

Arch. Mikrobiol. 78, 180—188 (1971)

© by Springer-Verlag 1971

MPN
529

Analysis of the Cell Wall from the Gametes of
Chlamydomonas reinhardtii

Autolyse der Zellwand bei den Gameten
von *Chlamydomonas reinhardtii*

HEDWIG CLAES

Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Melchers, Tübingen

Eingegangen am 23. März 1971

Autolysis of the Cell Wall from the Gametes of *Chlamydomonas reinhardtii*

Summary. As in fertilization of higher organisms a lytic factor is involved in the mating reaction of the heterothallic isogamous green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Lytic activity was found in the medium after copulation of $\oplus$ and $\ominus$ gametes, after isoagglutination of $\oplus$ gametes with isolated $\ominus$ flagella, and of $\ominus$ gametes with isolated $\oplus$ flagella. A lytic factor could also be extracted from vegetative and generative cells of *C. reinhardtii*. Partial lysis of cell walls from vegetative or generative cells accompanied by the release of protoplasts, and complete lysis of the walls from zoosporangia followed by the release of zoospores, were observed in the presence of the autolysin secreted by gametes under the above mentioned conditions or extracted from vegetative and generative cells.

Zusammenfassung. An der Gametenverschmelzung bei der heterothallischen, isogamen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist, wie an der Befruchtung bei höheren Organismen, ein lytischer Faktor beteiligt. Während des Kontaktes von $\oplus$ und $\ominus$ Gameten oder während einer Isoagglutination von Gameten des einen Paarungstyps mit den isolierten Geißeln vom entgegengesetzten Paarungstyp wurde ein hitzelabiler, lytischer Faktor ins Nährmedium abgegeben. Auch Extrakte aus vegetativen und generativen Zellen von *C. reinhardtii* enthielten lytische Aktivität. Unter der Einwirkung des extrahierten oder des sekretierten Autolysins fand eine partielle Lyse der Zellwände von Gameten und Zoosporen statt, die mit der Freisetzung von Protoplasten verbunden war. Die Präparate mit lytischer Aktivität lösten außerdem die Wände der Zoosporangien von *C. reinhardtii* vollständig auf und setzten dabei Zoosporen frei.

Ein Beispiel für die Wechselwirkung zwischen Zellen ist die auf vielfältige Art erfolgende Fusion der Gameten von Grünalgen. Der Zellkontakt, der die Gametenverschmelzung einleitet, erfolgt bei *Chlamydomonas eugametos* und *C. moewussii* in 2 Schritten (Wiese u. Jones, 1963; Wiese u. Metz, 1969). An den Geißeloberflächen lokalisierte, spezifische Glykoproteide führen zunächst nach Art einer Antigen-Antikörper-Reaktion zu einer Agglutination der generativen Zellen im Bereich ihrer Geißelspitzen. Auf das „Verkleben“ der Geißeln folgen weitere, biochemisch noch wenig bekannte Wechselwirkungen zwischen den Zell-

oberflächen im Bereich der Austrittsstellen der Geißeln, bis die Zellen schließlich verschmelzen.

Das Schicksal der Zellwände während der Gametenfusion ist bei den meist untersuchten Arten von *Chlamydomonas* nicht einheitlich. Eine zumindest lokale Lyse der Gametenwände ist notwendig, damit die Protoplastenmembranen in Kontakt treten und fusionieren können. Die Gameten von *C. eugametos* und *C. moewussii* behalten dabei zunächst ihre Zellwände. Anders ist die Situation bei *C. reinhardtii*, wo die Gameten bei der Paarungstypen ihre Wände unmittelbar nach erfolgtem Zellkontakt abstreifen. Die Fusion der Gameten findet erst im wandfreien Stadium statt (Friedmann et al., 1968), und die junge Zygote hat folglich zunächst keine Zellwand.

Eine Lyse der Zellwände, die bei *C. reinhardtii* zum sofortigen Verlust der Wände führt, ist also eine der ersten Reaktionen, die der für Gameten spezifische Zellkontakt auslöst. Die folgende Mitteilung bringt erste Daten über einen lytischen Faktor, der die Zellwände von *C. reinhardtii* angreift und bei den zur Zygote führenden Reaktionen eine Rolle spielt.

Material und Methodik

Für die Untersuchungen wurden ein $\oplus$ und ein $\ominus$ Stamm von *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard verwendet: Nr. 89 $\oplus$ und Nr. 90 $\ominus$ aus der Algensammlung der Universität Indiana, USA. Die Algen wurden bei $+33^{\circ}\text{C}$ unter Belüftung mit CO_2 -angereicherter Luft in dem konzentrierten Medium nach Sueoka (1960) und mit den Spurenelementen nach Jones (1962) kultiviert. Die Synchronisation der Kulturen erfolgte durch einen Wechsel von 12 Std Licht-12 Std Dunkel. Am Anfang der Lichtperiode wurden die Suspensionen täglich auf 10^6 Zellen/ml verdünnt. Um Gameten zu erhalten, wurde die Zelldichte auf $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml gebracht. Nach 8 Std Belichtung wurden die Zellen dann in stickstofffreies Nährmedium übertragen und bei $+24^{\circ}\text{C}$ kontinuierlich belichtet. Unter diesen Bedingungen hatten sich nach etwa 15 Std im allgemeinen 80–90% der Zellen zu Gameten differenziert.

Zellextrakte wurden durch Behandlung gekühlter Suspensionen (66 Vol.-% Zellen in 10^{-2} m Phosphatpuffer pH 7,1) mit Ultraschall hergestellt. Nach Zentrifugation der beschallten Suspensionen bei 18000 g befand sich lytische Aktivität im Überstand.

Die Isolierung von Gametengeißeln erfolgte bei dem $\ominus$ Paarungstyp durch Ansäuern der Gametensuspensionen mit Essigsäure auf pH 4,5. Nach 2 min wurde mit NaOH neutralisiert und die aus abgeworfenen Geißeln und Zellen bestehenden Suspensionen sofort auf 0°C abgekühlt. Die weitere Trennung von Geißeln und Gameten erfolgte durch Zentrifugation. Da die Geißeln des $\oplus$ Paarungstyps beim Abwerfen ihre Fähigkeit verlieren, $\ominus$ Gameten zu agglutinieren, wurden die $\oplus$ Gameten vor Isolierung der Geißeln 3 Std mit 3% Glutardialdehyd fixiert. Nach Auswaschen des Fixierungsmittels wurden die Zellen durch eine Frenchpresse gegeben. Dabei brachen die fixierten Geißeln ab. Durch Zentrifugation konnte eine Suspension gewonnen werden, die Geißeln, Geißelbruchstücke und nur wenig Zellfragmente enthielt.

Für den Test auf die Freisetzung von Zoosporen aus Zoosporangien wurden Sporangien verwendet, deren eigenes Autolysin nach 5 min Erwärmung auf $+55^{\circ}\text{C}$ inaktiviert war.

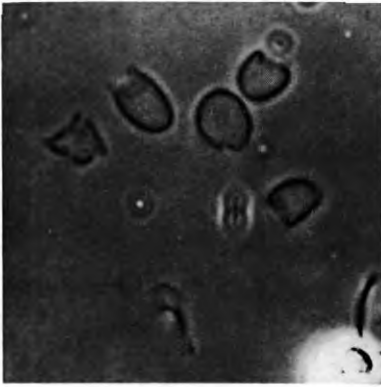


Abb. 1

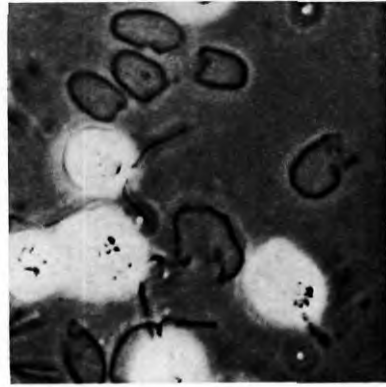


Abb. 2

Abb. 1. Partiiell lysierte, abgestreifte Zellwände in einer Suspension aus $\oplus$ und $\ominus$ Gameten von *Chlamydomonas reinhardtii* (fixiert mit 0,5% OsO₄, Phasenkontr., Vergr. 1020 $\times$)

Abb. 2. Partiiell lysierte, abgestreifte Zellwände von $\ominus$ Gameten in einem Zell-extrakt aus $\ominus$ Gameten von *Chlamydomonas reinhardtii* (fixiert mit KJ · J₂, Phasenkontr., Vergr. 1070 $\times$)

Ergebnisse

Abb. 1 zeigt eine Suspension agglutinierender $\oplus$ und $\ominus$ Gameten von *C. reinhardtii* und die von den Gameten abgestreiften Zellhüllen. Entleerte Zellwände traten bereits wenige Sekunden nach dem Mischen konzentrierter Suspensionen von $\oplus$ und $\ominus$ Gameten auf. Die ursprünglich ovalen Zellen rundeten sich nach dem Verlust ihrer Zellwände ab. Eine vollständige Lyse der Gametenwände fand nicht statt. Die lichtmikroskopischen Beobachtungen zeigten, daß sich die Zellwände nur im Bereich der Austrittsstellen der Geißeln auflösten. Die abgestreiften Wandreste waren jedoch mechanisch sehr wenig widerstandsfähig, so daß auch eine Veränderung ihrer Feinstruktur anzunehmen ist.

Agglutination und Zygotenbildung ließen sich bei *C. reinhardtii* mit Trypsin hemmen. Um festzustellen, ob die Lyse der Gametenwände von den für Gameten spezifischen Zellkontakten abhängt, wurden $\oplus$ und $\ominus$ Gameten getrennt 15 min mit Trypsin inkubiert und danach gemischt. Nach 60 min erfolgte eine Prüfung der Suspensionen auf Agglutination, Zygotenbildung und freie Zellwände. Tab. 1 zeigt, daß freie Zellwände nur dann in den Suspensionen auftraten, wenn die Gameten agglutinierten und Zygoten bildeten. 0,001% Trypsin ließen noch eine Agglutination, die Bildung von Zygoten und das Freiwerden von Zellwänden zu. 0,002% Trypsin hemmten jedoch Agglutination und Zygotenbildung.

Tabelle 1. Die Abhängigkeit der Zellwandlyse bei *Chlamydomonas reinhardtii* vom Kontakt zwischen $\oplus$ und $\ominus$ Gameten

% Trypsin · 10 ³	Agglutina- tion	Zygotenbildung ^a			freie Zellwände
		E	Z	%	
0,00	+	316	302	66	+
0,06	+	337	246	59	+
0,12	+	318	215	57	+
0,25	+	163	115	59	+
0,50	+	290	167	54	+
1,00	+	474	44	16	+
2,00	0	300	0	0	0
4,00	0	300	0	0	0

^a E = Zahl der Einzelzellen, Z = Zahl der Zygoten, $\frac{2Z \cdot 100}{E + 2Z} = \% \text{ Zygotenbildung}$.

Freie Zellwände traten dann nicht mehr in den Suspensionen auf. Die partielle Lyse der Gametenwände in Suspensionen aus $\oplus$ und $\ominus$ Gameten ist daher offensichtlich eine Folge der für die Gameten spezifischen Zellkontakte.

Eine Suche nach Enzymen, welche die Zellwände der Gameten von *C. reinhardtii* angreifen, ergab zunächst, daß sowohl Extrakte aus Gameten wie aus vegetativen Zellen beider Paarungstypen lytische Aktivität enthielten und durch 10 min Erwärmung auf + 60°C inaktiviert wurden. Das Vorkommen von Autolysin bei *C. reinhardtii* ist also weder an einen bestimmten Differenzierungszustand noch an einen bestimmten Paarungstyp der Zellen gebunden. Unabhängig vom Zelltyp war auch die Empfindlichkeit der Zellwände gegenüber dem extrahierten Autolysin. Die Übersicht in Tab. 2 (Sp. 2 und 3) zeigt, daß bei allen Zelltypen unter der Einwirkung eines Extrakts aus jedem beliebigen anderen oder dem gleichen Zelltyp eine Lyse der Zellwände eintrat. Die Wände lösten sich dabei nur partiell auf und wurden von den Zellen unter Freisetzung von Protoplasten abgestreift. Abb. 2 läßt die entleerten Zellwände von $\ominus$ Gameten nach Inkubation in einem Extrakt aus $\ominus$ Gameten erkennen. Die Zellwände lösten sich unter der Einwirkung des extrahierten Autolysins meistens am Geißelende auf und unterschieden sich dann im mikroskopischen Bild nicht von den nach Zellkontakt abgestreiften Zellwänden (s. Abb. 1).

Während sich die Wände der Einzelzellen von *C. reinhardtii* unter der Einwirkung lytisch aktiver Extrakte immer nur partiell auflösten, zerfielen die Wände der Zoosporangien unter gleichen Bedingungen vollständig in submikroskopische Untereinheiten (s. Tab. 2). Die Extrakte

Tabelle 2. *Das Vorkommen lytischer Aktivität bei Chlamydomonas reinhardtii*

	lytische Aktivität					
	in Extrakten aus		im Medium nach			
	Zoosporen ($\oplus$ oder $\ominus$)	Gameten ($\oplus$ oder $\ominus$)	Agglutina- tion von $\oplus$ und $\ominus$ Gameten	Agglutina- tion von $\oplus$ Game- ten mit $\ominus$ Geißeln	Agglutina- tion von $\ominus$ Game- ten mit $\oplus$ Geißeln	Zoosporen- frei- setzung
partielle Lyse der Wände vegetativer Zellen ($\oplus$ oder $\ominus$)	+	+	+	+	+	0
partielle Lyse der Wände von Gameten ($\oplus$ oder $\ominus$)	+	+	+	+	+	0
vollständige Lyse von Zoosporangien- wänden	+	+	+	+	+	+

In den Spalten 2—7 bedeuten + und 0, ob die Wände der in Spalte 1 angegebenen Zellen verschiedener Differenzierungsstadien lysiert bzw. nicht lysiert werden.

Tabelle 3. *Die lytische Aktivität des Nährmediums nach Agglutination von $\oplus$ und $\ominus$ Gameten von Chlamydomonas reinhardtii*

Verdünnung des lytisch aktiven Überstands (s. Text)	partielle Lyse der Wände von $\ominus$ Zoosporen	vollständige Lyse der Wände von Zoosporangien
1/1	+	+
1/2	+	+
1/4	+	+
1/8	+	+
1/16	0	+
1/32	0	+
1/64	0	+
1/128	0	0

enthielten offenbar auch den von Schlösser (1966) nachgewiesenen lytischen Faktor, der bei *C. reinhardtii* die Freisetzung der Zoosporen durch eine Auflösung der Sporangienwand bewirkt und dabei ins Medium abgegeben wird.

Wie bereits erwähnt, ist die Bildung von Autolysin bei *C. reinhardtii* nicht an die Differenzierung zu Gameten gebunden. Spezifisch für Gameten ist jedoch die mit einer Abgabe ins Medium verbundene Aktivierung eines hitzelablen lytischen Faktors. In Lösungen, die $\oplus$ und $\ominus$ Gameten in hinreichender Zelldichte enthielten, trat sehr schnell lytische Aktivität auf. Bei Suspensionen von nur einem Paarungstyp oder bei einem Gemisch von entgeißelten $\oplus$ und $\ominus$ Gameten blieb das Nährmedium inaktiv. Das von den kopulierenden Gameten ins Medium abgegebene Autolysin bewirkte wie das extrahierte Autolysin einen partiellen Abbau und ein Abstreifen der Zellwände bei den Gameten und Zoosporen beider Paarungstypen und eine Auflösung der Wände von Zoosporangien (Tab. 2, Sp. 4). Tab. 3 gibt einen Anhaltspunkt für die lytische Aktivität einer Lösung nach 30 min Inkubation mit $7 \cdot 10^8$ $\ominus$ Gameten/ml und $7 \cdot 10^8$ $\oplus$ Gameten/ml bei Raumtemperatur. Die zell- und wandfrei zentrifugierte Lösung wurde dann in verschiedenen Verdünnungen 60 min bei $+30^\circ\text{C}$ mit Zoosporen oder Zoosporangien inkubiert. Es folgte eine Prüfung der Suspensionen auf entleerte Zellwände bzw. freigesetzte Zoosporen, deren Ergebnis in Tab. 3 zusammengestellt ist. In der Tabelle fällt auf, daß der durch kopulierende Gameten aktivierte Überstand bei der vollständigen Lyse der Zoosporangienwände wirksamer war als bei der partiellen Lyse der Einzelzellwände. Ob der Unterschied auf dem Vorhandensein von 2 verschiedenen autolytischen Systemen oder, bei dem gleichen Autolysin, auf Differenzen in der Struktur der Wände von Sporangien und Einzelzellen beruht, ist an Hand dieser ersten Befunde nicht zu entscheiden.

Weitere Untersuchungen zeigten, daß die Aktivierung eines lytischen Faktors nicht nur beim Kontakt zwischen $\oplus$ und $\ominus$ Gameten erfolgt. Auch während der Isoagglutination von $\oplus$ Gameten durch isolierte Geißeln von $\ominus$ Gameten und von $\ominus$ Gameten durch isolierte Geißeln von $\oplus$ Gameten verloren die Gameten ihre Zellwände und nahmen die für Protoplasten typische runde Form an. Das Nährmedium enthielt auch nach Isoagglutination von Gameten lytische Aktivität (Tab. 2, Sp. 5 und 6). So war z. B. bei einer Konzentration von $8 \cdot 10^7$ $\oplus$ Gameten/ml nach 60 min Isoagglutination mit isolierten $\ominus$ Geißeln lytische Aktivität in der Nährlösung nachzuweisen. Bei Gameten oder Geißeln allein blieb das Medium inaktiv. Für den Nachweis lytischer Aktivität mußten die zell- und geißelfrei zentrifugierten Lösungen durch Ultrafiltration etwa 5fach konzentriert werden. Zoosporen oder Gameten wurden dann 60 min bei $+30^\circ\text{C}$ in den Konzentraten inkubiert und anschließend auf runde Zellen, d. h. Protoplasten, geprüft. Tab. 4 zeigt, daß nach Inkubation von Zoosporen oder Gameten im konzentrierten Überstand von isoagglutinierten $\oplus$ Gameten mehr als 90% runde Zellen auftraten. Im konzentrierten Überstand von Geißeln oder Gameten allein und in Phosphat-

Tabelle 4. Die lytische Aktivität des Nährmediums nach Agglutination von $\oplus$ Gameten mit isolierten Geißeln von $\ominus$ Gameten bei Chlamydomonas reinhardtii

Inkubation in	$\ominus$ Zoosporen		$\oplus$ Zoosporen		$\ominus$ Gameten		$\oplus$ Gameten		Lyse der Wände von Zoosporan- gien
	rund/oval	% rund	rund/oval	% rund	rund/oval	% rund	rund/oval	% rund	
Überstand von $\oplus$ Gameten	2/300	1	7/400	2	18/306	6	31/563	5	0
Überstand von $\ominus$ Geißeln	2/330	1	1/400	0	7/614	1	— ^a	— ^a	0
Überstand von iso- agglutinierten $\oplus$ Gameten	360/17	95	300/5	98	562/37	94	300/0	100	+
Phosphatpuffer	0/300	0	6/340	2	9/300	3	22/400	5	0
	1/400	0	1/300	0	11/1100	1	— ^a	— ^a	
	2/300	1	3/300	1	16/301	5	14/365	4	

In Spalte 10 bedeuten + oder 0 Lyse bzw. keine Lyse der Sporangienwände.

^a Die Kombination von $\oplus$ Gameten und Überstand von $\ominus$ Geißeln war nicht auszuwerten, da der Geißelüberstand vermutlich von den Geißeln frei gewordenes $\ominus$ Agglutinin enthielt und darum zu einer schwachen Isoagglutination der $\oplus$ Gameten führte.

puffer suspendierte Zellen verloren ihre Zellwände nicht. Die Zahl der runden Zellen betrug hier nur wenige Prozent. Nur der Überstand der isoagglutinierten Gameten, nicht jedoch der Überstand von Geißeln oder Gameten allein, bewirkte außerdem eine vollständige Lyse von Zoosporangienwänden. Das gleiche Ergebnis zeigte sich nach Isoagglutination von $\ominus$ Gameten mit $\oplus$ Geißeln, die vor ihrer Isolierung mit Glutaraldehyd fixiert worden waren.

Diskussion

Die Untersuchungen zeigen, daß ein lytischer Faktor aus vegetativen und generativen Zellen von *C. reinhardtii* zu extrahieren ist. Lytische Aktivität läßt sich auch nach Zellkontakt zwischen $\oplus$ und $\ominus$ Gameten oder nach der Isoagglutination von Gameten mit den Geißeln des entgegengesetzten Paarungstyps im Medium nachweisen. Die Hitzelabilität der lytisch wirkenden Präparate spricht dafür, daß sowohl der aus den Zellen extrahierte wie der unter den beschriebenen Bedingungen ins Medium sekretierte lytische Faktor enzymatischer Natur sind. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob es sich dabei um ein oder mehrere Enzyme handelt. Insbesondere ist die Frage zu klären, ob für die vollständige Lyse der Wände von Zoosporangien ein anderes autolytisches System verantwortlich ist als für die partielle Lyse der Wände von Gameten und Zoosporen. Nach den Beobachtungen von Schlösser (1966) greift der bei der Zoosporenfreisetzung ins Medium abgegebene lytische Faktor die Zellwände von *C. reinhardtii* vor Beginn der Zellteilung nicht an. Die eigenen Untersuchungen führten bisher zu keinem eindeutigen Ergebnis. Ein Effekt auf die Wände von Zoosporen oder Gameten, der mit dem des extrahierten oder dem von Gameten sekretierten Autolysin vergleichbar ist, ließ sich auch mit konzentrierten Präparaten des an der Zoosporenfreisetzung beteiligten Autolysin bisher nicht erreichen.

Auch die Frage, wie es bei den Gameten von *C. reinhardtii* durch Zellkontakt zur Aktivierung von Autolysin kommt, ist noch ungeklärt. Agglutination der Geißeln, Kontakt der Zellwände und, nach Abstreifen der Zellwände, Kontakt der Protoplastenmembranen sind aufeinanderfolgende Reaktionen bei der Gametenfusion. Innerhalb dieser Folge können nur die Agglutination der Geißeln oder der Zellwandkontakt die Aktivierung von Autolysin bewirken. Eine Lyse der Zellwände ermöglicht ja erst den für die Zellverschmelzung notwendigen Kontakt der Protoplastenmembranen. Die Abgabe von Autolysin durch Gameten während einer Isoagglutination mit den Geißeln des entgegengesetzten Paarungstyps, d.h. unter Ausschaltung des Kontakts zwischen $\oplus$ und $\ominus$ Zellwänden, bedeutet jedoch noch nicht, daß die Aktivierung des lytischen Faktors bereits während der Agglutination der Geißeln und nicht

erst während des Zellwandkontakts eintritt. Auch isoagglutinierte Gameten kommen untereinander intensiv mit ihren Zellwänden in Berührung, und dabei könnte Autolysin aktiviert werden. Es ist jedoch nach den beschriebenen Untersuchungen auszuschließen, daß eine Reaktion zwischen Zellwänden von entgegengesetztem Paarungstyp für die Aktivierung des lytischen Faktors notwendig ist.

Für wertvolle Mitarbeit danke ich Fräulein I. Dobrigkeit.

Literatur

- Friedmann, J., Colwin, A. L., Colwin, L. H.: Fine-structural aspects of fertilization in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Cell Sci. **3**, 115—128 (1968).
 Jones, R. F.: Extracellular mucilage of the red alga *Porphyridium cruentum*. J. cell. comp. Physiol. **60**, 61—64 (1962).
 Schlösser, U.: Enzymatisch gesteuerte Freisetzung von Zoosporen bei *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard in Synchronkultur. Arch. Mikrobiol. **54**, 129—159 (1966).
 Sueoka, N.: Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **46**, 83—91 (1960).
 Wiese, L., Jones, R. F.: Studies on gamete copulation in heterothallic *Chlamydomonads*. J. cell. comp. Physiol. **61**, 265—275 (1963).
 — Metz, Ch. B.: On the trypsin sensitivity of gamete contact at fertilization as studied with living gametes in *Chlamydomonas*. Biol. Bull. **136**, 483—493 (1969).

Dr. Hedwig Claes
 Max-Planck-Institut für Biologie
 Abt. Melchers
 BRD-7400 Tübingen, Corrensstr. 41
 Deutschland