



Zellevolution im Zeitraffer

Wie konnten aus Bakterien pflanzliche Zellen und damit höheres Leben auf unserer Erde entstehen?

RALPH BOCK, Direktor am **MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR PFLANZENPHYSIOLOGIE** in Golm, beschäftigt sich seit vielen Jahren mit dieser Frage. Sein Untersuchungsobjekt: Tabakzellen. Sie besitzen – wie alle Pflanzenzellen – nicht nur DNA im Zellkern, sondern auch in zwei weiteren Organellen, den Chloroplasten und den Mitochondrien. Im Verlauf der Evolution wanderten Gene aus dem Erbgut dieser Organellen in den Kern ein. Durch neue Techniken und Selektionsverfahren ist es Bock und seinem Team gelungen, diesen Prozess im Labor nachzuvollziehen und experimentell zu untersuchen.

ILLUSTRATION: JOCHEN STUHRMANN

Korallen leuchten in unterschiedlichsten Farben. In ihrem Zellinneren leben Algen, sogenannte Zooxanthellen, die ihnen nicht nur ihr attraktives Aussehen verleihen, sondern auch eine wichtige Funktion erfüllen. Sie betreiben Photosynthese, sind also in der Lage, Licht in chemische Energie umzuwandeln und Kohlendioxid in Zucker. Dabei entsteht Sauerstoff – Voraussetzung für alles Leben auf unserem Planeten. Für die Koralle hat dies einen entscheidenden Vorteil: Sie muss sich nicht allein von Mikroplankton ernähren, das sie aus dem Meerwasser filtert, sondern kann in der Nähe der lichtdurchfluteten Wasseroberfläche Profit aus den Photosynthese-Produkten der Alge schlagen.

Die Wurzel-Knöllchen von Leguminosen – das sind Hülsenfrüchte wie zum Beispiel Bohnen – beheimaten Stickstoff fixierende Bakterien. So lebt das Bakterium *Rhizobium japonicum* beispielsweise in Symbiose mit der Sojabohne. Die Pflanze liefert in dieser engen Arbeitsbeziehung Kohlenhydrate und andere organische Verbindungen; das Bakterium ist in der Lage, Luftstickstoff aus dem Boden zu binden, aus dem die Pflanze wiederum auf unterschiedlichen Wegen Aminosäuren bildet.

Nicht nur Menschen bauen also auf Beziehungen. Zwischen einzelnen Zellen, Bakterien, Tieren und Pflanzen bestehen komplizierte Kontakte – lose oder eng, konkurrierend oder symbiotisch, zum Vorteil einer Art oder zu deren Nachteil. Die Übergänge sind oft fließend und verändern sich im Laufe der Evolution.

Für den russischen Naturforscher Constantin Sergeevich Merezchkowsky lieferten solche symbiotischen Beziehungen einen ersten Hinweis darauf, dass neue Lebensformen durch Kombination von Einzelorganismen entstehen können. Im Jahr 1905 veröffentlichte Merezchkowsky eine erste theoretische Arbeit, die noch heute als die grundlegende Publikation zur Endosymbiontentheorie gilt.

Danach stammen Mitochondrien und Chloroplasten von ursprünglich

selbstständigen Organismen ab, die vermutlich vor über einer Milliarde Jahren von einer präeukaryotischen Vorläuferzelle verschluckt, jedoch nicht verdaut wurden. Ähnlich wie bei Amöben, die ihre Nahrung umfließen und sich schließlich einverleiben, wurden diese Organismen (freie lebende Bakterien) von den Zellen umschlossen. Die Membran der Wirtszelle stülpte sich ein, das Bakterium wurde vollständig in das Innere der Wirtszelle aufgenommen und schließlich kompromisslos verschluckt: Es verlor seine Unabhängigkeit, wurde zum Mitochondrium und diente fortan seiner Wirtszelle als Kraftwerk zur Energiegewinnung. Diesen Zelltyp mit zwei Genomen – im Zellkern und in den Mitochondrien – finden wir heute noch bei allen Tieren und Pilzen.

CYANOBAKTERIEN WERDEN CHLOROPLASTEN

Pflanzen besitzen in ihren Zellen darüber hinaus noch eine weitere DNA-haltige Organelle: die „grünen“ Chloroplasten. Denn bei der Entstehung der Pflanzenzelle wiederholte sich dieser Prozess ein weiteres Mal. Allerdings wurde nun ein Cyanobakterium geschluckt, eine sogenannte Blaualge. Diese war bereits zur Photosynthese fähig, konnte also Lichtenergie in chemische Energie und Kohlendioxid in Zucker umwandeln und dabei Sauerstoff freisetzen. Sowohl Chloroplasten als auch Mitochondrien sind deshalb von zwei Membranen umschlossen: Die äußere stammt von der Wirtszelle, die innere vom aufgenommenen Bakterium. Merezchkowskys Thesen zum Ursprung dieser Zellorganellen stellen heute einen wesentlichen Bestandteil der modernen (synthetischen) Theorie der biologischen Evolution dar.

Doch nach wie vor sind viele Fragen offen: Wie wurden im Zuge der Evolution die aufgenommenen Bakterien allmählich in Zellorganellen umgewandelt und wie die beteiligten Genome umstrukturiert? Fest steht bislang nur, dass eine gewaltige Menge an bakteriellen Genen aus dem Erbgut der aufgenommenen Bakterien

in das Kerngenom der Wirtszelle übertragen wurde. Heute enthalten die Organellengenome nur noch einige Dutzend Gene, obwohl die Bakterien, aus denen sie hervorgegangen sind, vermutlich mindestens ein paar tausend Gene besaßen. Indirekte Hinweise auf einen solchen Gentransfer aus dem Genom der Mitochondrien und Chloroplasten in das Kerngenom liefern Sequenzähnlichkeiten zwischen Kerngenen und Genen aus Cyanobakterien. Auch gibt es einige Fälle von offensichtlich erst vor relativ kurzer Zeit transferierten Genen. Solche Gene liegen bei einigen Pflanzenarten noch in den Organellen vor, während sie bei anderen Arten bereits im Kerngenom zu finden sind.

Wie kann ein Gen aus dem von einer Doppelmembran umschlossenen Chloroplasten oder Mitochondrium in das Kerngenom gelangen? Da die Übertragung Tausender Gene aus den Organellen in den Kern offenbar in riesigen evolutionären Zeiträumen abließ und demzufolge niemand jemals ein solches Ereignis beobachten konnte, entzog sich diese Frage bislang jedem experimentellen Zugang. Erst neue Technologien, die es erlauben, Chloroplastengenome höherer Pflanzen gentechnisch zu verändern, haben es uns in den letzten Jahren ermöglicht, wichtige Schritte dieses evolutionären Prozesses im Labor – quasi im Zeitraffer – nachzuvollziehen und die molekularen Grundlagen des Gentransfers zwischen Organellen- und Kerngenomen zu analysieren.

Mittels eines einfachen experimentellen Tricks ist es uns am Max-Planck-Institut für Pflanzenphysiologie in Golm gelungen, diesen Gentransfer zu rekonstruieren: Dazu haben wir die Chloroplastengenome von Tabakpflanzen gentechnisch verändert, indem wir zusätzlich zwei Gene eingeführt haben. Während eines der beiden Gene, *aadA* genannt, durch seine bakterielle Genstruktur für das Chloroplastengenom maßgeschneidert ist, haben wir das zweite Gen, *nptII*, für den Zellkern konstruiert (eukaryotische Genstruktur). Durch das *aadA* wird eine Resistenz gegen das Anti-

biotikum Spectinomycin vermittelt; nptII verleiht eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin.

Und dies erlaubte uns nun eine einfache Selektion von Pflanzen, bei denen der Gentransfer in den Zellkern stattgefunden hatte: Da das nptII in den Chloroplasten nicht aktiv ist, sind Pflanzen mit transgenen Chloroplastengenomen zwar widerstandsfähig auf das Antibiotikum Spectinomycin, reagieren aber empfindlich auf Kanamycin. Wenn Zellen dieser Pflanzen in

Gen in den Zellkern gelangt. Diese Befunde verändern unser Verständnis von genetischer Homogenität innerhalb einer Art und innerhalb eines Organismus. Wenn man sich klarmacht, dass zum Beispiel ein Tabakblatt aus wesentlich mehr als fünf Millionen Zellen besteht, dann wird offensichtlich, dass die Zellen in ein und demselben Blatt einer Pflanze nicht notwendigerweise genetisch identisch sind. Tatsächlich können sie sich im Muster der in das

Gleiches gilt für in umgekehrter Richtung transferierte Gene. Ihnen fehlen der jeweils spezifische Promotor, eine Sequenz, die dem Gen vorgeschaltet ist und seine Transkription erst möglich macht, sowie der spezifische Terminator, der die Stabilität der gebildeten Boten-RNA garantiert.

Im beschriebenen Laborexperiment konnten wir dieses Problem zunächst umgehen, indem wir das nptII-Gen mit eukaryotischen Expressionssignalen, also einem entsprechenden

nomycin. In einem groß angelegten Selektionsexperiment untersuchten wir nun, ob und wie dieses inaktive aadA-Gen im Kern funktionsfähig werden kann. Dazu wurden Zellen einer Selektion auf spectinomycinhaltigem Kulturmedium ausgesetzt. Auf diese Weise erhielten wir tatsächlich Pflanzen, in denen das aadA-Gen im Zellkern aktiv geworden war.

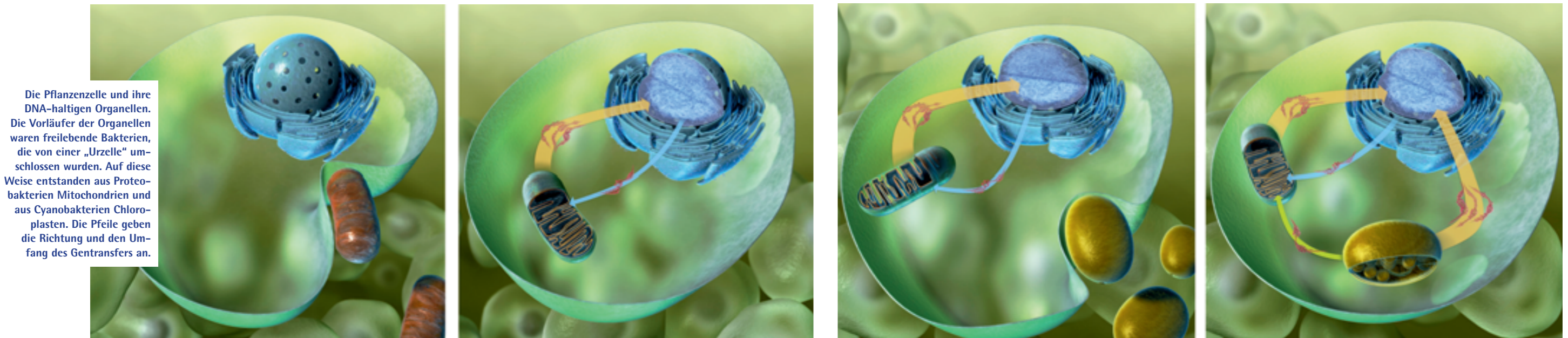
Als Nächstes galt es nun, die molekularen Mechanismen aufzuklären, die zur Aktivierung des aadA-Gens

werden konnte, obwohl die molekularen Mechanismen zum Stoppen des Ablesevorgangs im Zellkern völlig andere sind als im Chloroplasten. Wir führen dies auf das häufige Auftreten der Nukleotidbasen Adenin (A) und Thymin (T) zurück, die sowohl in Chloroplasten- als auch in Zellkern-terminatoren häufig vorkommen.

Diese Experimente haben uns erste Einsichten in die molekularen Prozesse geliefert, die die Genome von tierischen und pflanzlichen Zellen seit

ziehen und die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären.

In aktuellen Experimenten arbeiten wir daran, den horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Organismen und Pflanzenarten im Labor zu rekonstruieren. Kritiker gentechnisch veränderter Lebensmittel fürchten nämlich die Weitergabe der in Pflanzen eingebrachten Gene an andere, nicht verwandte Lebewesen, zum Beispiel Mikroorganismen oder andere Pflanzenarten. Dieser Vorgang, auch



Die Pflanzenzelle und ihre DNA-haltigen Organellen. Die Vorläufer der Organellen waren freilebende Bakterien, die von einer „Urzelle“ umschlossen wurden. Auf diese Weise entstanden aus Proteobakterien Mitochondrien und aus Cyanobakterien Chloroplasten. Die Pfeile geben die Richtung und den Umfang des Gentransfers an.

einem Gewebekultursystem einer Selektion auf Kanamycinresistenz ausgesetzt werden, so überleben nur jene Zellen, die das nptII-Gen aus dem Chloroplastengenom in das Kerngenom verschoben haben.

Genetische und molekulare Untersuchungen bestätigten anschließend einen erfolgreichen Gentransfer: Die Kanamycinresistenz wurde nach den Mendel'schen Regeln vererbt (während Chloroplastengene und damit die Spectinomycinresistenz nur mütterlicherseits vererbt werden), und wir konnten die DNA des nptII-Gens im Genom des Zellkerns nachweisen. Erstaunt waren wir allerdings über die hohe Frequenz, mit der ein solcher Gentransfer aus dem Chloroplasten in den Zellkern stattgefunden hatte: In ungefähr einer von fünf Millionen Zellen war das nptII-

Kerngenom transferierten Organellensequenzen unterscheiden.

Eine weitere interessante Konsequenz ergibt sich aus dem zufälligen Einbauort transferierter Organellengene im Kerngenom. Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit kann der Einbau in ein Gen des Kerngenoms erfolgen und dieses damit zerstören. Somit könnte der Transfer von Organellen-DNA in den Zellkern auch zum spontanen Auftreten von Mutationen (sogenannten somatischen Mutationen) beitragen.

Darüber hinaus führt die erfolgreiche Übertragung eines Gens aus den Chloroplasten in den Kern nicht unmittelbar zu einem neuen funktionsfähigen Kerngen. Denn aus den Chloroplasten stammende Gene können nicht automatisch abgelesen und in Boten-RNA übersetzt werden.

Promotor und Terminator ausstatten, die direkt nach dem Transfer aktiv sein konnten. Wie aber mag dieser Prozess in der Natur abgelaufen sein, wie kann aus einem inaktiven ehemaligen Chloroplasten-Gen ein funktionsfähiges Kern-Gen entstehen?

Die Antwort lieferten uns Pflanzenlinien, die ein großes Stück Chloroplasten-DNA in den Kern übertragen hatten, auf dem nicht nur das Kanamycin-Resistenzgen nptII, sondern auch das benachbarte Spectinomycin-Resistenzgen aadA lokalisiert war. Das aadA-Gen lieferte nun genau das geeignete Untersuchungsobjekt: Als prokaryotisches Gen (mit einem Chloroplastenpromotor und -terminator) war es im Zellkern nicht aktiv. Folglich reagierten die Gentransferpflanzen mit dem aadA-Gen im Zellkern empfindlich gegen das Antibiotikum Specti-

geführt hatten. Dabei stellte sich heraus, dass in allen acht selektierten Pflanzenlinien sehr ähnliche Vorgänge an der Genaktivierung beteiligt waren. In allen Fällen war es dem aadA-Gen gelungen, durch relativ einfache Mutationen (sogenannte Deletionen), den Promotor des benachbarten Kerngens „einzufangen“ und nun für seine eigene Expression zu nutzen. Erstaunlicherweise reichte dieser eine molekulare Umbau aus, um das Gen im Zellkern funktionsfähig zu machen.

Ähnliche Veränderungen hatten wir auch im Terminatorbereich erwartet, konnten diese allerdings nicht nachweisen. Überraschenderweise ergab eine Analyse der zum aadA-Gen gehörigen Boten-RNA, dass der Chloroplastenpromotor von der Ablesemaschinerie des Zellkerns benutzt

ihrer Entstehung vor mehr als einer Milliarde Jahren geformt haben. Mit neuen Methoden und gentechnischen Verfahren ist es möglich geworden, diese Prozesse im Labor in einem Zeitraum von nur wenigen Jahren ablaufen zu lassen. Das eröffnet die aufregende Perspektive, Vorgänge, die normalerweise in riesigen evolutionären Zeiträumen stattfinden, im Zeitraffer experimentell nachzuvoll-

als horizontaler Gentransfer bezeichnet, ist seit über 20 Jahren Gegenstand der Forschung. Obwohl ein Genaustausch zwischen Bakterien ständig erfolgt, zum Beispiel in Krankenhäusern, Kläranlagen und Jauchegruben, ist der horizontale Gentransfer aus Pflanzen heraus kaum erforscht. Genetische Experimente sollen nun klären, ob und wie häufig Pflanzengene die Artgrenzen überwinden können. ■



FOTO: PRIVAT

PROF. DR. RALPH BOCK ist Direktor am Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie in Golm und leitet die Abteilung Organellenbiologie, Biotechnologie und molekulare Ökophysiologie. Er unterstützt die europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit bei der Entwicklung von Sicherheitsstandards bei der Freisetzung gentechnisch veränderter Pflanzen.



FOTO: PRIVAT

BARBARA ABRELL studierte Botanik an der Technischen Universität in München und schrieb ihre Diplomarbeit in Limnologie über die Rolle von Algen in hypertrophen Abwasserteichen. Über mehrere Jahre arbeitete sie als Wissenschaftsredakteurin bei FOCUS Online. Seit 2007 verstärkt sie das Team im Presseferat der Max-Planck-Gesellschaft.