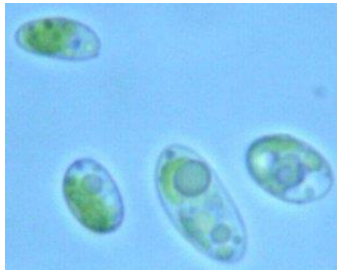
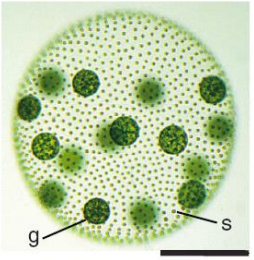
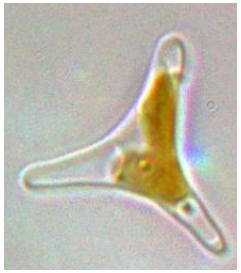


Coccomyxa

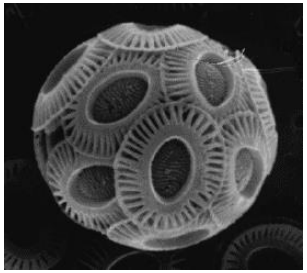
Chlamydomonas reinhardtii



Volvox carteri



Phaeodactylum tricornutum



Emiliania huxleyi

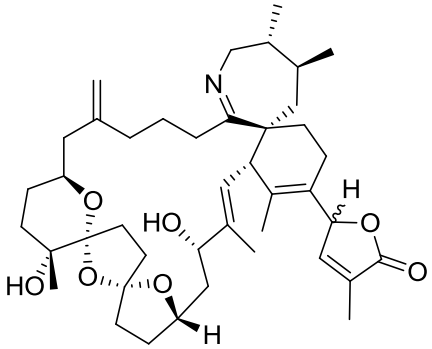
Entdeckung neuer Naturstoffe in Algen mit Hilfe von Genomsequenzen

seit 1558

Severin Sasso

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie

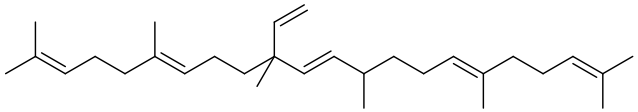
Innovationsforum «AlgaeStream», 12. September 2013



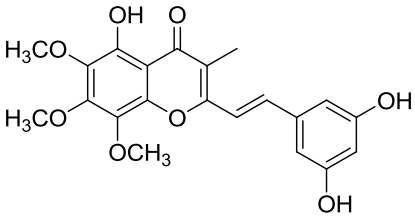
Sekundärstoffwechsel in Algen

- Sekundärstoffe (=Naturstoffe):
  - spezialisierter Stoffwechsel
  - oft beteiligt an der Wechselwirkung eines Organismus mit seiner Umwelt

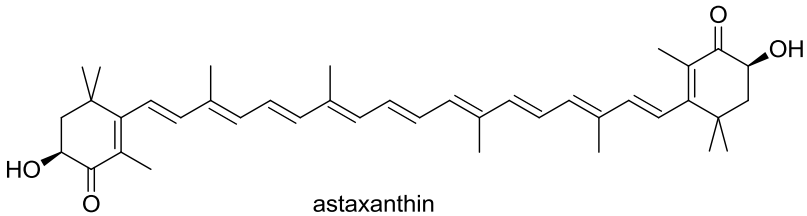
- Beispiele aus Algen:



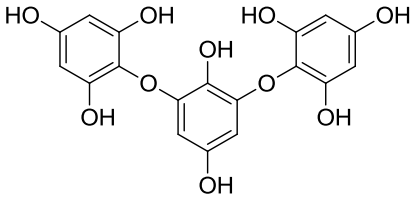
a C_{30} botryococcene
(*Botryococcus braunii*, a chlorophyte)



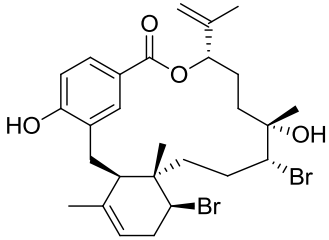
hormothamnione
(*Chrysophaeum taylori*, a cryptophyte)



astaxanthin
(many chlorophytes)



example of a phlorotannin
(brown algae)



bromophycolide N
(*Callohycus serratus*,
a red macroalga)

Isolation von Naturstoffen

- Klassischer Ansatz: Reinigung und Identifikation
  - Entdeckung einer Reihe von aktiven Verbindungen
  - hohe Wiederentdeckungsfrequenz
  - wenig bekannt über Biosynthese
  - funktionelle Untersuchungen schwierig

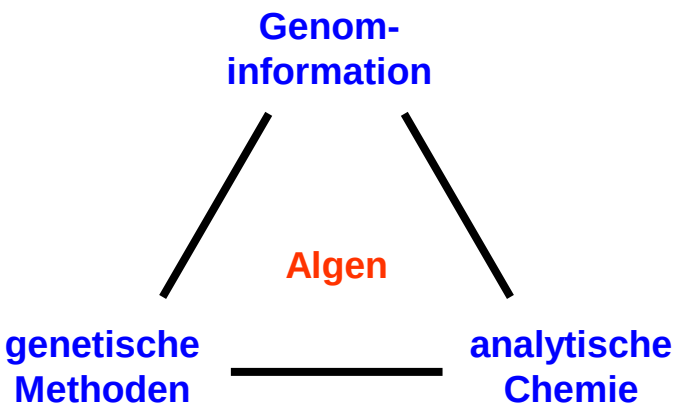
    Effekt auf andere Organismen; Korrelationsstudien (z.B. produzierende vs. nicht-produzierende Stämme)

  -> Ein besseres Verständnis der Biosynthese würde helfen, Regulation und Funktion zu verstehen.

- Mikroalgen:
  - einige Arten gut im Labor kultivierbar
  - z.T. genetische Methoden etabliert

Untersuchung des Sekundärstoffwechsels in Algen

- Moderner Ansatz:

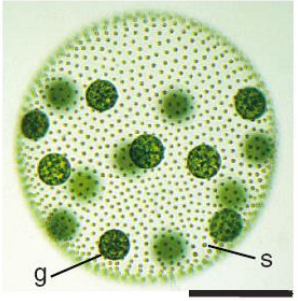


-> Ist es möglich, neue Verbindungen mit interessanten Eigenschaften zu entdecken?

-> Welchen Vorteil hat der Produzent?

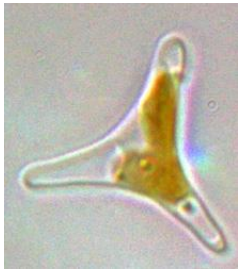
Algen: Verfügbare Genominformationen

Species	Description	Genome size (Mb)	Gene number	Year published
Chlorophyta				
Bathycoccus prasinos	marine picoeukaryote			-
Chlamydomonas reinhardtii	model species, freshwater	121	15,143	2007
Chlorella variabilis	*Paramecium* symbiont	46.2	9,791	2010
Coccomyxa subellipsoidea	*Chlorella* relative	49	9,627	2012
Micromonas sp. CCMP1545	marine picoeukaryote	21.9	10,575	2009
Micromonas sp. RCC299	marine picoeukaryote	20.9	10,056	2009
Ostreococcus lucimarinus	marine picoeukaryote	13.2	7,651	2007
Ostreococcus tauri	marine picoeukaryote	12.6	7,892	2006
Ostreococcus sp. RCC809	marine picoeukaryote	13.3	7,492	-
Volvox carteri	simple multicellular relative of *C. reinhardtii*	138	14,520	2010
Rhodophyta				
Chondrus crispus	multicellular seaweed, source of carrageenan	105	9,606	2013
Cyanidioschyzon merolae	thermo-acidophile	16.5	5,331	2004
Galdieria sulphuraria	thermo-acidophile	13.7	6,623	2013
Porphyridium purpureum	mesophilic unicellular alga	19.7	8,355	2013
Pyropia (Porphyra) yezoensis	multicellular seaweed, susabi-nori	ca. 43	10,237	2013
Glaucophyta				
Cyanophora paradoxa	freshwater alga with peptidoglycan-surrounded plastid	ca. 70	27,921	2012
Chlorarachniophyta				
Bigelowiella natans	marine alga	94.7	21,708	2012
Heterokontophyta				
Aureococcus anophagefferens	harmful algal bloom-forming marine pelagophyte	57	11,501	2011
Ectocarupus siliculosus	brown alga (multicellular seaweed)	214	16,256	2010
Fragilariopsis cylindrus	marine psychrophilic diatom			-
Nannochloropsis gaditana CCMP526	marine lipid-accumulating alga	ca. 29	9,052	2012
Nannochloropsis oceanica LAMB0001	marine lipid-accumulating alga	ca. 30	11,129	2011
Nannochloropsis oceanica CCMP1779	marine lipid-accumulating alga	28.7	11,973	2012
Phaeodactylum tricornutum	marine pennate diatom	27.4	10,402	2008
Pseudo-nitzschia multiseries	neurotoxin-producing diatom			-
Thalassiosira pseudonana	marine centric diatom	32.4	11,776	2004
Dinoflagellates				
Symbiodinium minutum	unicellular symbiotic alga (photosynthetic)	ca. 1,500	ca. 42,000 (616 Mb sequenced)	2013
Haptophyta				
Emiliania huxleyi	marine coccolithophore	141.7	30,569	2013
Cryptophyta				
Guillardia theta	marine alga	87.2	24,840	2012



Volvox carteri
(scale bar: 0.2 mm)

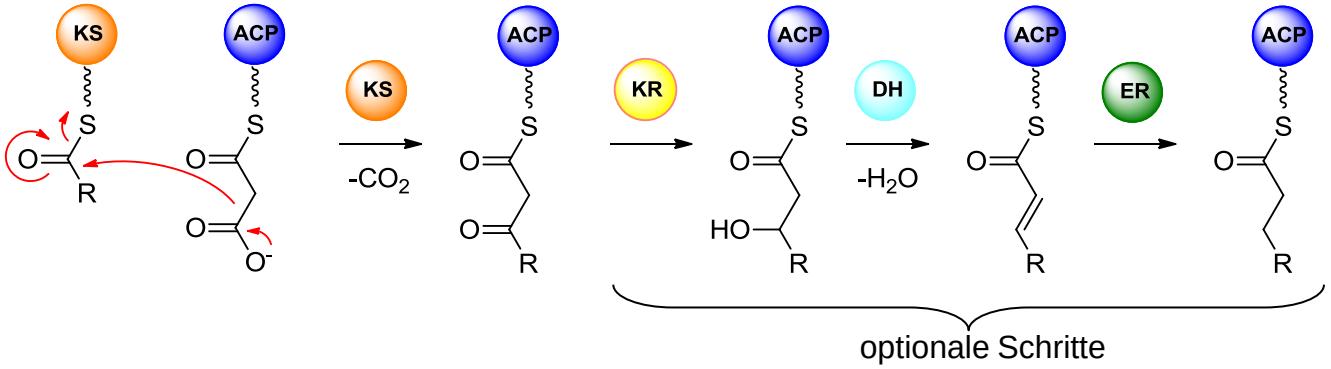
Ectocarpus siliculosus



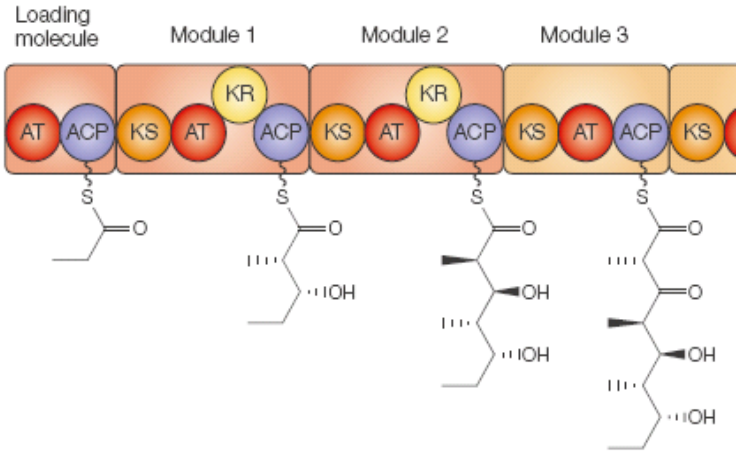
Phaeodactylum tricornutum

Polyketide: eine wichtige Klasse von Sekundärstoffen

- Biosynthese vieler bioaktiver Verbindungen (Bakterien, Pilze)
- Allgemeiner Mechanismus: Die Polyketid-Synthase (PKS) ist mit der Fettsäure-Synthase verwandt.



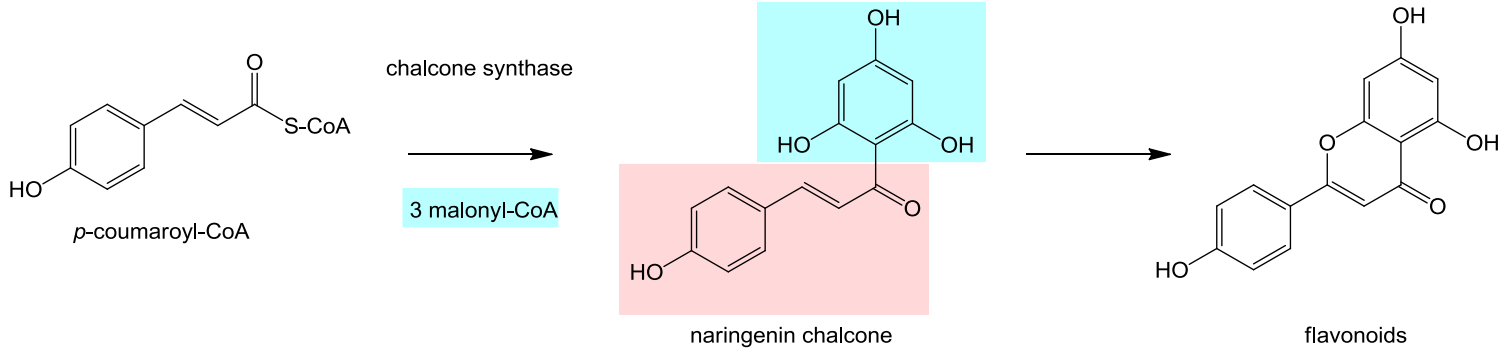
- Typ-I-PKS: grosse, modulare Enzyme



Polyketide: eine wichtige Klasse von Sekundärstoffen

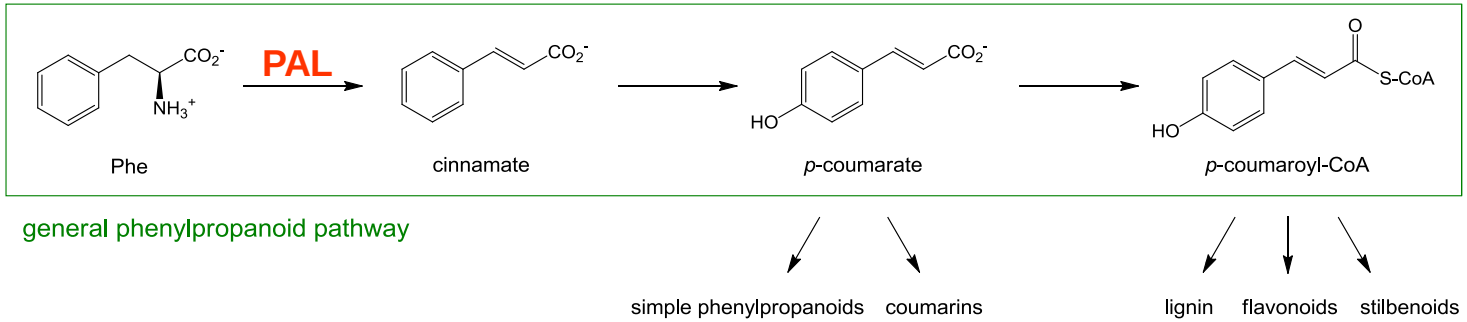
- Typ-II-PKS: enzymatische Domänen bilden nicht-kovalenten (dissoziierbaren) Komplex

- Typ-III-PKS: kleine Enzyme, variable Starteinheit



Der Phenylpropanoidweg fehlt in Algen

- Biosynthese phenolischer Verbindungen in höheren Pflanzen:



PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase

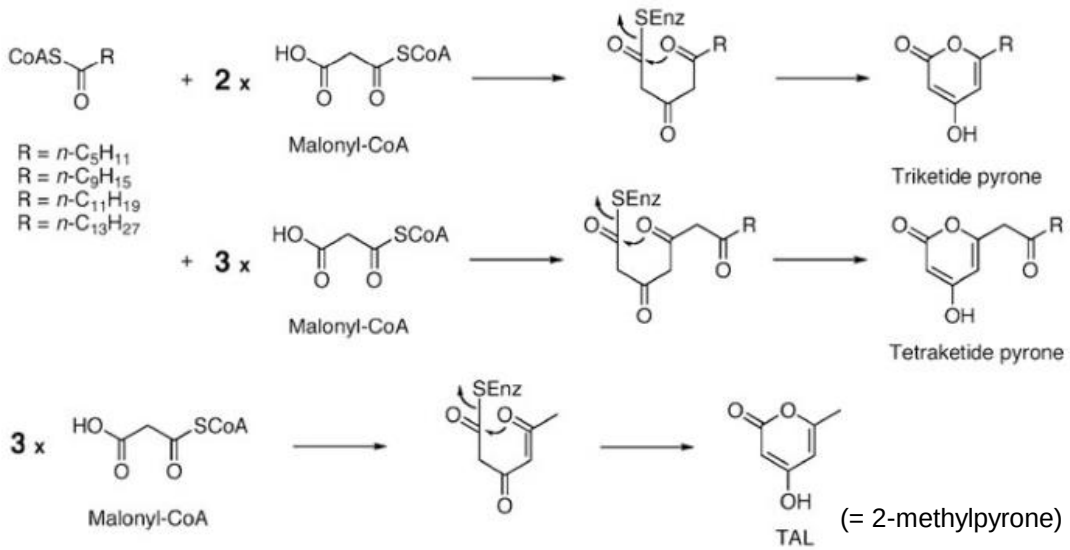
- PAL-Gen: fehlt in Algengenomen

  -> Alternativer Weg zu phenolischen Verbindungen in Algen?

- Hypothese: Typ-III-PKS könnten zu phenolischen Verbindungen führen

Typ-III-PKS aus *Sargassum binderi*

- Erste *In-vitro*-Charakterisierung einer Typ-III-PKS aus Braunalgen: *Sargassum binderi*



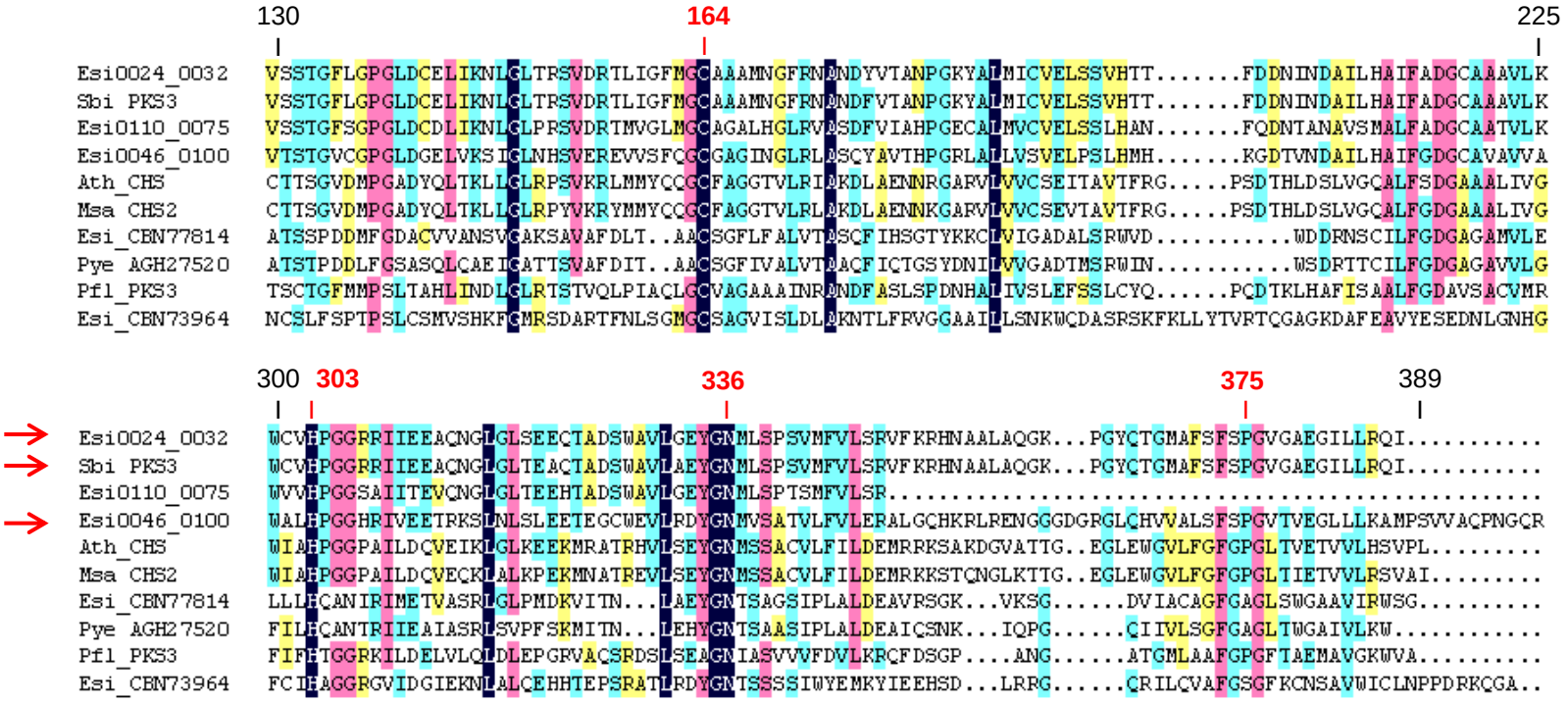
-> SbPKS beteiligt an Pyron-Biosynthese; biologische Rolle unklar

-> Ähnliche Reaktionen könnten zu anderen phenolischen Verbindungen führen

H. Baharum *et al.*, *Mar. Biotechnol.* **13**, 845 (2011)

Vorhergesagte Typ-III-PKS aus Makroalgen

- Verwandtschaft mit Enzymen des Fettsäurestoffwechsels – Pro375 könnte für Polyketid-Zyklisierung verantwortlich sein. (Jiang *et al.*, *Mol. Phylogen. Evol.* **49**, 691 (2008))

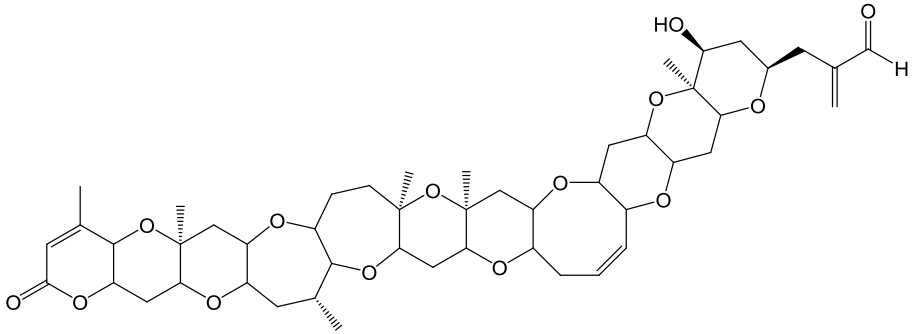


(Nummerierung bezieht sich auf Chalcon-Synthase 2 aus *Medicago sativa* (Msa_CHS2).)

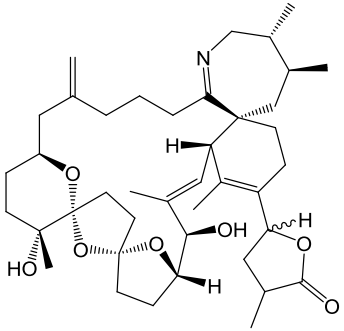
-> 2 *Ectocarpus*-Proteine sind wahrscheinlich Typ-III-PKS. (Esi0024_0032 stark exprimiert)

Einige Dinoflagellaten produzieren Polyketid-Toxine während Algenblüten

- Isotopenmarkierung: Einige Toxine aus Dinoflagellaten sind Polyketide.



brevetoxin B
Karenia brevis



13-desmethyl spirolide C
Alexandrium ostenfeldii

Karenia mikimotoi

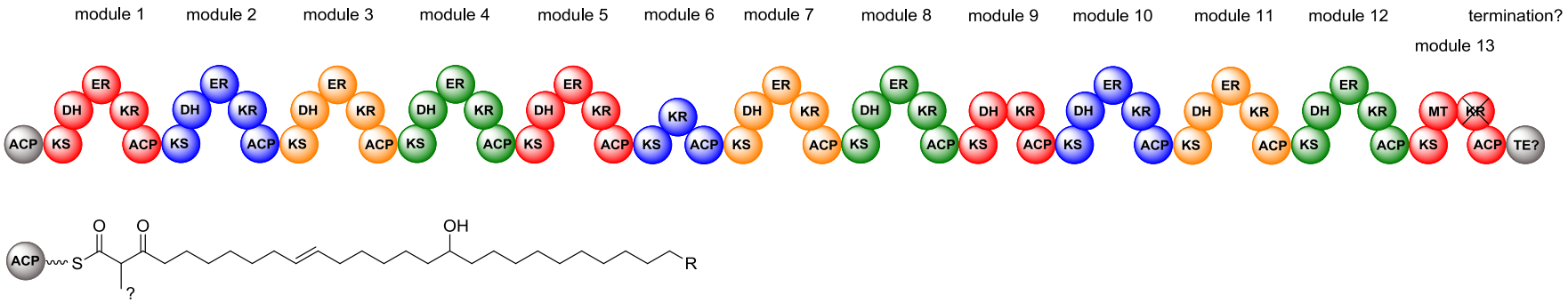
- Über die genetischen und enzymatischen Grundlagen der Polyketid-Biosynthese in Dinoflagellaten ist wenig bekannt.

Wie sieht es in den sequenzierten Algen aus?

Algenblüte («rote Flut»)

Beispiele vorhergesagter Typ-I-PKS in Algen

- *Emiliania huxleyi*:


module 1
module 2
module 3
module 4
module 5
module 6
module 7
module 8
module 9
module 10
module 11
module 12
termination?
module 13
ACP KS ACP KS ACP KS

Gene für Typ-I-PKS kommen in Algen häufig vor

Species	Type I PKS genes	NRPS genes
Chlorophyta		
Bathycoccus prasinos	0	0
Chlamydomonas reinhardtii	1	0
Chlorella variabilis	1	1
Coccomyxa subellipsoidea	10	1
Micromonas sp. CCMP1545	3	0
Micromonas sp. RCC299	2	0
Ostreococcus lucimarinus	3	0
Ostreococcus tauri	4	0
Ostreococcus sp. RCC809	0	0
Volvox carteri	1	0
Rhodophyta		
Cyanidioschyzon merolae	0	0
Galdieria sulphuraria	0	0
Porphyridium purpureum	0	0
Glaucophyta		
Cyanophora paradoxa	0	1
Chlorarachniophyta		
Bigelowiella natans	1	1
Heterokontophyta		
Aureococcus anophagefferens	10	1
Ectocarpus siliculosus	0	0
Fragilariopsis cylindrus	0	0
Phaeodactylum tricornutum	0	0
Pseudo-nitzschia multiseries	0	0
Thalassiosira pseudonana	0	0
Haptophyta		
Emiliania huxleyi	10	0
Crypophyta		
Guillardia theta	0	0

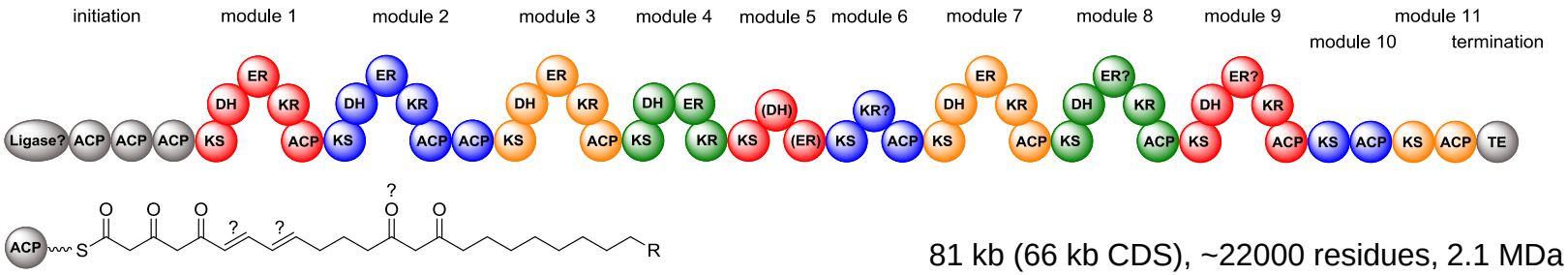
-> bisher keine Polyketide aus diesen Algen bekannt

-> Nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen (NRPS) seltener als in Cyanobakterien

(Es fehlen: *Chondrus crispus*, *Pyropia (Porhyra) yezoensis*, *Nannochloropsis*)

aktualisiert aus S. Sasso *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 761-785 (2012)

Typ-I-PKS aus *Chlamydomonas*



81 kb (66 kb CDS), ~22000 residues, 2.1 MDa

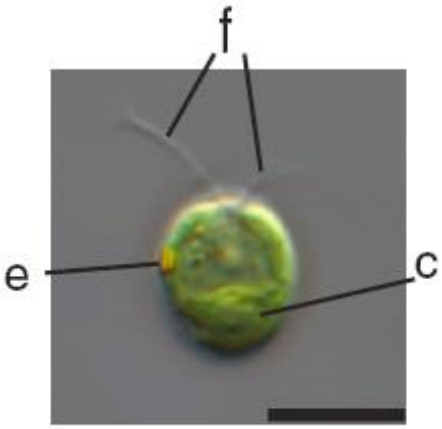
Ziele: Was ist die Funktion der Typ-I PKS in *C. reinhardtii*?

Was sind die zugehörigen Polyketide?

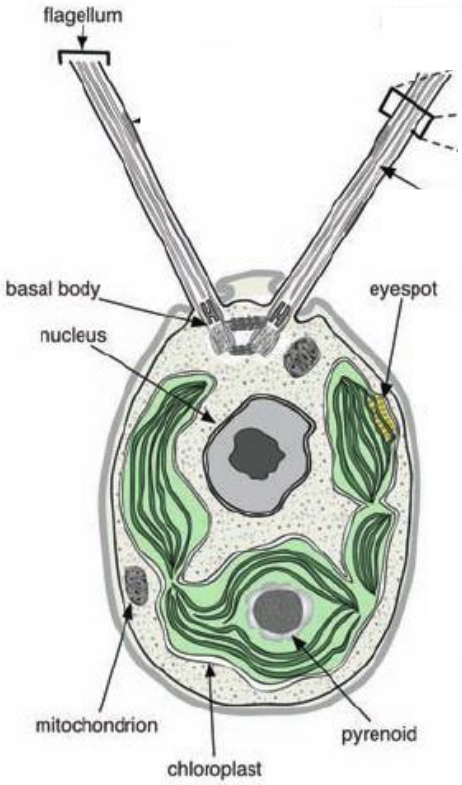
- strukturelle Bestandteile der Zelle?
- Signalmoleküle?
- Toxine??
- evolutionäre Überreste?

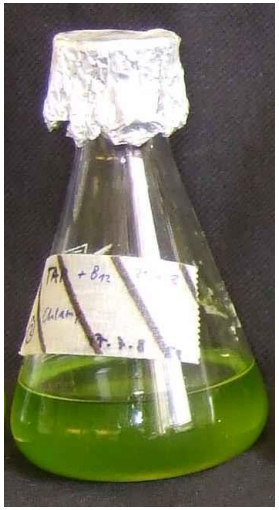
Kurzer Steckbrief von *Chlamydomonas reinhardtii*

- Modellart (Photosynthese, Motilität, circadiane Rhythmik)
- Chlorophyt
- Boden und Süsswasser
- Genome sind sequenziert:
  Kerngenom 121 Mb
  Chloroplastgenom 200 kb
  mitochondriales Genom 16 kb
- Tranformation and Gene-Silencing etabliert



scale bar: 10 μm

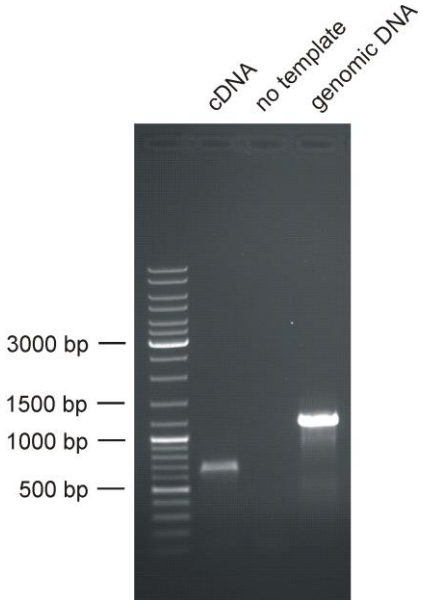




PKS mRNA ist detektierbar unter Standard-Wachstumsbedingungen

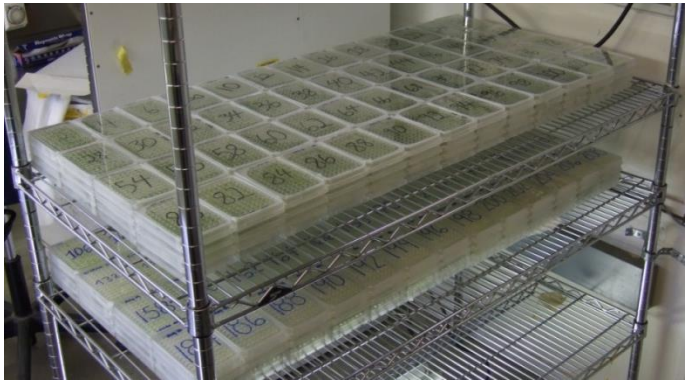
- Reverse-Transkription-PCR:

Zellen gezüchtet in TAP-Medium bei 23 °C, kontinuierlichem Licht

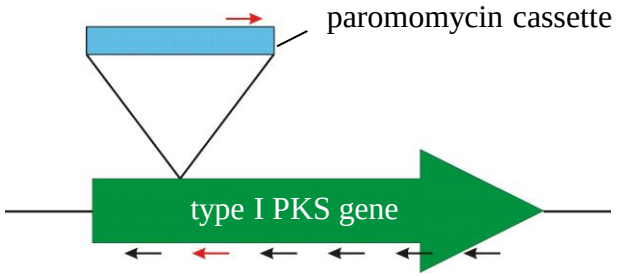


- Mutantenscreen:

1. Herstellung von 25.000 zufälligen Insertionsmutanten:

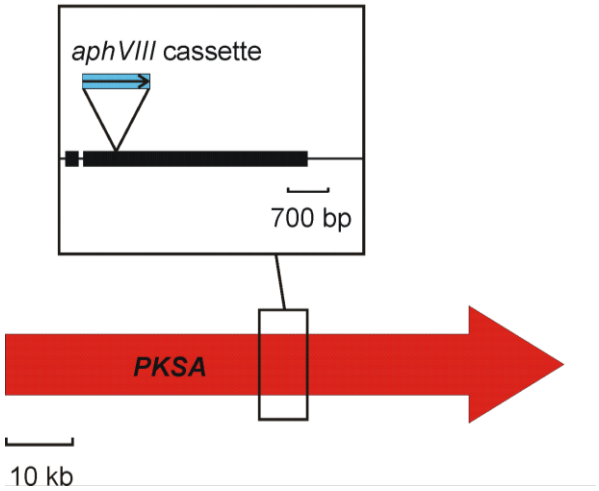


2. PCR-Screening:



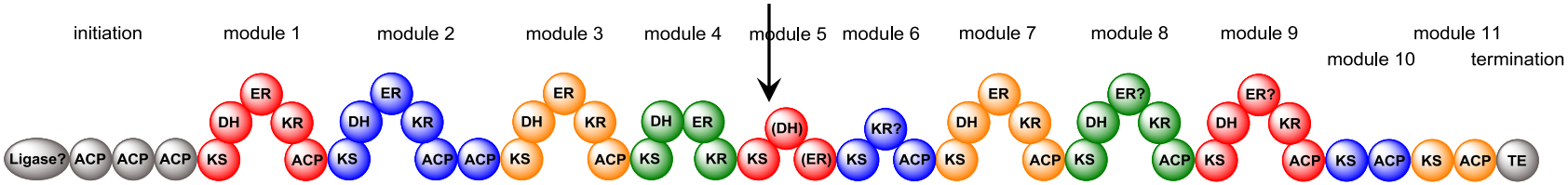
Methode beschrieben in:
D. Gonzalez-Ballester *et al.*, *Plant Methods* **7,** 24 (2011)

Typ-I-PKS-Mutante



- genomische DNA: beide Schnittstellen sequenziert
- cDNA: zwei Transkripte sequenziert

-> CRMS107 ist wahrscheinlich eine Knockout-Mutante

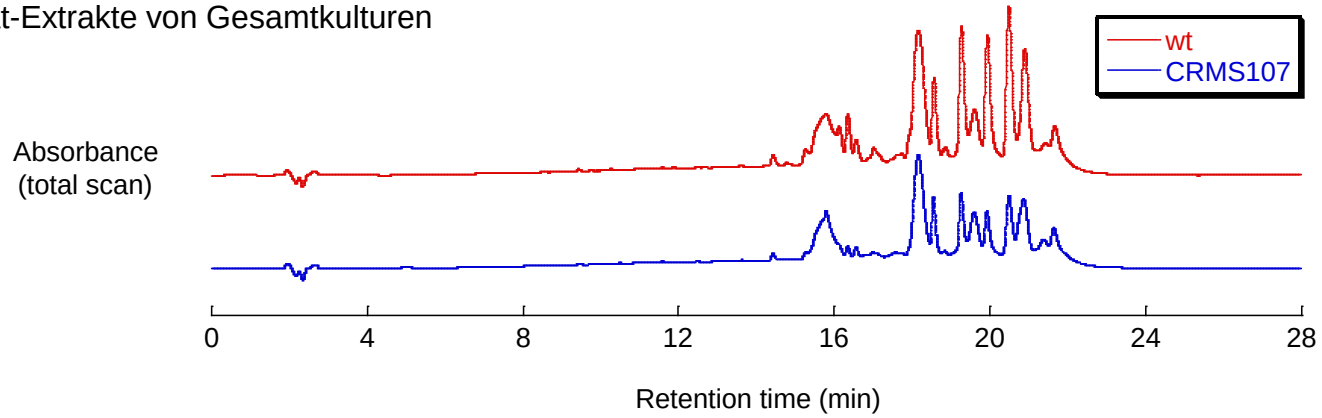


Charakterisierung der PKS-Mutante

- Bisher kein Wachstumsunterschied zwischen WT und PKS-Mutante

- Vergleichendes metabolisches Profiling mittels LC-HRMS:

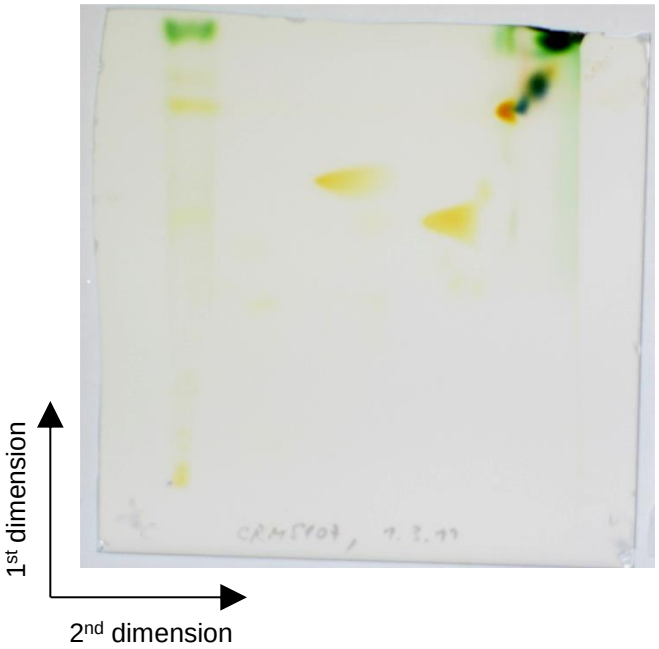
Ethylacetat-Extrakte von Gesamtkulturen



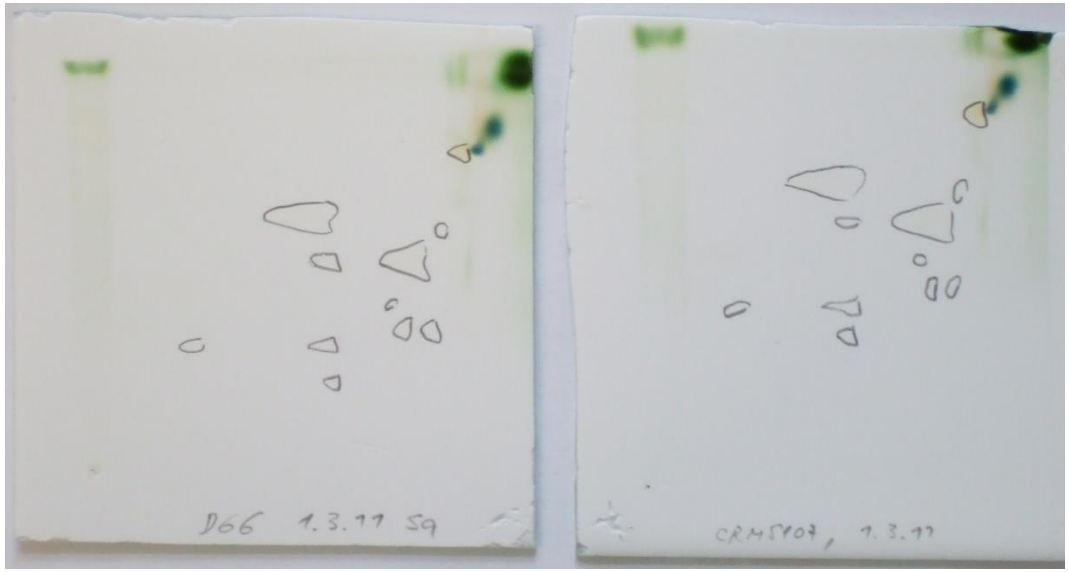
- Automatische Auswertung von MS-Daten

Könnte die Typ-I-PKS an der Fettsäure-Biosynthese beteiligt sein?

- Lipidanalyse: 2D-Dünnschichtchromatogramm eines Chloroformextraktes



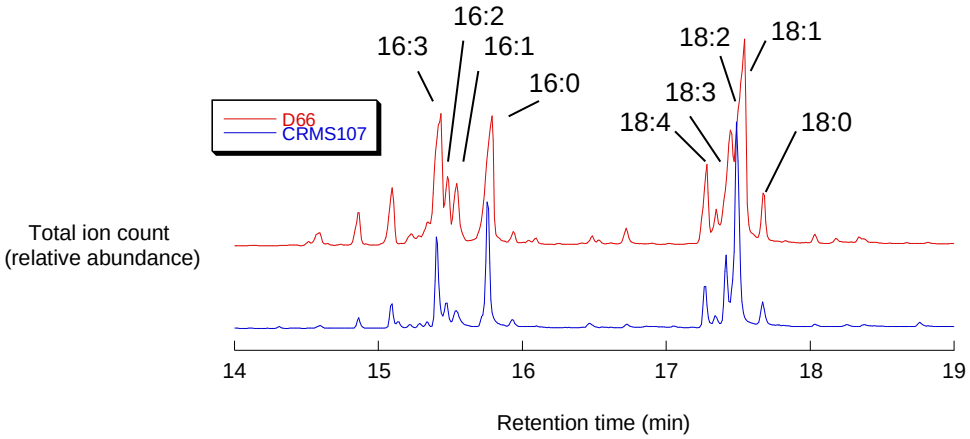
nach Iodfärbung



WT vs. CRMS107

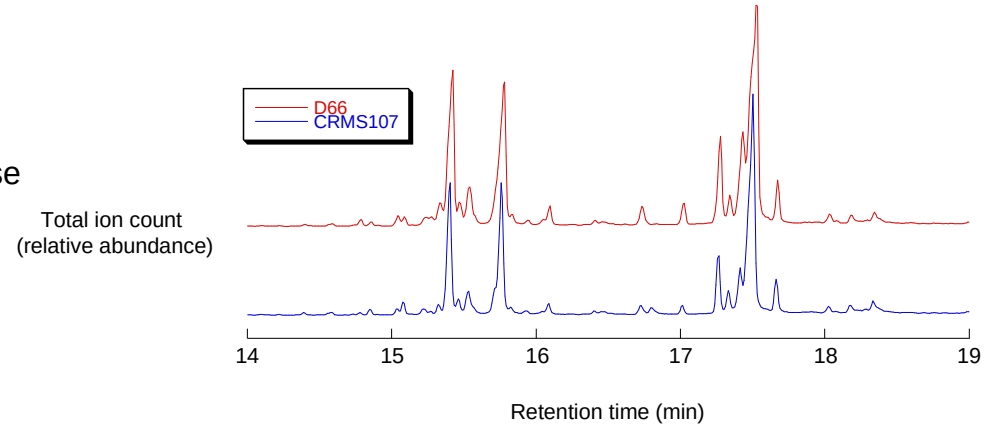
Analyse des Fettsäurenprofils

- BF_3-katalysierte Umesterung in Methylester
- GC-MS:



- Anaerobe Bedingungen:

1. Wachstum bis zur exponentiellen Phase
2. Argon-Begasung für 30 min
3. Inkubation bei 12 °C O/N im Dunkeln



Zusammenfassung

- Sequenzierte Algengenome codieren einige Typ-I-PKS-Gene mit unbekannter Funktion.
- Die Charakterisierung einer *Chlamydomonas*-PKS-Mutante ist am Laufen. Bisher konnte kein metabolischer oder phänotypischer Unterschied zwischen WT und PKS-Mutante beobachtet werden.
- Typ-III-PKS könnten eine neue Route zu phenolischen Verbindungen in Makroalgen darstellen.

Danksagung

seit 1558

Deutsche Forschungsgemeinschaft

JSMC

Leibniz Institute
for Natural Product Research and Infection Biology
Hans Knoell Institute

Natalie Oppenhäuser

Prof. Maria Mittag (Friedrich Schiller University Jena)

Dr. Katja Prager
Sandra Künzel
Eva-Maria Schmidt

Prof. Christian Hertweck (Hans Knöll Institute, Jena)

Dr. Kirstin Scherlach
Andrea Perner
Florian Kloss

Prof. Arthur Grossman (Carnegie Institution, Stanford, USA)

Dr. Mark Heinnickel
Dr. David Dewez
Danielle Ikoma

Genomsequenzierungs- und Annotationsteams

FNSNF
Swiss National Science Foundation