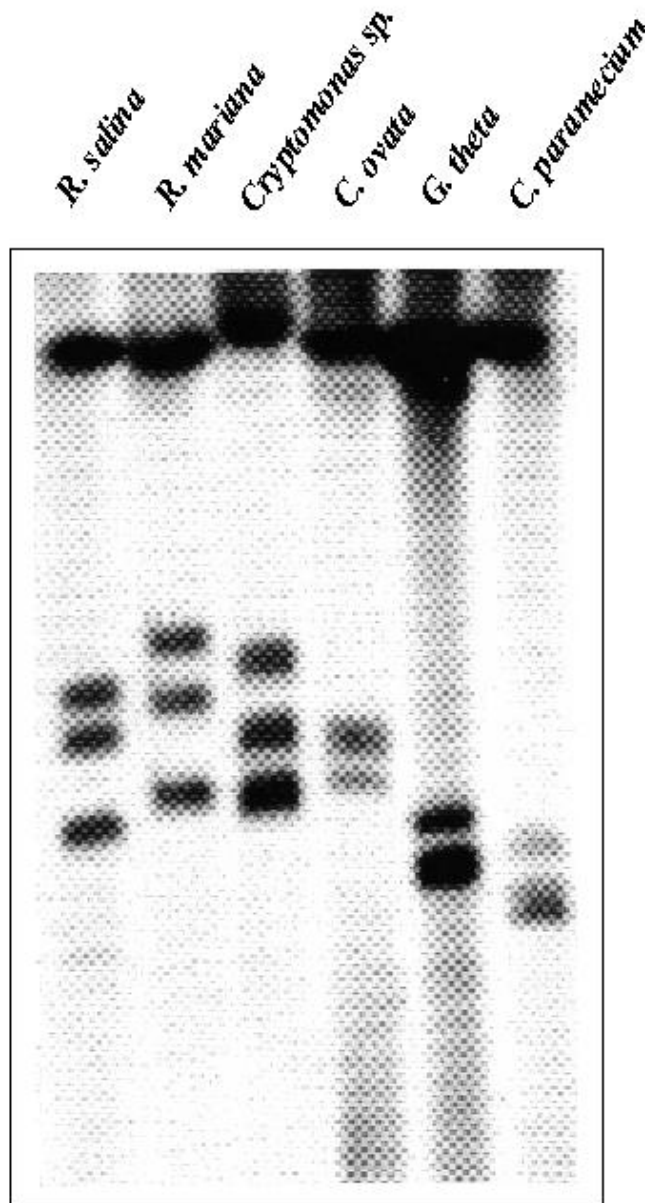


Abb. 1-4: Hybridisierung einer rRNA-Sonde gegen durch Pulsfeld-Gelelektrophorese separierte Nucleomorph Chromosomen. Die Nucleomorph-Genome aller bisher untersuchten Cryptomonaden bestehen aus drei linearen Chromosomen mit Gesamtcodierungskapazitäten um 600 kb. Jedes Nucleomorph Chromosom codiert rRNA (aus Rensing et al., 1994).

1.5. Das Nucleomorph Genom Projekt

Häuber et al. (1994) postulierten, dass Nucleomorphe existieren, da auf deren Genomen plastidär lokalisierte Funktionen codiert sind, die nicht durch Genprodukte aus dem jeweiligen Nucleus ersetzt werden können. Um diese Hypothese zu überprüfen und um die Fragestellung zu beantworten, weshalb das periplastidäre Kompartiment mit seinem minimierten Zellkern während der Evolution nicht eliminiert wurde, wurde ein Genom Projekt ins Leben gerufen, dessen Ziel die vollständige Sequenzierung der Nucleomorphgenome einer Cryptomonade, *Guillardia theta*, und einer Chlorarachniophyte, *Pedinomonas minutissima*, sein wird. Die Daten aus beiden Organismen sollen klären, welche gemeinsamen Mechanismen in diesen evolutionär so unterschiedlichen Organismen zur Etablierung eines Nucleomorphs innerhalb eines periplastidären Kompartiments geführt hat, und welche plastidären Faktoren auf diesen kleinsten bekannten Eukaryoten-Chromosomen codiert sind.

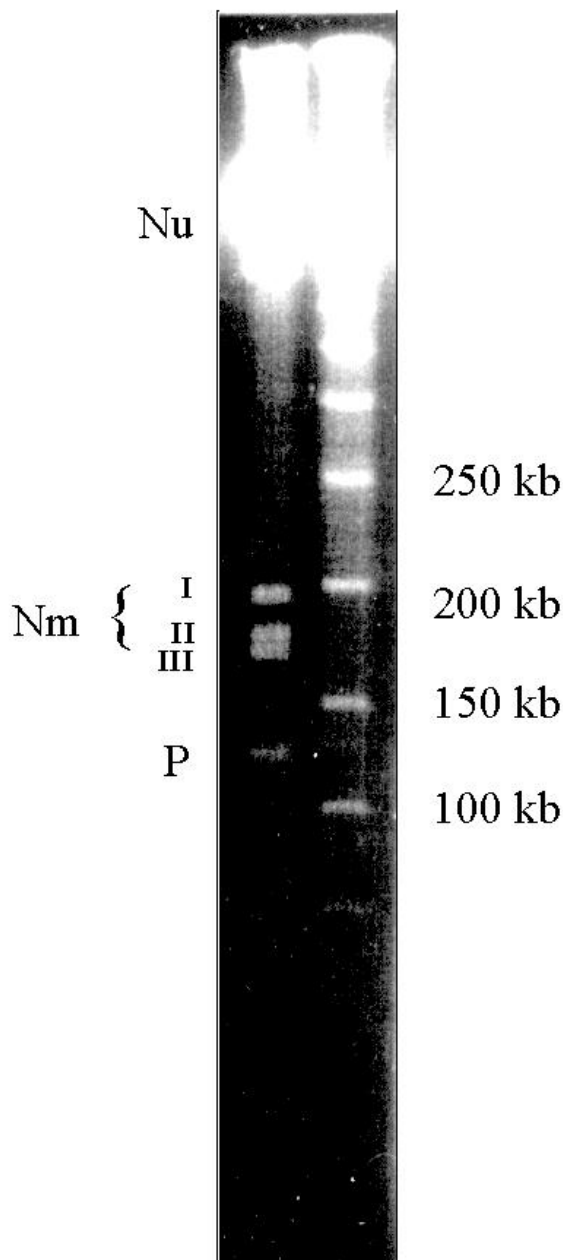


Abb. 1-5: Das Nucleomorph-Genom der Cryptomonade *Guillardia theta*.

Links: *G. theta* DNA. **Rechts:** λ -Oligomer Standard. Deutlich zu erkennen sind die drei Chromosomen des Nucleomorph-Genoms (Nm) in Spur B. Chromosom I ist etwa 190 kb, Chromosom II ca. 175 kb und Chromosom III ca 170 kb lang. Mit P ist das Plastidengenom von *G. theta* bezeichnet (121 kb), welches durch Strangbrüche ein lineares Laufverhalten besitzt. (aus Fraunholz et al., 1997).

1.6. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Struktur des Nucleomorph Chromosoms II zu untersuchen und Sequenzinformation über das mittlere (175 kb) der drei Chromosomen zu gewinnen, um damit das Nucleomorph Genom Projekt der Cryptomonade *Guillardia theta* zu initiieren. Dabei soll ausgehend von einer genomischen λ EMBL3-Bibliothek Nucleomorph-DNA aus

Chromosom II isoliert und sequenziert werden. Auf diesen Genomabschnitten sollen Gene identifiziert und deren Transkripte aus einer cDNA-Bibliothek isoliert werden. Plastiden-lokalisierte Produkte dieser Gene sollen näher charakterisiert werden.

[Inhalt](#) [Titelseite](#) [Nächste Seite](#) [UB-Marburg](#)