Evolution der Photorespiration

Dissertation

zur
Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Ramona Kern, geb. am 26.11.1984 in Neubrandenburg

Rostock, September 2012

Gutachter:

1. Gutachter:

   Apl. Prof. Dr. Martin Hagemann
   Abteilung Pflanzenphysiologie
   Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock

2. Gutachter:

   Prof. Dr. Hubert Bahl
   Abteilung Mikrobiologie
   Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock

Datum der Einreichung: 21. September 2012

Datum der Verteidigung: 07. Dezember 2012

urn:nbn:de:gbv:28-diss2013-0041-8

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Ramona Kern, Hermann Bauwe, and Martin Hagemann. Evolution of enzymes involved in the photorespiratory 2-phosphoglycolate cycle from cyanobacteria via algae toward plants. *Photosynthesis Research* 109 (1-3):103-114, 2011.

Claudia Hackenberg, **Ramona Kern**, Jan Huege, Lucas J. Stal, Yoshinori Tsuji, Joachim Kopka, Yoshihiro Shiraiwa, Hermann Bauwe, and Martin Hagemann. Cyanobacterial lactate oxidases serve as essential partners in N_2 fixation and evolved into photorespiratory glycolate oxidases in plants. *Plant Cell* 23 (8):2978-2990, 2011.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis iii
Abbildungsverzeichnis v
Tabellenverzeichnis vi
Summary vii
Zusammenfassung ix
1. Einleitung 1
1.1 Die Evolution der oxygenen Photosynthese ist gekoppelt an die Entstehung der Cyanobakterien 1
1.2 Der Vorgänger der Chloroplasten phototropher Eukaryoten war ein stickstoff-fixierender β-Cyanobakterium-ähnlicher Endosymbiont 4
1.3 Während der primären Endosymbiose wurden zahlreiche cyanobakterielle Gene in das Genom des phototrophen Eukaryoten übertragen 6
1.4 Steigende O_2/CO_2-Raten der Atmosphäre führen zu vermehrten Bildung von 2-Phosphoglykolat durch die Oxygenase-Aktivität der Rubisco 9
1.5 Der cyanobakterielle 2PG-Metabolismus variiert in Biochemie und Aufbau von der pflanzlichen Photorespiration 13
2. Zielstellung 16
3. Material und Methoden 17
3.1 Material 17
3.1.1 Organismen und verwendete DNA 17
3.1.2 Chemikalien und Enzyme 18
3.1.3 Synthetische Oligonukleotide 18
3.1.4 Vektorsysteme und Plasmide 19
3.1.5 Nährmedien 21
3.2 Methoden 21
3.2.1 Kultivierung und Anzucht 21
3.2.2 Molekularbiologie 22
3.2.3 Protein- und Enzymanalytik 27
3.2.4 Bioinformatik 30
4. Ergebnisse 33
4.1 Phylogenie der Chloroplasten phototropher Eukaryoten 33
4.2 Phosphoglykolat-Phosphatase 34
4.3 Glykolat-Oxidase 35
4.3.1 Phylogenie der GOX 35
4.3.2 Biochemie der GOX 36

4.4 Glycin-Decarboxylase 40
4.5 Serin:Hydroxymethyltransferase 43
4.6 Serin:Glyoxylat-Aminotransferase 44
4.7 Hydroxypyruvat-Reduktase 47
4.7.1 Phylogenie der HPR 47
4.7.2 Biochemie der HPR 49
4.8 Glycerat-Kinase 51
5. Diskussion 53
5.1 Der photorespiratorische 2PG-Metabolismus ist in der heutigen, sauerstoff-reichen Atmosphäre für Cyanobakterien und Algen essentiell 53
5.2 Photorespiratorische Enzyme in Pflanzen stammen von α-proteobakteriellen und cyanobakteriellen Proteinen ab 54
5.3 Eine cyanobakterielle Laktat-Oxidase diente als Vorläufer für die pflanzlichen Glykolat-Oxidasen 59
5.4 Die photorespiratorische Hydroxypyruvat-Reduktase in Pflanzen hat keinen cyanobakteriellen Ursprung 63
5.5 Die Proteine eines rudimentären Glykolat-Metabolismus entstanden vor der oxygenen Photosynthese 65
5.6 Die Entschlüsselung neuer Algengenome deutet auf Variabilität im 2PG-Metabolismus 67
6. Ausblick 73
7. Literatur 75
8. Anhang I
8.1 *Accession*-Nummern I
8.2 Selbstständigkeitserklärung III
8.3 Publikationen IV
8.4 Tagungsbeiträge V

Abkürzungsverzeichnis

2PG	2-Phosphoglykolat
3PGA	3-Phosphoglycerat
3PGADH	3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase
A. dest.	destilliertes Wasser
AmpR	Ampicillin-Resitenzgen
At	*Arabidopsis thaliana*
ATP	Adenosin-Triphosphat
AXI	Ampicilin + X-Gal + IPTG
bla	kodierendes Gen für β-Lactamase
Blast	engl. *Basic Local Alignment Search Tool*
*Blast*P	Protein-BLAST
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	Circa
CCM	*Carbon Concentration mechanisms*
Chl	Chlorophyll
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGT	Endosymbiontischer Gentransfer
et al.	*et alteri*, und andere
GCL	Glyoxylat-Carboligase
GDC	Glycin-Decarboxylase
GGT	Glyoxylat:Glutamat-Aminotransferase
GlcDH	Glycolat-Dehydrogenase
GLYK	pflanzliche Glycerat-3-Kinase
GK	Bakterielle Glycerat-2-Kinase
GOX	Glykolat-Oxidase
His Tag	Histidin-Markierung
HPR	Hydroxypyruvat-Reduktase
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
LB	Luria Bertani (Medium)
LOX	Laktat-Oxidase
Ni-NTA	Nickel-Trinitiloessigsäure
NAD^+	Nicotinamiddinucleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamiddinucleotid, reduziert
NaOH	Natriumhydroxid
No	*Nostoc sp*. PCC 7120
ODC	Oxalat-Decarboxylase
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (Polymerasekettenreaktion)
PGPase	Phosphoglykolatphosphatase
Rubisco	Ribulose-1,5 bisphosphat Carboxylase/Oxygenase

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SGT	Serin:Glyoxylat-Aminotransferase
SHMT	Serin-Hydroxymethyltransferase
sp.	Species
Taq	*Thermus aquaticus*
TE	Tris-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSR	Tartronsäuresemialdehyd-Reduktase
VT	Volumenteile
z. Bsp.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Phylogenie moderner Cyanobakterien. **6**
Abbildung 2. Entstehung der Plastiden durch primäre und sekundäre Endosymbiose. **7**
Abbildung 3. Modell des CCM in Cyanobakterien **10**
Abbildung 4. Photorespiratorischer 2PG-Zyklus. **11**
Abbildung 5. Maximum-Likelihood-Phylogenie basierend auf 16S rRNA-Sequenzen. **34**
Abbildung 6. Maximum-Likelihood-Baum der *Arabidopsis* Glykolat-Oxidase (At-GOX2) basierend auf 23 Sequenzen **36**
Abbildung 7. *Alignment* der am aktiven Zentrum der LOX und GOX beteiligten Aminosäuren **38**
Abbildung 8. Vergleich der Enzymaktivitäten der L-Laktat- und Glykolat-Oxidasen **39**
Abbildung 9. Maximum-Likelihood-Phylogenien der GDC P-, T-, und L-Proteine **42**
Abbildung 10. Maximum-Likelihood-Phylogenie basierend auf 31 Sequenzen der Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT1 und SHMT2) **43**
Abbildung 11. Maximum-Likelihood-Baum der Serin:Glyoxylat-Aminotransferase (SGT) **45**
Abbildung 12. Maximum-Likelihood-Baum der *Arabidopsis* Hydroxypyruvat-Reduktase (HPR1).. .....**47**
Abbildung 13. Maximum-Likelihood-Baum der *Arabidopsis* 3-Phosphogycerat-Dehydrogenase (3PGADH). **49**
Abbildung 14. Enzymkinetische Parameter der *Arabidopsis* HPR1 (AtHPR1) und putativen HPR-Proteine aus Synechocystis (Slr2123, Slr1556) und Nostoc (All8087, Alr0058). **50**
Abbildung 15 . Maximum-Likelihood-Phylogenien basierend auf 24 Sequenzen der pflanzlichen Glycerat-3-Kinase (GLYK). **52**
Abbildung 16 Maximum-Likelihood-Phylogenien basierend auf (A) 16S rRNA-Sequenzen aus 30 heterotrophen Prokaryoten, Cyanobakterien und den Chloroplasten phototropher Eukaryoten; (B) 24 Sequenzen der Glycerat-3-Kinase (GLYK); (C) 29 Sequenzen des P-Proteins der Glycin-Decarboxylase (GDC). **55**
Abbildung 17. Vereinfachte zeitliche Einordnung wichtiger Ereignisse, die zu der Entstehung der heutigen Sauerstoff-reichen Atmosphäre beitrugen **66**

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. *E. coli*-Stämme die zur Transformation verwendet wurden. **17**
Tabelle 2. Die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten *E. coli*-Stämme. **18**
Tabelle 3. Sequenzen der verwendeten Primer.. .....**19**
Tabelle 4.Vektorsysteme. **20**
Tabelle 5. In dieser Arbeit hergestellte rekombinante Plasmide. **20**
Tabelle 6. Zusammensetzung der BG11-Mediums. **21**
Tabelle 7. PCR-Programme. **24**
Tabelle 8. Enzymkinetische Parameter der L-Laktat- und Glykolat-Oxidasen aus *Nostoc* (No-LOX), *Chlamydomonas* (Cr-LOX) und *Arabidopsis* (At-GOX2). **37**
Tabelle 9. Enzymaktivitäten der Wildtyp-Proteine No-LOX, Cr-LOX, Cm-GOX und At-GOX2 verglichen mit den Aminosäureaustausch-Varianten der No-LOX. **40**
Tabelle 10. Enzymaktivitäten der *Arabidopsis* HPR1 und *Cyanothece* HPR7822, sowie den 3PGADHs aus *Synechocystis* Sll1908 und *Nostoc* Alr1890 .....**51**
Tabelle 11. *Accession*-Nr. der P-, T-, und L-Proteine des GDCs, der SHMT- und GLYK-Proteine. .....**I**
Tabelle 12. *Accession*-Nr. der 16S rRNA-Gene und der GOX-, SGT- und HPR-Proteine. .....**II**

Summary

The photorespiratory pathway is essential for organisms performing oxygenic photosynthesis in the present day O_2-containing atmosphere. The occurrence of the plant-like 2-phosphoglycolate-cycle in extant cyanobacteria indicated that not only genes of oxygenic photosynthesis but also genes encoding photorespiratory enzymes were endosymbiotically conveyed from ancient cyanobacteria to eukaryotic phototrophs. To analyze the origin of the plant photorespiration, BlastP searches were performed to select photorespiratory proteins in phototrophs using the *Arabidopsis* enzymes as template. Systematic phylogenetic analyses of the identified plant, algal, cyanobacterial and proteobacterial proteins showed that the phylogenetic origin of the plant and algal 2-phosphoglycolate cycle is a mixture of enzymes with cyanobacterial or α-proteobacterial origin. However, the inclusion of the homologous proteins from the Glaucophyte *Cyanophora paradoxa* into the phylogenetic analysis revealed that initially more photorespiratory enzymes were obtained from cyanobacteria during the endosymbiotic event like the serine:glyoxylate aminotransferase, however, these genes were later replaced by the corresponding genes for enzymes from proteobacteria. On the other hand, some proteins which were initially acquired by *Cyanophora* from the cyanobacterial endosymbiont, were subsequently lost, e. g. glycerate kinase.

In case of the hydroxypyruvate reductase, it was unknown which cyanobacterial enzyme catalyzes the hydroxypyruvate reducing step. Among cyanobacteria, phylogenetic studies identified three clusters of putative HPR proteins, which were subsequently biochemical analyzed. The HPR1-like protein of *Cyanothece* showed the closest sequence and biochemical similarity to the plant AtHPR1. Additional HPR-like proteins were found in other cyanobacterial strains. The *Nostoc* protein All8087, which clusters also closely to the plant HPR1, is characterized by a very low K_m value for hydroxypyruvate, whereas the Slr1556 protein from *Synechocystis* had the highest v_{max} with hydroxypyruvate. However, further investigations are needed to confirm the functionality of these enzymes during photorespiration in cyanobacteria.

Although it was shown that the 2-phosphoglycolate metabolism in cyanobacteria and algae is essential despite an active CCM, the organization and biochemistry differs to that of land plants. The most interesting difference was found regarding the glycolate oxidizing step. Whereas in plants this reaction is catalyzed by a glycolate oxidase, cyanobacteria and most green algae prefer a NAD-depending glycolate dehydrogenase. Unexpectedly, BlastP searches with the *Arabidopsis* glycolate oxidase 2 identified several glycolate-oxidase-like

proteins in the genomes of nitrogen-fixing cyanobacteria like *Nostoc* and some algae, like the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Recent database searches showed that also the genome of the red alga *Cyanidioschyzon merolae* encodes for a putative glycolate oxidase, which contains in contrast to the enzymes of *Nostoc* and *Chlamydomonas* an active site similar to that of *Arabidopsis* glycolate oxidase 2. The phylogenetic tree of the plant glycolate oxidase indicated a cyanobacterial origin of these proteins in land plants and algae. Biochemical investigations of selected proteins revealed that the enzymes from *Nostoc* and *Chlamydomonas* are rather lactate oxidases whereas the enzyme of *Cyanidioschyzon* most probably catalyzes the photorespiratory oxidation of glycolate to glyoxylate. In contrast to the established opinion that active glycolate oxidases evolved lately during the land settlement of plants, our results verifying the presence of a glycolate oxidase in all three lines of the Archaeplastida provide evidence that this protein evolved already in the protoalga.

Zusammenfassung

Die Evolution der oxygenen Photosynthese und der damit verbundene Anstieg der O_2-Konzentration in der Atmosphäre wies dem photorespiratorischen Metabolismus in allen phototrophen Organismen eine essentielle Rolle zu. Das Vorkommen eines Pflanzen-ähnlichen 2-Phosphoglykolat-Zyklus in heutigen Cyanobakterien ließ zunächst vermuten, dass ähnlich, wie die Proteine der Photosynthese auch die photorespiratorischen Proteine der Landpflanzen und Algen das Ergebnis des endosymbiontischen Gentransfers ausgehend von der Aufnahme eines cyanobakteriellen Endosymbionten sind. Um diese Annahme zu untersuchen, wurden mittels *Blast*P-Analysen, ausgehend von den photorespiratorischen Proteinen aus *Arabidopsis* ähnliche Proteine aus Landpflanzen, Algen, Cyanobakterien und Proteobakterien in Datenbanken identifiziert. Diese Proteinsequenzen wurden zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume genutzt und zeigten, dass die phylogenetische Herkunft der Proteine des 2-Phosphoglykolat-Zyklus ein Mix aus cyanobakteriellen und α-proteobakteriellen Enzymen ist. Die Einbeziehung der homologen Proteine aus der Glaucophyta *Cyanophora paradoxa* zeigte außerdem, dass anfangs mehr photorespiratorische Proteine während der Endosymbiose mit einem Cyanobakterium übertragen wurden (z. Bsp. Serin:Glyoxylat-Aminotransferase). Einige dieser Proteine wurden jedoch im weiteren Verlauf der Evolution in den Genomen der Roten- und Grünen-Plastiden-Linie durch proteobakterielle Homologe ersetzt. Im Gegensatz dazu, gingen andere cyanobakterielle Proteine, die aufgrund des endosymbiontischen Gentransfers zunächst Bestandteil des 2-Phosphoglykolat-Zyklus von Protoalgen wurden, bei *Cyanophora* wieder verloren (z. Bsp. Glycerat-3-Kinase).

In Cyanobakterien konnte bis jetzt noch keine photorespiratorische HPR funktionell charakterisiert werden. *Blast*P-Analysen ausgehend von der *Arabidopsis* HPR1 identifizierten einige cyanobakterielle Kandidaten-Proteine. Davon zeigte das HPR-ähnliche Protein aus *Cyanothece* sowohl die größte Sequenzähnlichkeit zur *Arabidopsis* HPR1, als auch ähnliche biochemische Eigenschaften. Biochemische Untersuchungen der heterolog exprimierten HPR1-ähnlichen Proteine aus *Synechocystis* und *Nostoc* Slr2123 und All8087 zeigten eine deutliche, aber verglichen mit der *Arabidopsis* HPR1 geringere Aktivität mit Hydroxypyruvat. Beide Proteine katalysieren neben der Umsetzung von Hydroxypyruvat auch die Reduktion von Glyoxylat. Bei einer ähnlich hohen maximalen Reaktionsgeschwindigkeit für die Reduktion dieser beiden Substrate, deuten aber die K_m-Werte auf die Bevorzugung von Hydroxypyruvat gegenüber Glyoxylat, so dass diese Proteine weiterhin als HPR1-Kandidaten in Cyanobakterien angesehen werden können. Weitere Untersuchungen sind

jedoch notwendig, um die Funktionalität dieser Proteine in den Cyanobakterien während der Photorespiration abschließend zu klären.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in Cyanobakterien als auch in Grünalgen der 2-Phophoglykolat-Metabolismus trotz eines aktiven CO_2-Kozentrierungs-Mechanismus essentiell ist. Jedoch unterscheiden sich sowohl Aufbau, als auch Biochemie des 2-Phosphoglykolat-Zyklus in diesen Mikroorganismen von dem der Landpflanzen. Einer der wichtigsten Unterschiede besteht in der Nutzung verschiedener Glykolat-oxidierender Enzyme. Während in Landpflanzen und einigen Streptophyta-Algen die Umsetzung von Glykolat durch eine Glykolat-Oxidase katalysiert wird, nutzen Cyanobakterien und Grünalgen für die Glykolat-Oxidation eine NAD-abhängige Glykolat-Dehydrogenase. Eine Datenbanksuche identifizierte jedoch Glykolat-Oxidase-ähnliche Proteine in Genomen von stickstofffixierenden Cyanobakterien, wie *Nostoc* und Grünalgen, wie *Chlamydomonas reinhardtii*. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch die Genome der Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* und der Glaucophyta *Cyanophora paradoxa* Glykolat-Oxidase-ähnliche Proteine kodieren, dessen aktives Zentrum im Gegensatz zum *Chlamydomonas* Protein dem der *Arabidopsis* Glykolat-Oxidase 2 entspricht. Der phylogenetische Stammbaum der pflanzlichen Glykolat-Oxidasen bestätigte ferner einen cyanobakteriellen Ursprung dieses Proteins in Landpflanzen und Algen. Weitere biochemische Analysen zeigten, dass es sich bei den Enzymen aus *Nostoc* und *Chlamydomonas* eher um Laktat-Oxidasen handelt, während das Protein aus der Rotalge *Cyanidioschyzon* wahrscheinlich die photorespiratorische Oxidation von Glykolat katalysiert. Die Präsenz einer Glykolat-Oxidase in allen drei Linien der Archaeplastida deutet, anders als bisher vermutet, auf die frühe Entstehung einer photorespiratorischen Glykolat-Oxidase in der durch primäre Endosymbiose entstandenen Protoalge und nicht erst in den Landpflanzen hin.

1. Einleitung

Mit einem Anteil von ~21% ist Sauerstoff nach Stickstoff das häufigste Gas der modernen Erdatmosphäre. Zu Beginn der Erdgeschichte vor über 3500 Millionen Jahren, lange bevor die oxygene Photosynthese entstand, war die Atmosphäre jedoch anaerob und enthielt hohe Anteile der Treibhausgase Methan und Kohlenstoffdioxid (Kasting 2005). Erst die Evolution von Cyanobakterien und den daraus abgeleiteten Algen und Landpflanzen veränderte die Gasatmosphäre der Erde. Allen diesen Organismengruppen ist es möglich, durch die Kombination eines manganhaltigen Photosystems II (PSII) mit weiteren Membrankomplexen oxygene Photosynthese zu betreiben. Dabei wird Lichtenergie genutzt, um anorganischen Kohlenstoff in Form von CO_2 zu fixieren und daraus die Grundbausteine organischer Kohlenstoffverbindungen zu bilden. Für diesen Photosynthesetyp dient Wasser als Elektronendonor, bei dessen Spaltung am PSII als Nebenprodukt Sauerstoff freigesetzt wird. Die Produkte der oxygenen Photosynthese, Sauerstoff und organischer Kohlenstoff bilden die Grundlage für das Leben auf der Erde, wie wir es heute kennen.

Sauerstoff ist aber auch ein hochreaktives Molekül. Für viele Enzyme, wie zum Beispiel für die Nitrogenase, das Hauptenzym der Stickstofffixierung, wirkt Sauerstoff inhibierend (Fay 1992). Auch das wichtigste Enzym der Kohlenstofffixierung, die Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco), zeigt neben der CO_2-Bindung zur Kohlenhydratsynthese eine Nebenreaktion mit Sauerstoff. Das, aus der Rubisco-Oxygenase-Reaktion resultierende 2-Phosphoglykolat (2PG), wirkt inhibierend auf zahlreiche, an der Photosynthese beteiligten Enzyme (Husic et al. 1987; Norman and Colman 1991). Die Evolution und Etablierung der oxygenen Photosynthese erforderte somit die Co-Evolution Sauerstoff-entgiftender Proteine und Synthesewege, um die aus der Reaktion mit Sauerstoff entstandenen toxischen Intermediate abzubauen (Kirschvink and Kopp 2008; Lorimer and Andrews 1973; Wickramasinghe and Ville 1975). Für den Abbau von 2PG nutzen oxygene Phototrophe den photorespiratorischen 2PG-Zyklus, auch C2-Zyklus genannt (Lorimer and Andrews 1973; Tolbert 1997).

1.1 Die Evolution der oxygenen Photosynthese ist gekoppelt an die Entstehung der Cyanobakterien

Die Umsetzung von Lichtenergie in chemische Energie bei der Photosynthese findet an membrangebundenen Pigment-Proteinkomplexen statt. Das gewonnene ATP und die Reduktionsäquivalente in Form von NADPH werden hauptsächlich im gekoppelten Calvin-Benson-Zyklus für die Fixierung von CO_2 benötigt. Aber auch viele weitere reduktive

Reaktionen im Chloroplast, z.B. Fettsäurebiosynthese, Nitrit- und Sulfatreduktion nutzen diese Energiequellen. Die ersten phototrophen Organismen waren Bakterien mit nur einem Photosystem (Allen and Martin 2007). Alle Bakterien mit nur einem Photosystem betreiben eine anoxygene Photosynthese, d.h. sie produzieren keinen Sauerstoff. Das liegt daran, dass diese Organismen nicht Wasser sondern andere Verbindungen als Elektronendonator nutzen, wie z.B. Wasserstoff, Fe^{2+}, Schwefelverbindungen oder vielfach organische Moleküle (Canfield 1998 und darin zitierte Quellen). Sie besitzen entweder ein Photosystem des Typs II, allerdings ohne Manganzentrum, wie Purpurbakterien (z. Bsp. *Rhodopseudomonas palustris*) und Grüne Nicht-Schwefelbakterien oder ein Photosystem des Typs I wie Grüne Schwefelbakterien (z. Bsp. *Chlorobium tepidum*) und Heliobakterien (Allen and Martin 2007; Oh-oka 2007). Bei genauerer Betrachtung der Photosysteme fiel auf, dass diese sich sehr ähneln. Phylogenetische und strukturbiologische Untersuchungen zeigten, dass beide Photosysteme aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind. Vermutlich konnten sich nach Verdopplung des Gen-*Clusters* eines Ur-Photosystems die Strukturen in verschiedenen Linien weiter differenzieren (Allen and Martin 2007; Jones 2007; Nelson and Yocum 2006; Schubert et al. 1998). Dabei diente wahrscheinlich ein PSII-ähnliches System als Prototyp (Baymann et al. 2001; Mulkidjanian et al. 2006). Die Verteilung der Photosystemtypen innerhalb der Prokaryoten kann nicht alleine durch einen vertikalen Transfer erklärt werden, da deren Vorkommen nicht mit den verwandtschaftlichen Beziehungen der unterschiedlichen phototrophen Bakterien korreliert (Gupta 2003). Wahrscheinlicher ist, dass die Gen-*Cluster*, die für das eine oder andere Photosystem codieren, durch horizontalen Gentransfer, also über die Artgrenzen hinaus, zwischen den verschiedenen Bakteriengruppen übertragen und ausgetauscht wurden (Mulkidjanian et al. 2006; Blankenship 2010).

Cyanobakterien sind die einzige prokaryotische Lebensform, in der Photosysteme beider Typen vorkommen. Eine Erklärung dafür liefern zwei unterschiedliche evolutionäre Szenarien (Allen and Martin 2007). Zum einen hat eine Zelle, die bereits ein PSI enthielt die Gene für ein PSII durch horizontalen Gentransfer erworben (Baymann et al. 2001; Olson and Blankenship 2004) oder umgekehrt (Xiong et al. 2000). Das zweite Szenarium geht von einem Ur-Cyanobakterium aus, in dem beide Photosysteme durch Genduplikation innerhalb einer Zelle evolviert sind. Vermutlich waren diese zunächst nicht durch eine Elektronenkette verbunden, sondern je nach Umweltbedingungen (z. Bsp. nach Art verfügbarer Elektronendonatoren) wurde das eine oder das andere Photosystem genutzt (Allen 2005; Mulkidjanian et al. 2006). Das Vorkommen nur eines Photosystems in phototrophen Bakterien, wie den Purpurbakterien ist demnach durch Verlust eines Gen-*Clusters* für das andere Photosystem, bzw. durch die Aufnahme nur eines dieser Photosysteme über horizontalen Gentransfer begründet (Allen and Martin 2007; Mulkidjanian et al. 2006). Unabhängig davon, welches Szenarium die Kombination von PSI und PSII in der Ur-

Cyanobakterienzelle korrekt darstellt, fand die Evolution des wasserspaltenden Mangan-Komplexes am PSII und die Verbindung der Photosysteme durch eine Elektrontransportkette für die oxygene Photosynthese erst danach statt (Allen and Martin 2007; Blankenship and Hartman 1998; Blankenship 2010; Olson and Blankenship 2004).

Es ist generell anerkannt, dass der Prozess der oxygenen Photosynthese in Cyanobakterien entstanden ist. Dieser Photosynthesetyp, der als einziger das weitverbreitete Wasser als Elektronenquelle nutzen kann, sowie die Fähigkeit molekularen Stickstoff zu fixieren, sind Gründe für den globalen Erfolg der Cyanobakterien. Moderne Cyanobakterien sind in nahezu allen ökologischen Nischen zu finden (z. Bsp. Garcia-Pichel et al. 2001; Nübel et al. 2000). Unklar ist nach wie vor, wann die oxygene Photosynthese tatsächlich entstand. Unbestritten ist, dass das Auftreten von Cyanobakterien in der Erdgeschichte und oxygene Photosynthese eng gekoppelt sind. Die vermutlich ältesten cyanobakteriellen Fossilien stammen von Stromatolithen aus West-Australien und scheinen die Evolution der ersten Cyanobakterien auf über 3500 Millionen Jahre vor unserer Zeit zu datieren (Awramik 1992; Golubic and Lee 1999; Schopf and Packer 1987). Allerdings ist die Zuordnung der Fossilien umstritten. Unabhängige Datierungen, basierend auf molekularen und biochemischen Merkmalen, z. Bsp. auf Photosynthesepigmente und deren Abbauprodukte, unterstützen die Fossilienfunde nur teilweise (Björn and Govindjee 2009; Olson and Blankenship 2004). Ein indirektes Argument für eine frühe Evolution von Cyanobakterien entstammt dem sicheren Nachweis von Heterocysten. Das sind spezialisierte Zellen mit dicken Zellwänden zur Stickstofffixierung in einer O_2-haltigen Umgebung. Die Kombination von paläontologischen, geologischen und phylogenetischen Daten spricht für die sichere Existenz von Heterocysten bereits im Präkambrium vor 2300 Millionen Jahren. Da Heterocysten-bildende Cyanobakterien sich als letzte Gruppe im Cyanobakterien-stammbaum abspalteten und erst entstanden sein können, als bereits signifikante Mengen an, von Cyanobakterien durch oxygene Photosynthese produziertem O_2 in der Atmosphäre vorlagen. Demzufolge müssen die ursprünglichen Cyanobakterien erheblich älter als 2300 Millionen Jahre sein (Tomitani et al. 2006). Alternativ wird das Auftreten von Cyanobakterien durch geologische Verbindungen (v.a. Mangan- und Eisenformationen, aber auch Kohlenstoffisotopenverteilungen), die nur in Gegenwart von Sauerstoff, d.h. durch oxygene Photosynthese entstanden sein können, datiert. Diese Marker zeigen, dass freier Sauerstoff mindestens vor 2300 bis 2500 Millionen Jahren in der Atmosphäre akkumulierte (Olson and Blankenship 2004 und darin zitierte Quellen). Somit schwanken die Angaben für die Existenz von Cyanobakterien zwischen 2300 bis 3000 Millionen Jahren. Viele Befunde sprechen jedoch für eine sehr frühe Evolution von Cyanobakterien ca. 3000 Millionen Jahre vor heute (Kirschvink and Kopp 2008).

1.2 Der Vorgänger der Chloroplasten phototropher Eukaryoten war ein stickstoff-fixierender β-Cyanobakterium-ähnlicher Endosymbiont

Die sehr lange Evolutionsgeschichte gab den Cyanobakterien Zeit für die Ausbildung einer hohen Biodiversität, die sich in zahlreichen morphologischen und physiologischen Anpassungen heute vorkommender Stämme widerspiegelt. Das morphologische Spektrum reicht von einfachen kokkalen Zellen bis hin zu verzweigten, filamentbildenden Vertretern mit differenzierten Zellen (z. Bsp. Heterocysten und Akineten) (Rippka et al. 1979). Die physiologische als auch morphologische Diversität zeigt sich auch in den Größen sequenzierter Cyanobakterien-Genome, die von 1,6 Mbp (*Prochlorococcus* sp. Stamm MIT9301) bis zu 9,7 Mbp (*Nostoc punctiforme* Stamm ATCC 29133) reichen (http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/). Die Einteilung der Cyanobakterien erfolgte in der Vergangenheit oft aufgrund ihrer morphologischen und physiologischen Eigenschaften (Rippka et al. 1979). Jedoch zeigten Phylogenien unter Nutzung bestimmter Markergene (16S rRNA, 23S rRNA, *nifH* ,*rbcL* , *rpoB,* usw.) starke Abweichungen, bzw. differenziertere Aufspaltungen, so dass die Taxonomie der Cyanobakterien in einem derzeitig völlig unklaren Zustand ist und einer Neudefinition bedarf (Gugger and Hoffmann 2004; Henson et al. 2004; Honda et al. 1999; Rajaniemi et al. 2005; Turner et al. 2001). Molekulare Phylogenien zeigten außerdem, dass sich die Cyanobakterien schon sehr früh in mehrere Gruppen aufgespalten haben. Auch das Merkmal „filamentös“, bzw. „kokkal“ ist von geringem Wert, da anders als bisher angenommen, einfache kokkale Nicht-Stickstofffixierer von komplexeren, fadenförmigen und zum Teil stickstofffixierenden Cyanobakterien abgeleitet sind (Cavalier-Smith 2010; Gupta and Mathews 2010).

Innerhalb der heutigen Cyanobakterien lassen sich zwei große Gruppen unterscheiden. Diese haben unterschiedliche Kohlenstoff-Konzentrierungs-Proteine (siehe unten) erworben und damit korreliert, besitzen sie entweder die Form Ia oder Ib von Rubisco (Hess et al. 2001). Ausgehend von der Rubisco-Form werden die Cyanobakterien heute in α- bzw. β-Cyanobakterien unterteilt (Badger et al. 2006). Eine verlässliche Einteilung der Cyanobakterien erfolgte für 44 cyanobakterielle Stämme mit vollständig sequenzierten Genomen. Dabei wurden Proteine genutzt, die für bestimmte Cyanobakteriengruppen spezifisch sind. Auf Grundlage dieser Signatur-Proteine konnte eine Phylogenie erstellt werden, die im Wesentlichen die Einteilung in α- und β-Cyanobakterien widerspiegelt (Abbildung 1; Gupta and Mathews 2010). Wie in vielen anderen Analysen befinden sich an der Basis des phylogenetischen Stammbaums *Gloeobacter violacens*, das einzige Cyanobakterium ohne Thylakoidmembranen und zwei thermophile *Synechococcus*-Stämme (JA-3-3Ab und JA2-3-B’a). Die ursprünglichen Stämme werden als *Clade* A zusammengefasst. Die *Clade* A-Stämme besitzen Rubisco Typ 1b und β-Carboxysomen.

Davon abgeleitet sind Cyanobakterien der Klassen *Nostocales*, *Chroococcales* und *Oscillatoriales*, die zusammen die *Clade* B bilden. Diese morphologisch und physiologisch sehr diverse Gruppe enthält ausnahmslos Vertreter der β-Cyanobakterien, von denen einige N_2 fixieren können. Die Schwestergruppe (*Clade* C) dazu bilden marine, einzellige Cyanobakterien, die ausschließlich die Rubisco-Form Ia enthalten und somit den α-Cyanobakterien zuzuordnen sind. Diese Gruppe beinhaltet nur picoplanktische Vertreter der *Synechococcen* und *Prochlorococcen*. Dabei bilden *Prochlorococcus*-Stämme die am weitesten abgeleitete Gruppe, die entsprechend ihrer Anpassung an Lichtbedingungen und dem damit verbundenen variierendem Chlorophyll b/a_2-Verhältnis weiter unterteilt werden können (Abbildung 1; Gupta and Mathews 2010). Ein Cyanobakterium, welches den heutigen stickstofffixierenden Vertretern der *Clade* B ähnelte, spielte eine entscheidende Rolle in der Evolution der Algen und Landpflanzen (Deusch et al. 2008; Falcon et al. 2010).

Schon sehr früh ist den Wissenschaftlern Schimper und Mereschkowsky durch alleinige Betrachtung im Lichtmikroskop die Ähnlichkeit zwischen den Chloroplasten der phototrophen Eukaryoten, Pflanzen bzw. Algen und den Cyanobakterien aufgefallen. Schimper formulierte 1883 die erste Version der Endosymbiontentheorie, welche 1905 erneut von dem russischen Wissenschaftler Mereschkowsky aufgegriffen wurde. Nach der Endosymbiontentheorie ist der Vorgänger aller phototrophen Eukaryoten durch Aufnahme und stabile Etablierung eines Cyanobakterien-ähnlichen Endosymbionten durch einen einzelligen heterotrophen Eukaryoten entstanden (Mereschkowsky 1905; Schimper 1883). Die Endosymbiontentheorie konnte in den letzten 100 Jahren vor allem durch molekularbiologische Untersuchungen weitgehend bestätigt werden (Bonen and Doolittle 1976; Sagan 1967). Ein gewichtiges Argument liefert die Monophylie cyanobakterieller Proteine und Proteine, die im pflanzlichen Chloroplast codiert sind (Deusch et al. 2008; Ishikawa et al. 2009; Martin et al. 2002; Moreira et al. 2000; Reith and Munholland 1995; Rousseau-Gueutin et al. 2011; Sasaki and Sato 2010; Vesteg et al. 2009). Ferner konnte in Genomvergleichen zwischen Pflanzen und Cyanobakterien gezeigt werden, dass es sich bei dem damals aufgenommenen Prokaryoten wahrscheinlich um ein stickstofffixierendes β-Cyanobakterium handelte (Deusch et al. 2008).

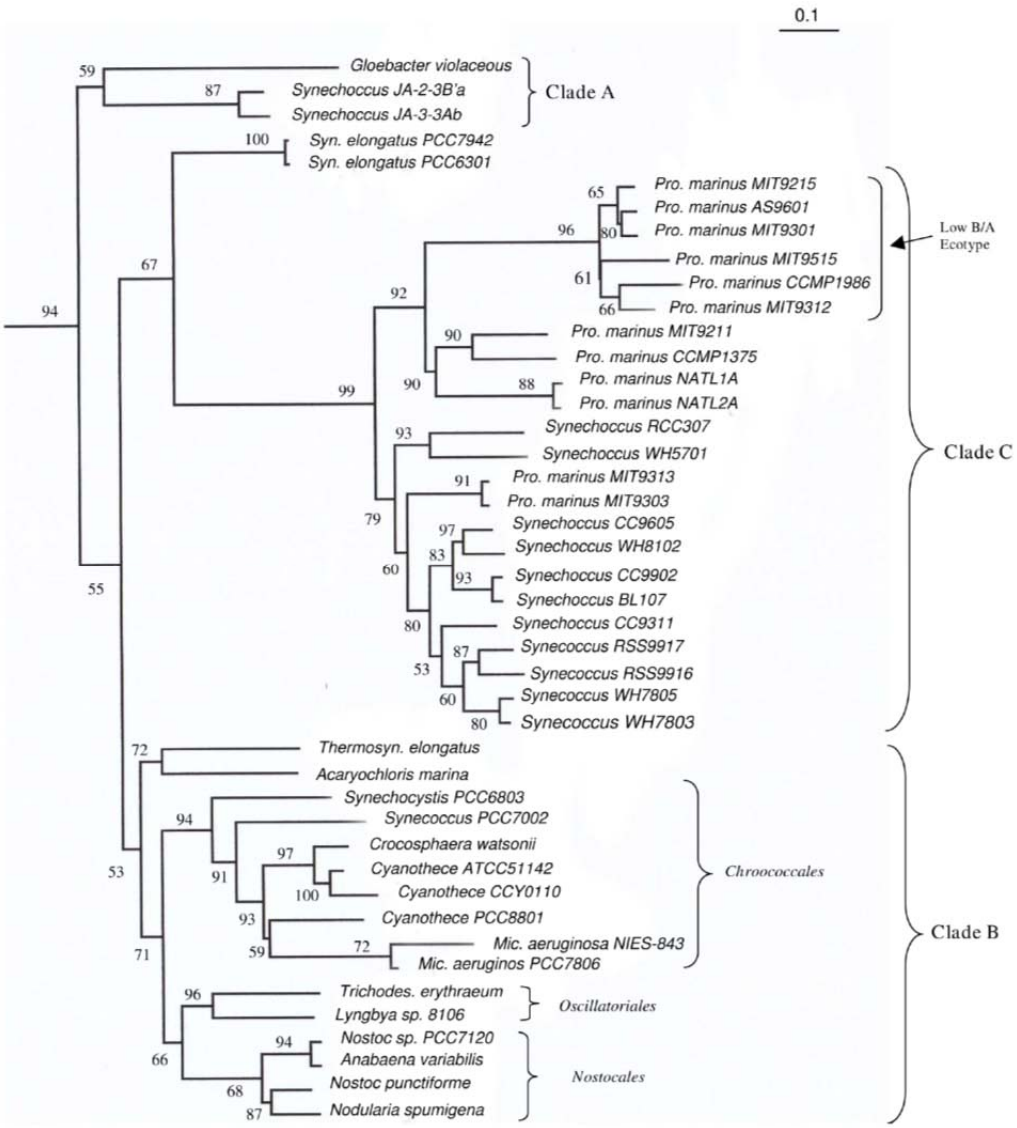

Abbildung 1. Phylogenie moderner Cyanobakterien. Der Baum basiert auf einer Maximum-Likelihood-Analyse von Markerproteinen von 44 cyanobakteriellen Genomen (aus Gupta and Mathews 2010).

1.3 Während der primären Endosymbiose wurden zahlreiche cyanobakterielle Gene in das Genom des phototrophen Eukaryoten übertragen

Der erste Schritt in der Evolution der Eukaryoten war vermutlich die Fusion zwischen einem Archaea-Bakterium und einem α-proteobakteriellen Endosymbionten. Diese Endosymbiose führte letztlich zur Bildung des Mitochondriums aller Eukaryoten (Bonen 2006; Cavalier-Smith 2006; Esser et al. 2004; Gray et al. 2001). Während über die Art und auch die Monophylie der ur-eukaryotischen Wirtszelle diskutiert wird (Cox et al. 2008; Embley and Martin 2006; Gribaldo et al. 2010; Lombard et al. 2012), bestätigen Genomvergleiche die Abstammung aller Mitochondrien von einem α-Proteobakterium des heutigen SAR11-*Clusters* (Thrash et al. 2011). Die Existenz von anaeroben Vertretern an der

Basis in allen Domänen des Lebens (Archaea, Bacteria, Eukaryota) spricht auch für eine frühe Entstehung der Eukaryoten unter anoxischen Bedingungen (Dietrich et al. 2006; Van Der Giezen and Lenton 2012).

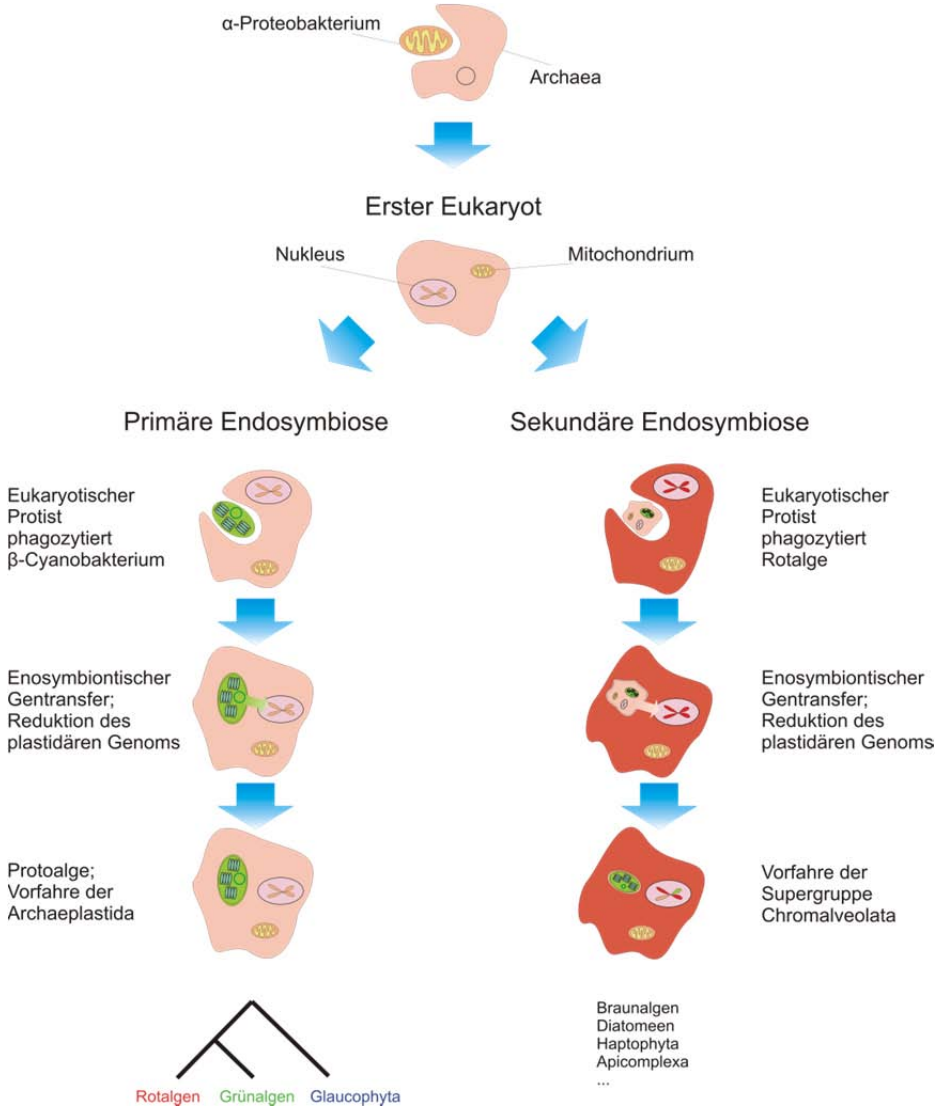

Abbildung 2. Entstehung der Plastiden durch primäre und sekundäre Endosymbiose. Endosymbiontischer Gentransfer ist durch Pfeile und die Farben der Chromosomen dargestellt. Abgebildet ist nur die sekundäre Endosymbiose mit einer Rotalge (verändert nach Bhattacharya et al. 2004).

Phylogenetische Untersuchungen unter Einbeziehung einer molekularen Uhr zeigen, dass die primäre Aufnahme eines Cyanobakteriums als Chloroplastenvorläufer durch die eukaryotische Wirtszelle vor ca. 1500 Millionen Jahren stattfand (Yoon et al. 2004). Diese Ur-Pflanze bildete den gemeinsamen Vorgänger der drei Archaeplastida-Linien der Glaucophyta, Rhodophyta (Rotalgen) und Chlorophyta (Grünalgen), inklusive der daraus

resultierenden Streptophyta (Landpflanzen) (Ball et al. 2011; Deschamps et al. 2008; Moreira et al. 2000; Price et al. 2012; Yoon et al. 2004). Die Endosymbiose mit einem Cyanobakterium ermöglichte es der Wirtszelle Lichtenergie zur Fixierung anorganischen Kohlenstoffs zu nutzen. Neben der Etablierung der photoautotrophen Lebensweise spielte wahrscheinlich auch der stickstofffixierende Apparat des Cyanobakteriums für die fortlaufende Existenz der Endosymbiose eine entscheidende Rolle (Deusch et al. 2008; Falcon et al. 2010). Allerdings scheint die Fähigkeit zur N_2-Fixierung schon vor der Differenzierung der Protoalgen verloren gegangen zu sein. Im weiteren Verlauf der Endosymbiose verlor der cyanobakterielle Endosymbiont seine Autonomie und wurde von der Wirtszelle "versklavt" (Abbildung 2) (Bhattacharya et al. 2007; Gould et al. 2008; Nowack et al. 2008; Weber and Osteryoung 2010). Durch den Transfer cyanobakterieller Gene in den Kern des Wirts, auch als endosymbiontischer Gentransfer (EGT) bezeichnet, wurde die Proteinausstattung des Endosymbionten zunehmend vom Wirt kontrolliert. Allerdings mussten die Proteine, die durch solche transferierten Gene codiert wurden, anschließend wieder in den Endosymbionten transportiert werden, d.h. die Evolution von Transportprozessen war ein wesentlicher Teil der Endosymbiose (Weber and Osteryoung 2010). Das Ergebnis der primären Endosymbiose ist ein Photosynthese-betreibender Ur-Eukaryot mit Genen cyanobakteriellen Ursprungs im Kerngenom und einem stark reduzierten plastidären Genom (Abbildung 2) (Weber and Osteryoung 2010). Während das Genom des stickstofffixierenden β-Cyanobakteriums *Nostoc* sp. PCC 7120 für 5368 Proteine codiert, sind im bisher größten chloroplastidären Genom der Rotalge *Porphyra purpurea* nur noch 251 Proteine kodiert (Kaneko et al. 2001; Reith and Munholland 1995). Neben Proteinen für die Photosynthese wurden weitere cyanobakterielle Gene erworben, die im Wirt vielfältige Funktionen haben (Andersson 2005; Frommolt et al. 2008; Weber and Osteryoung 2010). Der cyanobakterielle "Fußabdruck" kann in allen phototrophen Eukaryoten nachgewiesen werden und ist ein Beleg für die hohe Anzahl der, während der primären Endosymbiose transferierten Gene (Deusch et al. 2008; Martin et al. 2002; Price et al. 2012; Reyes-Prieto et al. 2006).

In den letzten zehn Jahren konnten zahlreiche Genome von Landpflanzen, wie *Arabidopsis thaliana* (Kaul et al. 2000) oder *Physcomitrella patens* (Rensing et al. 2008), und Algen, wie der Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* (Matsuzaki et al. 2004) oder der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Merchant et al. 2007), sequenziert werden. Kürzlich konnte auch das Genom von *Cyanophora paradoxa*, einem Vertreter der nur ca. 30 Arten umfassendenen Glaucophyta, entschlüsselt werden (Price et al. 2012). Vergleichende Genomanalysen haben gezeigt, dass der Anteil der vom cyanobakteriellen Endosymbionten stammenden Gene zwischen Vertretern der drei Linien mit primären Plastiden schwankt (Price et al. 2012). Konnten für *Arabidopsis* noch 18% Protein-kodierende Gene mit

cyanobakteriellen Ursprungs identifiziert werden (Martin et al. 2002), so zeigt sich für *Chlamydomonas* mit 6% und für *Cyanophora* und *Cyanidioschyzon* mit 7% ein geringerer Anteil Protein-kodierender Gene mit der höchsten Ähnlichkeit zu cyanobakteriellen Homologen (Moustafa et al. 2009; Price et al. 2012; Sato et al. 2005). Die Funktion der cyanobakteriellen Proteine in den Genomen von Pflanzen und Algen ist oft an die Photosynthese und die Fixierung anorganischen Kohlenstoffs gebunden (Reyes-Prieto et al. 2006). Auch Gene, die nicht an die Photosynthese geknüpft sind, wurden im Kern der Wirtszelle nachgewiesen, wie die Phosphoglycerat-Kinase (Brinkmann and Martin 1996). Die Genomanalysen vieler Algen und auch Landpflanzen haben die Monophylie der Archaeplastida bestätigt. Aufgrund vieler rudimentärer Eigenschaften der Glaucophyta, die auch in Cyanobakterien vorkommen (z. Bsp. Peptidoglycanhülle um den Chloroplasten; Löffelhardt et al. 1997), wird diese Gruppe in der Literatur oft als "lebendes Fossil" angesehen. Die Genomsequenz eines Vertreters der Glaucophyta, *Cyanophora paradoxa*, bekräftigte die frühe Abspaltung dieser Gruppe nach der primären Endosymbiose und deren Stellung an der Basis des Stammbaums der Archaeplastida (Price et al. 2012).

Aus der Gruppe der durch primäre Endosymbiose entstandenen phototrophen Eukaryoten bildeten Rot- und Grünalgen den Ausgangspunkt für mindestens drei unabhängige sekundäre Endosymbiosen (zusammengefasst in Keeling 2004). Eine dieser sekundären Endosymbiosen basiert auf der Aufnahme einer Rotalge durch einen heterotrophen Eukaryoten vor ca. 1300 Millionen Jahren, die zu der Entstehung des gemeinsamen Vorläufers der Chromalveolata-Supergruppe führte (Abbildung 2) (Janoušíkovec et al. 2010; Keeling 2004; Yoon et al. 2004). Vertreter dieser Gruppe sind Braunalgen, Diatomeen und auch parasitäre Lebensformen mit einem stark reduzierten oder verloren gegangenen Plastiden (Keeling 2004). Auch nach der Entstehung dieser sekundären Plastiden wurden weitere plastidäre Gene in das Wirtsgenom durch EGT übertragen. Als Ergebnisse können in den Genomen der Chromalveolaten neben Genen des Rotalgen-Endosymbionten auch Gene des ursprünglichen cyanobakteriellen Endosymbionten nachgewiesen werden (Abbildung 2) (Bhattacharya et al. 2004).

1.4 Steigende O_2/CO_2-Raten der Atmosphäre führen zu vermehrten Bildung von 2-Phosphoglykolat durch die Oxygenase-Aktivität der Rubisco

Alle oxygenen Phototrophen nutzen den Calvin-Benson-Zyklus zur CO_2-Fixierung mit Rubisco Typ I als Eingangsenzym. Die Phylogenie der pflanzlichen Rubisco, das am häufigsten auf der Erde vorkommenden Protein, kann bis zur primären Endosymbiose mit einem β-Cyanobakterium zurückverfolgt werden (Delwiche and Palmer 1996). Neben dem

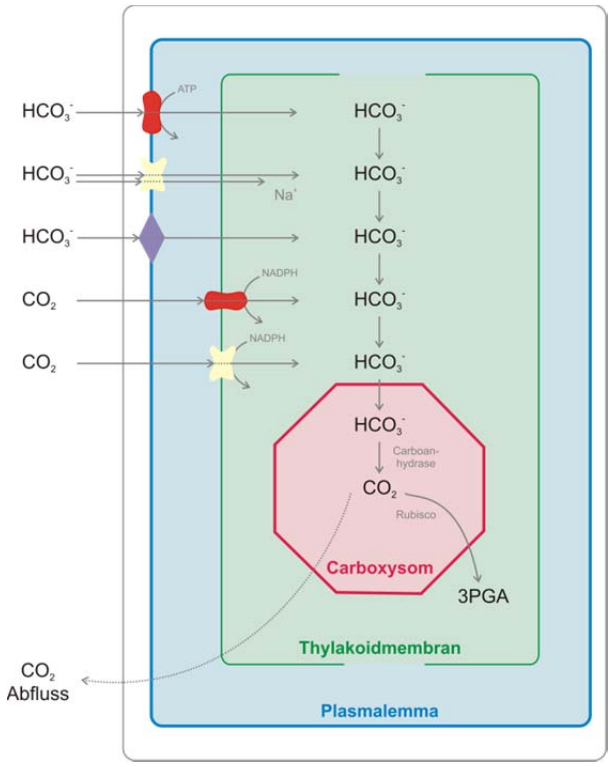

Abbildung 3. Modell des CCM's in Cyanobakterien. Dargestellt ist die Aufnahme anorganischen Kohlenstoffs in Form von CO_2 und HCO_3^- durch *High-* und *Low-Affinity* Transportsysteme am Plasmalemma und/oder der Thylakoidmembran, sowie die Akkumulation und Umwandlung von HCO_3^- im Carboxysom (verändert nach Giordano et al. 2005)

pflanzlichen Typ I Rubisco werden noch zwei weitere Rubisco-Formen als CO_2-fixierende Enzyme verwendet. Alle Rubisco's der Typen I, II und III können nicht strikt zwischen O_2 und CO_2 unterscheiden. Allerdings schwankt die Fähigkeit dieser Rubisco-Formen in ihrem Diskriminierungsfaktor, d.h. der Fähigkeit CO_2 stark vor O_2 zu bevorzugen, art- und enzymtypspezifisch sehr weit (Tabita et al. 2007). Demzufolge katalysiert Rubisco zwei Reaktionen: die Carboxylierung von Ribulose-1,5-bisphosphat mit CO_2, wodurch zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat (3PGA) entstehen, und die Oxygenierung von Ribulose-1,5-bisphosphat mit O_2, wobei neben 3PGA auch das toxische Intermediat 2PG entsteht. Die Akzeptanz der beiden Substrate CO_2 und O_2 durch Rubisco (Tabita et al. 2007) stellte ein zunehmendes Problem in einer O_2-reichen und CO_2-armen Atmosphäre dar. Landpflanzen, Algen und Cyanobakterien haben verschieden Mechanismen entwickelt, um das Problem der steigenden Oxygenierung mit steigendem O_2- und sinkenden CO_2-Konzentration zu minimieren. In Algen und Cyanobakterien entstanden verschiedene Kohlenstoff-Konzentrierungs-Mechanismen (CCM), die CO_2 in räumlicher Nähe zu Rubisco anreichern, um so die Oxygenierungsreaktion der Rubisco zu unterdrücken (Badger et al. 2006; Giordano et al. 2005; Kaplan and Reinhold 1999; Raven et al. 2012) (Abbildung 3). Diese CCMs nutzen häufig hoch effiziente CO_2- oder Hydrogencarbonat-Aufnahmesysteme, welche Hydrogencarbonat ins Zytosol transportieren und anreichern (biophysikalischer CCM; Abbildung 3). In anderen CCM's wird CO_2 an organische Zwischenakzeptoren wie Malat gebunden und akkumuliert (biochemischer CCM in C_4-Pfanzen). In allen Fällen liegt Rubisco in speziellen Kompartimenten vor, in denen der zuvor akkumulierte Kohlenstoff in Form von

CO_2 freigesetzt und angereichert wird. Im Falle der Cyanobakterien findet das im Carboxysom statt, in die das aufgenommene Hydrogencarbonat durch kleine Poren der Proteinhülle hinein diffundiert, wo es anschließend durch eine dort lokalisierte Carboanhydrase in CO_2, ein für Rubisco nutzbares Substrat, umgewandelt wird (Abbildung 3) (Badger et al. 2006; Kaplan and Reinhold 1999). Viele eukaryotische Algen wie *Chlamydomonas* zeigen auch eine CCM-Aktivität, allerdings basieren diese Mechanismen auf anderen molekularen Grundlagen, welche noch nicht für alle Algengruppen geklärt werden konnten (Giordano et al. 2005; Raven et al. 2008b). C_4-Pflanzen, wie Mais (*Zea mays*) und Hirse (*Sorghum bicolor*) benutzen ein alternatives Enzym, die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase im Blattmesophyll für die primäre Carboxylierung. Die entstandenen C_4-Säuren werden weiter transportiert und schließlich in den Rubisco-enthaltenden Bündelscheidenzellen decarboxyliert (Osmond and Harris 1971).

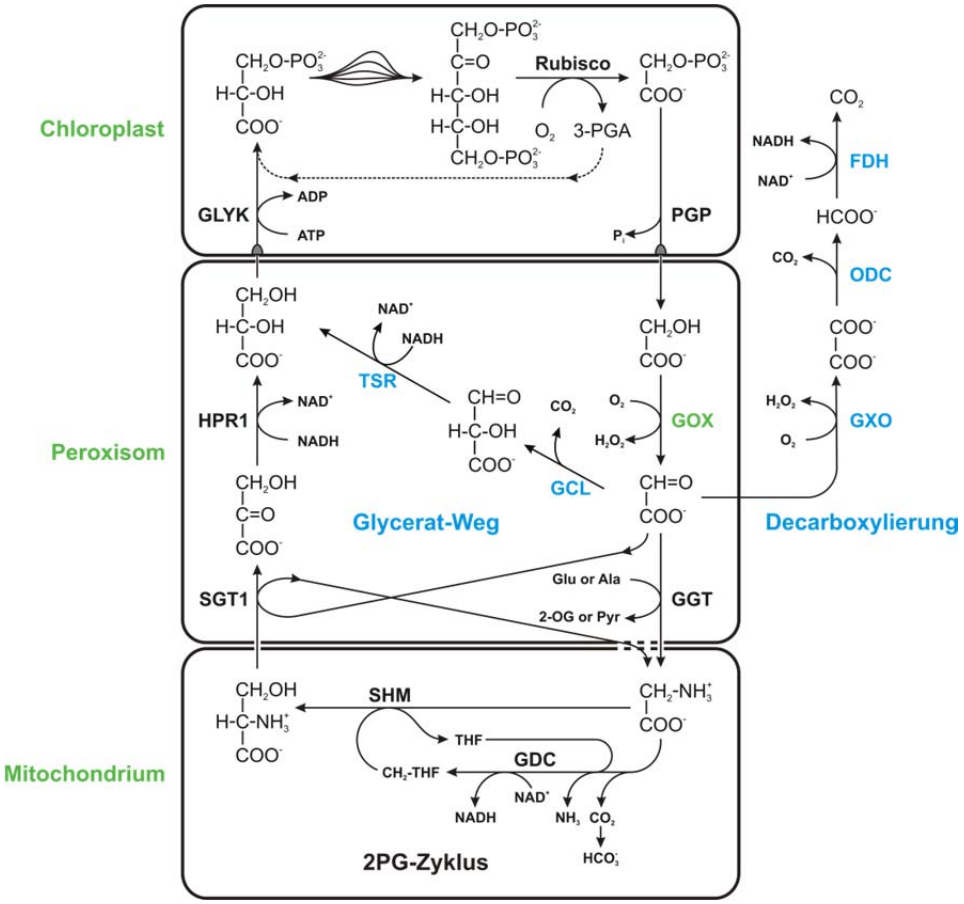

Abbildung 4. Photorespiratorischer 2PG-Zyklus in heutigen Landpflanzen (schwarz und grün; ohne zytosolische Reduktion von Hydroxypyruvat) und *Synechocystis* sp. PCC 6803 (schwarz und blau). Pflanzlicher 2PG-Zyklus erstreckt sich über vier Kompartimente, wohingegen der 2PG-Metabolismus in *Synechocystis* im Zytosol stattfindet. Die Glykolat-Oxidation wird in *Synechocystis* durch eine Glykolat-Dehydrogenase katalysiert.

In heutigen Landpflanzen wird das durch die Oxygenierungsreaktion der Rubisco gebildete toxische Intermediat 2PG in mehreren enzymatischen Schritten wieder in das Calvin-Benson-Zyklus-Intermediat 3PGA umgewandelt. Dieser Prozess wird auch als Photorespiration, C2-Zyklus oder 2PG-Zyklus bezeichnet (Abbildung 4) und erstreckt sich über vier Zellkompartimente (Chloroplast, Peroxisom, Mitochondrium und Zytosol; Bauwe et al. 2010; Tolbert 1997). Die erste Reaktion des 2PG-Zyklus findet in Chloroplasten statt, wo 2PG zu Glykolat hydrolysiert wird. Diese Reaktion katalysiert eine 2PG-Phosphatase (PGPase). Glykolat wird dann ins Peroxisom transportiert und durch die Aktivität einer Glykolat-Oxidase (GOX) zu Glyoxylat oxidiert. Es folgt die Aminierung durch eine Glutamat:Glyoxylat-Aminotransferase (GGT). Im nächsten Schritt werden zwei Moleküle Glycin durch die Zusammenarbeit der mitochondrialen Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT) und Glycin-Decarboxylase (GDC) in Serin, CO_2 und NH_4^+ umgewandelt. Letzteres Enzym besteht aus den vier Untereinheiten, P-, H-, T- und L-Protein. Wieder im Peroxisom wird Serin durch eine Serin:Glyoxylat-Aminotransferase (SGT) zu Hydroxypyruvat desaminiert, welches unmittelbar durch eine Hydroxypyruvat-Reduktase (HPR1) zu Glycerat reduziert wird. Die Reduktion von Hydroxypyruvat kann auch über eine zytosolische Form der Hydroxypyruvat-Reduktase (HPR2) erfolgen (Timm et al. 2008). Schließlich wird Glycerat in Chlorplasten durch die Aktivität der Glycerat-3-Kinase (GLYK) phosphoryliert und es entsteht 3PGA, welches wieder in den Calvin-Benson-Zyklus eingehen kann. *Arabidopsis*-Mutanten, die einen Defekt im 2PG-Zyklus aufweisen, zeigen einen typischen „photorespiratorischen" Phänotypen, d. h. diese Pflanzen können nur unter erhöhten CO_2-Konzentrationen wachsen und zeigen einen letalen Phänotyp unter atmosphärischen Bedingungen (Bauwe et al. 2010; Somerville 2001; Timm et al. 2012). Diese Experimente zeigen deutlich, dass der photorespiratorische 2PG-Zyklus für das Überleben der Landpflanzen in der heutigen Atmosphäre erforderlich ist.

Die Photorespiration ist in Pflanzen ein multifunktioneller Metabolismus, deren Hauptfunktion in der Detoxifizierung von 2PG, Glykolat und Glyoxylat und deren Rückführung in den Calvin-Benson-Zyklus besteht (Bauwe et al. 2012). *Arabidopsis*-Mutanten, bei denen einzelne enzymatische Schritte des 2PG-Zyklus ausgeschaltet sind, zeigen einen "photorespiratorischen" Phänotypen. Das heißt, sie können nicht überleben unter atmosphärischen Bedingungen. Dieser Phänotyp kann aber durch Erhöhung der CO_2-Konzentration reversiert werden. Bei genauerer Betrachtung dieser *Knock Out*-Pflanzen zeigen sich jedoch Unterschiede in der Stärke des ausgebildeten Phänotyps. So weist die *shm1*-Mutante einen deutlich schwächeren "photorespiratorischen" Phänotypen auf, als die *Atpglp1*-Mutante. Während das Wachstum der *shm1*-Mutante schon bei 0,15% CO_2 dem des Wildtyps gleicht, zeigt die *Atpglp1*-Mutante erst bei 1% CO_2 ein normales Wachstum (Schwarte et al. 2007; Voll et al. 2006). Ein *Knock Out* beider Genkopien des P-Proteins der

GDC führt sogar unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen zu einem letalen Phänotyp von *Arabidopsis* (Engel et al. 2007). Die unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotypen deuten auf eine Verknüpfung der Photorespiration mit anderen metabolischen Wegen, die durch eine Beeinflussung des 2PG-Zyklus ebenfalls betroffen sind (Bauwe et al. 2012). Bisher konnte die Photorespiration in Pflanzen mit folgenden Prozessen in Verbindung gebracht werden: Redoxregulation, Respiration, Stickstoff- und C_1-Kohlenstoff-Metabolismus (Bauwe et al. 2010 und darin zitierte Quellen). Durch die gekoppelte Aktivität der GDC und SHMT wird im Mitochondrium während der Serin-Glycin-Interkonversion CO_2 und NH_4^+ frei. Das entstandene NH_4^+ wird im gekoppelten Stickstoff-Kreislauf durch die Aktivität einer Glutamin- und Ferredoxin-abhängigen Glutamat-Synthase refixiert (Key 2006). Außerdem entsteht ein Methylen-Rest im Zuge der Decarboxylierung und Desaminierung von Glycin, welcher an Tetrahydrofolat (THF) gehängt und aktiviert wird. Das photorespiratorische, aktivierte THF stellt eine der wichtigsten Quellen für C_1-Kohlenstoffbausteine in Pflanzen dar (Oliver 1994). Dies ist nur ein Beispiel der Vernetzung der Photorespiration mit anderen Stoffwechselwegen der Pflanzen und ist sicherlich ein Grund für die Notwendigkeit des 2PG-Zyklus in Cyanobakterien, Algen und C_4-Pflanzen trotz eines aktiven CCM's.

1.5 Der cyanobakterielle 2PG-Metabolismus variiert in Biochemie und Aufbau von der pflanzlichen Photorespiration

Lange wurde angenommen, dass das Vorkommen bzw. die Funktionalität eines 2PG-Zyklus in C_4-Pflanzen, Algen und Cyanobakterien ausgeschlossen werden kann, da diese Organismengruppen über hoch effiziente CCM's verfügen und damit die Oxygenasefunktion der Rubisco unterdrücken. Im Falle von Cyanobakterien und Algen gab es darüber hinaus Hinweise, dass das entstandene toxische 2PG oder Glykolat aus der Zelle ausgeschieden wird (Norman and Colman 1988; Renström and Bergman 1989; Moroney et al. 1986). Aktuelle Ergebnisse zeigen jedoch, dass auch C_4-Pflanzen, Grünalgen und Cyanobakterien einen funktionellen 2PG-Zyklus besitzen. Weiterhin ist dessen Funktion auch in oxygenen Phototrophen mit CCM essentiell, da das Ausschalten dieses Weges ähnlich wie in C_3-Pflanzen unter atmosphärischen CO_2-Konzentrationen letal ist (Eisenhut et al. 2008; Nakamura et al. 2005; Zelitch et al. 2009).

Sequenzvergleiche zwischen den photorespiratorischen Proteinen aus *Arabidopsis* und *Synechocystis* sp. PCC 6803 lieferten erste Hinweise auf die Existenz eines Pflanzen-ähnlichen 2PG-Zyklus in Cyanobakterien. Die Überprüfung der Funktionalität dieses Metabolismus in Cyanobakterien erfolgte vor allem durch die Charakterisierung von *Synechocystis*-Mutanten, bei denen Gene, kodierend für Proteine des 2PG-Zyklus, ausgeschaltet wurden. Die Erzeugung einer photorespiratorischen *Synechocystis*-Mutante

gelang z. Bsp. durch den *Knock Out* der, im *Synechocystis*-Genom codierten Glykolat-Dehydrogenase (GlcDH)-Untereinheiten D1 und D2. Diese Mutante war letal unter ambienten CO_2- und O_2-Konzentrationen, wobei dieser Phänotyp durch Erhöhung der CO_2-Konzentration wieder aufgehoben werden konnte (Eisenhut et al. 2008). Auch für die Grünalge *Chlamydomonas* konnte durch die Charakterisierung zweier Mutanten, die einen Defekt im Gen kodierend für die PGPase oder Glykolat-Dehydrogenase aufwiesen, ein Beweis für die Funktionalität des 2PG-Zyklus erbracht werden (Nakamura et al. 2005; Suzuki 1995).

Zwischen dem 2PG-Metabolismus in Cyanobakterien, Algen und Landpflanzen bestehen jedoch zahlreiche Unterschiede. Zum einen ist der pflanzliche 2PG-Zyklus stark kompartimentiert (Abbildung 4). In Cyanobakterien hingegen, die zu den Prokaryoten zählen, finden alle Reaktionen im Zytosol statt. Weiter konnte gezeigt werden, dass in *Synechocystis* zwei alternative Wege zum Abbau des, aus der Oxygenierungs-Reaktion der Rubisco entstandenen 2PG existieren: der Glycerat-Weg und die vollständige Decarboxylierung von Glyoxylat (Abbildung 4; Eisenhut et al. 2006; Eisenhut et al. 2008). Letztere scheint aber nur in einigen wenigen Cyanobakterien vorzukommen (*Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Synechococcus elongatus* PCC 6301/7942). Erst durch Ausschalten aller drei Wege des 2PG-Umsatzes in *Synechocystis* konnte ein „photorespiratorischer" Phänotyp beobachtet werden (Eisenhut et al. 2008). Ein besonders interessanter Unterschied zwischen dem 2PG-Zyklus in Cyanobakterien und Landpflanzen bildet das Glykolat-oxidierende Enzym. Während in Pflanzen dieser Schritt durch eine Glykolat-Oxidase (GOX) katalysiert wird, wird in Cyanobakterien Glykolat durch eine Dehydrogenase in Glyoxylat umgewandelt. Beide Enzyme sind phylogenetisch unabhängig entstanden und unterscheiden sich im benötigten Co-Faktor und den entstehenden Nebenprodukten. Die pflanzliche GOX verbraucht während der Oxidation O_2 und bildet neben Glyoxylat das toxische Wasserstoffperoxid, welches unmittelbar durch die Aktivität einer Katalase abgebaut werden muss. Die Lokalisation der GOX in Pflanzenperoxisomen zusammen mit Peroxidasen und Katalasen erlaubt eine schnelle und unidirektionale Glykolatumsetzung und H_2O_2-Entgiftung. Die cyanobakteriellen Glykolat-Dehydrogenasen (GlcDH) reduzieren während der Oxidation von Glykolat $NAD(P)^+$. In heterotrophen Bakterien, wie *E. coli* dient dieses Enzym dem Glykolatabbau über den Glycerat-Weg um Glykolat als Kohlenstoffquelle nutzbar zu machen (Pellicer et al. 1996). Das Enzym besteht aus den Untereinheiten D, E und F. Auch für *Synechocystis* konnten neben den D1- und D2-Untereinheiten (Sll0404, Slr0806; Eisenhut et al. 2008) weitere Komponenten der GlcDH identifiziert werden (GlcE: Sll1189, GlcF: Sll1831). Ob sie aber für die Glykolat-Oxidation essentiell sind ist fraglich (nicht publizierte Ergebnisse, Claudia Hackenberg).

Auch die Photorespiration in Algen unterscheidet sich vom 2PG-Zyklus in Landpflanzen oder Cyanobakterien. Dies betrifft vor allem die Lokalisation einiger Enzyme. Viele Grünalgen besitzen keine echten Peroxisomen (Shinozaki et al. 2009; Stabenau and Winkler 2005). Demzufolge sind photorespiratorische Enzyme, die bei Landpflanzen im Peroxisom vorliegen, in Grünalgen und Diatomeen vermutlich im Mitochondrium lokalisiert (Atteia et al. 2009; Beezley et al. 1976; Shinozaki et al. 2009; Stabenau and Winkler 2005; Winkler and Stabenau 1995). Eine Gemeinsamkeit zu den Cyanobakterien bildet das Glykolat-oxidierende Enzym. Auch in vielen Grünalgen konnte die Aktivität einer Glykolat-Dehydrogenase im photorespiratorischen Umsatz von Glykolat zu Glyoxylat nachgewiesen werden (Frederic et al. 1973; Nakamura et al. 2005; Stabenau and Winkler 2005; Suzuki et al. 1991). Weiter konnte gezeigt werden, dass das Vorkommen einer GOX oder GlcDH mit einigen zytologischen Merkmalen korreliert, wodurch einfache Grünalgen von komplexeren Grünalgen und Landpflanzen (den Streptophyten) unterschieden werden (Frederic et al. 1973). Die GlcDH galt demnach als ein rudimentäres Merkmal, welches in der weiteren Evolution der Photorespiration während der Entwicklung der Landpflanzen durch eine GOX ersetzt wurde (Frederic et al. 1973). Die Photorespiration bei den meisten Algengruppen, wie Rotalgen, aber auch durch sekundäre Endosymbiose entstandene Algen, wie Diatomeen und Braunalgen, ist bisher nur sehr fragmentarisch charakterisiert worden (Paul and Volcani 1976; Seckbach et al. 1992; Winkler and Stabenau 1995). Jedoch deuten Informationen aus den kürzlich sequenzierten Genomen von Rotalgen und Diatomeen (Kroth et al. 2008), aber auch Untersuchungen der Grünalge *Chlamydomonas* darauf hin, dass auch in Algen ein Pflanzen-ähnlicher 2PG-Zyklus vorhanden ist (Atteia et al. 2009; Gravot et al. 2010; Nakamura et al. 2005; Suzuki et al. 1991).

Trotz der vielen Unterschiede im 2PG-Metabolismus bei Landpflanzen, Algen und Cyanobakterien ist dieser Prozess unter O_2-reichen und CO_2-armen Bedingungen der heutigen Atmosphäre in allen oxygenen Phototrophen essentiell, unabhängig davon, ob ein CCM vorliegt oder nicht (Eisenhut et al. 2008; Nakamura et al. 2005; Suzuki 1995). Deutet dies auf eine ähnlich frühe Evolution der Photorespiration, wie die der oxygenen Photosynthese hin? Erste Sequenzvergleiche zwischen den pflanzlichen und cyanobakteriellen Proteinen des 2PG-Zyklus, sowie die ähnliche Biochemie deuteten einen cyanobakteriellen Ursprung der Photorespiration in Landpflanzen an (Eisenhut et al. 2008). Somit stellte sich auch die Frage, inwieweit die Existenz des photorespiratorischen 2PG-Zyklus in Algen und Landpflanzen ein Ergebnis des EGT's ausgehend vom cyanobakteriellen Endosymbionten ist? Wenn die pflanzlichen und cyanobakteriellen photorespiratorischen Proteine aus einem gemeinsamen Vorgänger entstanden sind, warum wurde der 2PG-Zyklus in der weiteren Evolution phototropher Eukaryoten und Cyanobakterien modifiziert (z. Bsp. GOX anstatt GlcDH)?

2. Zielstellung

Die Photorespiration hat ihren Ausgangspunkt in der Bifunktionalität der Rubisco, die als carboxylierendes Enzym in der photosynthetischen CO_2-Fixierung bei allen oxygenen Phototrophen agiert. Beide Prozesse sind unlösbar miteinander verknüpft. Dies lässt vermuten, dass die Evolution von Photosynthese und Photorespiration auf eine ähnliche Art und Weise verlaufen ist. Viele der an der Photosynthese beteiligten Gene sind ein Teil des cyanobakteriellen „Fußabdrucks", der auf die primäre und gelegentlich sekundäre Endosymbiose zurückzuführen ist. Ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung von Photosynthese und Photorespiration ließe vermuten, dass auch Gene der Photorespiration in den Genomen von Landpflanzen und Algen das Ergebnis des endosymbiontischen Gentransfers ausgehend von der Aufnahme eines cyanobakteriellen Endosymbionten vor über 1500 Millionen Jahren sind. Um diese Annahme zu unterstützen, wurden drei Schwerpunkte in meiner Arbeit verfolgt.

1) Den phylogenetischen Analysen vorangestellt sollte eine Datenbankrecherche sein, die die Vollständigkeit oder auch Variabilität der Photorespiration in Cyanobakterien und Algen aufzeigt. Die Datenbankrecherche sollte durch Einbeziehung aktueller Genomsequenzen von überwiegend Algen im gesamten Zeitraum der Promotion erweitert werden.

2) Um die Evolution der photorespiratorischen Proteine zu verstehen, sollten systematische phylogenetische Analysen mit Proteinen aus Landpflanzen, sowohl durch primäre als auch sekundäre Endosymbiose entstandene Algen und Cyanobakterien durchgeführt werden. Als Vergleichsgruppe sollten homologe Proteine aus heterotrophen Bakterien herangezogen werden. Die Phylogenie der einzelnen photorespiratorischen Proteine sollte mit der Art-Phylogenie der verwendeten Taxa verglichen werden.

3) Die durch phylogenetische Analysen gewonnenen Ergebnisse sollten durch molekularbiologische und biochemische Untersuchungen unterstützt und erweitert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Organismen und verwendete DNA

Genomische DNA (3.2.2.1) wurde aus dem japanischen Wildtyp von *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Nostoc* (*Anabaena*) sp. PCC 7120 isoliert.

Die zur Transformation eingesetzten *E. coli* Stämme waren DH5α, Top10 sowie BL21-Gold, wobei letzterer für die Expression rekombinanter Proteine eingesetzt wurde. In Tabelle 1 sind die verwendeten *E. coli*- Stämme aufgeführt.

Die in dieser Arbeit erzeugten rekombinanten *E. coli* Stämme sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Genomische DNA von *Cyanidioschyzon merolae* wurde freundlicherweise von Dr. M. Eisenhut (Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Die Isolation des Gens für die Cr-LOX aus *Chlamydomonas reinhardtii* erfolgte durch Yoshinori Tsuji und Yoshihiro Shiraiwa (Universität Tsukuba, Japan) und wurde ligiert im pGemT-Easy Vektor an unsere Arbeitsgruppe verschickt.

DNA des Cyanobakteriums *Cyanothece* sp. PCC 7822 wurde von Prof. Louis Sherman (Purdue University, USA) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1. *E. coli*-Stämme, die zur Transformation verwendet wurden.

Stamm	Genotyp	Herkunft
Escherichia coli DH5α	F^-, *end*A1, *gln*V44, *thi*-1, *rel*A1, *gyr*A96, deo^R, *nup*G, Δ*lac*ZM15, *hsd*R17	Laborsammlung
Escherichia coli Top10	F^-, *mcrA,* Δ(*mrr-hsd*RMS-*mrc*BC), φ80*lacZ*ΔM15, Δ*lac*X74, *rec*A 1, *deo*R, *ara*D139, Δ(*ara-leu*)7697, *gal*U, *gal*K, *rps*L (Str^R), *end*A 1, *nup*G	Laborsammlung
Escherichia coli BL21-Gold (DE3)	F^-, *ompT*, *hsdS* (r_B^- m_B^-), dcm^+, Tet^R, *gal*, *λ* (DE3), *endA*, Hte	Laborsammlung

Tabelle 2. Die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten *E. coli*-Stämme.

Bezeichnung des rekombinanten Plasmids	*E. coli*-Stamm
pGemT-all0170	DH5α
pet28a-all0170-82	BL21-Gold (DE3)
pet28a-all0170-112	BL21-Gold (DE3)
pet28a-all0170-212	BL21-Gold (DE3)
pet28a-all0170-82-112	BL21-Gold (DE3)
pet28a-all0170-112-212	BL21-Gold (DE3)
pet28a-all0170-82-112-212	BL21-Gold (DE3)
pet28a-all0170-82-212	BL21-Gold (DE3)
pet28a-Cr-LOX	BL21-Gold (DE3)
pet28a-all8087	BL21-Gold (DE3)
pet28a-sll1908	BL21-Gold (DE3)
pet28a-alr0058	BL21-Gold (DE3)
pet28a-alr1890	BL21-Gold (DE3)
pet28a-slr1556	BL21-Gold (DE3)
IBA43^{+}-slr1556 K11	BL21-Gold (DE3)
pet28a-HPR7822	BL21-Gold (DE3)
IBA43^{+}-HPR7822	BL21-Gold (DE3)
IBA43^{+}-CMQ436C	BL21-Gold (DE3)
pET28a-CMQ436C	BL21-Gold (DE3)

3.1.2 Chemikalien und Enzyme

Verwendete Chemikalien und Enzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt von den Firmen Fermentas, New England Biolabs, Qiagen, Roth und Sigma bezogen.

3.1.3 Synthetische Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer (Tabelle 3) wurden ausschließlich von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Für die spätere Klonierung wurden den Primern zum Teil Restriktionsschnittstellen angehängt. Die Primer, welche in der *Site-Specific-Mutagenesis* verwendet wurden, trugen eine phosphoryliertes 5'-Ende.

Tabelle 3. Sequenzen der verwendeten Primer. Restriktionsschnittstellen, die der Originalsequenz angehangen wurden, sind unterstrichen.

Primer	Sequenz (5`→ 3`)
pUC/M13-fw	GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG AC
pUC/M13-rv	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG
*all*0170-fw-*Nde*I	CAT ATG ACA GCT ATA TCC AGT CCC AT
*all*0170-rev-*Eco*RI	GAA TTC TTA CAA ATG CAG AAA ACT AG
*all*0170_82M_F	CTA TTA ATT GCA CCA ACG GCG TTT C
*all*0170_82M_F	AGG TAA TTG CAG AGG TTG TCC CAA A
*all*0170_112L_F	AGT ACG TGG TCC ACC AAA AGT TTA G
*all*0170_112L_R	CAA AAC CAT ACC CGT CCC AGC C
*all*0170_212F_F	GGT TGT TTA CCT ATG TTG CTC AAC A
*all*0170_212F_R	CAG ATT CTC CTG GTG CAT GAG GAA TA
*Cr-LOX-Nde*I-fw	CAT ATG GCA GAC CTA AGC TTC C
*Cr-LOX-Eco*RI-rev	GAA TTC CTA CAG CTT GCA CAG C
*CMQ436C-Eco*RI-fw	GAA TTC ATG GTT GAG AAG CCA GCA G
*CMQ436C-Sal*I-rv	GTC GAC TTA GAG TTT GCT CTG CAT C
*all8087-Nde*I-fw	CAT ATG AAA CCA AAG GTT GTG ATT A
*all8087-Eco*RI-rev	GAA TTC TCA AGA TTC CCT AAG ATA A
*alr0058-Nde*I-fw	CAT ATG AAA GTA GCA GTC TTC AGT A
*alr0058-Eco*RI-rev	GAA TTC TCA ACT AAC TAA AAC CTT A
*alr1890-Nde*I-fw	CAT ATG TCT AAG GTT CTC GTC TCC G
*alr1890-Eco*RI-rev	GAA TTC CTA TAG TGT TAC TGT ATA CG
*slr1556-Eco*RI-fw	GAAT TCA TGA AAA TCG CTT TTT TTA GC
*slr1556-Xho*I-rev	CTC GAG TTA ATG GGG ACA GAT TAC TTG G
*sll1908-Nde*I-fw	CAT ATG GCT AAA GTT TTA GTT TCT G
*sll1908-EcoR*I-fw	GAA TTC TTA GAG CTT AAC GGT GTA G
*HPR7822-Eco*RI-fw	GAA TTC ATG TCA CTC CCT AAA ATA T
*HPR7822-Xho*I-rev	CTC GAG TCA ACT ATA AAT CTC AGG A
*HPR7822-Nde*I-fw	CAT ATG TCA CTC CCT AAA ATA TTT G
*HPR7822-Eco*RI-rev	GAA TTC TCA ACT ATA AAT CTC AGG A

3.1.4 Vektorsysteme und Plasmide

Die verwendeten Vektorsysteme sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten rekombinanten Plasmide sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 4.Vektorsysteme.

Vektor	Größe (bp)	Relevante Merkmale	Herkunft
pGemT®	3000	P_{T7}, *lacZ* start codon, *lac* operon, Amp^R, linearisiert über *EcoR*V, 3'-term. T-Überhang	PROMEGA
pET-28a	5369	P_{T7}, ATG, C-term. und N-term. 6xHis-*Tag*, Km^R	NOVAGEN (Nottingham)
pASK-IBA43plus	3286	P_{tetA}, ATG, OmpA-Signal-Sequenz, C-term. Strep-*Tag* II, N-term. 6xHis-*Tag*, Amp^R	IBA (Göttingen)

Tabelle 5. In dieser Arbeit hergestellte rekombinante Plasmide.

Plasmid	Insert (*Accession* Nr. oder ORF-Namen)	Schnittstellen der Insertion (fw/rev)	Größe des Inserts (bp)
pGemT-all0170	all0170	*Nde*I/*Eco*RI	1098
pet28a-all0170-82	all0170, M82T	*Nde*I/*Eco*RI	1098
pet28a-all0170-112	all0170, L112W	*Nde*I/*Eco*RI	1098
pet28a-all0170-212	all0170, F212V	*Nde*I/*Eco*RI	1098
pet28a-all0170-82-112	all0170, M82T, L112W	*Nde*I/*Eco*RI	1098
pet28a-all0170-112-212	all0170, L112W, F212V	*Nde*I/*Eco*RI	1098
pet28a-all0170-82-112-212	all0170, M82T, L112W, F212V	*Nde*I/*Eco*RI	1098
pet28a-all0170-82-212	all0170, M82T, F212V	*Nde*I/*Eco*RI	1098
pet28a-Cr-LOX	AB610509	*Nde*I/*Eco*RI	1157
pet28a-all8087	all8087	*Nde*I/*Eco*RI	999
pet28a-sll1908	sll1908	*Nde*I/*Eco*RI	1581
pet28a-alr0058	alr0058	*Nde*I/*Eco*RI	1028
pet28a-alr1890	alr1890	*Nde*I/*Eco*RI	1590
pet28a-slr1556	slr1556	*Nde*I/*Hind*III	1002
$IBA43^+$-slr1556	slr1556	*Eco*RI/*Xho*I	1002
pet28a-HPR7822	YP_003887724	*Nde*I/*Eco*RI	980
$IBA43^+$-HPR7822	YP_003887724	*Eco*RI/*Xho*I	980
$IBA43^+$-CMQ436C	CMQ436C	*Eco*RI/*Sal*I	1167
pET28a-CMQ436C	CMQ436C	*Eco*RI/*Sal*I	1167

3.1.5 Nährmedien

Die Cyanobakterien *Synechocystis* und *Nostoc* wurden in BG11-Medium pH 8.0 kultiviert (Rippka et al. 1979). Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 6 aufgezeigt.

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB (Luria Bertani)-Medium (Roth). Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium Vektor-spezifisches Antibiotikum zugegeben. Für Agarplatten wurde LB-Agar (Roth) laut Herstellerangaben verwendet und ebenfalls mit dem Vektor-spezifischen Antibiotikum versehen.

Tabelle 6. Zusammensetzung des BG11-Mediums.

	Endkonzentration
Citric Acid Monohydrat $C_6H_8O_7$ x H_2O	0.029 mM
Ferric Ammonium Citrat Fe-NH4-Citrat	0.03 mM
EDTA-Dinatriumsalz $C_{10}H_{14}O_8N_2Na_2$ x H_2O	0.003 mM
$NaNO_3$	17.65 mM
K_2HPO_4	0.22 mM
$MgSO_4$ x $7H_2O$	0.3 mM
$CaCl_2$ x H_2O	0.26 mM
H_3BO_3	46 µM
MnCl2 x $4H_2O$	9.4 µM
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	0.77 µM
Na_2MoO_4 x $2H_2O$	0.086 µM
$Co(NO_3)_2$ x $6H_2O$	0.17 µM
TES Puffer pH 8.0	20 mM

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung und Anzucht

3.2.1.1 Kultivierung von Cyanobakterien

Die Kultivierung von *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Nostoc* sp. PCC 7120 erfolgte in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 40 ml BG11-Medium pH 8.0 (0) bei 30 °C, 120 rpm unter ambienten CO_2 Bedingungen bei einer Lichtstärke von 20-40 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}.

3.2.1.2 Kultivierung von Escherichia coli

E. coli wurde, wenn nicht anders vermerkt in Antibiotika-haltigem LB-Medium (3.1.5) bei 37 °C inkubiert. Das Wachstum in Flüssigkulturen erfolgte in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben mit Schikanen, die maximal mit ⅓ des nominellen Volumens befüllt waren, auf einen Rotationsschüttler bei 180 rpm. Die Kultivierung auf LB-Agarplatten erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C. Zur Herstellung von Glycerol-Dauerkulturen wurden 700 µl einer Übernacht-Kultur mit 300 µl sterilen 79%igen [v/v] Glycerol versetzt, 1 h auf einem Schüttler gemischt und bei -80 °C eingefroren.

3.2.2 Molekularbiologie

3.2.2.1 DNA-Isolation

Für die Isolation genomischer DNA aus den Cyanobakterien *Nostoc* sp. PCC 7120 und *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurden 200 µl Kultur steril in ein 1.5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt, mit 200 µl Tris-gepufferten Phenol versetzt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden der Lösung 200 µl Chloroform zugesetzt, gemischt und für 5 min bei 11000 rpm bei RT zentrifugiert. Nach Abnahme der oberen, wässrigen Phase wurde dieser wiederholt 1 Volumenteil (VT) Chloroform zugesetzt, gemischt und erneut für 5 min bei 11000 rpm bei RT zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 1.5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.2.2 Plasmid-Minipräparation

Die Aufarbeitung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode von Bimboim and Doly (1979). Für die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 2x 2 ml einer Übernachtkultur bei 11000 rpm für 2 min bei RT zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 100 µl Lösung I (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 15 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Glukose) resuspendiert und anschließend 200 µl Lösung II (1% SDS, 0.2 N NaOH) zum Ansatz pipettiert und dieser für 10 min bei RT inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 150 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat, 20% Essigsäure) und anschließender Inkubation von 15 min auf Eis renaturiert. Nach Zugabe von 1 VT Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und Zentrifugation bei 11000 rpm für 5 min bei RT konnte die obere, wässrige Phase in ein neues steriles 1.5 ml Eppendorf-Gefäß überführt werden. Die Plasmid-DNA wurde unter Zugabe von 1 VT Isopropanol für mind. 30 min auf Eis gefällt und anschließend bei 11000 rpm für 15 min bei RT zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen. Um alle Rückstände des Ethanols aus dem Ansatz zu entfernen, wurde dieser für 5 min mit offenem Deckel bei 55 °C inkubiert. Die Resuspension des Pellets erfolgte in

30-50 µl TE-RNAse (100:1). Um RNA-Verunreinigungen zu entfernen, wurde der Ansatz mind. 30 min bei 5000 rpm inkubiert. Die RNAse-Inaktivierung erfolgte für 5 min bei 68 °C. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde entweder direkt eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

3.2.2.3 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die zu klonierenden DNA-Fragmente oder Plasmide wurden in einem 1.5%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.2.8) und mit einer sterilen Skalpellklinge unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Agaroseblöcke wurden in sterile 1.5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Die DNA-Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II PCR Clean-up and Gel Extraction Kits (Macherey-Nagel) laut Herstellerangaben. Die Elution der DNA erfolgte in 30 µl sterilem bidest. H_2O. Die isolierten DNA-Fragmente wurden direkt in der Ligation eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

3.2.2.4 Polymerasekettenreaktion-PCR

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Cyanobakterien erfolgte mittels des PCR-Mastermix der Firma Qiagen. Um die natürliche Fehlerrate der Polymerase zu minimieren, wurden dem Ansatz 0.2 µl Elongase®-Enzym-Mix der Firma Invitrogen zugegeben. Die PCR-Ansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 10 µl 1x *Taq*-Mastermix: 250 U Elongase und 5 pmol μl^{-1} je Primer, sowie 1 µl *Template*-DNA. Die Amplifikation der Gene aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* und der Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* erfolgte durch die Phusion™-Polymerase der Firma New England Biolabs. Der PCR-Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 20 µl 1x Phusion GC Puffer: 200 µM je dNTP, 0.5 µM je Primer, 3% DMSO, 0.002 U/µl Phusion Polymerase, sowie 1 µl *Template*-DNA. Die verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7. PCR-Programme.

Schritt	Zeit	Dauer	Wiederholungen
Amplifizierung von *slr1556*			
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	
Denaturierung	20 sec	95 °C	
Annealing	30 sec	52 °C	27x
Elongation[1)]	30 sec	72 °C	
Finale *Elongation*	5 min	72 °C	
Amplifizierung von *all8087, alr0058, all1890, slr1908, HPR7822,*			
Initiale Denaturierung	2 min	94 °C	
Denaturierung	15 sec	94 °C	
Annealing	30 sec	58 °C	10x
Elongation	1 min	72 °C	
Denaturierung	15 sec	94 °C	
Annealing	30 sec	58 °C	20x
Elongation[2)]	1 min	72 °C	
Finale *Elongation*	7 min	72 °C	
Amplifizieren von *Cr-LOX, Cm-GOX*			
Initiale Denaturierung	30 sec	98 °C	
Denaturierung	10 sec	98 °C	
Annealing	1 min	50 °C	35x
Elongation	1 min 30 sec	72 °C	
Finale *Elongation*	4 min	72 °C	
Amplifizieren von pGemt-*all0170*-Varianten			
Initiale Denaturierung	30 sec	98 °C	
Denaturierung	10 sec	98 °C	
Annealing	30 sec	60 °C	30x
Elongation	1 min	72 °C	
Finale *Elongation*	7 min	72 °C	

[1)] + 3 sec pro Zyklus; [2)] + 20 sec pro Zyklus

3.2.2.5 Site-Specific-Mutagenesis-PCR

Die *Site-Specific-Mutagenesis* zum Austausch einzelner Aminosäuren im No-LOX-Protein (All0170) wurde durch den Austausch einzelner Basen im Gen des Proteins erreicht. Dazu wurden phosphorylierte Primer mit einem an der entsprechenden Position veränderten Nukleotid degeneriert (3.1.3). Diese Primer wurden in einer PCR mit dem pGemT-all0170-Plasmid eingesetzt um den gesamten Vektor inklusive der all0170-Variante, bei der nun an

einer Position ein verändertes Nukleotid eingebaut wird, zu amplifizieren. Die Doppel- und Dreifach-Austauschvarianten wurden generiert, in dem als *Template* die Einzel- bzw. Doppelaustausch-Varianten eingesetzt wurden. Die Amplifikation des Vektors inkl. all0170 bzw. all0170-Variante erfolgte durch die Phusion™-Polymerase der Firma New England Biolabs. Der PCR-Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 20 µl 1x Phusion HF Puffer: 200 µM je dNTP, 0.5 µM je Primer, 3% DMSO, 0.002 U/µl Phusion Polymerase, sowie 1 µl *Template*-DNA. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Der amplifizierte Vektor wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und die betreffende DNA-Bande aus dem Gel geschnitten und lt. Punkt 3.2.2.3 die DNA aus dem Gel eluiert. Anschließend wurde der lineare Vektor in einer Ligation geschlossen und in *E. coli* transformiert. Alle Konstrukte wurden via Restriktion (3.2.2.7) und Sequenzierung (3.2.2.6) überprüft. Zur Expression der No-LOX-Varianten wurde das entsprechende Genfragment in den Expressionsvektor pET28a kloniert.

3.2.2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung der pGemT-Konstrukte erfolgte durch die Firma SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH). Die Überprüfung der Sequenzierung wurde unter Zuhilfenahme des *Sequence Alignment* Explores von BioEdit durchgeführt.

3.2.2.7 DNA-Restriktion

Die Restriktion von Plasmid-DNA erfolgte, wenn nicht anders vermerkt mit den Enzymen und Puffersystemen der Firma Fermentas laut Herstellerangaben. Die Restriktion enthielt 3-5 µl Plasmid-DNA und 0.5 Units pro Restriktionsenzym und wurde 1-4 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Restriktion in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.2.8).

3.2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Für die analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten und deren Größenbestimmung wurde Agarose in 1xTAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht und gelöst. Der Agarosegehalt wurde der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente angepasst (0.7-1.5% Agarose). Anschließend wurde die Agarose auf ca. 60 °C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0.1 µg ml^{-1}) versetzt. Die flüssige Agarose wurde je nach Probenzahl in verschieden große Horizontal-Gel-Apparaturen gegossen. Die zu analysierenden Proben wurden mit 0.2 VT Stopplösung (10 mM Na_2PO_4, pH 7.0, 50% [v/v] Glycerin, 0.4% [w/v] Orange G) versetzt und in die Geltaschen geladen. Als Größenstandard dient der

GeneRuler™ 1 kb DNA-Marker oder der λDNA/*Eco*RI+*Hind*III-Marker (Fermentas). Die DNA-Fragmente wurden in 1xTAE bei einer Spannung von 70-100 V für 30-45 min aufgetrennt. Die aufgetrennten Fragmente und deren Größe wurden im UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert.

3.2.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

Für die Klonierung der amplifizierten Gene wurde das pGemT-Kit (Promega) verwendet. Dieser Vektor besitzt eine Mutiple Klonierungsstelle in einer für β-Galaktosidase kodierenden Region, wodurch die sogenannte Blau-Weiß-Selektion möglich ist. Die Klonierung erfolgte nach Herstellerangaben.

Für die heterologe Expression gewünschter Proteine wurde die kodierende Region durch Restriktion aus dem vorher verifizierten pGemT-Konstrukt geschnitten. Den zu klonierenden Genen wurden durch Verwendung verlängerter Primer Restriktionsschnittstellen angehängt. Dies ermöglichte das Einbringen der Gene in den Expressionsvektor in gewünschter Orientierung.

3.2.2.9.1 Ligation

Die Ligation von PCR-Fragmenten in das pGemT-Vektorsystem (Promega) erfolgte laut Herstellerangaben. Die Ligation der verifizierten Gene in den Expressionsvektor und die Selbstligation der unter Pkt. 3.2.2.5 amplifizierten Konstrukte erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl 1x Ligase-Puffer: 5 Units T4-DNA-Ligase und *Insert*- sowie Vektor-DNA im Verhältnis von 50:1. Alle Ansätze wurden in einem mit Wasser gefüllten, geschlossenen Styropor-Behälter über Nacht bei 4 °C inkubiert.

3.2.2.9.2 Transformation

Für die Transformation wurden 100 µl chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (DH5α, Top10 oder BL21; siehe Pkt. 3.1.1) auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die kompetenten Zellen zum Ligationsansatz oder 1 µl Plasmid-DNA pipettiert, durchmischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Hitzeschock für 90 sec bei 42°C und anschließende Inkubation von 5 min auf Eis. Den Zellen wurden 500 µl steriles LB-Medium zugesetzt und der Ansatz bei 37 °C für maximal 1 h geschüttelt (180 rpm). 50-100 µl und der verbliebene Rest der Transformation wurden auf zwei LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden

Klone mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und eine Übernachtkultur für die weitere Verifizierung beimpft.

3.2.3 Protein- und Enzymanalytik

3.2.3.1 Expression rekombinanter Proteine in E. coli

Die Expression rekombinanter Proteine durch *E. coli* BL21 erfolgte immer in LB-Flüssigmedium mit der entsprechenden Antibiotika-Zugabe.

3.2.3.1.1 Testexpression

Die Testexpression erfolgte in einem Volumen von 5 ml in einem Reagenzglas. Dazu wurden 4.5 ml LB-Medium mit 500 µl einer Übernachtkultur beimpft und der Ansatz für 2 h bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Nach der Probenahme (100 µl) wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch die Zugabe von 1 mM IPTG (pET28a) oder 200 µg l^{-1} AHT (IBA43+) induziert und weitere 2 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert und eine weitere Probe von 100 µl entnommen. Die Proteine der Proben wurden anschließend in einer SDS-PAGE (3.2.3.3) der Größe nach aufgetrennt. Konnte in der induzierten Probe eine verstärkte Bande der entsprechenden Größe ausgemacht werden, verlief die Testexpression positiv und konnte im großen Maßstab wiederholt werden (3.2.3.1.2).

3.2.3.1.2 Überexpression rekombinanter Proteine

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden 200 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit 5 ml einer Übernachtkultur beimpft und diese wenn nicht anders vermerkt bei 30 °C für 6 h bei 170 rpm geschüttelt. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG (pET28a) oder 200 µg l^{-1} AHT (IBA43+) über Nacht bei 30 °C. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 10000 rpm für 6 min bei 4 °C. Das Pellet konnte bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert werden. Die Resuspension des Pellets erfolgte je nach Enzym in Natriumphosphatpuffer (20 mM Natriumphosphat pH 7.4; 500 mM NaCl; Reduktasen/Dehydrogenasen) oder Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM FMN; Oxidasen). Der Zellaufschluss erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung (Braun Labsonic U, 50 W, 4x 30 sec). Zwischen den einzelnen Intervallen wurde die Ultraschallspitze in einem Eisbad gekühlt, umso unnötiges Erwärmen der Zellextrakte zu vermeiden. Durch eine anschließende Zentrifugation bei 10000 rpm für 20 min bei 4 °C wurden die löslichen Proteine von den sedimentierenden Zelltrümmern getrennt. Das erhaltene klare Proteinlysat wurde für die Affinitätschromatografie verwendet.

Außerdem wurden vom Pellet und Lysat 100 µl entnommen und diese für eine spätere SDS-PAGE eingefroren.

3.2.3.1.3 Affinitätschromatografie

Durch die Ligation der Gene in die Expressionsvektoren pET28a und IBA43+ konnte den exprimierten Proteinen ein Histidin-Rest (His-*Tag*) angehängt werden. Mit Hilfe dieses His-Tags können die Proteine über eine Nickel-NTA-Matrix aufgereinigt werden. Für die Aufreinigung wurden 2 ml ProBond Slurry (Invitrogen) in leere Säulen gegeben und diese nach Absetzen der Säulenmatrix mit 6 ml bidest. H_2O gewaschen und mit 2x 6 ml des jeweiligen Homogenisationspuffers equilibriert. Anschließend wurde die fertige Säule mit dem Proteinlysat beladen und der Durchfluss aufgefangen. Für die Reduktasen/Dehydrogenasen-Proteine erfolgte eine Waschung mit 6 ml Waschpuffer 1 (20 mM Natriumphosphat pH 7.4, 500 mM NaCl, 40 mM Imidazol) und 6 ml Waschung 2 (20 mM Natriumphosphat pH 7.4, 500 mM NaCl, 80 mM Imidazol). Die Waschung der Oxidase-Proteine erfolgte mit den Tris-gepufferten Waschpuffer 1 (20 mMTris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 1mM DTT, 0.1 mM FMN, 40 mM Imidazol) und Waschpuffer 2 (20 mMTris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM FMN, 80 mM Imidazol). Der Durchfluss der Waschungen wurde aufgefangen. Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgte durch die Zugabe von 3x 1 ml Elutionspuffer, der neben den Komponenten des jeweiligen Waschpuffers eine Imidazol-Konzentration von 300 mM enthält. Von allen Fraktionen wurden 100 µl für die anschließende Auftrennung per SDS-PAGE entnommen. Die Elutionen 1 bis 3 wurden in der Größenausschluß-Chromatografie (3.2.3.1.4) weiter bearbeitet.

3.2.3.1.4 Größenausschluss-Chromatografie

Imidazol und andere Salze können die Enzymaktivität beeinträchtigen. Aufgrund dessen wurden die Proteine via PD-10-Säulen (GE Healthcare) laut Herstellerangaben in ein Salz-freies Puffersystem überführt. Verwendet wurden 0.5 ml Eluat 1 und je 1 ml der Eluate 2 und 3. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 3.5 ml 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4 bzw. 20 mM Tris pH 8.0 (inkl. 1 mM DTT und 0.1 mM FMN). Eine Probe von 100 µl wurde für die Proteinbestimmung und Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel abgenommen.

Nach der Aufreinigung wurden die Proteine in 20% Glycerol in flüssigen N_2 schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der unter Pkt. 3.2.3.1 gewonnenen Eluate wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt, wobei eine Verdünnungsreihe des BSA als Standard diente. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Rotis®-Nanoquant (Roth) nach Herstellerangaben. Das Roti-Reagenz wurde 1:5 mit sterilem bidest H_2O zu einer Arbeitslösung verdünnt. In Einweg-Küvetten wurden 990 µl der Arbeitslösung mit 10 µl der zu vermessenden Proteinlösung vermischt und für 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend konnte die Extinktion, welche proportional zum Proteingehalt ist, bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen den Probenpuffer (Blindwert) gemessen werden. Die Proteinkonzentration konnte durch die BSA-Kalibrierung bestimmt werden.

3.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche, denaturierende SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen ihrer Größe entsprechend (Laemmli 1970). Als Proteinstandard wurde der *Protein Molecular Weight* Marker (Fermentas) verwendet. Die Proben wurden vor Beladung des Gels mit ⅓ VT 3x Lämmli-Lösung versetzt und für 10 min bei 90 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Proteine wurden für ca. 30 min bei 90 V und anschließend für ca. 2 h bei 120 V aufgetrennt.

Die Polyacrylamidgele wurden vorsichtig von den Glasträgern gelöst und die aufgetrennten Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel in einer Coomassie-Brillant Blau R-250-Färbelösung für mind. 30 min leicht geschwenkt. Anschließend wurde überschüssiges Coomassie durch mehrmalige Zugabe von Entfärberlösung (40% Methanol, 10% Essigsäure) gelöst bis deutlich scharfe Proteinbanden erkennbar waren. Nach Entfernen von Methanolresten wurde das Gel für weitere evtl. Auswertungen eingescannt und gespeichert.

3.2.3.4 Enzymaktivitätsbestimmung

Die Enzymaktivitäten der Reduktasen bzw. Dehydrogenasen wurde durch spektrophotometrische Messungen der Extinktionsänderung bei 340 nm proportional zu der NADH-Konzentration mit einem Cary-50-Spektrophotometer (Varian) bestimmt. Alle Aktivitäten wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml bei 30 °C gemessen und die Reaktion nach 2-minütiger Aufzeichnung der Hintergrundaktivität durch Zugabe des Substrates gestartet. Die Umsetzung von 1 mM Hydroxypyruvat, Glyoxylat und Pyruvat wurde in 0.1 M MES-Puffer pH 6.5 (inkl. 1 mM DTT) gemessen. Außerdem enthielt der Reaktionsansatz 187.5 µM des Co-Substrats NAD^+ bzw. NADH (Timm et al. 2008). Die 3-Phosphoglycerat-

Dehydrogenase-Aktivität wurde in folgendem Ansatz gemessen: 200 mM Tris pH 9.0, 25 mM EDTA, 2.5 mM DTT und 0.5 mM $NAD(P)^+$ (Ho et al. 1999). Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte gemäß dem Lambert-Beer´schen Gesetz (siehe Formel). Die spezifische Aktivität entspricht der Bildung von 1 µmol NAD(P) oder NAD(P)H in 1 min bei 30 °C durch 1 mg Protein.

$$\mathrm{U}[\mu\mathrm{mol\,min^{-1}\,mg^{-1}}] = \frac{\Delta\mathrm{E}[\mathrm{min^{-1}}] \cdot \mathrm{V_{Reaktionsansatz}}[\mathrm{ml}]}{\varepsilon[\mu\mathrm{mol^{-1}\,cm^2}] \cdot \mathrm{d_{Küvette}}[\mathrm{cm}] \cdot \mathrm{v_{Probe}}[\mathrm{ml}] \cdot \mathrm{c_{Protein}}[\mathrm{mg\,ml^{-1}}]}$$

U spezifische katalytische Aktivität

ΔE Absorptionsänderung bei 340 nm

V Volumen des Reaktionsansatzes

ε molarer Extinktionskoeffizient für NADH (6,22 µmol-1cm2)

d Schichtdicke der Küvette

v Probenvolumen

c Proteinkonzentration der Probe

Die Oxidase-Aktivität wurde über die Konzentrationsänderung des Co-Substrates Sauerstoff mittels einer Hansatech Sauerstoff-Elektrode (Oxygraph) gemessen. Der Reaktionsansatz enthielt 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM FMN, 0.0083% Triton-X 100, 1-50 µl Proteinlösung und 5 mM Substrat und wurde bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 3-minütiger Aufzeichnung der Hintergrundaktivität durch Zugabe des Substrates gestartet. Gemessen wurde die Umsetzung von Glykolat und L-Laktat. Die Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und v_{max} erfolgte durch Veränderung der Glykolat- bzw. L-Laktat-Konzentration (0-10 mM) und wurden durch nicht-lineare Regression über die Michaelis-Menten-Gleichung berechnet (Sigma Plot 11.0).

3.2.4 Bioinformatik

Bioinformatische Methoden wurden herangezogen um die Abstammung der pflanzlichen, photorespiratorischen Proteine zu analysieren.

3.2.4.1 Datenbankrecherche

Die am pflanzlichen 2-Phosphoglykolat (2PG)-Zyklus beteiligten Proteine aus *Arabidopsis thaliana* (Bauwe et al. 2010) und *Nostoc* sp. PCC 7120 (Eisenhut et al. 2008) wurden aus

den Datenbanken TAIR (http://www.arabidopsis.org/) oder Cyanobase (http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/) bezogen. Die Proteine dienten in *Blast*P-Analysen (Altschul et al. 1990) der Identifizierung ähnlicher Sequenzen in den sequenzierten Genomen von 18 Landpflanzen und eukaryotischen Algen sowie 12 Cyanobakterien-Stämmen. Außerdem wurden *Nodularia spumigena* CCY9414 und *Emiliania huxleyi* bei der Suche berücksichtigt, trotz des Fehlens eines vollständig sequenzierten Genoms. Homologe Proteine einiger heterotropher Bakterien, wie *Escherichia coli* K12, *Rhodopseudomonas palustris* HaA2 und CGA009 wurden ebenfalls in phylogenetischen Analysen betrachtet. Die Sequenzen wurden von folgenden Datenbanken bezogen: 1) GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) für *Populus trichocarpa*, *Zea mays*, *Physcomitrella patens*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Ostreococcus tauri*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri, Chlorella variabilis, Coccomyxa subellipsoidea, Micromonas* sp. RCC299, *Ectocarpus silculosus Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Nodularia spumigena* CCY9414, *Escherichia coli* K12, *Rhodpseudomonas palustris* HaA2 und CGA009; 2) JGI (http://www.jgi.doe.gov/) für *Sorghum bicolor, Fragilariopsis cylindrus* und *Emiliania huxleyi*; 3) *Cyanidioschyzon merolae* genome browser (http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/) (Matsuzaki et al. 2004); 4) *Cyanophora paradoxa* (http://cyanophora.rutgers.edu/cyanophora/home.php); CyanoBase für alle Cyanobakterien außer *N. spumigena*. Die Proteinsequenzen der Rotalge *Galdieria sulphuraria* wurden freundlicher Weise von Prof. A. P. M. Weber (Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die *Accession*-Nummern oder ORFs sind in (Tabelle 11,12) zusammengefasst. Zusätzlich wurden 16S rRNA-Sequenzen der genannten Organismen von den Datenbanken GenBank und Cyanobase bezogen.

3.2.4.2 Phylogenetische Analysen

Die Berechnung der Phylogenien der am 2PG-Zyklus beteiligten Proteine und der 16S rRNA erfolgte auf Grundlage eines *Alignments* homologer Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen. Dieses *Alignment* wurde nach dem ClustalW-Algorithmus (Thompson et al. 1994) innerhalb des BioEdit Alignment Editors (Hall 1999) oder des Muscle-Algorithmus' (Edgar 2004) der phylogeny.fr Website (Dereeper et al. 2008) erstellt und falls notwendig visuell ausgebessert. Stark nicht-konservierte Bereiche wurden durch das Programm GBlocks (Castresana 2000) aus dem *Alignment* entfernt. Die Maximum-Likelihood-Analyse der 16S rRNA erfolgte unter Nutzung des General Time Reversible-Substitutionsmodell, welches von einer geschätzten Ratenheterogenität der Sequenzpositionen (α-Parameter der Gamma-Verteilung) ausgeht. Die Wahrscheinlichkeit der entstandenen Knoten wurde mit den *Bootstrap*-Werten für 400 oder 1000 Replikate angegeben.

Für die Berechnung der Maximum-Likelihood-Phylogenien auf Grundlage eines Protein-*Alignments* wurden die Evolutionsmodelle Le and Gascuel (2008) oder WAG (Whelan and Goldman 2001) ausgewählt. Beide Modelle nutzen einen geschätzten α-Parameter der Gamma-Verteilung um die Ratenheterogenität der Sequenzpositionen einzubeziehen.

Die Phylogenien wurden unter Zuhilfenahme des Programmes MEGA 5.1 (Tamura et al. 2011) oder PhyML (Guindon and Gascuel 2003) innerhalb der phylogeny.fr Website berechnet. Die graphische Darstellung und Bearbeitung der Phylogenien erfolgte ebenfalls mit MEGA 5.1.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind nach den Proteinen des 2-Phosphoglykolat-Zyklus gegliedert. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Annahme über die Phylogenie der Glutamat:Glyoxylat-Aminotransferase (GGT) gemacht werden.

4.1 Phylogenie der Chloroplasten phototropher Eukaryoten

Ausgangspunkt der phylogenetischen Analysen der Proteine des 2PG-Zyklus ist ein phylogenetischer Stammbaum, basierend auf 16S rRNA-Sequenzen aus heterotrophen Bakterien, Cyanobakterien und den Chloroplasten phototropher Eukaryoten (Abbildung 5). Übereinstimmend mit anderen Arbeiten (z. Bsp. Le Corguille et al. 2009; Nelissen et al. 1995; Worden et al. 2009), die auf Grundlage eines größeren Datensatzes berechnet wurden, bilden Cyanobakterien, Algen und Landpflanzen eine monophyletische Gruppe. Neben diesem großen Cluster bilden α- und β- Cyanobakterien die Schwestergruppe der phototrophen Eukaryoten. An der Spitze des phylogenetischen Stammbaums bilden alle Landpflanzen eine Gruppe, die sich von den Grünalgen abspaltet. An der äußerstes Position der Landpflanzen und Grünalgen ist die einzellige Grünalge *Chlorella variabilis* positioniert. Die Schwestergruppe der Landpflanzen und Grünalgen bilden die Rotalgen *Cyanidioschyzon merolae* und *Galdieria sulphuraria* und die Chromalveolaten, wie *Thalassiosira pseudonana* (Diatomee) oder *Ectocarpus silculosus* (Braunalge). Das Auftreten der Rotalgen und Chromalveolata in einer Gruppe bestätigt die Entstehung des Plastids der Chromalveolaten aus einer sekundären Endosymbiose mit einer Rotalge (Janoušíkovec et al. 2010; Keeling 2004). Die basale Position der phototrophen Eukaryoten wird durch die Glaucophyta *Cyanophora paradoxa* eingenommen und reflektiert die frühe Divergenz dieser Gruppe von den Rot- und Grünalgen (z. Bsp. Price et al. 2012). *Gloeobacter violaceus,* das einzige Cyanobakterium ohne Thylakoidmembranen, bildet die äußerste Position aller phototrophen Organismen. Die anderen Cyanobakterien teilen sich in zwei *Subcluster*, die α- und β-Cyanobakterien. Eine Ausnahme bilden die β-Cyanobakterien *Acyrochloris* sp. und *Synechococcus elongatus* PCC 6301, die sich von den α-Cyanobakterien abspalten, wie auch schon von Gupta und Mathews (2010) beobachtet. Als Außengruppe dienten 16S rRNA-Sequenzen heterotropher Prokaryoten.

Die monophyletische Gruppe aller phototrophen Organismen (Cyanobakterien und Eukaryoten) spiegelt die cyanobakterielle Abstammung aller eukaryotischen Plastiden wider. Wurde in einer der Phylogenien der pflanzlichen Proteine des 2PG-Zyklus eine ähnliche

Phylogenie gefunden, wurde für dieses Proteine eine cyanobakterielle Herkunft angenommen.

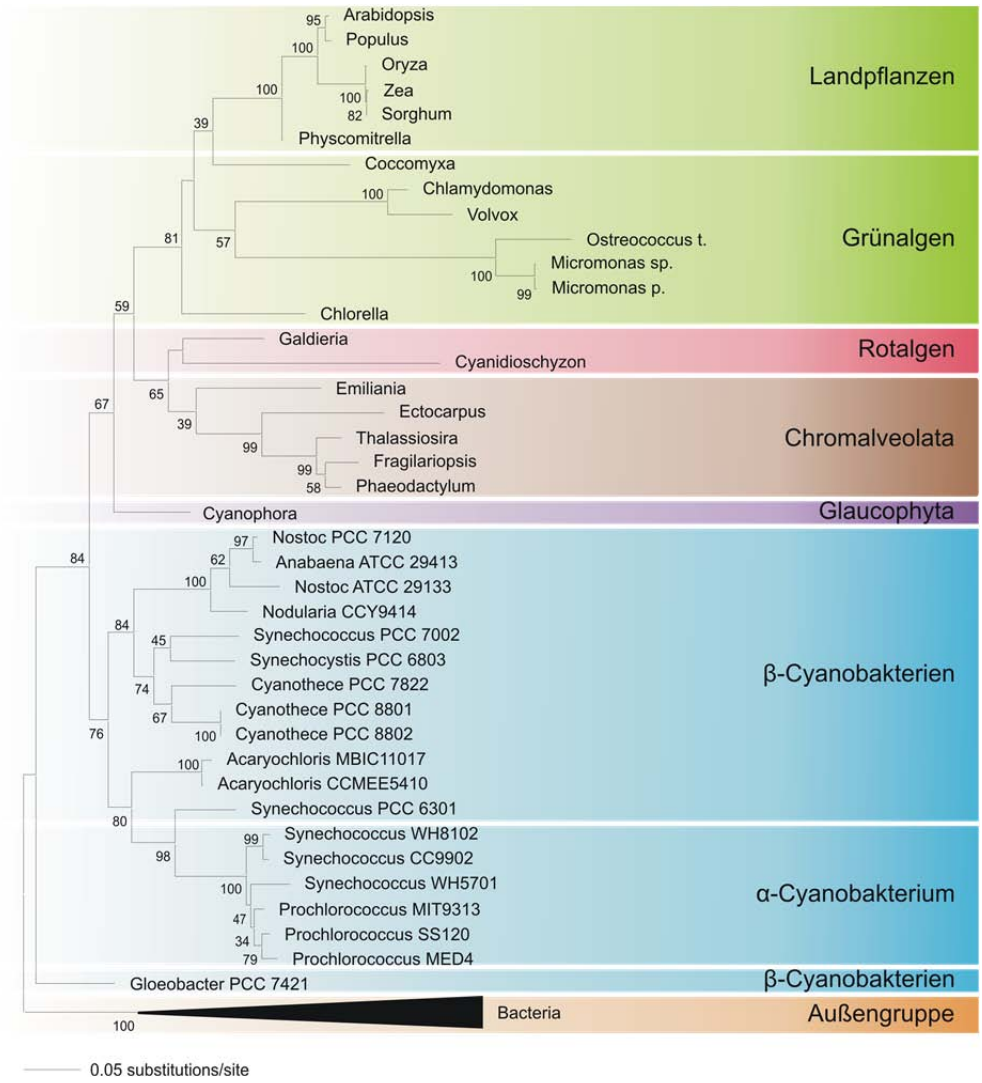

Abbildung 5. Maximum-Likelihood-Phylogenie basierend auf 16S rRNA-Sequenzen, aus 52 heterotrophen Prokaryoten, Cyanobakterien und den Chloroplasten phototropher Eukaryoten. Die Zahlen an den Knoten repräsentieren die *Bootstrap*-Werte für 1000 Replikate.

4.2 Phosphoglykolat-Phosphatase

Phosphoglykolat-Phosphatasen (PGPase) zählen zu der Proteinfamilie der *Haloacid* Dehalogenase-ähnlichen Hydrolasen (IPR005833). Während die photorespiratorische PGPase aus *Arabidopsis* identifiziert werden konnte (At5g36790; Schwarte and Bauwe 2007), ist bis heute unklar, welches Enzym in Cyanobakterien das, aus der Oxygenase-Reaktion der Rubisco resultierende 2PG dephosphoryliert. *Blast*P-Analysen, ausgehend von der *Arabidopsis* PGPase identifizierten in *Synechocystis* sp PCC 6803 drei Kandidaten-

Proteine Slr1762, Sll1349 und Slr0459, die allerdings nur wenig Sequenzähnlichkeit zu der *Arabidopsis* PGPase aufweisen (~20%). Im Gegensatz dazu, weisen die putativen PGPasen aus der Glaucophyta *Cyanophora paradoxa* und den Rot- und Grünalgen eine relativ hohe Sequenzähnlichkeit auf (~50%). Dies spricht für die Polyphylie der PGPasen aus Cyanobakterien und phototrophen Eukaryoten. Trotz der Lokalisation der pflanzlichen PGPase im Chloroplasten wurde dieses Protein nicht während der primären Endosymbiose ins Genom der phototrophen Eukaryoten transferiert. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der Heterogenität der PGPasen aus phototrophen Eukaryoten und Cyanobakterien keine vertrauenswürdige Phylogenie berechnet werden.

4.3 Glykolat-Oxidase

4.3.1 Phylogenie der GOX

Die *Arabidopsis* Glykolat-Oxidase 2 (At-GOX2, At3G14415) wurde in einer *Blast*P-Analyse als *Template* eingesetzt um ähnliche Proteine in Cyanobakterien und Algen zu identifizieren. Die putative Oxidase aus *Nostoc* sp. PCC 7120 (All0170) wurde in einer zweiten *Blast*P-Analyse gegen cyanobakterielle Proteine genutzt. Die identifizierten Proteine zählen alle zu den α-Hydroxysäure-Oxidasen (EC 1.1.3.15) und sind charakterisiert durch die Umsetzung von L-Isomeren der α-Hydroxysäuren. Die putativen GOX-Proteine wurden genutzt um die Phylogenie der At-GOX2 zu berechnen. Im phylogenetischen Stammbaum lassen sich die Proteine in zwei *Cluster* unterteilen (Abbildung 6). Das untere, kleinere *Cluster* besteht ausschließlich aus α- und γ-Proteobakterien. In einem anderen phylogenetischen Stammbaum wurden neben diesen auch andere bakterielle Proteine einbezogen, die bereits als Laktat-Oxidasen beschrieben sind (Hackenberg, Kern et al. 2011). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich auch bei den Proteinen aus den, in diesem Baum untersuchten proteobakteriellen Proteinen um Laktat-Oxidasen handelt. Das zweite große *Cluster* umfasst ausschließlich phototrophe Organismen, an deren Basis erstaunlicherweise die putativen GOX-Proteine der Cyanobakterien positioniert sind und wird durch einen hohen *Bootstrap*-Wert (100%) unterstützt. Die Monophylie der GOX-Proteine aus Cyanobakterien, Algen und Landpflanzen ist ein Indiz für einen cyanobakteriellen Ursprung der pflanzlichen Glykolat-Oxidasen. Gene für GOX-ähnliche Proteine konnten allerdings nicht in allen cyanbakteriellen Genomen detektiert. Cyanobakterien mit einem GOX-ähnlichen Protein besitzen alle die Fähigkeit molekularen Stickstoff zu fixieren.

Die Grünalgen positionieren sich als äußerste Gruppe der phototrophen Eukaryoten. Dieses *Clustering* ist unerwartet, da sie im phylogenetischen Stammbaum, basierend auf der chloroplastidären 16S rRNA-Gene die Schwestergruppe der Landpflanzen bilden. In der

Phylogenie der pflanzlichen GOX bilden Rotalgen die Schwestergruppe der Landpflanzen. Die Abspaltung der Glaucophyta *Cyanophora paradoxa* von der Landpflanzen-Rotalgen-Gruppe ist nur durch einen schwachen *Bootstrap*-Wert (<50%) unterstützt und bedarf weiterer Untersuchungen. Die Braunalge *Ectocarpus silculosus* positioniert sich an der Basis der Archaeplastida-Linien.

Ob es sich bei den Proteinen aus Cyanobakterien, Grün- und Rotalgen tatsächlich um Glykolat-Oxidasen handelt, wurde im Weiteren durch die biochemische Charakterisierung der rekombinanten Proteine untersucht.

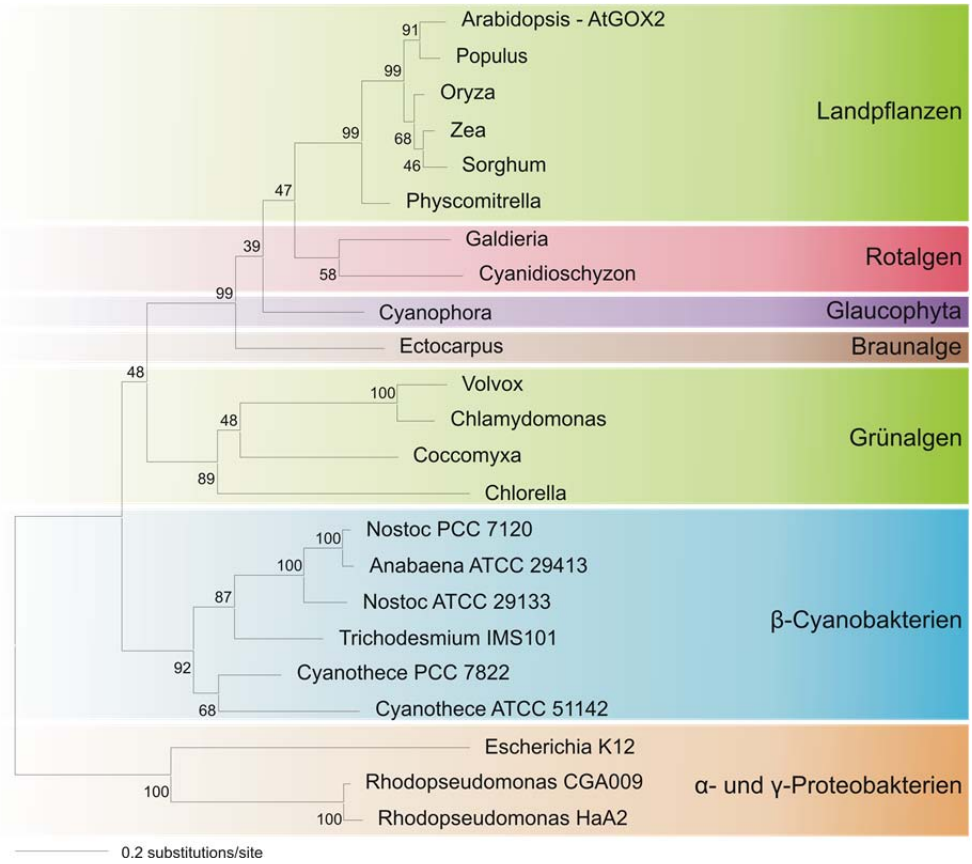

Abbildung 6. Maximum-Likelihood-Baum der *Arabidopsis* Glykolat-Oxidase (At-GOX2) basierend auf 23 Sequenzen. Um die Datengrundlage zu vergrößern, wurden putative GOX-Proteine von *Trichodesmium erythraeum* IMS101 (Tery_2398) und *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (cce_1717) einbezogen. Die Zahlen an den Knoten repräsentieren die *Bootstrap*-Werte für 1000 Replikate.

4.3.2 Biochemie der GOX

Die biochemische Charakterisierung des All0170-Proteins aus *Nostoc* ergab, dass es sich bei diesem Enzym um eine L-Laktat-Oxidase handelt und wurde aufgrund dessen als No-LOX bezeichnet (Hackenberg, Kern et al. 2011). Dies wird durch die hohe Affinität des Proteins zu L-Laktat (K_m von 0.039±0.007 mM) verglichen mit Glykolat (K_m von

0.233±0.05 mM) und der über 200fach höheren spezifischen Aktivität mit L-Laktat unterstützt (Tabelle 8; Hackenberg, Kern et al. 2011).

Im phylogenetischen Stammbaum steht die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* zwischen den cyanobakterielle Laktat-Oxidasen (LOX) und den pflanzlichen GOX-Proteinen. Somit könnte das Protein eine Zwischenstufe in der Evolution von der cyanobakteriellen No-LOX zu der pflanzlichen At-GOX2 bilden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das Gen der putative GOX aus der Grünalge isoliert (siehe Hackenberg, Kern et al. 2011) und in den Expressionsvektor pET28a kloniert und das heterologe Protein in *E. coli* überexpremiert. Durch das His-*Tag* des rekombinanten Proteins konnte die putative GOX über eine Affinitätschromatografie aufgereinigt und anschließend biochemisch charakterisiert und mit der No-LOX und At-GOX2 verglichen werden.

Tabelle 8. Enzymkinetische Parameter der L-Laktat- und Glykolat-Oxidasen aus *Nostoc* (No-LOX), *Chlamydomonas* (Cr-LOX) und *Arabidopsis* (At-GOX2) mit L-Laktat und Glykolat als Substrat. Gemessen wurden die Enzymaktivitäten von mindestens drei biologischen Replikaten (Hackenberg, Kern et al. 2011).

	L-Laktat		Glykolat	
	K_m (mM)	v_{max} (µmol min^{-1} mg^{-1})	K_m (mM)	v_{max} (µmol min^{-1} mg^{-1})
No-LOX	0.039 ± 0.007	12.73 ± 1.55	0.233 ± 0.05	0.049 ± 0.021
Cr-LOX	0.081 ± 0.027	10.59 ± 0.46	1.244 ± 0.063	0.189 ± 0.059
At-GOX2	0.356 ± 0.182	0.742 ± 0.036	1.906 ± 0.64	35.64 ± 11.16

Ähnlich, wie für die No-LOX konnte auch für das Protein aus *Chlamydomonas* eine höhere Affinität zu L-Laktat (K_m von 0.081±0.027 mM) verglichen mit Glykolat (K_m von 1.244±0.063) detektiert werden. Aufgrund dessen wurde das Protein Cr-LOX genannt. Die maximale spezifische Aktivität (v_{max}) der Cr-LOX für L-Laktat ist 50mal höher als für Glykolat. Im Gegensatz dazu weist die At-GOX2 einen 40mal höheren v_{max}-Wert mit Glykolat gegenüber L-Laktat auf. Zwar ist auch für die Cr-LOX eine deutliche Präferenz für L-Laktat zu erkennen, vergleicht man aber das Verhältnis der L-Laktat- zu Glykolat-Oxidase-Aktivität der Cr-LOX mit der No-LOX und At-GOX2, zeigt sich eine Entwicklung zu einer Glykolat-Oxidase. Die kinetischen Paramater positionieren die Cr-LOX, genauso wie die phylogenetischen Analysen zwischen die At-GOX2 und No-LOX (Abbildung 8).

Position in *Nostoc*		28	29	81	82	110	112	135	137	163	165	172	212	239	263	266	294	298	318
GOX	At-GOX2	Y	Y	P	T	S	W	Q	Y	T	D	R	V	K	H	R	D	R	R
	Cm-GOX	Y	Y	P	T	S	W	Q	Y	T	D	R	V	K	H	R	D	R	R
	Cyanophora	Y	Y	P	T	S	W	Q	Y	T	D	R	V	K	H	R	D	R	R
	Ectocarpus	Y	Y	P	T	S	W	Q	Y	T	D	R	V	K	H	R	D	C	R
LOX	Cr-LOX	Y	Y	P	M	S	V	Q	Y	T	D	R	F	K	H	R	D	R	R
	No-LOX	Y	I	P	M	S	L	Q	Y	T	D	R	F	K	H	R	D	R	R
	A. viridans	Y	I	P	I	S	Y	Q	Y	T	D	R	Y	K	H	R	D	R	R

Abbildung 7. *Alignment* der am aktiven Zentrum der LOX und GOX beteiligten Aminosäuren. Nummern der Aminosäure beziehen sich auf die Position in der No-LOX. *Arabidopsis*: At-GOX2; *Cyanidioschyzon*: Cm-GOX; *Chlamydomonas*: Cr-LOX; *Nostoc*: No-LOX. *Accession* Nummern der Proteine sind At-GOX2 (At3g14415), Cm-GOX (CMQ436C), *Cyanophora* (contig54585), *Ectocarpus* (CBN74053), Cr-LOX (AB610509), No-LOX (All0170), *A. viridans* (AAB36100) (verändert nach Hackenberg, Kern et al. 2011).

Die Abstammung der At-GOX2 von einem cyanobakteriellen Vorläufer bedeutet, dass eine Evolution von einem Laktat-spezifischen (No-LOX) zu einem Glykolat-spezifischen (At-GOX2) Enzym (oder umgekehrt) stattgefunden haben muss. Um die Schritte, die zu der Veränderung der Substratspezifität beigetragen haben, nachzuvollziehen, wurde das aktive Zentrum beschriebener Laktat- und Glykolat-Oxidasen analysiert. In einem *Alignment* der am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren wurden die Aminosäuren des aktiven Zentrums bekannter Laktat- und Glykolat-Oxidasen mit denen aus *Nostoc*, *Chlamydomonas* und *Arabidopsis* verglichen (Abbildung 7). Neben den FMN-bindenden Aminosäuren konnten drei Aminosäurepositionen ausgemacht werden, die besonders wichtig für die Interaktion mit Laktat bzw. Glykolat sind (Hackenberg, Kern et al. 2011 und darin zitierte Quellen). Durch *Site Specific Mutagenesis* konnten die drei Aminosäuren an Position 82, 112 und 212 der No-LOX so verändert werden, dass das aktive Zentrum an diesen drei Positionen dem der At-GOX2 entsprach. Die daraus resultierenden sieben einfach, doppelt oder dreifach mutierten No-LOX-Varianten wurden in *E. coli* überexpremiert und biochemisch analysiert. Mit der Ausnahme der No-LOX-Variante M82T zeigen alle No-LOX-Varianten eine geringere Aktivität mit L-Laktat als Substrat verglichen mit dem Wildtyp-Enzym (Tabelle 9). Im Gegensatz dazu, gelang es in den meisten No-LOX-Varianten einer Erhöhung der Glykolat-Aktivität zu detektieren. Dabei zeigten die Doppel-Aminosäureaustausch-Varianten M82T/L112W und L112W/F212V eine bis 10fach gesteigerte Aktivität mit Glykolat. Betrachtet man die Raten der L-Laktat- zu Glykolat-Aktivität, zeigen alle No-LOX-Varianten eine Abnahme dieser Aktivitätsrate (Abbildung 8). Ferner zeigen die Varianten L112W/F212V und die dreifach-mutierte No-LOX ein LOX/GOX-Verhältnis ähnlich der At-GOX2 (Abbildung 8).

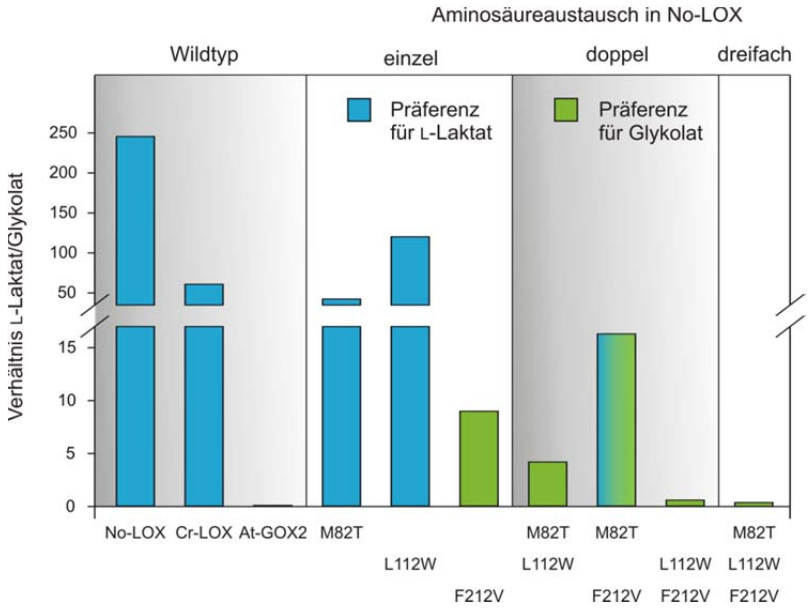

Abbildung 8. Vergleich der Enzymaktivitäten der L-Laktat- und Glykolat-Oxidasen, aus *Nostoc* (No-LOX), *Chlamydomonas* (Cr-LOX) sowie *Arabidopsis* (At-GOX2) und der Aminosäureaustausch-Varianten der No-LOX mit L-Laktat oder Glykolat als Substrat. Die Bezeichnungen der No-LOX-Varianten entsprechen der Wildtyp Aminosäure der No-LOX und der Aminosäure der No-LOX-Variante (Einbuchstaben-*Code*) an der entsprechenden Position in der No-LOX. Dargestellt ist das Verhältnis der L-Laktat/Glykolat-Oxidation.

Die GOX-ähnlichen Proteine aus Rot-, Braun-, und Glaucophyta-Algen bilden die Schwestergruppe zu den GOX-Proteinen aus Landpflanzen. Hingegen positionieren sich die Grünalgen von den Landpflanzen weiter entfernt, als basale Gruppe der phototrophen Eukaryoten. Dieses ungewöhnliche *Clustering* im phylogenetischen Stammbaum der pflanzlichen GOX spiegelt sich im aktiven Zentrum der Oxidasen wider. Das aktive Zentrum der GOX-Proteine aus Rot-, Braun- und Glaucophyta-Algen ist im Gegensatz zu der Cr-LOX mit dem aktiven Zentrum der At-GOX2 identisch (Abbildung 7). Dies lässt die Hypothese zu, dass es sich bei diesen Proteinen im Gegensatz zur Cr-LOX um Glykolat-Oxidasen handelt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das Gen der GOX aus der einzelligen Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* isoliert. Das heterolog exprimierte Protein aus *Cyanidioschyzon* konnte, ebenso wie die anderen Oxidasen über Affinitätschromatografie aufgereinigt und biochemische charakterisiert werden. Das rekombinante Protein der Rotalge besitzt ähnliche biochemische Eigenschaften wie die At-GOX2 (Tabelle 9) und wurde deshalb Cm-GOX genannt. Zwar ist die spezifische Aktivität der Cm-GOX verglichen mit der At-GOX2 mit L-Laktat höher und mit Glykolat geringer, aber die Aktivität der Cm-GOX ist doppelt so hoch mit Glykolat als mit L-Laktat als Substrat (Tabelle 9).

Tabelle 9. Enzymaktivitäten der Wildtyp-Proteine No-LOX, Cr-LOX, Cm-GOX und At-GOX2 verglichen mit den Aminosäureaustausch-Varianten der No-LOX mit Glykolat und L-Laktat als Substrat (verändert nach Hackenberg, Kern et al. 2011).

	Aktivität (µmol min^{-1} mg^{-1})		Verhältnis
	Glykolat (5 mM)	L-Laktat (5 mM)	L-Laktat/ Glykolat
Wildtyp-Enzyme			
No-LOX	0.06 ± 0.01	14.73 ± 3.59	245.5
Cr-LOX	0.16 ± 0.06	9.75 ± 0.46	60.9
Cm-GOX	12.39 ± 1.21	5.79 ± 1.06	0.47
At-GOX2	24.27 ± 5.00	3.05 ± 1.28	0.1
Einzelaustausch-Varianten der No-LOX			
M82T	0.55 ± 0.10	23.34 ± 2.76	42.5
L112W	0.06 ± 0.02	7.69 ± 0.48	120.2
F212V	0.16 ± 0.03	1.43 ± 0.30	9.0
Doppelaustausch-Varianten der No-LOX			
M82T, L112W	0.11 ± 0.06	0.47 ± 0.04	4.2
M82T, F212V	0.47 ± 0.13	7.57 ± 1.10	16.3
L112W, F212V	0.60 ± 0.13	0.38 ± 0.07	0.6
Dreifachaustausch-Variante der No-LOX			
M82T, L112W, F212V	0.26 ± 0.04	0.11 ± 0.03	0.4

4.4 Glycin-Decarboxylase

In allen Phylogenien der Glycin-Decarboxylase (GDC)-Proteine, P, T und L, bilden die phototrophen Eukaryoten eine monophyletische Gruppe mit den Proteinen der α-Proteobakterien (Abbildung 9), was durch hohe *Bootstrap*-Werte unterstützt werden kann. Diese Phylogenien deuten auf einen α-proteobakteriellen Ursprung der GDC-Proteine, welche im Mitochondrium von Pflanzen und Algen lokalisiert sind (Bauwe et al. 2010). Zwar sind die Phylogenien der einzelnen GDC-Proteine ähnlich und die Hauptabzweigungen durch hohe *Bootstrap*-Werte unterstützt, doch die Stellung des γ-Proteobakteriums *E. coli* unterscheidet sich in den einzelnen Maximum-Likelihood-Analysen. Während in der P- und L-Protein-Phylogenie *E. coli* eine monophyletischer Gruppe mit *Rhodopseudomonas* und den phototrophen Eukaryoten bildet, *clustert* das T-Protein von *E. coli* an der Basis der cyanobakteriellen Proteine. Außerdem positionieren sich die P-Proteine der β-Cyanobakterien separat als Schwestergruppe zu den Proteobakterien, Pflanzen und Algen, wobei die α-Cyanobakterien an der Basis stehen. Hingegen konnten die Phylogenien der T- und L-Proteine die Differenzierung der Cyanobakterien nicht klar widergeben. Besonders die

Position von *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 und *Synechococcus* sp. PCC 6301 ist unklar und wird nur von niedrigen *Bootstrap*-Werten unterstützt.

Im Gegensatz zum L-Protein der GDC ist ein weiteres L-Protein, welches Teil der Pyruvat-Dehydrogenase ist, im Chloroplasten lokalisiert. Im phylogenetischen Stammbaum des chloroplastidären L-Proteins bilden, anders als das mitochondriale GDC L-Protein, die Proteine aus Landpflanzen und Algen eine monophyletische Gruppe mit den cyanobakteriellen Enzymen (Lutziger and Oliver 2000).

Neben den großen Untereinheiten P-, T- und L-Protein der GDC wurde auch das H-Protein betrachtet. Jedoch ist dieses Protein sehr kurz und wenig konserviert, was die Berechnung abgesicherter Phylogenien unmöglich macht. Trotzdem sprechen die Phylogenien der anderen GDC-Proteine auch im Falle des H-Proteins für einen α-proteobakteriellen Ursprung dieses Proteins in phototrophen Eukaryoten.

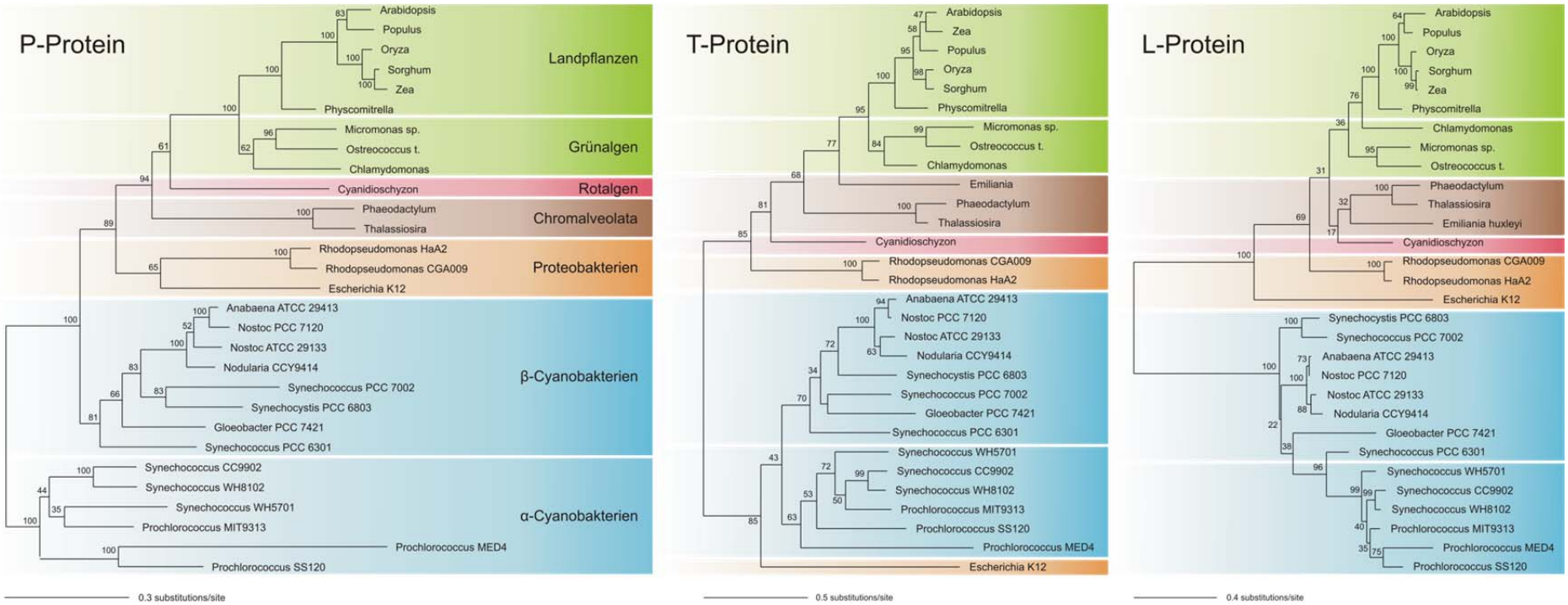

Abbildung 9. Maximum-Likelihood-Phylogenien der GDC P-, T-, und L-Proteine. Die Maximum-Likelihood-Analysen basieren auf 29 Sequenzen des P-Proteins, 30 Sequenzen des T-Proteins und 30 Sequenzen des L-Proteins. Die Zahlen an den Knoten repräsentieren die *Bootstrap*-Werte für 400 Replikate (Kern et al. 2011).

4.5 Serin:Hydroxymethyltransferase

Im *Arabidopsis*-Genom sind fünf Serin:Hydroxymethyltransferase (SHMT)-Isoformen kodiert, deren Proteine in diversen Zellkompartimenten lokalisiert sind (Bauwe et al. 2010; McClung et al. 2000; Voll et al. 2006). Innerhalb dieser Arbeit wurden nur die mitochondrialen Isoformen SHMT1 und SHMT2 betrachtet. Im phylogenetischen Stammbaum der SHMT sind beide Isoformen aus einem gemeinsamen Knoten abgeleitet (Abbildung 10). Die SHMT-Proteine aus Pflanzen und Algen bilden eine monophyletische Gruppe, an deren Basis die SHMT der Haptophyta *Emiliania huxleyi* steht. Außerdem erfolgt die Aufspaltung der Cyano- und Proteobakterien von einem gemeinsamen Knoten. Weder die Proteobakterien, noch die Cyanobakterien stehen in einer direkten Schwestergruppen-Beziehung zu den phototrophen Eukaryoten. Dies macht eine eindeutige Beurteilung der Abstammung der SHMT in phototrophen Eukaryoten unmöglich. Dennoch wird aufgrund der Lokalisation im Mitochondrium eine proteobakterielle Herkunft der photorespiratorischen SHMT vermutet.

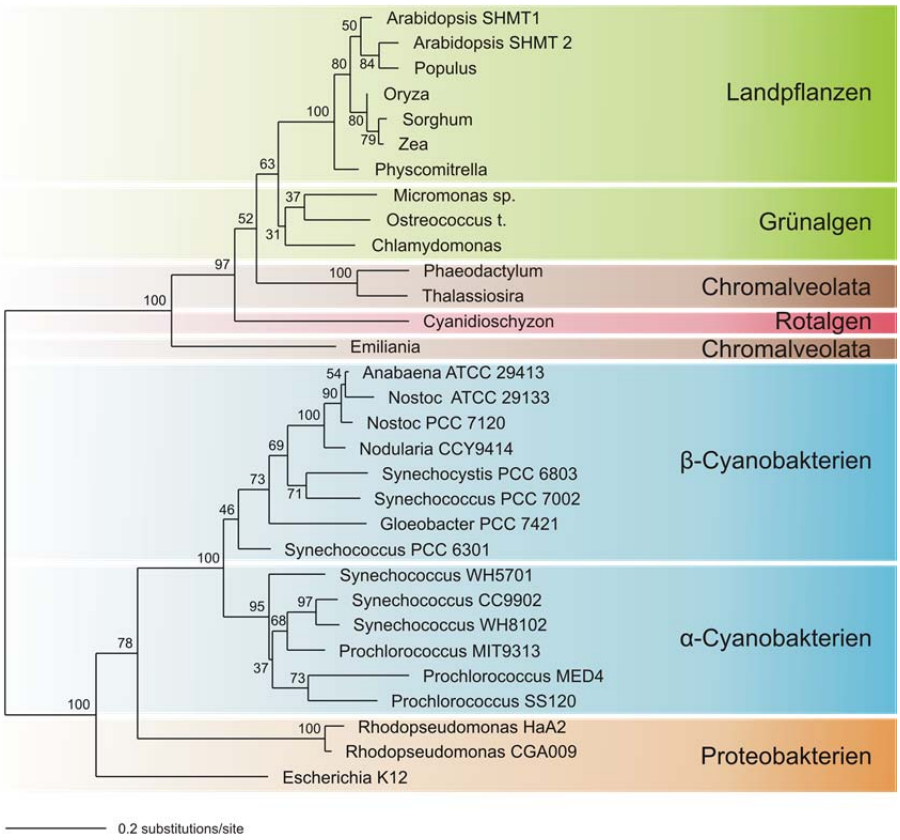

Abbildung 10. Maximum-Likelihood-Phylogenie basierend auf 31 Sequenzen der Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT1 und SHMT2). Die Zahlen an den Knoten repräsentieren die *Bootstrap*-Werte für 400 Replikate (Kern et al. 2011).

4.6 Serin:Glyoxylat-Aminotransferase

Die Serin:Glyoxylat-Aminotransferase (SGT) zählt zu den Aminotransferasen der Klasse V. Die *Arabidopsis* SGT1 (At2g13360) weist hohe Sequenzähnlichkeiten zu Alanin:Glyoxylat-Aminotransferasen auf, weshalb sie in der Literatur oft auch als AGT1 beschrieben wird (Liepman and Olsen 2001). Über cyanobakterielle Aminotransferasen ist bisher wenig bekannt. *Blast*P-Analysen mit der *Arabidopsis* SGT1 identifizierten einige Aminotransferasen innerhalb der Cyanobakterien und Algen, sowie heterotrophen Bakterien und Tieren. Pflanzliche Aspartat-Aminotransferasen dienten als Außengruppe für die Phylogenie-Rekonstruktion der photorespiratorischen SGT. In einem Maximum-Likelihood-Baum SGT-ähnlicher Proteine trennen sich vier große Gruppen (Abbildung 11). Die oberste Gruppe bilden die photorespiratorischen SGT-Proteine aus Landpflanzen mit der biochemisch charakterisierten SGT1 aus *Arabidopsis* (Liepman and Olsen 2001), sowie verwandte Proteine der Grün- und Rotalgen. Als Schwestergruppe dazu stehen die proteobakteriellen Proteine mit Aminotransferase-Ähnlichkeit (Abbildung 11). Diese Beziehung deutet auf eine proteobakterielle Herkunft der SGT in Landpflanzen und den Algen dieses *Clusters*. Alle anderen Gruppen des Maximum-Likelihood-Baums enthalten cyanobakterielle Proteine. Dabei fallen die meisten cyanobakteriellen Proteine in die zwei unteren Gruppen der SGT-ähnlichen Proteine. Im Gegensatz zu den SGT-ähnlichen Proteinen von *Chlamydomonas* und *Volvox* des oberen *Clusters* gruppieren sich die putativen SGTs der Diatomeen und Grünalgen *Micromonas* sp. RCC299, *Micromonas pusilla*, *Ostreococcus lucimarinus* und *Ostreococcus tauri* in einem kleineren *Subcluster* zusammen mit zwei Cyanobakterien-Stämmen *Acaryochloris marina* MMIC11017 und *Acaryochloris* sp. CCMEE5410. Proteine, dieses *Subcluster* ähneln Aminotransferasen der Klasse V aus Bakterien, die allerdings in dieser Phylogenie nicht berücksichtigt wurden. Die Bildung eines separaten *Clusters* und die Ähnlichkeit zu bakteriellen Proteinen deutet auf eine differenzierte Entstehungsgeschichte der SGT in Diatomeen und den basalen Grünalgen, wie *Micromonas* und *Ostreococcus* verglichen mit den SGT-Proteinen aus Landpflanzen, Rot- und anderen Grünalgen. Die Präsenz von nur zwei Cyanobakterien-Stämmen in diesem *Subcluster* und das Fehlen anderer cyanobakterieller Proteine in dieser Gruppe lässt auf einen horizontalen Erwerb dieses Proteins von anderen Bakterien durch die genannten *Acaryochloris*-Stämme vermuten.

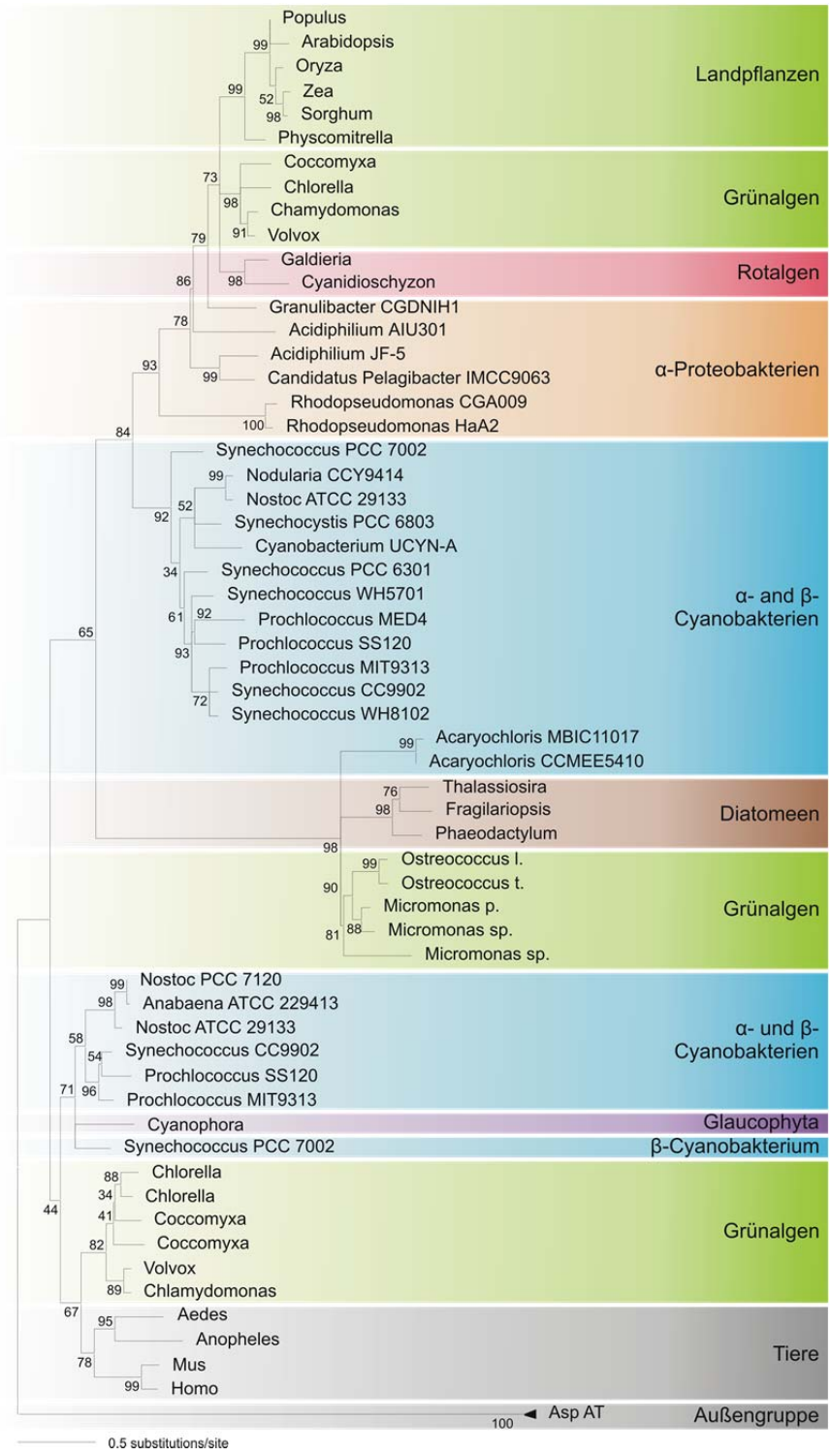

Abbildung 11. Maximum-Likelihood-Baum der Serin:Glyoxylat-Aminotransferase (SGT) basierend auf 62 Sequenzen. Zusätzlichen wurden putative SGT-Proteine der von Tieren *Aedes aegypti* (XP_001660875), *Anopheles gambiae* str. PEST (XP_311559), *Mus musculus* (AAH25799) und *Homo sapiens* (NP_000021) einbezogen. Als Außengruppe wurden pflanzliche Aspartat-Aminotransferasen verwendet: *Arabidopsis thaliana* (At2g30970), *Populus trichocarpa* (XP_002321073), *Oryza sativa* (NP_001057825) und *Zea mays* (NP_001141969). Die Zahlen an den Knoten repräsentieren die *Bootstrap*-Werte für 1000 Replikate.

Im Gegensatz zu den Landpflanzen, Grün- und Rotalgen gruppiert sich eine vermutliche SGT aus der Glaucophyta-Alge *Cyanophora paradoxa* (Glaucophyta) gemeinsam mit den Proteinen aus α- und β-Cyanobakterien. Zusammen bildet dieses *Cluster* die Schwestergruppe zu anderen SGT-ähnlichen Proteinen aus Eukaryoten inklusive einigen Proteinen aus Tieren und ein zweites SGT-ähnliches Protein aus *Chlamydomonas* und *Volvox*. In dem *Cyanophora*-Cyanobakterien-Cluster positionieren sich SGTs aus Cyanobakterien, die in keiner der anderen cyanobakteriellen *Cluster* auftreten. Im Gegensatz zur proteobakteriellen Herkunft der SGT-Proteine in Landpflanzen sowie Rot- und einigen Grünalgen, deutet die Bildung einer monophyletischen Gruppe der SGT-ähnlichen Proteine aus *Cyanophora* und Cyanobakterien auf einen cyanobakteriellen Ursprung dieses Proteins in den Glaucophyta-Algen hin.

Die einzelnen Aufspaltungen der SGT-Phylogenie sind zum Teil sehr ungenau und nur durch geringe *Bootstrap*-Werte unterstützt. Diese Phylogenie verdeutlicht die Komplexität der Evolution von Aminotransferasen der Klasse V.

4.7 Hydroxypyruvat-Reduktase

4.7.1 Phylogenie der HPR

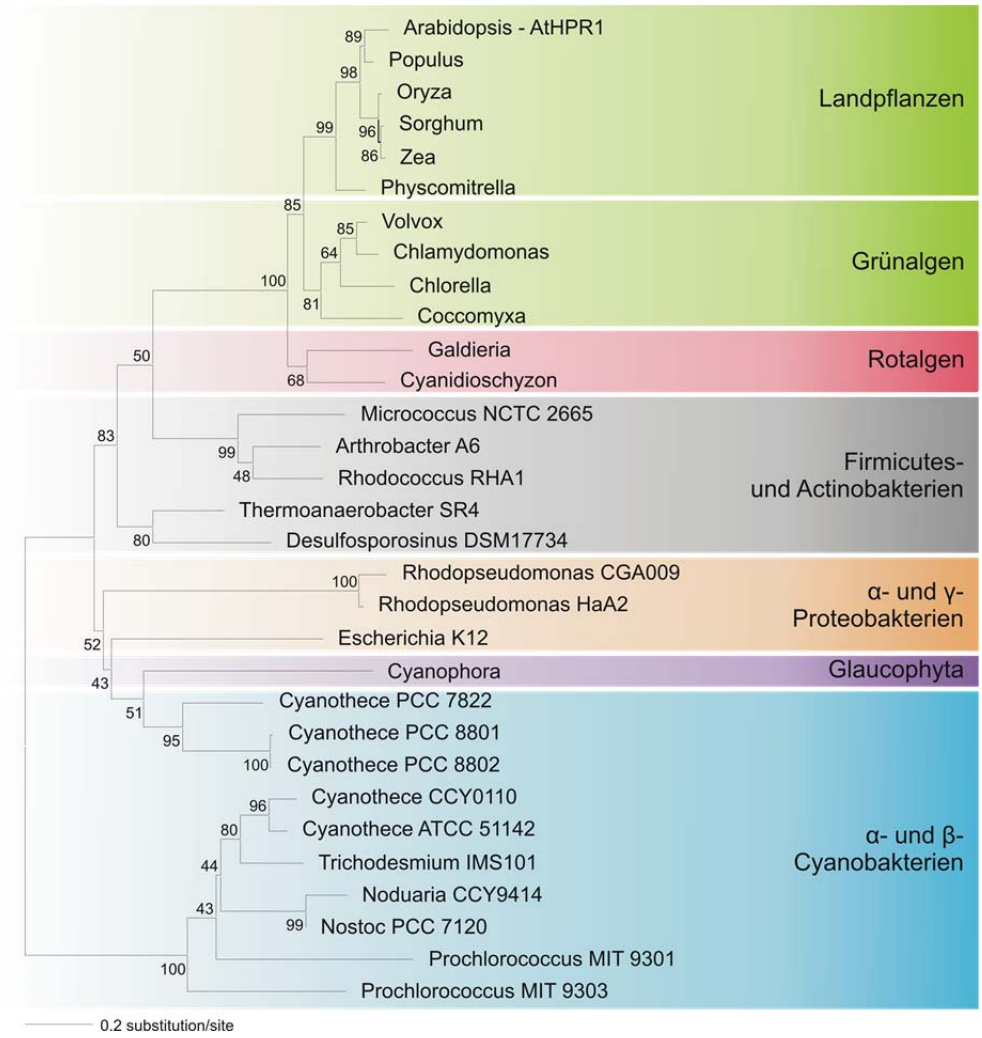

Abbildung 12. Maximum-Likelihood-Baum der *Arabidopsis* Hydroxypyruvat-Reduktase (HPR1) basierend auf 31 Sequenzen. Die Zahlen an den Knoten repräsentieren die *Bootstrap*-Werte für 1000 Replikate.

Die photorespiratorische Hydroxypyruvat-Reduktase katalysiert die NAD(P)H-abhängige Reduktion von Hydroxypyruvat zu Glycerat und zählt zu der Proteinfamilie der NAD(P)-abhängigen 2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen (Pfam Clan CL0325). Dies Proteinfamilie ist charakterisiert durch die Substratspezifität gegenüber D-Isomeren der Hydroxysäuren. In Cyanobakterien konnte bisher noch keine photorespiratorische Hydroxypyruvat-Reduktase funktionell charakterisiert werden. *Blast*P-Analysen ausgehend von der *Arabidopsis* HPR1 (Timm et al. 2008) identifizierten zunächst drei Kandidaten-Proteine in den Cyanobakterien *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Slr2123, Slr1556 und Sll1908) und *Nostoc* sp. PCC 7120

(All8087, Alr0058 und Alr1890). Erste *Cluster*-Analysen zeigten, dass die Proteine aus *Synechocystis* Slr1556, Sll1908 sowie aus *Nostoc* Alr0058 und Alr1890 ein, zu den anderen HPR-ähnlichen Proteinen aus Cyanobakterien und der biochemisch charakterisierten HPR1 von *Arabidopsis* separates *Cluster* bilden. Die anschließende Maximum-Likelihood-Analyse erfolgte nur mit cyanobakteriellen Proteinen ähnlich der des *Nostoc*-Proteins All8087. Ähnlich, wie die No-LOX sind auch die HPR1-ähnlichen Proteine nur in einigen wenigen Cyanobakterien-Stämmen präsent, darunter meist Stickstofffixierer (Abbildung 12). In dem phylogenetischen Stammbaum der *Arabidopsis* HPR1 bilden Proteine aus Landpflanzen, Grünalgen und Rotalgen eine monophyletische Gruppe, die aus einem gemeinsamen Knoten mit Bakterien der *Firmicutes* und *Actinobacter* hervorgehen. Diese Beziehung kann weder mit einer proteobakteriellen noch cyanobakteriellen Herkunft der photorespiratorischen HPR1 erklärt werden.

Neben dem unteren cyanobakteriellen *Cluster*, welches unter anderem das *Nostoc*-Protein All8087 enthält, kann eine zweite Gruppe mit cyanobakteriellen Proteinen definiert werden. Diese Gruppe umfasst neben *E. coli* und *Rhodopseudomonas*, ausschließlich *Cyanothece*-Stämme. Anders als erwartet, fällt auch das HPR-ähnliche Protein aus der Glaucophyte *Cyanophora* in diese Gruppe. Dies spricht für eine andere Phylogenie der HPR aus *Cyanophora* verglichen mit anderen Archaeplastida, wie den Landpflanzen und Rotalgen.

*Blast*P-Analysen mit dem *Synechocystis*-Protein Sll1908 oder dem *Nostoc*-Protein Alr1890 als *Template* sollten Aufschluss über die Funktion dieser Proteine geben. Dabei zeigte sich, dass die cyanobakteriellen Proteine der *Arabidopsis* 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (3PGADH; At1g17745) ähneln. In der Maximum-Likelihood-Analyse der *Arabidopsis* 3PGADH bilden, ähnlich der Art-Phylogenie, Landpflanzen, Grün- und Rotalgen eine monophyletische Gruppe (Abbildung 13). Die Schwestergruppe dazu wird von den α- und β-Cyanobakterien gebildet. An der Basis dieses phylogenetischen Stammbaums stehen α- und γ-Proteobakterien. Die Schwestergruppenbeziehung zwischen den putativen 3PGADH's aus Cyanobakterien und den Proteinen phototropher Eukaryoten, lässt einen cyanobakteriellen Ursprung der pflanzlichen 3PGADH vermuten.

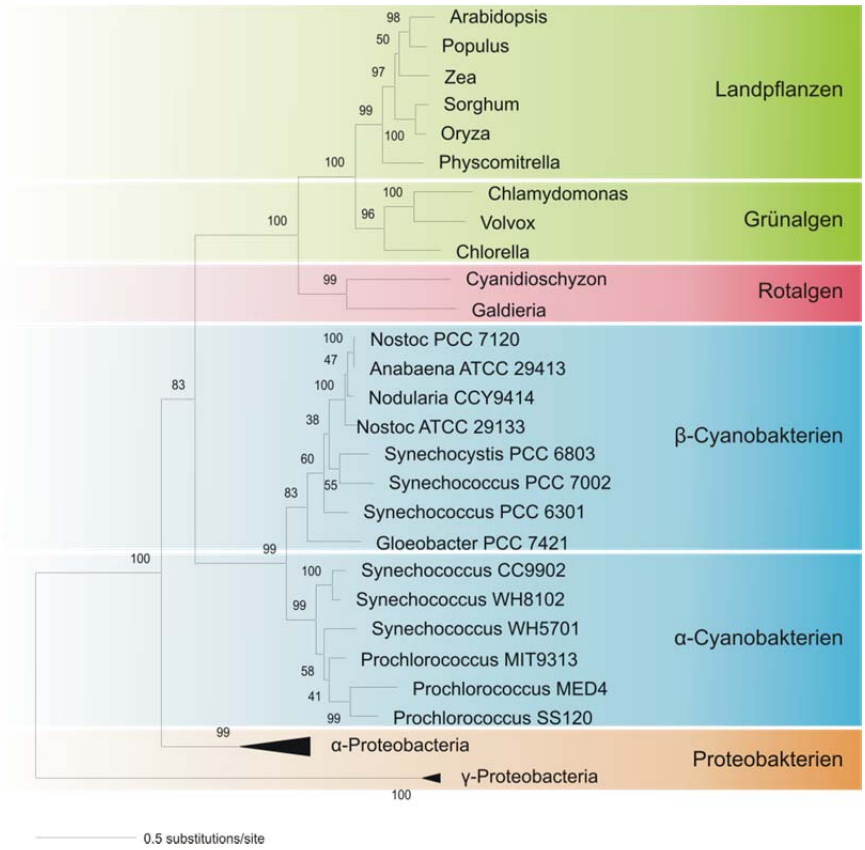

Abbildung 13. Maximum-Likelihood-Baum der *Arabidopsis* 3-Phosphogycerat-Dehydrogenase (3PGADH) basierend auf 37 Sequenzen. Die Zahlen an den Knoten repräsentieren die *Bootstrap*-Werte für 1000 Replikate. Die *Accession*-Nr. sind: *Arabidopsis* At1g17745, *Populus* XP_002316453, *Sorghum* XP_002438779, *Oryza* EAZ37861, *Physcomitrella* XP_001751801, *Zea* ACF86477, *Chlamydomonas* XP_001692431, *Volvox* XP_002950373, *Chlorella* EFN59904, *Cyanidioschyzon* CMC149C, *Nostoc* alr1890, *Anabaena* Ava_3759, *Gloeobacter* glr2139, *Nodularia* CCY9414 ZP_01627985, *Nostoc punctiforme* Npun_R5218, *Prochlorococcus* MED4 PMM1354, *Prochlorococcus* MIT9313 PMT1431, *Prochlorococcus* SS120 Pro1436, *Rhodopseudomonas* CGA009 RPA4308, *Synechocystis* sll1908, *Synechococcus* PCC 6301 syc2486_c, *Synechococcus* CC9902 Syncc9902_0527, *Synechococcus* PCC 7002 SYNPCC7002_A1246, *Synechococcus* WH8102 SYNW0533, *Synechococcus* WH5701 ZP_01084050, *Agrobacterium* NP_356914, *Rhizobium* YP_470937, *Maritimibacter* ZP_01015661, *Caulobacter* NP_422009, *Xanthobacter* YP_001416108, *Methylobacterium* YP_001773092, *Rhizobium* YP_002977271, *Escherichia* NP_289481, *Citrobacter* YP_003368296, *Yersinia* YP_001007569, *Serratia* YP_001480146.

4.7.2 Biochemie der HPR

Um zu überprüfen, ob es sich bei den Kandidaten-Proteinen aus *Synechocystis* (Slr2123) und *Nostoc* (All8087 und Alr0058) um funktionelle HPRs handelt, wurden die Gene aus den Cyanobakterien isoliert. Die Proteine wurden in *E. coli* überexpremiert, aufgereinigt und biochemisch charakterisiert. Aufgrund der Position der HPR-ähnlichen Proteine aus drei *Cyanothece*-Stämmen wurde auch die putative HPR aus *Cyanothece* PCC 7822 (HPR7822) biochemisch charakterisiert.

Die biochemischen Untersuchungen der Alr0058 zeigten, dass es sich bei diesem Enzym eher um eine Pyruvat-Reduktase handelt. Ähnliches konnte im Vorfeld schon für das *Synechocystis*-Protein Slr1556 durch M. Steffen (Abteilung Pflanzenphysiologie) gezeigt werden (nicht-publizierte Ergebnisse). Beide Enzyme haben mit Pyruvat als Substrat sowohl

den höchsten v_{max}-Wert, als auch den niedrigsten K_m-Wert. Trotzdem konnten beide Enzyme die Reduktion von Glyoxylat und Hydroxypyruvat katalysieren (Abbildung 14). Die Proteine Slr2123 und All8087 setzen Hydroxypyruvat und Glyoxylat in einer ähnlichen maximalen Reaktionsgeschwindigkeit um, jedoch deuten vor allem die K_m-Werte von All8087 auf die Bevorzugung von Hydroxypyruvat (Abbildung 14). Allerdings zeigt keines der Proteine eine ähnlich hohe Aktivität mit Hydroxypyruvat, wie die *Arabidopsis* HPR1 (Abbildung 14). Untersuchungen zur Substratspezifität der putativen HPR aus *Cyanothece* zeigten, im Gegensatz zu den Proteinen All8087 und Slr2123 eine ähnlich hohe Aktivität mit Hydroxypyruvat, wie die *Arabidopsis* HPR1. Während die *Cyanothece* HPR mit 1 mM Hydroxypyruvat eine spezifische Aktivität von 396.8 µmol min^{-1} mg^{-1} hat, setzt die *Arabidopsis* HPR1 Hydroxypyruvat mit einer Aktivität von 222 µmol min^{-1} mg^{-1} um. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität der *Arabidopsis* HPR mit 1 mM Glyoxylat 35mal geringer (Timm et al. 2008). Die Aktivität der *Cyanothece* HPR mit 1 mM Glyoxylat ist hingegen nur 4mal geringer als mit Hydroxypyruvat (Tabelle 10).

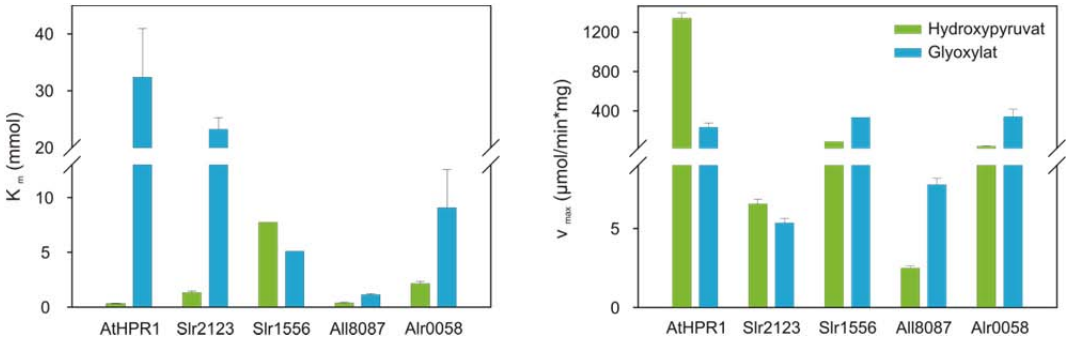

Abbildung 14. Enzymkinetische Parameter der *Arabidopsis* HPR1 (AtHPR1) und putativen HPR-Proteine aus *Synechocystis* (Slr2123, Slr1556) und *Nostoc* (All8087, Alr0058) mit Hydroxypyruvat und Glyoxylat als Substrat. Gemessen wurden die Enzymaktivitäten von drei biologischen Replikaten (Slr2123, All8087 und Alr0058) oder drei technischen Replikaten (AtHPR1). Die Werte der Slr1556 entstammen der Arbeit von M. Steffen (nicht-publizierte Daten).

Weder das Protein Sll1908 noch Alr1890 katalysieren die Umsetzung von Hydroxypyruvat oder Glyoxylat. Im Gegensatz dazu setzen beide Enzyme 3-Phosphoglycerat unter Verbrauch von NAD^+ um (Tabelle 10) und zeigen gleichzeitig nur einen minimale Aktivität mit anderen Substraten. Dies bestätigt die Vermutung, dass es sich bei diesen Proteinen um die am Phosphoserin-Weg beteiligte 3PGADH handelt.

Tabelle 10. Enzymaktivitäten der *Arabidopsis* HPR1 und *Cyanothece* HPR7822, sowie den 3PGADHs aus *Synechocystis* Sll1908 und *Nostoc* Alr1890 mit 1 mM Substrat. n.d., nicht detektiert. *aus Timm et al. 2008.

	Aktivität (µmol min^{-1} mg^{-1})		
	Hydroxypyruvat + NADH	Glyoxylat + NADH	3-Phosphoglycerate + NAD^+
AtHPR1*	222 ± 15.7	6.4 ± 0.6	n.d.
HPR7822	396.8	100.6	n.d.
Sll1908	0	0	1.9 ± 0.3
Alr1890	0	0	5 ± 0.1

4.8 Glycerat-Kinase

Die pflanzliche Glycerat-3-Kinase (GLYK) des 2PG-Zyklus unterscheidet sich sowohl strukturell, als auch phylogenetisch von bakteriellen Glycerat-2-Kinasen (GK), die u. a. auch in Tieren vorkommen (Bartsch et al. 2008; Boldt et al. 2005). Im Gegensatz zu den meisten anderen Cyanobakterien besitzen *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Bartsch et al. 2008) und die thermophilen *Synechococcus*-Stämme JA-3-3Ab und JA-2-3B' eine bakterielle GK. Aufgrund der unterschiedlichen Phylogenien beider Glycerat-Kinasen, wurde nur die Phylogenie der pflanzlichen GLYK betrachtet. Der phylogenetische Stammbaum der GLYK unterstützt eine cyanobakterielle Herkunft dieses Proteins in Pflanzen (Abbildung 15). Dabei bilden die β-Cyanobakterien eine monophyletische Gruppe mit den phototrophen Eukaryoten. Die GLYK von *Gloeobacter violaceus* ist an der Basis der phototrophen Eukaryoten positioniert. Die Stellung dieses Cyanobakterium ist unerwartet, konnte aber in einer Neighboor-Joining-Analyse mit einem *Bootstrap*-Wert von 79% reproduziert werden. Die Beziehungen der Proteine der Algen konnte aufgrund einer niedrigen *Bootstrap*-Unterstützung nicht aufgelöst werden (Abbildung 15). Alle Algen-GLYKs positionieren sich zwischen die Landpflanzen und Cyanobakterien, was eine cyanobakterielle Herkunft dieses Enzyms phototrophen Eukaryoten unterstützt. Wie schon durch andere Autoren beschrieben, konnte in keinen der bisher sequenzierten Diatomeen eine pflanzliche GLYK oder bakterielle GK identifiziert werden. Gleiches gilt auch für die Glaucophyta-Alge *Cyanophora paradoxa*. Allerdings besitzen andere Chromalveolaten wie *Emiliania huxleyi* (Haptophyta) oder *Ectocarpus silculosus* (Braunalge; *Accession* Nr. CBN78958) eine pflanzliche GLYK.

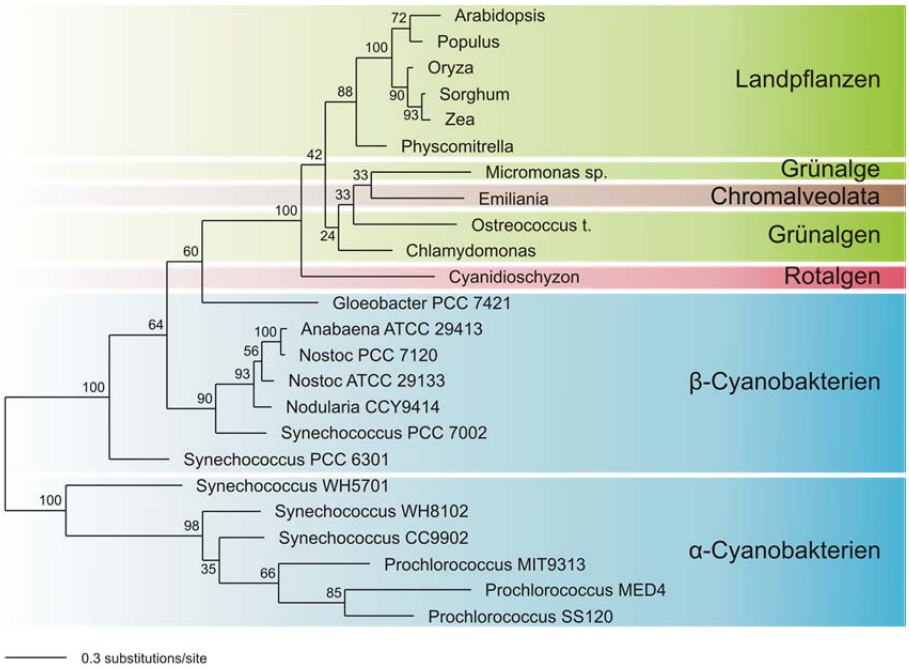

Abbildung 15 . Maximum-Likelihood-Phylogenien basierend auf 24 Sequenzen der pflanzlichen Glycerat-3-Kinase (GLYK). Die Zahlen an den Knoten repräsentieren die *Bootstrap*-Werte für 400 Replikate (Kern et al. 2011).

5. Diskussion

5.1 Der photorespiratorische 2PG-Metabolismus ist in der heutigen, sauerstoffreichen Atmosphäre für Cyanobakterien und Algen essentiell

Durch intensive Forschungen zu Funktion und Biochemie der Photorespiration in Landpflanzen gelang es, alle am photorespiratorischen 2PG-Zyklus beteiligten Proteine in *Arabidopsis* zu identifizieren (Bauwe et al. 2010). Eine umfangreiche Suche nach Proteinen des Pflanzen-ähnlichen 2PG-Zyklus bestätigte das Vorkommen dieser Proteine in allen bisher sequenzierten Cyanobakterien (Kern et al. 2011; Mulkidjanian et al. 2006). Dies schließt auch die marinen *Synechococcus*- und *Prochlorococcus*-Stämme ein, die durch ein stark reduziertes Genom charakterisiert sind (Scanlan et al. 2009). Das Vorkommen von Proteinen für einen Pflanzen-ähnlichen 2PG-Zyklus in allen cyanobakteriellen Genomen weist darauf hin, dass dieser Prozess trotz eines aktiven CCMs im sauerstoffreichen Milieu für alle Cyanobakterien notwendig ist (Eisenhut et al. 2008; Kern et al. 2011). Auch C_4-Pflanzen und viele Algen haben Mechanismen entwickelt Kohlenstoff zu konzentrieren, um so die Photosynthese-Rate unter CO_2-limitierenden Bedingungen zu erhöhen (Giordano et al. 2005). Wie für Cyanobakterien, konnte auch für einige Vertreter dieser Organismengruppen gezeigt werden, dass ein aktiver photorespiratorischer Metabolismus trotz aktivem CCM abläuft und essentiell für das Wachstum unter ambienten Bedingungen ist (Bhatti and Colman 2011; Nakamura et al. 2005; Zelitch et al. 2009).

Die Photorespiration ist in Pflanzen ein multifunktioneller Metabolismus. Die Hauptfunktion des 2PG-Zyklus besteht in der Detoxifizierung toxischer Intermediate, wie 2PG, Glykolat und Glyoxylat und die Rückführung des Kohlenstoffs in den Calvin-Benson-Zyklus (Bauwe et al. 2012). Aber auch ein positiver Effekt der Photorespiration bei Lichtstress und während der Pathogen-Abwehr konnte für Pflanzen gezeigt werden (Foyer et al. 2009; Kozaki and Takeba 1996). Letzteres wird vor allem durch die H_2O_2-produzierende Oxidation von Glykolat im Peroxisom unterstützt (Foyer et al. 2009). Auch für Cyanobakterien werden positive Effekte des 2PG-Zyklus auf die Anpassung an Starklicht vermutet (Hackenberg et al. 2009). Die Rolle des 2PG-Zyklus im Primärstoffwechsel wird aktuell diskutiert (Knoop et al. 2010; Young et al. 2011), bedarf allerdings noch weiterer Untersuchungen (Bauwe et al. 2012). Die Multifunktionalität des 2PG-Metabolismus könnte ein Grund für das Vorkommen des Pflanzen-ähnlichen 2PG-Zyklus, trotz aktiven CCMs in Cyanobakterien und Algen sein (siehe auch Raven et al. 2012).

5.2 Photorespiratorische Enzyme in Pflanzen stammen von α-proteobakteriellen und cyanobakteriellen Proteinen ab

Eine Endosymbiose mit einem stickstofffixierenden β-Cyanobakterien-ähnlichen Endosymbionten vor ca. 1500 Millionen Jahren führte zu der Entstehung des gemeinsamen Vorgängers der Glaucophyta, Rot- und Grünalgen (daraus abgeleitet die Landpflanzen) (Deusch et al. 2008; Yoon et al. 2004). Grün- und vor allem Rotalgen waren Ausgangspunkt in weiteren sekundären Endosymbiosen (Keeling 2004). Die Abstammung der Plastiden phototropher Eukaryoten von einem cyanobakteriellen Endosymbionten kann auch anhand der Phylogenie vieler Markergene oder auch ganzer Genome abgeleitet werden (Björn and Govindjee 2009; Martin et al. 2002; Moreira et al. 2000; Sasaki and Sato 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNA Sequenzen aus heterotrophen Bakterien, Cyanobakterien und den Chlorplasten phototropher Eukaryoten erstellt. Übereinstimmend mit anderen Phylogenien bilden Cyanobakterien, Algen und Landpflanzen eine monophyletische Gruppe (Kern et al. 2011). Ausgehend von diesem Stammbaum wurde die Hypothese untersucht, inwieweit während der primären Endosymbiose neben den Genen der Photosynthese auch die Gene für Proteine des 2PG-Metabolismus in das Genom der späteren Landpflanzen gelangten. Erste Hinweise für solch einen engen Zusammenhang ergaben sich aus der starken Ähnlichkeit in Biochemie und Funktion des 2PG-Metabolismus in Landpflanzen und im cyanobakteriellen Modellstamm *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Eisenhut et al. 2008). Systematische phylogenetischen Analysen der 2PG-Zyklus-Proteine zeigen, dass der pflanzliche 2PG-Zyklus aus einer Vermischung von Proteinen mit einem cyanobakteriellen und α-proteobakteriellen Ursprung besteht (Kern et al. 2011).

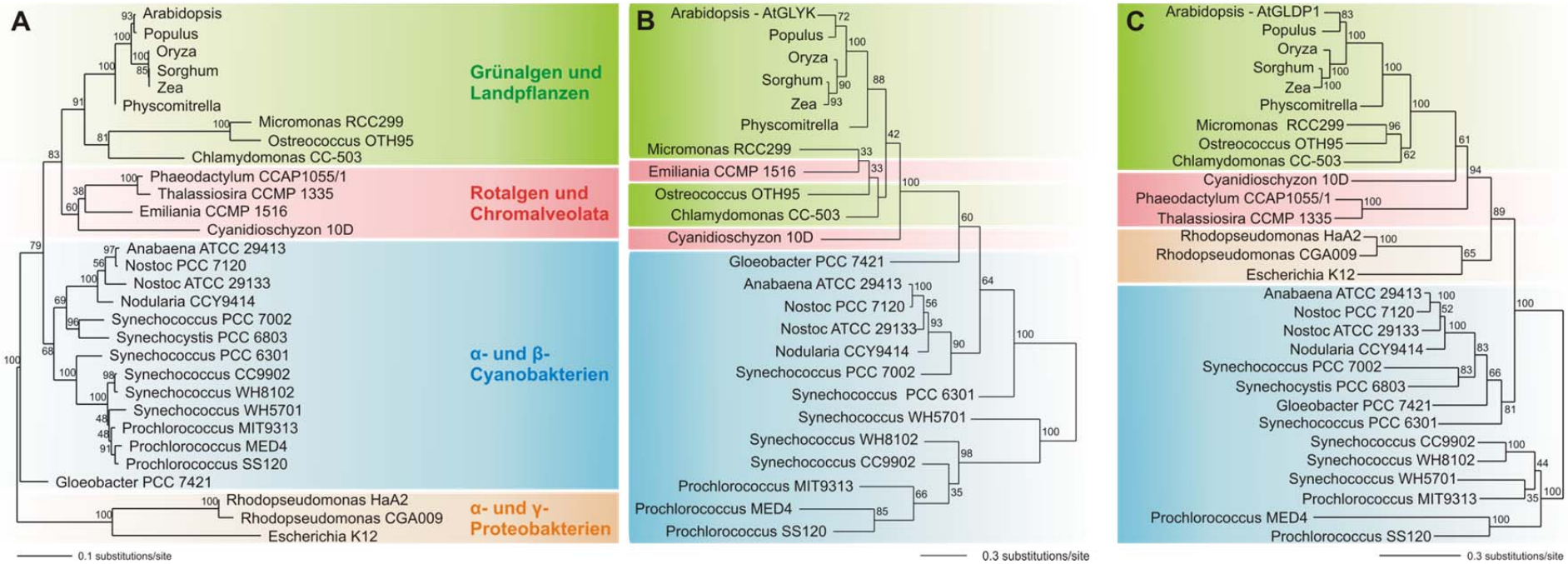

Abbildung 16 Maximum-Likelihood-Phylogenien basierend auf (A) 16S rRNA-Sequenzen aus 30 heterotrophen Prokaryoten, Cyanobakterien und den Chloroplasten phototropher Eukaryoten; **(B)** 24 Sequenzen der Glycerat-3-Kinase (GLYK); **(C)** 29 Sequenzen des P-Proteins der Glycin-Decarboxylase (GDC). Die Zahlen an den Knoten repräsentieren die *Bootstrap*-Werte für 400 Replikate (verändert nach Kern et al. 2011).

Neben der Glykolat-Oxidase (siehe unten) kann auch die Existenz der Glycerat-3-Kinase (GLYK) in Pflanzen und Algen auf die primäre Endosymbiose mit einem Cyanobakterium zurückverfolgt werden (Kern et al. 2011). Das pflanzliche Enzym unterscheidet sich sowohl strukturell als auch phylogenetisch von anderen Glycerat-Kinasen (GK) aus Bakterien, Tieren und einigen Pilzen (Bartsch et al. 2008; Boldt et al. 2005). In Cyanobakterien kommt fast ausschließlich die pflanzliche GLYK vor (Boldt et al. 2005). Eine Ausnahme bilden *Synechocystis* sp. PCC 6803 und die thermophilen *Synechococcus*-Stämme JA-3-3Ab und JA-2-3B' in denen die bakterielle GK vorkommt (Bartsch et al. 2008; Kern et al. 2011). Sequenzvergleiche und die Phylogenie der pflanzlichen GLYK zeigen einen cyanobakteriellen Ursprung dieses Proteins in Landpflanzen und Algen (Abbildung 16B; Kern et al. 2011). Die Existenz einer bakteriellen GK in den drei genannten Cyanobakterien-Stämmen ist wahrscheinlich auf Verlust des Gens für die GLYK und anschließenden Neuerwerb einer bakteriellen GK durch horizontalen Gentransfer zurückzuführen (Kern et al. 2011). Somit sind photorespiratorische Proteine im Chloroplasten, wie erwartet auf den cyanobakteriellen Endosymbionten zurückzuführen. Das trifft natürlich auch auf Rubisco zu, ist aber für die 2PG-Phosphatase unklar (siehe unten).

Im Gegensatz zur GLYK bilden die T-, L- oder P- Untereinheiten der Glycin-Decarboxylase (GDC) aus phototrophen Eukaryoten eine monophyletische Gruppe mit homologen Proteinen aus α-Proteobakterien (Abbildung 16C; Kern et al. 2011). Die Phylogenien der drei GDC Proteine, T, L und P, lassen auf einen α-proteobakteriellen Ursprung der GDC in Landpflanzen und Algen schließen (Kern et al. 2011). Auch für die Serin:Hydroxymethyltransferase (SHMT) konnte eine Maximum-Likelihood-Phylogenie berechnet werden. Jedoch bilden in diesem Baum Cyanobakterien und Proteobakterien eine monophyletische Gruppe (Kern et al. 2011). Dies erschwert die eindeutige Zuordnung einer Abstammung dieses Proteins. Trotzdem ist aufgrund der engen Verknüpfung mit der GDC und die Lokalisation der SHMT im Mitochondrium eine proteobakterielle Abstammung wahrscheinlicher (McClung et al. 2000; Voll et al. 2006). Mitochondrien sind wie Chloroplasten durch eine Endosymbiose des späteren Eukaryoten mit einem Prokaryoten entstanden. Viele mitochondriale Proteine, die heute im Kerngenom des Eukaryoten kodiert sind, gehen auf den α-proteobakteriellen Vorläufer des Mitochondriums zurück (Atteia et al. 2009; Esser et al. 2004). Vermutlich wurde primär auch eine GDC und eine SHMT in den Algenvorläufer durch den cyanobakteriellen Endosymbionten gebracht. Während des EGT wurden diese Gene dann weitgehend durch die bereits vorhandenen α-proteobakteriellen Gene ersetzt, bzw. diese wurde beibehalten und die cyanobakteriellen gingen verloren. Hinweise für diese Vermutung finden sich in der Existenz eines cyanobakteriellen L-Proteins in Chloroplasten (Kern et al. 2011).

Im Pflanzen-Mitochondrium werden durch die gekoppelte Aktivität der GDC und der SHMT simultan zwei Moleküle Glycin in Serin, CO_2 und NH_4^+ umgewandelt und ein Methylrest auf den C_1-Körper Tetrahydrofolat übertragen. Die gegenseitige Umwandlung von Glycin und Serin ist eine der wichtigsten Quellen für aktivierte C_1-Bausteine und der Ausgangspunkt vieler weiterer Biosynthesewege (z. Bsp. Methionin und Purine) (Oliver 1994). Die Aktivität von GDC und SHMT spielt eine wichtige Rolle im Primärstoffwechsel und ist der Grund für die ubiquitäre Verbreitung dieser Proteine. Der *Knock Out* der Genkopien, kodierend für das P-Protein des GDCs ist auch unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen, also auch bei Erhöhung der CO_2-Konzentration, letal in *Arabidopsis* (Engel et al. 2007). Dies spricht für die Notwendigkeit der Aktivität von GDC und SHMT auch unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen, wie z. Bsp. in heterotrophen Prokaryoten.

Schätzungen gehen davon aus, dass in dem γ-Proteobakterium *E. coli* 15% aller Kohlenstoffatome, die aus der Glukose-Assimilation stammen, durch den GDC-SHMT-Komplex laufen (Wilson et al. 1993). GDC-Mutanten von *E. coli* konnten durch Zugabe von Serin, nicht aber von Glycin wachsen. Dies deutete auf eine Defekt der Serin-Synthese aus Glycin durch die fehlende Aktivität der GDC. Auch für das Cyanobakterium *Synechocystis* wurde ein ähnlicher Phänotyp erwartet, jedoch gelang der *Knock Out* des P-, T-, oder H-Proteins ohne sichtbaren Phänotyp (Wachstum, Pigmentgehalt, Photosyntheserate). Es konnte einzig ein Anstau intrazellulären und eine Sensibilität gegenüber extrazellulären Glycins beobachtet werden (Hagemann et al. 2005). Da die Mutante auch ohne externe Zugabe von Serin wachsen kann, dieses aber ähnlich wie in *E. coli* durch fehlende Aktivität der GDC nicht mehr aus Glycin synthetisiert werden kann, müssen andere Wege der Serin-Biosynthese existieren. Eine Möglichkeit ist der Phosphoserin-Weg, ausgehend von 3-Phosphoglycerat. Eine Rekonstruktion des Primärmetabolismus von *Synechocystis* scheint allerdings die Präsenz des Phosphoserin-Wegs auszuschließen (Knoop et al. 2010). Das Eingangsenzym dieses Wegs ist die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase, welches die NAD-abhängige Oxidation von 3-Phosphoglycerat katalysiert, wobei 3-Phosphohydroxypyruvat entsteht. Im *Synechocystis*-Genom konnte ein Protein ähnlich der *Arabidopsis* 3PGADH identifiziert werden. Die Präsenz einer 3PGADH deutet auf einen alternativen Serin-Synthese-Weg in *Synechocystis* und wahrscheinlich auch in anderen Cyanobakterien. Der endgültige Beweis für die Funktionalität und die fehlenden Proteine des Phosphoserin-Wegs müssen allerdings noch erbracht werden.

Das für die GDC und SHMT benötigte Substrat Glycin wird durch die Aktivität einer Glutamat:Glyoxylat-Aminotransferase (GGT) im Peroxisom gebildet. Das aus der Carboxylierung von Glycin entstandene Serin wird durch die Serin:Glyoxylat-Aminotransferase transaminiert. Bisher konnte in Cyanobakterien keine der beiden

Aminotransferasen funktionell charakterisiert werden. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten mit der GGT aus *Arabidopsis* (At1g23310) werden die Proteine Slr0006 oder Sll1559 aus *Synechocystis* als Kandidaten für dieses Enzym betrachtet (Eisenhut et al. 2008). Die SGT zählt zu den Aminotransferasen der Klasse V und beinhaltet viele Vertreter mit einem breiten Substratspektrum (Liepman and Olsen 2001). *BlastP*-Analysen mit der *Arabidopsis* SGT identifizierten einige Aminotransferasen innerhalb der Cyanobakterien, die zum größten Teil noch nicht untersucht wurden. Ohne eine funktionelle Analyse ist die Substratspezifität von Aminotransferasen nur schwer vorhersagbar, was eine Identifizierung photorespiratorischer SGT-Proteine allein durch phylogenetische Betrachtung schwierig gestaltet. Aminotransferasen zählen ebenso wie die GDC und SHMT zum Primärstoffwechsel und sind ubiquitär verbreitet. Auch in nicht-phototrophen Prokaryoten konnten SGT-ähnliche Proteine identifiziert werden.

In einem Maximum-Likelihood-Baum SGT-ähnlicher Proteine trennen sich vier große Gruppen. Diese Phylogenie verdeutlicht die Komplexität der Evolution von Aminotransferasen der Klasse V. Die Schwestergruppenbeziehung zwischen den Proteinen aus Landpflanzen, Algen und Proteobakterien deutet auf die Aufnahme des Gens für die SGT während der Endosymbiose mit einem α-Proteobakterium, die zu der Entstehung des Mitochondrium führte. Im Gegensatz zu den Landpflanzen, Grün- und Rotalgen gruppiert sich eine vermutliche SGT aus *Cyanophora paradoxa* (Glaucophyta) gemeinsam mit den Proteinen aus Cyanobakterien. Diese monophyletische Einheit zwischen Cyanobakterien und *Cyanophora* könnte für einen cyanobakteriellen Ursprung der SGT in der Archaeplastida-Linie Glaucophyta sprechen. Wahrscheinlich wurde auch der cyanobakterielle Vorläufer für die SGT in den Kern des primären Endosymbionten transferiert. Allerdings blieb dieses Gen nur in den Genomen der Glaucophyta bestehen, wohingegen es in den Genomen der sich später abspaltenden Rot- und Grünalgen durch ein proteobakterielles Gen ersetzt wurde.

Ein Protein, dessen Evolution im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, ist die Phosphoglykolat-Phosphatase (PGPase). Dieses Enzym katalysiert die erste Reaktion im photorespiratorischen 2PG-Zyklus und spielt eine entscheidende Rolle in der Detoxifizierung von 2PG. Bisher konnte nur für ein Cyanobakterium, *Coccochloris peniocystis* eine PGPase biochemisch charakterisiert werden (Norman and Colman 1991). Im Genom von *Synechocystis* sind mindestens drei potentielle PGPasen kodiert (Slr1762, Sll1349, Slr0459), die jedoch wenig Sequenzähnlichkeiten zu der photorespiratorischen PGPase aus *Arabidopsis* (At5g36790; Schwarte and Bauwe 2007) aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigen die PGPasen aus Glaucophyta, Rot- und Grünalgen eine hohe Sequenzähnlichkeit zur *Arabidopsis* PGPase. In *Arabidopsis* wird die photorespiratorische

PGPase durch das Gen *pgp1* kodiert (Schwarte and Bauwe 2007). Das Ausschalten dieses Gens bewirkt einen besonders starken photorespiratorischen Phänotyp (Timm et al. 2012). Auch die PGPase-Mutante der Grünalge *Chlamydomonas* kann nicht unter atmosphärischen CO_2 Bedingungen wachsen (Suzuki 1995). Hingegen deuten physiologische Untersuchungen von *Synechocystis*-Mutanten, bei denen ein oder zwei potentielle PGPasen ausgeschaltet sind, nicht auf das Vorliegen eines photorespiratorischen Phänotyps hin. Das könnte dadurch erklärt werden, dass in Cyanobakterien eine Kombination von mehreren PGPasen für den schnellen Abbau des aus der Oxygenierungsreaktion der Rubisco resultierenden toxischen 2PG verantwortlich ist (nicht-publizierte Daten; Claudia Hackenberg und Doreen Schwarz).

Neben der photorespiratorischen PGPase sind im Genom von *Arabidopsis* noch zehn weitere vermutliche PGPasen kodiert, deren Funktionen nur teilweise bekannt sind (Schwarte and Bauwe 2007). Im *E. coli*-Genom sind 23 Proteine der Klasse *Haloacid*-Dehalogenasen kodiert (Kuznetsova et al. 2006). Die Vorhersage ihrer Substratspezifität ist schwierig und oft korrelieren Phylogenie und Substratpräferenz des Proteins nicht miteinander (Kuznetsova et al. 2006). Dies lässt vermuten, dass die PGPasen von phototrophen Eukaryoten und Cyanobakterien unabhängig voneinander evolviert sind. Weitere funktionelle Analysen cyanobakterieller und Algen-PGPasen sind notwendig um die Evolution dieses, für den 2PG-Zyklus so wichtigen Enzyms aufzuklären.

5.3 Eine cyanobakterielle Laktat-Oxidase diente als Vorläufer für die pflanzlichen Glykolat-Oxidasen

Ein besonderes Protein des 2PG-Zyklus ist die Glykolat-Oxidase (GOX). Dieses Enzym katalysiert in Landpflanzen die O_2-abhängige Oxidation von Glykolat, wobei Glyoxylat und als Nebenprodukt H_2O_2 entstehen. In Cyanobakterien und vielen Algen wird diese Reaktion jedoch durch eine $NAD(P)^+$-abhängige Glykolat-Dehydrogenase (GlcDH) katalysiert (Eisenhut et al. 2008; Frederic et al. 1973; Nakamura et al. 2005; Paul and Volcani 1976; Stabenau and Winkler 2005; Suzuki et al. 1991; Winkler and Stabenau 1995). Die Glykolat-Oxidation durch eine GOX wurde bisher nur für Landpflanzen, einige Grünalgen und Braunalgen beschrieben (Frederic et al. 1973; Iwamoto et al. 1996; Iwamoto and Ikawa 2000). *Blast*P-Analysen mit der AtGOX2 aus *Arabidopsis* zeigen jedoch, dass neben den Genen für die GlcDH auch GOX-ähnliche Proteine in Cyanobakterien und Grünalgen kodiert sind. Die pflanzlichen GOX-Proteine bilden in einem phylogenetischen Stammbaum zusammen mit den GOX-ähnlichen Proteinen aus Cyanobakterien und Grünalgen eine monophyletische Gruppe. Diese Phylogenie spricht für den Transfer eines cyanobakteriellen

GOX-ähnlichen Proteins in das Genom der heutigen Pflanzen während der primären Endosymbiose.

Neben dem GOX-ähnlichen Protein aus *Nostoc* konnte auch für die Grünalge *Chlamydomonas* eine putative GOX identifiziert werden. Sowohl das Protein aus *Nostoc* (No-LOX), als auch das Protein aus *Chlamydomonas* (Cr-LOX) konnte die Oxidation von Glykolat katalysieren, zeigten jedoch eine eindeutige Präferenz für L-Laktat (Hackenberg, Kern et al. 2011). Eine Funktion der No-LOX oder der Cr-LOX im 2PG-Zyklus ist unwahrscheinlich. Dies kann zum einen durch eine GlcDH-Mutante aus *Chlamydomonas* unterstützt werden. In dieser Mutante kann aufgrund einer Mutation im Gen der GlcDH das Protein nicht mehr exprimiert werden, weshalb diese Mutante nur noch unter erhöhten CO_2-Konzentrationen wachsen kann (Nakamura et al. 2005). Würde die Cr-LOX unter photorespiratorischen Bedingungen zum Glykolatabbau beitragen, hätte kein oder nur ein schwacher „photorespiratorischer“ Phänotyp der GlcDH-Mutante nachgewiesen werden können. Auch der *Knock Out* des Gens, kodierend für die No-LOX hat in *Nostoc* keinen Einfluss auf das Wachstum unter photorespiratorischen Bedingungen (Hackenberg, Kern et al. 2011). In *Nostoc* existieren neben den Genen der No-LOX auch Gene, kodierend für die D-Untereinheiten der GlcDH (*alr5269* und *all4443*). Die Umsetzung des unter photorespiratorischen Bedingungen entstandenen Glykolats wird vermutlich in *Nostoc,* ebenso wie in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Eisenhut et al. 2008) und *Chlamydomonas* (Nakamura et al. 2005) vollständig durch die GlcDH oxidiert.

Bei genauerer Betrachtung der Phylogenie der GOX fällt auf, dass es sich bei den cyanobakteriellen Vertretern mit einem Gen für GOX-ähnliche Proteine ausschließlich um stickstofffixierende Cyanobakterien handelt. Da eine Interaktion der No-LOX im photorespiratorischen 2PG-Metabolismus ausgeschlossen werden kann, wurde zunächst eine Beteiligung dieses Enzyms an der Stickstofffixierung angenommen. Das Hauptenzym der Stickstofffixierung ist die Nitrogenase. Dieses Enzym ist sauerstoffsensitiv und ist in *Nostoc* in Heterocysten lokalisiert. Um die Beteiligung der No-LOX an der Stickstofffixierung zu überprüfen, wurde die Δ*lox*-Mutante unter diazotrophen, also stickstofffixierenden Bedingungen angezogen. Die Mutante zeigte ein deutlich vermindertes Wachstum, verglichen mit dem Wildtyp. Weiter konnte gezeigt werden, dass vor allem die Nitrogenase-Aktivität in der Δ*lox* beeinträchtigt ist (Hackenberg, Kern et al. 2011). Dies und die hohe Affinität der No-LOX zum Co-Substrat Sauerstoff (K_m von 0,29±0,14 µM O_2; Hackenberg, Kern et al. 2011) lässt eine sauerstoffverbrauchende Funktion der No-LOX zum Schutz der sauerstoffsensitiven Nitrogenase vermuten (Hackenberg, Kern et al. 2011).

Die Abstammung der At-GOX2 von einem cyanobakteriellen Vorläufer bedeutet, dass eine Evolution von einem Laktat-spezifischen (No-LOX) zu einem Glykolat-spezifischen (At-

GOX2) Enzym (oder umgekehrt) stattgefunden haben muss. Die phylogenetische und biochemische Zwischenstufe bildete zunächst die Cr-LOX (Hackenberg, Kern et al. 2011). Um die Schritte, die zu der Veränderung der Substratspezifität beigetragen haben, nachzuvollziehen, wurde das aktive Zentrum beschriebener Laktat- und Glykolat-Oxidasen analysiert. In einem *Alignment,* der am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren wurden die Aminosäuren des aktiven Zentrums bekannter Laktat- und Glykolat-Oxidasen mit denen aus *Nostoc*, *Chlamydomonas* und *Arabidopsis* verglichen. Neben den FMN-bindenden Aminosäuren konnten drei Aminosäurepositionen ausgemacht werden, die besonders wichtig für die Interaktion mit Laktat, bzw. Glykolat sind (Hackenberg, Kern et al. 2011 und darin zitierte Quellen). Durch *Site Specific Mutagenesis* konnten die drei Aminosäuren an Position 82, 112 und 212 der No-LOX so verändert werden, dass das aktive Zentrum an diesen drei Positionen dem der At-GOX2 entsprach (Hackenberg, Kern et al. 2011). Schon der Austausch einer Aminosäure zeigte eine Veränderung des Verhältnisses der Aktivität mit Glykolat zu Laktat (Hackenberg, Kern et al. 2011). Wurden zwei oder alle drei Aminosäuren ausgetauscht, konnte dadurch eine Veränderung der Substratspezifität, ähnlich der At-GOX2 erreicht werden (Hackenberg, Kern et al. 2011). Zwar konnte vor allem in den Doppel- und Dreifach-Mutanten eine klare Verbesserung der Glykolat-Aktivität gezeigt werden, allerdings gelang es nicht, ähnlich hohe Glykolat-Oxidase-Aktivitäten (v_{max}) der At-GOX2 zu erzielen (Hackenberg, Kern et al. 2011). Dies zeigt, dass die drei untersuchten Aminosäuren zwar wichtig sind für die Substratspezifität, aber neben der Veränderung dieser Aminosäuren noch weitere Schritte in der Evolution der GOX erforderlich waren, um die Aktivität der heutigen pflanzlichen GOX zu erreichen. Die biochemischen Eigenschaften, die Aminosäureaustausch-Varianten der No-LOX und die Phylogenie der AtGOX2 deuteten zunächst auf die Evolution der photorespiratorischen GOX während der Differenzierung der Landpflanzen (Hackenberg, Kern et al. 2011).

Über die Glykolat-oxidierenden Enzyme in Rotalgen und Vertretern der Chromalveolaten ist wenig bekannt. Einige wenige biochemische Analysen isolierter Peroxisomen aus Rotalgen deuten auf das Vorkommen einer peroximalen GOX (Seckbach et al. 1992; Suzuki et al. 1991). Aus den Braunalgen *Spatoglossum pacificum* und *Egregia menziesii* konnten Proteine mit GOX-Aktivität aufgereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Diese Enzyme wiesen ein ähnliches Substratspektrum wie pflanzliche GOX-Proteine auf (Gross et al. 1985; Iwamoto et al. 1996). Aus einer *Expressed Sequence Tag*-Studie der Braunalge *Laminaria digitata* konnte ein 239 bp langes Fragment isoliert werden, dessen Aminosäuresequenz der GOX aus Pflanzen ähnelt. Alle diese Arbeiten deuten darauf hin, dass es GOX-Proteine nicht nur in Pflanzen, sondern auch in Braun- und Rotalgen gibt (Iwamoto et al. 1996). Das könnte bedeuten, dass eine photorespiratorische

GOX bereits vor der Entwicklung der Streptophyten existierte oder sich davon unabhängig in Rotalgen entwickelt hat.

Mittlerweile liegen Genominformationen von ersten Spezies dieser Algengruppen vor. Die Maximum-Likelihood-Phylogenie der vermutlichen GOX, bzw. LOX-Proteine aus den genannten Algen bestätigte diese Vermutungen. In dem Stammbaum bilden die Rot- und Braunalgen eine monophyletische Gruppe mit den Landpflanzen. Zwischen dem Zweig der Rotalgen *Cyanidioschyzon merolae* und *Galdieria sulphuraria* und der Braunalge *Ectocarpus silculosus* steht die Vertreterin der Glaucophyta *Cyanophora paradoxa*. Diese Position ist unerwartet, da *Cyanophora* in der Art-Phylogenie an der Basis der phototrophen Eukaryoten steht (Price et al. 2012). Allerdings ist dieser Knoten in der GOX-Phylogenie durch einen schwachen *Bootstrap*-Wert (39%) unterstützt, der für eine fehlerhafte Stellung dieser Alge in der GOX-Phylogenie spricht. Neben dem erstaunlichen Befund, dass GOX-ähnliche Proteine aus Rot-, Braun- und Glaucophyta-Algen die Schwestergruppe zu photorespiratorischen GOX-Enzymen der Landpflanzen bilden, stehen die Proteine aus den Grünalgen *Chlamydomonas* oder *Volvox carteri* als Schwestergruppe bei den Cyanobakterien und separiert von den eukaryotischen Phototrophen. Eine nähere Betrachtung des aktiven Zentrums der GOX-Proteine aus Algen zeigt, dass sowohl das aktive Zentrum der vermutlichen GOX aus Rot- und Braunalgen, als auch aus *Cyanophora* im Gegensatz zu der Cr-LOX dem der At-GOX2 entspricht. Die heterolog exprimierte GOX aus *Cyanidioschyzon* (Cm-GOX) wies tatsächlich ähnliche biochemische Eigenschaften wie die At-GOX2 auf. Diese funktionellen Daten sowie die Stellung der Cm-GOX im phylogenetischen Stammbaum und das zu Pflanzen identische aktive Zentrum zeigen eindeutig die Existenz einer aktiven GOX in Rotalgen. Zusätzlich dazu besitzt die Cm-GOX-Sequenz am C-Terminus das Signalpeptid SKL, welches auf eine Lokalisation im Peroxisom hindeutet (Reumann et al. 2004). Zusätzlich konnten in keinem sequenzierten Genom von Rotalgen Gene, kodierend für eine Glykolat-Dehydrogenase, ähnlich der GlcDH aus *Chlamydomonas* oder Cyanobakterien, identifiziert werden.

Das Vorkommen einer GOX in Landpflanzen, Rot- und Braunalgen sowie in Glaucophyta deutet, anders als bisher vermutet (Hackenberg, Kern et al. 2011; Igamberdiev and Lea 2002) auf eine sehr frühe Evolution der photorespiratorischen GOX in dem gemeinsamen Vorfahren der Archaeplastida. In der grünen Plastidenlinie konnte eine GOX-Aktivität bisher nur für Landpflanzen und Streptophyta-Algen beschrieben werden (Frederic et al. 1973). Eine Ausnahme bildet die einzellige Grünalge *Mesostigma viride,* dessen GOX aufgereinigt und biochemisch charakterisiert wurde (Iwamoto and Ikawa 2000). Allerdings ist das dazugehörige Gen bisher unbekannt, so dass die vermutliche *Mesostigma* GOX nicht in die vorliegende Analyse einbezogen werden konnte. Die Position der Gattung *Mesostigma*

wird aktuell diskutiert. Einige Phylogenien platzieren die Gattung als Schwestergruppe zu den Streptophyta, inklusive der Landpflanzen (z. Bsp. Worden et al. 2009). Allerdings zeigen phylogenetische Untersuchungen der chloroplastidären und mitochondrialen Genome, dass diese Gruppe sich sehr früh von anderen Grünalgen differenziert hat und somit an der Basis der grünen Plastidenlinie, also aller Grünalgen und Landpflanzen stehen könnte (Lewis and McCourt 2004 und darin zitierte Quellen). Das Vorhandensein einer GOX anstelle einer LOX in einer basalen Grünalge wäre ein weiteres Indiz für die frühe Entstehung der GOX-Aktivität in der frühen Algen- oder sogar Cyanobakterienevolution.

Das Vorliegen von GOX-Proteinen in allen Linien der Archaeplastida würde ferner dafür sprechen, dass eine konvergente sekundäre Evolution der GOX in eine LOX in stickstofffixierenden Cyanobakterien und einigen Grünalgen (z. Bsp. *Chlamydomonas*) aufgetreten sein könnte. Wahrscheinlich führte der Anstieg der Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre vor 2300 und 750 Millionen Jahren zur konvergenten Evolution eines CCMs in Grünalgen und Cyanobakterien (Giordano et al. 2005). Die Folgen waren eine Herabsetzung des CO_2-Kompensationspunktes und die Reduktion der Oxygenase-Aktivität der Rubisco und des photorespiratorischen Flusses. Ähnlich wie in dem Cyanobakterium *Nostoc* könnte durch die Verschiebung der Substratpräferenz von Glykolat zu Laktat eine neue Funktion der Cr-LOX entstanden sein. Leider ist die physiologische Rolle der Cr-LOX in *Chlamydomonas* bisher unbekannt. Wie alle Eukaryoten können Grünalgen keinen Stickstoff fixieren und besitzen demzufolge auch keine Nitrogenase. Die Fragestellung nach der Funktion der Cr-LOX ist jedoch nicht uninteressant, da *Chlamydomonas* auch als Wirt für die biotechnologische H_2-Herstellung populär ist. Genau wie die Nitrogenase ist die Hydrogenase ein O_2-empfinliches Enzym. Vermutlich wird die Sequenzierung weiterer Grünalgengenome, wie dem von *Chara vulgaris* als Vertreter der möglichen Schwesterngruppe der Landpflanzen (Becker and Marin 2009; Kranz et al. 1995), die Verteilung von GOX-, LOX- bzw. GlcDH-Proteinen in dieser Algengruppe sichtbar machen und so zum Verstehen der Evolution der photorespiratorischen Glykolat-Oxidation beitragen.

5.4 Die photorespiratorische Hydroxypyruvat-Reduktase in Pflanzen hat keinen cyanobakteriellen Ursprung

Ein weiteres Protein aus dem 2PG-Zyklus, dessen Herkunft nicht abschließend geklärt werden konnte, stellt die im pflanzlichen Peroxisom lokalisierte photorespiratorische Hydroxypyruvat-Reduktase (HPR1) dar. Dieses Enzym katalysiert die NAD(P)H-abhängige Reduktion von Hydroxypyruvat zu Glycerat. HPRs können neben der Reduktion von Hydroxypyruvat auch die Umsetzung von Glyoxylat und die jeweilige Rückreaktion katalysieren (Kleczkowski and Randall 1988; Timm et al. 2008; Tolbert et al. 1970). In

Cyanobakterien konnte bis jetzt noch keine photorespiratorische HPR funktionell charakterisiert werden. Biochemische Untersuchungen der heterolog exprimierten Proteine aus *Synechocystis* und *Nostoc* zeigten, dass es sich bei den Proteinen Slr1556 und Alr0058 eher um Pyruvat-Reduktasen handelt. Enzymaktivitätsmessungen der All8087 und Slr2123 zeigen eine deutliche, aber verglichen mit der *Arabidopsis* HPR1 geringere Aktivität mit Hydroxypyruvat. Beide Proteine katalysieren neben der Umsetzung von Hydroxypyruvat auch die Reduktion von Glyoxylat. Doch vor allem die K_m-Werte deuten auf die Bevorzugung von Hydroxypyruvat gegenüber Glyoxylat. In der nicht-kompartimentierten Cyanobakterienzelle, die aufgrund des CCM eher einen geringen photorespiratorischen Fluss aufweist, ist die Affinität sicher wichtiger als die maximale Geschwindigkeit. Daher kann man vermuten, dass diese biochemischen Untersuchungen als Indiz auf eine photorespiratorische HPR-Funktion dieser cyanobakteriellen Proteine gewertet werden können. Für eine abschließende Bewertung bedarf es jedoch noch weiterer Untersuchungen. Das Einbringen eines *Knock Out*-Konstrukts für ein oder beide HPR-Proteine in eine *Synechocystis*-Mutante, in der der Glycerat-Weg unterbrochen ist (z. Bsp. Δ*slr0229*; Tartronsäuresemialdehyd-Reduktase), könnte Aufschluss über die Beteiligung der cyanobakteriellen HPRs an der Photorespiration geben.

Weitere Analysen, basierend auf Sequenzunterschieden zeigten, dass die Distanz zwischen dem Protein All8087 von *Nostoc* und der *Arabidopsis* HPR1 am geringsten ist. Jedoch zeigte eine weitere Maximum-Likelihood-Phylogenie, die neben Proteobakterien auch Vertreter weiterer Bakteriengruppen berücksichtigt, dass die Landpflanzen, Grün- und Rotalgen eine monophyletische Gruppe mit HPR-ähnlichen Proteinen aus heterotrophen Bakterien, der *Firmicutes* und *Actinobacter*, bilden. Eine Schwestergruppenbeziehung zwischen den pflanzlichen HPRs und bakteriellen Enzymen, die nicht aus Proteobakterien stammen, ist schwierig zu interpretieren. Proteine, ähnlich der HPR1 aus *Arabidopsis* kommen in vielen Bakteriengruppen vor und konnten auch für Tiere und Pilze beschrieben werden (Cramer et al. 1999; de Vries et al. 1990; Ohshima et al. 2001; Shen and Wu 2007; Utting and Kohn 1975; Yoshikawa et al. 2007). In 138 von 167 sequenzierten Genomen aus allen Domänen des Lebens konnten HPR-ähnliche Proteine identifiziert werden, denen zum größten Teil eine Funktion im Glyoxylat-Metabolismus zugeordnet wurde (Peregrin-Alvarez et al. 2009). Methylotrophe Bakterien wie *Methylobacterium* sp. können C_1-Verbindungen als Kohlenstoffquelle nutzen (de Vries et al. 1990). Dabei dient die HPR aus einigen methylotrophen Bakterien der Umsetzung des im Serin-Zyklus entstehenden Hydroxypyruvats (Shen and Wu 2007). Im Menschen spielt die HPR neben der Funktion im Glyoxylat-Metabolismus ebenfalls eine wichtige Rolle im Serin-Metabolismus für die Gluconeogenese (Cramer et al. 1999). Ein Defekt im Gen für die menschliche HPR verursacht u. a. den Anstau von Oxalsäure, in dessen Folge es zu Nierenfunktionsstörungen

kommt (Cramer et al. 1999). Auch Archaea besitzen zur pflanzlichen HPR1 ähnliche Proteine, die gleichzeitig ein Indiz für einen funktionellen Glyoxylat-Metabolismus darstellen (Ohshima et al. 2001; Yoshikawa et al. 2007). Die ubiquitäre Verbreitung dieses Enzyms lässt die Vermutung zu, dass ein Gen, kodierend für ein HPR-ähnliches Enzym schon im Archaeum vorhanden war, welches durch Verschmelzung mit einem α-Proteobakterium zum Vorläufer der Eukaryoten werden sollte (Bonen 2006; Cavalier-Smith 2006; Esser et al. 2004; Gray et al. 2001).

Bei genauerer Betrachtung der HPR1-Phylogenie, lässt sich neben dem *Cluster* mit dem *Nostoc*-Protein All8087 ein zweites cyanobakterielles *Cluster* definieren. Dieses *Cluster* umfasst neben *E. coli* und *Rhodopseudomonas*, ausschließlich *Cyanothece*-Stämme. Anders als erwartet, fällt auch das HPR-ähnliche Protein aus der Glaucophyte *Cyanophora* in diese Gruppe. Dies spricht für eine andere Phylogenie der HPR aus *Cyanophora* und anderen Archaeplastida. Untersuchungen zur Substratspezifität der putativen HPR aus *Cyanothece* sp. PCC7822 bestätigten dessen HPR-Funktion. Die Sequenzierung von sechs *Cyanothece*-Genomen zeigt eine große Flexibilität des metabolischen Potenzials dieser Cyanobakterien. Die Plastizität der *Cyanothece*-Genome geht u. a. auf den Erwerb neuer metabolischer Fähigkeit, aber auch den Erhalt rudimentärer Proteine zurück (Bandyopadhyay et al. 2011). Weiterhin ist sie aber auch ein deutlicher Hinweis auf die Polyphylie der *Cyanothece*-Stämme. Die Präsenz der HPR in vielen entfernt verwandten bakteriellen Gruppen und das gleichzeitige Vorkommen dieses Proteins in nur drei *Cyanothece*-Stämmen deutet auf den Erwerb dieses Gens durch *Cyanothece* von einem Proteobakterium durch horizontalen Gentransfer hin.

5.5 Die Proteine eines rudimentären Glykolat-Metabolismus entstanden vor der oxygenen Photosynthese

Cyanobakterien waren die ersten Organsimen, die eine oxygene Photosynthese betrieben und waren somit auch die ersten Organismen, in denen die Rubisco direkt Sauerstoff ausgesetzt war (Mulkidjanian et al. 2006). Die ersten Cyanobakterien lebten wahrscheinlich in benthischen mikrobiellen Verbänden (z. Bsp. Stromatolithen), die einen UV-Schutz boten. In diesen mikrobiellen Matten kann es durch eine erhöhte Photosyntheserate zu einem punktuellen Anstieg der Sauerstoffkonzentration, in einer ansonsten O_2-armen und CO_2-reichen Atmosphäre, gekommen sein. Die Oxygenierung von Ribulose-1,5-Bisphosphat durch die Rubisco war unter diesen Bedingungen begünstigt und führte zu einem Anstieg des toxischen Intermediats 2PG. Demzufolge müssen die ersten Cyanobakterien und wahrscheinlich auch andere Bakterien schon vor der Entstehung biogenen Sauerstoffs mit 2PG-abbauenden Enzymen ausgestattet gewesen sein. Dieser

rudimentäre 2PG-Metabolismus in Cyanobakterien war der Ausgangspunkt für die weitere Evolution eines photorespiratorischen 2PG-Zyklus zum Abbau des aus der Oxygenase-Aktivität der Rubisco entstandenen 2PG. Möglicherweise ist der CCM in Cyanobakterien erst später entstanden als es vor 2300 oder 750 Millionen Jahren zu einem Anstieg der O_2/CO_2-Rate der Atmosphäre kam (Giordano et al. 2005; Raven et al. 2008a).

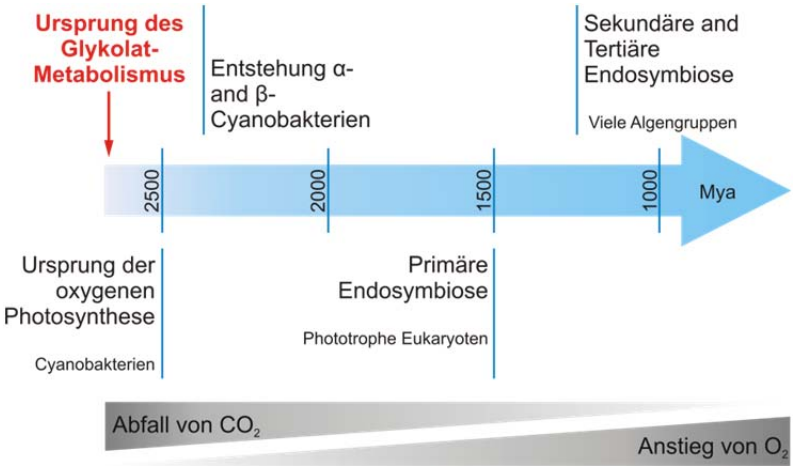

Abbildung 17. Vereinfachte zeitliche Einordnung wichtiger Ereignisse, die zu der Entstehung der heutigen Sauerstoff-reichen Atmosphäre beitrugen (Björn and Govindjee 2009; Yoon et al. 2004) und der frühe Ursprung des Glykolat-Metabolismus vor der Entstehung der oxygenen Photosynthese (Kern et al. 2011). Mya: *Million Years Ago*.

Im Gegensatz zu den meisten an der oxygenen Photosynthese beteiligten Proteine kommen Proteine des 2PG-Zyklus sowohl in Cyanobakterien als auch in Eubakterien wie *Rhodopseudomonas palustris* vor (Kern et al. 2011; Mulkidjanian et al. 2006). Diese Proteine könnten in dem gemeinsamen Vorfahren von Cyanobakterien und anderen Eubakterien für den Abbau von Glykolat oder verwandten organischen Säuren verantwortlich gewesen sein. Ein Beispiel ist das Eingangsenzym des 2PG-Zyklus, die PGPase. Auch in nicht-phototrophen Organismen sind PGPasen ähnliche Proteine kodiert (Lyngstadaas et al. 1999; Pellicer et al. 2003; Schäferjohann et al. 1993; Zelda 1981). Dort dienen sie wahrscheinlich dazu, das, während der DNA-Reparatur entstehende 2PG abzubauen (Pellicer et al. 2003). Außerdem können *E. coli* und andere Bakterien Glykolat als Kohlenstoffquelle nutzen (Hansen and Hayashi 1962; Sakai et al. 2008; Friedrich et al. 1991; Edenborn and Litchfield 1985; Furuya and Hayashi 1963). Glykolat und andere kleine Ketosäuren als Fermentationsprodukte waren vermutlich im Urozean angereichert und stellten eine populäre C-Quelle vor der Erfindung der oxygenen Photosynthese dar.

Die Co-Existenz 2PG-abbauender Proteine in Cyanobakterien und anderen Eubakterien spricht somit für die Existenz eines rudimentären Glykolat-Metabolismus schon vor der Evolution der oxygenen Photosynthese im gemeinsamen Vorfahren der Chlorplasten

und phototrophen Bakterien. Ein rudimentärer 2PG-Zyklus diente in der weiteren Evolution phototropher Eukaryoten als Start für Entwicklung des modernen pflanzlichen photorespiratorischen 2PG-Zyklus, welcher auch die Kompartimentierung einzelner enzymatischer Schritte beinhaltet.

5.6 Die Entschlüsselung neuer Algengenome deutet auf Variabilität im 2PG-Metabolismus

Neue, schnellere und kostengünstigere Sequenzierungs-Verfahren ermöglichten in den letzten zehn Jahren die Sequenzierung zahlreicher Genome, darunter auch zunehmend viele Landpflanzen (Venter et al. 1996; Sundquist et al. 2007; Hamilton and Buell 2012; Flagel and Blackman 2012). Aber auch Genome von Vertretern der Rot-, Grün, und Glaucophyta-Algen, sowie von durch sekundäre Endosymbiose entstandenen Algengruppen (z. Bsp. Haptophyta, Diatomeen und Braunalgen) wurden entschlüsselt (z. Bsp. Armbrust et al. 2004; Blanc et al. 2012; Blanc et al. 2010; Bowler et al. 2008; Cock et al. 2012; Derelle et al. 2006; Matsuzaki et al. 2004; Price et al. 2012; Worden et al. 2009). Diese zunehmend bessere Datenbasis ermöglichte die Suche nach Genen für Proteine des 2PG-Metabolismus in vielen Algengruppen (Kern et al. 2011).

Mit *Cyanophora* konnte erstmals das Genom eines Vertreters der Glaucophyta sequenziert werden (Price et al. 2012). Phylogenetische Analysen der 2PG-Zyklus-Proteine aus *Cyanophora* zeigen, dass der Ursprung dieser Proteine teilweise von denen der Landpflanzen und anderer phototrophen Eukaryoten abweicht. Ein Beispiel dafür ist die HPR. Sowohl die pflanzlichen als auch die HPRs aus Rot- und einigen Grünalgen bilden eine monophyletische Gruppe mit heterotrophen Bakterien der Gruppen *Firmicutes* und *Actinobacter*. Die Präsenz HPR-ähnlicher Proteine in vielen Bakteriengruppen deutet auf den Erwerb des Proteins durch den endosymbiontischen Gentransfer im Zuge der Entstehung des Mitochondriums oder die Präsenz eines HPR-kodierenden Gens in der Wirtszelle vor der Etablierung des Mitochondriums hin. Die *Cyanophora*-HPR hingegen bildet eine Gruppe zusammen mit α- und γ-Proteobakterien, sowie drei *Cyanothece*-Stämmen. Leider lässt sich aus den Maximum-Likelihood-Analysen keine eindeutige Phylogenie der *Cyanophora*-HPR ablesen. Aber die deutlich differenzierte Stellung dieser basalen Alge, im Vergleich zu anderen Algen, erscheint sicher. *Blast*P-Analysen konnten auch HPR-ähnliche Proteine in den Diatomeen, wie *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana,* sowie einigen stark abgeleiteten Grünalgen der Gattung *Ostreococcus* und *Micromonas,* identifizieren. Diese Proteine ordnen sich weder in der Gruppe der Landpflanzen noch in die Gruppe von *Cyanophora* ein.

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch in der Phylogenie der Serin:Glyoxylat-Aminotransferase. Die Maximum-Likelihood-Analyse der SGT1 aus *Arabidopsis* deutet auf eine hohe Diversität der Aminotransferasen innerhalb der phototrophen Eukaryoten. Während für die Landpflanzen, Rot- und einigen Grünalgen, ähnlich der HPR eine proteobakterielle Herkunft wahrscheinlich ist, steht die SGT aus *Cyanophora* in unmittelbarer Nachbarschaft zu Aminotransferasen aus Cyanobakterien. Die Präsenz einer cyanobakteriellen Aminotransferase in einer der drei durch primäre Endosymbiose entstandenen Linien lässt vermuten, dass ursprünglich mehr Proteine des 2PG-Zyklus von dem cyanobakteriellen Endosymbionten transferiert wurden. Die cyanobakteriellen Gene blieben in den zuerst abzweigenden Glaucophyta in einem größeren Ausmaß bestehen, wurden aber offensichtlich im Zuge der späteren Differenzierung von Rot- und Grünalgen durch bakterielle Homologe ersetzt. Auch in der Phylogenie der SGT zeigte sich eine differenzierte Gruppierung von SGT-ähnlichen Proteinen abgeleiteter Grünalgen und Diatomeen.

Diatomeen sind wie Braunalgen durch eine sekundäre Endosymbiose mit einem Rotalgen-ähnlichen Organismus entstanden (Janoušíkovec et al. 2010; Keeling 2004). In isolierten Peroxisomen zweier Diatomeen konnten weder eine Katalase noch eine H_2O_2-produzierende Oxidase durch biochemische Tests identifiziert werden. Ferner zeigten diese Untersuchungen, dass Diatomeen eine peroximale L-Laktat-umsetzende Dehydrogenase neben einer mitochondrialen D-Laktat-umsetzenden Dehydrogenase besitzen (Winkler and Stabenau 1995). Das ist sehr ungewöhnlich, da die Umsetzung von D- oder L-Laktat als ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen Dehydrogenasen (D-Isomer) und Oxidasen (L-Isomer) herangezogen wird. Die Sequenzierung der Diatomeengenome von *Thalassiosira* und *Phaeodactylum* ermöglichte die Suche nach GOX-ähnlichen Proteinen in diesen Spezies (Kern et al. 2011; Kroth et al. 2008). In beiden Diatomeen konnten zwei GOX-ähnliche Proteine gefunden werden, wovon eines der beiden Proteine das für Eukaryoten typische peroximale PTS1-Peptid enthält (Reumann et al. 2004). Das andere GOX-ähnliche Proteine ist wahrscheinlich im Mitochondrium lokalisiert, wo sich auch eine Katalase befinden soll (Kroth et al. 2008). Ob es sich bei diesen Enzymen um Oxidasen oder Dehydrogenase handelt, konnte jedoch durch alleinige Sequenzvergleiche nicht gezeigt werden.

Weder in den Genomen der Glaucophyte *Cyanophora* noch in einer der bisher sequenzierten Diatomeen gelang es eine pflanzliche oder bakterielle Glycerat-Kinase zu identifizieren (Kern et al. 2011; Kroth et al. 2008). Allerdings wurde für die Haptophyta-Alge *Emiliania huxleyi* und die Braunalge *Ectocarpus silculosus* eine Pflanzen-ähnliche GLYK beschrieben (Kern et al. 2011). Haptophyta, Diatomeen und Braunalgen sind Mitglieder der

Supergruppe Chromalveolata, von der man annimmt, dass sie aus einem gemeinsamen Vorfahren entstanden sind, der aus einer Endosymbiose mit einer Rotalge resultierte (Janoušíkovec et al. 2010; Keeling 2004). Auch Plastiden-freie, parasitäre Vertreter der Chromalveolaten wie z. Bsp. *Phytophthora* sp. besitzen eine GLYK, die auf die sekundäre Endosymbiose mit einer Rotalge zurückgeht (Maruyama et al. 2009). Die Präsenz einer GLYK in anderen Vertretern der Chromalveolata deutet darauf hin, dass ursprünglich das Gen für eine GLYK vom Rotalgen-Endosymbionten in das Wirts-Genom übertragen wurde. Offensichtlich ist es jedoch im Zuge der weiteren Differenzierung der Diatomeen verloren gegangen (Kern et al. 2011). Die Präsenz einer GLYK in anderen Linien der Archaeplastida deutet auch für die Glaucophyta auf einen Verlust dieses Proteins nach der Abspaltung von Rot- und Grünalgen hin. Die Sequenzierung von Genomen weiterer Vertreter der Glaucophyta wird zeigen, ob der Verlust der GLYK in allen Glaucophyta stattfand oder spezifisch für einige Vertreter wie *Cyanophora* ist. Ähnliches gilt auch für die Gruppe der Chromalveolata.

Das Fehlen einer Glycerat-Kinase in Diatomeen und Glaucophyta bedingt eine Veränderung des 2PG-Zyklus, da kein 3-Phosphoglycerat, welches wieder in den Calvin-Benson-Zyklus eingehen kann, im Chloroplasten generiert wird. Diese Algen müssen somit über andere Intermediate, das aus der Oxygenase-Aktivität resultierende 2PG entgiften und den organischen Kohlenstoff in den Calvin-Benson Zyklus zurückführen (Kern et al. 2011; Kroth et al. 2008). Eine Möglichkeit ist der Abbau des aus der Glykolat-Oxidation entstandenen Glyoxylats über das Tricarbonsäure-Zyklus-Intermediat Malat (Igamberdiev and Lea 2002; Winkler and Stabenau 1995). Diese Variation würde die Aktivität einer Malat-Synthase erfordern, dessen Gen und Aktivität im Peroxisom von Diatomeen bereits nachgewiesen werden konnte (Kroth et al. 2008; Winkler and Stabenau 1995). Eine weitere Möglichkeit ist ein Ende des 2PG Umsatzes bei Serin bzw. Glycin. Das photorespiratorische Serin bzw. Glycin könnte direkt in andere Biosynthesewege, wie die Glutathion-Synthese einfließen (Kroth et al. 2008). Diatomeen verfügen darüber hinaus über viele weitere physiologische und metabolische Besonderheiten, wie zum Beispiel das Vorkommen eines kompletten Harnstoffzyklus (Armbrust et al. 2004; Bowler et al. 2008). Die metabolische Diversität und die Unterschiede zu anderen phototrophen Eukaryoten könnten vor allem mit der hohen Anzahl an prokaryotischer Gene, die aus einem horizontalen Gentransfer zwischen Diatomeen und Bakterien resultieren, begründet werden (Bowler et al. 2008). Alternative Wege des 2PG-Abbaus in *Cyanophora* sind unbekannt, aber eine ähnliche Verwertung des aus dem 2PG-Zyklus entstandenen Glycins und Serins ist auch für die Glaucophyta vorstellbar. Die Bedingungen, die zu einem Verlust der Glycerat-Kinase und zur Etablierung anderer, bisher unbekannter Wege der 2PG-Entgiftung geführt haben, sind unbekannt. Offensichtlich bedarf es weiterer physiologischer und molekularbiologischer

Untersuchungen, um den Aufbau und die Funktionsweise des 2PG-Metabolismus in Diatomeen und Glaucophyta aufzuklären.

Neben den unterschiedlichen Phylogenien einiger 2PG-Zyklus-Proteine von Algen und Landpflanzen, unterscheidet sich auch deren zelluläre Lokalisation in phototrophen Eukaryoten. Dabei wird vor allem den Peroxisomen eine besondere Rolle zugesprochen. Peroxisomen sind von einer einfachen Doppelmembran umschlossene *Microbodies* und sind bei der Anpassung an eine sauerstoffreiche Atmosphäre besonders wichtig. Sie kommen in allen Eukaryoten vor (Gabaldon 2010). Über die Entstehung von Peroxisomen wird in der Literatur immer noch debattiert. Aus elektronmikroskopischen Aufnahmen, die Peroxisomen in enger Verbindung mit dem Endoplasmatischen Retikulum zeigen, wurde geschlossen, dass Peroxisomen aus Vesikelabschnürungen des Endoplasmatischen Retikulums entstehen (Novikoff and Shin 1964). Jedoch zeigt die Entdeckung sich teilender Peroxisomen und der post-translationelle Import von Proteinen, dass diese Organelle ebenso wie Mitochondrien und Chloroplasten aus einer Endosymbiose resultieren könnte (deDuve 1982). Neuere Studien bezweifeln jedoch den endosymbiontischen Ursprung der Peroxisomen (zusammengefasst in Gabaldon 2010). Die Hauptfunktion der Peroxisomen in Pflanzen ist die Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid durch eine Katalase oder Peroxidase (Gabaldon 2010). Viele Reaktionen des photorespiratorischen 2PG-Zyklus sind im Blatt von Pflanzen im Peroxisomen lokalisiert, während Peroxisomen der Pflanzenwurzel andere Proteinausstattungen und Funktion aufweisen (Bauwe et al. 2010; Reumann et al. 2006). Über Art und Funktion der Peroxisomen in eukaryotischen Algen ist allerdings wenig bekannt (Gabaldon 2010; Hagemann et al. 2012). Das Vorkommen Pflanzen-ähnlicher Peroxisomen konnte bisher für einige Streptophyta- und Rotalgen gezeigt werden (Gabaldon 2010). Die enzymatische Ausstattung der meisten Algen-Peroxisomen unterscheidet sich von denen der Landpflanzen. Weder in Peroxisomen von Diatomeen noch in denen der Grünalgen konnte bisher ein Wasserstoffperoxid-produzierendes oder -abbauendes Enzym nachgewiesen werden (Igamberdiev and Lea 2002; Winkler and Stabenau 1995). Dies schließt auch die Präsenz einer GOX im Peroxisom aus. Die Cr-LOX aus *Chlamydomonas* besitzt zwar ein peroximales Signalpeptid, ähnlich der PTS1 aus Landpflanzen und Rotalgen, allerdings konnte ein Import dieses Proteins ins Peroxisom nicht bestätigt werden (Shinozaki et al. 2009). Die Lokalisation einer photorespiratorischen GlcDH im Mitochondrium deutet auf eine andere Funktion der Peroxisomen in Grünalgen (Gabaldon 2010). Neben der GlcDH, konnte auch für die 2PG-Zyklus-Proteine SGT, GGT und HPR1 von *Chlamydomonas* der Import ins Mitochondrium nachgewiesen werden (Atteia et al. 2009). Demzufolge findet der größte Teil des 2PG-Zyklus in den Mitochondrien dieser Grünalge statt (Atteia et al. 2009).

Viele Algen weisen effiziente CCM's auf, die die CO_2-Konzentration in räumlicher Nähe zum kohlenstofffixierenden Enzym Rubisco anreichern. Bei Diatomeen wurde eine wesentlich niedrigere Halbsättigungskonstante für CO_2 für die Photosyntheserate intakter Zellen (2-5 µM CO_2), verglichen mit dem K_m-Wert der isolierten Diatomeen-Rubisco (~40 µM CO_2), gemessen (Reinfelder 2011 und darin zitierte Quellen). Diese Eigenschaft spricht für die Präsenz eines CCM in Diatomeen. Dessen Mechanismus ist umstritten. Neben Enzymen für einen C_4-Mechanismus sind im Genom von Diatomeen zahlreiche Bicarbonat-Transporter und Carboanhydrasen kodiert (Kroth et al. 2008). Beide Proteine sind essentiell für die Funktion einer biophysischen Kohlenstoffkonzentrierung. Einige Ergebnisse deuten außerdem daraufhin, dass die CCMs innerhalb der Diatomeen variieren (Reinfelder 2011). Auch in anderen eukaryotischen Algen scheint ein CCM zu der Herabsetzung der Oxygenase-Aktivität der Rubisco beizutragen, wodurch der photorespiratorische Fluss vermindert wird (Giordano et al. 2005; Raven et al. 2012; Reinfelder 2011). Die Herabsetzung des photorespiratorischen Flusses in vielen eukaryotischen Algen und Cyanobakterien bildete wahrscheinlich die Voraussetzung, den 2PG-Metabolsimus zu variieren und evtl. auch vermehrt für andere Funktionen zu nutzen.

In der Erdgeschichte tauchen vier Ereignisse auf, die zu einer drastischen Erhöhung der O_2/CO_2-Rate in der Atmosphäre führten und somit Ausgangspunkt für die Selektion zur Evolution eines CCM sein könnten (Giordano et al. 2005 und darin zitierte Quellen). Der erste Anstieg der Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre war vor ca. 2300 Millionen Jahren (Bekker et al. 2004). Die starke Oxygenierung der Atmosphäre und der daraus resultierende selektive Druck könnte zu der Evolution eines CCMs in Cyanobakterien geführt haben (Giordano et al. 2005). Dies würde bedeuten, dass auch der Vorläufer der Plastiden einen CCM besaß und die Gene des CCMs durch die Endosymbiose in den Vorgänger der phototrophen Eukaryoten gebracht worden sein könnte. Bis heute konnte jedoch kein cyanobakterielles CCM-Gen im Genom eines phototrophen Eukaryoten nachgewiesen werden. Daher nehmen die meisten Autoren an, dass der cyanobakterielle CCM später, nach der primären Endosymbiose entstanden ist. Im Zeitraum zwischen 750 und 600 Millionen Jahren kam es zu einem erneuten Anstieg der O_2/CO_2-Rate (Giordano et al. 2005). Wahrscheinlich war dies Auslöser für die Entstehung diverser CCMs in den meisten Algengruppen. Ob auch innerhalb der Cyanobakterien ein CCM ausgebildet wurde ist fraglich. Die Phylogenie der α- und β-Cyanobakterien deutet eher auf einen frühen Ursprung des CCM. Die unterschiedliche Funktionsweise der CCMs in Cyanobakterien und vielen Algen ist ebenfalls ein Indiz für eine unabhängige Evolution der Anpassungen an CO_2-Mangel (Giordano et al. 2005). Die Entstehungsgeschichte der biochemischen CO_2-Konzentrierung in CAM- und C_4-Pflanzen ist relativ jung und hängt wahrscheinlich mit der Erhöhung der O_2/CO_2-Rate vor ca. 30 Millionen Jahren zusammen (Giordano et al. 2005).

Dabei konnte die Evolution der C_4-Photosynthese in mehreren unabhängigen Linien nachgewiesen werden (Sage et al. 2011). Ebenso deuten einige C_3-C_4-intermediäre Pflanzen auf einen noch nicht abgeschlossenen Prozess (Langdale 2011). Teil der Evolution zur C_4-Photosynthese ist auch eine Relokalisierung der Photorespiration, beginnend mit der Verlagerung des GDC in den Bündelscheidenzellen (Osmond and Harris 1971).

Die phylogenetischen Untersuchungen zeigen, dass einige Enzyme des pflanzlichen 2PG-Zyklus schon in dem cyanobakteriellen Endosymbionten vorhanden waren und teilweise ebenso wie die Gene der Photosynthese über den endosymbiontischen Gentransfer in das Genom der Protoalge übertragen wurden (Hackenberg, Kern et al. 2011; Kern et al. 2011). Die Umstrukturierung des 2PG-Metabolismus könnte eine Folge der Etablierung effizienter CCMs in Cyanobakterien, Algen und C_4-Pflanzen sein.

6. Ausblick

Phylogenetischen Untersuchungen von Enzymen des 2PG-Zyklus zeigten, dass einige dieser heute im Kern von Landpflanzen und Algen kodierten Proteine das Ergebnis des endosymbiontischen Gentransfers, ausgehend von einem Cyanobakterium sind (Kern et al. 2011). Neben dem 2PG-Zyklus tragen in Cyanobakterien, wie z.B. *Synechocystis*, noch zwei weitere Wege zum schnellen Abbau des, aus der Oxygenase-Reaktion der Rubisco entstandenen 2PG bei (Eisenhut et al. 2008). Einer dieser alternativen 2PG-Abbauwege ist der, auch in anderen Bakterien vorkommende Glycerat-Weg. Die am Glycerat-Weg beteiligten Enzyme sind die Glyoxylat-Carboligase und Tartronsäuresemialdehyd-Reduktase (TSR). Die Aktivität dieser Enzyme sorgt für die Bildung von Glycerat aus Glyoxylat in nur zwei Schritten und bildet somit eine Abkürzung zum 3-Phosphoglycerat. Insbesondere umgeht dieser Weg die Reaktionen des GDC's. Daher wird nur CO_2 und kein NH_4^+ freigesetzt, das auch nicht energetisch aufwendig wiedergewonnen werden muss. Daher könnte der Glycerat-Weg unter photorespiratorischen Bedingungen zu einem energetisch günstigeren und schnellerem Abbau des toxischen 2PG beitragen. Da diverse Proteine des cyanobakteriellen 2PG-Zyklus Ausgangspunkt der Photorespiration in Landpflanzen waren, stellt sich die Frage, ob nicht auch die Proteine des Glycerat-Wegs in phototrophen Eukaryoten als Ergebnis eines endosymbiontischen Gentransfers nachweisbar sind? Gegen die Existenz alternativer Wege, die einen signifikanten Anteil am Abbau des 2PG leisten, spricht der klare "photorespiratorische" Phänotyp von Mutanten mit Defekten in Enzymen des 2PG-Zyklus (Timm et al. 2012). Allerdings sprechen einige biochemische Untersuchungen an Diatomeen und Grünalgen für die mögliche Präsenz des Glycerat-Wegs in phototrophen Eukaryoten. Sowohl für die Grünalge *Gloeomonas* sp., als auch die Diatomee *Cylindrotheca fusiformes* konnte die Aktivität einer Glyoxylat-Carboligase nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit radioaktiv markierten Glyoxylat wurden anschließend Tartronsäuresemialdehyd und CO_2 als Reaktionsprodukte identifiziert (Badour and Waygood 1971, Paul and Volcani 1976). In unseren Voruntersuchungen zur Existenz des Glycerat-Wegs in phototrophen Eukaryoten dienten die TSR's aus *Synechocystis* (Slr0229) und *Nostoc* (Alr3358) als Ausgangspunkt für *Blast*P-Analysen nach ähnlichen Proteinen in den Genomen von Landpflanzen und Algen. Diese Suche identifizierte zwei putative TSR-Proteine in dem Modellorganismus *Chlamydomonas* (XP 001691921 und XP 001692084). Das könnte ein erster Hinweis sein, dass auch in *Chlamydomonas* der Glycerat-Weg aktiv ist. *Chlamydomonas* ist in der Wissenschaft ein langjährig genutzter Modellorganismus. Seine Popularität hat neuerdings stark zugenommen, da mit Hilfe dieses Organismus biotechnologisch H_2 produziert werden könnte und *Chlamydomonas* darüber

hinaus genetisch manipulierbar ist (Kindle 1990, Molnar et al. 2007, Molnar et al. 2009, Schroda 2006, Zhao et al. 2009). Um die Hinweise aus den Genomuntersuchungen zu untermauern, wird zukünftig angestrebt, analog zum Herangehen an *Synechocystis* (Eisenhut et al., 2008) Enzyme für alternative 2PG-Stoffwechselwege gemeinsam mit denen des 2PG-Zyklus in *Chlamydomonas* auszuschalten (z. Bsp. SHMT, SGT). Einzelmutanten im 2PG-Zyklus sollten im Falle eines funktionellen Glycerat-Wegs, ähnlich wie in *Synechocystis* (Eisenhut et al. 2006; Eisenhut et al. 2008), nur eine schwache Verringerung des Wachstums unter CO_2-armen und O_2-reichen Bedingungen aufweisen. Erst der zweite *Knock Down*, z.B. der TSR des Glycerat-Wegs, sollte zu einem "photorespiratorischen" Phänotyp führen, ähnlich der GlcDH- oder PGPase-Mutante von *Chlamydomonas* (Nakamura et al. 2005; Suzuki 1995).

Der Nachweis eines aktiven Glycerat-Wegs in der Grünalge *Chlamydomonas*, wäre ein Indiz dafür, dass ursprünglich nicht nur ein Teil des 2PG-Zyklus ins Genom der heutigen Landpflanzen übertragen wurde, sondern auch die Proteine des Glycerat-Wegs im gemeinsamen Vorläufer der Grün-, Rot- und Glaucophyta-Algen präsent waren. Im Zuge der weiteren Differenzierung der einzelnen Linien und der Evolution des 2PG-Zyklus, ging der Glycerat-Weg in den heutigen Landpflanzen verloren.

7. Literatur

Allen JF, Martin W (2007) Evolutionary biology - Out of thin air. Nature 445**:** 610-612

Allen JF (2005) A redox switch hypothesis for the origin of two light reactions in photosynthesis. Febs Letters 579**:** 963-968

Andersson JO (2005) Lateral gene transfer in eukaryotes. Cell Mol Life Sci 62**:** 1182-1197

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215**:** 403-410

Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou SG, Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A, Davis AK, Demarest MS, Detter JC, Glavina T, Goodstein D, Hadi MZ, Hellsten U, Hildebrand M, Jenkins BD, Jurka J, Kapitonov VV, Kroger N, Lau WWY, Lane TW, Larimer FW, Lippmeier JC, Lucas S, Medina M, Montsant A, Obornik M, Parker MS, Palenik B, Pazour GJ, Richardson PM, Rynearson TA, Saito MA, Schwartz DC, Thamatrakoln K, Valentin K, Vardi A, Wilkerson FP, Rokhsar DS (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. Science 306**:** 79-86

Atteia A, Adrait A, Brugiere S, Tardif M, van Lis R, Deusch O, Dagan T, Kuhn L, Gontero B, Martin W, Garin J, Joyard J, Rolland N (2009) A proteomic survey of *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria sheds new light on the metabolic plasticity of the organelle and on the nature of the α-Proteobacterial mitochondrial ancestor. Mol Biol Evol 26**:** 1533-1548

Awramik SM (1992) The oldest records of photosynthesis. Photosynth Res 33**:** 75-89

Badger MR, Price GD, Long BM, Woodger FJ (2006) The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO_2 concentrating mechanism. J Exp Bot 57**:** 249-265

Badour SS, Waygood ER (1971) Glyoxylate carboxy-lyase activity in unicellular green alga *Gloeomonas* sp. Biochim Biophys Acta 242: 493

Ball S, Colleoni C, Cenci U, Raj JN, Tirtiaux C (2011) The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. J Exp Bot 62**:** 1775-1801

Bandyopadhyay A, Elvitigala T, Welsh E, St+Âckel J, Liberton M, Min H, Sherman LA, Pakrasi HB (2011) Novel metabolic attributes of the genus *Cyanothece*, comprising a group of unicellular nitrogen-fixing Cyanobacteria. mBio 2**:**-

Bartsch O, Hagemann M, Bauwe H (2008) Only plant-type (GLYK) glycerate kinases produce D-glycerate 3-phosphate. Febs Letters 582**:** 3025-3028

Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR (2010) Photorespiration: players, partners and origin. Trends Plant Sci 15**:** 330-336

Bauwe H, Hagemann M, Kern R, Timm S (2012) Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. Curr Opin Plant Biol 15**:** 269-275

Baymann F, Brugna M, Muhlenhoff U, Nitschke W (2001) Daddy, where did (PS)I come from? Biochim Biophys Acta 1507**:** 291-310

Becker B, Marin B (2009) Streptophyte algae and the origin of embryophytes. Ann Bot-London 103**:** 999-1004

Beezley BB, Gruber PJ, Frederick SE (1976) Cytochemical localization of glycolate dehydrogenase in mitochondria of *Chlamydomonas*. Plant Physiol 58**:** 315-319

Bekker A, Holland HD, Wang PL, Rumble D, Stein HJ, Hannah JL, Coetzee LL, Beukes NJ (2004) Dating the rise of atmospheric oxygen. Nature 427**:** 117-120

Bhattacharya D, Yoon HS, Hackett JD (2004) Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. Bioessays 26**:** 50-60

Bhattacharya D, Archibald JM, Weber APM, Reyes-Prieto A (2007) How do endosymbionts become organelles? Understanding early events in plastid evolution. Bioessays 29**:** 1239-1246

Bhatti S, Colman B (2011) Evidence for the occurrence of photorespiration in synurophyte algae. Photosynth Res 109**:** 251-256

Bimboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl Acids Res 7**:**1513-1523.

Björn LO, Govindjee (2009) The evolution of photosynthesis and chloroplasts. Curr Sci India 96**:** 1466-1474

Blanc G, Agarkova I, Grimwood J, Kuo A, Brueggeman A, Dunigan DD, Gurnon J, Ladunga I, Lindquist E, Lucas S, Pangilinan J, Proschold T, Salamov A, Schmutz J, Weeks D, Yamada T, Lomsadze A, Borodovsky M, Claverie JM, Grigoriev IV, Van Etten JL (2012) The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. Genome Biol 13**:** R39-

Blanc G, Duncan G, Agarkova I, Borodovsky M, Gurnon J, Kuo A, Lindquist E, Lucas S, Pangilinan J, Polle J, Salamov A, Terry A, Yamada T, Dunigan DD, Grigoriev IV, Claverie

JM, Van Etten JL (2010) The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. Plant Cell 22**:** 2943-2955

Blankenship RE, Hartman H (1998) The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. Trends Biochem Sci 23**:** 94-97

Blankenship RE (2010) Early evolution of photosynthesis. Plant Physiol 154**:** 434-438

Boldt R, Edner C, Kolukisaoglu U, Hagemann M, Weckwerth W, Wienkoop S, Morgenthal K, Bauwe H (2005) D-GLYCERATE 3-KINASE, the last unknown enzyme in the photorespiratory cycle in *Arabidopsis*, belongs to a novel kinase family. Plant Cell 17**:** 2413-2420

Bonen L (2006) Mitochondrial genes leave home. New Phytol 172**:** 379-381

Bonen L, Doolittle WF (1976) Partial sequences of 16S ribosomal-RNA and phylogeny of blue-green-algae and chloroplasts. Nature 261**:** 669-673

Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F, Otillar RP, Rayko E, Salamov A, Vandepoele K, Beszteri B, Gruber A, Heijde M, Katinka M, Mock T, Valentin K, Verret F, Berges JA, Brownlee C, Cadoret JP, Chiovitti A, Choi CJ, Coesel S, De Martino A, Detter JC, Durkin C, Falciatore A, Fournet J, Haruta M, Huysman MJJ, Jenkins BD, Jiroutova K, Jorgensen RE, Joubert Y, Kaplan A, Kroger N, Kroth PG, La Roche J, Lindquist E, Lommer M, Martin-Jezequel V, Lopez PJ, Lucas S, Mangogna M, McGinnis K, Medlin LK, Montsant A, Oudot-Le Secq MP, Napoli C, Obornik M, Parker MS, Petit JL, Porcel BM, Poulsen N, Robison M, Rychlewski L, Rynearson TA, Schmutz J, Shapiro H, Siaut M, Stanley M, Sussman MR, Taylor AR, Vardi A, Von Dassow P, Vyverman W, Willis A, Wyrwicz LS, Rokhsar DS, Weissenbach J, Armbrust EV, Green BR, Van de Peer Y, Grigoriev IV (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. Nature 456**:** 239-244

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72**:**248-254

Brinkmann H, Martin W (1996) Higher-plant chloroplast and cytosolic 3-phosphoglycerate kinases: A case of endosymbiotic gene replacement. Plant Mol Biol 30**:** 65-75

Canfield DE (1998) A new model for Proterozoic ocean chemistry. Nature 396**:** 450-453

Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Mol Biol Evol 17**:** 540-552

Cavalier-Smith T (2006) Origin of mitochondria by intracellular enslavement of a photosynthetic purple bacterium. P Roy Soc Lond B Biol 273**:** 1943-1952

Cavalier-Smith T (2010) Deep phylogeny, ancestral groups and the four ages of life. Philos T Roy Soc B 365**:** 111-132

Cock J, Arun A, Godfroy O, Macaisne N, Strittmatter M, Peters A, Coelho S (2012) Genomics of brown algae: current advances and future prospects. Genes Genom 34**:** 1-5

Cox CJ, Foster PG, Hirt RP, Harris SR, Embley TM (2008) The archaebacterial origin of eukaryotes. P Natl Acad Sci USA 105**:** 20356-20361

Cramer SD, Ferree PM, Lin K, Milliner DS, Holmes RP (1999) The gene encoding hydroxypyruvate reductase (GRHPR) is mutated in patients with primary hyperoxaluria type II. Hum Mol Genet 8**:** 2063-2069

de Vries GE, Kües U, Stahl U (1990) Physiology and genetics of methylotrophic bacteria. Fems Microbiol Lett 75**:** 57-101

de Duve C (1982) Peroxisomes and related particles in historical perspective. Ann N Y Acad Sci 386**:** 1–4.

Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res. 36 (Web Server issue)**:** W465-W469

Delwiche CF, Palmer JD (1996) Rampant horizontal transfer and duplication of rubisco genes in eubacteria and plastids. Mol Biol Evol 13**:** 873-882

Derelle E, Ferraz C, Rombauts S, Rouzé P, Worden AZ, Robbens S, Partensky F, Degroeve S, Echeynié S, Cooke R, Saeys Y, Wuyts J, Jabbari K, Bowler C, Panaud O, Piégu B, Ball SG, Ral JP, Bouget FY, Piganeau G, De Baets B, Picard A, Delseny M, Demaille J, Van de Peer Y, Moreau H (2006) Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. PNAS 103**:** 11647-11652

Deschamps P, Colleoni C, Nakamura Y, Suzuki E, Putaux JL, Buleon A, Haebel S, Ritte G, Steup M, Falcon LI, Moreira D, Löffelhardt W, Raj JN, Plancke C, d'Hulst C, Dauvillee D, Ball S (2008) Metabolic symbiosis and the birth of the plant kingdom. Mol Biol Evol 25**:** 536-548

Deusch O, Landan G, Roettger M, Gruenheit N, Kowallik KV, Allen JF, Martin W, Dagan T (2008) Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. Mol Biol Evol 25**:** 748-761

Dietrich LEP, Tice MM, Newman DK (2006) The co-evolution of life and Earth. Curr Biol 16**:** R395-R400

Edenborn HM, Litchfield CD (1985) Glycolate metabolism by *Pseudomonas* sp., strain S227, isolated from a coastal marine sediment. Mar Biol 88**:** 199-205

Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucl Acids Res 32**:** 1792-1797

Eisenhut M, Kahlon S, Hasse D, Ewald R, Lieman-Hurwitz J, Ogawa T, Ruth W, Bauwe H, Kaplan A, Hagemann M (2006) The plant-like C2 glycolate cycle and the bacterial-like glycerate pathway cooperate in phosphoglycolate metabolism in cyanobacteria. Plant Physiol 142**:** 333-342

Eisenhut M, Ruth W, Haimovich M, Bauwe H, Kaplan A, Hagemann M (2008) The photorespiratory glycolate metabolism is essential for cyanobacteria and might have been conveyed endosymbiontically to plants. P Natl Acad Sci USA 105**:** 17199-17204

Embley TM, Martin W (2006) Eukaryotic evolution, changes and challenges. Nature 440**:** 623-630

Engel N, van den Daele K, Kolukisaoglu U, Morgenthal K, Weckwerth W, Parnik T, Keerberg O, Bauwe H (2007) Deletion of glycine decarboxylase in *Arabidopsis* is lethal under nonphotorespiratory conditions. Plant Physiol 144**:** 1328-1335

Esser C, Ahmadinejad N, Wiegand C, Rotte C, Sebastiani F, Gelius-Dietrich G, Henze K, Kretschmann E, Richly E, Leister D, Bryant D, Steel MA, Lockhart PJ, Penny D, Martin W (2004) A genome phylogeny for mitochondria among α-Proteobacteria and a predominantly eubacterial ancestry of yeast nuclear genes. Mol Biol and Evol 21**:** 1643-1660

Falcon LI, Magallon S, Castillo A (2010) Dating the cyanobacterial ancestor of the chloroplast. ISME J 4**:** 777-783

Fay P (1992) Oxygen relations of nitrogen-fixation in Cyanobacteria. Microbiol Rev 56**:** 340-373

Flagel LE, Blackman BK (2012) The first ten years of plant genome sequencing and prospects for the next decade. Plant Genome Diversity Volume 1. (Eds JF Wendel, J Greilhuber, J Dolezel, and IJ Leitch) pp. 1-15. Springer

Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G (2009) Photorespiratory metabolism: Genes, mutants, energetics, and redox signaling. Annu Rev Plant Biol 60**:** 455-484

Frederic SE, Gruber PJ, Tolbert NE (1973) Occurrence of glycolate dehydrogenase and glycolate oxidase in green plants - Evolutionary survey. Plant Physiol 52**:** 318-323

Friedrich M, Laderer U, Schink B (1991) Fermentative degradation of glycolic acid by defined syntrophic cocultures. Arch Microbiol 156**:** 398-404

Frommolt R, Werner S, Paulsen H, Goss R, Wilhelm C, Zauner S, Maier UG, Grossman AR, Bhattacharya D, Lohr M (2008) Ancient recruitment by chromists of green algal genes encoding enzymes for carotenoid biosynthesis. Mol Biol and Evol 25**:** 2653-2667

Furuya A, Hayashi JA (1963) Glycolic acid oxidation by Escherichia coli adapted to glycolate. J Bacteriol 85**:** 1124-1131

Gabaldon T (2010) Peroxisome diversity and evolution. Philos T Roy Soc B 365**:** 765-773

Garcia-Pichel F, López-Cortés A, Nübel U (2001) Phylogenetic and morphological diversity of Cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado plateau. Appl Environ Microb 67**:** 1902-1910

Giordano M, Beardall J, Raven JA (2005) CO_2 CONCENTRATING MECHANISMS IN ALGAE: Mechanisms, environmental modulation, and evolution. Annu Rev Plant Biol 56**:** 99-131

Golubic S, Lee SJ (1999) Early cyanobacterial fossil record: preservation, palaeoenvironments and identification. Eur J Phycol 34**:** 339-348

Gould SB, Waller RF, McFadden GI (2008) Plastid evolution. Annu Rev Plant Biol 59**:** 491-517

Gravot A, Dittami SM, Rousvoal S, Lugan R, Eggert A, Collen J, Boyen C, Bouchereau A, Tonon T (2010) Diurnal oscillations of metabolite abundances and gene analysis provide new insights into central metabolic processes of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. New Phytol 188**:** 98-110

Gray MW, Burger G, Lang BF (2001) The origin and early evolution of mitochondria. Genome Biol 2**:** reviews1018.1–reviews1018.5

Gribaldo S, Poole AM, Daubin V, Forterre P, Brochier-Armanet C (2010) The origin of eukaryotes and their relationship with the Archaea: are we at a phylogenomic impasse? Nat Rev Micro 8**:** 743-752

Gross W, Winkler U, Stabenau H (1985) Characterization of peroxisomes from the alga *Bumilleriopsis filiformis*. Plant Physiol 77**:** 296-299

Gugger MF, Hoffmann L (2004) Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). Int J Syst Evol Micr 54**:** 349-357

Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol 52**:** 696-704

Gupta RS (2003) Evolutionary relationships among photosynthetic bacteria. Photosynth Res 76**:** 173-183

Gupta RS, Mathews DW (2010) Signature proteins for the major clades of Cyanobacteria. BMC Evol Biol 10**:** 24-44

Hackenberg C, Engelhardt A, Matthijs HC, Wittink F, Bauwe H, Kaplan A, Hagemann M (2009) Photorespiratory 2-phosphoglycolate metabolism and photoreduction of O_2 cooperate in high-light acclimation of *Synechocystis* sp strain PCC 6803. Planta 230**:** 625-637

Hackenberg C, Kern R, Huege J, Stal LJ, Tsuji Y, Kopka J, Shiraiwa Y, Bauwe H, Hagemann M (2011) Cyanobacterial lactate oxidases serve as essential partners in N(2) fixation and evolved into photorespiratory glycolate oxidases in plants. Plant Cell 23**:** 2978-2990

Hagemann M, Alisdair RF, George ES, Kern R, Eisenhut M, Reumann S, Bauwe H, Weber APM (2012) Evolution of the biochemistry of the photorespiratory C2 cycle. Plant Biology-*accepted*

Hagemann M,Vinnemeier J, Oberpichler I, Boldt R, Bauwe H (2005). The glycine decarboxylase complex is not essential for the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803. Plant Biol 7**:** 15-22

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp 41**:** 95-98

Hamilton JP, Buell RC (2012) Advances in plant genome sequencing. Plant J 70**:** 177-190

Hansen RW, Hayashi JA (1962) Glycolate metabolism in *Escherichia coli*. J Bacteriol 83**:** 679-687

Henson BJ, Hesselbrock SM, Watson LE, Barnum SR (2004) Molecular phylogeny of the heterocystous cyanobacteria (subsections IV and V) based on *nifD*. Int J Syst Evol Micr 54**:** 493-497

Hess WR, Rocap G, Ting CS, Larimer F, Stilwagen S, Lamerdin J, Chisholm SW (2001) The photosynthetic apparatus of *Prochlorococcus*: Insights through comparative genomics. Photosynth Res 70**:** 53-71

Ho CH, Noji M, Saito M, Saito K (1999) Regulation of serine biosynthesis in *Arabidopsis*. J Biolog Chem 274**:** 397-402

Honda D, Yokota A, Sugiyama J (1999) Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. J Mol Evol 48**:** 723-739

Husic DW, Husic HD, Tolbert NE (1987) The oxidative photosynthetic carbon-cycle or C2 cycle. CRC Cr Rev Plant Sci 5**:** 45-100

Igamberdiev AU, Lea PJ (2002) The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. Phytochemistry 60**:** 651-674

Ishikawa M, Fujiwara M, Sonoike K, Sato N (2009) Orthogenomics of photosynthetic organisms: Bioinformatic and experimental analysis of chloroplast proteins of andosymbiont origin in *Arabidopsis* and their counterparts in *Synechocystis*. Plant Cell Physiol 50**:** 773-788

Iwamoto K, Ikawa T (2000) A novel glycolate oxidase requiring flavin mononucleotide as the cofactor in the prasinophycean alga *Mesostigma viride*. Plant Cell Physiol 41**:** 988-991

Iwamoto K, Suzuki K, Ikawa T (1996) Purification and characterization of glycolate oxidase from the brown alga *Spatoglossum pacificum* (Phaeophyta). J Phycol 32**:** 790-798

Janoušíkovec N, Horák A, Oborník M, Lukeš J, Keeling PJ (2010) A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. PNAS 107**:** 10949-10954

Jones MR (2007) Lipids in photosynthetic reaction centres: Structural roles and functional holes. Prog Lipid Res 46**:** 56-87

Kaneko T, Nakamura Y, Wolk CP, Kuritz T, Sasamoto S, Watanabe A, Iriguchi M, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takazawa M, Yamada M, Yasuda M, Tabata S (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. DNA Res 8**:** 205-213

Kaplan A, Reinhold L (1999) CO_2 concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. Annu rev plant Phys 50**:** 539-570

Kasting JF (2005) Methane and climate during the Precambrian era. 3. Precambrian Research 137**:** 119-129

Kaul S, Koo HL, Jenkins J, Rizzo M, Rooney T, Tallon LJ, Feldblyum T, Nierman W, Benito MI, Lin XY, Town CD, Venter JC, Fraser CM, Tabata S, Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Asamizu E, Kato T, Kotani H, Sasamoto S, Ecker JR, Theologis A, Federspiel NA, Palm CJ, Osborne BI, Shinn P, Conway AB, Vysotskaia VS, Dewar K, Conn L, Lenz CA, Kim CJ, Hansen NF, Liu SX, Buehler E, Altafi H, Sakano H, Dunn P, Lam B, Pham PK, Chao Q, Nguyen M, Yu GX, Chen HM, Southwick A, Lee JM, Miranda M, Toriumi MJ, Davis RW, Wambutt R, Murphy G, Dusterhoft A, Stiekema W, Pohl T, Entian KD, Terryn N, Volckaert G, Salanoubat M, Choisne N, Rieger M, Ansorge W, Unseld M, Fartmann B, Valle G, Artiguenave F, Weissenbach J, Quetier F, Wilson RK, de la Bastide M, Sekhon M, Huang E, Spiegel L, Gnoj L, Pepin K, Murray J, Johnson D, Habermann K, Dedhia N, Parnell L, Preston R, Hillier L, Chen E, Marra M, Martienssen R, McCombie WR, Mayer K, White O, Bevan M, Lemcke K, Creasy TH, Bielke C, Haas B, Haase D, Maiti R, Rudd S, Peterson J, Schoof H, Frishman D, Morgenstern B, Zaccaria P, Ermolaeva M, Pertea M, Quackenbush J, Volfovsky N, Wu DY, Lowe TM, Salzberg SL, Mewes HW, Rounsley S, Bush D, Subramaniam S, Levin I, Norris S, Schmidt R, Acarkan A, Bancroft I, Quetier F, Brennicke A, Eisen JA, Bureau T, Legault BA, Le QH, Agrawal N, Yu Z, Martienssen R, Copenhaver GP, Luo S, Pikaard CS, Preuss D, Paulsen IT, Sussman M, Britt AB, Selinger DA, Pandey R, Mount DW, Chandler VL, Jorgensen RA, Pikaard C, Juergens G, Meyerowitz EM, Theologis

A, Dangl J, Jones JDG, Chen M, Chory J, Somerville MC (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408**:** 796-815

Keeling PJ (2004) Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. Am J Bot 91**:** 1481-1493

Kern R, Bauwe H, Hagemann M (2011) Evolution of enzymes involved in the photorespiratory 2-phosphoglycolate cycle from cyanobacteria via algae toward plants. Photosynth Res 109**:** 103-114

Keys A (2006) The re-assimilation of ammonia produced by photorespiration and the nitrogen economy of C_3 higher plants. Photosynth Res 87**:**165-175

Kindle KL (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. PNAS 87**:** 1228-1232

Kirschvink JL, Kopp RE (2008) Palaeoproterozoic ice houses and the evolution of oxygen-mediating enzymes: the case for a late origin of photosystem II. Philos T Roy Soc B 363**:** 2755-2765

Kleczkowski LA, Randall DD (1988) Purification and characterization of a novel NADPH (NADH)-dependent hydroxypyruvate reductase from spinach leaves - Comparison of immunological properties of leaf hydroxypyruvate reductases. Biochem J 250**:** 145-152

Knoop H, Zilliges Y, Lockau W, Steuer R (2010) The metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803: Systemic properties of autotrophic growth. Plant Physiol

Kozaki A, Takeba G (1996) Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. Nature 384**:** 557-560

Kranz HD, Miks D, Siegler ML, Capesius I, Sensen CW, Huss VAR (1995) The origin of land plants: Phylogenetic relationships among charophytes, bryophytes, and vascular plants inferred from complete small-subunit ribosomal RNA gene sequences. J Mol Evol 41**:** 74-84

Kroth PG, Chiovitti A, Gruber A, Martin-Jezequel V, Mock T, Parker MS, Stanley MS, Kaplan A, Caron L, Weber T, Maheswari U, Armbrust EV, Bowler C (2008) A model for carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* deduced from comparative whole genome analysis. Plos One 3**:** e1426

Kuznetsova E, Proudfoot M, Gonzalez CF, Brown G, Omelchenko MV, Borozan I, Carmel L, Wolf YI, Mori H, Savchenko AV, Arrowsmith CH, Koonin EV, Edwards AM, Yakunin AF (2006) Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family. J Biol Chem 281**:** 36149-36161

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. Nature 227**:** 680

Langdale JA (2011) C_4 cycles: Past, present, and future research on C_4 photosynthesis. Plant Cell 23**:** 3879-3892

Le SQ, Gascuel O (2008) An improved general amino acid replacement matrix. Mol Biol and Evol 25**:** 1307-1320

Le Corguille G, Pearson G, Valente M, Viegas C, Gschloessl B, Corre E, Bailly X, Peters AF, Jubin C, Vacherie B, Cock JM, Leblanc C (2009). Plastid genomes of two brown algae, *Ectocarpus siliculosus* and *Fucus vesiculosus*: further insights on the evolution of red-algal derived plastids. Bmc Evol Biol 9

Lewis LA, McCourt RM (2004) Green algae and the origin of land plants. Am J Bot 91**:** 1535-1556

Liepman AH, Olsen LJ (2001) Peroxisomal alanine: glyoxylate aminotransferase (AGT1) is a photorespiratory enzyme with multiple substrates in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 25**:** 487-498

Löffelhardt W, Bohnert HJ, Bryant DA (1997) The cyanelles of *Cyanophora paradoxa*. CRC Cr Rev Plant Sci 16**:** 393-413

Lombard J, Lopez-Garcia P, Moreira D (2012) The early evolution of lipid membranes and the three domains of life. Nature Rev Microbiol 10**:** 507-515

Lorimer GH, Andrews TJ (1973) Plant photorespiration - An inevitable consequence of the existence of atmospheric oxygen. Nature 243**:** 359-360

Lutziger I, Oliver DJ (2000). Molecular evidence of a unique lipoamide dehydrogenase in plastids: analysis of plastidic lipoamide dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. Febs Letters 484**:** 12-16

Lyngstadaas A, Løbner-Olesen A, Grelland E, Boye E (1999) The gene for 2-phosphoglycolate phosphatase (*gph*) in *Escherichia coli* is located in the same operon as *dam* and at least five other diverse genes. BBA-Gen Subjects 1472**:** 376-384

Nelissen B, Vandepeer Y, Wilmotte A, Dewachter R (1995) An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolutionary trees based on complete 16S ribosomal-RNA sequences. Mol Biol Evol 12**:** 1166-1173

Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. P Natl Acad Sci USA 99**:** 12246-12251

Maruyama S, Matsuzaki M, Misawa K, Nozaki H (2009) Cyanobacterial contribution to the genomes of the plastid-lacking protists. BMC Evol Biol 9**:** 197

Matsuzaki M, Misumi O, Shin I, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima SY, Mori T, Nishida K, Yagisawa F, Nishida K, Yoshida Y, Nishimura Y, Nakao S, Kobayashi T, Momoyama Y, Higashiyama T, Minoda A, Sano M, Nomoto H, Oishi K, Hayashi H, Ohta F, Nishizaka S, Haga S, Miura S, Morishita T, Kabeya Y, Terasawa K, Suzuki Y, Ishii Y, Asakawa S, Takano H, Ohta N, Kuroiwa H, Tanaka K, Shimizu N, Sugano S, Sato N, Nozaki H, Ogasawara N, Kohara Y, Kuroiwa T (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. Nature 428**:** 653-657

McClung CR, Hsu M, Painter JE, Gagne JM, Karlsberg SD, Salome PA (2000) Integrated temporal regulation of the photorespiratory pathway. Circadian regulation of two *Arabidopsis* genes encoding serine hydroxymethyltransferase. Plant Physiol 123**:** 381-392

Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Marechal-Drouard L, Marshall WF, Qu LH, Nelson DR, Sanderfoot AA, Spalding MH, Kapitonov VV, Ren QH, Ferris P, Lindquist E, Shapiro H, Lucas SM, Grimwood J, Schmutz J, Cardol P, Cerutti H, Chanfreau G, Chen CL, Cognat V, Croft MT, Dent R, Dutcher S, Fernandez E, Fukuzawa H, Gonzalez-Balle D, Gonzalez-Halphen D, Hallmann A, Hanikenne M, Hippler M, Inwood W, Jabbari K, Kalanon M, Kuras R, Lefebvre PA, Lemaire SD, Lobanov AV, Lohr M, Manuell A, Meir I, Mets L, Mittag M, Mittelmeier T, Moroney JV, Moseley J, Napoli C, Nedelcu AM, Niyogi K, Novoselov SV, Paulsen IT, Pazour G, Purton S, Ral JP, Riano-Pachon DM, Riekhof W, Rymarquis L, Schroda M, Stern D, Umen J, Willows R, Wilson N, Zimmer SL, Allmer J, Balk J, Bisova K, Chen CJ, Elias M, Gendler K, Hauser C, Lamb MR, Ledford H, Long JC, Minagawa J, Page MD, Pan JM, Pootakham W, Roje S, Rose A, Stahlberg E, Terauchi AM, Yang PF, Ball S, Bowler C, Dieckmann CL, Gladyshev VN, Green P, Jorgensen R, Mayfield S, Mueller-Roeber B, Rajamani S, Sayre RT, Brokstein P, Dubchak I, Goodstein D, Hornick L, Huang YW, Jhaveri J, Luo YG, Martinez D, Ngau WCA, Otillar B, Poliakov A, Porter A, Szajkowski L, Werner G, Zhou KM, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Grossman AR (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. Science 318**:** 245-251

Mereschkowsky C (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. Biologisches Centralblatt 25**:** 593-604

Molnar A, Bassett A, Thuenemann E, Schwach F, Karkare S, Ossowski S, Weigel D, Baulcombe D (2009) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J 58:* 165-174

Molnar A, Schwach F, Studholme DJ, Thuenemann EC, Baulcombe DC (2007) miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Nature 447**:** 1126-1129

Moreira D, Le Guyader H, Philippe H (2000) The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. Nature 405**:** 69-72

Moroney JV, Wilson BJ, Tolbert NE (1986) Glycolate Metabolism and Excretion by Chlamydomonas-Reinhardtii. Plant Physiol 82**:** 821-826

Moustafa A, Beszteri B, Maier UG, Bowler C, Valentin K, Bhattacharya D (2009) Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. Science 324**:** 1724-1726

Mulkidjanian AY, Koonin EV, Makarova KS, Mekhedov SL, Sorokin A, Wolf YI, Dufresne A, Partensky F, Burd H, Kaznadzey D, Haselkorn R, Galperin MY (2006) The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis. P Natl Acad Sci USA 103**:** 13126-13131

Nakamura Y, Kanakagiri S, Van K, He W, Spalding MH (2005) Disruption of the glycolate dehydrogenase gene in the high-CO_2-requiring mutant HCR89 of *Chlamydomonas reinhardtii*. Can J Bot 83**:** 820-833

Nelson N, Yocum CF (2006) Structure and function of photosystems I and II.Annu Rev Plant Biol 57**:** 521-565

Norman EG, Colman B (1988) Evidence for an incomplete glycolate pathway in cyanobacteria. J Plant Physiol 132**:** 766-768

Norman EG, Colman B (1991) Purification and characterization of phosphoglycolate phosphatase from the cyanobacterium *Coccochloris peniocystis*. Plant Physiol 95**:** 693-698

Novikoff A, Shin W Y (1964) The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relation to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. J Microsc 3**:** 187-206

Nowack ECM, Melkonian M, Gl÷ckner G (2008) Chromatophore genome sequence of *Paulinella* sheds light on acquisition of photosynthesis by Eukaryotes. Curr Biol 18**:** 410-418

Nübel U, Garcia-Pichel F, Clavero E, Muyzer G (2000) Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. Environ Microbiol 2**:** 217-226

Oh-oka H (2007) Type 1 reaction center of photosynthetic heliobacteria. Photochem Photobiol 83**:** 177-186

Ohshima T, Nunoura-Kominato N, Kudome T, Sakuraba H (2001) A novel hyperthermophilic archaeal glyoxylate reductase from *Thermococcus litoralis*. Eur J Biochem 268**:** 4740-4747

Oliver DJ (1994) The glycine decarboxylase complex from plant-mitochondria. Annu Rev Plant Phys 45**:** 323-337

Olson JM, Blankenship RE (2004) Thinking about the evolution of photosynthesis. Photosynth Res 80**:** 373-386

Osmond CB, Harris B (1971) Photorespiration during C_4 photosynthesis. BBA - Bioenergetics 234**:** 270-282

Paul JS, Volcani BE (1976) Photorespiration in diatoms. 4.2 Pathways of glycolate metabolism in synchronized cultures of *Cylindrotheca fusiformis*. Arch Microbiol 110**:** 247-252

Pellicer MT, Badia J, Aguilar J, Baldoma L (1996) *glc* locus of *Escherichia coli*: Characterization of genes encoding the subunits of glycolate oxidase and the *glc* regulator protein. J Bacteriol 178**:** 2051-2059

Pellicer MT, Nunez MF, Aguilar J, Badia J, Baldoma L (2003) Role of 2-phosphoglycolate phosphatase of *Escherichia coli* in metabolism of the 2-phosphoglycolate formed in DNA repair. J Bacteriol 185**:** 5815-5821

Peregrin-Alvarez J, Sanford C, Parkinson J (2009) The conservation and evolutionary modularity of metabolism. Genome Biol 10**:** R63

Price DC, Chan CX, Yoon HS, Yang EC, Qiu H, Weber AP, Schwacke R, Gross J, Blouin NA, Lane C, Reyes-Prieto A, Durnford DG, Neilson JA, Lang B, Burger G, Steiner JM, Loeffelhardt W, Meuser JE, Posewitz MC, Ball S, Arias MC, Henrissat B, Coutinho PM, Rensing SA, Symeonidi A, Doddapaneni H, Green BR, Rajah VD, Boore J, Bhattacharya D (2012) *Cyanophora paradoxa* genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. Science 335**:** 843-847

Rajaniemi P, Hrouzek P, Kastovska K, Willame R, Rantala A, Hoffmann L, Komarek J, Sivonen K (2005) Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (*Nostocales*, Cyanobacteria). Int J Syst Evol Micr 55**:** 11-26

Raven JA, Giordano M, Beardall J (2008a) Insights into the evolution of CCMs from comparisons with other resource acquisition and assimilation processes. Physiol Plantarum 133**:** 4-14

Raven JA, Cockell CS, De La Rocha CL (2008b) The evolution of inorganic carbon concentrating mechanisms in photosynthesis. Philos T Roy Soc B 363**:** 2641-2650

Raven JA, Giordano M, Beardall J, Maberly SC (2012) Algal evolution in relation to atmospheric CO_2: carboxylases, carbon-concentrating mechanisms and carbon oxidation cycles. Philos T Roy Soc B 367**:** 493-507

Reinfelder JR (2011) Carbon concentrating mechanisms in eukaryotic marine phytoplankton. Ann Rev Mar Sci 3**:** 291-315

Reith M, Munholland J (1995) Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. Plant Mol Biol Rep 13**:** 333-335

Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud PF, Lindquist EA, Kamisugi Y, Tanahashi T, Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin I, Kuroki Y,

Toyoda A, Suzuki Y, Hashimoto S, Yamaguchi K, Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Anterola A, Aoki S, Ashton N, Barbazuk WB, Barker E, Bennetzen JL, Blankenship R, Cho SH, Dutcher SK, Estelle M, Fawcett JA, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks KA, Hughes J, Lohr M, Mayer K, Melkozernov A, Murata T, Nelson DR, Pils B, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushton PJ, Sanderfoot A, Schween G, Shiu SH, Stueber K, Theodoulou FL, Tu H, Van de Peer Y, Verrier PJ, Waters E, Wood A, Yang LX, Cove D, Cuming AC, Hasebe M, Lucas S, Mishler BD, Reski R, Grigoriev IV, Quatrano RS, Boore JL (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. Science 319**:** 64-69

Renström E, Bergman B (1989) Glycolate metabolism in cyanobacteria. 1. Glycolate excretion and phosphoglycolate phosphatase-activity. Physiol Plantarum 75**:** 137-143

Reumann S, Ma C, Lemke S, Babujee L (2004) AraPerox. A database of putative *Arabidopsis* proteins from plant peroxisomes. Plant Physiol 136**:** 2587-2608

Reumann S, Weber APM (2006) Plant peroxisomes respire in the light: Some gaps of the photorespiratory C2 cycle have become filled--Others remain. BBA Mol Cell Res 1763**:** 1496-1510

Reyes-Prieto A, Hackett JD, Soares MB, Bonaldo MF, Bhattacharya D (2006) Cyanobacterial contribution to algal nuclear genomes a primarily limited to plastid functions. Curr Biol 16**:** 2320-2325

Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J Gen Microbiol 111**:** 1-61

Rousseau-Gueutin M, Ayliffe M, Timmis j (2011) Conservation of plastid sequences in the plant nuclear genome for millions of years facilitates endosymbiotic evolution. Plant Physiol 157**:** 2181-2193

Sagan L (1967) On the origin of mitosing cells. J Theor Biol 14**:** 255-274

Sage RF, Christin PA, Edwards EJ (2011) The C_4 plant lineages of planet Earth. J Exp Bot 62**:** 3155-3169

Sakai S, Inokuma K, Nakashimada Y, Nishio N (2008) Degradation of glyoxylate and glycolate with ATP synthesis by a thermophilic anaerobic bacterium, *Moorella* sp. strain HUC22-1. Appl Environ Microb 74**:** 1447-1452

Sasaki NV, Sato N (2010) CyanoClust: comparative genome resources of cyanobacteria and plastids. Database 2010**:** bap025

Sato N, Ishikawa M, Fujiwara M, Sonoike K (2005) Mass identification of chloroplast proteins of endosymbiont origin by phylogenetic profiling based on organism-optimized homologous

protein groups. Genome informatics International Conference on Genome Informatics 16**:** 56-68

Scanlan DJ, Ostrowski M, Mazard S, Dufresne A, Garczarek L, Hess WR, Post AF, Hagemann M, Paulsen I, Partensky F (2009) Ecological genomics of marine picocyanobacteria. Microbiol Mol Biol Rev 73**:** 249-+

Schäferjohann J, Yoo JG, Kusian B, Bowien B (1993) The *Cbb* operons of the facultative chemoautotroph *Alcaligenes eutrophus* encode phosphoglycolate phosphatase. J Bacteriol 175**:** 7329-7340

Schimper AFW (1883) Ueber die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. Botanische Zeitung 41

Schopf JW, Packer BM (1987) Early Archean (3.3 billion to 3.5 billion-year-old) microfossils from Warrawoona group, Australia. Science 237**:** 70-73

Schroda M (2006) RNA silencing in *Chlamydomonas*: mechanisms and tools. Curr Genet 49**:** 69-84

Schubert WD, Klukas O, Saenger W, Witt HT, Fromme P, Krauss N (1998) A common ancestor for oxygenic and anoxygenic photosynthetic systems: A comparison based on the structural model of photosystem I. J Mol Biol 280**:** 297-314

Schwarte S, Bauwe H (2007) Identification of the photorespiratory 2-phosphoglycolate phosphatase, PGLP1, in *Arabidopsis*. Plant Physiol 144**:** 1580-1586

Seckbach J, Gonzales E, Wainwright IM, Gross W (1992) Peroxisomal function in the Cyanidiophyceae (Rhodophyta) - A discussion of phylogenetic-relationships and the evolution of microbodies (peroxisomes). Nova Hedwigia 55**:** 99-109

Shen PH, Wu B (2007) Over-expression of a hydroxypyruvate reductase in *Methylobacterium* sp. MB200 enhances glyoxylate accumulation. J Ind Microbiol Biot 34**:** 657-663

Shinozaki A, Sato N, Hayashi Y (2009) Peroxisomal targeting signals in green algae. Protoplasma 235**:** 57-66

Somerville CR (2001) An early *Arabidopsis* demonstration. Resolving a few issues concerning photorespiration. Plant Physiol 125**:** 20-24

Stabenau H, Winkler U (2005) Glycolate metabolism in green algae. Physiol Plantarum 123**:** 235-245

Sundquist A, Ronaghi M, Tang H, Pevzner P, Batzoglou S (2007) Whole-genome sequencing and assembly with high-throughput, short-read technologies. Plos One 2**:** e484-

Suzuki K (1995) Phosphoglycolate phosphatase-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* capable of growth under air. Plant Cell Physiol 36**:** 95-100

Suzuki K, Iwamoto K, Yokoyama S, Ikawa T (1991) Glycolate-oxidizing enzymes in algae. J Phycol 27**:** 492-498

Tabita FR, Hanson TE, Li H, Satagopan S, Singh J, Chan S (2007) Function, structure, and evolution of the RubisCO-Like proteins and their RubisCO homologs. Microbiol Mol Biol Rev 71**:** 576-599

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony pethods. Mol Biol Evol

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal-W - Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl Acids Res 22**:** 4673-4680

Thrash JC, Boyd A, Huggett MJ, Grote J, Carini P, Yoder RJ, Robbertse B, Spatafora JW, Rappe MS, Giovannoni SJ (2011) Phylogenomic evidence for a common ancestor of mitochondria and the SAR11 clade. Scientific Reports 1**:** e30520

Timm S, Nunes-Nesi A, Pamik T, Morgenthal K, Wienkoop S, Keerberg O, Weckwerth W, Kleczkowski LA, Fernie AR, Bauwe H (2008) A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in *Arabidopsis*. Plant Cell 20**:** 2848-2859

Timm S, Mielewczik M, Florian A, Frankenbach S, Dreissen A, Hocken N, Fernie AR, Walter A, Bauwe H (2012) High-to-Low CO_2 acclimation reveals plasticity of the photorespiratory pathway and indicates regulatory links to cellular metabolism of *Arabidopsis*. Plos One 7**:** e42809

Tolbert NE (1997) The C2 oxidative photosynthetic carbon cycle. Annu Rev Plant Phys 48**:** 1-23

Tolbert NE, Yamazaki RK, Oeser A (1970) Localization and properties of hydroxypyruvate and glyoxylate reductases in spinach leaf particles. J Biol Chem 245**:** 5129-5136

Tomitani A, Knoll AH, Cavanaugh CM, Ohno T (2006) The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. P Natl Acad Sci USA 103**:** 5442-5447

Turner S, Huang TC, Chaw SM (2001) Molecular phylogeny of nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria. Bot Bull Aca Sinica 42**:** 181-186

Utting JM, Kohn LD (1975) Structural, kinetic, and renaturation properties of an induced hydroxypyruvate reductase from Pseudomonas acidovorans. J Biol Chem 250**:** 5233-5242

Van Der Giezen M, Lenton TM (2012) The rise of oxygen and complex life. J Eukaryot Microbiol 59**:** 111-113

Venter JC, Smith HO, Hood L (1996) A new strategy for genome sequencing. Nature 381**:** 364-366

Vesteg M, Vacula R, Krajcovic J (2009) On the origin of chloroplasts, import mechanisms of chloroplast-targeted proteins, and loss of photosynthetic ability - review. Folia Microbiol 54**:** 303-321

Voll LM, Jamai A, Renne P, Voll H, McClung CR, Weber APM (2006) The photorespiratory *Arabidopsis shm1* mutant is deficient in SHM1. Plant Physiol 140**:** 59-66

Weber APM, Osteryoung KW (2010) From endosymbiosis to synthetic photosynthetic life. Plant Physiol 154**:** 593-597

Whelan S, Goldman N (2001) A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. Mol Biol Evol 18**:**691-699

Wickramasinghe RH, Villee CA (1975) Early role during chemical evolution for cytochrome P450 in oxygen detoxification. Nature 256**:** 509-511

Wilson RL, Stauffer LT, Stauffer GV (1993) Roles of the GcvA and PurR proteins in negative regulation of the *Escherichia* coli glycine cleavage enzyme system. J Bacteriol 175**:** 5129-5134

Winkler U, Stabenau H (1995) Isolation and characterization of peroxisomes from diatoms. Planta 195**:** 403-407

Worden AZ, Lee JH, Mock T, Rouze P, Simmons MP, Aerts AL, Allen AE, Cuvelier ML, Derelle E, Everett MV, Foulon E, Grimwood J, Gundlach H, Henrissat B, Napoli C, McDonald SM, Parker MS, Rombauts S, Salamov A, Von Dassow P, Badger JH, Coutinho PM, Demir E, Dubchak I, Gentemann C, Eikrem W, Gready JE, John U, Lanier W, Lindquist EA, Lucas S, Mayer KFX, Moreau H, Not F, Otillar R, Panaud O, Pangilinan J, Paulsen I, Piegu B, Poliakov A, Robbens S, Schmutz J, Toulza E, Wyss T, Zelensky A, Zhou K, Armbrust EV, Bhattacharya D, Goodenough UW, Van de Peer Y, Grigoriev IV (2009) Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas*. Science 324**:** 268-272

Xiong J, Fischer WM, Inoue K, Nakahara M, Bauer CE (2000) Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. Science 289**:** 1724-1730

Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G, Bhattacharya D (2004) A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. Mol Biol Evol 21**:** 809-818

Yoshikawa S, Arai R, Kinoshita Y, Uchikubo-Kamo T, Wakamatsu T, Akasaka R, Masui R, Terada T, Kuramitsu S, Shirouzu M, Yokoyama S (2007) Structure of archaeal glyoxylate reductase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 complexed with nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. Acta Crystallogr D 63**:** 357-365

Young JD, Shastri AA, Stephanopoulos G, Morgan JA (2011) Mapping photoautotrophic metabolism with isotopically nonstationary C-13 flux analysis. Metabol Engineering 13**:** 656-665

Zelda B (1981) Phosphoglycolate phosphatase from human red blood cells. Arch Biochem Biophys 208**:** 602-609

Zelitch I, Schultes NP, Peterson RB, Brown P, Brutnell TP (2009) High glycolate oxidase activity is required for survival of maize in normal air. Plant Physiol 149**:** 195-204

Zhao T, Wang W, Bai X, Qi YJ (2009) Gene silencing by artificial microRNAs in *Chlamydomonas*. Plant J 58**:** 157-164

8. Anhang

8.1 *Accession*-Nummern

Tabelle 11. *Accession*-Nr. der P-, T-, und L-Proteine des GDCs, der SHMT- und GLYK-Proteine.

Organismus	***Accession* Nummer/ ORF-Name**				
	GCD P-Protein	GCD T-Protein	GDC L-Protein	SHMT	GLYK
Phototrophe Eukaryoten					
Arabidopsis thaliana	At4g33010	At1g11860	At3g17240	At4g37930/ At5g26780	At1g80380
Populus trichocarpa	XP_002308562	XP_002332617	XP_002311367	XP_002302357	XP_002304169
Zea mays	EST-Datenbank	AAL33597	ACR36413	ACG33140	NP_001141904
Physcomitrella patens	XP_001754864	XP_001767216	XP_001752276	XP_001765821	XP_001752276
Oryza sativa	NP_001044046	NP_001053928	NP_001042918	NP_001051211	NP_001043886
Sorghum bicolor	XP_002441849	XP_002447121	XP_002457769	Sb01g008690	XP_002439104
Ostreococcus tauri OTH95	CAL56288	CAL56242	CAL55907	CAL57026	CAL53463
Chlamydomonas reinhardtii CC-503	XP_001692993	XP_001693107	XP_001695163	XP_001701451	XP_001694073
Micromonas sp. RCC299	XP_002503477	XP_002503818	XP_002508932	XP_002505413	XP_002500252
Phaeodactylum tricornutum CCAP1055/1	XP_002182636	XP_002176340	XP_002178956	XP_002177340	-
Thalassiosira pseudonana CCMP 1335	XP_0022886991	XP_002292225	XP_002296489	XP_002295557	-
Cyanidioschyzon merolae 10D	CMR282C	CMG086C	CMM299C	CMO142C	CMK141C
Emiliania huxleyi CCMP 1516	?	422537	442074	433725	219082
Cyanobakterien					
Synechococcus sp. WH8102	SYNW2374	SYNW2425	SYNW1630	SYNW0259	SYNW1209
Synechococcus sp. CC9902	SYNcc9902_2188	SYNcc9902_2232	SYNcc9902_1530	SYNcc9902_2091	SYNcc9902_1154
Synechococcus sp. WH5701	ZP_01084893	ZP_01083395	ZP_01085790	ZP_01084787	ZP_01086254
Synechococcus elongatus PCC 6301	syc2046_c	syc1794_c	syc0352_d	syc1231_d	syc0548_c
Synechococcus sp. PCC 7002	SYNPCC7002_A1549	SYNPCC7002_A1703	SYNPCC7002_A1126	SYNPCC7002_A2430	SYNPCC7002_A0028
Prochlorococcus marinus SS120	Pro1829	Pro1851	Pro1372	Pro0290	Pro0730
Prochlorococcus marinus MIT9313	PMT2169	PMT2215	PMT0335	PMT1847	PMT0758
Prochlorococcus marinus MED4	PMM1668	PMM1687	PMM1298	PMM0258	PMM0959
Gloeobacter violaceus PCC 7421	glr0246	glr3530	glr3029	glr4369	gll2598
Nostoc sp. PCC7120	all4607	all4609	alr4745	alr4806	alr2873
Anabaena variabilis ATCC 29413	Ava_2762	Ava_2760	Ava_1937	Ava_2076	Ava_1031
Nostoc punctiforme ATCC 29133	Npun_R3754	Npun_R3756	Npun_R4179	Npun_F5156	Npun_R5210
Nodularia spumigena CCY9414	ZP_01630468	ZP_01630466	ZP_01630446	ZP_01632507	ZP_01631898
Synechocystis sp. PCC 6803	slr0293	sll0171	slr1096	sll1931	slr1840
Proteobakterien					
Escherichia coli K12	NP_487343	NP_417381	NP_414658	NP_417046	-
Rhodopseudomonas palustris HaA2	YP_487345	YP_487343	YP_483896	YP_486247	-
Rhodopseudomonas palustris CGA009	NP_949187	NP_949185	NP_945538	NP_948067	-

Tabelle 12. *Accession*-Nr. der 16S rRNA-Gene und der GOX-, SGT- und HPR-Proteine.

	Accession number/ ORF name			
	16S rRNA	GOX	SGT	HPR1
Phototroophe Eukaryoten				
Arabidopsis thaliana	NC_00093	At3g14420	At2g13360	At1g68010
Populus trichocarpa	EF489041	XP_00231470	XP_002298306	XP_002305524
Zea mays	NC_001666	NP_001152347	NP_001148339	NP_001148591
Physcomitrella patens	AP005672	XP_001769086	XP_002321073	XP_001784621
Oryza sativa	NC_001320	NP_001058909	NP_001057825	NP_001045589
Sorghum bicolor	NC_008602	XP_002466341	XP_002444789	Sb04g000320
Coccomyxa subellipsoidea	HQ693844	EIE24931	EIE23124/EIE24180/ EIE24183	EIE24184
Chlamydomonas reinhardtii CC-503	BK000554	XP_001703481	XP_001701557/ XP_001702106	XP_001691480
Volvox carteri f. nagariensis UTEX 2908	GU084820	XP_002946783	XP_002949266/ XP_002953765	XP_002949292
Chlorella variabilis NC64A	HQ914635	EFN51979	EFN59783/EFN60011/ EFN59780	EFN59781
Ostreococcus lucimarinus	-	-	XP_001422127	-
Ostreococcus tauri OTH95	CR954199	-	XP_003084154	-
Micromonas pusilla CCMP 489	FN563098	-	XP_003064521	-
Micromonas sp. RCC299	NC_012575	-	XP_002503846/ XP_002501110	-
Galdieria sulphuraria	AF545618	*	*	*
Cyanidioschyzon merolae 10D	AB002583	CMQ436C	CMS429C	CMS425C
Ectocarpus siliculosus	FP102343	CBN74053	-	-
Phaeodactylum tricornutum CCAP1055/1	EF067920	-	XP_002184315	-
Thalassiosira pseudonana CCMP 1335	EF067921	-	XP_002289278	-
Fragilariopsis cylindrus	FJ002238	-	Fracy_211817	-
Emiliania huxleyi CCMP 1516	AY741371	-	-	-
Cyanophora paradoxa	U30821	54585	37079	6968
Cyanobakterien				
Synechococcus sp. WH8102	NC_005070	-	SYNW0045	-
Synechococcus sp. CC9902	NC_007513	-	Syncc9902_1263/ Syncc9902_0040	-
Synechococcus sp. WH5701	AY172832	-	SYNW0045	-
Synechococcus elongatus PCC 6301	AP008231	-	syc1320_c	-
Synechococcus sp. PCC 7002	AJ000716	-	SYNPCC7002_A0177/ SYNPCC7002_A1332	-
Prochlorococcus marinus SS120	pror01	-	Pro1037/Pro0036	-
Prochlorococcus marinus MIT9313	NC_005071	-	PMT0600/PMT0043	-
Prochlorococcus marinus MED4	RNA_39	-	PMM0035	-
Gloeobacter violaceus PCC 7421	rrna16sa	-	-	-
Nostoc sp. PCC7120	rrn16sa	All0170	Alr1004	All8087
Anabaena variabilis ATCC 29413	CP000117	Ava_1430	Ava_5058	-
Nostoc punctiforme ATCC 29133	rrn16sa	Npun_R5717	Npun_F4445/ Npun_F4157	-
Nodularia spumigena CCY9414	EU155886	?	ZP_01630449	ZP_01632392
Synechocystis sp. PCC 6803	rrn16sa	-	Sll1559	-
Acaryochloris sp. CCMEE 5410	AY790243	-	ZP_09248532	-
Acaryochloris marina MBIC11017	CP000828	-	YP_001515615	-
Cyanothece sp. PCC 7822	CP002198	YP_003890366	-	YP_003887724
Cyanothece sp. PCC 8801	CP001287	-	-	YP_002373188
Cyanothece sp. PCC 8802	CP001701	-	-	YP_003138751
Non-phototrophe Bakterien				
Escherichia coli K12	CP_000948	NP_418062	-	NP_418009
Rhodopseudomonas palustris HaA2	CP_000240	YP_484926	ABD09312	YP_779183
Rhodopseudomonas palustris CGA009	BX572608	NP_949656	NP_946142	NP_945775
Rhodococcus jostii RHA1	CP000431	-	-	YP_704862
Arthrobacter chlorophenolicus A6	CP001341	-	-	YP_002486284
Micrococcus luteus NCTC 2665	CP001628	-	-	YP_002956269
Thermoanaerobacter siderophilus SR4	AF120479	-	-	EIV99571
Desulfosporosinus youngiae DSM 17734	DQ117470	-	-	ZP_09652449
Candidatus Pelagibacter sp. IMCC9063	CP002511	-	YP_004358513	-
Granulibacter bethesdensis CGDNIH1	CP000394	-	YP_743869	-
Acidiphilium multivorum AIU301	AP012035	-	YP_004276943	-
Acidiphilium cryptum JF-5	CP000697	-	YP_001220167	-

8.2 Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen, als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, September 2012 Ramona Kern

8.3 Publikationen

Ramona Kern, Hermann Bauwe, and Martin Hagemann. Evolution of enzymes involved in the photorespiratory 2-phosphoglycolate cycle from cyanobacteria via algae toward plants. *Photosynthesis Research* 109 (1-3):103-114, 2011.

Claudia Hackenberg, **Ramona Kern**, Jan Huege, Lucas J. Stal, Yoshinori Tsuji, Joachim Kopka, Yoshihiro Shiraiwa, Hermann Bauwe, and Martin Hagemann. Cyanobacterial lactate oxidases serve as essential partners in N(2) fixation and evolved into photorespiratory glycolate oxidases in plants. *Plant Cell* 23 (8):2978-2990, 2011.

Hermann Bauwe, Martin Hagemann, **Ramona Kern**, and Stefan Timm. Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 15 (3):269-275, 2012.

Martin Hagemann, Alisdair R. Fernie, George S. Espie, **Ramona Kern**, Marion Eisenhut, Sigrun Reumann, Hermann Bauwe, and Andreas P. M. Weber. Evolution of the biochemistry of the photorespiratory C2 cycle. *Plant Biology*, *accepted* 2012.

Ramona Kern, Marion Eisenhut, Herman Bauwe, Andreas P. M. Weber, and Martin Hagemann. Does the Cyanophora paradoxa genome revise our view on the evolution of photorespiratory enzymes? *Plant Biology*, *submitted*.

8.4 Tagungsbeiträge

Vorträge

Ramona Kern and Martin Hagemann. Evolution of the photorespiratory glycolate cycle from cyanobacteria through algae towards plants. *Promics-Warnemünde*, 2010

Ramona Kern and Martin Hagemann. Evolution of the Photorespiratory Glycolate Metabolism from Cyanobacteria through Algae towards Plants. *Promics-Hannover*, 2011

Ramona Kern and Martin Hagemann. Evolutionary Origin of Photorespiration: Phylogenetic and Biochemical Studies of Core Cycle Enzymes. *Promics-Warnemünde*, 2012

Ramona Kern, Claudia Hackenberg and Martin Hagemann. Evolutionary origin of photorespiration: Phylogenetic and biochemical studies of core cycle enzymes among cyanobacteria and algae. *The 5th Japan-China-Korea Graduate Student Forum, Tsukuba (Japan)*, 2012

Poster

Ramona Kern, Sarah Lorenz, Herman Bauwe and Martin Hagemann. Evolution of the photorespiratory glycolate cycle from cyanobacteria through algae toward plants. *ESF-EMBO Symposium on Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria, Sant Feliu de Guixols (Spain),* 2011.

Ramona Kern, Sarah Lorenz, Herman Bauwe and Martin Hagemann. Phylogenetic and biochemical characterization of photorespiratory enzymes in cyanobacteria and plants. *Deutsche Botaniker Tagung (Berlin)*, 2011. Best Poster Award

Ramona Kern, Sarah Lorenz, Herman Bauwe and Martin Hagemann. Phylogenetic and biochemical characterization of photorespiratory enzymes in cyanobacteria and plants. *Deutsch-Japanisches Meeting (Freiburg)*, 2011.