

Evolution der Chloroplasten: Endosymbiose führt zu photoautotrophen Eukaryonten

W. LÖFFELHARDT

Abstract: Plastid evolution: Endosymbiosis gave rise to phototrophic eukaryotes. The glaucocystophyte alga *Cyanophora paradoxa*, a living fossil whose plastids (cyanelles) are surrounded by a peptidoglycan wall, constitutes the missing link in plastid evolution. Phylogenetic analyses of chloroplast and nuclear genes reveal glaucocystophyte algae as the first phototrophic eukaryotes and support a single primary endosymbiotic event, i.e. the monophyly of the kingdom "Plantae". This is corroborated by the demonstration of homologous protein import apparatus in the three primary plastid types: cyanelles, rhodoplasts, and chloroplasts. A hypothesis for the evolution of the carbon-concentrating mechanism in aquatic microorganisms is presented.

Key words: *Cyanophora paradoxa*, glaucocystophytes, plastid evolution, single primary endosymbiosis.

Einleitung

Die serielle Endosymbiontentheorie ist am klarsten und überzeugendsten dargestellt durch jenes (singuläre!) Ereignis, bei dem ein heterotropher, zur Phagozytose befähigter Protist, also ein Eukaryont mit Zellkern und Mitochondrien, einen photosynthetischen Prokaryonten aufgenommen hat, der heutigen filamentösen Cyanobakterien verwandt war. Diese Beuteorganismen brachten den offensichtlichen metabolischen Vorteil der Photosynthese in die „Wirtszelle“ ein, die daher darauf verzichtete, sie vollständig abzubauen. Über obligate Endosymbionten, die vermutlich frei nicht mehr lebensfähig sind, wie im Falle der Thekamöbe *Paulinella chromatophora* (MARIN et al. 2005), entstanden schließlich die Plastiden, die Zellorganellen, die in Eukaryonten den Photosyntheseapparat beherbergen (Abb. 1). Es gibt aber auch Fälle, wo nicht die Photoassimilation sondern die Stickstoff-Fixierung des cyanobakteriellen Endosymbionten für die Wirtszelle interessant ist, wie bei der Diatomee *Rhopalodia gibba* (PRECHTL et al. 2004). Hier kann man die Entstehung einer neuartigen Organelle („Nitrogenosom“) verfolgen.

Die ältesten bisher nachgewiesenen phototrophen Eukaryonten wurden als Rotalgen-ähnliche Mikrofossilien ins Praekambrium, d.h. vor ca. 1,2 Milliarden Jahren datiert (BUTTERFIELD 2000). Plastiden als Überbegriff umfassen die Cyanellen der Glaucocystophyten, die freilebenden Cyanobakterien am nächsten kommen, die Rhodoplasten der Rotalgen, beide mit Chlorophyll a und Phycobilisomen als Antennensystem, und die Chloroplasten *sensu stricto* der Grünalgen und

Pflanzen mit einem Antennensystem aus Chlorophyll a/b-Proteinkomplexen. Aufschlüsse über die Evolution der Plastiden sind von Untersuchungen an den (primitiven) Plastiden von Rotalgen und insbesondere Glaucocystophyten zu erwarten. Die Cyanellen von *Cyanophora paradoxa* und allen anderen Glaucocystophyten sind von einer Bakterienzellwand umgeben, einzigartig unter Eukaryonten und ein klarer Beweis für die Richtigkeit der Endosymbiontentheorie (LÖFFELHARDT & BOHNERT 2001). 50 Jahre lang wurden sie als endosymbiontische Cyanobakterien angesehen und erhielten sogar einen Namen als eigene Spezies: *Cyanocyta korschikoffiana*. Sobald eine exakte Untersuchung des Cyanellengenoms möglich war (LÖFFELHARDT et al. 1997), wurde aber klar, dass die Genomgröße von 136 kb im Bereich von Chloroplastengenomen liegt und um einen Faktor 20-30 geringer ist als die von einzelligen Cyanobakterien.

Primäre Plastiden und sekundäre Plastiden

Die Morphologie und Pigmentierung (grün, blaugrün, rot, gelblich) der Algenplastiden sind so unterschiedlich, dass in den 70er und 80er Jahren durchaus ein polyphyletischer Ursprung der Plastiden diskutiert wurde (RAVEN 1970). Heute unterscheidet man bei den Algen zwischen primären Plastiden, die vom primären endosymbiontischen Ereignis herrühren und von zwei Envelope-Membranen (bei Cyanellen mit einer dazwischenliegenden Peptidoglykanschicht) begrenzt werden (Abb. 2), und sekundären oder komplexen Plastiden.

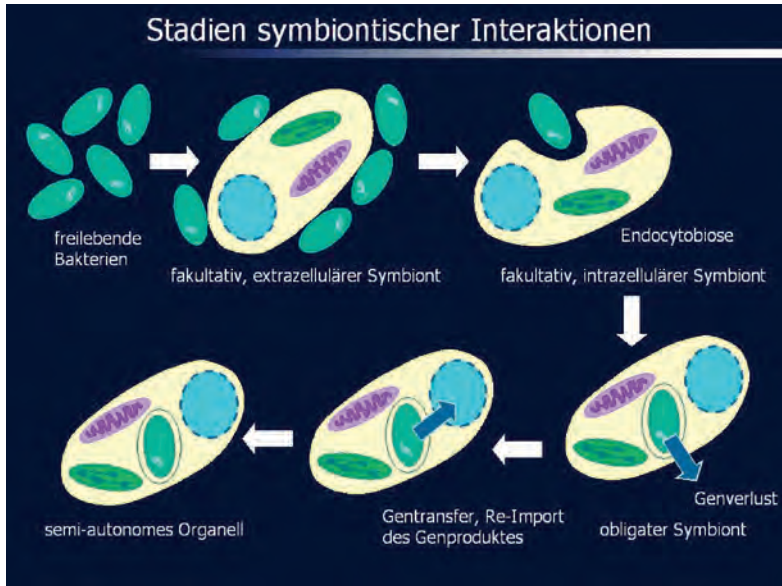
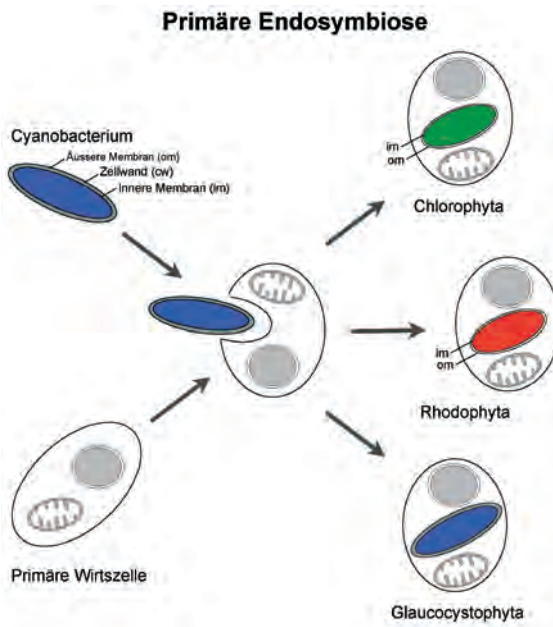


Abb. 1: Stadien symbiontischer Interaktionen. Die Schritte vom obligaten Symbionten zur Organelle sind besonders kompliziert und langwierig: Der Gentransfer zum Kern ist auch heute noch nicht abgeschlossen.

Abb. 2: Primäre Endosymbiose (singulär). Die Zellwand des Cyanobakteriums blieb nur in den Cyanellen der Glaucocystophyten erhalten. Nach STOEBE & MAIER 2002.



Komplexe Plastiden entstanden durch sekundäre Endosymbiosen, wobei heterotrophe Protisten Rotalgen oder Grünalgen aufgenommen hatten. Die jeweiligen Endosymbionten waren also Eukaryonten, die bereits mit Rhodoplasten bzw. Chloroplasten ausgestattet waren. Je nach Typus der so entstandenen neuen Algenformen wurde die primäre Wirtszelle mehr oder weniger reduziert. In jedem Fall sind die entsprechenden Plastiden aber von mehr als zwei Hüllmembranen umgeben: drei bei Euglenoiden und manchen Dinoflagellaten, vier bei Chromophyten, Cryptomonaden etc. (Abb. 3). Bei Chorarachniden bzw. Cryptomonaden sind im periplastidären Raum zwischen den beiden inneren und den

beiden äußeren Membranen der komplexen Plastiden nicht nur die 80S Ribosomen sondern auch der rudimentäre Kern der primären Wirtszelle (Nukleomorph) erhalten geblieben. Die Kodierungskapazität dieser kleinsten bekannten eukaryontischen („Bonsai“-) Genome liegt bei ca. 300 bis 500 Genen, die auf drei Minichromosomen verteilt sind: Bei den Genprodukten handelt es sich hauptsächlich um Ribonukleinsäuren und Proteine des periplasmatischen Raumes mit Funktionen in der Replikation und Expression der Nukleomorph-DNA, sowie um 17 bis 30 Plastidenproteine (CAVALIER-SMITH 2006). Manche Autoren favorisieren die Entstehung der Heterokontophyta, Cryptophyta, Apicomplexa, etc. (Chromalveolaten) aus einer einzigen sekundären Endosymbiose mit einer Rotalge (CAVALIER-SMITH 2002). Die Apicoplasten der heterotrophen Apicomplexa wurden (unter starker Reduktion des Plastidengenoms) beibehalten, obwohl diese Organismen die Fähigkeit zur Photosynthese wieder verloren haben. Der Grund dafür liegt in wichtigen Biosynthesewegen z. B. für Fettsäuren, Häm und Isoprenoidlipide, die dort kompartimentiert sind. Der Transport kernkodierter Plastidenproteine zu den sekundären Plastiden und der anschließende Import („Targeting“) ist ein komplizierter Prozess, an dem auch andere Zellorganellen wie ER und Golgi-Apparat beteiligt sein können (van DOOREN et al. 2001) und der über zusammengesetzte Praesequenzen (Signalpeptid + Transitpeptid) mediiert wird. Ein Umstoßen dieser Kompartimentierung, z. B. Deletion der „nutzlosen“ photosynthetisch inaktiven Plastiden und Transferierung der entsprechenden Stoffwechselwege ins Cytosol wäre viel zu aufwendig. Inhibitoren der entsprechenden Schlüsselenzyme können letal für den Organismus sein. So trat die unerwartete Situation ein, dass neue Medikamente gegen Malaria aus einer Kenntnis des Plastidenstoffwechsels heraus entwickelt werden konnten (FICHERA & ROOS 1997). Die metabolische Energie kommt von Kohlehydraten die über spezielle Transporter aus dem Cytosol in die Apicoplasten importiert werden (MULLIN et al. 2006).

Tertiäre Endosymbiosen

Wenn nicht-photosynthetische Dinoflagellaten Algen mit sekundären Plastiden als Endosymbionten aufnehmen, kommt es zu tertiären Endosymbiosen (Abb. 4). Im Falle der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten wird auch eine Einteilung unter die sekundären Endosymbiosen diskutiert (STOEBE & MAIER 2002).

Eine Symbiose zwischen Tier und Pflanze wird für die Meeresschnecke *Elysia chlorotica* beschrieben, die die Plastiden von *Vaucheria litorea* (Heterokonta) aus den Zellen „aussaugt“ und mit deren Hilfe autotroph le-

ben kann. Diese sekundären Plastiden sind nicht vererbbar („Kleptochloroplasten“) doch ihre ungewöhnliche Stabilität über die ganzen Lebensspanne (ca. 1 Jahr) von *E. chlorotica* legt horizontalen Gentransfer zum Kern der Wirtszellen nahe, der für prk (Phosphoribulokinase) und psbO (Protein des O₂-entwickelnden Komplexes aus Photosystem II) demonstriert werden konnte. Auch für den Import dieser Proteine in die Plastiden gibt es erste Hinweise (RUMPHO et al. 2006).

Primäre Endosymbiose: Monophylie der Plastiden

Phylogenien basierend auf der 16S ribosomalen RNA von Chloroplasten und Cyanobakterien zeigten zweierlei: 1. Das Phylum Prochlorophyta (phototrophe Prokaryonten mit zwei Photosystemen und Chlorophyll a/b-Proteinkomplexen als Haupt-Antennensystem) war nicht zu halten und wurde in die Cyanobakterien eingereiht. 2. Alle Plastiden leiten sich von Cyanobakterien ab.

Damit ergab sich die nächste Frage: Wurden Cyanobakterien mehrmals unabhängig von (verschiedenen) Protisten aufgenommen oder erfolgte das primäre endosymbiontische Ereignis nur einmal? Vergleiche der Genorganisation zeigten folgenden Gencluster bei primitiven Plastiden und hochentwickelten Chloroplasten, der aus Komponenten besteht, die in cyanobakteriellen Genomen weit voneinander entfernt liegen:

5'-*rpoB-rpoC1-rpoC2-rps2-atpI-atpH-atpG-atpF-atpD-atpA*-3'

Die Genreihenfolge wird immer beibehalten, fettgedruckte Gene sind bei höheren Pflanzen in den Kern verlagert. Da die betreffende Gene ganz unterschiedlichen Plastidenstrukturen wie Ribosomen (*rps2*), RNA-Polymerase (*rpoB,C1,C2*) und ATP-Synthase (*atpA,D,F,G,H,I*) zugeordnet sind, kann auch kein Selektionsdruck auf stöchiometrische Expression vorliegen. Die Aufrechterhaltung dieses Genclusters ist auch nicht essentiell. Dies zeigt das Beispiel von *Chlamydomonas reinhardtii*, wo aufgrund der hohen Rekombinationsaktivität in den Chloroplasten auch diese Transkriptionseinheit (neben einer Reihe anderer) aufgelöst ist. Konvergente Evolution ist also in diesem Fall äußerst unwahrscheinlich. Viel eher wird die Erklärung zutreffen, dass alle Plastiden von einer Urform („Protoplastid“) abstammen. Dieser Protoplastid erfuhr eine Reduktion des Genoms auf etwa 5 % (verglichen mit dem Endosymbionten). Dabei wurden offenbar beibehaltene cyanobakterielle Operons zusammengeschoben und auch neue Transkriptionseinheiten kreiert (REITH & MUNHOLLAND 1993, KOWALLIK 1994, LÖFFELHARDT 1995).

Sekundäre Endosymbiosen

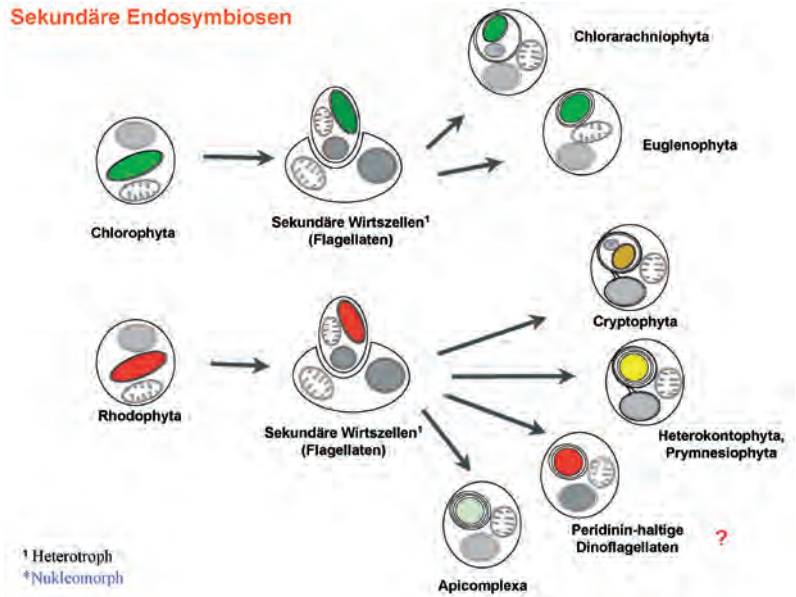


Abb. 3: Sekundäre Endosymbiosen. Unterschiedliche Reduktion der primären Wirtszelle in den einzelnen Phyla. Nach STOEBE & MAIER 2002.

Tertiäre Endosymbiosen

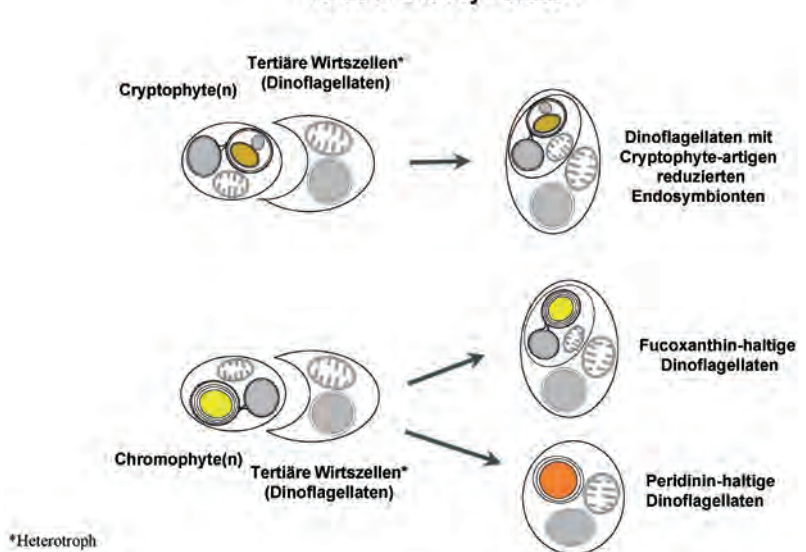


Abb. 4: Tertiäre Symbiosen. Die Endosymbionten enthalten bereits komplexe Plastiden. Nach STOEBE & MAIER 2002.

Primäre Endosymbiose: Monophylie des Pflanzenreiches

Dieser enorm komplizierte Prozess beinhaltete den Transfer von mehr als 4500 Genen vom Genom des cyanobakteriellen Endosymbionten zum Kern der Wirtszelle (MARTIN et al. 2002). Diese Gene waren prokaryontisch und mussten nach ihrer Insertion einen eukaryontischen Promotor „finden“, um transkribiert zu werden, und, darüber hinaus in etwa 50 % der Fälle, eine 5'-seitig gelegene DNA-Region, die nach Transkription und Translation eine sogenannte Transitsequenz ausbildet,

**Phylogenie basierend auf 143 konkatenierten Kern-kodierten Proteinen:
Monophylie der Pflanzen**

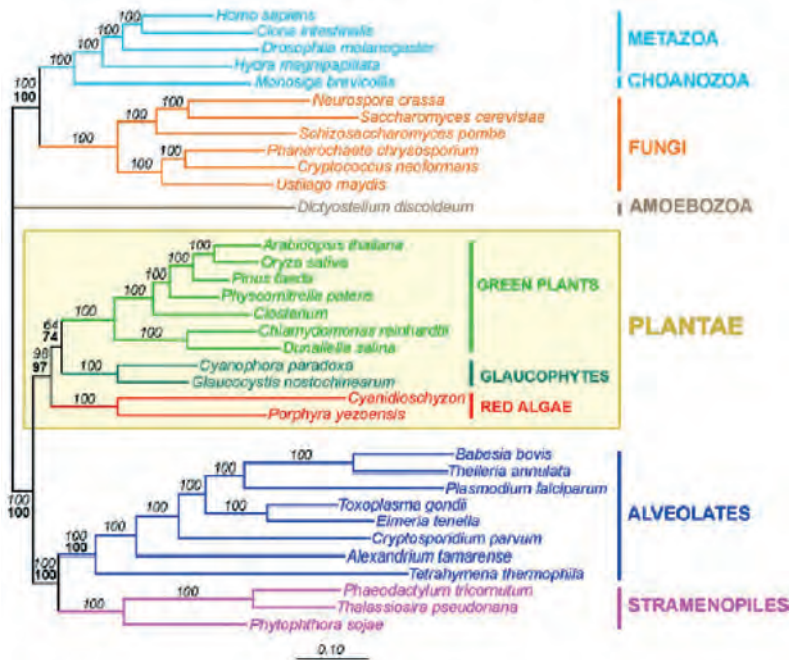
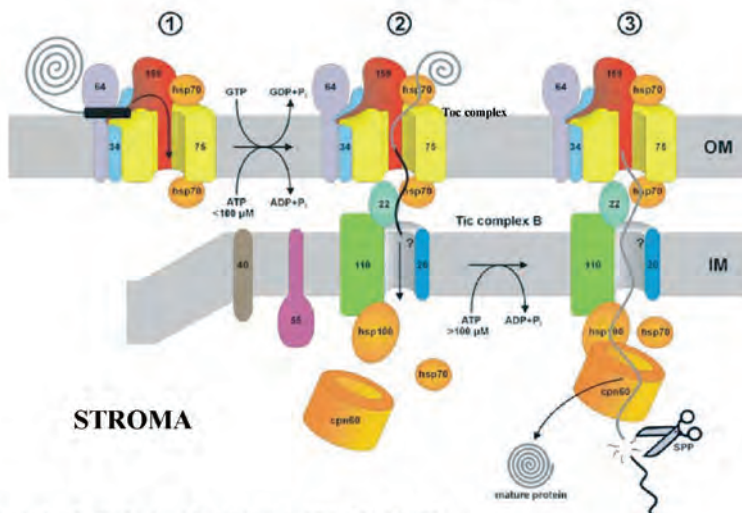


Abb. 5: Phylogenetische Analyse zum Nachweis einer singulären primären Endosymbiose. Die Bootstrap-Werte sind jeweils angegeben. Aussagekräftige Ergebnisse wurden erst erhalten, als die Anzahl der konkatenierten Gene über 130 und die Anzahl der inkludierten Spezies über 30 lag.

der cyanobakteriellen Peptidoglykanschicht umgeben war. 90 % des gesamten Gentransfers zum Kern haben während der Ausbildung dieses „Protoplastiden“ stattgefunden. Nach diesem ersten großen Schritt erfolgte der weitere Gentransfer vom Plastidengenom zum Kerngenom – ein Prozess, der immer noch andauert – in den einzelnen Phyla der phototrophen Eukaryoten mit unterschiedlicher Geschwindigkeit: dementsprechend enthalten die Genome primitiver Plastiden mehr Proteingene als die Chloroplastengenome von Grünalgen und höheren Pflanzen. Es gibt jedoch einen Satz von 46 Proteingenen, die in allen sequenzierten Plastidengenomen vorkommen. Diese wurden konkateniert und einer umfassenden phylogenetischen Analyse zu Grunde gelegt. Als Ergebnis wurde ein singuläres primäres endosymbiontisches Ereignis postuliert und die Glaucocystophyten auf der ersten Abzweigung danach, d.h. als die ersten phototrophen Eukaryoten positioniert (MARTIN et al. 1998). Wenn also eine bestimmte Spezies filamentöser Cyanobakterien, wie z. B. *Nostoc*, das auch für rezente Symbiosen bekannt ist, mit einem bestimmten Typ von heterotrophen phagozytierenden Protisten diese Endosymbiose eingegangen hatte, so müsste sich dies durch phylogenetische Analyse von Kerngenen erhärten lassen. Abb. 5 zeigt, dass bei 143 konkatenierten Kern-kodierten Genen von phototrophen und nicht-phototrophen Eukaryoten (insgesamt 34 Spezies) die Organismen mit primären Plastiden – Glaucocystophyta, Rhodophyta, Chlorophyta und Streptophyta – eine gut gestützte Gruppe bilden, unter Ausschluss aller anderen Eukaryoten, auch der phototrophen Diatomeen, die ja das Resultat einer sekundären Endosymbiose sind (RODRIGUEZ-EZPELETA et al. 2005). Natürlich wäre es wünschenswert, Sequenzinformation aus allen eukaryontischen Bereichen, z.B. den Excavata, zu haben. Beim gegenwärtigen Wissens- und Datenstand weist dieses Ergebnis jedenfalls klar auf die Monophylie des Pflanzenreiches hin.

CYTOSOL



P. Jarvis, J. Soll / *Biochimica et Biophysica Acta* 1590 (2002) 177-189

Abb. 6: Der Proteinimportapparat der Chloroplasten höherer Pflanzen.

die die im Cytoplasma gebildeten Vorläufer-Proteine wieder in die aus dem Endosymbionten hervorgegangene Organelle dirigiert. Dafür musste dieser Plastid einen selektiven Importapparat entwickeln, der nur die für ihn bestimmten Proteine aufnimmt. Die Existenz der Cyanellen und andere Befunde weisen darauf hin, dass dies erfolgt ist, während der primitive Plastid noch von

Zentrale Stoffwechselwege wie die Biosynthese von Fettsäuren und Aminosäuren waren zum Zeitpunkt des primären endosymbiontischen Ereignisses natürlich in beiden Partnern vorhanden. Nach erfolgreichem Gentransfer und Reimport der Produkte eines Teils der zuvor an den Kern abgegebenen Gene ergab sich eine gewisse Redundanz: sollen duale Stoffwechselwege in „Wirtszelle“ und Endosymbionten (Organelle) beibehalten werden oder soll der vom Protisten bzw. der vom Cyanobakterium stammende Stoffwechselweg deletiert werden? Im Falle der Fettsäurebiosynthese und eines Großteils der Aminosäure-Biosynthesewege fiel die Entscheidung zugunsten der prokaryontischen Version und einer Kompartimentierung in den Chloroplasten aus (NEUHAUS & EMES 2000). Dementsprechend besteht die pflanzliche Fettsäuresynthase aus einem Multien-

zymkomplex in den Chloroplasten und nicht wie die tierische aus einem multifunktionellen Enzym (Polyprotein) im Cytosol. Ein naheliegender Grund dafür ist der, dass die Chloroplasten die für anabole Reaktionen notwendige Redoxenergie (in Form von NADPH) und chemische Energie (in Form von ATP) durch photosynthetischen Elektronentransport und Photophosphorylierung „unbegrenzt“ bereitstellen können.

Konsequenzen eines singulären primären endosymbiontischen Ereignisses

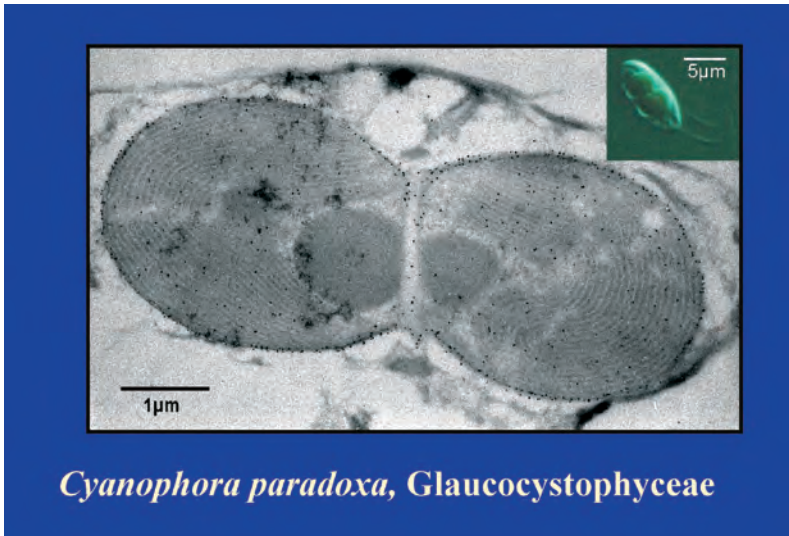
Wenn alle primären Plastiden inklusive der Cyanellen, von einer gemeinsamen Vorläuferorganelle, dem Protoplastiden abstammen, müssen ihre Importapparate homolog sein. Dies bedeutet nicht, dass ihre Proteinzusammensetzung identisch ist: am Anfang war der Prototyp, eine minimalistische Lösung, die offenbar auch heute noch bei primitiven Plastiden, wie Cyanellen und Rhodoplasten funktioniert (MCFADDEN & van DOOREN 2004) während die Chloroplasten im Laufe der Evolution zusätzliche Rezeptoren dazugewonnen haben. Zwei Translocons an der äußeren (Toc) und inneren (Tic) Envelope-Membran der Chloroplasten (Abb. 6) wirken beim Import zusammen (JARVIS & SOLL 2002, SOLL & SCHLEIFF 2004).

Erfolgreich durchgeführte heterologe in vitro Importexperimente mit den verschiedenen primären Plastiden können die postulierte Monophylie des Pflanzenreiches unterstützen. Das in vitro System mit isolierten Erbsenchloroplasten ist gut etabliert, in gleicher Weise das in vitro System mit isolierten Cyanellen von *C. paradoxa* (STEINER & LÖFFELHARDT 2005). Precursor-Proteine von *C. paradoxa* werden effizient in isolierte Erbsen-Chloroplasten importiert. Der umgekehrte Prozess – Import von Precursor-Proteinen aus höheren Pflanzen in isolierte Cyanellen – konnte jedoch nicht beobachtet werden. Damit war die Homologie der Importapparate in Frage gestellt. Schliesslich stellte sich heraus, dass eine einzige Aminosäure, Phenylalanin, im aminoterminalen Bereich der Transitsequenz absolut essentiell für den Import in Cyanellen ist. Der primitive Importapparat erfordert also diese Spezifität, da offenbar ein einziges Protein (Toc75) als Rezeptor und zugleich Pore an der äußeren Membran wirkt. Das Vorliegen mehrerer Rezeptoren mit überlappenden und weniger stringenten Spezifitäten in Chloroplasten führte zum Wegfall der Phenylalanin-Erfordernis in den Transitsequenzen von Precursor-Proteinen aus Grünalgen und Pflanzen. Wird nun in einen derartigen Precursor gentechnisch ein Phenylalaninrest eingeführt, so ist Import in Cyanellen gewährleistet (STEINER et al. 2005). Der Importapparat der Plastiden ist als Syntheseleistung der eukaryonti-

schen Zelle anzusehen, seine Entwicklung ein finaler Schritt zur „Versklavung“ des Endosymbionten. Dies schließt aber nicht aus, dass einige geeignete Membranproteine des Cyanobakteriums dafür rekrutiert wurden (bei geänderter Funktion). Am überzeugendsten kann dies für ein Protein der äusseren Membran gezeigt werden, das zur Omp85-Familie gehört. Bei Gram-negativen Bakterien haben diese Proteine die Funktion von Chaperonen, die den Einbau anderer Proteine, z.B. der Porine, in die äußere Membran unterstützen. Diese von innen (d.h. vom Periplasma) her kommenden Porine besitzen einen C-terminalen Phenylalaninrest, der von Omp85 erkannt wird. Cyanobakterielle Omp85-Proteine besitzen zusätzlich Ionenkanalaktivität (BREDEMEIER et al. 2007) und zeigen Sequenzähnlichkeit zu der Toc75-Pore der Chloroplasten. Nach ihrer Umfunktionalisierung zu Komponenten des Importapparates erkennen die Omp85/Toc75-Proteine nun Phenylalanin-haltige (Transit)Peptide von Precursors die von außen (Cytosol!) kamen. Dieser primitive Importapparat an der Envelopemembran von Cyanellen und Rhodoplasten scheint auch an den beiden innersten Membranen komplexer Plastiden, die von Rotalgen abgeleitet sind, vorzuliegen: Auch hier ist ein Phenylalaninrest am Beginn der Transitsequenz essentiell für Import in das Stroma der Plastiden von Chromalveolaten (KILIAN et al. 2005, GOULD et al. 2006).

Das Peptidoglykan der Cyanellen: rudimentär oder nicht?

Die Biosynthese dieser Organellenwand verläuft fast völlig analog zu den cytosolischen, membrangebundenen und periplasmatischen Schritten bei *Escherichia coli* (PLAIMAUER et al. 1991; PFANZAGL & LÖFFELHARDT 1999). Die Cyanellenwand ist sogar dicker als bei diesem Modell-Bakterium und stärker vernetzt (Abb. 7). Charakteristisch ist eine Modifikation des Cyanellenpeptidoglykans, die bei Bakterien nicht auftritt: Die 1-Carboxylgruppe des D-Isoglutamylrestes ist häufig mit N-Acetylputrescin amidiert (PFANZAGL et al. 1996). Dadurch wird jeweils eine negative Ladung aus den Peptid-Seitenketten bzw. -Brücken entfernt, was vermutlich von Bedeutung für den Proteinimport ist und auch für die Cyanellen von *Glaucocystis nostochinearum* und *Cyanoptyche gloeocystis* demonstriert wurde. Vergleicht man jedoch die Dicke der Cyanellenwand mit der der Zellwand der unmittelbar ancestralen Cyanobakterien so ergibt sich eine beträchtliche Reduktion von 6-7 Schichten auf 2-3 Schichten, wieder verständlich im Hinblick auf die notwendige Translokation von mehr als 2000 Cyanellenproteinen. Die Teilung der Cyanellen ist wie bei Bakterien von der Bildung eines Peptidoglykan-Septums abhängig. Cyanellen besitzen an der in-

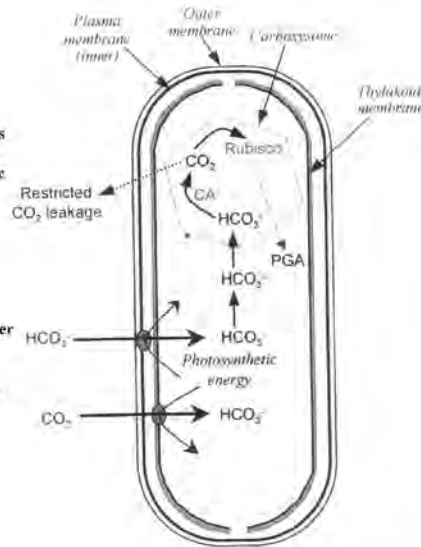


Cyanophora paradoxa, Glaucocystophyceae

Abb. 7: *Cyanophora paradoxa*. Insert: Interferenzkontrast-Aufnahme des Flagellaten im Zwei-Cyanellen-Stadium (frühe logarithmische Wachstumsphase). Immuno-Elektronenmikroskopie einer Cyanelle im Endstadium der Teilung. Primäre Antikörper gegen Peptidoglykan von *E. coli* gerichtet. Sekundäre Antikörper Gold-markiert.

• Das wichtigste Merkmal des CCM der Cyanobakterien ist das Carboxysom, ein kompaktes, polyedrisches Mikrokompartiment das von einer Proteinhülle* umgeben ist und die zelluläre Rubisco and die carboxysomale Carbonic Anhydrase (CA) enthält.

• Die Carboxysomen (Durchmesser 100-200nm, hier stark vergrößert), halten eine erhöhte CO₂-Konzentration am Ort der Rubisco aufrecht. Sie befinden sich im zentralen Nucleoplasma, das von konzentrischen Thylakoidmembranen eingeschlossen ist.



Nach: Badger & Price 2003

Abb. 8: Der cyanobakterielle CCM. Bicarbonat wird im Cytosol um einen Faktor > 1000 angereichert, durch Induktion hoch-affiner Transporter, von Carbonic Anhydrasen, etc.

neren Envelope-Membran sieben s.g. Penicillin-bindende Proteine, Carboxypeptidasen bzw. Transglycosylasen-Transpeptidasen, die die letzten Schritte der Peptidoglykan-Biogenese katalysieren. Dementsprechend wird die Cyanellenteilung durch β -Lactam Antibiotika gehemmt, etwa in vergleichbaren Konzentrationen wie bei *E. coli*. Da aber alle anderen Plastiden sehr wohl prokaryontische Proteine wie FtsZ zur Einleitung der Organellenteilung verwenden, ohne aber ein Peptidoglykan-Septum auszubilden, kann die Beibehaltung der einzigartigen Cyanellenwand nicht allein in der Cyanellenteilung begründet sein...

Carboxysomen: das zweite einzigartige cyanobakterielle Relikt der Cyanellen?

Photosynthese stellt die unverzichtbare Grundlage für alle höheren Lebensformen auf unserer Erde dar. Zu der enormen Menge von mehr als 200 Milliarden Tonnen CO₂, die pro Jahr in Biomasse umgewandelt werden, tragen aquatische Mikroorganismen, wie Cyanobakterien und Algen etwa 50 % bei. Ermöglicht wird dies durch CO₂-Konzentrationsmechanismen (CCM, KAPLAN & REINHOLD 1999) die darauf abzielen, die krassen Konzentrationsunterschiede (21 % O₂ gegenüber 0,037 % CO₂, dazu kommt hier noch das Problem der Wasserlöslichkeit) der beiden konkurrierenden Substrate der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) auszugleichen. Anhand des „lebenden Fossils“ *Cyanophora paradoxa* kann auch die Evolution des CCM untersucht werden. Glaucocystophyten haben eine einzigartige Brückenstellung zwischen Cyanobakterien und Algen inne. Nur in diesem Algenphylum findet man Plastiden (Cyanellen), die noch von einer Peptidoglykanwand umgeben sind, und – möglicherweise – das Schlüsselenzym Rubisco in der (quasikristallinen) Form eines Carboxysoms kompartimentiert (Abb. 8). Beides ist sonst auf prokaryontische Organismen beschränkt.

Bei Algen liegt Rubisco oft in Form eines funktionell ähnlichen Mikrokompartiments, des Pyrenoids, vor. Nach BADGER & PRICE (2003) sind die CCM's in Cyanobakterien und Algen unabhängig voneinander erst vor ca. 400 Millionen Jahren entstanden. Während der phanerozoischen Periode kam es zu einem starken Anstieg der Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre bei gleichzeitigem Absinken der CO₂-Konzentration, was nach Meinung der Autoren den Druck auf Rubisco so stark erhöhte, dass die (gleichzeitige) Entwicklung carboxysomaler und pyrenoidaler CCM's unumgänglich war (Abb. 9). Die andere Theorie zur Entstehung des CCM (RAVEN 2003) setzt diese sehr früh an, vor mehr als 1,2 Milliarden Jahren und damit vor dem primären endosymbiotischen Ereignis, das die Chloroplasten von Algen und Pflanzen von in heterotrophe Zellen aufgenommenen Cyanobakterien ableitet. In diesem Fall hätten sich die Pyrenoide der Algen aus den Carboxysomen der Endosymbionten entwickelt und *Cyanophora paradoxa* könnte einen carboxysomalen CCM besitzen. RAVEN (2003) postuliert auch einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem Peptidoglykan der Cyanellen und dem Vorliegen eines Carboxysoms: die Anreicherung von Bicarbonat in den Cyanellen ist so hoch, dass diese infolge des osmotischen Überdrucks gegenüber dem Cytoplasma platzen würden, wenn nicht die stabilisierende Organellenwand beibehalten worden wäre. Bei allen anderen Algentypen ging mit dem Verlust der Peptidoglykanwand eine Umstellung auf einen pyrenoidalen CCM einher, der nicht mehr mit derart starker Akkumulation von Bicarbonat in den Plastiden verbunden ist.

Entscheidend ist die Lokalisierung der Carbonic Anhydrase (CA), die die Gleichgewichtseinstellung zwischen CO_2 und Bicarbonat katalysiert. In Carboxysomen ist sie mit Rubisco zusammen verpackt (Abb. 8), bei Pyrenoiden befindet sie sich im Lumen der das Mikrokompartment durchziehenden Thylakoidmembranen (KAPLAN & REINHOLD 1999). In der Literatur wird der elektronendichte Zentralkörper der Cyanellen als Carboxysom geföhrt. Dafür spricht einiges, doch sind wichtige Befunde noch ausständig. In Größe (500-1000nm) und Zahl entsprechen sie eher Pyrenoiden. Auch die abgerundete Form (Abb. 7) bei *C. paradoxa* scheint verschieden von den cyanobakteriellen Mikrokompartmenten. Doch findet man bei *Gloeochaete wittrockiana* und *Cyanoptyche gloeocystis* polyedrische „Carboxysomen“ mit einer deutlich hervortretenden Begrenzungs-„Membran“ (Abb. 10). Massenspektrometrie der Proteinbanden nach Elektrophorese isolierter Zentralkörper und heterologe Westerns konnten Rubisco-Activase erstmals in einer Carboxysomen-artigen Struktur nachweisen. Wird der radioaktiv markierte Precursor *in vitro* in Cyanellen importiert kann Einbau des reifen Proteins in das „Carboxysom“ (30 % innerhalb von 30 Minuten) beobachtet werden (BUREY et al. 2005). Microarrays mit 2300 Genen von *C. paradoxa* wurden im Hinblick auf den Effekte von niedrigen CO_2 -Konzentrationen auf die Genexpression untersucht. In 58 Fällen wurde ein erhöhter Transkript-Pool festgestellt: Gene für drei Formen der Carbonic Anhydrase (leider ist das Cyanellen-Enzym nicht dabei), Rubisco-Activase, einen putativen Bicarbonat-Transporter etc. gehören dazu (BUREY et al. 2007). Derzeit kann über die exakte Natur des Zentralkörpers noch nicht entschieden werden. Auch eine Übergangsform von den Carboxysomen zu den Pyrenoiden hin kommt in Frage.

Zusammenfassung

Die Evolution der Plastiden durch eine singuläre primäre Endosymbiose zwischen einem Cyanobakterium und einem heterotrophen Protisten wurde anhand neuerer Arbeiten mit dem Brücken-Organismus *Cyanophora paradoxa* dargestellt: Monophylie des Pflanzenreiches! Die Ableitung des pyrenoidalen CO_2 -Konzentrierungsmechanismus (CCM) aus einem carboxysomalen CCM wird postuliert.

Danksagung

Unsere eigenen Forschungen an *C. paradoxa* wurden durch die langjährige Unterstützung des Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung ermöglicht, zuletzt durch die Projekte P14573, P15438 und P19683. Für Abbildung 1 danke ich Christine Voß (Marburg).

Evolution des CCM

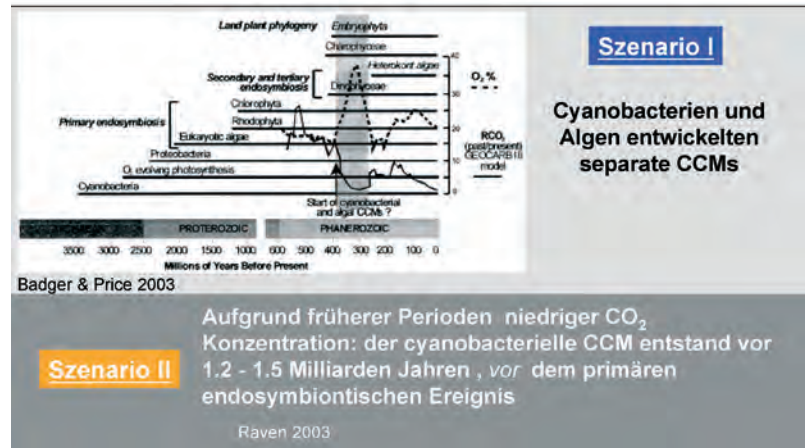
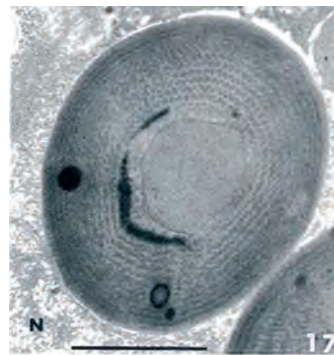
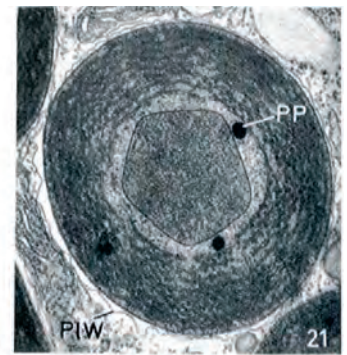


Abb. 9: Mögliche Szenarien der Evolution der CCM's von Cyanobakterien und Algen.



Cyanoptyche gloeocystis

Aufnahmen von L. Kies, Hamburg



Gloeochaete wittrockiana

Abb. 10: Cyanellen mit polyedrischen „Carboxysomen“, die von einer deutlich sichtbaren Hülle begrenzt werden (*siehe Abb. 8).

Literatur

BADGER M.R. & G.D. PRICE (2003): CO_2 concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. — J. Exp. Botany **54**: 609-622.

BREDEMEIER R, SCHLEGEL T., ETEL F., VOJTA A., BORISSENKO L., BOHNSACK M.T., GROLL M., von HAESLER A. & E. SCHLEIFF (2006): Functional and phylogenetic properties of the pore forming β -barrel transporter of the Omp85 family. — J. Biol. Chem., in Druck.

BUREY S.C., FATHI-NEJAD S., POROYKO V., STEINER J.M., LÖFFELHARDT W. & H.J. BOHNERT (2005): The central body of the cyanelles of *Cyanophora paradoxa*: a eukaryotic carboxysome? — Can J. Bot. **83**: 758-764.

BUREY S.C., POROYKO V., OZTURK Z.N., FATHINEJAD S., SCHÜLLER C., BOHNERT H.J. & W. LÖFFELHARDT (2007): Acclimation to low $[\text{CO}_2]$ by an inorganic carbon concentrating mechanism in *Cyanophora paradoxa*. — Plant Cell Environ., in Druck.

BUTTERFIELD N.J. (2000): *Bangiomorpha pubescens* n.gen., n.sp.: implications for the evolution of sex, multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes. — Paleobiology **26**: 386-404.

- CAVALIER-SMITH T. (2002): Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses. — *Curr. Biol.* **12**: R62-R64.
- CAVALIER-SMITH T. (2006): The tiny enslaved genome of a rhizarian alga. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 9379-9380.
- FICHERA M.E. & D.S. ROOS (1997): A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. — *Nature* **390**: 407-409.
- GOULD S., SOMMER M.S., HADFI K., ZAUNER S., KROTH P.G. & U.G. MAIER (2006): Protein targeting into the complex plastid of cryptophytes. — *J. mol. Evol.* **62**: 674-681.
- KAPLAN A. & L. REINHOLD (1999): CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. — *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 539-570.
- KILIAN O. & P.G. KROTH (2005): Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids. — *Plant J.* **41**: 175-183.
- KOWALLIK K.V. (1994): From endosymbionts to chloroplasts: evidence for a single prokaryotic/eukaryotic endocytobiosis. — *Endocyt. Cell Res.* **10**: 137-149.
- JARVIS P. & J. SOLL (2002): Toc, Tic and chloroplast protein import. — *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **1590**: 177-189.
- LÖFFELHARDT W. (1995): Molecular Analysis of Plastid Evolution. — In: JOINT I. (Ed.), *Molecular Ecology of Aquatic Microbes*. NATO ASI Series G. Vol. **138**. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg: 265-278.
- LÖFFELHARDT W., BOHNERT H.J. & D.A. BRYANT (1997): The complete sequence of the *Cyanophora paradoxa* cyanelle genome (*Glaucozystophyceae*). — *Pl. Syst. Evol. [Suppl.]* **11**: 149-162.
- LÖFFELHARDT W. & H.J. BOHNERT (2001): The cyanelle (muoplast) of *Cyanophora paradoxa*: a paradigm for endosymbiotic organelle evolution. — In: SECKBACH J. (Ed.), *Symbiosis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 111-130.
- MARIN B., NOWACK E.C.M. & M. MELKONIAN (2005): A plastid in the making: Primary endosymbiosis. — *Protist* **156**: 425-432.
- MARTIN W., STOEBE B., GOREMYKIN V., HANSMANN S., HASEGAWA M. & K. KOWALLIK (1998): Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. — *Nature* **393**: 162-165.
- MARTIN W., RUJAN T., RICHLY E., HANSEN A., CORNELSEN S., LINS T., LEISTER D., STOEBE B., HASEGAWA M. & D. PENNY (2002): Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 12246-12251.
- McFADDEN G.A. & G.G. van DOOREN (2004): Evolution: Red algal genome affirms a common origin of all plastid types. — *Curr. Biol.* **14**: R514-R516.
- MULLIN K.A., LIM L., RALPH S.A., SPURCK T.P., HANDMAN E. & G.I. McFADDEN (2006): Membrane transporters in the relict plastid of malaria parasites. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 9572-9577.
- NEUHAUS H.E. & M.J. EMES (2000): Nonphotosynthetic metabolism in plastids. — *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 111-140.
- PFANZAGL B., ZENKER A., PITTENAUER E., ALLMAIER G., MARTINEZ-TORRECUIADRADA J., SCHMID E.R., de PEDRO M.A. & W. LÖFFELHARDT (1996): Primary structure of cyanelle peptidoglycan of *Cyanophora paradoxa*: a prokaryotic cell wall as part of an organelle envelope. — *J. Bacteriol.* **178**: 332-339.
- PFANZAGL B. & W. LÖFFELHARDT (1999): In vitro synthesis of peptidoglycan precursors modified with N-acetylputrescine by *Cyanophora paradoxa* cyanelle envelope membranes. — *J. Bacteriol.* **181**: 2643-2647.
- PLAUMAUER B., PFANZAGL B., BERENQUER J., de PEDRO M.A. & W. LÖFFELHARDT (2001): Sub-cellular distribution of enzymes involved in the biosynthesis of cyanelle murein in the protest *Cyanophora paradoxa*. — *FEBS Lett.* **284**: 169-172.
- PRECHTL J., KNEIP C., LOCKHART P., WENDEROTH K. & U.G. MAIER (2004): Intracellular spheroid bodies of *Rhopalodia gibba* have nitrogen-fixing apparatus of cyanobacterial origin — *Mol. Biol. Evol.* **21**: 1477-1481.
- RAVEN P. (1970): A multiple origin of plastids and mitochondria. — *Science* **169**: 641-646.
- RAVEN J.A. (2003): Carboxysomes and peptidoglycan walls of cyanelles: possible physiological functions. — *Europ. J. Phycol.* **38**: 47-53.
- REITH M. & J. MULHOLLAND: (1993) A high resolution gene map of the chloroplast genome of the red alga *Porphyra purpurea*. — *Plant Cell* **5**: 465-476.
- RODRÍGUEZ-EZPELETA N., BRINKMANN H., BUREY S.C., ROURE B., BURGER G., LÖFFELHARDT W., BOHNERT H.J., PHILIPPE H. & B.F. LANG (2005): Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae and glaucophytes. — *Curr. Biol.* **15**: 1325-1330.
- RUMPHO M.E., WORFUL J., POCHAREDDY S., TYLER M. & F. DASTOOR (2006): Sea slug kleptoplasty and other unusual symbioses. — 5th International Congress on Symbiosis, Vienna: 43 (abstr.).
- SOLL J. & E. SCHLEIFF (2004): Protein import into chloroplasts. — *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**: 198-208.
- STEINER J.M. & W. LÖFFELHARDT (2005): Protein translocation into and within cyanelles. — *Mol. Membrane Biol.* **22**: 123-132.
- STEINER J.M., YUSA F., POMPE J.A. & W. LÖFFELHARDT (2005): Homologous protein import machineries in chloroplasts and cyanelles. — *Plant J.* **44**: 646-652.
- STOEBE B. & U.-G. MAIER (2002): One, two, three: nature's toolbox for building plastids. — *Protoplasma* **219**: 123-130.
- van DOOREN G.G., SCHWARTZBACH S.D., OSAFUNE T. & G.A. McFADDEN (2001): Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. — *Biochim. Biophys. Acta* **1541**: 34-53.

Anschrift des Verfassers:

Dr. Wolfgang LÖFFELHARDT
 Max F. Perutz Laboratories, Universität Wien
 Department für Biochemie
 Dr. Bohrgasse 9
 1030 Wien
 Austria
 E-Mail: wolfgang.loeffelhardt@univie.ac.at