

Genomik

Die Entschlüsselung des Genoms des Quastenflossers

MANFRED SCHARTL¹, AXEL MEYER²

¹LEHRSTUHL PHYSIOLOGISCHE CHEMIE, BIOZENTRUM, UNIVERSITÄT WÜRZBURG

²LEHRSTUHL FÜR ZOOLOGIE UND EVOLUTIONS BIOLOGIE, UNIVERSITÄT KONSTANZ

Seventy-five years after the discovery of the first coelacanth the genome sequence of the *Latimeria chalumnae* has been completed. The *Latimeria* genome will be an invaluable resource for inferring evolutionary processes that happened during the transition from water to land. The first analyses of genes and regulatory elements disclosed changes, which permitted vertebrate adaptation to land. A phylogenomic analysis again strongly supports that the lungfishes are the closest living relatives of the tetrapods.

DOI: 10.1007/s12268-013-0349-2
© Springer-Verlag 2013

■ Es war vor genau 75 Jahren, als die junge Kuratorin des Naturkundemuseums in East London an der Küste zum Indischen Ozean in Südafrika kurz vor Weihnachten eine sensationelle Entdeckung machte. 1938 fand Ms. Marjorie Latimer einen sehr merkwürdig aussehenden Fisch auf dem Fischmarkt, der, wie sich bald herausstellte, zu einer evolutionären Linie gehörte, von der man glaubte, dass sie seit über 70 Millionen Jahren ausgestorben sei. Das Tier war über einen Meter lang, bläulich gefärbt, mit großen, harten Schuppen bewehrt, die Flossen waren fleischig und sahen eher aus wie Gliedmaßen als Flossen – und der Fisch hatte eine Art Quaste in der Schwanzflosse. Dieser Quastenflosser wurde nur wenige Monate später von dem südafrikanischen Ichthyologen J. L. B. Smith in einer Veröffentlichung in *Nature* [1] nach seiner Entdeckerin *Latimeria chalumnae*, der Komoren-Quastenflosser, benannt (**Abb. 1**).

Latimeria sah den Versteinerungen von längst ausgestorbenen Quastenflossern sehr ähnlich – ein „lebendes Fossil“ war entdeckt worden. Smith schrieb, dass es wäre, als ob ihm ein Dinosaurier auf der Straße begegnet sei. Dieser altertümliche bläuliche Fisch mit weißen Flecken ist seitdem weltberühmt geworden, und Smith selbst war besessen davon, auch einen lebenden Quastenflosser zu finden. Seine Suche dauerte fast 14 Jahre,

bis er das Exemplar Nummer 2 auf dem Komoren-Archipel fand und mit der südafrikanischen Luftwaffe sozusagen aus der französischen Kolonie entführte. Diese Suche beschrieb J. L. B. Smith in seinem Buch *Old Fourlegs*, einem wahren Wissenschaftskrimi. Seitdem sind weniger als 300 Exemplare von *Latimeria chalumnae* gefangen worden, hauptsächlich im südlichen Indischen Ozean. Im Jahre 1997 wurde sogar nördlich der indonesischen Insel Sulawesi eine zweite lebende Quastenflosserart entdeckt. Sie erhielt den Namen *Latimeria menadoensis*, der Manado-Quastenflosser. Sie unterscheidet sich morphologisch kaum vom afrikanischen Quastenflosser, jedoch weisen die DNA-Sequenzen den indonesischen Quastenflosser eindeutig als eigenständige Art aus.

Der sensationelle Fund von Marjorie Latimer veränderte das Verständnis der Geschichte des Landgangs der Wirbeltiere, wie also Fische das Wasser verließen und das Land besiedelten, denn für mehr als fünf Jahrzehnte galt *Latimeria* als nächster lebender Verwandter der Landwirbeltiere (Tetrapoden). Seine Anatomie und Physiologie wurde nach Gemeinsamkeiten mit Tetrapoden und Anpassungen für den Landgang untersucht. Die Lungenfische, die schon Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckt worden waren, wurden durch den Quastenflosser als nächste

lebende Verwandte der Landwirbeltiere entthront.

Nun wurde genau 75 Jahre nach seiner Entdeckung das komplette Genom des Quastenflossers am Broad Institute des Massachusetts Institute of Technology in Boston sequenziert [2], und unsere Labore in Würzburg und Konstanz waren Teil eines internationalen Teams, das die fast drei Gigabasen seines Genoms analysierte. Es wäre natürlich schön gewesen, auch das Genom eines Lungenfisches zu analysieren, aber diese haben mit über 100 Gigabasen die größten Genome überhaupt, was technisch immer noch eine zu große Herausforderung darstellt. Lungenfisch-Genome sind also mehr als 30-mal größer als das Genom von *Homo sapiens*. Daher wurde als Teil der Studie des Quastenflosser-Genoms ein Transkriptom eines Afrikanischen Lungenfisches (*Protopterus annectens*) analysiert.

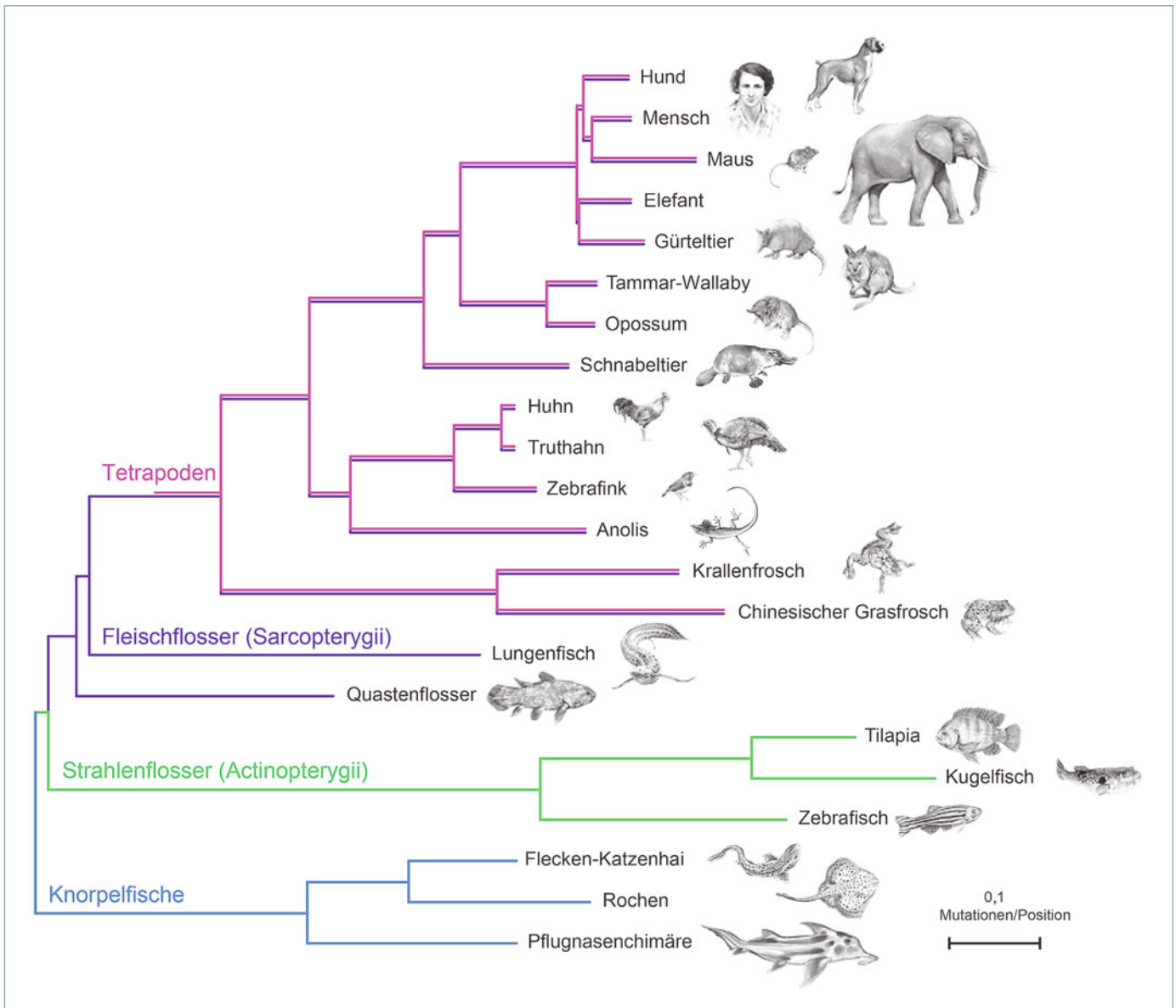
Lungenfisch oder Quastenflosser, wer ist näher mit uns verwandt?

Seit es vor fast 25 Jahren durch die ersten PCR-Anwendungen möglich wurde, zunächst kurze DNA-Sequenzen beider evolutionärer Linien zu bestimmen [3], deutete sich immer mehr an, dass die Lungenfische doch näher mit uns verwandt sind [4] als die Quastenflosser, es also einen (ausgestorbenen) Vorfahren gab, der vor jüngerer Zeit gelebt hat, von dem sowohl die Lungenfische als auch die Landwirbeltiere abstammen.

Die nun auf 251 orthologen Genen von 23 Wirbeltier-Genomen basierende phylogenomische Analyse bestätigte mit hoher statistischer Signifikanz, dass die Lungenfische näher mit den Tetrapoden verwandt sind als



▲ **Abb. 1:** Präparat des Komoren-Quastenflossers *Latimeria chalumnae*, Naturhistorisches Museum Wien (Bild: Alberto Fernandez Fernandez, www.wikipedia.de).



▲ **Abb. 2:** Stammbaum der Wirbeltiere auf der Basis von 251 orthologen Genen. Die molekulare Phylogenie wurde von einem insgesamt 100.583 eindeutige Aminosäurepositionen umfassenden Proteinalignment erstellt und zeigt, dass die Lungenfische innerhalb der Sarcopterygier den Tetrapoden näherstehen als die Quastenflosser. Die Knorpelfische wurden als Außengruppe verwendet (verändert nach [2]).

die Quastenflosser (**Abb. 2**). Trotzdem half die Analyse des Quastenflosser-Genoms, besser zu verstehen, welche genomischen Präadaptationen des letzten gemeinsamen Vorfahren der Quastenflosser und der evolutionären Linie, aus der alle Amphibien, Reptilien, Vögel und Säugetiere entstanden sind, den Landgang ermöglichten. Einige dieser Merkmale werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Ist der Quastenflosser ein lebendes Fossil?

Man muss sich in Erinnerung rufen, dass *Homo sapiens* und alle anderen Landwirbeltiere einen gemeinsamen Vorfahren mit dem

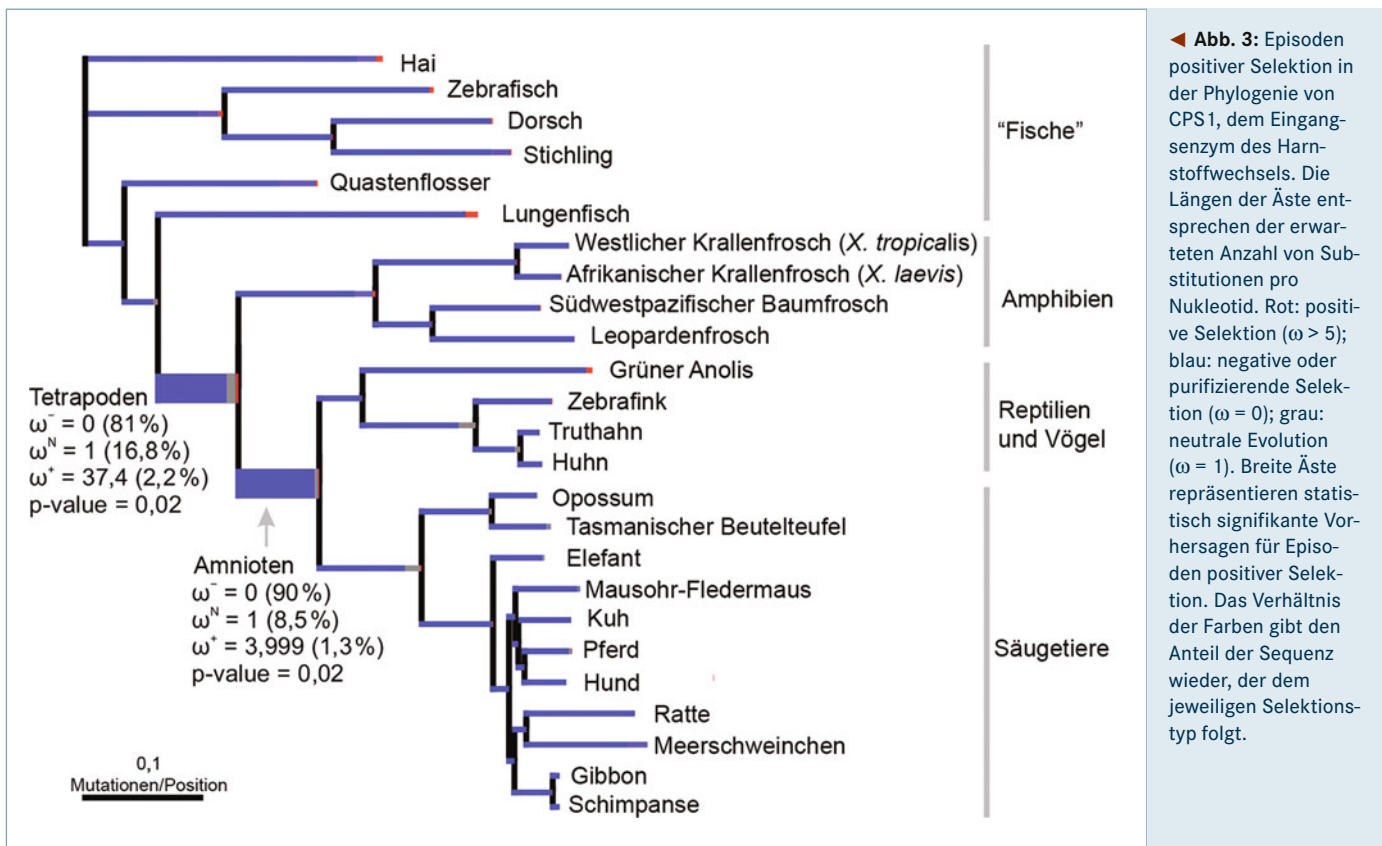
Quastenflosser hatten, der vor mehr als 400 Millionen Jahren lebte. Uns trennen also mehr als 800 Millionen Jahre Evolution von den lebenden Quastenflossern. Keine lebende Art ist der Vorfahre einer anderen Art, allein deshalb ist der Begriff „lebendes Fossil“ für den Quastenflosser problematisch. Auch wenn einige Arten, im Vergleich mit Fossilien phänotypisch unverändert zu sein scheinen, so kann man doch davon ausgehen, dass nicht notwendigerweise auch die molekulare Evolution verlangsamt ist.

Es stellte sich heraus, dass die molekulare Evolution des Quastenflossers tatsächlich nicht stehen geblieben ist. Die Analyse des Genoms zeigte allerdings, dass die molekulare

Uhr im Genom des Quastenflossers im Durchschnitt langsamer tickt als die der meisten anderen Arten von Wirbeltieren. Warum dies so ist, bleibt noch unklar, hat aber möglicherweise mit der langsamen Stoffwechselrate des Quastenflossers zu tun. Auch wenn die Mutationsrate langsamer ist, findet Evolution dennoch statt, wie der Vergleich zwischen Individuen verschiedener Populationen zeigte [5]. Die Analyse molekularer Marker (mitochondriale D-Loop-Sequenzen, Mikrosatelliten) ergab, dass sich vor den Küsten Süd- und Ostafrikas und auf den Komoren genetisch differenzierte Populationen etabliert haben, die unterschiedliche Lebensräume besiedeln.

Hier steht eine Anzeige.





◀ **Abb. 3:** Episoden positiver Selektion in der Phylogenie von CPS1, dem Eingangsenzym des Harnstoffwechsels. Die Längen der Äste entsprechen der erwarteten Anzahl von Substitutionen pro Nukleotid. Rot: positive Selektion ($\omega > 1$); blau: negative oder purifizierende Selektion ($\omega < 1$); grau: neutrale Evolution ($\omega = 1$). Breite Äste repräsentieren statistisch signifikante Vorhersagen für Episoden positiver Selektion. Das Verhältnis der Farben gibt den Anteil der Sequenz wieder, der dem jeweiligen Selektionstyp folgt.

Springende Gene

Transposons können in erheblichem Maße zur Evolution von Genomen beitragen, indem sie als „Blaupausen“ für neue regulatorische Elemente und Exons genutzt werden können und Substrate für genomische Rearrangements/Veränderungen darstellen. Das Genom des Quastenflossers enthält relativ viele Transposons – mehr als ein Viertel seines Genoms besteht aus solchen Elementen. Dabei fällt auf, dass es mehr verschiedene Transposon-Superfamilien als bei den Tetrapoden gibt und viele davon noch aktiv sind. Die Evolutionsraten der Transposons in *Latimeria* unterscheiden sich nicht von denen anderer Fische oder Tetrapoden. Im Gegensatz zur langsamen Evolution Protein-codierender Sequenzen des Quastenflossers ist also dieser Aspekt seines Genoms vergleichbar mit dem anderer Wirbeltiere.

Analyse von Genen und deren Regulation, die für die Adaptation an das Landleben von Bedeutung waren

Harnstoffzyklus. Eine der Herausforderungen, die sich mit dem Verlassen des aquatischen Lebensraums für die Vorfahren der Landwirbeltiere stellte, betrifft die Exkretion von Stickstoff. Dieser fällt als Stoffwechselendprodukt des Protein- und Aminosäure-

stoffwechsels in größeren Mengen als Ammoniumion (NH_4^+) an. Wegen der Toxizität von Ammoniak muss eine effektive Ausscheidung gewährleistet sein. Aufgrund seiner guten Löslichkeit in Wasser nutzen aquatische Organismen diesen direkten Weg für eine energetisch günstige Stickstoffexkretion (Ammoniotelie). Die landlebenden Amphibien und Säuger metabolisieren NH_4^+ zu Harnstoff, der selbst in hoher Konzentration nicht toxisch ist. Die Bildung erfolgt über den hepatischen Harnstoffzyklus. Der Sequenzvergleich aller an der Harnstoffproduktion beteiligten Enzyme des Quastenflossers mit Fischen und Tetrapoden ergab nun interessanterweise, dass das Eingangsenzym des Zyklus, Carbamoylphosphatsynthase 1 (CPS1), welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Harnstoffsynthese katalysiert, in dem Ast des Stammbaums, der zu den Tetrapoden führt, unter starkem positiven Selektionsdruck stand, also auffallend schnell evolvierte (**Abb. 3**). Im Vergleich dazu zeigt Arginase 2, das Enzym, welches für die Bildung des extrahepatischen Harnstoffs zuständig ist, wie auch alle anderen Enzyme des Harnstoffzyklus, keine Anzeichen positiver Selektion. Dies zeigt eine adaptive Evolution für das Schlüsselenzym des Harnstoffzyklus beim Übergang zum Landleben. Bezeichnend ist, dass drei

der fünf Aminosäuren, in denen sich CPS1 des Quastenflossers von denen der Tetrapoden unterscheidet, in wichtigen funktionellen Domänen des Proteins liegen, nämlich in der ATP-A-, der ATP-B-Domäne sowie der Untereinheiten-Interaktionsdomäne. Die vierte Aminosäure ist an einer Position, die bei Patienten mit einer Mutation ein Protein mit eingeschränkter Enzymaktivität produziert.

Geruchswahrnehmung. Der terrestrische Lebensraum bietet gegenüber dem aquatischen weiter reichende Möglichkeiten zur Wahrnehmung von Gerüchen. Die Analyse des Quastenflosser-Genoms ergab, dass es an der Basis der Tetrapodenevolution nicht nur zu einer Vermehrung der codierenden Sequenzen für olfaktorische Rezeptoren, sondern auch einer Zunahme der regulatorischen Elemente kam. Dies spiegelt offensichtlich die Notwendigkeit wider, ein noch besser reguliertes, größeres und diverseres Repertoire an Rezeptoren für die Erkennung des vielfältigeren Spektrums an flüchtigen chemischen Substanzen in der Luft zu entwickeln.

Gliedmaßenentwicklung. Die bereits auf kurzen fleischigen Stümpfen sitzenden Flossen von *Latimeria* zeigen offensichtliche Ähnlichkeiten mit den Extremitäten der Landwirbeltiere. Während elf Gene, die bei Fischen

an der Ausbildung der Flossen beteiligt sind, beim Übergang zur terrestrischen Lokomotion verloren gingen, entstanden innerhalb der Tetrapoden hochkonservierte, neue regulatorische Elemente für Gene, die nun die Gliedmaßen ausbilden. Für deren Entwicklung während der Embryogenese spielen verschiedene *Hox*-Gene eine entscheidende Rolle. Im Genom von *Latimeria*, genauer im *Hox-D*-Gencluster, fanden sich regulatorische Sequenzen, die später bei den Landwirbeltieren für die Ausbildung der Extremitäten eine veränderte Funktion bekamen. Man kann dies als Präadaption für den Landgang interpretieren.

Zukünftige Forschung an und mit dem Quastenflosser-Genom

Obwohl Lungenfische näher mit den Tetrapoden verwandt sind, wird das Quastenflosser-Genom weiterhin von höchstem Interesse für die molekulare Evolutionsbiologie und vergleichende Genomik sein. Wegen seiner Größe wird es wohl auf absehbare Zeit weiterhin schwierig bleiben, auf genomweiter Ebene nicht Proteincodierende Teile des Lungenfisch-Genoms zu bestimmen. Gene des Quastenflosser-Genoms werden bereits jetzt für viele phylogenetische Untersuchungen als Außengruppe verwendet und bieten somit die Möglichkeit, quasi eine genomische Zeitreise zu unternehmen. So kann man ausschlaggebende evolutionäre Ereignisse erkennen, welche die Evolution der Tetrapoden vor Hunderten von Millionen Jahren ermöglichten. ■

Literatur

- [1] Smith JLB (1939) A living fish of mesozoic type. *Nature* 143:455–456
- [2] Amemiya CT, Alföldi J, Lee AP et al. (2013) The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. *Nature* 496:311–316
- [3] Meyer A, Wilson AC (1990) Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish. *J Mol Evol* 31:359–364
- [4] Brinkmann H, Venkatesh B, Brenner S et al. (2004) Nuclear protein-coding genes support lungfish and not the coelacanth as the closest living relatives of land vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4900–4905
- [5] Lampert KP, Fricke H, Hissmann K et al. (2012) Population divergence in East African coelacanths. *Curr Biol* 22:R439–440

Korrespondenzadressen:

Prof. Dr. Dr. Manfred Scharl
Physiologische Chemie
Universität Würzburg
Biozentrum, Am Hubland
D-97074 Würzburg
Tel.: 0931-31-84148
Fax: 0931-31-84150
phch1@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Prof. Dr. Axel Meyer
Lehrstuhl für Zoologie and Evolutionsbiologie
Fachbereich Biologie
Universität Konstanz
Universitätsstraße 10
D-78457 Konstanz
Tel.: 07531-883069
Fax: 07531-883018
axel.meyer@uni-konstanz.de

AUTOREN



Manfred Scharl

Jahrgang 1953. 1973–1977 Biologie- und Chemiestudium an der Universität Gießen. 1980 Promotion in Genetik bei Prof. Dr. F. Anders. 1980–1984 Postdoc in Gießen und am National Institutes of Health in Bethesda, MD, USA. 1985–1991 Nachwuchsgruppenleiter am Genzentrum des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried. Seit 1991 Ordinarius für Physiologische Chemie am Biozentrum der Universität Würzburg.



Axel Meyer

Jahrgang 1960. 1979–1982 Biologiestudium an den Universitäten Marburg, Kiel und Miami. 1985 Masters Degree in Zoology, University of California in Berkeley. 1986–1987 Studium an der Harvard University. 1988 Promotion an der University of California in Berkeley. 1988–1990 Alfred P. Sloan Postdoc bei Prof. A. C. Wilson, Fachbereich Biochemie in Berkeley. 1990–1997 Assistent und Associate Professor im Department of Ecology and Evolution an der State University of New York, in Stony Brook. Seit 1997 Professor für Zoologie und Evolutionsbiologie an der Universität Konstanz.