

Pochodzenie bakteryjne niektórych minichromosomów u bruzdnic *Ceratium horridum* i *Pyrocystis lunula*.



Moszczyński K.¹, Mackiewicz P.¹, Bodył A.²

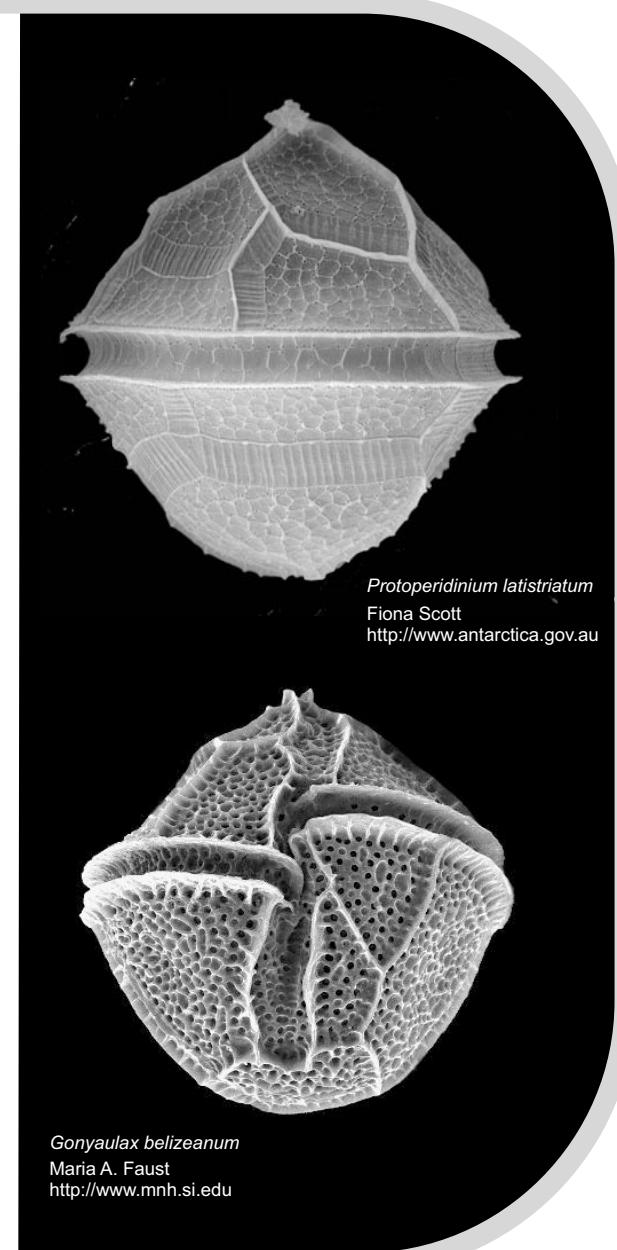
moszcz@biol.uni.wroc.pl

¹ Zakład Genomiki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

² Zakład Bioróżnorodności i Taksonomii Ewolucyjnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

1

Dinoflagellata (bruzdnice) to istotna ekologicznie grupa jednokomórkowych glonów eukariotycznych, które zasiedlają wody zarówno słodkie, jak i morskie. Bruzdnice posiadają kilka typów organeli fotosyntetycznych (plastydów), przy czym najbardziej powszechnym jest trójblonowy plastyd peridininowy. Plastyd ten wewnątrz glonu eukariotycznego, ale nie jest obecnie jeszcze jasne, czy był nim krasnorost, czy też haptotif (Cavalier-Smith 1999, Archibald 2009, Bodył i in. 2009).



2

W odróżniu od pozostałych plastydów, których genomy zorganizowane są w postaci kolistych cząsteczek DNA o wielkości ok. 100-250 kpz, plastyd peridininowy charakteryzuje się obecnością wielu kolistych chromosomów, które swoją wielkością (0,4-10 kpz) przypominają plazmidy, i dlatego nazywano je minichromosomami (ang. minicircles) (Howe i in. 2008). Minichromosomy zawierają część niekodującą, która jest konserwatywna, ale konserwatyzm ten dotyczy jedynie minichromosomów w obrębie tego samego gatunku. Choć większość minichromosomów koduje od jednego do kilku genów, to potencjał kodujący genomu plastydów peridininowych jest zdziwiająco ubogi, w sumie znanych jest niewiele ponad 20 genów minichromosomowych (Howe i in. 2008).

Zgodnie z przyjmowaną powszechnie hipotezą, osobienna organizacja genomu plastydów peridininowego jest wynikiem redukcji 'typowego' genomu plastydowego do postaci obserwowanych dziś minichromosomów (Zhang i in. 2002). Ważną implikacją tej hipotezy jest założenie wspólnego plastydowego pochodzenia wszystkich minichromosomów, włączając zarówno ich część niekodującą, jak i regiony kodujące.

W celu zweryfikowania powyższych założeń, przeprowadziliśmy programem blast poszukiwanie regionów podobnych dla 103 sekwenций minichromosomów. Sekwencje minichromosomów AF490364 *Ceratium horridum* oraz AF490367 *Pyrocystis lunula* jako jedynie nie posiadały regionów wspólnych z innymi minichromosomami. Aby zbadać jakie jest pochodzenie tych minichromosomów i sprawdzić, czy zawierają one geny spokrewnione z genami plastydowymi krasnorostów lub haptotifów, jak ma to miejsce w przypadku pozostałych sekwenacji genów minichromosomów, sekwencje genów: *ycf16* i *ycf24* (kodowanych na minichromosomie AF490364 *C. horridum*) oraz genów: *rpl28* i *rpl33* (kodowanych na minichromosomie AF490367 *P. lunula*) przetłumaczylismy na sekwencje aminokwasowe i poddaliśmy analizom filogenetycznym.

3

Geny *ycf16* i *ycf24* (hypothetical chloroplast open reading frame), które kodowane są na minichromosomie AF490364 (*C. horridum*), są homologami genów bakteriowych: *SufC* i *SufB* (Ellis i in. 2001). Bialka *SufB* i *SufC* wchodzą w skład systemu SUF (ang. mobilization of sulfur), który odpowiada u bakterii za syntezę i naprawę centrów żelazowo-siarkowych [Fe-S] w warunkach stresu oksydacyjnego. Sąsiadujące ze sobą geny: *SufC* i *SufB*, adnotowane jako *ycf16* i *ycf24*, kodowane są między innymi przez geny plastydowe krasnorostów (*Porphyra purpurea*). W genomach plastydowych haptotifów (*Emiliania huxleyi*) *ycf16* nie występuje. Co ciekawe, na otrzymanych drzewach filogenetycznych sekwencje bruzdnic wylinają się wewnątrz grupy sekwenacji bakteriowych z istotnym wsparciem statystycznym. Wynik ten sugeruje, że kodowane na minichromosomie AF490364 (*C. horridum*) geny *ycf16* i *ycf24* zostały nabyte w wyniku transferu poziomego od bakterii.

4

Minichromosom AF490367 (*P. lunula*) zawiera geny kodujące białka rybosomalne: *rpl28* i *rpl33*, które budują większą podjednostkę (50S) rybosomów u bakterii i plastydów (Yamaguchi i in. 2003). Podobnie jak w przypadku poprzednich analiz filogenetycznych, sekwencje bruzdnic wylinają się wewnątrz grupy sekwenacji bakteriowych, a nie eukariotycznych. Jednak z uwagi na krótkie przywrótowania (72 pozycje dla *rpl28*, 44 pozycje dla *rpl33*), nie wszyscy zastosowane metody dają wysokie wsparcie statystyczne dla zgrupowań sekwenacji bruzdnic z bakteriami.

U bakterii geny kodujące białka: *rpl28* (adnotowane jako *rpmB*) i *rpl33* (adnotowane jako *rpmG*) kodowane są w postaci operonu *rpmBG* (Maguire i Wild 1997). Oba geny posiadały również geny plastydowe krasnorostów, chociaż nie występują one w bliskim sąsiedztwie. U haptotifów *rpl28* kodowany jest przez genom jądrowy podczas, gdy *rpl33* występuje na genomie plastydowym. Niespotykane w innych genomach plastydowych blisko sąsiedztwo genów *rpl28* i *rpl33* na minichromosomie AF490367 przypomina bakteryjny operon *rpmBG*.

Kolejnym dowodem wskazującym, że minichromosom AF490367 (*P. lunula*) zawiera fragment DNA bakteryjnego jest obecność nieadnotowanego wcześniej ORF-u o długości 210 nukleotydów, którego produkt białkowy wykazuje najwyższy stopień podobieństwa do sekwenacji białka *FtsY* pochodzącego z bakterii należących do grupy Bacteroidetes/Chlorobi. Warto podkreślić, że u bakterii tych gen *ftsY* występuje tuż za operonem *rpmBG*. Analizy programem InterProScan i programami przewidującymi strukturę drugorzędowe białek oraz przywrótanie sekwenacji wskazują, że przetłumaczona sekwencka aminokwasowa nowego ORF-u posiada domenę helikalną SRP54_N, która jest typowa dla białek *FtsY*. Jednak z czterech oryginalnych alfa-helis zachowały się tylko dwie, co sugeruje, że ORF ten jest pseudogenem.

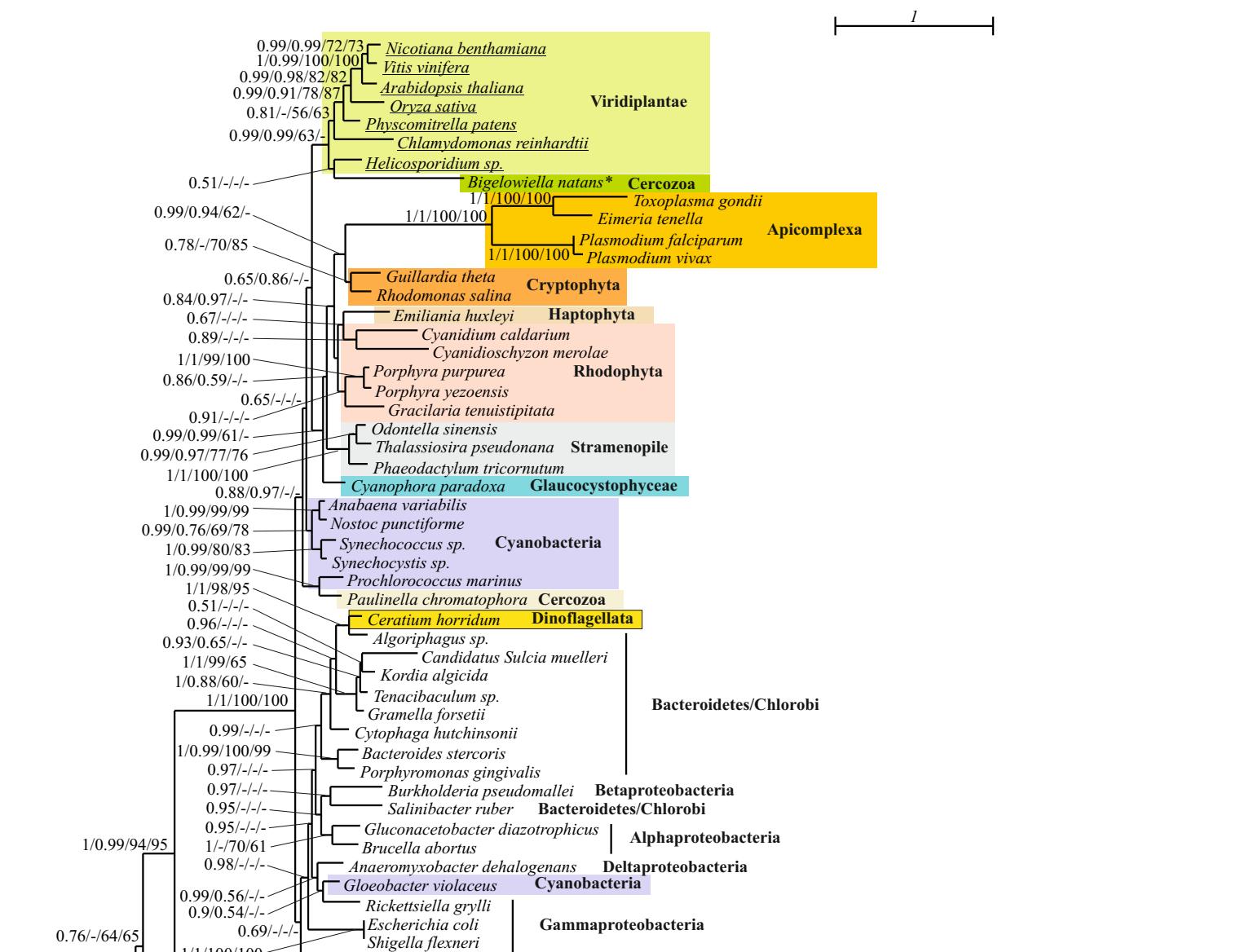
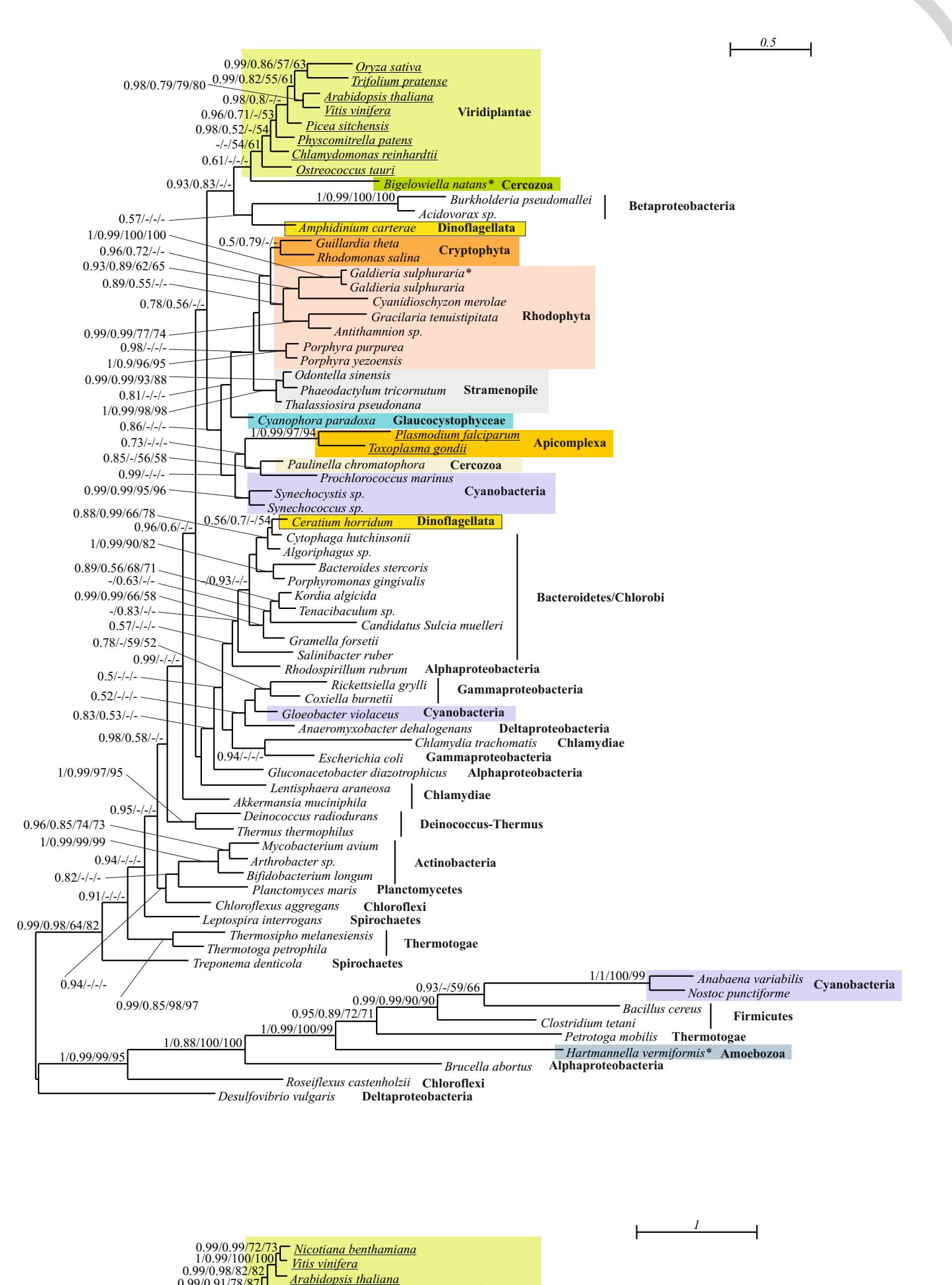
5

Otrzymane wyniki sugerują, że minichromosomy *C. horridum* AF490364 i *P. lunula* AF490367 mogą być fragmentami DNA bakteryjnego. Za taką hipotezę przemawia:

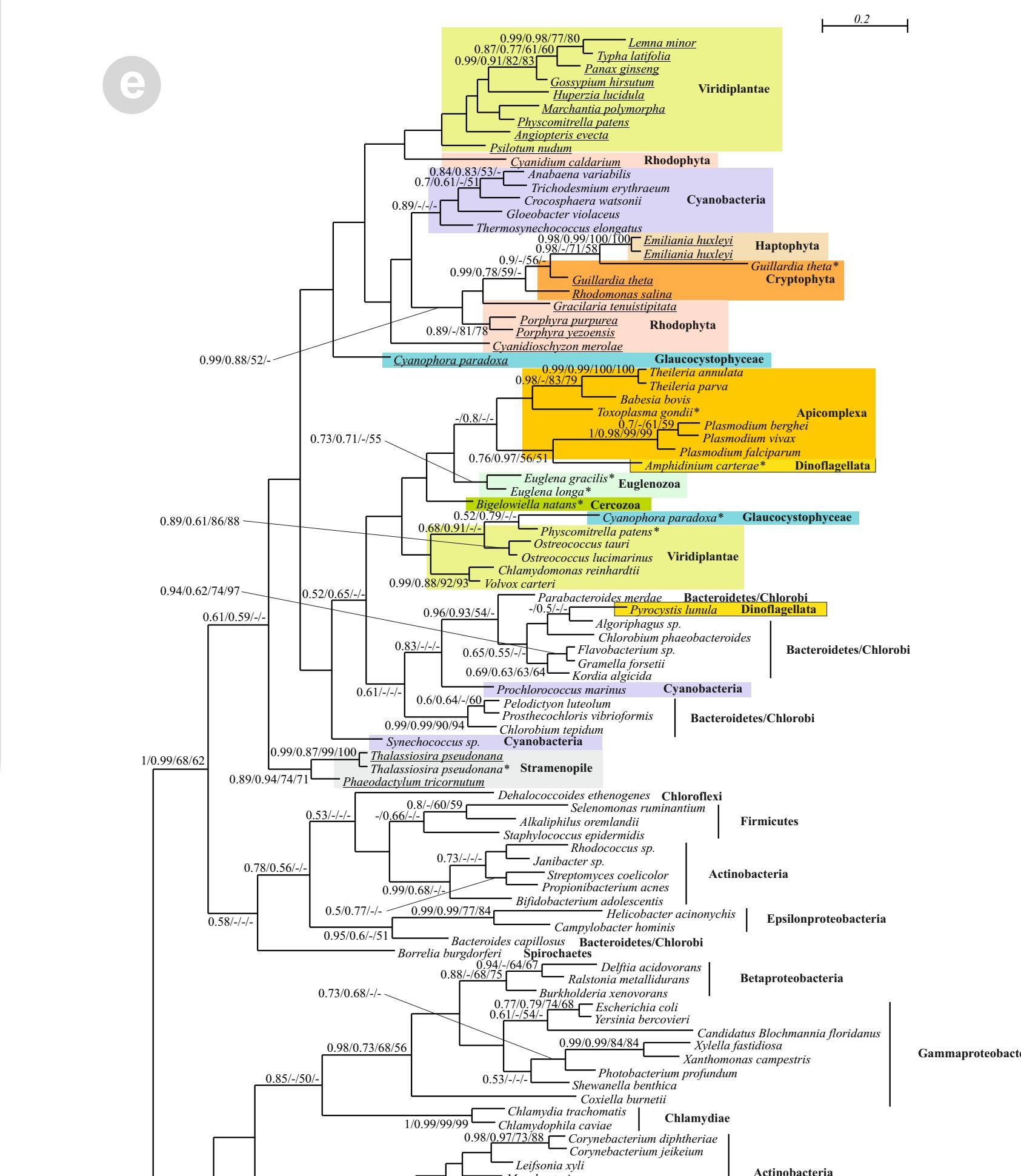
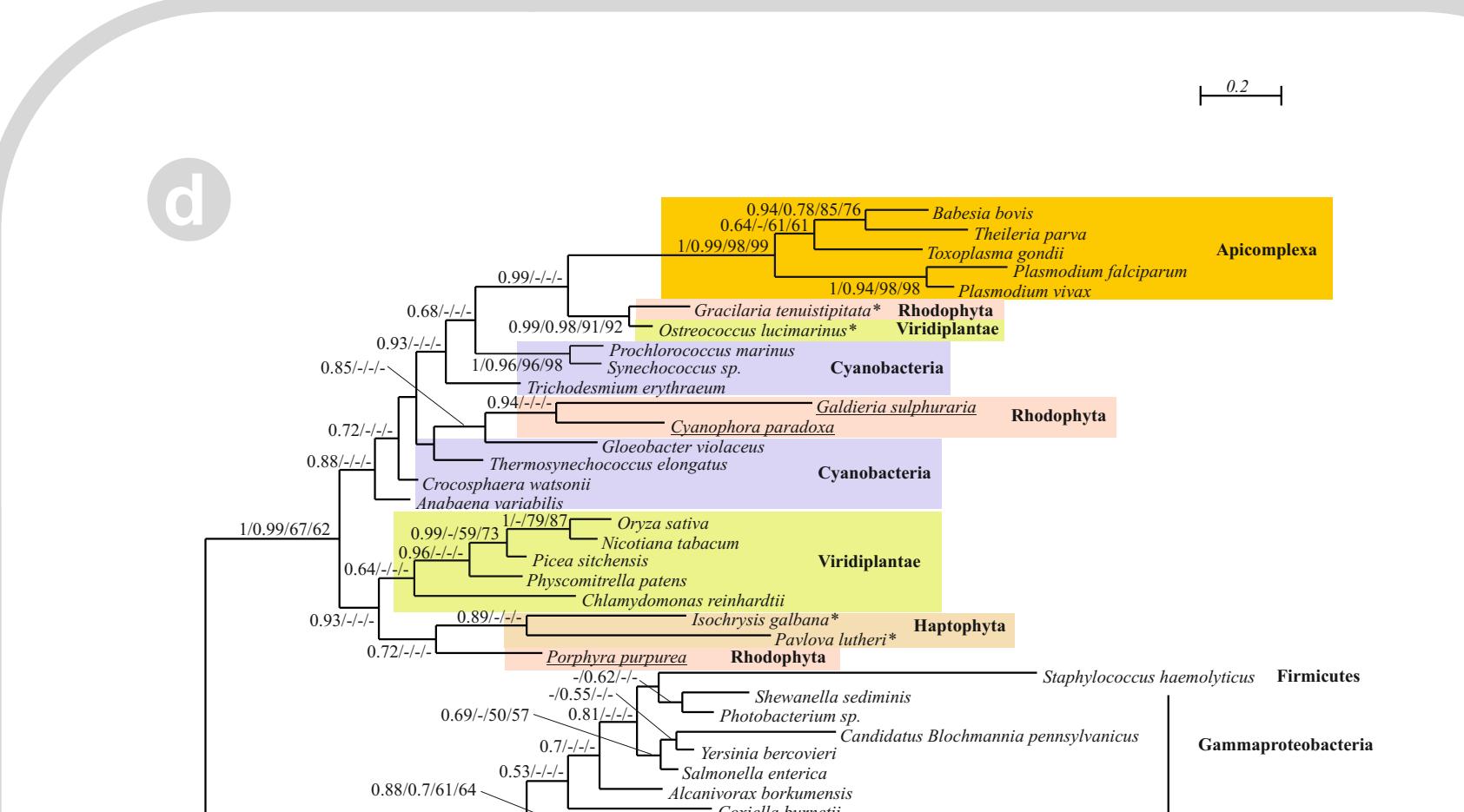
- (i) brak sekwenacji podobnych do innych minichromosomów zarówno w obrębie regionów kodujących, jak i niekodujących;
- (ii) bakteryjne pochodzenie kodowanych przez nie genów, oraz
- (iii) współistwarzanie i utożsamojenie genów kodowanych na minichromosomie AF490367, które przypominają fragment bakteryjnego operonu *rpmBG*.

Prezentowane przez nas wyniki stanowią pierwszy udokumentowany przypadek transferu genów bakterii do genomu plastydów peridininowych bruzdnic, sugerując jego chimeryczny charakter. Jest interesujące, że taką naturę genomu plastydowego odkryto również w przypadku plastydów niefotosyntetycznych (apikoplastu) występującego u pasożytniczej grupy Apicomplexa, która jest grupą siostrzaną dla Dinoflagellata (Obornik i in. 2002).

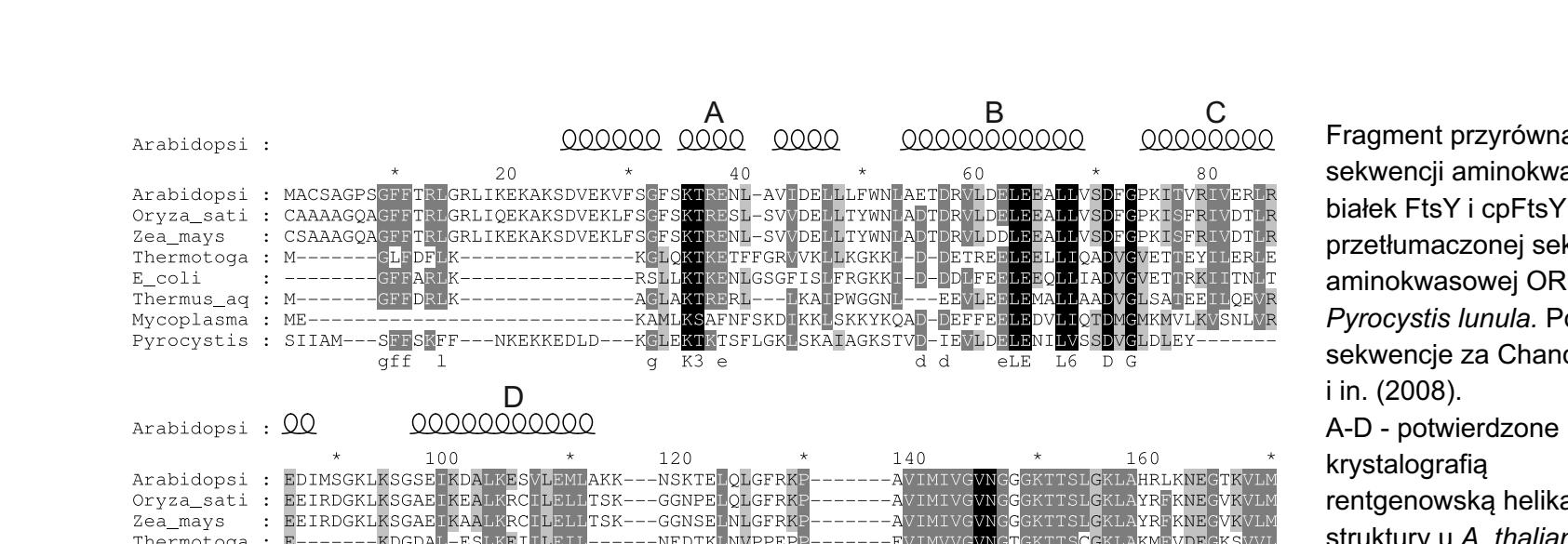
Analizy filogenetyczne (a) *ycf16*, (b) *ycf24*, (c) *ycf16+ycf24* *Ceratium horridum*. Na węzłach umieszczone wartości wsparcia > 50 w następującej kolejności: wartości 'bootstrap' liczone przez program. Sekwencje, których geny kodowane są jądrowo oznaczono jasnozielonymitem. Czcionka podkreślona oznacza sekwencję kodowaną w jądrze. Sekwencje EST oznaczono symbolem '***'.



2



Analizy filogenetyczne (d) *rpl28*, (e) *rpl33* *Pyrocystis lunula*. Na węzłach umieszczone wartości wsparcia > 50 w następującej kolejności: wartości 'bootstrap' liczone przez program. Sekwencje, których geny kodowane są jądrowo oznaczono jasnozielonymitem. Czcionka podkreślona oznacza sekwencję kodowaną w jądrze. Sekwencje EST oznaczono symbolem '***'.



program	liczba domen	poczatek	koniec	Potencjalne domeny alfa-helikalne w sekwenacji aminokwasowej ORF-a według programów, przewidujących strukturę drugorzędową białek.
hpred	3	18	39	5, 11 w sekwenacji nowego ORF-a według programów, przewidujących strukturę drugorzędową białek.
juf0	3	4	12	
phne	3	2	12	
porter	2	3	58	
pred	3	6	39	
prof	3	2	21	
psipred	2	3	41	
sable	3	7	11	
		47	56	
		47	61	
		47	55	
		47	49	
		47	53	
		50	58	
		48	60	
		47	60	

Zaktualizowany diagram kołowy minichromosomu *Pyrocystis lunula* o nowej, zachodzącej ORF *FtsY*.

Literatura:

- Archibald J.M. (2009). The puzzle of plastid evolution. *Curr. Biol.* 19:81-88.
- Bodył A., Stiller J.W., Mackiewicz P. (2009). Chromalveolate plastids: direct descent or multiple endosymbioses? *Trends Ecol. Evol.* 24(3):119-121.
- Cavalier-Smith T. (1999). Principles of protein and lipid targeting in secondary symbioses: euglenoids, dinoflagellates, and sporozoan plastid origins and the eukaryote tree. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46:347-366.
- Chandrasekar S., Charlton J., Jaru-Amparan P., Shan S. (2008). Structure of the Chlorella Signal Recognition Particle (SRP) Receptor-Domain Arrangement Modulates SRP-Receptor Interaction. *J. Mol. Biol.* 375:425-436.
- Ellis K.E., Cleugh B., Saldanha J.W., Wilson R.J. (2001). NifS and Sulfur in *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Biol.* 21:2675-2686.
- Maguire D.G. (1997). Mutations in the rpmBG operon of *Escherichia coli* that affect ribosome assembly. *J. Bacteriol.* 179:2496-2499.
- Obornik M., Van de Peer Y., Hickey D.J., Salgotra A., Larkum A.W. (2008). The origin of plastids. *Philos. Trans. R. Soc. London B-Biol. Sci.* 363(1504):2675-2686.
- Yamaguchi K., Belmont M.V., Pretto S., Haynes P.A., McDonald W.H., Yates J.R. 3rd, Mayfield S.P. (2003). Proteomic characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast ribosome. Identification of proteins unique to the 70S ribosome. *J. Biol. Chem.* 278(36):33774-33785.
- Zhang Z., Cavalier-Smith T., Green R.R. (2002). Evolution of dinoflagellate unicellular minichromosomes and the partially concerted divergence of their putative replication origins. *Mol. Biol. Evol.* 19(4):489-500.