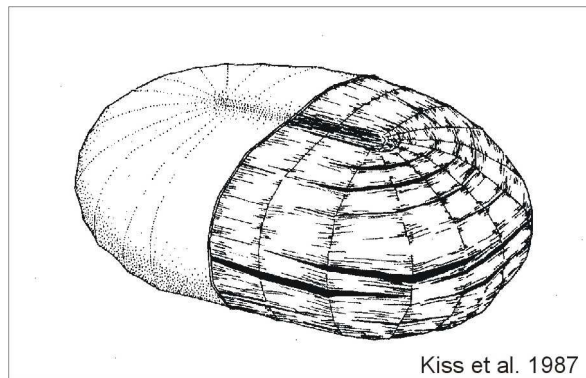


**Molekulare Identifizierung und
Charakterisierung der Glucosyltransferase
EgPaS (Paramylon-Synthase) aus
Euglena gracilis (Euglenozoa)**



**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
(Dr. rer. nat)
der Fakultät für Biologie
der Universität Bielefeld**

vorgelegt von
Ulrike Brommund
Bielefeld, im Januar 2004

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	CHARAKTERISTISCHE MERKMALE DER EUGLENIDA	1
1.2	PHYLOGENETISCHE SYSTEMATIK DER EUGLENIDA	6
1.3	VORKOMMEN UND SYNTHESE VON POLYSACCHARIDEN IN PROKARYOTEN UND EUKARYOTEN	10
1.4	DAS RESERVEKOHLENHYDRAT PARAMYLON UND SEINE SYNTHESE	18
1.5	ZIELE DIESER ARBEIT	26
2	MATERIAL & METHODEN	27
A	MATERIAL	27
2.1	GERÄTE	27
2.2	CHEMIKALIEN & VERBRAUCHSMATERIALIEN	28
2.3	KITS	28
2.4	ENZYME	29
2.5	PLASMIDE & <i>E. COLI</i> -STÄMME	29
2.6	LÄNGENSTANDARDS	29
2.7	OLIGONUKLEOTID-PRIMER	29
2.8	SOFTWARE & INTERNET DATENBANKEN	30
B	METHODEN	31
2.9	KULTIVIERUNG VON <i>EUGLENA GRACILIS</i>	31
2.10	KULTIVIERUNG ANDERER EUGLENIDA	33
B1	BIOCHEMISCHE METHODEN	33
2.11	ISOLIERUNG DES PARAMYLON-SYNTHASE-KOMPLEXES	33
2.12	RADIOAKTIVER ENZYMTEST MIT [¹⁴ C]-UDP-GLUCOSE	36
2.13	PHOTOAFFINITÄTS-MARKIERUNG DER SUBSTRATBINDENDEN UNTEREINHEIT	37
2.13.1	SYNTHESE VON [ALPHA- ³² P]-UDP-GLUCOSE	38
2.13.2	MARKIERUNG DER SUBSTRATBINDENDEN UNTEREINHEIT	38
2.14	PROTEINBESTIMMUNG	39
2.14.1	MODIFIZIERTE PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY ET AL. (1951)	39
2.14.2	BIORAD-PROTEINASSAY	40
2.15	POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE [PAGE]	40
2.15.1	NATIVE PAGE	40
2.15.2	SDS-PAGE	41
2.15.3	BESTIMMUNG DES MOLEKULARGEWICHTES AUFGETRENNTER PROTEINE	43
2.16	PROTEINNACHWEIS IM POLYACRYLAMID-GEL	44
2.16.1	SILBER-FÄRBUNG FÜR NATIVE PHASTSYSTEM™ PAGE	44
2.16.2	SILBER-FÄRBUNG FÜR NATIVE UND SDS-PAGE	44
2.16.3	COOMASSIE® BRILLIANT BLUE R250-FÄRBUNG FÜR NATIVE UND SDS-PAGE	45
2.16.4	KUPFERCHLORID-FÄRBUNG FÜR PRÄPARATIVE SDS-PAGE	46
2.16.5	IMIDAZOL / ZINK-FÄRBUNG FÜR PRÄPARATIVE SDS-PAGE	46
2.16.6	TROCKNEN VON POLYACRYLAMID-GELEN	47
2.17	ELUTION VON PROTEINEN AUS POLYACRYLAMID-GELEN	47
2.18	ANKONZENTRIEREN VON PROTEINHALTIGEN LÖSUNGEN	47
2.18.1	VAKUUM-ZENTRIFUGATION	48
2.18.2	ACETON-FÄLLUNG	48
2.18.3	TCA-FÄLLUNG	48
2.18.4	METHANOL / CHLOROFORM-FÄLLUNG	48
2.19	BESTIMMUNG DER N-TERMINALEN AMINOSÄUREN-SEQUENZ	49
2.20	MASSENSPEKTROMETRISCHE PEPTID-MASSENBESTIMMUNG MIT MALDI-TOF-MS	50
2.20.1	TRYPSIN-SPALTUNG VON PROTEINEN IM SDS-POLYACRYLAMID-GEL	50
2.20.2	MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE DER PEPTIDE	51

2.21	MASSENSPEKTROMETRISCHE PEPTID-SEQUENZIERUNG MIT ESI-QTOF-MS/MS	51
2.21.1	TRYPsin-SPALTUNG VON PROTEINEN IM SDS-POLYACRYLAMID-GEL	52
2.21.2	MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNG DER TRYPSINFRAGMENTE	52
B2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	53
2.22	DNA-ISOLIERUNG	53
2.23	RNA-ISOLIERUNG	53
2.24	OLIGONUKLEOTID-PRIMER-DESIGN	53
2.25	POLYMERASE-KETTENREAKTION [PCR]	54
2.26	REVERSE TRANSKRIPTION	55
2.27	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE ZUR AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN	56
2.28	EXTRAKTION VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSE-GELEN	56
2.29	REINIGUNG VON DNA	57
2.29.1	REINIGUNG MIT DEM E.Z.N.A. [®] CYCLE-PURE KIT	57
2.29.2	N-BUTANOL-FÄLLUNG	57
2.29.3	PHENOLISIERUNG UND ETOH-FÄLLUNG	57
2.30	KLONIERUNG	57
2.31	KULTIVIERUNG VON <i>E. COLI</i> -ZELLEN	58
2.31.1	KULTIVIERUNG IN FLÜSSIGKULTUREN	59
2.31.2	KULTIVIERUNG AUF AGARPLATTEN	59
2.31.3	ANLEGEN VON GLYCERIN-DAUER-KULTUREN	59
2.32	CHARAKTERISIERUNG DER PLASMIDE: PCI-QUICK PREP	59
2.33	CHARAKTERISIERUNG DER INSERTS: COLONY-PCR	60
2.34	PLASMIDISOLIERUNG	61
2.35	RESTRIKTIONSSPALTUNG	61
2.36	SCREENING VON cDNA-PHAGEN-BANKEN	62
2.36.1	HERSTELLUNG UND MARKIERUNG DER HYBRIDISIERUNGS-SONDE	62
2.36.2	HERSTELLUNG VON LAMBDA-PHAGEN-KOMPETENTEN <i>E. COLI</i> -ZELLEN	63
2.36.3	PLATTIERUNG DER cDNA-PHAGEN-BANKEN	63
2.36.4	HERSTELLUNG DER NITROCELLULOSE REPLIKA-FILTER	63
2.36.5	HYBRIDISIERUNG	64
2.36.6	VEREINZELUNG DER PHAGEN-PLAQUES	65
2.36.7	<i>IN VIVO</i> EXCISION DER PLASMIDE	66
2.37	SEQUENZIERUNG	66
3	ERGEBNISSE	67
3.1	ANZUCHT VON <i>EUGLENA GRACILIS</i> IN KULTUR-RÖHREN UNTER HETEROTROPHEN BEDINGUNGEN UND BESTIMMUNG DES GEEIGNETEN ERNTEZEITPUNKTES ZUR ISOLIERUNG DER PARAMYLON-SYNTHASE	67
3.2	ISOLIERUNG DES PARAMYLON-SYNTHASE-KOMPLEXES	70
3.3	PHOTOAFFINITÄTS-MARKIERUNG DER SUBSTRATBINDENDEN UNTEREINHEIT DES PARAMYLON-SYNTHASE-KOMPLEXES	74
3.4	GRÖßENBESTIMMUNG UND ISOLIERUNG DER SUBSTRATBINDENDEN UNTEREINHEIT DES PARAMYLON-SYNTHASE-KOMPLEXES AUS <i>EUGLENA GRACILIS</i>	78
3.5	MASSENSPEKTROMETRISCHE PROTEIN-ANALYSE DER 54 kDa SUBSTRATBINDENDEN UNTEREINHEIT DES PARAMYLON-SYNTHASE-KOMPLEXES AUS <i>EUGLENA GRACILIS</i>	79
3.5.1	PEPTID-MASSENBESTIMMUNG VON TRYPSIN-FRAGMENTEN DES 54 kDa PROTEINS DURCH MALDI-TOF- UND ESI-QTOF-MASSENSPEKTROSKOPIE	79
3.5.2	AMINOSÄURE-SEQUENZIERUNG DER 54 kDa PROTEINBANDE DURCH N- TERMINALEN EDMAN-ABBAU SOWIE VON TRYPSIN-FRAGMENTEN DER 54 kDa PROTEINBANDE DURCH ESI-QTOF-TANDEM-MASSENSPEKTROSKOPIE	85
3.6	SCREENING DER cDNA-PHAGEN-BANKEN VON <i>EUGLENA GRACILIS</i>	90
3.7	VERVOLLSTÄNDIGUNG DES 5'-ENDES DER cDNA FÜR DIE PARAMYLON-SYNTHASE VON <i>EUGLENA GRACILIS</i> DURCH VERWENDUNG EINES „SPICED LEADER“- SPEZIFISCHEN OLIGONUKLEOTID-PRIMERS IN DER RT-PCR	94

3.8	ANALYSE DER cDNA-SEQUENZ (<i>EGPAS</i>) FÜR DIE 54 kDA SUBSTRATBINDENDE UNTEREINHEIT DES PARAMYLON-SYNTHASE-KOMPLEXES AUS <i>EUGLENA GRACILIS</i>	94
3.9	ANALYSE DER ABGELEITEN PROTEIN-SEQUENZ FÜR DIE PARAMYLON-SYNTHASE <i>EGPAS</i> AUS <i>EUGLENA GRACILIS</i>	99
3.10	ANALYSE DER GEN-SEQUENZ DER 54 kDA SUBSTRATBINDENDEN UNTEREINHEIT DES PARAMYLON-SYNTHASE-KOMPLEXES <i>EGPAS</i> AUF DNA-EBENE	110
3.11	ERSTE DNA-SEQUENZINFORMATIONEN FÜR DIE PARAMYLON-SYNTHASE AUS ANDEREN ARTEN DER GATTUNG <i>EUGLENA</i>	112
4	DISKUSSION	115
4.1	DIE GLUCOSYLTRANSFERASE <i>EGPAS</i> IM VERGLEICH MIT ANDEREN GLYCOSYLTRANSFERASEN	116
4.2	NUKLEINSÄURE-ANALYSE DER GLUCOSYLTRANSFERASE <i>EGPAS</i>	123
4.3	MODELL ZUR PARAMYLON-SYNTHESE IN DER GRANULA-MEMBRAN	124
4.4	HYPOTHESE ÜBER DIE HERKUNFT DER FÄHIGKEIT ZUR PARAMYLON-SYNTHESE INNERHALB DER EUGLENIDA	126
5	ZUSAMMENFASSUNG	128
6	LITERATUR	129
7	ABKÜRZUNGEN	140
	ANHANG A	142
	LOKALE ALIGNMENTS (MIT DEM NCBI-PROGRAMM BLAST) UND MASSEN-SPEKTREN DER MITTELS ESI-QTOF-MASSENSPEKTROSKOPIE SEQUENZIIERTEN PEPTIDE DER 54 kDA PARAMYLON-SYNTHASE <i>EGPAS</i> AUS DEM SYNTHASE-KOMPLEX VON <i>EUGLENA GRACILIS</i>	
	ANHANG B	150
	LOKALE ALIGNMENTS (MIT DEM NCBI-PROGRAMM BLAST) DER MITTELS ESI-QTOF-MASSENSPEKTROSKOPIE SEQUENZIIERTEN PEPTIDE MIT ÜBEREINSTIMMUNG ZUR ATPASE BETA-UNTEREINHEIT AUS DER 54 kDA-PROTEIN-BANDE VON <i>EUGLENA GRACILIS</i>	
	DANKSAGUNG	
	ERKLÄRUNG	

1 EINLEITUNG

Das lineare beta-1,3-Glucan Paramylon ist das Reservekohlenhydrat einer morphologisch sehr heterogenen Gruppe von Flagellaten, den Euglenida. Paramylon wird sowohl von den phototrophen als auch von den meisten heterotrophen Spezies der Ordnung Euglenida gebildet. Über das Paramylon-synthetisierende Enzym (UDP-Glucose:beta-1,3-Glucosyltransferase) und seinen evolutionären Ursprung ist bisher nicht viel bekannt.

Im Folgenden soll zunächst eine Einführung in die morphologischen und physiologischen Charakteristika der Euglenida sowie die phylogenetische Systematik des Taxons gegeben werden. Mit einem sich anschließenden Überblick über die Vielfalt der Polysaccharide, deren Synthese und dem bisherigen Kenntnisstand über die Paramylon-Synthese bei *Euglena gracilis* wird der Ausgangspunkt für diese Arbeit dargelegt.

1.1 CHARAKTERISTISCHE MERKMALE DER EUGLENIDA

Die Euglenida bilden eine sehr formenreiche Organismengruppe einzelliger begeißelter Eukaryoten. Sie umfassen Spezies mit nur etwa 10 µm Zelllänge (*Notosolenus apocampus*) bis hin zu der 100 bis 400 µm großen *Euglena ehrenbergii* (LEEDALE 1967). Die eugleniden Flagellaten sind ubiquitär verbreitet und besiedeln die unterschiedlichsten **Lebensräume**. Die meisten Arten leben im Süßwasser, aber auch in extremen Habitaten wie Salz- und Brackwasser, im Erdboden und sogar auf Schnee lassen sich euglenide Flagellaten finden (JONES 1944, LEEDALE 1967, HOHAM & BLINN 1979, EKELUND & PATTERSON 1997). Deshalb weisen viele Spezies ein breites Toleranzspektrum in Bezug auf abiotische Umweltfaktoren wie Lichtverhältnisse, pH-Wert, Temperatur, Sauerstoff- und Salzgehalt auf. Manche Euglenida sind charakteristische Indikatorarten für Lebensräume mit einem hohen organischen Nährstoffgehalt. Auch einige möglicherweise endozoisch lebende Vertreter sind beschrieben worden (JAHN 1946, HUBER-PESTALOZZI 1955, PONCE GORDO et al. 2002).

Die Besiedlung von so unterschiedlichen Lebensräumen wurde u.a. durch die Ausbildung verschiedener Ernährungsweisen innerhalb der Ordnung Euglenida ermöglicht, die neben den bekannteren phototrophen Spezies auch zahlreiche heterotrophe (osmotrophe und phagotrophe) Gattungen umfasst (Abb. 1.1).

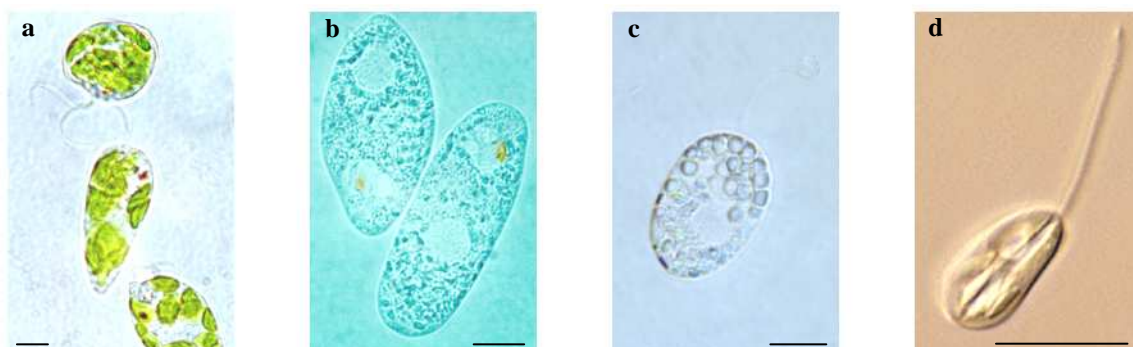


Abb. 1.1 Lichtmikroskopische Aufnahmen verschiedener Euglenida. **a** *Euglena gracilis* (phototroph, mit Chloroplasten und Stigma), **b** *Khawkinea quartana* (sekundär osmotroph, mit Stigma) **c** *Gyropaigne lefevrei* (primär osmotroph), **d** *Petalomonas minuta* (phagotroph, mit Ingestionsapparat). Maßstab 10 µm.

Durch den Besitz von Chloroplasten können **phototrophe Arten** ihren Energiebedarf durch Photosynthese decken und benötigen lediglich die exogenen Vitamine B₁ und B₁₂ als essentielle Kofaktoren (LEEDALE 1967). Einige Arten, wie z.B. *Khawkinea quartana*, haben ihre phototrophe Ernährungsweise durch die Reduktion der Plastiden wieder eingebüßt und werden deshalb als sekundär Osmotrophe bezeichnet (PREISFELD et al. 2000). Die am Besten untersuchte phototrophe Spezies *Euglena gracilis* kann sogar je nach Kulturbedingung in mineralischem Medium im Licht phototroph, in organischem Medium im Licht mixotroph (photoheterotroph) und auch in organischem Medium im Dunkeln osmotroph leben.

Neben den sekundär Osmotrophen gibt es aber auch Gattungen, die sich ausschließlich und ohne Anzeichen für eine ehemals phototrophe Lebensweise osmotroph ernähren. Diese **primär Osmotrophen** wie auch die **sekundär osmotrophen Arten** nehmen zur Deckung ihres Nährstoffbedarfes durch Pinocytose gelöste Substanzen aus dem Medium auf. Ebenfalls heterotroph ernähren sich die **phagotrophen Spezies**, die mit Hilfe von Ingestionsapparaten Nahrungspartikel pro- oder eukaryotischer Herkunft phagocytotisch aufnehmen können. Für diese unterschiedlichen Ernährungsweisen werden charakteristische zelluläre Strukturen benötigt, die im Folgenden zusammen mit gemeinsamen Merkmalen aller Eugleniden beschrieben werden.

Charakteristisch für das Taxon Euglenida ist die **Pellikula**, die den zellwandlosen Flagellaten als Begrenzung nach außen dient. (Abb. 1.2, 1.3, 1.5). Sie besteht aus einer 8-10 nm dicken Cytoplasmamembran und einer darunter liegenden epiplasmatischen Schicht aus proteinogenen Streifen, die eine Art-spezifische Ausprägung aufweist (LEANDER & FARMER 2000). Gemeinsam mit den assoziierten Mikrotubuli steht die Dicke der epiplasmatischen Schicht in direktem

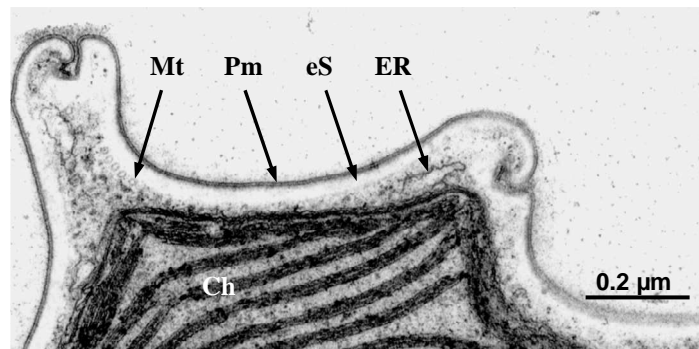


Abb. 1.2 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch die rigide **Pellikula** von *Lepocinclis ovata*. **Ch** Chloroplast, **ER** Endoplasmatisches Retikulum, **eS** epiplasmatische Schicht, **Mt** Mikrotubuli, **Pm** Plasmamembran.

Zusammenhang mit der Flexibilität bzw. Rigidität der Pellikula und damit mit der Fähigkeit zur „Metabolie“, der typischen eugleniden Bewegung (WALNE 1980). Die Pellikula-Streifen verlaufen je nach Spezies in unterschiedlicher Dichte und Ausprägung entweder parallel zur Längsachse der Zellen (longitudinal) oder helikal um die Zellen herum und sind bereits lichtmikroskopisch zu erkennen. Unmittelbar unter der Pellikula befinden sich Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums, Schleimkörper und manchmal auch als Mucocysten bezeichnete Extrusomen (MIGNOT 1963). Die Schleimkörper sezernieren extrazelluläre Mucopolysaccharide, die u.a. auch an der Bildung der starren, die Zellen umgebenden Loricæ bei den Gattungen *Trachelomonas* und *Strombomonas* beteiligt sind.

Am vorderen Ende weisen die Zellen eine Invagination der Pellikula auf (Abb. 1.3), die über den **Kanal** in das **Reservoir** führt. An dieser Stelle geht die charakteristische Pellikula-Struktur der Plasmamembran in eine glatte Membran über. Perlschnurartig darunter liegen Mikrotubuli. Die Reservoir-Membran ist der bevorzugte Ort der Pinocytose, also der osmotrophen Ernährung. Vermutlich sind zu dieser Art der Stoffaufnahme alle Euglenida befähigt, also auch die phototrophen und phagotrophen Spezies zusätzlich zu ihrer sonstigen Ernährungsweise. Außerdem dient die Cytoplasmamembran im Bereich des Reservoirs zusammen mit den intrazellulär in der Nähe lokalisierten **pulsierenden Vakuolen** der Osmoregulation.

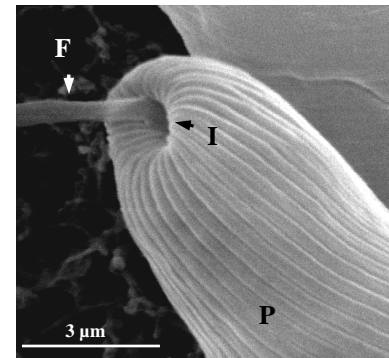


Abb. 1.3 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zelloberfläche von *Euglena gracilis*. **F** dorsales Flagellum, **I** Invagination der Pellikula, **P** Pellikula.

Die phagotrophen Arten des Taxons Euglenida besitzen zur Aufnahme partikulärer Nahrung **Ingestionsapparate** (Cytostome), die sich seitlich neben der Reservoir-Kanal-Struktur nach außen öffnen. Man kennt vier verschiedene Typen mit unterschiedlich komplexem Aufbau: Ein Typ I-Cytostom wie beispielsweise bei *Petalomonas cantuscygni* besteht aus einer Mikrotubuli-verstärkten cytoplasmatischen Tasche. Typ II-Ingestionsapparate werden zusätzlich noch von zwei Stäben („rods“) und einigen Flügeln („vanes“) unterstützt und sind bisher nur in der Gattung *Ploeotia* gefunden worden. Ein Typ III-Cytostom kommt zum Beispiel bei *Peranema trichophorum* vor und ist mit zwei mikrotubulären Stäben und vier Flügeln ausgestattet. Ausschließlich in der Spezies *Entosiphon sulcatum* findet sich der komplexe Siphon-artige Typ IV-Ingestionsapparat mit drei mikrotubulären Stäben und vier Windmühlen-artigen Flügeln um das Cytostom (TRIEMER & FARMER 1991). Die Komplexität der Ingestionsapparate korreliert aber nicht unbedingt mit der Art der aufgenommenen Nahrung, da beispielsweise die ursprünglich als bakteriotroph geltende Gattung *Ploeotia* (Typ II-Cytostom) unter Kulturbedingungen Hefezellen aufnehmen konnte. Bei *Entosiphon sulcatum* mit dem komplizierten Typ IV-Ingestionsapparat wurde dagegen bisher nur die Aufnahme von Bakterien beobachtet (TRIEMER & FARMER 1991, LINTON & TRIEMER 1999).

An der Basis des Reservoirs entspringen die **Geißeln**, die über zwei Basalkörper und drei asymmetrische, mikrotubuläre Geißelwurzeln in der Zelle verankert sind (FARMER & TRIEMER 1988). Ursprünglich weisen die Euglenida zwei Flagellen auf, die mit **Mastigonemata** (feine Haare aus nicht-tubulären Glycoproteinen) versehen sind (DEFLANDRE 1934, BOUCK et al. 1978). Während die dorsale Geißel außer bei *Euglena mutabilis* immer aus dem Reservoir / Kanal-Komplex herausragt (Abb. 1.3), ist die ventrale Geißel häufig stark verkürzt oder wie im Falle von *Petalomonas cantuscygni* vollständig reduziert (CANN & PENNICK 1986). Die jeweils emergenten Geißeln weisen mit dem **Paraxonemalstab** (PAR, engl. *paraxonemal rod*), einer parallel zum Axonem verlaufenden proteinogenen Struktur, ein Merkmal auf, welches die Euglenida in dieser Komplexität nur mit den Kinetoplastida (Kapitel 1.2) gemeinsam haben und dessen Funktion bis heute nicht geklärt werden konnte (WALNE & DAWSON 1993, TALKE 2000). Während die Protein-Struktur des PAR in der dorsalen Geißel im Längsschnitt gitterartig ist, weist das ventrale Flagellum - wenn es emergent ist - einen plattenartig strukturierten PAR auf.

Noch innerhalb des Reservoirs gelegen, befindet sich bei den phototrophen und einigen sekundär osmotrophen Arten innerhalb der emergenten Geißel der parakristalline **Paraxonemalkörper** (PAB, engl. *paraxonemal body*). Zusammen mit dem extraplastidären **Stigma** (dem Augenfleck), das aus membranumschlossenen Lipiden, Flavinen und Carotinoiden besteht und in der Nähe der Reservoir-Membran lokalisiert ist, dient der PAB der Lichtperzeption.

Die Geißeln werden verdoppelt, bevor die **Zellteilung** durch Einschnürung vom Reservoir beginnend in Längsrichtung der Zellen erfolgt. Der große **Zellkern** mit seinem auffälligen **Nukleolus** (Abb. 1.4) wandert dabei von seiner posterioren Position zum Vorderende der Zelle und streckt

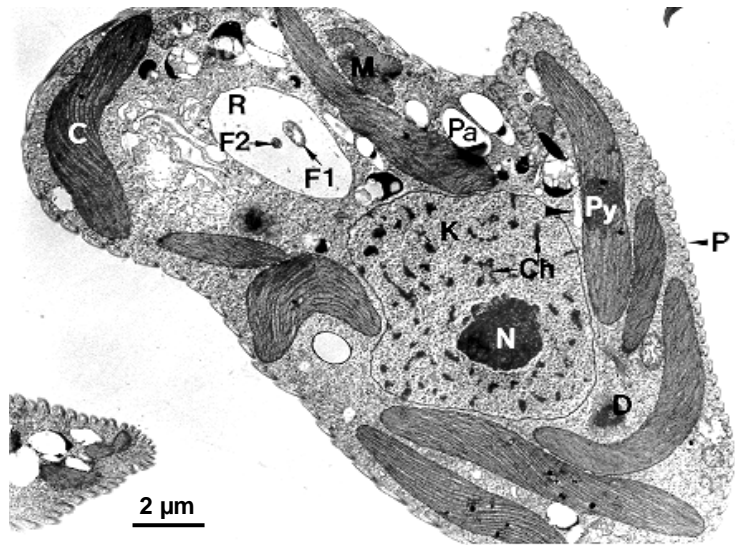


Abb. 1.4 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch eine phototrophe Zelle von *Euglena gracilis*. C Chloroplast, Ch Chromosomen, D Dictyosom, F1 dorsale Geißel mit PAR, F2 ventrale Geißel, K Zellkern mit kondensierten Chromosomen, M Mitochondrium, N Nukleolus, P Pellikula, Pa Paramylon-Granulum, Py Pyrenoid mit Paramylon-Kappe, R Reservoir.

sich dann hantelförmig quer zur Längsachse. Während der geschlossenen **Mitose**, die der ausschließlich vegetativen Vermehrung der Euglenida vorausgeht, bleiben sowohl die Kernhülle als auch der Nukleolus unfragmentiert erhalten. Die Chromosomen liegen auch in der Interphase in kondensiertem Zustand vor (LEEDALE 1967), wie man auf der elektronenmikroskopischen Aufnahme eines Zellquerschnitts von *Euglena gracilis* gut erkennen kann (Abb. 1.4). Die Anzahl der Chromosomen bei *Euglena gracilis* beträgt 45 bzw. mindestens 42 (LEEDALE 1958a, b, DOOIJES et al. 2000).

Auch bei der **Organisation der genetischen Informationen** weisen die Euglenida im Vergleich zu anderen Eukaryoten manche Besonderheiten auf, von denen im Folgenden einige kurz dargestellt werden sollen:

- Die Gene für die ribosomale RNA sind bei *Euglena gracilis* nicht chromosomal kodiert, sondern liegen innerhalb des Nukleolus als zirkuläre, extrachromosomale DNA vor (GREENWOOD et al. 2001).

- Die seltene Base J (beta-D-glucosyl-hydroxymethyluracil) ist zu 0.2 mol % Bestandteil der *Euglena gracilis*-DNA und ist außer in den Euglenida bisher nur in den Kinetoplastida und den Diplonemida nachgewiesen worden (DOOIJES et al. 2000).

- Neben den konventionellen spleißosomalen Introns (GT-AG-Introngrenzen mit typisch eukaryotischem *cis*-Spleißmechanismus) sind in kernkodierten Genen bei der phototrophen *Euglena gracilis* auch untypische Introngrenzen mit unbekanntem Spleißvorgang gefunden worden. Das Plastidengenom von *Euglena gracilis* enthält ebenfalls ungewöhnliche Gruppe III-Introns und sogenannte Twintrons (HENZE et al. 1995, BRECKENRIDGE et al. 1999, EBEL et al. 1999).

- In fast allen bisher daraufhin untersuchten Euglenida wurden charakteristische, zusammen mit der 5S rRNA kodierte „spliced leader“-Sequenzen gefunden, die bei der Prozessierung der kernkodierten prä-mRNA in einem spleißosomalen *trans*-Spleißmechanismus an das 5'-Ende der mRNA angehängt werden (TESSIER et al. 1991, EBEL et al. 1999, FRANTZ et al. 2000).

Die **Mitochondrien** der Euglenida durchziehen entweder als singuläres, netzförmiges Chondriom die ganze Zelle oder liegen in Form von zahlreichen distinkten, länglich bis eiförmigen Organellen vor. Ein weiteres Charakteristikum der Euglenida sind die scheibenförmigen, an der Basis eingeschnürten Cristae (Abb. 1.5, WALNE & KIVIC 1990). Die **Chloroplasten** der phototrophen eugleniden Flagellaten enthalten ebenso wie die der Viridiplantae die Photosynthesepigmente Chlorophyll a und b. Anzahl, Form und Größe der Chloroplasten sind artspezifisch, wobei die Diversität von wenigen großen bandförmigen Plastiden bei *Eutreptia* bis hin zu zahlreichen linsenförmigen Organellen bei einigen *Euglena*-Spezies reicht. *Euglena gracilis* besitzt 6 bis 12 der semiautonomen Organellen, die unter heterotrophen Bedingungen zu Proplastiden reduziert werden können (LEEDALE 1967). Bei einigen Arten finden sich in den Chloroplasten **Pyrenoide**, also distinkte Orte der Kohlenstoff-Fixierung durch die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO, KISS et al. 1986). Im Unterschied zu den aus einer primären Endocytobiose stammenden Chloroplasten der Grünalgen mit doppelter Hüllmembran, sind die Plastiden der Euglenida von drei Hüllmembranen umgeben (Abb. 1.6). Erklären lässt sich dieses Merkmal durch eine sekundäre Endocytobiose, bei der eine phagotrophe Zelle keine Cyanobakterium-ähnliche Zelle, sondern eine eukaryotische, bereits plastidenhaltige Zelle bzw. dessen Chloroplast aufgenommen hat (GIBBS 1978, GIBBS 1990). Für die Hypothese der phagocytotischen Aufnahme einer kompletten Zelle muss die Reduktion einer der vier Hüllmembranen, die bei der Etablierung einer solchen Endocytobiose entstehen, angenommen werden. Postuliert man dagegen die Aufnahme eines Chloroplasten durch das myzocytotische „Aussaugen“ von Zellen, wie es für die phagotrophe Euglenide *Peranema trichophorum* gezeigt werden konnte (TRIEMER 1997, DELWICHE 1999), würden direkt Plastiden mit drei Hüllmembranen entstehen. Anhand morphologischer Charakteristika und phylogenetischer Analysen von Plastiden-kodierten Genen (*psbA*, *rbcL*, 16S rRNA und *tufA*) konnte gezeigt werden, dass der Ursprung der eugleniden Chloroplasten innerhalb der Chlorophyceae liegt (MORDEN et al. 1992, DELWICHE 1999).

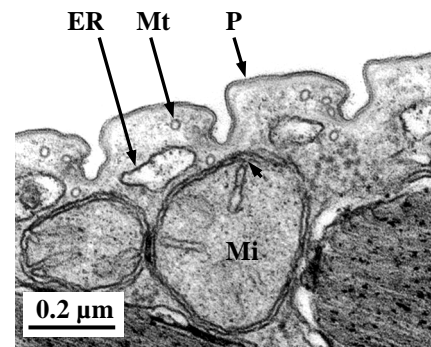


Abb. 1.5 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch ein **Mitochondrium** von *Euglena gracilis*. **Ch** Chloroplast, **ER** Endoplasmatisches Retikulum, **Mi** Mitochondrium mit eingeschnürten Cristae (Pfeilspitze), **Mt** Mikrotubuli, **P** Pellikula.

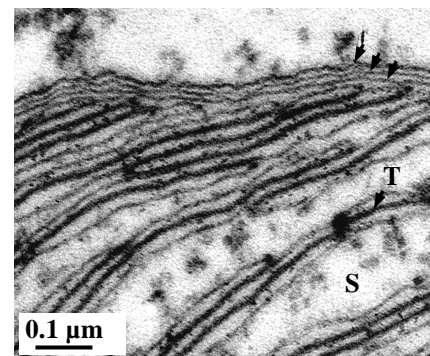


Abb. 1.6 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch einen **Chloroplasten** von *Euglena gracilis* mit drei Hüllmembranen (Pfeilspitzen). **S** Stroma, **T** Thylakoidmembranen.

Sowohl die phototrophen als auch die meisten heterotrophen eugleniden Flagellaten speichern Kohlenhydrate in Form von Membran-umschlossenen Granula aus unverzweigtem beta-1,3-Glucan. Das als **Paramylon** (siehe Kapitel 1.4) bezeichnete Reservekohlenhydrat wird auch bei den phototrophen Arten extraplastidär im Cytoplasma der Zellen gebildet. Gestalt, Größe und Anzahl der Paramylon-Granula sind bei den einzelnen Arten sehr unterschiedlich ausgeprägt, aber nur eingeschränkt als artspezifisch zu bezeichnen, da sie immer auch vom Ernährungszustand der Zellen abhängen.

Trotz der großen Vielfalt der eugleniden Flagellaten basieren die meisten **biochemischen und physiologischen** Erkenntnisse auf Untersuchungen der sowohl phototroph als auch heterotroph lebenden *Euglena gracilis*, weil sie vergleichsweise einfach zu kultivieren ist und deshalb in ausreichender Zellzahl zur Verfügung steht. Eine Besonderheit im Hinblick auf die Paramylon-Synthese und den Kohlenhydrat-Stoffwechsel soll im Folgenden erwähnt werden:

Während bei *Euglena gracilis* unter aeroben Bedingungen das abgebaute Paramylon zur Energiegewinnung die klassischen cytoplasmatischen und mitochondrialen Stoffwechselwege (Glycolyse, Oxidative Decarboxylierung, einen modifizierten Citratzyklus und die Oxidative Phosphorylierung) durchläuft, wird unter anaeroben Bedingungen die ungewöhnliche Wachsester-Fermentation angewendet (INUI et al. 1992). Auf diese Weise kann der Organismus aus dem Paramylon-Abbau auch ohne Sauerstoff ATP gewinnen. Die im Cytoplasma gelagerten Wachsester können bei einsetzenden aeroben Bedingungen ohne Netto-Verluste der Oxidativen Phosphorylierung zugeführt werden. Schlüsselenzym für beide Wege ist die Pyruvat:NADP⁺ Oxidoreduktase (PNO), ein einzigartiges mitochondriales Enzym, welches die Eigenschaften des klassischen mitochondrialen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDH, aerob) mit denen der cytoplasmatischen oder hydrogenosomalen Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFO, anaerob) kombiniert (ROTTE et al. 2001).

1.2 PHYLOGENETISCHE SYSTEMATIK DER EUGLENIDA

Die phylogenetische Einordnung der etwa 1000 bekannten eugleniden Spezies (micro*scope, <http://www.mbl.edu/microscope>) sowie auch die Systematik innerhalb der Gruppe war aufgrund der unterschiedlichen Ernährungsformen für lange Zeit umstritten und ist bis heute nicht umfassend geklärt. So werden die Flagellaten zum einen als Euglenophyceae (Chlorophyta) oder Euglenophyta zu den Algen gezählt (VAN DEN HOEK et al. 1993, SITTE et al. 2002) und zum anderen als Euglenida zu den Protozoen, den tierischen Einzellern (WEHNER & GEHRING 1990). Es existieren damit sowohl botanische (nach dem ICBN, dem International Code of Botanical Nomenclature) als auch zoologische Bezeichnungen (nach dem ICZN, dem International Code of Zoological Nomenclature) für das ambiregnale Taxon der Euglenida. Inzwischen gilt es als erwiesen, dass die eugleniden Flagellaten ursprünglich eine heterotrophe Protistengruppe darstellen (DAWSON & WALNE 1994, PREISFELD et al 2000, 2001, LEANDER et al. 2001, BUSSE et al 2003), aus der die phototrophen Spezies durch die Etablierung von Plastiden über eine sekundäre Endocytobiose hervorgegangen sind (GIBBS 1978, LEEDALE 1978). Aus diesem Grund werden für diese Arbeit die zoologischen Bezeichnungen der Taxa verwendet.

Aufgrund gemeinsamer morphologischer und molekularer Merkmale konnten als nächste Verwandte der Euglenida die Kinetoplastida identifiziert werden, zu denen die parasitischen Trypanosomatiden und die frei- oder parasitisch lebenden Bodoniden gehören (KIVIC & WALNE 1984). Die Euglenida werden zur Zeit zusammen mit den Kinetoplastida, den Diplonemida (inklusive der Gattung *Rhynchopus*, BUSSE & PREISFELD 2002a) und der isoliert stehenden Art *Postgaardia mariagerensis* als monophyletisches Taxon **Euglenozoa** geführt (CAVALIER-SMITH 1981, 1993, SIMPSON 1997). Wichtige gemeinsame Merkmale sind die heteromorphen Paraxonemalstäbe (WALNE & DAWSON 1993), die ungewöhnliche Base J als Bestandteil der DNA (DOOIJES et al. 2000) und der Mechanismus des *trans*-Spleißens (SIMPSON 1997, TESSIER et al. 1991, FRANTZ et al. 2000). Innerhalb der Euglenozoa lassen sich molekular bisher nur die Kinetoplastida und die Diplonemida als monophyletische Taxa darstellen, eine Monophylie der Euglenida konnte mit molekularen Markern bis heute nicht gezeigt werden (Abb. 1.7, PREISFELD et al. 2001, BUSSE & PREISFELD 2002a, b, 2003a, 2003b BUSSE et al. 2003). Das morphologische Merkmal der Pellikula gilt daher als einzige gut begründbare Autapomorphie der Euglenida (Abb. 1.7, LARSEN & PATTERSON 1990, SIMPSON et al. 1997, LEANDER & FARMER 2000, BUSSE et al. 2003).

Auch die Frage nach den nächsten Verwandten der Euglenozoa ist bis jetzt unbeantwortet. Die in SSU rDNA-Stammbäumen gefundene Position der Euglenozoa an der Basis der Eukaryoten zusammen mit den amitochondrialen Protisten könnte auf die erhöhten Substitutionsraten der Sequenzen bei den analysierten Taxa zurückgeführt werden (PHILIPPE & ADOUTTE 1998, STILLER & HALL 1999, BUSSE 2003). Aufgrund morphologischer Merkmale kommen die Heterolobosea als nächste Verwandte in Frage, mit denen die Euglenozoa die scheibenförmigen Cristae in den Mitochondrien, die geschlossene Mitose und die intranukleäre Spindel gemeinsam haben (Discicristata). Zu diesem Ergebnis kommt auch eine auf verschiedenen Protein-kodierenden Genen basierende phylogenetische Analyse, wenngleich die Position innerhalb der Eukaryoten weiterhin umstritten bleibt (BALDAUF et al. 2000).

Die bis vor kurzem noch in ihren Grundzügen gültige **Systematik innerhalb der Euglenida** nach LEEDALE (1967) basiert überwiegend auf den Kriterien Begeißelung und Ernährungsmodus. In Tabelle 1.1 sind die sechs Unterordnungen mit ihren charakteristischen Gattungen dargestellt: Die phototrophen und die osmotrophen Euglenida wurden aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der emergenten Geißeln und dem Vorhandensein eines photosensorischen Apparates jeweils in verschiedene Unterordnungen sortiert (**Euglenina**, **Eutreptiina** und **Rhabdomonadina**). Die phagotrophen Spezies wurden aufgrund von einfachen oder komplexen Ingestionsapparaten in zwei Ordnungen (**Sphenomonadina** und **Heteronematina**) unterteilt. Zu den **Euglenamorphina** zählen zwei Gattungen, deren Gemeinsamkeit das Vorhandensein von drei oder mehr Geißeln ist, sowie eine möglicherweise endozoisch-parasitische Lebensweise in Kaulquappen (BRUMPT & LAVIER 1924).

UNTERORDNUNGEN (ICZN)	MERKMALE	GATTUNGEN
EUGLENINA	Phototrophie & Osmotrophie Nur dorsale Geißel emergent, Stigma & PAB Zellen metabol bis rigide, teilweise mit Loricacae Paramylon vorhanden, oft sehr zahlreich und charakteristisch für die Art	<i>Ascoglena</i> , <i>Astasia</i> , <i>Colacium</i> , <i>Cyclidiopsis</i> , <i>Euglena</i> , <i>Euglenopsis</i> , <i>Hyalophacus</i> , <i>Khawkinaea</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Lepocinclis</i> , <i>Phacus</i> , <i>Trachelomonas</i> , <i>Strombomonas</i>
EUTREPTIINA	Phototrophie & Osmotrophie Beide Geißeln emergent, Zellen metabol Paramylon vorhanden	<i>Eutreptia</i> , <i>Eutreptiella</i> , <i>Distigma</i> , <i>Distigmopsis</i>
RHABDOMONADINA	Osmotrophie Nur dorsale Geißel emergent, Zellen rigide Paramylon vorhanden	<i>Gyropaigne</i> , <i>Menoidium</i> , <i>Parmidium</i> , <i>Rhabdomonas</i> , <i>Rhabdospira</i>
SPHENOMONADINA	Phagotrophie Ingestionsapparat nicht deutlich sichtbar Dorsale Geißel emergent, ventrale (wenn vorhanden) emergent Zellen rigide mit ausgeprägten Kielen Paramylon teilweise vorhanden	<i>Anisonema</i> , <i>Atraktomonas</i> , <i>Calycimonas</i> , <i>Notosolenus</i> , <i>Petalomonas</i> , <i>Sphenomonas</i> , <i>Tropidoscyphus</i>
HETERONEMATINA	Phagotrophie Ingestionsapparat deutlich sichtbar Dorsale Geißel emergent, ventrale (wenn vorhanden) emergent Zellen eher metabol (<i>Entosiphon</i> rigide) Paramylon teilweise vorhanden	<i>Dinema</i> , <i>Entosiphon</i> , <i>Heteronema</i> , <i>Peranema</i> , <i>Peranemopsis</i> , <i>Urceolus</i>
EUGLENAMORPHINA	Phototrophie & Osmotrophie mindestens drei Geißeln, Endoparasiten Paramylon nur in <i>Euglenamorphia</i>	<i>Euglenamorphia</i> , <i>Hegneria</i>

Tab. 1.1 Systematik der Euglenida nach LEEDALE (1967). Die Bezeichnungen der Unterordnungen erfolgte nach dem International Code of Zoological Nomenclature (ICZN). **PAB** Paraxonemalkörper. Die Ernährungsweisen der Gattungen sind durch folgenden Farbcode gekennzeichnet: **Phototrophie**, **Osmotrophie**, **Phagotrophie**. Das Vorkommen von **Paramylon** nach LEEDALE 1967 ist der Tabelle hinzugefügt, unterstrichene Gattungen besitzen nach LEEDALE 1967 vermutlich kein Paramylon (siehe auch Kapitel 1.4 und Tabelle 1.2).

Die Taxonomie von LEEDALE weist allerdings einige Unstimmigkeiten auf, so dass sie mit zunehmenden Kenntnissen über die Ultrastruktur der Euglenida und vor allem seit dem Einbezug der molekularen Phylogenie immer wieder Veränderungen unterworfen wurde (FARMER 1988, DAWSON & WALNE 1994, PREISFELD et al. 2001, BUSSE & PREISFELD 2003a, BUSSE et al. 2003, MARIN et al. 2003). Aufgrund aktueller Analysen lassen sich in der Stammesgeschichte der Euglenida folgende Entwicklungslinien erkennen (Abb. 1.7):

An der bisher noch unaufgelösten Basis des Stammbaumes aller Euglenida stehen phagotrophe Gattungen wie *Entosiphon*, *Ploeotia*, *Notosolenus* und *Petalomonas*, die bisher zwei verschiedenen Unterordnungen (Sphenomonadina und Heteronematina) angehörten. Sie besitzen eine rigide Pellikula mit wenigen longitudinalen Streifen und sind mit ihren sehr unterschiedlich gestalteten Ingestionsapparaten zur Aufnahme von partikulärer Nahrung in der Lage (LEANDER et al. 2001, BUSSE 2003). Über die Fähigkeit zur Paramylon-Synthese existieren bei den Gattungen *Entosiphon*, *Ploeotia*, *Notosolenus* und *Petalomonas* sehr widersprüchliche Angaben (HUBER-PESTALOZZI 1955, LEEDALE 1967, FARMER 1988, LEANDER et al. 2001, siehe auch Kapitel 1.4 und Tabelle 1.2). Alle anderen bisher untersuchten Eugleniden zeigen sich in den Analysen (Abb. 1.7) als Monophylum, an dessen Basis sich weitere phagotrophe Spezies der Gattungen *Peranema*, *Dinema* und *Anisonema* finden. Deren Grundmustervertreter besaß vermutlich eine flexible Pellikula mit vielen helikal angeordneten

Streifen und einen Ingestionsapparat aus zwei mikrotubulären Stäben und vier Segeln (BUSSE et al. 2003). Außerdem kommen bei allen bisher untersuchten Vertretern dieser Gattungen sowie in allen davon abgeleiteten Spezies charakteristische Polysaccharid-Granula (Paramylon) vor. Die sehr einheitlich gebauten Ingestionsapparate dieser Arten befähigen sie sowohl zur Myzocytose (dem „Ausaugen“ von Zellen) als auch zur Aufnahme ganzer Zellen (LEANDER et al. 2001). Damit sind die Vorfahren dieser phagotrophen Arten die geeigneten Organismen für das Ereignis der sekundären Endocytobiose, die zur Etablierung der Chloroplasten mit drei Hüllmembranen führte. Dass diese Endocytobiose innerhalb der Euglenida ein einmaliges Ereignis gewesen ist, wird durch die Monophylie der Phototrophen (inklusive der beiden Gattungen *Eutreptia* und *Eutreptiella* aus der Unterordnung Eutreptiina LEEDALE) gemeinsam mit den durch Plastidenreduktion sekundär osmotrophen Spezies sichtbar (Abb. 1.7, GIBBS 1978, MARIN et al. 2003). Durch die Einrichtung der neuen Klasse **Euglenea** (Abb. 1.7), die aus den Unterordnungen Euglenina und Eutreptiina (*sensu* BUSSE & PREISFELD 2003a) besteht, werden nun alle phototrophen und sekundär osmotrophen Euglenida in einem Taxon vereint (BUSSE & PREISFELD 2003a).

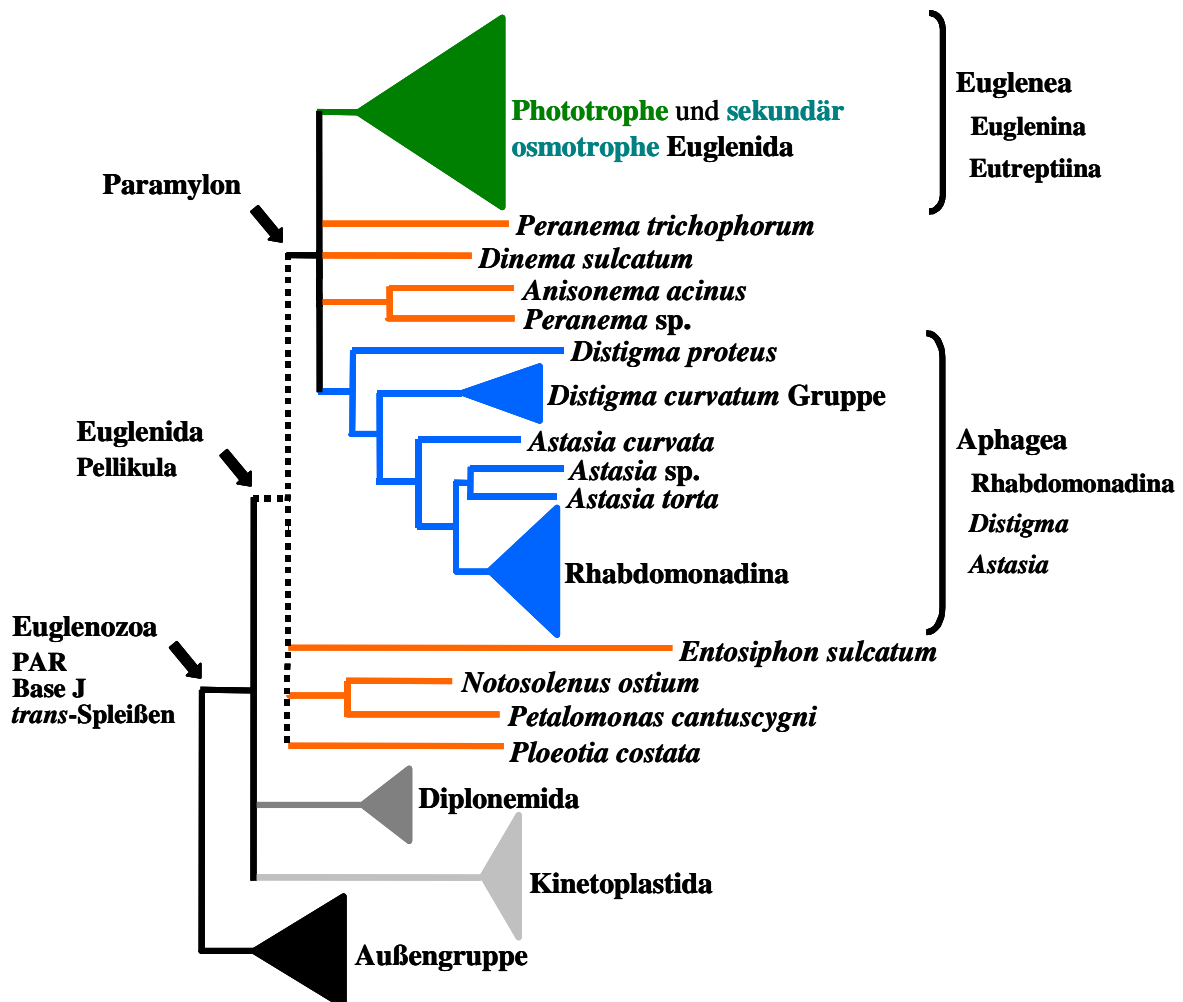


Abb. 1.7 Hypothese zur Stammesgeschichte der Euglenida, verändert nach BUSSE et al. 2003. Halbschematischer Neighbor Joining Stammbaum anhand von SSU rDNA-Daten. Die gestrichelte Linie idealisiert die Monophylie der Euglenida. Die Ernährungsweisen der Gattungen sind durch folgenden Farbcode gekennzeichnet: **Phototrophie**, **Sekundäre Osmotrophie**, **Primäre Osmotrophie**, **Phagotrophie**.

Sowohl die primäre und sekundäre Osmotrophie als auch die Phototrophie sind demnach abgeleitete Zustände in den Entwicklungslinien der Euglenida. Ebenso wie die grünen Spezies erweisen sich auch die primär osmotrophen Arten als monophyletisch und wurden daraufhin in einer neuen Unterklasse **Aphagea** vereint (Abb. 1.7, BUSSE & PREISFELD 2003a). Die Gattung *Astasia* erweist sich dabei eindeutig als paraphyletisch, so dass die erwiesenermaßen sekundär osmotrophe *Astasia longa* (GOCKEL & HACHTEL 2000) in *Euglena longa* umbenannt wurde (BUSSE & PREISFELD 2003a, MARIN et al. 2003), während die anderen bisher untersuchten Astasien zu den Aphagea gehören. Weitere taxonomische Veränderungen aufgrund aktueller SSU rDNA-Daten betreffen vor allem Gattungen und Arten im Monophylum der phototrophen und sekundär osmotrophen Euglenida (Details in MARIN et al. 2003, siehe auch Tabelle 1.2).

Wichtig für diese Arbeit zur Paramylon-Synthese aus *Euglena gracilis* ist die Beobachtung, dass das Vorkommen von Paramylon-Granula für die basalen phagotrophen Gattungen *Entosiphon*, *Ploetia*, *Notosolenus* und *Petalomonas* bisher nicht eindeutig belegt wurde, so dass es sich bei diesem Merkmal offensichtlich nicht um eine Autapomorphie der Euglenida handelt (Abb. 1.7, siehe auch Kapitel 1.4 und Tabelle 1.2).

1.3 VORKOMMEN UND SYNTHESE VON POLYSACCHARIDEN IN PROKARYOTEN UND EUKARYOTEN

Kohlenhydrate sind ubiquitär vorkommende Biomoleküle und stellen die häufigsten organischen Verbindungen auf der Erde dar. Sie werden von photo(auto)trophen Organismen durch Photosynthese gebildet (weltweit im Maßstab von mehr als 180 Billionen Tonnen pro Jahr) und dienen heterotrophen Lebewesen als Energie- und Kohlenstoffquelle.

Grundeinheiten der Kohlenhydrate sind Monosaccharide wie Galactose, Glucose, Fructose, Ribose und Xylose, die enzymatisch in einer Kondensationsreaktion über *O*-glycosidische Bindungen zu Oligosacchariden (zwei bis zehn Monosaccharide) und Polysacchariden verknüpft werden können. Über *N*-glycosidische Bindungen können Kohlenhydrate auch mit dem Stickstoffatom eines Amins verknüpft werden, so dass es zur Bildung von Nukleosid-Phosphaten wie z.B. **UDP-Glucose** (Abb. 1.8) und anderen Glykokonjugaten kommen kann. Je nach Orientierung der Hydroxy-Gruppe am asymmetrischen C1-Atom des Monosaccharids kennt man die alpha- und die beta-Konfiguration, die auch bei der glycosidischen Bindung für die Eigenschaften des Kohlenhydrats eine entscheidende Rolle spielt: alpha-Bindungen führen zu helikalen, beta-Bindungen dagegen zu linearen Polysacchariden. Durch glycosidische Bindungen zwischen dem C1-Atom des einen Monomers und dem C1- bzw. C2-Atom des anderen Monomers geht das reduzierende Ende eines Kohlenhydrates verloren. Im Gegensatz zu Proteinen und Polynukleotiden kann es bei Kohlenhydraten auch zu Verzweigungen innerhalb eines Moleküls kommen, wenn mehr als ein glycosidischer Bindungstyp vorliegt. Dabei nimmt die Löslichkeit der Polymere in Wasser oder anderen Lösungsmitteln mit zunehmendem Polymerisationsgrad ab (BERG et al. 2003).

Aufgrund der zahlreichen freien und reaktionsfähigen Hydroxy-Gruppen der Monosaccharide sind unzählige Bindungsvariationen, Verzweigungen und Derivatisierungen mit Molekülen anderer Stoffklassen möglich. Dementsprechend lassen sich Kohlenhydrate auch in vielfältigen funktionellen Zusammenhängen finden: Ribose und Desoxyribose sind als Komponenten der Nukleosid-Phosphate nicht nur Bestandteile der Polynukleotide DNA und RNA sondern auch des physiologisch essentiellen Energieträgers ATP, einem phosphorylierten Zuckerderivat. Das in der Natur am häufigsten vorkommende Monosaccharid Glucose ist - meist in seiner phosphorylierten oder durch Nukleosid-Phosphate aktivierten Form (Abb. 1.8) - ein zentrales Molekül in vielen assimilatorischen und dissimilatorischen Stoffwechselwegen, die nicht nur den Energiehaushalt der Zellen betreffen, sondern auch die Synthese von Biomolekülen anderer Stoffklassen. Auf der extraplasmatischen Seite der Cytoplasmamembranen sind Kohlenhydrate in Form von Glykokonjugaten (Glycolipide und Glycoproteine) die Grundlage für Zelladhäsion und Zell-Zell-Kommunikation sowie als Antikörper (Immunglobuline) Teil der Immunabwehr.

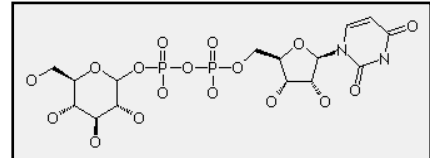


Abb. 1.8 UDP-Glucose (Uridin-5'-diphosphat Glucose), ein häufig verwendetes Substrat für die Polysaccharid-Synthese

Allgemein erfolgt die **Synthese von Sacchariden** durch Bindungstyp-spezifische **Glycosyltransferasen** (EC 2.4.-.-), die in Anwesenheit von divalenten Metallionen aktivierte Monosaccharide mit einer Glycankette oder einem anderen Akzeptormolekül verknüpfen. Man unterscheidet einen inversen Katalysemechanismus, bei dem ein alpha-Nukleosid für die Synthese einer beta-Bindung unter Umkehrung der anomeren Konformation verwendet wird von dem Retentionsmechanismus, bei dem ohne Konformationsänderung eine alpha-Bindung entsteht (SAXENA et al. 1995). Für den enzymatischen **Abbau von Sacchariden** unterscheidet man Endohydrolasen, welche die glycosidischen Bindungen innerhalb des Moleküls hydrolysieren und Exohydrolasen, die jeweils vom nichtreduzierenden Ende der Glycankette Disaccharide abspalten.

Quantitativ die größte Rolle unter den Kohlenhydraten spielen die **Polysaccharide**, die als intrazelluläre Reservekohlenhydrate, als Zellwandmaterial oder als extrazelluläre Matrices mit den unterschiedlichsten Funktionen synthetisiert werden. Im Folgenden sollen für die wichtigsten und häufigsten Polysaccharide in der Natur einige Beispiele gezeigt werden. Dabei sollen im Hinblick auf das lineare beta-1,3-Glucan Paramylon, dem Reservekohlenhydrat der Euglenida, überwiegend **Glucane** betrachtet werden, also Homopolysaccharide aus Glucose-Monomeren mit ihren unterschiedlichen Bindungstypen.

Das intrazelluläre Reservepolysaccharid **Stärke** setzt sich aus alpha-Amylose, einem unverzweigten helikalen **alpha-1,4-Glucan** (Abb. 1.9) und zu 70 bis 90 % aus Amylopektin (Abb. 1.10), einem verzweigten helikalen alpha-1,4-Glucan zusammen und wird von den Viridiplantae innerhalb der Chloroplasten bzw. in Speichergeweben innerhalb der Amyloplasten in Form von Granula gespeichert. Während die wasserlösliche Amylose aus ca. 1000 Glucose-Monomeren besteht und für den charakteristischen Stärke-Nachweis durch Jod-Färbung verantwortlich ist, kann das wasserunlösliche Amylopektin aus durchschnittlich 10 000 bis 100 000 Glucosemolekülen mit einer Länge von 200 bis 400 nm bestehen, wobei die kurzen Einzelstränge nur etwa 20 Glucose-Monomere umfassen können. Die Gesamtlänge resultiert aus zahlreichen alpha-1,6-glycosidischen Verzweigungen, durch die die kurzen unverzweigten Glucan-Ketten mit den vielfach verzweigten Hauptsträngen verbunden werden.

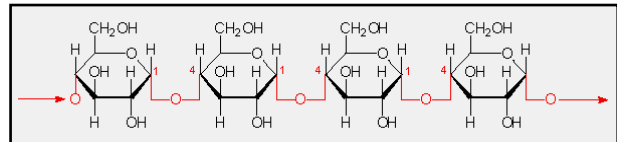


Abb. 1.9 Ausschnitt aus einem **Amylose**-Molekül mit alpha-1,4-glycosidischen Bindungen.

Die Stärke-Granula in den Chloroplasten setzen sich aus abwechselnd kristallinen (Amylopektin) und amorphen (Amylose) radiären Bereichen zusammen. Stärke-Granula enthalten meistens auch einen geringen Proteinanteil, da die synthetisierenden Enzyme teilweise von den wachsenden Polysaccharidketten mit eingebunden werden (MARTIN & SMITH 1995, PREISS & SIVAK 1998). Das Substrat für die Stärke-Synthese ist das energiereiche Zuckernukleotid ADP-Glucose, welches von einer Granula-gebundenen oder löslichen Synthase mit dem nicht-reduzierenden Ende des wachsenden alpha-1,4-Glucans verknüpft wird. Die alpha-1,6-glycosidischen Bindungen werden durch sogenannte Verzweigungsenzyme eingefügt, die einen alpha-1,4-Glucan-Strang herausschneiden und mit dem reduzierenden Ende über das C6-Atom wieder mit der Kette verbinden (MARTIN & SMITH 1995).

Die Rhodophyta, deren Chloroplasten wie bei den der Chlorophyta aus einer primären Endocytobiose stammen, speichern ihre Amylopektin-ähnliche **Florideenstärke** außerhalb der Plastiden (Palmer 2003). Bei den Cryptomonaden, die ihre Plastiden aus einer sekundären Endocytobiose mit Rotalgen erhalten haben, werden die Stärke-Granula zwischen den inneren und äußeren Membranen der Chloroplasten abgelagert, d.h. im Cytoplasma des Endocytobionten (MCFADDEN et al. 1997). Obwohl es innerhalb der Dinoflagellaten mehrere unabhängige sekundäre Endocytobiosen gegeben haben muss - und zwar sowohl aus den Chloro- als auch aus den Rhodophyceae - (DELWICHE 1999), wird auch hier die Stärke immer außerhalb der Chloroplasten abgelagert (VOGEL & MEEUSE 1968).

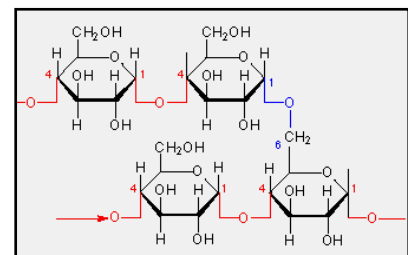


Abb. 1.10 Ausschnitt aus einem alpha-1,6-glycosidisch verzweigten alpha-1,4-Glucan (**Amylopektin, Glycogen**).

Das Reservekohlenhydrat **Glycogen**, ebenfalls ein alpha-1,4-Glucan mit alpha-1,6-glycosidischen Verzweigungen (Abb. 1.10) ist bei Tieren, Pilzen, Protozoa und Bakterien, aber auch bei einigen Algen und Höheren Pflanzen zu finden. Die Moleküle sind stärker verzweigt und mit kürzeren Seitenketten versehen als bei dem Amylopektin der Stärke. Glycogen ist wasserlöslich und kann aufgrund der zahlreichen nicht reduzierenden Enden sehr schnell hydrolysiert und verfügbar gemacht werden. Ebenso wie bei der Stärke sind auch beim Glycogen die synthetisierende Enzyme mit den Polysacchariden assoziiert (MARECHAL & GOLDEMBERG 1964, MARTIN & SMITH 1995).

Das wohl bekannteste und quantitativ häufigste Zellwandpolysaccharid ist das unverzweigte **beta-1,4-Glucan Cellulose** (Abb. 1.11), das nicht nur bei Höheren Pflanzen (20 bis 30 % der Trockenmasse der Zellwand) und Algen, sondern auch bei Pilzen, *Dictyostelium discoideum* und den Tunicata (Manteltiere) vorkommt. Als Exopolysaccharid wird Cellulose ebenfalls von einigen Proteobakterien (*Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Rhizobium*) in das umgebende Medium ausgeschieden.

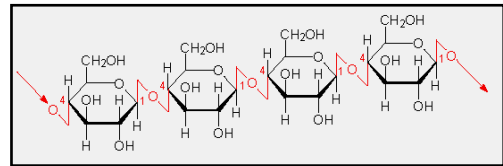


Abb. 1.11 Ausschnitt aus einem **Cellulose**-Molekül mit beta-1,4-glycosidischen Bindungen.

Bis heute ist es nicht gelungen, das katalytische Enzym zu isolieren, obwohl *Acetobacter xylinum* seit den 50er Jahren der Modell-Organismus für die Cellulose-Synthese-Forschung ist und schon zahlreiche Untersuchungen zur Cellulose-Synthese vorliegen (DELMER 1999, SAXENA & BROWN 2000, DOBLIN et al. 2002). Selbst aus den Samenfasern der Baumwolle (*Gossypium hirsutum*), wo die Cellulose in nahezu reiner Form vorliegt, konnte das Enzym noch nicht isoliert werden. Aus diesem Grund sind die meisten Informationen, die man über Struktur und Funktion der Cellulose-Synthasen besitzt, überwiegend aus Sequenzdaten abgeleitet.

Die Cellulose-Synthase-Multienzymkomplexe sind bei Algen und *Acetobacter xylinum* in hochgeordneter linearer Anordnung und bei Höheren Pflanzen in hexagonalen Rosetten (> 500 kDa) in der Cytoplasmamembran am Ende der Cellulose-Mikrofibrillen lokalisiert (terminal complex, TC). Während der Polymerisation der UDP-Glucose (Abb. 1.8) an das beta-1,4-Glucan im Cytoplasma wird die wachsende Fibrille durch die Membran nach außen geschoben. Ein Modell für die Topologie eines Cellulose-Synthase-Proteins ist in Abbildung 1.12 dargestellt. Nachdem in *Acetobacter xylinum* ein 83 kDa Protein als substratbindende Untereinheit identifiziert und das zugehörige Gen (*AxCeSA*) inklusive Operon isoliert werden konnte (SAXENA et al. 1990, WONG et al. 1990), fand man darin auch ein Gen, welches nur für die Kristallisation der Fibrillen verantwortlich ist (*AxCeSD*). Daraus wurde geschlossen, dass die Polymerisation der Glucose-Monomere und die Kristallisation mit sehr kurzem zeitlichem Abstand stattfinden, wenn beide Enzyme in einem Multienzym-Komplex lokalisiert sind. Ein entsprechendes Gen konnte in den sequenzierten Genomen der Höheren Pflanzen bisher nicht identifiziert werden (DELMER 1999).

Alle bisher in den verschiedenen Organismengruppen gefundenen Cellulose-Synthase-Sequenzen besitzen jedoch eine sehr ähnliche Domänen-Struktur, acht transmembrane Helices sowie ein hochkonserviertes Aminosäuren-Motiv (D, D, D und QXXRW), welches für die Substratbindung und die Katalyse verantwortlich ist (Abb. 1.12, SAXENA & BROWN 1997, DELMER 1999). Für die Termination der Synthese, d.h. den Fibrillenabbruch könnten Cellulasen verantwortlich sein, die entweder in der Cytoplasmamembran oder bei Bakterien auch im periplasmatischen Raum lokalisiert sein können.

Die 3.5 nm dicken Elementarfibrillen der Cellulose interagieren über zahlreiche intra- und interfibrilläre van-

der-Waals Kräfte sowie Wasserstoffbrücken miteinander, so dass ein außerordentlich kristallines Material entsteht (KISS et al. 1987, DELMER 1999). Gegenüber den langen Cellulose-Fibrillen bei Algen (einige Ulvophyceae, Bangiophyceae und Xanthophyceae) aus bis zu 1000 Glucan-Molekülen bilden Höhere Pflanzen deutlich kleinere Fibrillen aus etwa 36 primären beta-1,4-Molekülen. Für die hochgeordnete Schichtung der Cellulose-Fibrillen in den Zellwänden wird die Unterstützung eines mikrotubulären Netzwerkes vermutet, welches die Synthase-Komplexe gleich durch die Membran leitet (DELMER 1999, DOBLIN et al. 2002).

Eines der größten Probleme bei den Versuchen zur Isolierung der Cellulose-Synthase bei Höheren Pflanzen bereitete die durch die mechanischen Einwirkungen gleichzeitig aktivierte Synthese von **Callose**. Dieses beta-1,6-glycosidisch verzweigte **beta-1,3-Glucan** (Abb. 1.13) wird von den pflanzlichen Zellen bei Verwundungen und Infektionen, aber auch zur Auskleidung von Plasmodesmenkanälen und Siebzellen sowie bei der Primärwand-Bildung verwendet. Ob es sich bei der Cellulose-Synthase und der Callose-Synthase um zwei verschiedene Enzyme bzw. Enzym-Komplexe in der Cytoplasmamembran handelt, oder ob eine Synthase in Abhängigkeit von den zellulären Bedingungen aus UDP-Glucose (Abb. 1.8) entweder den einen oder den anderen Bindungstyp zwischen den Glucose-Monomeren katalysieren kann, ist noch nicht abschließend geklärt. Letzteres wird u.a. durch einen möglichen Regulationsmechanismus unterstützt, der sich aus der Mg^{2+} -Abhängigkeit der Cellulose-Synthase ergibt, während die Callose-Synthase Ca^{2+} -Ionen benötigt (DELMER 1999). Für die erste Hypothese könnten die in Höheren Pflanzen gefundenen Cellulose-Synthase-ähnlichen Gene (*cs1*) einen Anhaltspunkt bieten. Außerdem wurden Glucan-Synthase-Gene in der Baumwolle (*Gossypium hirsutum*, *cfl1*) und in *Arabidopsis thaliana* (*calS*) identifiziert, die für etwa 200 kDa große Proteine kodieren. Diese Gene weisen Ähnlichkeiten zu den beta-1,3-

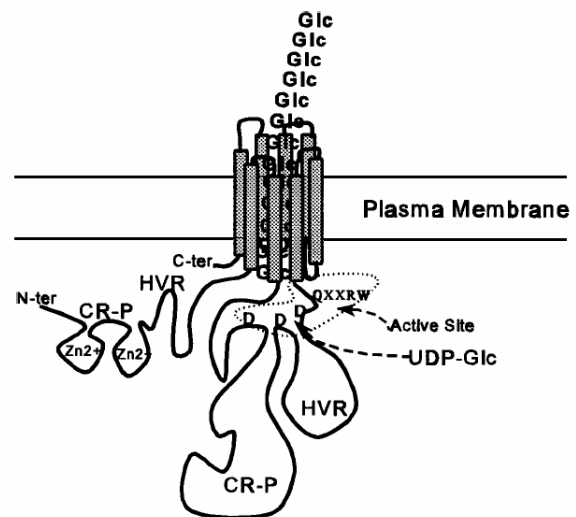


Abb. 1.12 Hypothetisches Modell der Membrantopologie einer **Cellulose-Synthase** (CesA-Protein) in der Plasmamembran von Höheren Pflanzen nach DELMER (1999). Acht transmembrane Helices formen eine Pore, durch die die Cellulose-Fibrille in die Zellwand sekretiert wird. Das katalytische Zentrum mit den drei konservierten Asparaginsäuren (**D**) sowie dem **QXXRW**-Motiv ist im Cytoplasma lokalisiert. Die konservierten (**CR-P**) und hypervariablen (**HVR**) Regionen sind Pflanzen-spezifisch und kommen bei bakteriellen Cellulose-Synthasen nicht vor.

Glucan-Synthase-Genen der Hefen (*fks1*, s.u.) auf, entsprechen aber nicht der Domänen-Struktur der Cellulose-Synthase-Gene (CUI et al. 2001, HONG et al. 2001a). Auf Proteinebene werden die mit der Callose-Synthase-Aktivität korrelierten Proteine in Photoaffinitäts-Markierungs-Experimenten mit 52 kDa bei *Gossypium hirsutum* und mit 55 und 70 kDa bei der Erbse (*Pisum sativum*) angegeben (DELMER et al. 1991, DHUGGA & RAY 1994). KUDLICKA & BROWN (1997) konnten enzymatisch aktive Cellulose- und Callose-Synthase-Komplexe in der nativen Gelelektrophorese unterscheiden. An den im nativen Gel synthetisierten Cellulose-Fibrillen wurden rosettenförmige Partikel, an den Callose-Fibrillen dagegen einzelne Untereinheiten gefunden. Diese Beobachtung spricht ebenfalls eher für die Existenz von zwei unterschiedlichen Enzym-Komplexen. Neben der *in vivo*-Lokalisation der Callose-Synthase-Komplexe in der Plasmamembran wurde bei *Zea mays* auch eine in der Golgi-Membran lokalisierte Synthase (*ZmCesA5*) gezeigt, die sowohl (1,3)(1,4)-beta-D-Glucane als auch Callose synthetisiert (GIBEAUT & CARPITA 1993, DOBLIN et al. 2002). Im ER-Golgi-Membrankomplex findet zudem die Synthese der Zellwand-Matrix-Polysaccharide sowie das Zusammenfügen der Synthase-Komplexe statt (HAIGLER & BROWN 1986, DOBLIN et al. 2002).

In den Zellwänden von Hefepilzen (*Saccharomyces*, *Candida*, *Schizosaccharomyces*) stellen **beta-1,3-Glucane** (Abb. 1.13) mit einigen beta-1,6-glycosidischen Bindungen eine der Hauptkomponenten dar. Das „**Yeast-Glucan**“ wird von einer in der Plasmamembran lokalisierten Synthase aus dem Substrat UDP-Glucose gebildet. Das Enzym benötigt im Gegensatz zu den meisten Glucan-Synthasen weder Lipid-gebundenes Intermediat noch Metallionen für die Katalyse und synthetisiert auf der cytoplasmatischen Seite der Membran relativ kurze Polysaccharide mit 60 bis 80 Monomeren (SHEMATEK et al. 1980). Die beta-1,3-Glucan-Synthase aus *Saccharomyces cerevisiae* ist ebenfalls Bestandteil eines großen Multienzym-Komplexes. Die beiden homologen Gene *fks1* und *fks2* kodieren für 215 kDa bzw. 217 kDa große integrale Membranproteine, die aufgrund ihrer Membrantopologie geeignete Kandidaten für eine transmembrane Synthese von Zellwandmaterial sind. Interessanterweise wird das FKS2-Protein durch Calcium-Ionen induziert und ähnelt damit und mit den schon erwähnten Sequenzübereinstimmungen den Callose-Synthasen aus Höheren Pflanzen (MAZUR et al. 1995).

Neben der Cellulose synthetisieren einige alpha-Proteobakterien wie z.B. *Agrobacterium* sp. ebenfalls ein lineares **beta-1,3-Glucan** (Abb. 1.13). Das als **Curdlan** bezeichnete Polysaccharid wird wie die Cellulose in Form von feinen Fibrillen in das umgebende Medium ausgeschieden. Das mutmaßliche Curdlan-Synthase-Gen (*crdS*) aus *Agrobacterium* sp. kodiert für ein 59 kDa (540 aa) großes Protein mit vier transmembranen Helices, die für eine mögliche Verankerung in der Cytoplasmamembran mit einer großen cytoplasmatischen Domäne in der Mitte des Enzyms sprechen. Interessanterweise weist die Sequenz inklusive eines D,D,D QXXRW-Motives höhere Ähnlichkeiten zu den Cellulose-Synthasen auf als zu beta-1,3-Glucan-Synthasen aus Pilzen und Höheren Pflanzen. Diese Beobachtung spricht für eine konvergente Evolution der beta-1,3-Glucan-Synthasen aus Prokaryoten und Eukaryoten (STASINOPOULOS et al. 1999).

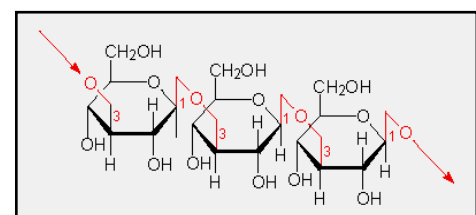


Abb.1 .13 Ausschnitt aus einem beta-1,3-Glucan

Die Cellulose-Synthasen (EC 2.4.1.12) sind zusammen mit den Chitin-Synthasen (EC 2.1.4., beta-1,4-N-Acetylglucosamin) und den bakteriellen beta-1,3-Glucan-Synthasen (z.B. der Curdlan-Synthase) in der **Glycosyltransferase Familie 2** zusammengefasst worden. Die beta-1,3-Glucan-Synthasen (EC 2.4.1.34) der Pilze und Höheren Pflanzen sind dagegen in der **Glycosyltransferase Familie 48** zu finden. Stärke- und Glycogen-Synthasen (EC 2.4.1.21 und EC 2.4.1.11) gehören zur **Glycosyltransferase Familie 5** (COUTINHO & HENRISSAT 1999).

Glycosyltransferasen bilden demnach eine große Gruppe von Enzymen mit sehr unterschiedlichen Aufgaben. Sie sind beteiligt an der Biosynthese von Oligo- und Polysacchariden mit Funktionen für Struktur und Reserve bis hin zu spezifischer Signal-Exposition. Prinzipiell transferieren Glycosyltransferasen Zuckerreste von einem aktivierten Donor, meist einem Nukleotidzucker, auf einen Akzeptor unterschiedlichster Ausprägung: Neben Lipiden, Nukleinsäuren und Proteinen können auch Oligo- oder Polysaccharide die Akzeptoren sein. Die sehr diversen Glycosyltransferasen werden in nur zwei strukturellen Superfamilien zusammengefasst. Diese unterscheiden sich aufgrund ihrer Faltungsart, dem aktiven Zentrum und den Reaktionsmechanismen und präsentieren somit zwei verschiedene Lösungsstrategien zum Transport von Glycosylresten (HU & WALKER 2002). Je nach dem Zuckertyp, den sie übertragen, ihren Sequenzeigenschaften sowie der Stereochemie von Donor und Akzeptor teilt man sie weiterhin in verschiedene Familien ein. Galactose- oder Glucose-übertragende Enzyme werden entsprechend als Galactosyl-, bzw. Glucosyltransferasen bezeichnet (CAMPBELL et al. 1997). Insgesamt ergeben sich somit 62 Familien der „Carbohydrate Active Enzymes“, die auf dem CAZy-Server (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>) geführt werden (BRETON et al. 2001, BRETON et al. 2002, HU & WALKER 2002).

Zahlreiche Glycosyltransferasen sind in eukaryotischen Zellen in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates inseriert und synthetisieren in dessen Lumen die Oligosaccharidanteile von Glycolipiden, Proteoglycanen, Polysacchariden und Glycoproteinen. Bis auf ein konserviertes DXD-Aminosäuremotiv (Aspartat - beliebige Aminosäure - Aspartat) für die Bindung von divalenten Kationen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} und Mn^{2+} besitzen die zahlreichen, für ihre unterschiedlichen Substrate hochspezifischen Glycosyltransferasen nur wenig Sequenz-Übereinstimmungen. Bei gleichen Glycosyltransferasen aus verschiedenen Spezies finden sich dagegen durchaus Sequenz-Ähnlichkeiten (PAULSON & COLLEY 1989, LUBAS et al. 1997, BRETON et al. 1998, BOEGGEMAN & QASBA 2002).

Diese Glycosyltransferasen gehören zu den Typ II-Transmembran-Proteinen mit einer kurzen N-terminalen cytoplasmatischen Domäne, einer Transmembran-Domäne, einer Stammregion, sowie einer relativ großen globulären katalytischen Domäne mit dem DXD-Motiv im nicht-cytoplasmatischen Lumen (BRETON et al. 2001).

Über die Enzyme der von einigen Algengruppen gebildeten beta-1,6-glycosidisch verzweigten beta-1,3-Glucane sind noch keine Sequenzdaten bekannt, die eine Einordnung in die Glycosyltransferase-Familien ermöglichen. Die Reservepolysaccharide der Heterokontophyta (u.a. Phaeophyta, Diatomeen, Chrysophyta) werden in wasserlöslicher Form in Vakuolen im Cytoplasma gespeichert. Während das **Laminarin** neben den Glucose-Monomeren auch Mannose-Monomere enthält, ist das **Chrysolaminarin** ein reines Homoglucan aus Glucose-Molekülen (CRAIGIE 1974, STONE & CLARKE 1992). Chrysolaminarin wird auch als **Chryose** (WALNE et al. 1986) oder **Leucosin** (ARCHIBALD et al. 1963) bezeichnet. Für Diatomeen konnte gezeigt werden, dass die Biosynthese des Chrysolaminarins aus dem Substrat UDP-Glucose durch eine nicht näher charakterisierte und lokalisierte beta-1,3-Glucan-Synthase erfolgt (ROESSLER 1987).

Die Chlorarachniophyta synthetisieren neben verschiedenen Homo- und Heteroglucanen ebenfalls ein wasserlösliches beta-1,3-Glucan als Reservekohlenhydrat, das in membranumschlossenen Vakuolen im Cytoplasma und häufig als Kappen an den Pyrenoiden vorliegt (MCFADDEN et al. 1997).

Pavlova mesolychnon und *P. lutheri* (Haptophyta) schließlich speichern ebenso wie die Euglenida ein lineares, wasserunlösliches und kristallines **beta-1,3-Glucan** (Abb. 1.13) in Form von zwei großen, durchscheinenden und wie bei den Eugleniden von einer Membran umgebenen Granula. Aufgrund von ersten Analysen schien das Reservekohlenhydrat von *Pavlova* identisch zu den immer extraplastidären Granula von *Euglena gracilis* zu sein (KREGER & VAN DE VEER 1970). Weiterführende Untersuchungen von KISS & TRIEMER (1988) ergeben jedoch eine deutlich andere Ultrastruktur der *Pavlova*-Granula, die aus 22 nm breiten Streifen bzw. Schichten aufgebaut sind, eine geringere Kristallinität aufweisen und sich auch im Röntgenbeugungsbild von Paramylon-Granula unterscheiden lassen.

Die Bezeichnung **Paramylon** wird also weiterhin exklusiv für das Reservekohlenhydrat der Euglenida verwendet. Über dessen Eigenschaften und den aktuellen Kenntnisstand der Paramylon-Synthese soll im folgenden Kapitel berichtet werden.

1.4 DAS RESERVEKOHLENHYDRAT PARAMYLON UND SEINE SYNTHESE

Das Vorkommen von reinem beta-1,3-Glucan in granulärer Form mit der Funktion einer Energie- und Kohlenstoff-Reserve ist, wie im vorhergehenden Kapitel gezeigt wurde, in der Natur nicht weit verbreitet. Da mittlerweile ein wirtschaftliches Interesse an der Gewinnung nachwachsender Rohstoffe besteht und den beta-1,3-Glucanen zahlreiche anwendungsorientierte Funktionen zugesprochen werden, soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die **Eigenschaften des Paramylon im Hinblick auf Verwendung und Wirkung** gegeben werden. Der schon bestehende wirtschaftliche Bedarf für beta-1,3-Glucane wird überwiegend durch Hefe-Glucan aus *Saccharomyces cerevisiae* (beta-1,3/1,6-Glucan) gedeckt. Dort liegt das Polysaccharid als Bestandteil der Zellwände vor und ist demzufolge schwerer zu reinigen als Paramylon.

- Es ist gezeigt worden, dass das Reservekohlenhydrat aus *Euglena gracilis* einen positiven Einfluss auf den Blutzuckerspiegel, die Insulin-Regulation und den Cholesterinspiegel besitzt (BARSANTI et al. 2001).

- Über eine Anregung der Makrophagen-Aktivität (HÄNSEL 1987) konnten eine Stimulierung des Immunsystems sowie hemmende Effekte auf das Wachstum einiger Tumore bewirkt werden (QUESEDA et al. 1976).

- Die sulfatisierten Derivate des Paramylons vermindern die cytopathischen Effekte des „human immunodeficiency virus“ (HIV) und die Expression der HIV-Antigene in menschlichen Blutzellen (KOIZUMI et al. 1993).

- Aus Paramylon hergestellte Matrices eignen sich als Träger von Zellkulturen adhärent wachsender tierischer Zellen, da sie sich nicht wie beispielsweise Gelatine-Matrices im Kulturmedium auflösen. Auch als Wundaufgabe, im Kosmetikbereich und in der Transplantationsmedizin ist eine Verwendung von Paramylon-Matrices vorstellbar (BÄUMER 1998).

Neben den anwendungsorientierten Aspekten ist Paramylon aber auch aus phylogenetischer Sicht und im Hinblick auf seine in der Natur einzigartige Struktur interessant, zumal über die Paramylon-Synthese bisher nicht viel bekannt ist.

Das **Vorkommen von Paramylon** innerhalb des monophyletischen Taxons Euglenozoa (siehe Kapitel 1.2, Abb. 1.7) ist bis heute nicht abschließend geklärt. Bei den Kinetoplastida wurde bisher kein granuläres Reservekohlenhydrat gefunden, vielmehr sind hier Lipidglobuli als Speichersubstanzen bekannt (VICKERMAN 1990). Die diplomemide Gattung *Rhynchopus* (BUSSE & PREISFELD 2002a) enthält dagegen refraktile Granula, welche von HUBER-PESTALOZZI (1955) als Paramylon eingeordnet wurden. Ultrastrukturelle Arbeiten an der marinen Art *Rhynchopus coscinodiscivorus* ergaben jedoch, dass diese Einschlüsse weder von einer Membran umgeben sind noch eine Paramylon-ähnliche Ultrastruktur aufweisen (SCHNEPF 1994). Innerhalb der Euglenida kommt Paramylon bei allen **phototrophen** und allen **primär und sekundär osmotrophen** Spezies vor, auch wenn die Identität eines unverzweigten, wasserunlöslichen beta-1,3-Glucans nur für einzelne Vertreter einiger Gattungen durch enzymatischen Abbau, Röntgenbeugungsanalysen oder ultrastrukturelle Untersuchungen gezeigt ist: *Euglena* (GOTTLIEB 1850, BÜTSCHLI 1906, LEEDALE et al. 1965, MARCHESAULT & DESLANDES 1979, KISS et al. 1987, 1988a, 1988b, KISS & TRIEMER 1988, BÄUMER et al. 2001), *Eutreptia* (KISS et

al. 1987), *Trachelomonas* (SINGH 1956), *Phacus* (LEEDALE et al. 1965), *Astasia* (KREGER & MEEUSE 1952, LEEDALE et al. 1965) und *Khawkinea* (NATH et al. 1960, LEEDALE et al. 1965). Bei den **phagotrophen** Spezies gilt der Besitz von Paramylon nur für *Peranema trichophorum* als erwiesen (ARCHIBALD et al. 1963, VOLLMER 2004). In aktuellen Arbeiten konnten außerdem für *Entosiphon sulcatum* eindeutige Hinweise auf membranumschlossene beta-1,3-Glucane in der Zelle gefunden werden, die Spezies *Ploeotia costata* und *Petalomonas cantuscygni* enthalten dagegen kein Paramylon (VOLLMER 2004). Darüber hinausgehende Angaben für andere Arten beruhen überwiegend auf detaillierten lichtmikroskopischen Untersuchungen. Diese werden durch die auffälligen Lichtbrechungs-Eigenschaften (Anisotropie) und die charakteristischen Formen bzw. Anordnungen der Granula erleichtert, aber bei den phagotrophen Spezies oft durch die Anwesenheit von Nahrungsvakuolen erschwert. Es kann also bis heute nur spekuliert werden, ob das Vorhandensein von Paramylon phylogenetisch mit der Fähigkeit zur phagotrophen Aufnahme von eukaryotischen Zellen bzw. zur Myzocytose gekoppelt ist, wie es für *Peranema* gezeigt werden konnte (TRIEMER 1997). Die Fähigkeit zur Synthese des Reservekohlenhydrates ist offensichtlich nicht als eine Autapomorphie der Euglenida zu bezeichnen (FARMER 1988, LEANDER et al. 2001, BUSSE et al. 2003, vergleiche auch Abb. 1.7). Tabelle 1.2 gibt eine Übersicht der Verbreitung von Paramylon im Zusammenhang mit den jeweiligen Ernährungsweisen der Euglenida:

VORKOMMEN VON PARAMYLON	GATTUNGEN
Paramylon-Granula vorhanden, oft sehr zahlreich und charakteristisch für die Art (Angaben nach HUBER-PESTALOZZI 1955, LEEDALE 1967, FARMER 1988 und LEANDER et al. 2001)	<i>Ascoglena</i> , <i>Colacium</i> , <i>Cryptoglena</i> (emend.), <i>Cyclidiopsis</i> , <i>Euglena</i> (emend., inkl. <i>E. longa</i> Basionym <i>Astasia longa</i>), <i>Euglenopsis</i> , <i>Eutreptia</i> , <i>Eutreptiella</i> (emend., inkl. <i>Tetreutreptia</i>), <i>Khawkinea</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Lepocinclis</i> (emend.), <i>Monomorphina</i> (emend.), <i>Phacus</i> (emend., inkl. <i>Hyalophacus</i>), <i>Trachelomonas</i> (emend.), <i>Strombomonas</i> <i>Astasia</i> , <i>Distigma</i> , <i>Distigmopsis</i> , <i>Gyropaigne</i> , <i>Menoidium</i> , <i>Parmidium</i> , <i>Parvonema</i> (emend.), <i>Rhabdomonas</i> , <i>Rhabdospira</i> E <i>Dinema</i> ^{1a, 2a, 3a, 4a} , <i>Heteronema</i> ^{(1a), 2a} , <i>Jenningsia</i> ^{1a} E, M <i>Peranema</i> ^{1a, 2a, 4a} , <i>Peranemopsis</i> ^{2a} , <i>Sphenomonas</i> ^{(1a), 2a} , E <i>Urceolus</i> ^{1, 2, 3a, 4a}
Paramylon-Granula möglicherweise nicht vorhanden bzw. nicht geklärt	<i>Anisonema</i> ^{1a, 2} , <i>Atraktomonas</i> ² , <i>Calycimonas</i> ² , B <i>Entosiphon</i> ^{1, 2, 3, 4, 5a} , <i>Lentomonas</i> ⁴ , <i>Notosolenus</i> ^{(1a), 2a} , B <i>Petalomonas</i> ^{(1a), 2a, 3, 4} , <i>Tropidoscyphus</i> ^{1, 2} B, (E) <i>Ploeotia</i> ^{1, 3?, 4}

Tab. 1.2 Das Vorkommen von Paramylon bei den Euglenida im Zusammenhang mit den Ernährungsweisen. Die Gruppierung aufgrund der aktuellen Systematik basiert auf BUSSE & PREISFELD 2003a und MARIN et al. 2003 (emend. korrigierte Gattungsbeschreibungen). Die Ernährungsweisen der Gattungen sind durch folgenden Farbcode gekennzeichnet: **Phototrophie**, **Sekundäre Osmotrophie**, **Primäre Osmotrophie**, **Phagotrophie**. ^B Bakteriotrophie, ^E Eukaryotrophie nach FARMER 1988, ^(E) Eukaryotrophie in Kultur nach LINTON & TRIEMER 1999, ^M Myzocytose nach TRIEMER 1997, DELWICHE 1999.

1 keine Paramylon-Granula („lichtbrechende Körnchen im Zellinneren“) nach HUBER-PESTALOZZI 1955, **1a** besitzen Paramylon-Granula („lichtbrechende Körnchen im Zellinneren“) nach HUBER-PESTALOZZI 1955, **2** kein Paramylon nach LEEDALE 1967, **2a** besitzen Paramylon-Granula nach LEEDALE 1967, **3** kein Paramylon nach FARMER 1988, **3a** besitzen Paramylon nach FARMER 1988, **4** keine großen Paramylon-Granula nach LEANDER et al. 2001, **4a** besitzen große Paramylon-Granula nach LEANDER et al. 2001, **5a** membranumschlossenes beta-1,3-Glucan (Immunocytochemie, VOLLMER 2004)

Die **Diversität der Paramylon-Granula** (Abb. 1.14) bei den verschiedenen Spezies und auch innerhalb einer Zelle reicht von kleinen runden oder eiförmigen über unterschiedlich große stabförmige Granula bis hin zu runden oder eiförmigen Ringen mit mehr oder weniger ausgeprägtem Loch in der Mitte des Granulums. Bei den phototrophen Arten werden häufig zusätzlich zu den überall im Cytoplasma gebildeten Körnern im Bereich der Pyrenoide uhrglasförmige Paramylon-Kappen oder sogenannte Paramylon-Zentren bei bandförmigen Chloroplasten gebildet (LEEDALE 1967).

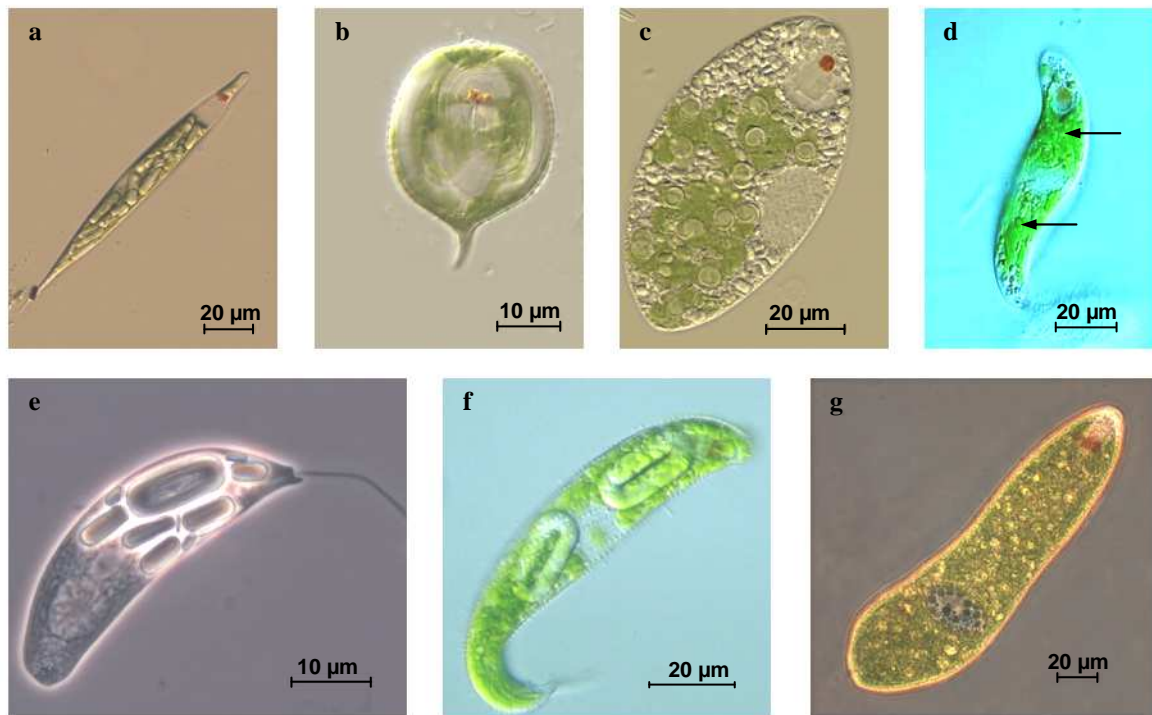


Abb. 1.14 Diversität der Paramylon-Granula. Lichtmikroskopische Aufnahmen verschiedener Euglenida. **a** *Euglena acus* mit stabförmigen Paramylon-Granula **b** *Phacus monilatus* mit zwei großen Paramylon-Ringen **c** *Euglena velata* mit vielen ovalen Paramylon-Granula und uhrglasförmigen Paramylon-Kappen auf den Pyrenoiden der Chloroplasten **d** *Euglena geniculata* mit zwei Paramylon Zentren (Pfeile) **e** *Menoidium* sp. mit kleinen und großen Paramylon-Stäben im anterioren Teil der Zelle **f** *Euglena spirogyra* mit zwei großen ovalen Paramylon-Ringen **g** *Euglena ehrenbergii* mit zahlreichen kleinen Paramylon-Granula. Quellen (d): The Euglenoid Project (<http://bio.rutgers.edu/euglena>), Quelle (f): <http://protist.i.hosei.ac.jp>.

Die Paramylon-Granula von *Euglena gracilis* (siehe auch Abb. 1.15) aus phototropher Kultur sind nach CLARKE & STONE (1960) linsenförmig, 2.6 bis 2.8 μm lang, 1 bis 1.6 μm breit und erscheinen im Lichtmikroskop ebenso wie Stärkekörner lichtbrechend. Bei der phagotrophen *Peranema trichophorum* sind die Granula 3.4 x 2.3 μm groß und können ebenso wie bei *Euglena gracilis* über 50 % des Trockengewichtes der Zellen ausmachen (ARCHIBALD et al. 1963, COOK 1967). Die Größe und die Anzahl der in den Zellen vorhandenen Paramylon-Granula ist jedoch abhängig vom Ernährungszustand und der Zellteilungsphase der Zellen (CLARKE & STONE 1960, MARECHAL & GOLDEMBERG 1964). So kann der **Kohlenhydrat-Gehalt** einer ausreichend mit Glucose, Sauerstoff und Aminosäuren versorgten heterotrophen *Euglena gracilis*-Kultur, der sich überwiegend aus dem in den Zellen enthaltenen Paramylon ergibt, 600 bis 1000 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen erreichen (BÄUMER 1998). Eine phototrophe *Euglena gracilis*-Standard-Kultur weist dagegen in der Belichtungsphase im Durchschnitt 50 bis 100 μg

Kohlenhydrate (Paramylon) /10⁶ Zellen auf (SCHOLTEN-BECK 1992, MIBFELDT 1993), vermutlich weil nur der photosynthetische Überschuss in Form von beta-1,3-Glucan gespeichert wird. In den Dunkelphasen und auch während der Zellteilung nimmt der Paramylon-Gehalt der phototrophen Zellen deutlich ab und unterliegt damit einem für Reservekohlenhydrate typischen Rhythmus (CLARKE & STONE 1960). Bei Nährstoffmangel ist hingegen häufig und vor allem bei den phototrophen Arten eine Zunahme des Paramylon-Gehaltes zu beobachten (BRIAND & CALVAYRAC 1980, SCHOLTEN-BECK 1992, MIBFELDT 1993). Für photoheterotrophe Kulturen von *Euglena gracilis* ist gezeigt worden, dass die Paramylon-Synthese bei gleichzeitiger Versorgung der Zellen mit organischen Kohlenstoffquellen wie Lactat, Succinat, Glutamat, Malat oder Glucose unabhängig vom Licht erfolgt und keine Pyrenoide in den Chloroplasten sichtbar sind (BRIAND & CALVAYRAC 1980, KISS et al. 1986). Hier wird also der osmotrophen Ernährungsweise gegenüber der phototrophen der Vorrang gegeben. Der Paramylon-Gehalt der Zellen wird außerdem von folgenden Faktoren beeinflusst: niedrigere Temperaturen (15 °C) führen bei heterotrophen Zellen zur Bildung von mehr Paramylon, anaerobe Bedingungen dagegen zu einem Abbau (Glycolyse) unter gleichzeitiger Synthese von Wachsestern (KAWABATA et al. 1982, INUI et al. 1992).

Im Dunkeln geschieht der **Paramylon-Abbau** langsamer als im Licht (BARSANTI et al. 2001), weil die Hydrolyse des beta-1,3-Glucans bei heterotrophen Zellen überwiegend zur Energiegewinnung verwendet wird. In phototrophen Zellen dagegen dienen die Glucose-Monomere auch zu etwa 40 % als Kohlenstoffquelle für die Biosynthese von Lipiden und Proteinen vor allem für die Chloroplasten-Entwicklung (DWYER & SMILLIE 1971). Außer durch Licht lässt sich ein Paramylon-Abbau auch durch Ammoniumionen induzieren (SUMIDA et al. 1987). Der enzymatische Abbau des beta-1,3-Glucans erfolgt mit Hilfe verschiedener beta-1,3-Glucanasen: während eine Exohydrolase (beta-1,3-Glucan Glucohydrolase) die Polysaccharide vom Molekül-Ende aus in Monosaccharide abbaut, spaltet die Endohydrolase (beta-1,3-Glucan Glucanohydrolase, beta-1,3-Glucan Phosphorylase) das Molekül in Oligosaccharide, die anschließend durch beta-1,3-Oligoglucan Phosphorylasen und Laminaribiose Phosphorylasen zu Glucose-1-phosphat umgesetzt werden. Sowohl die Endohydrolase-Aktivität als auch eine Saure Phosphatase (Phosphorylierung der freigesetzten Glucose-Monomere) sind direkt an den Granula gefunden worden (SOMMER & BLUM 1965, BARRAS & STONE 1968, CRAIGIE 1974).

Die meisten Untersuchungen zur **Ultrastruktur des Paramylons** stammen aus Spezies der Gattung *Euglena*. Bereits im Jahre 1850 konnte GOTTLIEB die Paramylon-Granula aus Zellen von *Euglena viridis* isolieren und anhand einer negativen Jodjodkalium-Reaktion zeigen, dass es sich hier nicht um Stärke (lat. *amylum*) handelt. Den Namen „Par-amylon“ wählte GOTTLIEB aufgrund der ähnlich aussehenden Granula und einer gleichen, ausschließlich aus Glucose-Monomeren bestehenden Zusammensetzung von Stärke und Paramylon (*par* lat. gleichen, entsprechen), obwohl die sonstigen von ihm überprüften Eigenschaften des Reservekohlenhydrats aus *Euglena viridis* eher der Widerstandsfähigkeit von Cellulose ähneln. Zu demselben Fazit kommen 130 Jahre später die Analysen von MARCHESSAULT & DESLANDES (1979).

So ist Paramylon weder in Wasser noch in Salzlösungen oder verdünnten Säuren löslich. In verdünnter Natronlauge lösen sich die Granula allerdings auf und können durch Neutralisation mit Salzsäure wieder zu einer Gel-artigen Masse ausgefällt werden. Kochen in rauchender Salzsäure führt wie bei Stärke zur Hydrolyse des Paramylons in Glucose-Monomere, ebenso wie ein enzymatischer Abbau mit Laminarase (beta-1,3-Glucan Hydrolase), während ein Abbau mit Amylasen (alpha-1,4-Glucanasen) nicht möglich ist (GOTTLIEB 1850, BÜTSCHLI 1906, GOLDEMBERG & MARECHAL 1963, BÄUMER et al. 2001). Durch partielle Hydrolyse des Polysaccharids erhält man neben Glucose auch Laminaribiose (3-beta-D-Glucosyl-D-Glucose) und Laminaritriose, die beta-1,3-glycosidischen Di- bzw. Trisaccharide der Glucose (CLARKE & STONE 1960, GOLDEMBERG & MARECHAL 1963).

Weitere Untersuchungen, u.a. durch Röntgenbeugungsanalysen ergaben schließlich, dass Paramylon in verschiedenen Euglenida ein lineares und unverzweigtes, hochkristallines und wasserunlösliches Makromolekül aus mehr als 100 beta-1,3-glycosidisch verknüpften Glucose-Einheiten ist (CLARKE & STONE 1960, ARCHIBALD et al. 1963, KISS & TRIEMER 1988, STONE & CLARKE 1992).

Die Paramylon-Granula aus heterotrophen Zellen von *Euglena gracilis* haben eine **Dichte** von 1,53 g/cm³ bis 1,62 g/cm³ (BARBER et al. 1966, MARCHESSAULT & DESLANDES 1979, MIßFELDT 1993). Der **Polymerisationsgrad** von Paramylon (DP, d.h. die durchschnittliche Anzahl der Glucose-Monomere pro Molekül) zeigt mit einem Wert von 50 bis 150, dass die Molekülgröße des Reservekohlenhydrates von *Euglena gracilis* mindestens doppelt so groß ist, wie die von Laminarin (DP 16 bis 21) und Chrysolaminarin (DP 34) aus *Ochromonas malhamensis*, aber deutlich kleiner als Cellulose mit DP-Werten von 600 bis 23 000 oder Curdlan (DP 540), dem beta-1,3-glucosidischen Exopolysaccharid aus *Alcaligenes faecalis* (ARCHIBALD et al. 1963, CRAIGIE 1974, MARCHESSAULT & DESLANDES 1979, DELMER 1999). Die **Kristallinität** von ausgereiften Paramylon-Granula ist mit 88 bis 90 % deutlich höher als die von Curdlan (30 %) und vergleichbar mit der höchsten bisher gefundenen Kristallinität von Cellulose aus der Grünalge *Valonia*. Bei Behandlung der Granula mit Laugen (0.5 M NaOH), die nach ca. 2 Stunden zu deren vollständigen Auflösung führt, geht die hohe Kristallinität verloren. Ebenso weisen noch unreife sowie getrocknete Paramylon-Granula eine geringere Kristallinität und Ordnung auf, was darauf hindeutet, dass auch beim Paramylon der Hydratisierungszustand des Glucans eine entscheidende Rolle für die hohe Kristallinität spielt (KISS et al. 1988b).

Die Paramylon-Granula von *Euglena gracilis* bestehen aus hochgeordneten **Makrofibrillen**, die parallel zur Längsachse des Granulums verlaufen und in ~ 200 Å dicken konzentrischen Schichten angeordnet sind (Abb. 1.15a, c und d, CLARKE & STONE 1960, MARCHESSAULT & DESLANDES 1979). Die Makrofibrillen setzen sich aus jeweils sechs, mindestens 4 nm dicken **Mikrofibrillen** zusammen, die wiederum aus je drei miteinander verdrillten primären beta-1,3-Glucanketten bestehen. Daraus ergibt sich eine typische tripelhelikale-Struktur, wie sie auch für Curdlan, Callose und Laminarin vermutet wird (MARCHESSAULT & DESLANDES 1979, DESLANDES et al. 1980, CHUAH et al. 1983, KISS et al. 1987, 1988b, KISS & TRIEMER 1988). Sowohl die Tripel-Helices als auch die Mikrofibrillen werden durch zahlreiche

Wasserstoffbrücken zusammengehalten. DESLANDES et al. (1980) postulieren, dass ähnlich wie bei der Cellulose-Synthese von *Acetobacter xylinum*, die Bildung der Tripel-Helices schon während bzw. kurz nach der Biosynthese geschehen muss. Die Abbildung 1.15 zeigt die Modelle zur Anordnung der Fibrillen, aus denen sich die Granula zusammensetzen, sowie eine elektronenmikroskopische Aufnahme im Negativkontrast-Verfahren eines Granulums aus *Euglena gracilis*, welches sich gut mit den Modellen in Einklang bringen lässt. Deutlich zu erkennen sind die keilförmigen und rechteckigen Segmente sowie die einzelnen Fibrillen (1.15c und 1.15d).

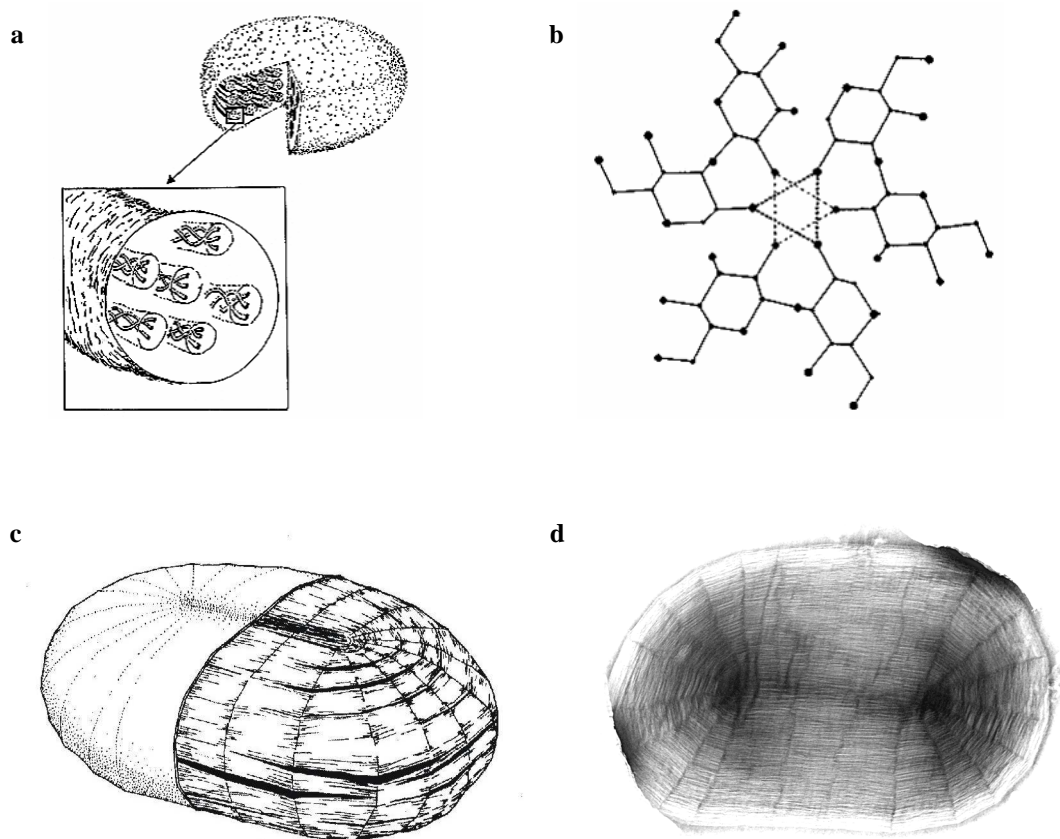


Abb. 1.15 Modelle zur **Ultrastruktur der Paramylon-Granula** aus *Euglena gracilis* im Vergleich mit einer elektronenmikroskopischen Aufnahme eines Granulums im Negativkontrastverfahren. **a** Tripel-Helikale Struktur der 4 nm dicken Mikrofibrillen aus drei primären beta-1,3-Glucan-Molekülen innerhalb der Makrofibrillen (MARCHESSAULT & DESLANDES 1979) **b** Projektion der Tripel-Helix in der Ebene mit den intrahelikalen Wasserstoffbrücken am Beispiel von Curdlan (DESLANDES et al. 1980) **c** Paramylon-Granulum mit umgebender Membran sowie Segmentierung (KISS et al. 1987) **d** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines negativkontrastierten Paramylon-Granulums aus *Euglena gracilis* (KAHMANN).

Über den Ursprung der das Granulum umhüllenden, 6 nm dicken einfachen **Membran** (Abb. 1.15c) gibt es bisher noch keine gesicherten Erkenntnisse (KISS et al. 1987). NATH et al. (1960) vermuten eine Umwandlung von Lipid-Vesikeln in Paramylon-Granula bei der sekundär osmotrophen *Khawkinea quartana* und MALKOFF & BUETOW (1964) postulieren das Endoplasmatische Retikulum als Ort der Paramylon-Synthese bei *Euglena gracilis* var. *bacillaris*. Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen von BRIAND & CALVAYRAC (1980)

geht hervor, dass bei heterotrophen *Euglena gracilis*-Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, ein Zusammenhang zwischen blasenförmigen Vesikelbildungen der Mitochondrien-Membranen und den Paramylon-Granula-Membranen besteht. Die in den phototrophen Spezies der Euglenida häufig mit den Pyrenoiden assoziierten Granula (Paramylon-Kappen oder Paramylon-Zentren) liegen immer außerhalb der Chloroplasten und auch die umgebende Membran hat keine Verbindung zu einer der drei Hüllmembranen der Plastiden. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass die Paramylon-Synthese nur deshalb in räumlicher Nähe der Chloroplasten stattfindet, da hier die Orte der photosynthetischen Kohlenstoff-Fixierung bzw. der Synthese von Glucose, dem Grundbaustein des Paramylons sind.

Nach Untersuchungen von MARECHAL & GOLDEMBERG (1964), TOMOS & NORTHCOTE (1978) und KISS et al. (1988a) mit solubilisierten enzymhaltigen Rohextrakten ist UDP-alpha-Glucose (Abb. 1.8) bei *Euglena gracilis* das Substrat für die **Paramylon-Synthese**. ADP-Glucose, dADP-Glucose, TDP-Glucose und UDP-beta-Glucose werden dagegen nicht umgesetzt. Die Einbaurate der UDP-Glucose in das beta-1,3-Glucan kann beispielsweise durch Laminaribiose, Spermidin und fibrilläres Paramylon erhöht werden, während sie durch UDP, diverse Salze und Phosphoenolpyruvat gehemmt wird (MARECHAL & GOLDEMBERG 1964, BÄUMER et al. 2001). Der gereinigte Paramylon-Synthase-Enzymkomplex arbeitet Calcium-abhängig (optimal sind 1 mM CaCl₂) und wird von MgSO₄ in seiner Aktivität gehemmt (BÄUMER et al. 2001). Das Substrat UDP-alpha-Glucose wird über einen inversen Katalysemechanismus von einer beta-1,3-Glucosyltransferase (**UDP-Glucose: 1,3-beta-D-Glucan 3-beta-D-Glucosyltransferase, EC 2.4.1.34, Paramylon-Synthase**) unter Abspaltung von Uridin und Phosphat zu einer primären beta-1,3-Glucankette verknüpft. Da die Synthese auch in Anwesenheit einer beta-1,3-Glucanase stattfindet, kommt kein Kohlenhydrat als Startmolekül für die Katalyse in Frage, wie es bei der Synthese von anderen Polysacchariden häufig der Fall ist (MARECHAL & GOLDEMBERG 1964). TOMOS & NORTHCOTE (1978) konnten aber ein mit Trichloressigsäure fällbares Protein als mögliches Startermolekül identifizieren, das vermutlich über eine alkali-labile Pyrophosphat-Bindung mit dem Glucan verbunden ist.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Ultrastruktur von Paramylon und Cellulose spekulierten KISS et al. bereits 1987 über eine möglicherweise ebenfalls in einem Membran-Enzym-Komplex lokalisierte Paramylon-Synthase und konnten daraufhin kleinere (5.6 bis 6.5 nm) und größere (9.6 bis 10.3 nm) transmembrane Partikel (IMP) in der Granula-Membran zeigen (KISS et al. 1988a). Während einer induzierten Paramylon-Synthese wurde eine Abnahme der größeren und eine Zunahme der kleineren Protein-Komplexe beobachtet, so dass diese Partikel entweder eine Funktion in der Biosynthese oder aber in Transportprozessen haben könnten.

Wie die neuesten Arbeiten zur Paramylon-Synthase aus *Euglena gracilis* zeigen (BÄUMER 1998, BÄUMER et al. 2001), ist das beta-1,3-Glucan-synthetisierende Enzym ebenso wie andere Glucan-Synthasen Bestandteil eines großen Multienzymkomplexes, der in der Paramylon-Granula-Membran lokalisiert ist. Mit dem zwitterionische Detergenz CHAPS konnte der 669 kDa große Paramylon-Synthase-Komplex solubilisiert und über Saccharose-Dichte-Zentrifugation aufgereinigt werden. Der isolierte Enzym-Komplex synthetisiert *in vitro* aus [¹⁴C]-UDP-Glucose unverzweigtes beta-1,3-Glucan, was durch Zugabe von Ethanol ausfällbar

ist. Die Identität des gebildeten Produktes wurde durch enzymatischen Abbau zu Glucose-Monomeren und Immunogold-Markierung mit einem monoklonalen Antikörper gegen unverzweigtes beta-1,3-Glucan im Negativkontrastverfahren gezeigt. Andere Versuche zur Auftrennung des Protein-Komplexes mittels Gelfiltration und Affinitätschromatographie führten aufgrund von Aggregationen und einem Verlust der enzymatischen Aktivität zu keinem Erfolg.

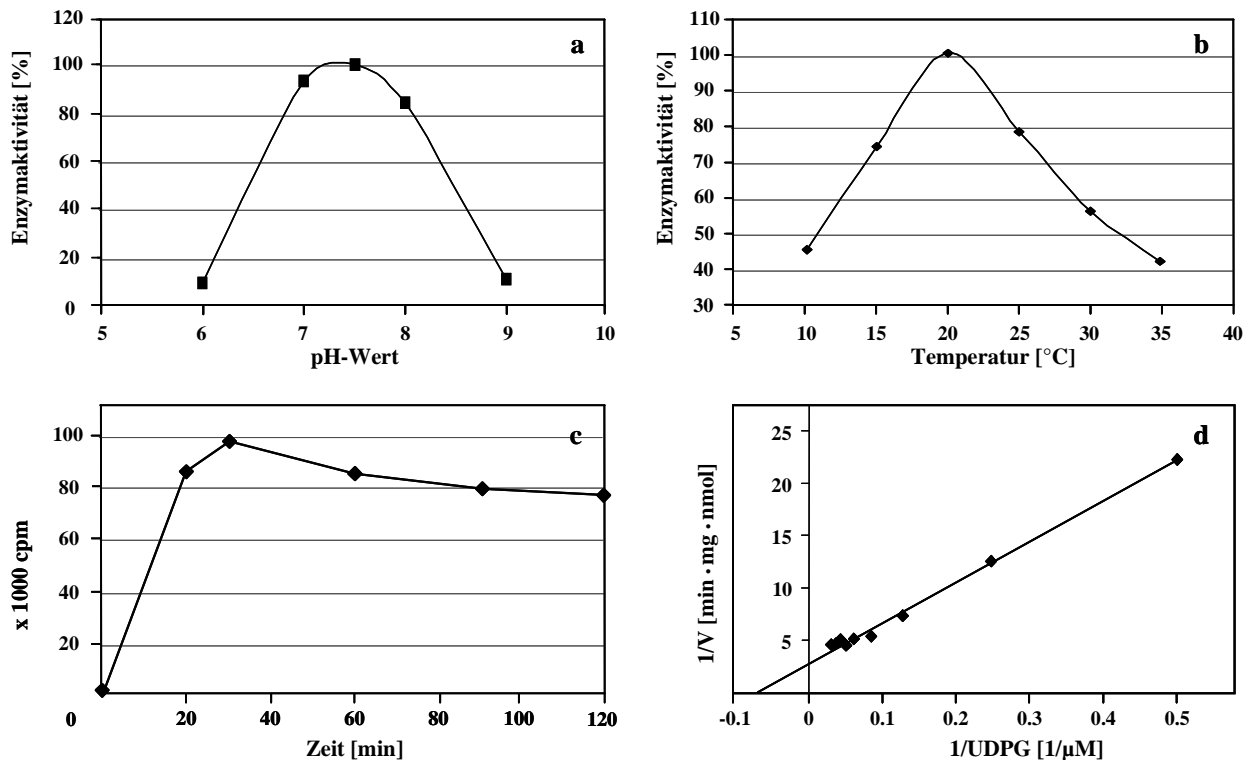


Abb. 1.16 Charakteristika des über Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigten isolierten Paramylon-Synthase-Komplexes aus heterotrophen Zellen von *Euglena gracilis* (Bäumer 1998, Bäumer et al. 2001).

a pH-Optimum **b** Temperatur-Optimum **c** Zeitabhängigkeit der enzymatischen Reaktion **d** Lineweaver-Burk-Diagramm zur Ermittlung des K_M -Wertes.

Der isolierte Paramylon-Synthase-Komplex zeichnet sich durch die in Abbildung 1.16 dargestellten Charakteristika aus. Diese in unserer Arbeitsgruppe ermittelten Daten entsprechen bis auf den K_M -Wert den 1964 von MARECHAL & GOLDEMBERG gefundenen Ergebnissen mit solubilisierten Rohextrakten. Demnach liegt das **pH-Optimum** bei pH 7.5, das **Temperatur-Optimum** bei 20 °C und die Synthesedauer beträgt 30 min. Der **K_M -Wert** des isolierten Paramylon-Synthase-Komplexes liegt mit 12.5 μM allerdings deutlich niedriger als die von MARECHAL & GOLDEMBERG (1964) gemessenen 0.6 mM. Die Paramylon-Synthase (UDP-Glucose:beta-1,3-D-Glucan 3-beta-D-Glucosyltransferase) aus *Euglena gracilis* besitzt demnach eine hohe Affinität zu ihrem Substrat UDP-Glucose.

Der Enzym-Komplex besteht aus mehreren Proteinen, die sich in einer denaturierenden SDS-Gelelektrophorese auftrennen lassen. In ersten Photoaffinitäts-Markierungsexperimenten mit dem radioaktiven Substrat [α - 32 P]-UDP-Glucose wurden zunächst zwei Proteine des Komplexes mit einem Molekulargewicht von ungefähr 54 und 37 kDa markiert.

1.5 ZIELE DER ARBEIT

Obwohl der Flagellat *Euglena gracilis* ein gut untersuchter Organismus darstellt, ist bisher nur vergleichsweise wenig über die Synthese des auffälligen und einzigartigen Reservepolysaccharids Paramylon bekannt. Die Isolierung der Paramylon-Synthase erwies sich als ebenso schwierig wie die Reinigung der Cellulose-Synthase (DELMER 1999) oder der Stärke-Synthase (PREISS & SIVAK 1998), so dass nach den Arbeiten von MARECHAL & GOLDEMBERG (1964) und TOMOS & NORTHCOTE (1978) kaum Fortschritte im Hinblick auf die beta-1,3-Glucan-Synthase aus *Euglena gracilis* erzielt wurden. Die Untersuchungen von BÄUMER (1998) und BÄUMER et al. (2001) führten zur Isolierung des Paramylon-Synthase-Komplexes aus den Granula-Membranen und einer Charakterisierung der Enzymaktivität. Damit wurden neue Ansätze zur Identifizierung der katalytischen Untereinheit der Paramylon-Synthase ermöglicht, so dass an dieser Stelle der Ausgangspunkt für diese Arbeit liegt.

Im Anschluss an die Arbeiten von BÄUMER (1998) und BÄUMER et al. (2001) sollte zunächst in weiteren biochemischen Experimenten die substratbindende bzw. katalytische Untereinheit aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis* identifiziert werden.

Eine Isolierung des Proteins sollte dann eine partielle Aminosäuren-Sequenzierung ermöglichen, auf deren Basis degenerierte Oligonukleotid-Primer konstruiert werden sollten. Anhaltspunkte für das Primerdesign sollten außerdem alignierte Sequenzen bereits bekannter beta-1,3-Glucan-Synthasen geben, obwohl zu vermuten war, dass die Paramylon-Synthase aus *Euglena gracilis* eventuell nur in hochkonservierten Bereichen der Sequenz Übereinstimmungen zu anderen beta-1,3-Glucan-Synthasen aufweist.

Ziel der sich anschließenden molekularbiologischen Versuche sollte die Identifizierung der Gensequenz der substratbindenden katalytischen Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes, also der UDP-Glucose:beta-1,3-Glucan Glucosyltransferase sein.

Detaillierte Sequenzanalysen auf Nukleinsäure- und Aminosäure-Ebene sollten schließlich Aussagen über Funktion und evolutionäre Herkunft der Paramylon-Synthase ermöglichen.

2 MATERIAL & METHODEN

A MATERIAL

2.1 GERÄTE

	HERSTELLER
Gel-Dokumentations-Anlage	
INTAS [®] Duo-Store Gel-Dokumentationsanlage [UV-Transilluminator (312 nm), CCD-Kamera, Dark-Room Box, Computer und Software]	INTAS
Video Graphic Printer Model UP 890CE mit UPP-110HA Superior Density Printing Paper	SONY
Netzgeräte	
PowerPac 300	BIORAD
Netzgerät/Power Supply 1200/200	DESAGA
PCR-Geräte	
Mastercycler [®] Gradient	EPPENDORF
Thermocycler PROGENE	TECHNE / THERMODUX
Spektralphotometer 6100 (320 - 920 nm)	JENWAY
Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Systeme	
PHASTSYSTEM [™] -Separation-Control and Development Unit 120VAC	PHARMACIA BIOTECH
Mini Protean II Elektrophoresekammer mit Gelgießstand	BIORAD
Elektrophoresekammer	WERKSTATT DER UNIVERSITÄT BIELEFELD
Sonstiges	
Algen-Anzuchtbecken	EDWARDS, KNEISE & CO.
UV-Generator Fluo-Link FLX-20.M: UV-Transilluminator (312 nm) Crosslinker (254 nm, max. 9.999 J/cm ² 7 mW/cm ²)	BIOMETRA
Durchlüftungsröhren	RETTBERG
French Pressure Cell Press (Frenchpresse)	AMICON
Inkubations-Schüttler Unitron	INFORS HT [®]
Geltrockner: Dual-Temperatur-Slab-Gel-Dryer Model 1125 B mit Kühlfalle: Refrigerated-Condensation-Trap und Vakuumpumpe	BIORAD BACHOFER KNF NEUBERGER
Phospho-Imager: GS-525 Molecular-Imager [®] -System mit GS-505 Sample-Exposure-Plattform und GS-525-Screen-Eraser, Imaging- Screen-BI, Software MULTIANALYST [®] Version 1.1	BIORAD
Sterilbank GELAIR Laminar Air Flow Class 100	GELMAN INSTRUMENT (ICN)
Szintillationszähler Tri-Carb [®] 300 und 1900 CA Liquid Scintillation Analyzer	CANBERRA PACKARD
Trockenschrank T 6060	HERAEUS
UV-Cross-Linker	BIOMETRA
Vapoklav [®] Dampfsterilisator	H & P LABORTECHNIK
Waagen	
Sartorius Basic BA 310, MD BB 200 (0 bis 310 g / 0.001 – 0.005 mg)	SARTORIUS
Analysenwaage AC 120 S (0 bis 120 g/ 0.1 mg)	SARTORIUS
Zentrifugen	
Varifuge s, Rotor 5010, max. 4 x 325 ml, max. 2930 xg	HERAEUS CHRIST
Labofuge III HC-162, Rotor: 1650, max. 4 x 170 ml, max. 4300 xg	HERAEUS CHRIST
Kühlzentrifuge Labofuge 400R, Rotor 8179, max. 4 x 170 ml, max. 3939 xg	HERAEUS INSTRUMENTS
SORVALL OTD-50 Ultrazentrifuge, Rotoren: TH-641, 6 x 13 ml, max. 206 000 xg; AH-627, 6 x 36 ml, max. 151 200 xg	DUPONT INSTRUMENTS
Biofuge 15, Rotor HFA 22.2 # 3024, max. 18 x 2 ml, max. 19 872 xg	HERAEUS INSTRUMENTS
Speed-Vac-Concentrator	SAVANT
Biofuge A Sepatech, max. 24 x 2 ml, max. 13 000 rpm	HERAEUS INSTRUMENTS
Tischzentrifuge, max. 6 x 2 ml	QUALITRON
Vakuumentrifuge: Concentrator 5301, max. 96 x 2 ml, max. 240 xg mit Membran-Vakuumpumpe	EPPENDORF VACUUBRAND

2.2 CHEMIKALIEN & VERBRAUCHSMATERIALIEN

	HERSTELLER
ANTIBIOTIKA	
Ampicillin	SERVA
Kanamycinsulfat	
Tetracyclin HCl	
RADIOAKTIVE SUBSTANZEN	
Uridin diphospho - D -[U- ¹⁴ C] glucose, Ammoniumsalz Spezifische Aktivität 11.8 GBq (319 mCi)/mmol, 20.5 MBq (554 µCi)/mg Konzentration 925 kBq (25 µCi)/ml	AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH
Uridin 5'-[α- ³² P] triphosphat, Triethylammoniumsalz Spezifische Aktivität 110 TBq (3000 Ci)/mmol Konzentration 370 MBq (10 mCi)/ml	AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH
SONSTIGES	
Agar für die Bakteriologie, Bacto™ Agar	APPLICHEM, DIFCO
Agarose zur Nukleinsäure-Elektrophorese; peqGold Universal Agarose MetaPhor® Agarose; SeaPlaque® GTG® Agarose	ROTH; PEQLAB FMC® BIO PRODUCTS/BIOZYM
APS [Ammoniumperoxodisulfat]	MERCK
Autoradiographie-Filme: BioMax™ Light-1 (BML1), X-OMAT™ AR (XAR5)	KODAK
Blotting Papier	SIGMA
Casamino acids (Casein Hydrolysate Acid Peptone No. 5)	GIBCO
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-di-methylammonio]-1-propan-sulfonat)	BIOMOL
Chromatographie Papier, 3 mm Chr	WHATMAN
Coomassie® Brilliant Blue R250	FLUKA
Ethidiumbromid [10 mg/ml]	ROTH
Ficoll 400	SERVA
Folin Ciocalteus-Phenolreagenz	MERCK
α-D-Glucose 1-phosphate, disodium salt hydrate	SIGMA
Nitrocellulose-Rundfilter BioTrace™ NT, 0.45 µm – 82 mm	PALL GELMAN LABORATORY
NZ-Amine (Casein Hydrolysate Enzymatic N-Z-Amine A)	ICN
PCIA (ROTI® Phenol/Chloroform mit TE-Puffer gesättigt)	ROTH
PEFABLOC® SC (4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-hydrochlorid)	MERCK
PHASTGEL™ Fertigele Gradient 4 – 15 %	AMERSHAM PHARMACIA
PHASTGEL™ Native Puffer Streifen	AMERSHAM PHARMACIA
PVDF-Membran: Immobilon™-P ^{NSQ} Transfermembran, 0.1 µm Porengröße	MILLIPORE
PVP (Polyvinylpyrrolidon 90)	SERVA
Röntgen Entwickler LX24, Röntgen Fixierbad AL4	KODAK
Szintillationsmix ULTIMAGOLD (High Flash-Point Liquid Scintillation cocktail, für wässrige und nicht-wässrige Proben)	CANBERRA PACKARD
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin)	MERCK
Wasser, nukleasefrei	PROMEGA
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl beta-D-Galactopyranosid)	SIGMA

2.3 KITS

	HERSTELLER
DNEASY®-Plant-Mini-Kit	QIAGEN
E.Z.N.A.®-Plasmid-Miniprep-Kit II	PEQLAB
E.Z.N.A.®-CyclePure-Kit	PEQLAB
E.Z.N.A.®-Gel-Extraction-Kit	PEQLAB
Protein-Assay-Kit	BIORAD
QIAQUICK®-Gel-Extraction-Kit	QIAGEN
Reverse-Transcription-System	PROMEGA
RNEASY®-Mini-Kit	QIAGEN
TOPO™-TA-Cloning®-Kit (Version K2)	INVITROGEN
Zinc-stain-and-destain-Kit	BIORAD

2.4 ENZYME

	UNITS	HERSTELLER
Anorganische Pyrophosphatase EC 3.6.1.1 aus Hefe	0.2 U/μl	SIGMA
AMV Reverse Transkriptase (H.C.)	20 U/μl	PROMEGA
<i>EcoR</i> I Restriktions-Endonuklease aus <i>E. coli</i> BS 5	10 U/μl	ROCHE bzw. FERMENTAS
HotStarTaq-DNA-Polymerase	5 U/μl	QIAGEN
HotMaster™ Taq-DNA-Polymerase	5 U/μl	EPPENDORF
MasterTaq-DNA-Polymerase	5 U/μl	EPPENDORF
RedTaq™ -DNA-Polymerase	1 U/μl	SIGMA
Trypsin, Sequenzierungs Grad, modifiziert	20 ng/μl	PROMEGA
Uridin-5'-Diphosphoglucose Pyrophosphorylase EC 2.7.7.9 aus Hefe	0.25 U/μl	SIGMA

2.5 PLASMIDE & *E. COLI*-STÄMME

	GENOTYP	HERSTELLER
<i>E. coli</i> TOP10F'	F' {lacIq Tn10(TetR)} mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	INVITROGEN
<i>E. coli</i> One Shot INVαF' Version I	F' endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 f80lacZDM15D(lacZYA-argF)U169	
pCR®2.1TOPO®	3.9 kb, <i>LacZα</i> fragment, M13 forward (-20) / reverse priming site, T7 promotor/priming site, multiple cloning site, fl origin, Kan ^R , Amp ^R , pUC origin	
<i>E. coli</i> SOLR™	e14-(McrA-) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5 (Kan ^R) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λR [F' proAB lacIqZ.M15] Su-(nonsuppressing)	STRATAGENE
<i>E. coli</i> XL1BlueMRF'	(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96relA1 lac [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)]	
pBluescript® SK ⁻	3.0 kb, beta-galactosidase alpha-fragment, M13 forward (-20) / reverse priming site, T7 promotor/priming site, multiple cloning site, fl (-) origin, Amp ^R , (<i>bla</i>), pUC origin, lac promoter	

2.6 LÄNGENSTANDARDS

	VERWENDUNG	HERSTELLER
HMW-Marker, 67 - 669 kDa	Native PAGE	AMERSHAM PHARMACIA
[¹⁴ C]-methylierte Proteine	Photoaffinitäts-Markierung	
Prestained-SDS-PAGE-Standard (Low Range) 19.9 - 102 kDa	SDS-PAGE	BIORAD
Precision-Protein-Standard™ Prestained (Broad Range) 10 - 250 kDa		
100 bp DNA Ladder, 1 μg/μl	Agarose Gelelektrophorese	GIBCOBRL
1 kb DNA Ladder, 1 μg/μl		
1 kb Plus DNA ladder		

2.7 OLIGONUKLEOTID-PRIMER

In der Tabelle ist für jeden Primer die Bezeichnung mit der Amplifikationsrichtung (→ 5' – 3', ← 3' – 5'), die Länge (NT), die Schmelztemperatur (T_M in °C), die Sequenz in 5' – 3' Richtung sowie der Bindungsort angegeben:

BEZEICHNUNG	NT	T _M [°C]	5' – 3' SEQUENZ	BINDET IN
EgSL →	22	54.7	CTGAGTGTCTATTTTTTTTCGG	<i>E. gracilis</i> spliced leader
PY5A →	31	68.2	ATGACGGCCGTAGTGAAGAATTTGGCGAAGT	<i>Euglena gracilis</i> Paramylon-Synthase
PY5A1 →	21	57.9	ATGACGGCCGTAGTGAAGAAT	
PY5A2 →	20	57.3	CCGTAGTGAAGAATTTGGCG	
PY5A3 →	20	61.4	CCTGCGGCAACCTCCCAAAT	
PYint5F →	23	60.6	GGCTGAAAAAAGACATGCAACGG	
PYint5R ←	23	60.6	CCGTTGCATGTCTTTTTTCAGCC	
PY45F →	18	54.5	GCATTTATGGCATCCTTCC	
PY45R ←	18	51.4	ACGGAAGGATGCCATAAA	
PYint4F →	23	58.9	GGAGTGGTATTCTTCTTATGGTG	
PYint4R ←	23	58.9	CACCATAAGAAGAATACCACTCC	
PYint3F →	23	66.0	TCGGGACGTTCCGGAAGTGTGCAC	
PYint3 ←	23	66.0	GTGCACACTTCCGAACGTCCCGA	
PYint2F →	25	63.0	CAATTGGAATGGACTGGCGATACTG	
PYint2R ←	21	59.8	ACAGTATCGCCAGTCCATTCC	
PYint1F →	18	56.0	TCGAGGTGATATGGAGGC	
PY1129a3A ←	20	59.4	TGTACCGGGCCTCCATATCA	
PYE20f →	20	57.3	TTCATCGTGTGGCTTGGCA	
PYE20rc ←	20	57.3	TGCCAAGCCAACACGATGAA	
PYE14f →	22	67.7	AGACGACCTCCCGAGGCCTCC	
PYE14rc ←	22	65.8	CTCGGGAAGGTCGTCTTCGGGA	
PYend3R ←	18	58.2	GAGGTGGGAGTTCGGGTA	
PYend2R ←	17	55.2	CTACTTCGCCAAGACGG	
PYendR ←	23	62.4	AATCCCCGCTTCTACTTCGCCAA	

2.8 SOFTWARE & INTERNET DATENBANKEN

	VERWENDUNG	LITERATUR / INTERNETADRESSE
BIOEDIT 5.0.9	Bearbeiten von Sequenz-Alignments	HALL 1999
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	ALTSCHUL et al. 1990, 1997 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
CAZY	Carbohydrate-Active EnZYmes server	COUINHO & HENRISSAT 1999 http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html
CLUSTALX 1.8	Multiple Sequence- & Profile-Alignments	THOMPSON et al. 1997 http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/
EXPASY	Expert Protein Analysis System, Sequenzanalyse	http://us.expasy.org/tools/
GENEDOC	Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility, Version 2.6.002	NICHOLAS et al. 1997 http://www.psc.edu/biomed/genedoc
MASCOT	Suchprogramm zur Auswertung massenspektroskopischer Daten	PERKINS et al. 1999 http://www.matrixscience.com/home.html
MICROSCOPE		http://microscope.mbl.edu/baypaul/microscope/general/page_01.htm
NCBI	National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
OLIGO	Software zur Primer Analyse, Version 4.0	RYCHLIK & RHOADS 1989
OLIGO ANALYZER	Software zur Primer Analyse, Version 1.0.3	http://www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware
PFAM	Protein family database of alignments and HMMs	BATEMAN et al. 1999, 2002 http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/
SWISSPROT	protein sequence database	http://us.expasy.org/sprot/sprot-top.html

B METHODEN

2.9 KULTIVIERUNG VON *EUGLENA GRACILIS*

Phototrophe und heterotrophe Kulturen von *Euglena gracilis* strain Z Klebs (SAG 1224-5/25 aus der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen) wurden in gläsernen Durchlüftungsröhren mit 100 bis 300 ml Fassungsvermögen in einem wassergefüllten Becken bei 25 bis 30 °C angezogen. Für die nötige Durchmischung wurden die Kulturen mit einem kontinuierlichen Strom aus Pressluft (Hausgasanlage der Universität Bielefeld, gefiltert durch sterile Watte) durchperlt. Die Stammkulturen wurden im 2-2-3 Tage-Rhythmus steril in frisches Nährmedium überimpft (Animpfdichte phototroph 2.5 bis 3 x 10⁵ Zellen/ml, heterotroph etwa 3 x 10⁵ Zellen/ml). Vor der Verwendung wurden die Kultur-Röhren und die für das Überimpfen nötigen Pipetten mit Wattestopfen verschlossen 7 h bei 150 °C sterilisiert. Das Nährmedium wurde in 100 bis 1000 ml Portionen in mit Wattestopfen und Aluminiumfolie verschlossenen Erlenmeyerkolben 2 min bei 121 °C und 0.7 bar autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Die **phototroph** kultivierten Zellen von *Euglena gracilis* wurden in mineralischer Nährlösung modifiziert nach CRAMER & MYERS (1952) angezogen, mit 3 % CO₂ in der Pressluft versorgt und in einem Licht-Dunkel-Wechsel von 14 : 10 h gehalten. Die Beleuchtung erfolgte mit drei 36 Watt Leuchtstoffröhren (2x Kaltlicht, weiß; 1x Warmlicht, weiß; OSRAM) und einer Lichtintensität von 3500 Lux.

MINERALISCHES NÄHRMEDIUM	STAMMLÖSUNG	PRO L NÄHRLÖSUNG	KONZENTRATION
FESTSTOFFE			
KH ₂ PO ₄	-	1.00 g	1.00 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	-	0.20 g	0.20 g/l
Na-Citrat x 2 H ₂ O	-	0.80 g	0.80 g/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-	1.00 g	1.00 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	-	0.02 g	0.02 g/l
VITAMIN-STAMMLÖSUNGEN			
Vitamin B ₁	0.10 g/l	1.0 ml	1 x 10 ⁻⁴ g/l
Vitamin B ₁₂	0.10 g/l	0.5 ml	5 x 10 ⁻⁵ g/l
SPURENELEMENTE-STAMMLÖSUNG			
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1.80 g/l	1.0 ml	1.8 x 10 ⁻³ g/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.40 g/l		4 x 10 ⁻⁴ g/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.02 g/l		2 x 10 ⁻⁵ g/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.20 g/l		2 x 10 ⁻⁴ g/l
Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O	1.30 g/l		1.3 x 10 ⁻³ g/l
WEITERE STAMMLÖSUNGEN			
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	13.90 g/l	22 ml	61.4 x 10 ⁻³ g Fe/l
Titriplex III® (Na ₂ -EDTA)	18.60 g/l		

Alle Stammlösungen und das Nährmedium wurden mit ddH₂O angesetzt. Die Eisen-Stammlösung wurde bis zum vollständigen Lösen des Eisen-EDTA-Komplexes mehrfach gekocht.

Für die **heterotrophe** Stammkultur wurden aus einer phototrophen *Euglena gracilis*-Kultur Zellen in organisches Nährmedium nach HUTNER et al. (1966) überführt und ohne zusätzliche CO₂-Versorgung im Dunkeln kultiviert. Nach etwa 10 Tagen haben die Zellen ihren Stoffwechsel vollständig auf die Heterotrophie eingestellt. Die Stammkultur dient der Dauerhaltung von heterotroph wachsenden Zellen, so dass 5.8 g Glucose/l Nährmedium ausreichen. Für die Aufarbeitungskulturen zur Isolierung des Paramylon-Synthase-Komplexes wurde dagegen organisches Nährmedium mit 10 g Glucose/l verwendet. Vier bis sechs Liter Nährmedium wurden mit einer drei Tage gewachsenen heterotrophen *Euglena gracilis*-Stammkultur angeimpft. Die **Zellernte** erfolgte für die Aufarbeitungen jeweils nach 40 h Kulturdauer.

ORGANISCHES NÄHRMEDIUM	STAMMLÖSUNG	PRO L NÄHRLÖSUNG	KONZENTRATION
FESTSTOFFE			
(MgCO ₃) ₄ x Mg (OH) ₂	-	0.4 g	0.4 g/l
Glucose x H ₂ O	-	5.8 g bzw. 10 g	5.8 g/l bzw. 10 g/l
Harnstoff	-	0.4 g	0.4 g/l
L-Glutaminsäure	-	5.0 g	5 g/l
D,L-Asparaginsäure	-	2.0 g	2 g/l
D,L-Äpfelsäure	-	5.0 g	5 g/l
Glycin	-	2.5 g	2.5 g/l
Na-Succinat x 6 H ₂ O	-	0.1 g	0.1 g/l
CaCO ₃	-	0.1 g	0.1 g/l
VITAMIN-STAMMLÖSUNGEN			
Vitamin B ₁	0.1 g/l	6.0 ml	6.0 x 10 ⁻⁴ g/l
Vitamin B ₁₂	0.1 g/l	0.5 ml	5.0 x 10 ⁻⁵ g/l
SPURENELEMENTE-STAMMLÖSUNG			
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1.100 g/l	10 ml	1.0 x 10 ⁻² g/l
MnSO ₄ x H ₂ O	0.580 g/l		5.8 x 10 ⁻³ g/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	0.180 g/l		1.8 x 10 ⁻³ g/l
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0.024 g/l		2.4 x 10 ⁻⁴ g/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.077 g/l		7.7 x 10 ⁻⁴ g/l
H ₃ BO ₃	0.029 g/l		2.9 x 10 ⁻⁴ g/l
NaNO ₃ x 4 H ₂ O	0.074 g/l		7.4 x 10 ⁻⁴ g/l
WEITERE STAMMLÖSUNGEN			
KH ₂ PO ₄	40 g/l	10 ml	0.4 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	14 g/l	10 ml	0.14 g/l
Fe(SO ₄) ₂ (NH ₄) ₂ x 6 H ₂ O	2.1 g/l	10 ml	3 x 10 ⁻³ g Fe/l

Alle Stammlösungen und das Nährmedium wurden mit ddH₂O angesetzt.

BESTIMMUNG DER ZELLZAHL

Für die Zellzahlbestimmung mit einer THOMA-Kammer wurden im Lichtmikroskop jeweils acht Objektträger ausgezählt, wobei 100 gezählte Zellen pro Objektträger einer Zellzahl von 1.56 x 10⁶ Zellen/ml entsprechen.

BESTIMMUNG DES KOHLENHYDRATGEHALTES

Der Kohlenhydratgehalt, der sich besonders bei den heterotrophen *Euglena gracilis*-Zellen vor allem aus dem in den Zellen enthaltenen Paramylon ergibt, wurde nach der Methode von ROE (1955) mit dem Anthron-Reagenz bestimmt.

ANTHRON-REAGENZ

0.1 %	Anthron
1 %	Thioharnstoff
in 75 %	H ₂ SO ₄
	Lösen durch Erwärmen auf 70 °C

0.5 ml Probe (zweimal gewaschene Zellen in ddH₂O) wurden mit 2 ml Reagenz vermischt und 15 min im kochenden Wasserbad (95 °C) erhitzt. Das saure Reagenz hydrolysiert dabei alle Poly- und Oligosaccharide zu Monosacchariden, deren Derivate mit dem Anthron zu einer blaugefärbten Verbindung reagieren. Nach zügigem Abkühlen wurde die Extinktion bei 620 nm gegen einen Blindwert (0.5 ml ddH₂O mit 2 ml Reagenz) gemessen und der Kohlenhydratgehalt der Proben über einen Glucose-Standard (20 µg/ml) bestimmt.

2.10 KULTIVIERUNG ANDERER EUGLENIDA

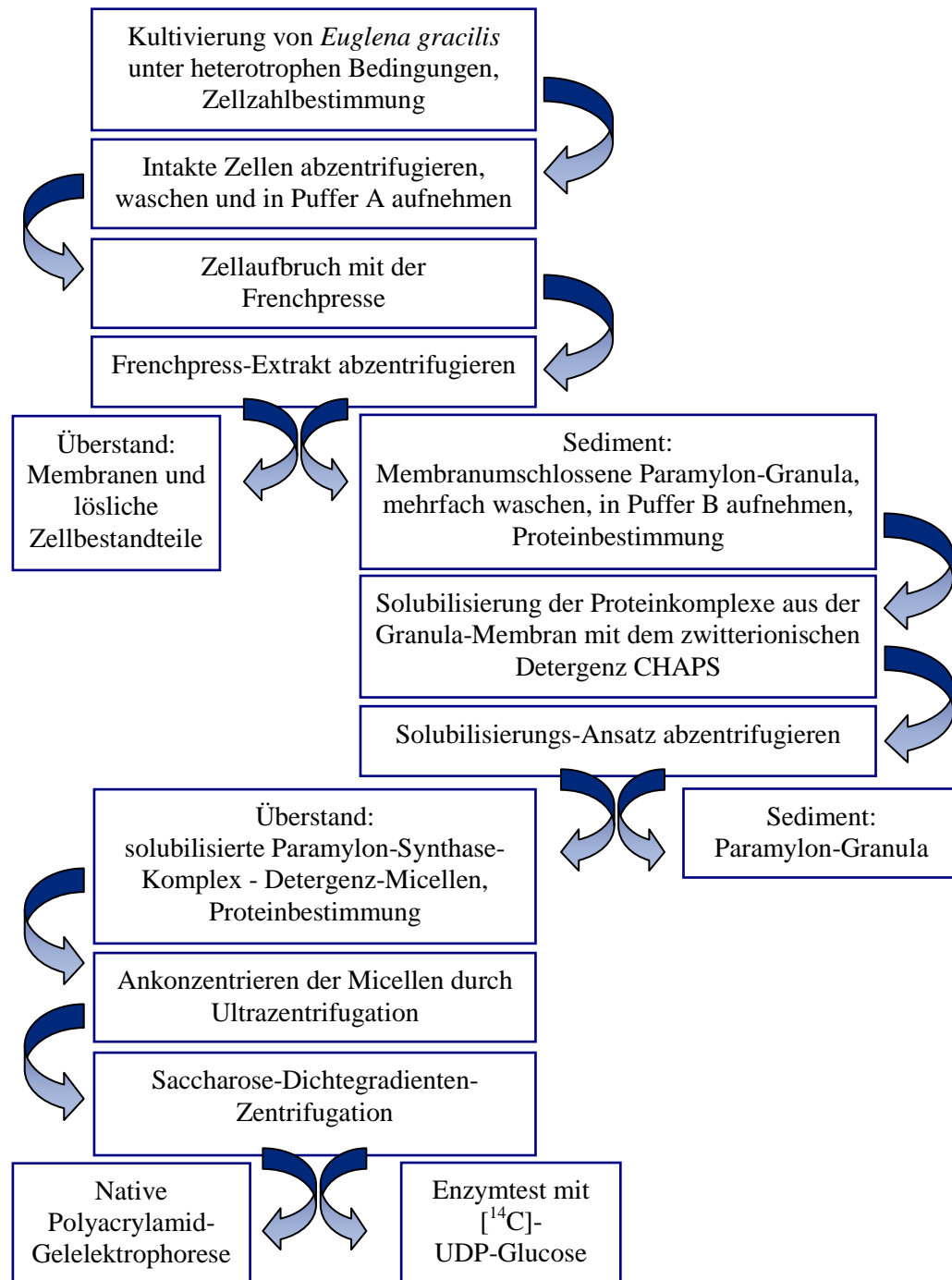
Euglena sp.3 BAPS 4-2000 und *Euglena* sp.4 BAPS 5-2001 stammen aus Freilandisolaten von Dr. Ingo Busse und wurden in Medium 3c (Erde-Wasser-Medium mit 1/8 Erbse, SCHLÖSSER 1994) bei Tageslicht und natürlichem Tag/Nacht-Rhythmus kultiviert.

B1 BIOCHEMISCHE METHODEN

2.11 ISOLIERUNG DES PARAMYLON-SYNTASE-KOMPLEXES

Zur Isolierung des Paramylon-Synthase-Komplexes aus den Paramylon-Granula wurden *Euglena gracilis*-Zellen unter heterotrophen Bedingungen für 40 h (1.5 Tage) in organischem Nährmedium (→ 2.9) mit 10 g Glucose/l kultiviert.

Zur besseren Übersicht wird die Vorgehensweise im Folgenden zunächst in Form eines Fließschemas dargestellt:



ZELLAUFBRUCH UND -FRAKTIONIERUNG

Nach dem Abzentrifugieren (5 min bei 1800 rpm) wurde das Zellsediment dreimal mit ddH₂O gewaschen. Alle folgenden Aufarbeitungsschritte wurden auf Eis und mit vorgekühlten Geräten und Lösungen durchgeführt. Mit einem entsprechenden Volumen **Puffer A** wurde eine Zellzahl von 1×10^8 Zellen/ml eingestellt. Der Aufbruch der Zellen erfolgte mit einem auf 4 °C vorgekühlten Frenchpress-Kopf (max. ca. 40 ml) bei 3800 psi (260 bar).

PUFFER A

50 mM	TRIS/HCl, pH 7.4
250 mM	Saccharose
3 mM	Na ₂ -EDTA (Titriplex III®)
0.05 bis 0.1 mM	Pefabloc® SC
0.04 % (v/v)	beta-Mercaptoethanol

Nach Zentrifugation (10 min bei 4000 *xg*) erhielt man im Überstand die aufgebrochenen Membranen und die löslichen Bestandteile der Zellen. Der Überstand wurde zur Herstellung der Präzipitationshilfe für den radioaktiven Enzymtest (→ 2.12) verwendet oder verworfen. Im Sediment befanden sich die noch von Membranen umschlossenen Paramylon-Granula sowie - als dünne Schicht auf dem Paramylon - noch intakte Zellen und größere Zelltrümmer. Die intakten Zellen und Zelltrümmer wurden zunächst mit ddH₂O gründlich von dem Paramylon-Sediment abgespült, welches anschließend noch vier- bis fünfmal mittels Magnetrührer in Puffer A resuspendiert und gewaschen wurde (5 min bei 2000 *xg*).

PUFFER B

25 mM	TRIS/HCl, pH 7.4
20 % (w/v)	Saccharose
0.05 bis 0.1 mM	Pefabloc® SC
1 mM	beta-Mercaptoethanol

Abschließend wurde das Paramylon in möglichst wenig **Puffer B** resuspendiert, so dass eine zu pipettierende Suspension entstand.

SOLUBILISIEREN DES PARAMYLON-SYNTHASE-KOMPLEXES

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der isolierten Paramylon-Granula in Puffer B wurden 0.2 ml Paramylon-Suspension mit 1.8 ml 2 % SDS 15 min im Wasserbad gekocht und nach Abkühlung 3 min bei 2000 *xg* zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt zur Proteinbestimmung verwendet (→ 2.14.1 ohne vorhergehende TCA-Fällung).

Der Solubilisierungs-Ansatz wurde auf eine Konzentration von 5 mg Protein/ml, 15 % Glycerin sowie 0.15 % des zwitterionischen Detergenzes CHAPS (= 24.4 mM im Ansatz) eingestellt und entsprechend mit Puffer B aufgefüllt. Die Solubilisierung erfolgte über Nacht bei 0 bis 4 °C auf einem langsam eingestellten Magnetrührer. Anschließend wurde die Suspension einmal gepottert und das Paramylon 10 min bei 4000 *xg* abzentrifugiert. Der Überstand enthielt die solubilisierten Enzym-Komplex-Detergenz-Micellen. Die anschließende Bestimmung des Proteingehaltes des Solubilisates erfolgte mit vorhergehender TCA-Fällung (→ 2.14.1).

ANKONZENTRIEREN DER PARAMYLON-SYNTHASE-KOMPLEX - DETERGENZ-MICELLEN

Das Solubilisat wurde in der Ultrazentrifuge 2 bis 3 h bei 190 000 *xg* zentrifugiert, das Sediment aus Protein-Detergenz-Micellen in wenig Puffer B (0.5 bis 1 ml pro Zentrifugenbecher) resuspendiert und erneut gepottert.

SACCHAROSE-DICHTEGRADIENTEN-ZENTRIFUGATION

Zur weiteren Aufreinigung wurde je 1 ml der ankonzentrierten und homogenisierten Micellen-Suspension auf diskontinuierliche Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und 16 h bei 190 000 xg zentrifugiert. Die Gradienten wurden aus Saccharose-Lösungen mit 0.15 % CHAPS in Puffer B folgender Konzentrationen gegossen: 1 ml 70 %, je 2 ml 60 %, 50 %, 40 % und 30 % Saccharose. Die Gradienten wurden von oben nach unten in 1 ml Portionen abgezogen, so dass man pro Gradient 10 Fraktionen erhielt.

Diese waren das Ausgangsmaterial für alle weiteren Arbeiten und wurden auf ihren Gehalt an Paramylon-Synthase-Komplexen mittels Proteinbestimmung (\rightarrow 2.14), radioaktivem Enzymtest (\rightarrow 2.12) und nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (\rightarrow 2.15.1) überprüft.

2.12 RADIOAKTIVER ENZYMTEST MIT [^{14}C]-UDP-GLUCOSE

Isolierte Glucosyltransferasen wie die Paramylon-Synthase synthetisieren aus Nukleotidzuckern entsprechende Oligo- bzw. Polysaccharidketten, die sich ab einer Länge von 10 Glucosemolekülen mit 70 % Ethanol (EtOH) ausfällen lassen. Durch die Verwendung von [^{14}C]-UDP-Glucose als Substrat kann unter geeigneten Reaktionsbedingungen die Enzymaktivität der Paramylon-Synthase über die Menge des synthetisierten radioaktiven Glucans nachgewiesen werden (QUENTMEIER 1987, BÄUMER 1998, BÄUMER et al. 2001).

GEFRIERGETROCKNETES PARAMYLON

Gereinigtes, fibrilläres Paramylon erhöht die Aktivität der enzymatischen Reaktion und wurde von Dr. Dietrich Bäumer zur Verfügung gestellt, deshalb soll die Herstellung hier nur angedeutet werden: aus heterotroph kultivierten *Euglena gracilis*-Zellen wurden die isolierten Paramylon-Granula in 1 % SDS gekocht, mehrfach mit ddH₂O und anschließend mit Aceton gewaschen und getrocknet. Nach Lösen des gereinigten Paramylons in 1 M NaOH, anschließender Neutralisation mit konzentrierter HCl und mehrfachem Waschen des entstandenen Präzipitats mit ddH₂O wurde das Paramylon gefriergetrocknet und stand so für die enzymatische Reaktion zur Verfügung.

PRÄZIPITATIONSHILFE

Um die Fällung des im Enzymtest gebildeten Glucans zu verbessern, wurden Membranfraktionen, die bei der Isolierung der Paramylon-Granula aus *Euglena gracilis* im Überstand angefallen sind (\rightarrow 2.11), durch Ultrazentrifugation (2 h bei 100 000 xg) ankonzentriert, in ddH₂O aufgenommen, gepottert und schließlich durch 15 min Kochen denaturiert.

TESTANSATZ

fibrilläres, gefriergetrocknetes Paramylon	~ 1 mg
16.8 mM TRIS/Acetat pH 7.5, 1 mM CaCl ₂	12 µl
Saccharose-Dichtegradienten-Fraktion	50 µl (40 bis 80 µg Protein)
[¹⁴ C]-UDP-Glucose	4 µl (= 0.5 µM)

Als negative Kontrolle wurden statt der Saccharose-Dichtegradienten-Fraktion 50 µl hitzedenaturiertes *Euglena gracilis*-Membransediment (Präzipitationshilfe) in den Ansatz gegeben. Die Ansätze wurden 30 min bei 20 °C inkubiert. Durch Zugabe von 0.5 ml 5 % Trichloressigsäure (TCA) und 1 min Kochen im Wasserbad wurde die Reaktion beendet. Zur Fällung des gebildeten radioaktiven Glucans wurden 50 µl Präzipitationshilfe zum Ansatz gegeben sowie durch Zugabe von 1.5 ml 98 % EtOH eine EtOH-Endkonzentration von 70 % eingestellt.

Die Fällung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Zur Trennung des EtOH-löslichen Substrates [¹⁴C]-UDP-Glucose von dem ausgefällten Produkt wurden die Ansätze 10 min bei 4000 xg zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend dreimal mit je 1.5 ml 70 % EtOH gewaschen, wobei der Überstand vorsichtig von dem lockeren Sediment abgezogen wurde. Dass es sich bei dem gebildeten Produkt um beta-1,3-Glucan handelt, wurde von BÄUMER et al. (2001) durch enzymatische Produktanalyse gezeigt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte schließlich nach Überführung des Glucan-Sedimentes mit 1 ml 98 % EtOH in ein Zählfläschchen mit 5 ml Szintillationsmix und einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur in einem Szintillationszähler gegen 1 ml H₂O + 5 ml Szintillationsmix zur Bestimmung der Hintergrundstrahlung.

Das Prinzip der Flüssig-Szintillations-Messung (LSC = liquid scintillation counting) ist die Umwandlung der Energie des radioaktiven beta-Zerfalls (= emittierte Elektronen, bei [¹⁴C] mit einer maximalen Energie von 0.157 MeV) in Lichtenergie durch die organischen Verbindungen im Szintillationsmix. Die Photonen bzw. Lichtblitze können von den Detektoren des Szintillations-Zählers gemessen werden und man erhält die Ergebnisse in cpm (counts per minutes = Zerfälle pro Minute).

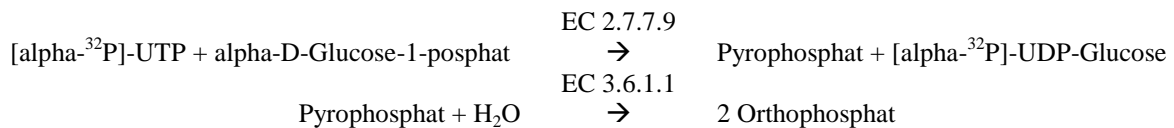
2.13 PHOTOAFFINITÄTS-MARKIERUNG DER SUBSTRATBINDENDEN UNTEREINHEIT

Zur Identifizierung der eigentlichen Paramylon-Synthase in dem beta-1,3-Glucan-synthetisierenden Enzymkomplex wurde nach einer Methode von DELMER et al. (1991) eine Photoaffinitäts-Markierung durchgeführt. Das Prinzip dieser Technik beruht auf einer durch UV-Bestrahlung verursachten kovalenten Bindung zwischen dem Substrat UDP-Glucose und dem aktiven Zentrum des substratbindenden Enzyms. Dazu wurden die aktiven Paramylon-Synthase Enzym-Komplexe zusammen mit dem radioaktiv markierten Substrat auf Eis und unter UV-Bestrahlung inkubiert und anschließend durch SDS-PAGE (→ 2.15.2) in ihre Untereinheiten aufgetrennt.

2.13.1 SYNTHESE VON [α - 32 P]-UDP-GLUCOSE

Das Substrat für die Paramylon-Synthase, [α - 32 P]-UDP-Glucose, wurde aus [α - 32 P]-UTP (250 μ Ci) und α -D-Glucose-1-phosphat durch Umsatz mit UDP-Glucose Pyrophosphorylase [EC 2.7.7.9] und Anorganischer Pyrophosphatase [EC 3.6.1.1] synthetisiert:

REAKTIONSMECANISMUS



Dazu wurde das radioaktive UTP zunächst in der Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet und in 216 μ l HEPES/KOH-Puffer pH 7.3 mit 13 mM α -D-Glucose-1-phosphat aufgenommen. Der Umsatz der Substrate UTP und Glucose-1-phosphat erfolgte für 30 min bei 30 °C mit 3.5 U UDP-Glucose Pyrophosphorylase und 4 U Anorganischer Pyrophosphatase.

HEPES /KOH-PUFFER

50 mM	HEPES/KOH	pH 7.3
8 mM	MgCl ₂ x 6H ₂ O	
0.8 mM	Na ₂ -EDTA	

ETHANOLISCHE AMMONIAKLÖSUNG

50 %	EtOH	
0.16 N	NH ₄ OH	

Der gesamte Ansatz wurde gründlich mit 2 mg gegläuhter Aktivkohle vermischt und 2 min bei 15 000 *xg* zentrifugiert. Das Aktivkohle-Sediment wurde zweimal mit je 200 μ l ddH₂O gewaschen und die UDP-Glucose anschließend dreimal mit je 100 μ l ethanolischer Ammoniaklösung aus der Aktivkohle extrahiert. Die Überstände der Extraktionen wurden in einem frischen 1.5 ml Reaktionsgefäß vereint und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die radioaktiv markierte [α - 32 P]-UDP-Glucose wurde schließlich in 50 μ l 50 % EtOH aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.13.2 MARKIERUNG DER SUBSTRATBINDENDEN UNTEREINHEIT

Vor jedem Markierungsexperiment wurde die benötigte Menge [α - 32 P]-UDP-Glucose in 50 % EtOH in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in der entsprechenden Menge HEPES/KOH-Puffer aufgenommen. Um die Abhängigkeit der Markierung von Metallionen zu überprüfen, wurden außer dem für die Synthese der UDP-Glucose verwendeten Puffer (HEPES/KOH mit 8 mM MgCl₂ und 0.8 mM EDTA) entsprechende Puffer mit 1 mM CaCl₂ bzw. mit 8 mM MgCl₂ und 1 mM CaCl₂ verwendet.

TESTANSATZ (70 μ l)

Saccharose-Dichtegradienten-Fraktion	50 μ l (40 bis 80 μ g Protein)
[α - 32 P]-UDP-Glucose in HEPES/KOH pH 7.3	4 μ l bis 10 μ l
HEPES/KOH pH 7.3	16 μ l bis 10 μ l

Die Reaktionsgefäße wurden auf Eis mit geöffnetem Deckel 20 min unter UV-Bestrahlung (254 nm) inkubiert. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne Protein und mit hitzedenaturiertem Protein (Präzipitationshilfe, → 2.12) im UV-Licht sowie Enzymhaltige Proben ohne UV-Bestrahlung (Dunkelkontrolle) verwendet. Anschließend wurden die Ansätze mit 50 µl SDS-Probenpuffer (→ 2.15.2) versetzt, 5 min bei 95 °C solubilisiert und nach Abkühlung einer SDS-PAGE (→ 2.15.2) unterzogen. Als Markerproteine wurden jeweils ein [¹⁴C]-methylierter- und ein Prestained-Standard (→ 2.15.3) verwendet.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Silber (→ 2.16.2) oder Coomassie[®] Brilliant Blue R250 (→ 2.16.3) gefärbt und auf Filterpapier ca. 1.5 h bei 60 °C im Vakuum-Geltrockner getrocknet.

Die Detektion der Radioaktivität erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur entweder mit einem Phospho-Imager und dem Programm MULTIANALYST[®] oder durch Inkubation der Gele mit Autoradiographie-Filmen in Filmkassetten. Die Filme wurden für 1 bis 2 min im Entwickler und nach kurzem Wässern für 1 bis 2 min im Fixierer bei Rotlicht entwickelt, anschließend getrocknet und nach Abgleich des Prestained-Markers eingescannt.

2.14 PROTEINBESTIMMUNG

2.14.1 MODIFIZIERTE PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY ET AL. (1951)

Das Prinzip dieser Proteinbestimmung beruht auf der Bildung eines Kupfer-Protein-Komplexes in alkalischer Lösung, welcher anschließend ein saures Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz (Folin-Ciocalteus Phenolreagenz) reduziert. Die dabei entstehende Blaufärbung wurde photometrisch bei 578 nm bestimmt und anhand einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin (52 µg bis 130 µg BSA) der Proteingehalt der Proben bestimmt. Modifiziert wurde diese Methode bei Bedarf durch eine vorgeschaltete Proteinfällung mittels TCA, um auch geringe Protein-Konzentrationen bestimmen zu können und störende Effekte von Puffern o.ä. auf die Farbreaktion zu vermeiden.

TCA-FÄLLUNG

0.2 ml Probe (gegebenenfalls verdünnt) wurden mit ddH₂O auf 1 ml aufgefüllt, die Proteine durch Zugabe von 0.1 ml 3 M TCA für 5 min gefällt und anschließend 30 s bei 6000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zentrifugengläser ca. 5 min kopfüber auf Filterpapier gestellt.

PROTEINBESTIMMUNG

Das Proteinsediment wurde in 0.1 ml 2 % SDS gelöst (bzw. maximal 0.1 ml des Überstandes der in 2 % SDS gekochten Paramylon-Granula in Puffer B eingesetzt, → 2.11) und anschließend mit 2 ml Lowry-Reagenz vermischt.

LOWRY-REAGENZ

100 VOL Lowry A	4 g NaOH / l und 20 g Na ₂ CO ₃ / l
1 VOL Lowry B	1 % CuSO ₄ x 5 H ₂ O
1 VOL Lowry C	2 % NaK-Tartrat
→ vor Gebrauch mischen	

Nach 10 min Inkubation im Dunkeln wurde 0.1 ml Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (vor Gebrauch 1:2 mit ddH₂O verdünnt) in den Ansatz pipettiert, gründlich durchmischt und nach weiteren 30 min im Dunkeln gegen 0.1 ml 2 % SDS, 2 ml Lowry-Reagenz und 0.1 ml 1:2 verdünntes Folin gemessen.

2.14.2 BIORAD-PROTEINASSAY

Der BIORAD-Proteinassay basiert auf der Methode von BRADFORD (1976), also einer Farbveränderung des Farbstoffs Coomassie[®] Brilliant Blue G-250 in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Dabei bindet der Farbstoff bevorzugt an basische (vor allem Arginin) und aromatische Aminosäuren des Proteins, wodurch das Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie[®] Brilliant Blue G-250-Lösung von 435 nm nach 595 nm verschoben wird.

Für den Protein-Microassay wurden die zu messenden Proteinlösungen mit ddH₂O auf 0.8 ml verdünnt, mit 0.2 ml Reagenz vermischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 595 nm gemessen. Zur Eichung wurden Ansätze mit 4.5 bis 15 µg BSA verwendet und als Referenz dienten 0.8 ml ddH₂O + 0.2 ml Reagenz.

2.15 POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE [PAGE]**2.15.1 NATIVE PAGE**

Die Analyse der Saccharose-Dichtegradienten-Fractionen mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde überwiegend an der PHASTSYSTEM[™]-Anlage der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld durchgeführt. Diese besteht aus einer programmierbaren automatischen Elektrophorese-Einheit und einer ebenfalls programmierbaren Entwicklungseinheit für die anschließende Färbung (→ 2.16.1) und arbeitet mit Fertiggelen.

Es wurden dünne Polyacrylamid-Gradientengele [PHASTGEL[®] 4 bis 15 % Polyacrylamid; Maße: 43 x 50 x 0.45 mm; Trennbereich: 150 bis 1000 kDa; Gelpuffer: 0.112 M Acetat, 0.112 M TRIS pH 6.4; Sammelgel (13mm): 4.5 % T / 3 % C; Trenngel (32mm): 4 bis 15 % T / 1 bis 2 % C] verwendet, die auf einer stabilisierenden Kunststoffschicht (GELBOND) aufgetragen sind. Der Laufpuffer für die Elektrophorese befand sich in den PHASTGEL[®] Pufferstreifen [41 x 10 x 6 mm], die aus 3 % Agarose IEF bestanden und mit dem nativen Puffer [0.88 M L-Alanin, 0.25 M TRIS pH 8.8] getränkt waren.

NATIVER PROBENPUFFER

62.6 mM	TRIS/HCl pH 6.8
40 % (v/v)	Glycerin
0.01 % (w/v)	Bromphenolblau

Die Saccharose-Dichtegradienten-Fractionen wurden 1:2 mit nativem Probenpuffer vermischt, mittels eines Applikators für acht bzw. zwölf Proben aufgenommen und während der Elektrophorese automatisch auf das Gel aufgetragen. Das Programm bestand aus folgenden Schritten:

METHODE 8						
(NATIV)						
8.1	Kühlung	200 V	10 mA	2.0 W	16 °C	4 Vh
8.2	Sammelgel	20 V	1 mA	0.0 W	15 °C	10 Vh
8.3	Trenngel Anfang	300 V	8.3 mA	2.4 W	16 °C	14 Vh
	Trenngel Ende	400 V	0.5 mA	0.0 W	15 °C	83 Vh

Im Anschluss an den Gellauf wurden die Fertiggele direkt in die Entwicklungs-Einheit eingelegt und einer Silber-Färbung nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1985) (→ 2.16.1) unterzogen.

Native Gradientengele (4 bis 15 %) für das BIORAD-System Mini Protean II wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers, einer Peristaltikpumpe und des BIORAD-Gelgießstandes gegossen. Sowohl die Polyacrylamid-Lösungen als auch der Laufpuffer wurden wie bei der SDS-PAGE (→ 2.15.2) nur ohne denaturierendes SDS angesetzt. Die proteinhaltigen Proben wurden mit nativem Probenpuffer solubilisiert und die Gele wurden im Anschluss an die Elektrophorese mit Silber (→ 2.16.2) oder mit Coomassie[®] Brilliant Blue R250 (→ 2.16.3) gefärbt.

2.15.2 SDS-PAGE

Proteine werden durch das Detergenz SDS zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs- / Masse-Verhältnis denaturiert, so dass sie in der Gelelektrophorese zur Anode wandern und aufgrund ihrer Größenunterschiede aufgetrennt werden. Die Trennung erfolgte in einem diskontinuierlichen TRIS-Glycin-System aus zwei Gelen mit unterschiedlichen pH-Werten und Acrylamid-Konzentrationen (Sammelgel und Trenngel) nach LAEMMLI (1970). Für die unterschiedlichen SDS-Gelelektrophoresen (analytische, radioaktive und präparative Gele) wurde überwiegend das BIORAD-System Mini Protean II verwendet, bei dem die Gele eine Größe von 90 x 60 x 0.75 mm aufweisen (im Folgenden als kleine Gele bezeichnet). Bei Bedarf, v.a. zu Präparationszwecken, wurden große SDS-Gele (160 x 120 x 1 mm) in einer selbstgebauten Elektrophoresekammer angefertigt. Mit Hilfe eines Gradientenmischers, einer Peristaltikpumpe und des BIORAD-Gelgießstandes wurden bei Bedarf auch SDS-Gradientengele gegossen.

Zunächst wurde das Trenngel zur Glättung der Oberfläche mit wassergesättigtem Isobutanol und nach ca. 1 h zum vollständigen Auspolymerisieren über Nacht bei 4 °C mit ddH₂O überschichtet.

Das Sammelgel wurde auf das mit ddH₂O abgespülte Trenngel gegossen, mit Hilfe eines Kammes mit sieben bis zehn Taschen, bei großen Gelen mit 17 Taschen versehen. Nach 1 bis 2 h war die Polymerisation abgeschlossen und die Geltaschen wurden vor der Verwendung des Gels mit ddH₂O gespült.

Die Protein-Proben wurden 1:2 mit Probenpuffer vermischt, 5 min bei 95 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

Der Gellauf erfolgte bei Raumtemperatur (kleine Gele) mit konstant 5 bis 10 mA pro Gel im Sammelgel und 20 bis 25 mA pro Gel im Trenngel bzw. bei 4 °C (großes Gel) mit konstant 20 mA im Sammelgel und 30 mA im Trenngel. Anschließend wurden die Gele entsprechend der weiteren Verwendung behandelt.

TRENNGEL (10 ml)

<u>8 %</u>	<u>10 %</u>	<u>12 %</u>	<u>mit 2.7 % C</u>
2 ml	2.5 ml	3 ml	40 % Acrylamid (w/v)
1.2 ml	1.4 ml	1.6 ml	2 % Methylenbisacrylamid (w/v)
1 ml	1 ml	1 ml	10X Trenngelpuffer pH 8.8 (2.88 M TRIS, 0.86 M TRIS/HCl)
0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	10 % (w/v) SDS
5.6 ml	5.2 ml	4.4 ml	ddH ₂ O
70 µl	70 µl	70 µl	10 % (w/v) APS
7 µl	7 µl	7 µl	TEMED

SAMMELGEL (10 ml)

<u>4 %</u>	<u>mit 2.7 % C</u>
1 ml	40 % Acrylamid (w/v)
0.5 ml	2 % Methylenbisacrylamid (w/v)
1 ml	10X Sammelgelpuffer pH 6.8 (0.04 M TRIS , 1.21 M TRIS/HCl)
0.1 ml	10 % (w/v) SDS
7.4 ml	ddH ₂ O
70 µl	10 % (w/v) APS
7 µl	TEMED

SDS-PROBENPUFFER

62.6 mM	TRIS/HCl pH 6.8
25 % (v/v)	Glycerin
2 % (w/v)	SDS
0.01 % (w/v)	Bromphenolblau
(10 mM	DTT)

SDS-LAUFPUFFER

25 mM	TRIS pH 8.45
192 mM	Glycin
0.1 % (w/v)	SDS

2.15.3 BESTIMMUNG DES MOLEKULARGEWICHTES AUFGETRENNTER PROTEINE

Für die native PAGE in der PHASTSYSTEM™-Anlage wurde ein **HMW-Marker** verwendet, der folgende Proteine enthielt:

	M_r
THYROGLOBULIN	669 000
FERRITIN	440 000
KATALASE	232 000
LACTATDEHYDROGENASE	140 000
ALBUMIN	67 000

Für die SDS-PAGE wurden entweder der **Prestained-SDS-PAGE-Standard** (Low Range):

	M_r
PHOSPHORYLASE B	102 000
RINDERSERUM ALBUMIN	78 000
OVALBUMIN	49 500
CARBONISCHE ANHYDRASE	34 200
SOJABOHNEN TRYPSIN INHIBITOR	28 300
LYSOZYM	19 900

oder der **Precision-Protein-Standard™-Prestained** (Broad Range) aus zehn rekombinanten Proteinen mit M_r 250 000, M_r 150 000, M_r 100 000, M_r 75 000, M_r 50 000, M_r 37 000, M_r 25 000, M_r 20 000, M_r 15 000 und M_r 10 000 verwendet.

Für die radioaktive Photoaffinitäts-Markierung (→ 2.13.2) wurde zusätzlich zum Prestained SDS-PAGE Standard auch ein **Marker mit [¹⁴C]-methylierten Proteinen** mit einer spezifischen Aktivität von 0.37 bis 3.7 MBq/mg (10 bis 100 μ Ci/mg) verwendet:

	M_r
MYOSIN	220 000
PHOSPHORYLASE B	97 400
RINDERSERUM ALBUMIN	66 000
OVALBUMIN	46 500
CARBONISCHE ANHYDRASE	30 000
LYSOZYM	14 300

Die Bestimmung des Molekulargewichtes eines Proteins erfolgte durch das Auftragen der Wanderungstrecke der Proteine gegen den dekadischen Logarithmus ihrer molaren Massen im Vergleich zu den Eichproteinen der Standards.

2.16 PROTEINNACHWEIS IM POLYACRYLAMID-GEL

2.16.1 SILBER-FÄRBUNG FÜR NATIVE PHASTSYSTEM™ PAGE

Diese Färbemethode für Polyacrylamidgele nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1985) ist das Standard-Programm der automatischen PHASTSYSTEM™-Anlage in der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld (→ 2.15.1). Sämtliche Lösungen wurden mit Millipore-Q®-H₂O und den in der Technischen Fakultät vorhandenen Chemikalien angesetzt. Die PHASTGEL®-Fertiggele wurden nach dem Gellauf kopfüber in die Entwicklungs-Einheit eingehängt und der Färbung nach folgendem Programm unterzogen:

METHODE 6 (HEUKESHOVEN)			ZEIT [MIN]	TEMPERATUR [°C]
6.01	Fixierer I	30 % MeOH, 10 % TCA	0.5	25
6.02	Fixierer II	30 % EtOH, 10 % Essigsäure	0.4	50
6.03	Fixierer II	30 % EtOH, 10 % Essigsäure	4.0	50
6.04	Konditionierer	30 % EtOH, 0.4 M Na-Acetat, 0.5 % Glutardialdehyd, 0.05 % Essigsäure, 0.2 % Na-Thiosulfat	7.0	40
6.05	Waschen	Millipore-Q®-H ₂ O	3.0	50
6.06	Waschen	Millipore-Q®-H ₂ O	3.0	50
6.07	Waschen	Millipore-Q®-H ₂ O	3.0	50
6.08	Waschen	Millipore-Q®-H ₂ O	4.0	50
6.09	Waschen	Millipore-Q®-H ₂ O	4.0	50
6.10	Versilberer	0.1 % Silbernitrat, 92.5 ppm Formaldehyd	8.0	40
6.11	Versilberer	0.1 % Silbernitrat, 92.5 ppm Formaldehyd	2.0	25
6.12	Entwickler	2.5 % Na-Carbonat, 92.5 ppm Formaldehyd	0.4	30
6.13	Entwickler	2.5 % Na-Carbonat, 92.5 ppm Formaldehyd	4.0	50
6.14	Stopp-Lösung	50 mM Na ₂ -EDTA	2.0	50
6.15	Waschen	Millipore-Q®-H ₂ O	3.0	50
6.16	Konservierer	10 % Glycerin	4.0	50
6.17	Waschen	Millipore-Q®-H ₂ O	0.4	25

Die gefärbten PHASTGEL®-Fertiggele wurden für Monate in Petrischalen bei 4 °C aufbewahrt.

2.16.2 SILBER-FÄRBUNG FÜR NATIVE UND SDS-PAGE

Diese Methode nach BLUM et al. (1987) wird bei Raumtemperatur durchgeführt und kann für native und SDS-Gele verwendet werden. Durch den Fixierer wird eine Diffusion der Proteine im Gel verhindert und er führt ebenso wie das Waschen mit EtOH zu einem klaren Hintergrund durch Entfernung störender Substanzen. Thiosulfat und Formaldehyd erhöhen die Empfindlichkeit und verstärkt den Kontrast der Färbung, die auf einer Bindung des Silbernitrates an die Proteine basiert. Die Behandlung mit dem Entwickler führt schließlich zu einem Abscheiden metallischen Silbers in Abhängigkeit von der Art des Proteins und dessen

Menge. Die Stopp-Lösung beendet diese Reaktion und das Glycerin verhindert das Einreißen des Gels beim Trocknen. Alle Lösungen wurden mit ddH₂O angesetzt.

			ZEIT
01	FIXIERER	50 % MeOH, 12 % Essigsäure, 0.019 % Formaldehyd	15 bis 60 min
02	WASCHEN	50 % EtOH	3 x 10 min bis über Nacht
03	IMPRÄGNIERER	0.02 % Na-Thiosulfat	genau 1 min
04	WASCHEN	ddH ₂ O	3 x 20 s
05	FÄRBUNG	0.2 % Silbernitrat, 0.028 % Formaldehyd	15 bis 30 min
06	WASCHEN	ddH ₂ O	3 x genau 20 s
07	ENTWICKLER	6 % Na-Carbonat, 0.4 % Na-Thiosulfat, 0.019 % Formaldehyd	1 bis 20 min bzw. bis Banden sichtbar sind
08	WASCHEN	ddH ₂ O	3 x 20 s
09	STOPP-LÖSUNG	50 % MeOH, 12 % Essigsäure	2 x 10 min
10	TROCKNER	30 % EtOH, 3 % Glycerin	10 bis 20 min

Die gefärbten Gele wurden bis zum Trocknen (→ 2.16.6) in Trocknerlösung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.16.3 COOMASSIE® BRILLIANT BLUE R250-FÄRBUNG FÜR NATIVE UND SDS-PAGE

Die gelelektrophoretisch getrennten Proteine können mit dem Farbstoff Coomassie® Brilliant Blue R250 im Gel angefärbt werden. Durch ein saures Milieu wird die ionische Bindung zwischen dem Farbstoff und den basischen Aminosäuren der Proteine gefördert und es findet gleichzeitig eine Fixierung der Proteinbanden im Gel und ein Auswaschen von SDS aus dem Gel statt. Die Entfärbung erfolgte jeweils durch zwei- bis dreifaches Wechseln des Entfärbers. Die **Standard-Coomassie®-Färbung** bei Raumtemperatur erfolgte modifiziert nach FAIRBANKS et al. (1971):

			ZEIT
01	FIXIEREN	2.5 % Isopropanol, 10 % Essigsäure	30 min
02	FÄRBEN	0.1 % Coomassie® Brilliant Blue R250 in 7 % Essigsäure	1 bis 2 h
03	ENTFÄRBEN	7 % Essigsäure	über Nacht

Für Gele, deren Proteine anschließend einer Trypsin-Spaltung (→ 2.20.1, → 2.21.1) unterzogen werden sollten, wurde eine **methanolische Coomassie®-Färbung** (nach Angaben der Keck Facility an der Yale Universität, New Haven, Connecticut, USA, <http://keck.med.yale.edu/prochem/stain.htm>) angewendet:

			ZEIT
01	FIXIEREN + FÄRBEN	0.1 % Coomassie® Brilliant Blue R250 in 50 % MeOH, 12 % Essigsäure	30 bis 50 min
02	ENTFÄRBEN	50 % MeOH, 12 % Essigsäure	1 bis 3 h
03	WÄSSERN	ddH ₂ O	über Nacht

2.16.4 KUPFERCHLORID-FÄRBUNG FÜR PRÄPARATIVE SDS-PAGE

Werden SDS-haltige Polyacrylamidgele nach der Elektrophorese in Kupferchlorid-Lösung gelegt, bildet sich innerhalb von kurzer Zeit in den proteinfreien Bereichen des Gels ein blaugrün-weißes opakes Präzipitat, während die Proteinbanden klar bleiben (Negativ-Färbung nach LEE et al. 1987). Die Sensitivität dieser Methode liegt zwischen der Coomassie[®] Brilliant Blue R250- und der Silber-Färbung und ist für präparative Gele empfehlenswert, da die Proteine während der Inkubation nicht fixiert werden.

Für das Ausschneiden der Proteine mit einem gereinigten Skalpell wurden die Gele auf eine saubere Glasplatte und zur besseren Darstellung der ungefärbten Banden auf einen schwarzen Untergrund gelegt. Das Entfärben erfolgte durch Chelatieren der ausgefallenen Kupferkomplexe mit EDTA in basischem Milieu.

			KLEINE GELE	GROBE GELE
01	FÄRBEN	3 M CuCl ₂	~ 5 min	~ 10 min
02	WASCHEN	ddH ₂ O	2-mal 20 s	
03	ENTFÄRBEN DER AUSGESCHNITTENEN BANDEN	250 mM TRIS/HCl pH 9.0 1 mM EDTA	2- bis 3-mal wechseln, bis die Banden vollständig entfärbt sind	

Die ausgeschnittenen, entfärbten Banden können bis zur Elution der Proteine bei -20 °C gelagert werden.

2.16.5 IMIDAZOL / ZINK-FÄRBUNG FÜR PRÄPARATIVE SDS-PAGE

Das Zinc-stain-and-destain-Kit für die reversible Imidazol / Zink-Färbung von SDS-Gelen nach FERNANDEZ-PATRON et al. (1992) ist wie die Kupferchlorid-Methode (→ 2.16.4) eine inverse Färbung von Proteinen im SDS-Gel. Das Imidazol sorgt dabei für einen stärkeren Kontrast zwischen ungefärbten Proteinbanden und gefärbtem Hintergrund. Der entstehende Imidazol-Zink-Komplex ist bei neutralem oder basischem pH-Wert unlöslich und bildet die weiße Färbung an den proteinfreien Geloberflächen. Das fest an die Proteine gebundene SDS verhindert die Komplexbildung und es kommt zu ungefärbten und - im Vergleich zu fixierenden Coomassie[®] Brilliant Blue R250- oder Silber-Färbungen - zu chemisch nicht modifizierten Banden.

			KLEINE GELE	GROBE GELE
01	WASCHEN	ddH ₂ O	2-mal 20 s	2-mal 1 min
02	VORINKUBIEREN	Lösung A (Imidazol)	10 bis 20 min	
03	FÄRBEN	Lösung B (ZnSO ₄)	30 s	1 min
04	STOPPEN	ddH ₂ O	3-mal 1 min	
05	ENTFÄRBEN DER AUSGESCHNITTENEN BANDEN	Zn-Destain (1X) 25 mM TRIS, 192 mM Glycin	2- bis 3-mal wechseln, bis die Banden vollständig entfärbt sind	

Die Gele wurden nach dem Abstoppen der Farbreaktion gegebenenfalls mit Durchlicht oder mit UV-Licht dokumentiert und können bei Raumtemperatur in ddH₂O für einige Tage aufbewahrt werden, ohne dass sich die Färbung verändert oder die Banden diffundieren. Für das Ausschneiden der Proteine mit einem gereinigten Skalpell wurden die Gele auf eine saubere Glasplatte und zur besseren Darstellung der ungefärbten Banden auf einen schwarzen Untergrund gelegt. Die ausgeschnittenen entfärbten Banden können bis zur Elution der Proteine bei -20 °C gelagert werden.

2.16.6 TROCKNEN VON POLYACRYLAMID-GELEN

Die Gele wurden nach luftblasenfreiem Einwickeln in mit Trockner-Lösung (30 % EtOH, 3 % Glycerin) getränkten, durchsichtigen Cellophanfolien auf einer Glasplatte innerhalb weniger Tage getrocknet und sind dann im Dunkeln bei Raumtemperatur mehrere Jahre haltbar. Die gefärbten Gele der Photoaffinitäts-Markierungs-Experimente (→ 2.13.2) wurden auf Filterpapier ca. 1.5 h bei 60 °C im Vakuum-Geltrockner getrocknet.

2.17 ELUTION VON PROTEINEN AUS POLYACRYLAMID-GELEN

Die zu eluierenden Protein-Banden wurden mit einem EtOH-gereinigten Skalpell aus den Kupferchlorid- (→ 2.16.4) oder Imidazol / Zink-gefärbten (→ 2.16.5) Polyacrylamidgelen ausgeschnitten, in der entsprechenden Entfärber-Lösung entfärbt und mit ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden die Gelstücke in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt, in denen auch die Elution der Proteine nach einer Methode von HAGER & BURGESS (1980) erfolgte. Dazu wurde auf die kleingeschnittenen Banden ein die Gelstücke bedeckendes Volumen Elutionspuffer gegeben und der Ansatz 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

ELUTIONSPUFFER

0.05 M	TRIS/HCl pH 7.9
0.1 % (w/v)	SDS
0.1 mM	Na ₂ -EDTA
2 mM	DTT

Nach Zentrifugation für 1 min bei 20 000 *xg* wurde die proteinhaltige Flüssigkeit ohne Gelstücke in ein frisches 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt, gegebenenfalls ankonzentriert (→ 2.18) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.18 ANKONZENTRIEREN VON PROTEINHALTIGEN LÖSUNGEN

Zum Ankonzentrieren von proteinhaltigen Lösungen wurden die Vakuum-Zentrifugation sowie verschiedene Fällungsmethoden angewendet.

2.18.1 VAKUUM-ZENTRIFUGATION

Die Reaktionsgefäße wurden mit geöffnetem Deckeln in der Zentrifuge positioniert und bis zur gewünschten Volumenreduzierung der Probe im Vakuum mit 240 *xg* bei Raumtemperatur oder 30 °C zentrifugiert. Da bei diesem Verfahren sämtliche Bestandteile der Lösung ankonzentriert werden, diente es lediglich der Volumenreduktion.

2.18.2 ACETON-FÄLLUNG

Die proteinhaltige Lösung wurde mit dem 9fachen Volumen –20 °C kaltem Aceton vermischt und 30 min bis über Nacht bei –20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min bei 14 000 *xg*) wurde der Überstand abgezogen und das Sediment 10 min bei Raumtemperatur bei geöffnetem Deckel getrocknet. Die gefällten Proteine wurden je nach weiterer Verwendung in dem entsprechenden Puffer aufgenommen oder bei –20 °C gelagert.

2.18.3 TCA-FÄLLUNG

Die Fällung von Proteinen aus wässrigen Lösungen durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) ist ein denaturierendes Verfahren und wurde nach der Methode von FROST et al. (1990) durchgeführt. Ein VOL proteinhaltige Lösung wurde mit 1 VOL 25 % TCA sowie 6 VOL 12.5 % TCA versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 13 000 *xg* in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Nach dem Abziehen des Überstandes wurde das Sediment mehrmals mit –20 °C kaltem Aceton gewaschen. Die gefällten Proteine wurden je nach weiterer Verwendung in dem entsprechenden Puffer aufgenommen oder bei –20 °C gelagert.

2.18.4 METHANOL / CHLOROFORM-FÄLLUNG

Diese Methode nach WESSEL & FLÜGGE (1984) ist ebenfalls ein denaturierendes Verfahren und kann gut für die Fällung von Proteinen aus Lösungen mit geringer Proteinkonzentration verwendet werden. Dazu wurden bei Raumtemperatur 1 VOL Proteinlösung mit 4 VOL Methanol gründlich vermischt und 10 s bei 9000 *xg* zentrifugiert. Nach Zugabe von 1 VOL Chloroform (bei hohem Phospholipid-Gehalt sollten 2 VOL verwendet werden) wurde erneut gründlich gemischt und 10 s bei 9000 *xg* zentrifugiert. Zur Phasentrennung wurden schließlich 3 VOL ddH₂O gründlich mit dem Ansatz vermischt und 1 min bei 9000 *xg* zentrifugiert. Die obere wässrige Methanol-Phase wurde abgezogen und verworfen, ohne die proteinhaltige Interphase zu beschädigen. Zum Sedimentieren der ausgefallenen Proteine wurde der Ansatz erneut mit 3 VOL Methanol gründlich vermischt und 2 min bei 9000 *xg* zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen und nach Trocknung an der Luft wurden die gefällten Proteine je nach weiterer Verwendung in dem entsprechenden Puffer aufgenommen oder bei –20 °C gelagert.

2.19 BESTIMMUNG DER N-TERMINALEN AMINOSÄUREN-SEQUENZ

Die N-terminale Proteinsequenzierung mit einem automatischen modularen Sequenzer (KNAUER, Modell 816 mit PTH-online-Injektion) wurde von Mark Oliver Lutter an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Tschesche durchgeführt. Das isolierte Protein wurde an eine PVDF-Membran gebunden in die Reaktionskammer gegeben und dem **Edman-Abbau** unterzogen. Prinzip des Edman-Abbaus ist eine zyklische Abspaltung der jeweils am N-Terminus des Proteins befindlichen Aminosäure durch die Reaktion der Aminogruppe mit Phenylisothiocyanat (PTH) im basischen Milieu und einer anschließenden Spaltung der Peptidbindung im sauren Milieu. Die derivatisierten PTH-Aminosäuren wurden auf einer angeschlossenen PTH-C18-Säule (2.1 x 220 mm, APPLIED BIOSYSTEMS) durch Anlegen eines Acetonitril-Gradienten aufgetrennt und durch den Vergleich des Elutionsprofils mit den PTH-Derivaten aller proteinogenen Aminosäuren bestimmt (EDMAN 1970, EDMAN & BEGG 1976, HUNKAPILLER et al. 1983a, 1983b, XU & SHIVELY 1988).

Zur Probenvorbereitung wurde das eluierte Protein (→ 2.17) zur Reinigung von Salzen und Detergenzien einer Aceton-Fällung unterzogen und erneut im SDS-Gel aufgetrennt (→ 2.15.2). Das Gel wurde zur Entfernung von SDS 15 min mit Blot-Puffer gewaschen und auf eine PVDF-Membran geblottet.

PVDF-BLOT-PUFFER

50 mM	H ₃ BO ₃ /NaOH pH 9
10 %	EtOH (für Proteine zwischen 20 und 80 kDa)
1 mM	DTT

Die für 3 s in 100 % MeOH, 2 min in ddH₂O und 1 min in 100 % EtOH aktivierte PVDF-Membran wurde ebenfalls für 5 min in Blot-Puffer equilibriert. Zum Aufbau des Druckblots wurden auf eine EtOH-gereinigte Glasplatte ein mit Blot-Puffer getränktes Filterpapier, die PVDF-Membran, das Gel, ein weiteres getränktes Filterpapier und eine weitere Glasplatte geschichtet und in einer Plastiktüte über Nacht bei Raumtemperatur mit 4 kg Gewicht beschwert. Die PVDF-Membran wurde anschließend mit Coomassie[®] Brilliant Blue R250 gefärbt, entfärbt und zwischen Filterpapier getrocknet.

			ZEIT
01	FÄRBEN	2 % Coomassie [®] Brilliant Blue R250 in Entfärber	5 min
02	ENTFÄRBEN	45.5 % EtOH, 45.5 % ddH ₂ O, 9 % Essigsäure, 1 mM DTT	5 bis 6 min, bis der Hintergrund entfärbt ist

Alternativ wurde Aceton-gefälltes Protein gelöst und direkt auf eine in die Reaktionskammer passende PVDF-Membran gegeben.

2.20 MASSENSPEKTROMETRISCHE PEPTID-MASSENBESTIMMUNG MIT MALDI-TOF-MS

Bei der MALDI-TOF-MS [Matrix-Assisted Laserdesorptions/Ionisations-Time of flight-Massenspektroskopie] werden zur **Ionenerzeugung** die zu untersuchenden Moleküle mit einer UV-absorbierenden Matrix kokristallisiert und anschließend im Hochvakuum durch den Beschuss mit einem UV-Laserpuls ionisiert. Die **Ionentrennung** geschieht mit einem Flugzeitanalysator (TOF), bei dem die Massenbestimmung (ebenfalls im Hochvakuum) über eine exakte Messung der Zeit erfolgt, welche die beschleunigten Ionen in Abhängigkeit von ihrer Masse zum Zurücklegen einer Strecke im feldfreien Raum bis zum Detektor benötigen. Dabei werden die Molekül-Ionen nach ihrem Masse/Ladungs- (m/z) -Verhältnis aufgetrennt, wobei ein Reflektor-Flugzeit-Massenspektrometer die Genauigkeit der Massenbestimmung erhöht. Da die Ladung z der Molekül-Ionen im ausgewerteten MALDI-Spektrum einfach positiv ist, also $[M+H]^+$ (monoisotopisch), erhält man mit dem (m/z) -Verhältnis die Masse des Molekül-Ions in Dalton (Da). Auf diese Weise können die Massen der Peptide bestimmt werden, die durch den tryptischen Verdau eines Proteins erhalten wurden.

2.20.1 TRYPSIN-SPALTUNG VON PROTEINEN IM SDS-POLYACRYLAMID-GEL

Die Vorbereitung der Proben für die MALDI-Analyse erfolgten nach einer Vorschrift der Keck Facility an der Yale Universität, New Haven, Connecticut, USA (<http://keck.med.yale.edu/prochem/geldig3.htm>). Der Paramylon-Synthase-Komplex wurde mittels SDS-PAGE (→ 2.15.2) aufgetrennt und das Gel anschließend nach der methanolischen Methode mit Coomassie[®] Brilliant Blue R250 gefärbt (→ 2.16.3). Die 54 kDa-Protein-Bande wurde ausgeschnitten, nach Volumenbestimmung der Gelstücke (5 mm^3) in kleinere Stücke zerschnitten und in sterile, mit 60 % (v/v) Acetonitril, 0.1 % (v/v) TFA ausgespülte Reaktionsgefäße überführt. Zur Detektion von verunreinigungsbedingten Störsignalen im Spektrum wurde ein entsprechendes Gelstück ohne Proteine ebenso behandelt. Vor der Trypsin-Spaltung wurden die Gelstücke zunächst durch mehrere Waschschriffe bei Raumtemperatur auf einem Schüttler entfärbt und anschließend in der Vakuum-Zentrifuge vollständig getrocknet.

	ZEIT		
01	250 μl	50 % (v/v) Acetonitril	5 min
02	250 μl	50 % (v/v) Acetonitril, 50 mM NH_4HCO_3	30 min
03	250 μl	50 % (v/v) Acetonitril, 10 mM NH_4HCO_3	30 min

Die Serinprotease Trypsin spaltet die Peptidbindungen spezifisch an der Carboxy-Seite der basischen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R), nicht aber wenn die Aminosäure Prolin (P) folgt. Das verwendete Enzym wurde durch reduktive Methylierung dahingehend modifiziert, dass keine Proteolyse des Trypsins stattfinden kann. Zum Verdau des Proteins im getrockneten Gel wurde den Ansätzen zunächst 0.1 μg Trypsin in 10 mM NH_4HCO_3 in einem Volumen von 5 μl zugegeben, die in 15 min bei Raumtemperatur von den Gelstücken absorbiert wurden. Nach Zugabe von je 20 μl 10 mM NH_4HCO_3 wurden die Proben für 18 h und mit weiteren

10 µl 10 mM NH₄HCO₃ noch einmal für 2.5 h bei 37 °C inkubiert. Die Peptide können für einige Tage bei 4 °C bis zur massenspektrometrischen Analyse gelagert werden.

2.20.2 MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE DER PEPTIDE

Die Peptide wurden zum Herauslösen aus dem Gel für 10 min im Ultraschall-Eisbad behandelt. Die im Folgenden beschriebene Matrix-Peptid-Kristallisierung sowie die Messungen am Massenspektrometer (Reflektor-MALDI-TOF Biflex III, BRUKER DALTONICS) wurden von Marc Oliver Lutter am Zentrum für Genomforschung an der Universität Bielefeld durchgeführt. Ein interner Standard zum Kalibrieren des Massenspektrometers, ein Aliquot des proteinfreien Spaltungsansatzes sowie ein Aliquot der proteinhaltigen Probe wurden mit der Dried-Droplet-Methode auf die Probenplatten aufgetragen. Dazu wurden dreimal hintereinander je 0.6 µl Probe mit je 0.6 µl Matrixlösung vermischt und mit einem Fön getrocknet.

MATRIX-LÖSUNG

10 mg/ml	alpha-Cyano-4-hydroxy Zimtsäure (CHCA)
5 % (v/v)	TFA
60 % (v/v)	Acetonitril

Nach Installation des Probenblockes im Massenspektrometer wurde das Hochvakuum gezogen und das Gerät mit dem internen Standard kalibriert. Anschließend wurde die proteinfreie Kontrolle gemessen und schließlich erfolgte eine vierfache Messung der proteinhaltigen Probe, deren Spektren gemittelt und manuell nachbearbeitet wurden. Die Analyse der erhaltenen Peptid-Massen erfolgte u.a. mit dem Programm MASCOT.

2.21 MASSENSPEKTROMETRISCHE PEPTID-SEQUENZIERUNG MIT ESI-QTOF-MS/MS

Im Unterschied zur MALDI-Massenspektroskopie bedient sich die **Electrospray Ionisations-Quadrupol-Time of flight-Massenspektroskopie** [ESI-QTOF-MS/MS] anderen Methoden zur Ionenerzeugung und zur Ionentrennung, so dass mit diesem auch als Tandem-Massenspektrometrie bezeichneten Verfahren nicht nur die Massenbestimmung sondern auch die Sequenzierung von ausgewählten Peptiden möglich wird. Die **Ionenerzeugung** erfolgt hier durch die Dispersion der gelösten zu untersuchenden Moleküle in viele kleine geladene Tröpfchen und anschließender Desolvatisierung der Ionen in die Gasphase mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes unter Atmosphärendruck. Bei der **Ionentrennung** mit einem Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer können im MS-Modus die Peptid-Ionen-Massen im Hochvakuum bestimmt werden. Im MS/MS-Modus dagegen wird ein einzelnes mit Hilfe der vier parallelen stabförmigen Metallelektroden des Quadrupols ausselektiertes Peptid-Ion in einer gasgefüllten Kollisionskammer fragmentiert und die Massen der dabei freiwerdenden Aminosäuren analysiert. Da jede Aminosäure eine definierte Masse besitzt, kann das erhaltene Spektrum mit Hilfe geeigneter Programme in eine Aminosäure-Sequenz des Peptides übersetzt werden. Charakteristisch für den ESI-Prozess ist, dass es zur Bildung von mehrfach geladenen

Ionen kommt, so dass man hier zweifach $[M-2H]^{2+}$ oder dreifach $[M-3H]^{3+}$ geladene Peptidmassen erhält.

Die nachfolgend beschriebene massenspektrometrische Sequenzierung wurde von Herrn Dr. Markus Piotrowski am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Dazu wurde das eluierte Protein (→ 2.17) erneut einer SDS-PAGE (→ 2.15.2) unterzogen, anschließend nach der methanolischen Methode mit Coomassie[®] Brilliant Blue R250 gefärbt (→ 2.16.3) und Herrn Dr. Piotrowski für die weiteren Analysen übersandt.

2.21.1 TRYPSIN-SPALTUNG VON PROTEINEN IM SDS-POLYACRYLAMID-GEL

Die Hydrolyse der Proteine mit Trypsin erfolgte nach JENSEN et al. (1998). Das zu hydrolysierende Protein wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ca. 1 mm³ große Würfel zerteilt und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke wurden durch zweimalige Inkubation in 50 % (v/v) Acetonitril (doppeltes Gelvolumen, 15 min) entfärbt, in 100 % Acetonitril entwässert (5 min) und durch die sequentielle Zugabe von 100 mM Ammoniumbicarbonat (einfaches Gelvolumen, 5 min) und 100 % Acetonitril (einfaches Gelvolumen, 15 min) rehydriert. Anschließend wurden die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und dann durch Zugabe der Trypsinlösung (10 ng/μl) wieder rehydriert. Nach vollständiger Quellung der Gelstücke wurden diese mit 25 mM Ammoniumbicarbonat überschichtet. Die Hydrolyse erfolgte über Nacht bei 37° C. Der Überstand wurde gesammelt und die Peptide durch sequentielle Inkubation in 100 mM Ammoniumbicarbonat (doppeltes Gelvolumen, 20 min), 50 mM Ammoniumbicarbonat, 50 % (v/v) Acetonitril (doppeltes Gelvolumen, 15 min) und abschließend zweimalig in 2.5 % (v/v) Ameisensäure, 50 % (v/v) Acetonitril aus dem Gel extrahiert. Die Extrakte wurden gesammelt und in einer Vakuumzentrifuge eingengt (~ 5 μl).

2.21.2 MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNG DER TRYPSINFRAGMENTE

Die Peptide wurden nach der Elution aus dem Gel durch Umkehrphasen-Festphasenextraktion mit Zip-Tips C18 (MILLIPORE) nach Angaben des Herstellers entsalzt und in 1 μl 60 % (v/v) Acetonitril, 0.1 % (v/v) Trifluoressigsäure eluiert. Das Peptidgemisch wurde anschließend mittels Nano-Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie mit einem Quadrupol-Flugzeitmessungs-Hybrid-Massenspektrometer (QTOF2, MICROMASS, Manchester, UK) im Positiv-Ionen-Modus analysiert. Die Aufnahme der Spektren erfolgte im MS-Modus in einem *m/z*-Bereich von 400 bis 1200. Für jedes Spektrum wurden die Daten von 2.4 s addiert. Doppelt oder dreifach geladene Peptide wurden anschließend zur kollisionsinduzierten Fragmentierung im MS/MS-Modus ausgewählt. Die Interpretation der MS/MS-Spektren erfolgte manuell mit Unterstützung der Programme MAXENT3 und PROTEINLYNX der MASSLYNX 3.5 Software (MICROMASS, Manchester, UK).

B2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.22 DNA-ISOLIERUNG

Zur Isolierung von Gesamt-DNA mit dem DNEASY[®]-Plant-Mini-Kit wurden je nach Zelldichte 1 bis 5 ml Zellkultur für 3 min bei 5700 *xg* abzentrifugiert und das Zellsediment mit 1 ml H₂O_{nano} gewaschen. Der Zellaufbruch erfolgte manuell durch Mörsern in flüssigem Stickstoff mit anschließender Zelllyse im RNase A-haltigen Puffer des Kits bei 65 °C. Nach der Salzfällung und Abtrennung von Detergenzien, Proteinen und Polysacchariden mit einer QIASHREDDER[™]-SPIN-Säule wurde die isolierte DNA über eine DNEASY[®]-MINI-SPIN-Säule mit Silikamembran gereinigt und schließlich durch einen Puffer mit niedrigem Salzgehalt oder H₂O_{nano} eluiert. Die DNA wurde in Aliquots von 25 µl bei –20 °C gelagert.

2.23 RNA-ISOLIERUNG

Zur Isolierung von RNA (> 200 Nukleotide) mit dem RNEASY[®]-Mini-Kit nach dem Protokoll – Isolierung aus Pflanzen und Pilzen– wurden je nach Zelldichte 1 bis 10 ml Zellkultur für 3 min bei 5700 *xg* abzentrifugiert und das Zellsediment mit 1 ml H₂O_{nano} gewaschen. Der Zellaufbruch erfolgte manuell durch Mörsern in flüssigem Stickstoff mit anschließender Zelllyse im beta-Mercaptoethanol-haltigen Puffer RLT (Guanidin-Isothiocyanat) des Kits bei Raumtemperatur. Die Abtrennung der RNA von den übrigen Bestandteilen der Zellen erfolgte über eine QIASHREDDER-SPIN Säule, die anschließende Reinigung der RNA über eine RNEASY[®]-MINI-SPIN-Säule (Silikamembran). Abschließend wurde die RNA mit nukleasefreiem H₂O eluiert und in Aliquots von 25 µl bei –20 °C oder –80 °C gelagert.

2.24 OLIGONUKLEOTID-PRIMER-DESIGN

Für die Primer wurden geeignete Bereiche aus den Alignments der beta-1,3-Glucan-Synthasen bzw. der Peptide und der Gensequenz der Paramylon-Synthase nach den Kriterien von RYCHLIK (1995a, 1995b) ausgewählt bzw. abgeleitet und mit Programmen zur Primeranalyse (Oligo 4.0 und Oligo Analyzer 1.0.3) überprüft. Die verwendeten Primer sind in Kapitel 2.7 aufgeführt.

Die optimale Annealing-Temperatur für den Einsatz der Primer in der PCR (→ 2.25) richtet sich nach der Basenzusammensetzung der Oligonukleotide und muss für jede Template / Primerkombination empirisch ermittelt werden. Bei zu niedrigen Temperaturen können unspezifische Primerbindungen erfolgen, zu hohe Temperaturen können dagegen die Bindung erschweren oder verhindern. Die maximale Temperatur T_m wird nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = [4\text{ °C} \times (C+G) + 2\text{ °C} \times (A+T)]$$

2.25 POLYMERASE-KETTENREAKTION [PCR]

In Anlehnung an die natürliche DNA-Replikation in der Zelle erlaubt die von MULLIS et al. (1986) entwickelte PCR die gezielte Amplifikation ausgewählter DNA-Abschnitte. Eine zyklische Temperatur-Veränderung im Reaktionsansatz begünstigt die exponentielle Vermehrung des DNA-Fragmentes, welches von den beiden spezifischen, einzelsträngigen und zur Zielsequenz komplementären Oligonukleotiden (Primer → 2.7, 2.24) begrenzt wird. Sowohl in einer initialen Phase als auch zu Beginn von jedem Zyklus wird die doppelsträngige DNA (Template) durch Erwärmung auf 94 °C in ihre Einzelstränge getrennt [Denaturierung]. Die geeignete Temperatur für die Bindung der Oligonukleotide an die einzelsträngige DNA [Annealing] ist u.a. abhängig von der Sequenz der Primer und dem Grad der Komplementarität zur DNA-Matritze und lag für diese Arbeit zwischen 45 °C und 55 °C. Die Taq-Polymerase, ein hitzestabiles rekombinantes Enzym aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, synthetisiert bei ihrem Temperaturoptimum von 72 °C ausgehend von den doppelsträngigen Primer-Bindestellen aus den im Ansatz enthaltenen Nukleotiden den jeweils komplementären DNA-Strang [Extension] in 5' – 3' Richtung. Die Extensionszeit richtet sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Am Ende des Zyklus entsteht aus jedem DNA-Einzelstrang wieder ein doppelsträngiges Molekül, dessen Länge durch die beiden Primer festgelegt wurde und die im nächsten Zyklus wieder als Matritze dienen. Nach 30 bis 35 dieser dreiteiligen Zyklen [Denaturierung, Annealing, Extension] werden abschließend alle begonnenen Polymerisationen in einer finalen Extensionsphase vervollständigt. Ein typisches PCR-Programm für ein DNA-Fragment von 1 kb sieht wie folgt aus:

		TEMPERATUR	ZEIT
01	INITIALE DENATURIERUNG	94 °C	3 min
02	DENATURIERUNG	94 °C	30 s
03	ANNEALING	45-55 °C	30 s
04	EXTENSION	72 °C	1 min
05	FINALE EXTENSION	72 °C	10 min
06	ENDE	4 bis 15 °C	

Die Taq-Polymerase besitzt die Eigenschaft der "Nicht-Matritzenabhängigen Polymerisationsaktivität", durch die an das 3'-Ende des PCR-Produktes ein Adenin-Nukleotid angehängt wird. Dieses ist die Voraussetzung für eine Ligation des PCR-Produktes in einen Vektor mit Thymin-Nukleotid-Überhang, wie es bei dem verwendeten TOPOTM-TA-Cloning[®]-Kit (→ 2.30) der Fall ist. Im Folgenden ist eine typische Mastermix-Zusammensetzung angegeben. Das Template (genomische DNA oder cDNA oder Plasmid-DNA) wurde als Vorlage direkt in die PCR-Gefäße gegeben und gründlich mit dem Mastermix vermischt.

PCR-MASTERMIX

10X Taq-Puffer	ENDKONZENTRATION
dNTP-Mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, je 2.5 mM)	1X
MgCl ₂	je 0.2 mM
Primer forward [10 pmol/μl]	1.1 bis 2.5 mM
Primer reverse [10 pmol/μl]	50 pmol
Taq-DNA-Polymerase	50 pmol
	0.625 bis 1.25 U
ENDVOLUMEN	25 bis 50 μl

2.26 REVERSE TRANSKRIPTION

Da sich mRNA nicht als Template für die Taq-DNA-Polymerase eignet, wurde diese vor dem Einsatz in der PCR in den komplementären DNA-Einzelstrang umgeschrieben. Diese cDNA-Synthese erfolgte mit einer AMV-Reversen Transkriptase, also einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase aus dem *Avian Myeloblastosis Virus*, die Bestandteil des Reverse-Transcription-Systems von PROMEGA ist (GOODMAN & MACDONALD 1979). Als Primer für die cDNA-Synthese wurden Oligo(dT)₁₅-Nukleotide verwendet, die an die Poly-Adenosin-3'-Enden der mRNA binden und somit zur Reversen Transkription aller im Ansatz vorhandenen mRNA-Moleküle führen. Die Synthese von cDNA einer bestimmten mRNA erfolgte mit Gen-spezifischen reversen Primern, die komplementär zu einer bereits bekannten Sequenz sind.

REVERSE TRANSKRIPTION

	VOLUMEN	ENDKONZENTRATION
25 mM MgCl ₂	4 µl	5 mM
Reverse Transkription 10X Puffer	2 µl	1X *
dNTP-Mix [je 10 mM]	2 µl	je 1 mM
Recombinant RNasin® Ribonuklease Inhibitor [40 U/µl]	0.5 µl	20 U
AMV Reverse Transkriptase [20 U/µl]	0.5 bis 1 µl	10 bis 20 U
Oligo(dT) ₁₅ -Primer [0.5 µg/µl] <u>oder</u>	1 µl	0.5 µg
Gen-spezifischer reverser Primer	2 µl	20 pmol
Gesamt RNA	1 bis 2 µl	
Nukleasefreies H ₂ O (ENDVOLUMEN)	20 µl	

* 10 mM TRIS/HCl pH 9, 50 mM KCl, 0.1 % Triton® X-100

Entsprechend dem Protokoll für die Reverse Transkription (siehe unten) wurde die mRNA zunächst bei 70 °C inkubiert, bevor die anderen Komponenten des Ansatzes in der angegebenen Reihenfolge hinzugegeben wurden.

	TEMPERATUR	ZEIT
01 VORINKUBATION DER RNA	70 °C	10 min
02 Zugabe der Komponenten des Ansatzes		
03 REVERSE TRANSKRIPTION	42 °C	15 min
04 AMV REVERSE TRANSKRIPTASE INAKTIVIEREN	99 °C	5 min
05 KÜHLEN	4 °C	5 min

Im Anschluss an die Reverse Transkription wurde der 20 µl-Ansatz mit 80 µl nukleasefreiem H₂O verdünnt und in Aliquots à 25 µl bei -20 °C gelagert. Für die anschließende PCR wurden 5 µl dieser einzelsträngigen cDNA als Template verwendet.

2.27 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE ZUR AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN

Die negativ geladenen Nukleinsäuren DNA und RNA wandern im elektrischen Feld zur Anode und lassen sich in Agarosegelen nach Größe und Molekül-Konformation auftrennen.

Für die Gelelektrophorese wurde 0.8 bis 1 % (w/v) Agarose in TA-Puffer durch mehrfaches Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Für präparative Elektrophoresen wurde bei Bedarf spezielle Agarose (→ 2.2) verwendet. Die Gellösung wurde mit 1 ppm Ethidiumbromid versetzt, in eine Horizontalgelkammer mit einem Gelvolumen von 25 ml gegossen und mit einem Kamm mit Probenauftragstaschen versehen.

TA-PUFFER

40 mM	TRIS/Acetat pH 7.5 bis pH 8.0
1 mM	Na ₂ -EDTA (Titriplex III)

Nach ca. 30 min wurde das auspolymerisierte Agarosegel mit TA-Puffer bedeckt und der Kamm entfernt. Bei präparativen Elektrophoresen sollte auf jeden Fall frischer Puffer verwendet werden. Die Proben wurden mit 0.2 Vol 5X Lade-Puffer vermischt in die Taschen pipettiert und bei konstant 100 V für ca. 30 min aufgetrennt. Als Größenvergleich und zur Quantifizierung der DNA dienten linearisierte DNA-Längenstandards (→ 2.7), die ebenfalls mit 5X Lade-Puffer vermischt wurden, so dass eine Konzentration von 0.08 bis 1 µg/µl Standard aufgetragen wurde.

5X LADE-PUFFER

100 mM	TRIS/Acetat pH 7.5
50 mM	Na ₂ -EDTA (Titriplex III)
15 % (w/v)	Ficoll
0.5 % (w/v)	SDS
0.05 % (w/v)	Bromphenolblau
0.05 % (w/v)	Xylencyanol

Die Detektion und Dokumentation der durch fluoreszierendes Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden erfolgte mit UV-Durchlicht, wobei die Nachweisgrenze bei 10 bis 20 ng pro Bande liegt. Aus präparativen Gelen wurden die zu eluierenden Banden schnell und ohne vorherige Dokumentation auf einem Durchlicht-UV-Tisch ausgeschnitten, da die DNA durch das kurzwellige Licht geschädigt wird.

2.28 EXTRAKTION VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSE-GELEN

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem E.Z.N.A.[®]-Gel-Extraction-Kit nach Angaben des Herstellers. Das Kit erlaubt die Extraktion von Molekülgrößen zwischen 50 bp und 40 kb mit einer Ausbeute von 90 bis 95 %. Dazu wurde die zu eluierende DNA in einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese (→ 2.27) aufgetrennt, unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in dem vierfachen Volumen Binde-Puffer bei 55 bis 65 °C gelöst. Nach Bindung der DNA an eine HiBIND[®]-Silikamembran und einigen Waschschritten erfolgte die Elution der DNA mit Nidrigsalzpuffer oder H₂O_{nano}. Die eluierte DNA wurde direkt für Ligationen oder PCR-Kontrollen eingesetzt, die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.29 REINIGUNG VON DNA

2.29.1 REINIGUNG MIT DEM E.Z.N.A.[®]-CYCLE-PURE-KIT

Vor der Klonierung wurden PCR-Amplifikate mit dem E.Z.N.A.[®]-Cycle-Pure-Kit nach Herstellerangaben gereinigt. Das Kit erlaubt die Reinigung von 50 bp bis 40 kb Fragmenten mit einer Ausbeute von 90 % der eingesetzten DNA. Dazu wurden die PCR-Ansätze mit einem speziellen Binde-Puffer vermischt, der eine Anheftung der DNA an die HiBIND[®]-DNA-SPIN-Säulen ermöglicht. Die an die Silikamembran gebundenen DNA-Fragmente wurden durch mehrere Waschstschritte von Salzen, dNTP's, Oligonukleotiden und Enzymen gereinigt, mit H₂O_{nano} eluiert und direkt für alle Folgeexperimente eingesetzt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

2.29.2 N-BUTANOL-FÄLLUNG

Zur Ankonzentrierung isolierter Plasmide oder DNA-Fragmente wurden die Ansätze mit 10 VOL n-Butanol versetzt und für 10 s kräftig gemischt (Trübung der Lösung). Nach Zentrifugation (15 min bei 15 000 *xg*) wurde der Überstand vollständig abgezogen und das DNA-Sediment mit 1 ml EtOH gewaschen (5 min Raumtemperatur, dann 5 min 15 000 *xg*). Der ethanolische Überstand wurde gründlich abgezogen, die DNA 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und in dem gewünschten Volumen H₂O_{nano} für 5 min bei 60 °C im Wasserbad gelöst.

2.29.3 PHENOLISIERUNG UND ETOH-FÄLLUNG

Die DNA-haltige Probe wurde zur Phenolisierung mit 1 VOL Roti[®]-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol [PCIA 25:24:1] vermischt und 5 min bei 15 000 *xg* zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 0.8 VOL Isopropanol und 1/10 VOL 3 M NaOAc (pH 6.5) gut vermischt für 20 min auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 15 000 *xg* wurde das Sediment mit 1 ml 70 % EtOH gewaschen und schließlich 10 bis 20 min bei 50 °C mit geöffnetem Deckel im Heizblock getrocknet. Das Lösen der DNA erfolgte in sterilem H₂O, gegebenenfalls durch kurzzeitige Erwärmung auf 60 °C.

2.30 KLONIERUNG

Das TOPO[™]-TA-Cloning[®]-Kit beinhaltet chemisch kompetente *Escherichia coli*-Zellen des Stammes TOP10F' (Lagerung bei -80 °C, vorsichtiges Auftauen auf Eis) und linearisierte Plasmidvektoren (pCR[®]2.1-TOPO[®]) mit Thymidin-Überhängen an den 3' -Enden (= T-tail Vektoren), an die das Enzym Topoisomerase I gebunden ist. Diese Plasmide ermöglichen eine Ligation mit DNA-Fragmenten, die mit der Taq-Polymerase amplifiziert wurden (→ 2.25), da diese einen Adenin-Überhang aufweisen.

Für die **Ligation** wurde 0.5 µl Vektor und 0.5 µl Salzlösung pro Ansatz mit 2 bis 4 µl PCR-Produkt vermischt und 10 min bei 25 °C inkubiert. Die **Transformation** der Konstrukte in die chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte nach Inkubation des Ansatzes für 10 bis 30 min auf Eis (Anlagerung der Vektoren an die Zelloberflächen) durch einen Hitzeschock (30 s bei 42 °C), der zur Aufnahme der Plasmide in die Zellen führt. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden die Transformanden zur Aktivierung ihres Stoffwechsels mit 250 µl 25 °C warmem SOC-Medium vermischt und 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 50 bis 150 µl der Suspension auf LB-AIX-Platten (→ 2.31.2) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Die Selektion von positiven Transformanden (enthalten Plasmid und kloniertes Insert) erfolgte über eine Plasmid-vermittelte **Ampicillin-Resistenz** sowie eine Insert-abhängige **Blau-Weiß-Selektion**. Letztere basiert auf dem im Plasmid enthaltenen *lacZ*-Gen für die beta-Galactosidase. Die Expression des intakten *lacZ*-Gens (Plasmid ohne Insert) wird durch IPTG (Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranosid) induziert, so dass das Enzym das ebenfalls im Medium enthaltene X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galactopyranosid) zu dem blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlorindigo umsetzt. Trägt das aufgenommene Plasmid dagegen wie gewünscht ein Insert, unterbleibt die Farbreaktion normalerweise, da der Insertionsort im *lacZ*-Gen liegt.

Zur weiteren Analyse wurden pro Klonierung einige weiße Kolonien (Plasmid mit Insert) sowie als Negativ-Kontrolle eine blaue Kolonie (Plasmid ohne Insert) in Flüssigmedium (→ 2.31.1) überführt und mittels PCI (→ 2.32) und Colony-PCR (→ 2.33) charakterisiert.

2.31 KULTIVIERUNG VON *E. COLI*-ZELLEN

Die Anzucht und die dauerhafte Aufbewahrung von *Escherichia coli*-Zellen erfolgte in Antibiotika-haltigem LB-Medium als Flüssigkulturen (→ 2.31.1), auf Agarplatten (→ 2.31.2) oder in Form von Glycerin-Dauer-Kulturen (→ 2.31.3).

LB-MEDIUM (LURIA BERTANI) verändert nach SAMBROOK et al. 1989

1 % (w/v)	Trypton
0.5 % (w/v)	Hefe-Extrakt
0.5 bis 1 % (w/v)	NaCl

Für die Anzucht der *E. coli*-Stämme SOLR und XL1-BlueMRF', wurde mit 1N NaOH ein pH-Wert von 7.5 eingestellt. Das LB-Medium wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert und vor der Zugabe der Antibiotika auf 50 °C abgekühlt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

ANTIBIOTIKA

	STAMMLÖSUNG	ENDKONZENTRATION	FÜR DEN <i>E. COLI</i> -STAMM
Ampicillin	50 mg/ml H ₂ O _{nano}	100 µg/ml	TOP10F', SOLR nach Transfektion
Kanamycin	50 mg/ml H ₂ O _{nano}	50 µg/ml	SOLR
Tetracyclin	12.5 mg/ml EtOH	12.5 µg/ml	XL1-BlueMRF'

LB-Medium mit Antibiotikum wird im Folgenden als LB⁺-Medium bezeichnet.

2.31.1 KULTIVIERUNG IN FLÜSSIGKULTUREN

Zur Vermehrung von *E. coli*-Klonen wurden Flüssigkulturen in sterilen, mit Wattestopfen verschlossenen Reagenzgläsern angelegt. Dazu wurde an der Sterilbank wenig Zellmaterial einer Kolonie von einer Agarplatte mit einem autoklavierten Zahnstocher in 2 ml LB⁺-Medium gegeben. Zur Isolierung von Plasmiden (→ 2.34) wurden 18 ml LB⁺-Medium mit 5 bis 10 µl einer Flüssigkultur angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

2.31.2 KULTIVIERUNG AUF AGARPLATTEN

Zur Herstellung von Agarplatten wurde vor dem Autoklavieren Agar-Agar zu dem LB-Medium (→ 2.31) hinzugegeben. Nach Abkühlung des LB-Agars auf 50 °C wurden für LB-AIX-Platten das Antibiotikum Ampicillin sowie die beiden für die Blau-Weiß-Selektion (→ 2.30) benötigten Substanzen IPTG und X-Gal hinzugefügt:

LB-AIX-PLATTEN

	ENDKONZENTRATION	
LB-Medium	→ 2.31	20 min bei 121 °C autoklavieren
Agar-Agar	1.5 % (w/v)	
Ampicillin [50 mg/ml]	100 µg/ml	nach Abkühlung auf 50 °C hinzufügen
IPTG [200 mg/ml H ₂ O _{nano}]	320 µg/ml	
X-Gal [20 mg/ml Dimethylformamid]	32 µg/ml	

Der flüssige LB-Agar wurde an der Sterilbank in 25 ml Portionen in sterile Petrischalen gegossen, die nach dem Auspolymerisieren über Kopf bei 4 °C gelagert wurden. Die Erhaltungskulturen der *E. coli*-Stämme SOLR und XL1-BlueMRF' wurden auf Agarplatten ohne IPTG und X-Gal mit den oben angegebenen Antibiotika (→ 2.31) angelegt.

2.31.3 ANLEGEN VON GLYCERIN-DAUER-KULTUREN

850 µl frische Flüssigkultur wurde mit 150 µl sterilem Glycerin (100 %) gründlich vermischt und sofort eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.32 CHARAKTERISIERUNG DER PLASMIDE: PCI-QUICK PREP

Die Vorauswahl der Klone mit dem gewünschten Insert erfolgte zunächst über eine Größenbestimmung der vorhandenen Plasmide im Vergleich zum Plasmid ohne Insert aus einer blauen Kolonie (HILLIS et al. 1996). Dazu wurden 30 µl *E. coli*-Zellen aus einer frischen Flüssigkultur phenolisiert, d.h. mit 30 µl organischem Lösungsmittel (PCI-Lösung) durch gründliches Vermischen aufgebrochen.

PCI-LÖSUNG

Phenol	25 VOL
Chloroform	24 VOL
Isoamylalkohol	1 VOL

kräftig vermischen, nach Phasentrennung die untere organische Phase verwenden, bei 4 °C lagern

Durch Zentrifugation (5 min bei 7000 xg) wurde die Plasmid-DNA vom Zelldebris getrennt, so dass 5 bis 7 μ l der oberen wässrigen Phase direkt in der Agarose-Gelelektrophorese (\rightarrow 2.27) analysiert werden konnten. Da die Vektoren in einer „supercoiled“-Konformation vorliegen, legen sie im Vergleich zu einem linearisierten Längenstandard weitere Laufstrecken im Gel zurück. Die Abschätzung der Insertgröße war also mit dieser Methode nur begrenzt möglich.

2.33 CHARAKTERISIERUNG DER INSERTS: COLONY-PCR

Mit der Colony-PCR wurde überprüft, ob die in der PCI (\rightarrow 2.32) positiven Klone das gewünschte Insert tragen. Dabei wurde die gleiche oder eine intern gelegene Oligonukleotid-Primer-Kombination verwendet, durch die das klonierte PCR-Produkt erhalten wurde. Als Template für eine Colony-PCR dienten einige *E. coli*-Zellen aus der Kolonie (mit einem autoklavierten Zahnstocher direkt in das PCR-Gefäß gegeben) oder 1 μ l einer Flüssigkultur. Die Bakterienzellen wurden bereits durch die Initiale Denaturierung bei 94 °C zerstört, so dass die Vektoren für die Primer zugänglich waren. Im Unterschied zu einer PCR mit DNA oder cDNA als Template (\rightarrow 2.24) wurden hier geringere Primermengen und ein reduziertes Ansatzvolumen verwendet, da die Plasmide in vergleichsweise hoher Konzentration vorlagen.

COLONY-PCR-MASTERMIX

	ENDKONZENTRATION
10X Taq-Puffer	1X
dNTP-Mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, je 2.5 mM)	je 0.2 mM
MgCl ₂	1.1 bis 2.5 mM
Primer forward [10 pmol/ μ l]	10 pmol
Primer reverse [10 pmol/ μ l]	10 pmol
Taq-DNA-Polymerase	0.5 bis 1.0 U
ENDVOLUMEN	12 bis 15 μ l

Die Änderungen des PCR-Protokolls für die Colony-PCR betrafen hauptsächlich reduzierte Annealing- und Extensionszeiten:

	TEMPERATUR	ZEIT
01 INITIALE DENATURIERUNG	94 °C	3 min
02 DENATURIERUNG	94 °C	15 s
03 ANNEALING	50 °C	15 s
04 EXTENSION	72 °C	30 s
05 FINALE EXTENSION	72 °C	5 min
06 ENDE	4 bis 15 °C	

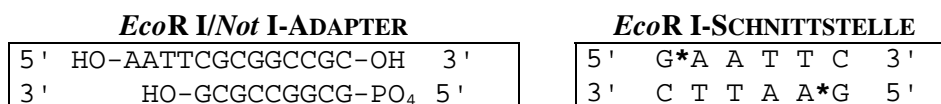
Im Anschluss an die Colony-PCR wurden 2 bis 5 μ l des PCR-Produktes in der Agarose-Gelelektrophorese (\rightarrow 2.27) analysiert.

2.34 PLASMIDISOLIERUNG

Die Isolierung der High Copy-Number-Plasmide pCR2.1TOPO[®] und pBluescriptSK⁻ aus frischen Flüssigkulturen der *E. coli*-Stämme TOP10F' bzw. SOLR erfolgte mit dem E.Z.N.A.[®]-Plasmid-Miniprep-Kit II nach Herstellerangaben. Dazu wurden 18 ml LB-Medium mit 100 µg Ampicillin/ml (→ 2.31) mit 10 µl einer Flüssigkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Das Zellsediment wurde über eine alkalische Lyse unter Zusatz von RNase A aufgebrochen und anschließend neutralisiert. Das von bakteriellem Debris geklärte Lysat wurde auf eine HiBIND[®]-MINIPREP-Säule (Silikamembran) geladen und durch mehrere Waschschriffe gereinigt. Die Plasmid-DNA wurde schließlich mit H₂O_{nano} von der trockenen Säule eluiert und bei -20 °C gelagert. Vor der Sequenzierung wurde die Qualität und die Ausbeute der Plasmid-DNA in der Agarose-Gelelektrophorese (→ 2.27) überprüft.

2.35 RESTRIKTIONSSPALTUNG

Restriktionsenzyme erkennen hoch spezifisch Sequenzabschnitte von vier bis acht Basenpaaren und schneiden abhängig vom Methylierungsmuster die doppelsträngige DNA an definierten Stellen. Ausgangsmaterial für die Spaltung waren pBluescriptSK⁻-Plasmide aus einer ansequenzierten *Euglena gracilis*-cDNA-Phagen-Bank (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. William F. Martin, Institut für Botanik III an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf, → 2.36). Da alle klonierten cDNA-Moleküle der Bank mit *EcoR* I/*Not* I-Adaptoren versehen sind, ließen sich die Inserts zur Größenbestimmung und zur Gewinnung des 415 bp-Fragmentes als Hybridisierungs-sonde mit dem Restriktionsenzym *EcoR* I aus dem Plasmid ausschneiden. Die Restriktions-Endonuklease *EcoR* I spaltet spezifisch an den mit Sternen gekennzeichneten Stellen der folgenden palindromischen Sequenz, so dass man „sticky ends“ mit 3'-Überhängen erhält:



EcoR I-RESTRIKTIONSSPALTUNGS-ANSATZ

GRÖßENBESTIMMUNG	SONDENGWINNUNG
10X SuRE/Cut Puffer H 2 µl	10X <i>EcoR</i> I+ Puffer 50 µl
<i>EcoR</i> I [10 U/µl] 0.5 bis 1 µl	<i>EcoR</i> I [10 U/µl] 7.5 µl
Plasmid-DNA [~ 1 µg/µl] 5 µl	Plasmid-DNA [~ 1 µg/µl] 70 µl
H ₂ O _{nano} 3 bis 8µl	steriles H ₂ O 372.5 µl
ENDVOLUMEN 20 µl	ENDVOLUMEN 500 µl

Die Ansätze wurden 1 bis 3.5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Fragmentgrößen und die Vollständigkeit der Spaltung in der Agarose-Gelelektrophorese (→ 2.26) überprüft.

2.36 SCREENING VON cDNA-PHAGEN-BANKEN

Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. William F. Martin am Institut für Botanik III an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf mit den dort vorhandenen Geräten und Chemikalien durchgeführt.

Das Screening erfolgte bei zwei verschiedenen cDNA-Phagen-Banken von *Euglena gracilis* strain Z (Klebs; SAG 1224-5/25): Für die **aerobe cDNA-Phagen-Bank** (eg0030, Titer 3.6×10^7 Plaques/ μl , Insertionsrate 90 %) wurden die Zellen in organischem Medium (*Euglena*-Medium 9a mit Mineralien nach SCHLÖSSER 1994) mit 2 % CO_2 in Luft und mit Beleuchtung, also unter mixotrophen Nahrungsbedingungen kultiviert. Die **anaerobe cDNA-Phagen-Bank** (eg0040, Titer 6×10^6 bis 1.3×10^7 Plaques/ μl , Insertionsrate 10 %) stammt aus 2-tägig im Dunkeln mit 2 % CO_2 in N_2 , also heterotroph kultivierten Zellen. Ausgangspunkt für das Screening war ein ansequenziertes Plasmid aus der anaeroben cDNA-Phagen-Bank, dessen 405 bp-Insert unter anderem für vier der massenspektrometrisch sequenzierten (\rightarrow 2.21) Peptide des 54 kDa-Proteins aus dem Paramylon-Synthase-Komplex kodierte. Dieses Fragment diente als Sonde für das Hybridisieren der Banken.

Die Isolierung der mRNA aus *Euglena gracilis*, die cDNA-Synthese mit dem cDNA-Synthesetkit [PHARMACIA], die Ligation der *EcoR* I/*Not* I-Adaptoren an die doppelsträngige cDNA und die Klonierung in den Lambda-ZAP[®]-II-Vektor mit dem Lambda-ZAP[®]-II-Predigested-*EcoR* I/CIAP-Treated-Vector-Kit [STRATGENE] sowie weitere für die Erstellung der cDNA-Phagen-Banken nötigen Methoden wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. William F. Martin wie in folgenden Veröffentlichungen beschrieben durchgeführt: HENZE et al. 1995, HANNAERT et al. 2000, ROTTE et al. 2001.

2.36.1 HERSTELLUNG UND MARKIERUNG DER HYBRIDISIERUNGS-SONDE

Als Sonde für das Durchsuchen der cDNA-Phagen-Banken diente ein [³²P]-markiertes 405 bp-Fragment aus einem sequenzierten Plasmid der anaeroben Bank. Dieses Fragment kodiert unter anderem für zwei der ESI-Peptide aus dem 54 kDa-Protein des Paramylon-Synthase-Komplexes. Nach dem Verdau des Plasmids mit der Restriktionsendonuklease *EcoR* I wurde der Spaltungsansatz (\rightarrow 2.35) aus 70 μg Plasmid zunächst phenolisiert und gefällt (\rightarrow 2.29.3). Der gereinigte Spaltungsansatz wurde in 100 μl sterilem H_2O gelöst, in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und die 405 bp-Fragment-Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Elution des Fragmentes aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick[®]-Gel-Extraction-Kit nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die eluierte DNA noch einmal über eine QIAQUICK[®]-SPIN-Säule gereinigt und in einer analytischen Agarose-Gelelektrophorese quantifiziert. 200 ng des 405 bp-Fragmentes in TE-Puffer wurden von Herrn Dr. Kay (Hartmann Analytik, Braunschweig) mittels „random priming“ [³²P]-markiert. Die Sonde lag schließlich in einem Volumen von 50 μl mit einer Gesamtaktivität von 5 MBq (135 μCi) vor.

2.36.2 HERSTELLUNG VON LAMBDA-PHAGEN-KOMPETENTEN *E. COLI* -ZELLEN

E. coli XL1-BlueMRF' wurden aus einer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ Glycerinkultur auf einer LB-Agar-Platte mit $12.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin ausgestrichen und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert. Eine Einzelkolonie wurde in 50 ml LB-Medium mit $0.2\text{ }\%$ Maltose und 10 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{ H}_2\text{O}$ und einem pH-Wert von 7.5 suspendiert und mit 180 rpm über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ geschüttelt. Die Zellen wurden 5 min bei 4000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sedimentiert und mit $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem 10 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{ H}_2\text{O}$ auf eine OD_{600} von 1.2 eingestellt.

2.36.3 PLATTIERUNG DER CDNA-PHAGEN-BANKEN

Von der aeroben Bank sollten 6000 PFU (Rekombinante) pro Platte, von der anaeroben Bank $10\text{ }000\text{ PFU}$ pro Platte ausplattiert werden. Dazu wurden die nach dem Titer berechneten Mengen $1:100$ mit SM-Puffer verdünnten Lambda-Phagen [$0.6\text{ }\mu\text{l}$ der aeroben Bank, $4\text{ }\mu\text{l}$ der anaeroben Bank] mit je $1600\text{ }\mu\text{l}$ *E. coli* XL1-BlueMRF' durch Invertieren vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden zu je 200 ml $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmem TOP-Agar gegeben, durch Schwenken vermischt und zügig und gleichmäßig auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmte NZ-Agar-Platten gegossen. Die nummerierten Platten wurden über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und vor der Herstellung der Nitrocellulose-Replika-Filter mindestens 1 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt.

SM-PUFFER [20 min autoklavieren]

$0.58\text{ }\%$ (w/v)	NaCl
$0.2\text{ }\%$ (w/v)	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{ H}_2\text{O}$
50 mM	TRIS/HCl pH 7.5
$0.01\text{ }\%$ (w/v)	Gelatine

TOP-AGAR [20 min autoklavieren]

$0.7\text{ }\%$ (w/v)	Agarose in 10 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{ H}_2\text{O}$
-----------------------	---

NZ-AGAR [20 min autoklavieren]

$1\text{ }\%$ (w/v)	NZ-Amine
$0.1\text{ }\%$ (w/v)	Casamino acids
$0.5\text{ }\%$ (w/v)	NaCl
$0.2\text{ }\%$ (w/v)	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{ H}_2\text{O}$
$1.5\text{ }\%$ (w/v)	Agar

mit $> 6.4\text{ ml}$ 1 N NaOH auf pH 7.5 einstellen

2.36.4 HERSTELLUNG DER NITROCELLULOSE-REPLIKA-FILTER

Die Nitrocellulose-Filter wurden luftblasenfrei mit leichtem Druck auf den von Phagen lysierten Bakterienrasen gelegt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert (Phagen haften an der Membran). Zur späteren Orientierung wurden mit einer Kanüle drei Löcher in Form eines asymmetrischen L's durch Filter und Agar gestochen. Nach dem Abziehen der Membranen wurden diese mit der Phagen-Seite nach oben auf trockenes Whatman-Papier gelegt, entsprechend der Platten-Nummerierung beschriftet und ab jetzt immer mit der DNA-Seite nach oben gehandhabt.

Zur Denaturierung der Phagen und Fixierung der DNA auf der Nitrocellulose wurden die Filter luftblasenfrei auf gründlich mit den folgenden Lösungen getränkte Whatman-Papiere gelegt:

		ZEIT
01	SOUTHERN I	genau 10 min
02	SOUTHERN II	10 min
03	2X SSPE	10 min

In der alkalischen Southern I-Lösung zerfallen die Phagenpartikel, die DNA wird denaturiert und durch die hohe Salzkonzentration an die Membran gebunden. Southern II dient der Neutralisation der Natronlauge und 2X SSPE der Entsalzung. Nach Trocknung der Filter bei Raumtemperatur wurde die DNA abschließend durch 40 bis 45 min Inkubation bei 80 °C irreversibel an die Nitrocellulose gebunden. Die Filter können in Petrischalen im Dunkeln 2 bis 3 Wochen gelagert werden.

SOUTHERN I

0.5 M NaOH
1 M NaCl

SOUTHERN II [20 min autoklavieren]

0.5 M TRIS
3 M NaCl

20X SSPE [20 min autoklavieren]

20 mM Na₂-EDTA
3 M NaCl
200 mM NaH₂PO₄
0.2 M NaOH

2.36.5 HYBRIDISIERUNG

Die Hybridisierung wurde mit vorgewärmten Lösungen und im Schüttel-Wasserbad bei einer für homologe Sonden geeigneten Temperatur von 68 °C durchgeführt. Pro Membran wurden etwa 2 ml Prähybridisierungslösung sowie insgesamt 1/1000 VOL einzelsträngige Poly A⁺-RNA (50 µg/µl) in eine runde Kunststoffschale mit Deckel gegeben, in welche die Filter einzeln nacheinander eingetaucht und durch Schwenken des Gefäßes gleichmäßig getränkt wurden. Die Vorhybridisierung wurde für 40 min im Schüttel-Wasserbad inkubiert. Dabei sättigt die Poly A⁺-RNA alle DNA-freien Bereiche der Nitrocellulose ab. Anschließend wurde die Lösung dekantiert und die Filter wieder einzeln nacheinander in Hybridisierungslösung (1.3 ml pro Filter) mit 1/1000 VOL Poly A⁺-RNA gelegt. Zur Denaturierung der radioaktiven Sonde ([³²P]-markiertes 415 bp-Fragment aus der anaeroben *Euglena gracilis* cDNA-Bank → 2.36.1) wurden die gesamten 50 µl mit 2 µl 1 N NaOH vermischt und 2 bis 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Sonde in das Gefäß mit Hybridisierungslösung und Rundfiltern gegeben und die Hybridisierung für 20 bis 24 h im Schüttel-Wasserbad inkubiert.

PRÄHYBRIDISIERUNGSLÖSUNG

6X SSPE
0.1 % SDS
0.02 % PVP
0.02 % Ficoll 400

HYBRIDISIERUNGSLÖSUNG

3X	SSPE
0.1 %	SDS
0.02 %	PVP
0.02 %	Ficoll 400

WASCHLÖSUNG

2X	SSPE
0.1 %	SDS

Die verdünnte Sonde wurde für die zweite Hybridisierung in Falcon-Röhrchen bei -20 °C aufbewahrt. Die Filter wurden zweimal mit Waschlösung ($\sim 1.5\text{ ml}$ pro Filter) durch 1 min Schwenken vorgespült und anschließend dreimal für 20 bis 30 min mit größeren Volumina Waschlösung im Schüttel-Wasserbad gewaschen bis die Hintergrund-Radioaktivität deutlich abgenommen hatte. Zum Trocknen wurden die Filter 30 min bei Raumtemperatur auf Whatman-Papier ausgebreitet, dann nach Banken geordnet auf geeigneten Papierbögen festgeklebt und mit Frischhaltefolie eingeschlagen. Zur späteren Orientierung auf den Filmen wurden je vier radioaktiv markierte Klebepunkte asymmetrisch auf den Bögen verteilt. Die Filterbögen wurden zusammen mit den Röntgenfilmen in mit Verstärkerfolien versehenen Filmkassetten über Nacht bei -80 °C exponiert. Die Filme wurden für ca. 5 min entwickelt bis die Filterumrisse zu erahnen waren und nach dem Wässern für ca. 5 min fixiert bis der Hintergrund klar wurde.

2.36.6 VEREINZELUNG DER PHAGEN-PLAQUES

Mit Hilfe der radioaktiv markierten Klebepunkte und den Löchern in den Filtern wurden die in der Autoradiographie positiven Signale den Positionen der Plaques auf den Platten zugeordnet. Diese Plaquebereiche wurden mit dem weiten Ende einer sterilen Pasteurpipette aus dem Agar ausgestochen, in $500\text{ }\mu\text{l}$ SM-Puffer mit $20\text{ }\mu\text{l}$ Chloroform überführt, geschüttelt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert (Lyse der Bakterien und Freisetzung der Phagen-Gemische). Von diesen Lysaten wurden 1:1000-Verdünnungen mit SM-Puffer hergestellt. Pro Ansatz wurden $1\text{ }\mu\text{l}$ und $10\text{ }\mu\text{l}$ dieser Verdünnung mit je $200\text{ }\mu\text{l}$ Phagen-kompetenten *E. coli* XL1-BlueMRF'-Zellen (OD_{600} von 1.0) durch Schwenken vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bakterien-Plaque-Verdünnungen wurden mit je 5 ml 45 °C warmem TOP-Agar vermischt, auf vorgewärmten NZ-Platten verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Herstellung der Nitrocellulose-Replika-Filter und die Hybridisierung mit derselben Sonde erfolgten bei dem Vereinzelungs-Screening ebenso wie vorher beschrieben (\rightarrow 2.36.4, \rightarrow 2.36.5).

Die in der Autoradiographie positiven und nun vereinzelt Plaques wurden mit dem spitzen Ende einer sterilen Pasteurpipette aus dem Agar ausgestochen, in $500\text{ }\mu\text{l}$ SM-Puffer mit $20\text{ }\mu\text{l}$ Chloroform überführt und nach Schütteln 2 h bei Raumtemperatur inkubiert (Lyse der Bakterien und Freisetzung der Phagen-Klone).

2.36.7 *IN VIVO* EXCISION DER PLASMIDE

Für die Ausschleusung der Plasmide aus den Phagen wurden sowohl Lambda-Phagen kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-BlueMRF' (→ 2.36.2) als auch nicht-Lambda-Phagen kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes SOLR benötigt. 50 ml LB-Medium ohne Maltose, MgSO₄ und Antibiotika wurden deshalb mit 10 µl einer Flüssigkultur SOLR-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden nach der Zentrifugation (5 min bei 4 °C und 4000 rpm) mit 4 °C kaltem 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 1.0 eingestellt und bei 4 °C aufbewahrt.

Im ersten Schritt der *in vivo* Excision erfolgte das Ausschleusen des pBluescript-Phagemids, welches die klonierte cDNA enthält, aus den Lambda-Phagen in filamentöse M13-Helfer-Phagen:

INFEKTIONSANSATZ

200 µl	<i>E. coli</i> XL1-BlueMRF' in 10 mM MgSO ₄ (OD ₆₀₀ von 1.0)
1 µl	ExAssist [®] Helfer-Phage (M13) STRATAGENE
250 µl	Lambda-Phagen-Suspension der vereinzelt Plagues in SM-Puffer

Die Infektionsansätze wurden 15 min bei 37 °C inkubiert, in je 3 ml LB-Medium überführt und 2.5 bis 3 h bei 37 °C geschüttelt. Nach Inkubation für 20 min bei 68 °C, bei der die Bakterien abgetötet wurden, und Zentrifugation von je 1 ml der Kulturen (15 min 1000 xg) erhielt man im Überstand die rekombinanten, in filamentöse Helfer-Phagen verpackten Plasmide. Diese sind bei 4 °C 1 bis 2 Monate haltbar.

Im zweiten Schritt, der Transfektion des verpackten Plasmids wurden pro Klon 10 µl und 100 µl des Gemisches aus Lambda-Phagen, M13-Helfer-Phagen und rekombinanten Phagen zu je 200 µl *E. coli*-SOLR-Zellen gegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Lambda-Phagen können SOLR aufgrund der fehlenden Maltose-Rezeptoren nicht infizieren und die M13-Helfer-Phagen können sich nicht in SOLR replizieren. Die pBluescript-Phagemide aus den rekombinanten Phagen werden dagegen in SOLR vermehrt. Aufgrund der auf dem Plasmid vorhandenen Ampicillin-Resistenz konnten die Vektor-tragenden SOLR-Klone durch Plattierung auf LB-AIX-Platten selektiert und in ampicillinhaltigem LB-Medium kultiviert werden. Die Isolierung der Plasmide (→ 2.34), die aufgrund besserer Kultivierung durchgeführten Transformationen (→ 2.30) in den *E. coli*-Stamm TOP10F' und die Sequenzierung (→ 2.37) wurden wie beschrieben durchgeführt.

2.37 SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde von der Firma IIT GmbH Biotech / Sequencing Service an der Universität Bielefeld mit einer automatisierten Fluoreszenz-Methode (enzymatische Didesoxy-Methode) nach SANGER et al. (1977) an einem LICOR Sequenzierer durchgeführt. Verwendet wurden sowohl M13- und andere Standard-Sequenzierprimer als auch bei Plasmiden mit großen Inserts Sequenz-spezifische interne Primer.

3 ERGEBNISSE

Aufbauend auf den Arbeiten von BÄUMER (1998) und BÄUMER et al. (2001) wurden zunächst biochemische Experimente mit dem Ziel der Identifizierung, der Isolierung und der partiellen Protein-Sequenzierung der substratbindenden Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *Euglena gracilis* durchgeführt. Auf der Basis der gefundenen Peptidsequenzen wurde durch das Screening von *Euglena gracilis*-cDNA-Phagen-Banken die für die UDP-Glucose:beta-1,3-Glucosyltransferase kodierende cDNA erhalten. Anschließend erfolgte die Identifizierung des zugehörigen Gens. Detaillierte Sequenzanalysen sollen schließlich Aussagen über die Membrantopologie, die Funktion und eventuell über die Herkunft der Paramylon-Synthase ermöglichen.

3.1 ANZUCHT VON *EUGLENA GRACILIS* IN KULTUR-RÖHREN UNTER HETEROTROPHEN BEDINGUNGEN UND BESTIMMUNG DES GEEIGNETEN ERNTEZEITPUNKTES ZUR ISOLIERUNG DER PARAMYLON-SYNTASE

Die Paramylon-Synthase aus *Euglena gracilis* ist Bestandteil eines integralen Multiprotein-Komplexes, der in der Membran der Paramylon-Granula lokalisiert ist (BÄUMER 1998, BÄUMER et al. 2001). Grundvoraussetzung für die Isolierung ausreichender Mengen aktiven Enzyms war deshalb die Bestimmung der geeigneten Kulturbedingungen sowie die Identifizierung des günstigsten Erntezeitpunktes in dem zur Verfügung stehenden Anzuchtsystem (Kultur-Röhren statt Anzucht im Fermenter). Die Zellen sollten also nicht nur ausreichende Mengen Paramylon-Granula enthalten, sondern sich auch in einer Wachstumsphase befinden, in der eine messbare Paramylon-Synthase stattfindet.

Wie Abbildung 3.1a zeigt, enthalten die heterotroph in organischem Nährmedium im Dunkeln kultivierten Zellen von *Euglena gracilis* deutlich mehr Paramylon-Granula als die phototroph

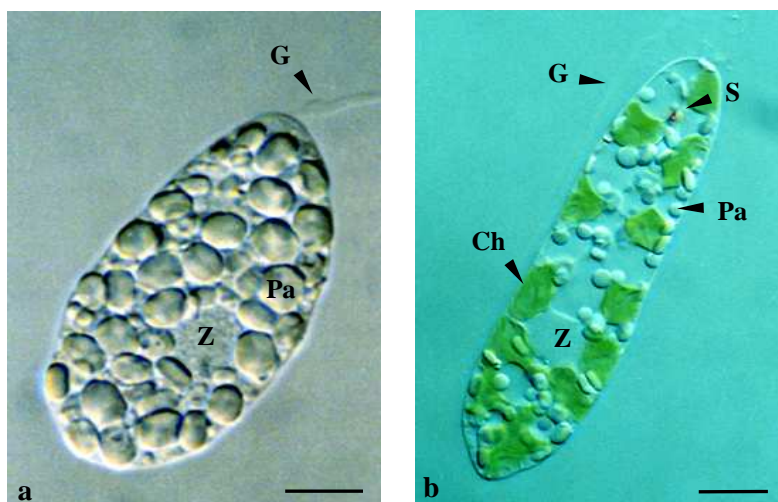


Abb. 3.1 Lichtmikroskopische Aufnahmen von *Euglena gracilis*. Normmaski-Optik, Zellen fixiert durch Eintrocknung. **a** heterotrophe Zelle **b** phototrophe Zelle **Ch** Chloroplast, **G** Geißel, **Pa** Paramylon-Granulum, **S** Stigma, **Z** Zellkern. Maßstab 10 µm.

lebenden Zellen (Abb. 3.1b), die in einem Licht/Dunkelrhythmus von 14:10 Stunden und in mineralischem Nährmedium angezogen werden. Die Paramylon-Synthase unterliegt unter den heterotrophen Kulturbedingungen keiner von der Beleuchtung abhängigen Regulierung. Aus diesem Grund wurden für die Isolierung der Paramylon-Synthase-Komplexe ausschließlich heterotrophe Kulturen verwendet.

KOHLENSTOFFQUELLE

Als Kohlenstoffquelle für das organische Nährmedium hat sich D(+)-Glucose-Monohydrat bewährt, mit dem eine besonders hohe Paramylon-Syntheserate erzielt werden kann (BARSANTI et al. 2001, BÄUMER et al. 2001). Während für die heterotrophen Stammkulturen eine Glucose-Konzentration von 5.8 g/l verwendet wurde, enthielt das Nährmedium für die Aufarbeitungskulturen 10 g Glucose/l, damit den Zellen nach dem Überimpfen auch bei Beginn der exponentiellen Wachstumsphase noch ausreichend Glucose zur Verfügung steht. Es konnte gezeigt werden, dass *Euglena gracilis* in einer heterotrophen Fermenter-Kultur die Kohlenstoffquelle Glucose ebenso wie die Aminosäuren Glutamat und Glycin innerhalb der ersten 50 Stunden nach dem Überimpfen nahezu vollständig dem Medium entzieht (BÄUMER 1998). Andere Komponenten des Nährmediums wie beispielsweise die Vitamine B₁ und B₁₂ sind zwar für das Überleben und die Zellteilungsrate von *Euglena gracilis* essentiell, haben aber nur einen indirekten Einfluss auf die Menge des gebildeten Paramylons. Die Kulturen wurden mit Pressluft versorgt, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, die ebenso wie die Glucose-Konzentration für die Paramylon-Synthese ausschlaggebend ist. Bei Sauerstoff-Mangel findet die Wachsester-Fermentation unter Abbau der Paramylon-Granula statt (INUI et al. 1992).

ERNTZEITPUNKT

Zur Ermittlung des geeigneten Erntezeitpunktes für das gegebene Anzuchtsystem (Kultur-Röhren) wurden die Parameter Zellzahl pro Milliliter, Kohlenhydratgehalt pro Milliliter sowie der Bezug Kohlenhydratgehalt pro Millionen Zellen bestimmt (Abb. 3.2) und mit den entsprechenden Tendenzen bei der von BÄUMER (1998) verwendeten 5 l bzw. 100 l Fermenter-Kultivierung verglichen. Aus technischen Gründen konnten die Wachstumsbedingungen für die heterotrophe Anzucht von *Euglena gracilis* in der 100 l Fermentation im Vergleich zur 5 l Fermentation weiter optimiert werden.

KOHLENHYDRATGEHALT

Der maximale Kohlenhydratgehalt einer gut mit Glucose (10 g/l), Pressluft und Aminosäuren versorgten heterotrophen *Euglena gracilis*-Kultur kann bei Anzucht in Kultur-Röhren bis zu **0.86 mg Kohlenhydrat/10⁶ Zellen** erreichen (Abb. 3.2c, nach 24 Stunden Kultivierung). Eine phototrophe Standard-Kultur in mineralischem Nährmedium weist in der Belichtungsphase dagegen im Durchschnitt nur 0.05 bis 0.10 mg Kohlenhydrat/10⁶ Zellen auf (SCHOLTEN-BECK 1992, MIBFELDT 1993). Der Kohlenhydratgehalt einer *Euglena gracilis*-Kultur ergibt sich überwiegend aus dem in den Zellen enthaltenen Paramylon, so dass im Folgenden die Begriffe Kohlenhydratgehalt und Paramylongehalt synonym verwendet werden. Das Ergebnis für die Kultur-Röhren-Anzucht liegt mit maximal 0.86 mg Kohlenhydrat/10⁶ Zellen zwischen den gemessenen maximalen Werten bei der heterotrophen Anzucht im 5 l Fermenter mit etwa 0.6 mg Kohlenhydrat/10⁶ Zellen bzw. im 100 l Fermenter mit etwa 1 mg Kohlenhydrat/10⁶ Zellen.

Für das Animpfen der Aufarbeitungskulturen zur Isolierung der Paramylon-Synthase-Komplexe wurden ausschließlich Kulturen nach 72-stündiger Kultivierung mit einer Zellzahl von ca. 15×10^6 Zellen/ml verwendet (Abb. 3.2, dunkelblaue Balken). Diese befinden sich zwar bereits in einer Nährstoff-Mangel-Situation, aber noch nicht in einer stationären Wachstumsphase. Werden stattdessen für das Animpfen der Aufarbeitungskulturen Zellen nach 48-stündiger Kultivierung verwendet (Abb. 3.2, hellblaue Balken), werden insgesamt deutlich niedrigere Zellzahlen und Kohlenhydratgehalte erzielt (Abb. 3.2a, 3.2b).

Das Überführen der Mangel-Zellen in frisches Nährmedium (Zeit 0, dunkelblaue Balken) hat zunächst einen deutlichen Anstieg des Kohlenhydratgehaltes pro Zelle um mehr als das Vierfache innerhalb der ersten 24 Stunden zur Folge (Abb. 3.2c, im Zeitraum von 0 bis 24 Stunden). In derselben Zeit hat sich die Zellzahl allerdings nur etwas mehr als verdoppelt (von 0.4 auf 0.9×10^6 Zellen/ml, Abb. 3.2a), d.h. die Kultur befindet sich offensichtlich noch in einer lag-Phase. Erst innerhalb der nächsten 24 Stunden (24 bis 48 Stunden Kultivierung) kommt die Kultur in die exponentielle Wachstumsphase, in der sowohl die Zellzahl (Abb. 3.2a, von 0.9 auf 6.2×10^6 Zellen/ml) als auch der absolute Kohlenhydratgehalt der Kultur (Abb. 3.2b, von 0.77 auf 2.89 mg/ml) deutlich zunehmen. Der Kohlenhydratgehalt (Paramylon) pro Zelle sinkt in derselben Zeit von seinem Maximum nach 24 Stunden (0.86 mg/ 10^6 Zellen, Abb. 3.2c) auf 0.47 mg/ 10^6 Zellen (Abb. 3.2c, nach 48 Stunden Kultivierung). Prinzipiell lassen sich diese Ergebnisse mit der Kultivierung von *Euglena gracilis* im 5 l bzw. im 100 l Fermenter vergleichen (BÄUMER 1998), auch wenn die absoluten Werte nicht identisch sind:

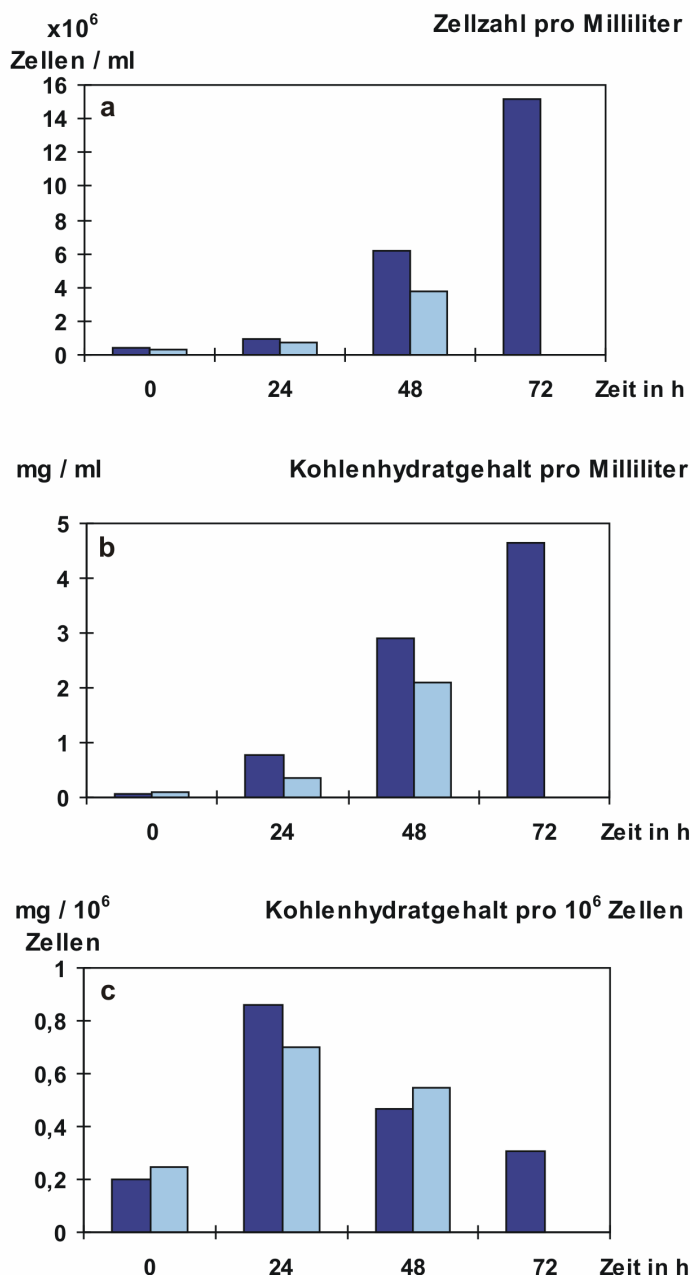


Abb. 3.2 Wachstumsverlauf und Paramylon-Synthese heterotropher *Euglena gracilis*-Kulturen [10 g/l Glucose in organischem Nährmedium, Anzucht im Dunkeln mit Pressluft]. Der Kohlenhydratgehalt ergibt sich überwiegend aus den in den Zellen vorhandenen Paramylon-Granula.
a Zellzahl pro Milliliter **b** Kohlenhydratgehalt pro Milliliter
c Kohlenhydratgehalt pro 10^6 Zellen.

■ Angeimpft mit Zellen aus 72 Stunden Kultivierung
 ■ Angeimpft mit Zellen aus 48 Stunden Kultivierung

In allen drei Kultursystemen werden in den ersten 24 Stunden vor Einsetzen der exponentiellen Wachstumsphase aus der reichlich im Nährmedium vorhandenen Glucose große Mengen Paramylon synthetisiert, während in den nächsten zwei Tagen (24 bis 72 Stunden) eine drastische Erhöhung der Zellzahl sowie des Gesamtkohlenhydratgehaltes der Kultur gemessen wird. Aufgrund der vergleichbaren Verläufe in allen drei Kultursystemen ist in den Anzucht-Röhren offensichtlich ebenso wie in den Fermentern nach 50 Stunden Kultivierung noch Glucose im Medium vorhanden. Die Reduktion des Paramylongehaltes pro 10^6 Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase (24 bis 72 Stunden Kultivierung) hängt demzufolge nicht mit einem bereits einsetzenden Abbau des Paramylons zusammen. Der abnehmende Paramylongehalt pro 10^6 Zellen in diesem Zeitraum basiert demnach auf einer Verteilung der bereits vorhandenen Paramylon-Granula auf mehrere Zellen durch die gesteigerte Zellteilungsrate in der exponentiellen Wachstumsphase.

FAZIT

Um für die Isolierung der Paramylon-Synthase-Komplexe ausreichend Zellmaterial und gleichzeitig noch in Synthese befindliche Enzyme zu erhalten, wurden die heterotrophen *Euglena gracilis*-Zellen aus der Kultur-Röhren-Anzucht mit 10 g/l Glucose und Pressluft-Versorgung nach etwa 40 Stunden geerntet, bevor aufgrund von Glucose-Mangel kein weiteres Paramylon mehr gebildet und demzufolge keine messbare Paramylon-Synthase-Aktivität mehr gefunden werden kann.

3.2 ISOLIERUNG DES PARAMYLON-SYNTHASE-KOMPLEXES

Nach Zellaufbruch mit der French-Press und Isolierung der Paramylon-Granula wurden die Paramylon-Synthase-Komplexe aus den Granula-Membranen herausgelöst. Zum Solubilisieren der 669 kDa großen Komplexe unter Beibehaltung der enzymatischen Aktivität hat sich das zwitterionische Detergenz **CHAPS** [3-[(3-Cholamidopropyl)-di-methylammonio]-1-propanesulfonate] als geeignet erwiesen (BÄUMER et al. 2001). Das nicht denaturierende Detergenz ist ebenso wie die Membranlipide ein amphiphiles Molekül und kann diese deshalb funktionell substituieren: Die hydrophoben Bereiche interagieren dabei mit den entsprechenden Transmembran-Bereichen der Protein-Komplexe, während sich die hydrophile Seite des Moleküls nach außen zum wässrigen Puffer orientiert. Auf diese Weise werden hydrophobe Membranproteine löslich und man erhält Protein-Detergenz-Micellen.

SACCHAROSE-DICHTEGRADIENT

Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Ankonzentrierung der Micellen schließlich über einen Saccharose-Dichtegradienten. In Abbildung 3.3 ist ein solcher Gradient mit den einzelnen Fraktionen und den entsprechenden Saccharose-Konzentrationen dargestellt. Die Gradienten wiesen je nach Proteingehalt der ankonzentrierten Micellen (im Mittel $5.0 \mu\text{g Protein}/\mu\text{l} \pm 0.9$) nur wenige weißlich oder gelblich gefärbte Banden auf. Diese fanden sich in den Fraktionen 2, 4, 6 und 8, also jeweils an den Grenzen zwischen zwei verschiedenen Saccharose-Konzentrationen (20/30, 30/40, 40/50 und 50/60 % Saccharose).

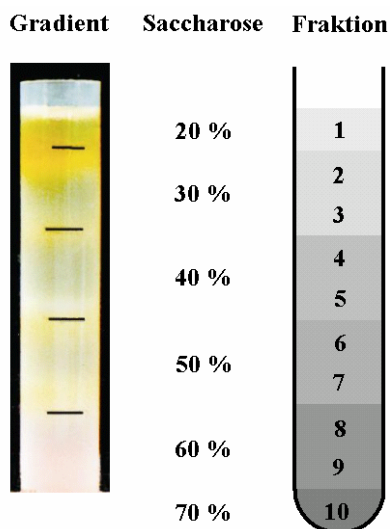


Abb. 3.3 Darstellung des **Saccharose-Dichtegradienten** zur Aufreinigung der Paramylon-Synthase-Komplexe. Die geschichteten Gradienten werden mit ankonzentrierten Protein-CHAPS-Micellen beladen. Die Saccharose-Konzentrationen sowie die Fraktions-Nummern sind entsprechend gekennzeichnet. In den Fraktionen 2, 4, und 8 (30 %, 40 % bzw. 60 % Saccharose) sind gelbe Banden, an der Grenze von Fraktion 5 und 6 (40 und 50 % Saccharose) ist eine gelblich-weiße Bande zu finden.

Zur weiteren Charakterisierung der Saccharose-Dichtegradienten bzw. zur Identifizierung derjenigen Fraktionen, die nur den 669 kDa Paramylon-synthetisierenden Komplex enthalten, wurden Protein-Bestimmungen (Abb. 3.4), Enzymaktivitäts-Messungen (Abb. 3.5) und native Polyacrylamid Gelelektrophoresen (Abb. 3.6) durchgeführt.

Die Proteinbestimmungen sollen die Verteilung der aufgetragenen Proteine über den Gradienten sowie eine eventuelle Korrelation mit den sichtbaren Banden aufzeigen. Durch die Enzymaktivitätsmessungen mit dem radioaktiv markierten Substrat der Paramylon-Synthase ($[^{14}\text{C}]$ -UDP-Glucose) wurde gezeigt, dass in den Fraktionen eine messbare beta-1,3-Glucan-Synthese stattfindet, es sich also um den Paramylon-synthetisierenden Komplex handelt. Die native Gelelektrophorese diente der Überprüfung der Reinheit der Fraktion. Nur die Fraktionen mit einem isolierten 669 kDa Komplex wurden für die weiteren Versuche verwendet.

PROTEINGEHALT

Der mittlere Proteingehalt der einzelnen Fraktionen stieg mit zunehmender Saccharose-Konzentration zunächst an (Abb. 3.4). In Fraktion 5 (40 % Saccharose) wurde der maximale Mittelwert von 1.17 μg Protein/ μl gemessen. Mit weiter zunehmender Saccharose-Konzentration wurden dann wieder niedrigere Proteinwerte ermittelt. Im Vergleich mit den ersten und den letzten drei Fraktionen (0.4 μg Protein/ μl oder weniger) weisen die vier mittleren Fraktionen 4, 5, 6 und 7 mit Saccharose-Konzentrationen von 40 und 50 % die höchsten Proteingehalte auf ($\geq 0.7 \mu\text{g}$ Protein/ μl).

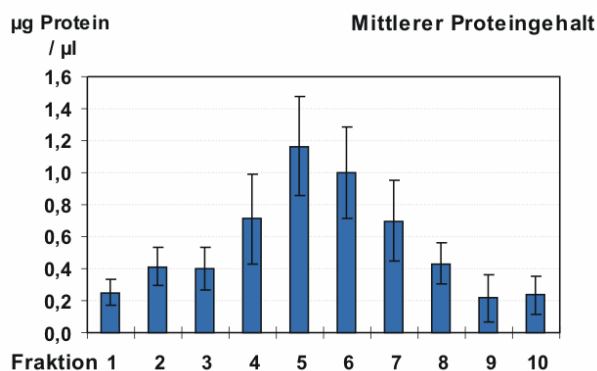


Abb. 3.4 Mittlerer Proteingehalt [$\mu\text{g Protein}/\mu\text{l}$] der Saccharose-Dichtegradienten-Fractionen. Die Zahlen der x-Achse entsprechen den Fraktions-Nummern aus Abb. 3.3. Die höchsten Proteinwerte werden in den Fraktionen 4, 5, 6 und 7 mit Saccharose-Konzentrationen von 40 und 50 % gefunden. $n = 8$

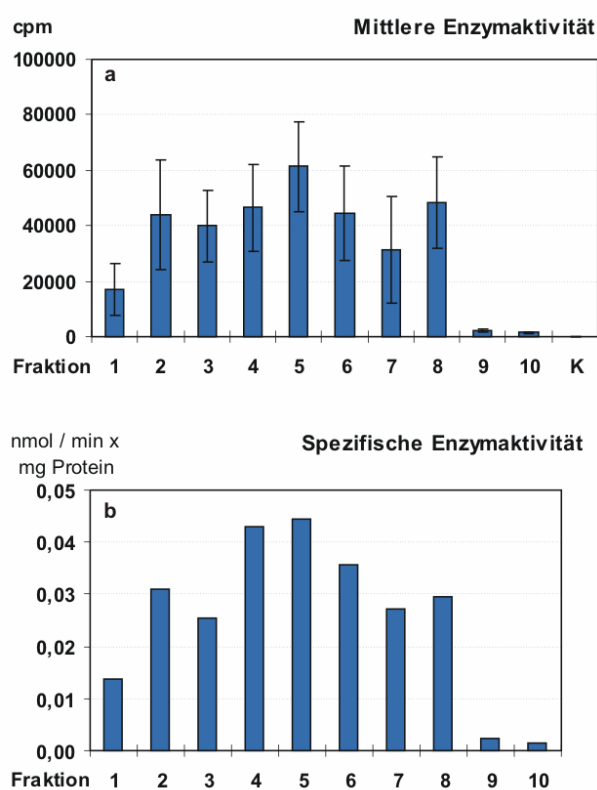


Abb. 3.5 Enzymaktivität in den Saccharose-Dichtegradienten-Fractionen. Die Zahlen der x-Achse entsprechen den Fraktions-Nummern aus Abb. 3.3. **K** Kontrolle mit hitzedenaturiertem Protein. **a Mittlere Enzymaktivität** in „counts per minute“ [cpm] **b Spezifische Enzymaktivität** in nmol/min x mg Protein. Die höchsten mittleren und spezifischen Enzymaktivitäten wurden in den Fraktionen 4, 5 und 6 gefunden. $n = 8$

ENZYMAKTIVITÄT

Die Messung der Enzymaktivität in den Saccharose-Dichtegradienten-Fractionen erfolgte unter optimierten Bedingungen nach BÄUMER et al. (2001) mit einer Substratkonzentration von $0.5 \mu\text{M}$ [^{14}C]-UDP-Glucose in TRIS/Acetat-Puffer bei pH 7.5, bei einer Temperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ sowie mit 1 mM CaCl_2 und fibrillärem Paramylon als Effektoren. Die über Saccharose-Dichtegradienten isolierten Paramylon-Synthase-Komplexe synthetisieren unter diesen Bedingungen unverzweigtes beta-1,3-Glucan, welches durch Zugabe von Ethanol als weißes Präzipitat ausfällt. Durch enzymatische Hydrolyse mit beta-1,3-Glucanase konnte die Identität

des im Enzymtest gebildeten Glucans gezeigt werden (BÄUMER et al. 2001). Das Maß für die Enzymaktivität der Paramylon-Synthase-Komplexe ist demzufolge die Menge des gebildeten Glucans bzw. der Umsatz der radioaktiv markierten UDP-Glucose zu dem fällbaren Enzymprodukt. Die mittleren Enzymaktivitäten sind nicht in derselben Art und Weise wie die Proteingehalte über den Gradienten verteilt (Abb. 3.5a). Zwar finden sich auch hier in den Fraktionen 4, 5 und 6 mit Saccharose-Konzentrationen von 40 bzw. 50 % die höchsten Aktivitätswerte von über 44 000 cpm, aber auch in den Fraktionen 2 (30 % Saccharose) und 8 (60 % Saccharose) wurde eine deutliche Paramylon-Synthese gemessen. Durch den Bezug der Enzymaktivität auf die Reaktionszeit und die Proteinmenge, also der Bestimmung der spezifischen Aktivität (Umsatz von UDP-Glucose in Nanomol pro Minute und Milligramm Protein, Abb. 3.5b), ist zu sehen, dass ebenfalls in den Fraktionen 4, 5 und 6 die höchsten Umsatzraten gefunden werden. Die Fraktionen 2 und 8 weisen dagegen eine niedrigere spezifische Enzymaktivität auf.

NATIVE POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Die aufgrund der gemessenen Enzymaktivitäten offensichtlich vorhandene Verteilung der Paramylon-Synthase-Komplexe über weite Bereiche des Gradienten korreliert mit den Ergebnissen der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abb. 3.6), bei welcher der 669 kDa Komplex ebenfalls in mehreren Fraktionen detektiert werden konnte. Allerdings enthalten einige dieser Fraktionen noch zusätzliche, kleinere Proteinbanden. Es sind also noch andere Proteine oder Proteinkomplexe in der Paramylon-Granula-Membran inseriert, die sich durch die Solubilisierung mit CHAPS herauslösen lassen. Nichtintegrale, locker an der cytoplasmatischen Seite der Membran oder mit den Protein-Komplexen assoziierte Polypeptide werden jedoch schon während der Isolierung der Paramylon-Granula durch die mehrfachen Waschungen abgelöst. Nur die Fraktionen 4, 5 und 6 enthielten ausschließlich die isolierten Paramylon-Synthase-Komplexe mit einem Molekulargewicht von 669 kDa (Pfeil in Abb. 3.6).

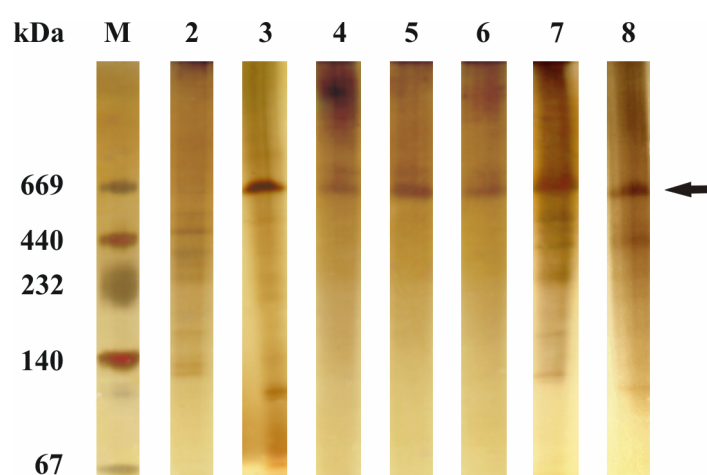


Abb. 3.6 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PHASTTM-System, PHARMACIA BIOTECH) der Saccharose-Dichtegradienten-Fractionen nach Aufreinigung der ankonzentrierten Paramylon-Synthase-Komplex-Solubilisate. Angegeben sind die Fraktionsnummern (vergleiche Abb. 3.3) und die HMW-Markerproteine (M) in kDa. Der Pfeil bezeichnet den 669 kDa Paramylon-Synthase-Komplex.

Bei Betrachtung aller Daten der Gradienten-Fraktionen zeigt sich, dass die sichtbare Bandierung der Gradienten nur teilweise mit den Enzymaktivitäten bzw. den isolierten 669 kDa Protein-Komplexen in der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese korreliert. Auch die durchschnittlichen Proteingehalte sind nicht immer in den Fraktionen mit sichtbaren Banden im Saccharose-Gradienten höher als in den Fraktionen ohne sichtbare Banden.

FAZIT

Sowohl bezüglich des Proteingehaltes als auch für die Enzymaktivität des Paramylon-Synthase-Komplexes (Umsatz von [^{14}C]-UDP-Glucose) werden die höchsten Werte in den Saccharose-Dichtegradienten-Fraktionen 4, 5 und 6 gefunden, also bei Saccharose-Konzentrationen von 40 bzw. 50 %. In der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese erhält man die isolierten 669 kDa großen Komplexe ebenfalls in den Fraktionen 4, 5 und 6. Diese enzymatisch aktiven und die isolierten Paramylon-Synthase-Komplexe enthaltenden Proben wurden gepoolt und für die weiteren Analysen verwendet.

3.3 PHOTOAFFINITÄTS-MARKIERUNG DER SUBSTRATBINDENDEN UNTEREINHEIT DES PARAMYLON-SYNTHASE-KOMPLEXES

Unter denaturierenden Bedingungen in der SDS-Gelelektrophorese zeigte sich, dass die 669 kDa Paramylon-Synthase-Komplexe aus 16 bisher nicht identifizierten Proteinen mit Molekularmassen zwischen 28 und 124 kDa bestehen, die in Kapitel 3.4 in Abbildung 3.9 dargestellt werden. In diesem Kapitel sollen zunächst die Photoaffinitäts-Markierungs-Experimente zur Identifizierung der substratbindenden Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes, der UDP-Glucose:beta-1,3-Glucosyltransferase, beschrieben werden.

PHOTOAFFINITÄTS-MARKIERUNG

Die solubilisierten, über einen Saccharose-Dichtegradienten aufgereinigten Enzym-Komplexe wurden bei niedrigen Temperaturen (0 bis 4 °C) und unter UV-Bestrahlung (254 nm) mit dem radioaktiven Substrat inkubiert. Unter diesen Bedingungen wird aufgrund der niedrigen Temperaturen der Umsatz von UDP-Glucose zu beta-1,3-Glucan verhindert. Die gleichzeitige UV-Exposition der Protein-Komplexe führt zu einer Fixierung der Substratmoleküle durch kovalente Bindungen im substratbindenden bzw. katalytischen Zentrum. Auch nach der Denaturierung der Enzym-Komplexe mit SDS und der anschließenden gelelektrophoretischen Trennung der Proteine bleibt diese Bindung erhalten, so dass diejenigen Polypeptide distinkt markiert werden, die das Substrat im katalytischen Zentrum gebunden haben. Da [^{14}C]-UDP-Glucose, wie es für die Enzymaktivitäts-Messungen verwendet werden kann, nur ein schwacher beta-Strahler ist (0.157 MeV beta-Zerfalls-Energie), wurde für die Markierungs-Experimente [α - ^{32}P]-UDP-Glucose mit einer beta-Zerfalls-Energie von 1.71 MeV synthetisiert. Die Zuordnung der radioaktiv markierten Banden erfolgte nach Detektion der Radioaktivität im Abgleich mit den gefärbten Proteinbanden im Gel und wird in Kapitel 3.4 (Abbildung 3.9) beschrieben.

Als Negativ-Kontrollen wurden jeweils identische Ansätze im Dunkeln (Abb. 3.7, Spuren **2**, **4**, **6**, **8**) sowie entsprechende Ansätze ohne Paramylon-Synthase-Komplex (Abb. 3.7, Spur **9**) inkubiert. Damit sollten unspezifische Bindungen des Substrates an ein beliebiges Protein bzw. Reaktionen des Substrates mit einer Komponente des Reaktionsansatzes erkannt und ausgeschlossen werden.

Durch die Wahl unterschiedlicher Versuchsbedingungen während der Photoaffinitäts-Reaktion wurde weiterhin die Signifikanz der erhaltenen Markierungen überprüft. Da Calcium im Enzymtest eine Aktivitäts-steigernde und Magnesium eine -hemmende Wirkung hatte (BÄUMER et al. 2001), sollte die Spezifität der Markierungen durch einen möglicherweise Metallionen-abhängigen Effekt überprüft werden (Abb. 3.7, Spuren **1**, **3**, **5**). Außerdem dienten eine von 20 auf 10 Minuten verkürzte UV-Expositionszeit (Abb. 3.7, Spur **7**) sowie unterschiedliche Substratkonzentrationen (Abb. 3.7, Spuren **10**, **11**, **12**) dazu, die Abhängigkeiten anhand einer Veränderung der Markierungs-Intensität zu erfassen.

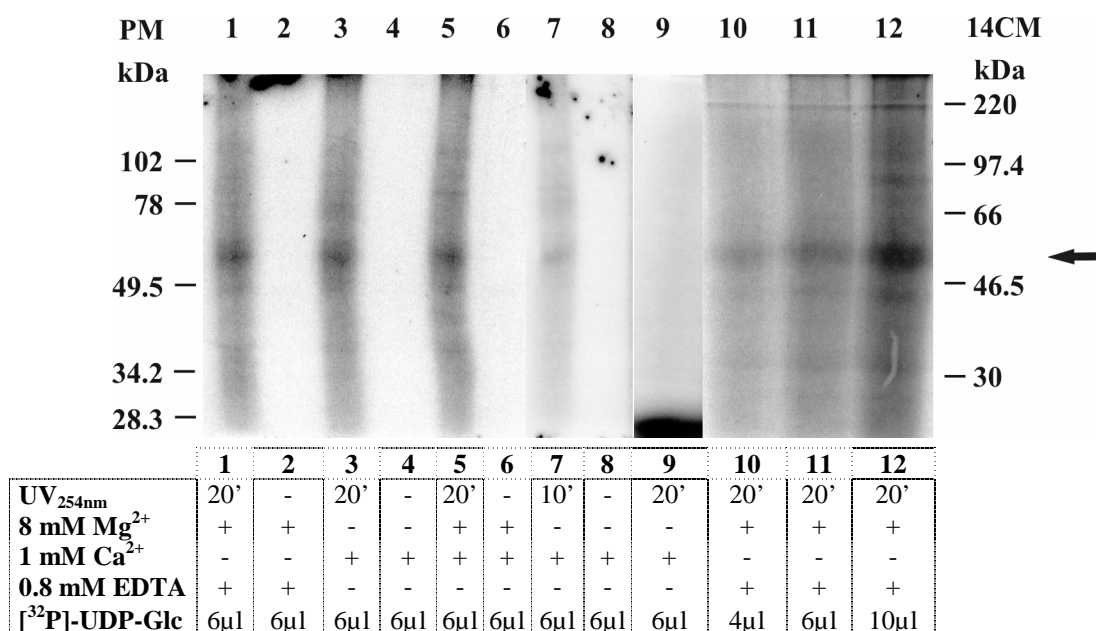


Abb. 3.7 Autoradiographie-Filme der **Photoaffinitäts-Markierung** des isolierten Paramylon-Synthase-Komplexes mit [α -³²P]-UDP-Glucose nach SDS-Gelelektrophorese. Der Pfeil bezeichnet die prominent und reproduzierbar radioaktiv markierte Bande. Die Versuchsbedingungen sind in der Tabelle angegeben: **1** +Mg +EDTA, 20 min UV **2** wie 1 dunkel **3** +Ca, 20 min UV **4** wie 3 dunkel **5** +Mg +Ca, 20 min UV **6** wie 5 dunkel **7** +Ca, 10 min UV **8** wie 7 dunkel **9** +Ca ohne Protein **10** +Mg +EDTA, 20 min UV, 4 µl Substrat **11** +Mg +EDTA, 20 min UV, 6 µl Substrat **12** +Mg +EDTA, 20 min UV, 10 µl Substrat. **PM** Prestained Marker-Proteine in kDa, **14CM** [¹⁴C]-methylierte Marker-Proteine in kDa.

Wie die Autoradiographie-Filme zeigen, erhält man bei Inkubation des isolierten Paramylon-Synthase-Komplexes mit dem radioaktiven Substrat [α -³²P]-UDP-Glucose eine reproduzierbare prominente Bande zwischen 49.5 und 78 kDa (Spuren **1**, **3**, **5**, **7**, **10**, **11**, **12**). Die Markierung ist eindeutig abhängig von der UV-Bestrahlung, da sie in den identischen Ansätzen bei Dunkel-Inkubation nicht erscheint (Spuren **2**, **4**, **6**, **8**). Ohne UV-Exposition wird kein Protein distinkt markiert, d.h. es findet keine kovalente Bindung zwischen radioaktivem Substrat und Protein statt.

Ebenso kann durch eine Verkürzung der UV-Expositionszeit von 20 auf 10 Minuten die Intensität der Markierung deutlich abgeschwächt werden (Spur 7). Außerdem zeigt der proteinfreie Ansatz, in dem ebenfalls keine Markierung zu sehen ist (Spur 9), dass es sich bei der prominenten Bande nicht um einen Artefakt durch Reaktion des Substrates mit einer Komponente des Reaktionsgemisches handelt. Die Intensität der Markierung ist aber nicht nur abhängig von der Länge der UV-Bestrahlung, sondern lässt sich auch durch niedrigere oder höhere Substratkonzentrationen entsprechend abschwächen oder verstärken (Spuren 10, 11, 12).

METALLIONEN-ABHÄNGIGKEIT DER MARKIERUNG

Eine signifikante Beeinflussung der Substratbindung durch Magnesium- oder Calcium-Ionen ließ sich dagegen nicht feststellen. Die prominente Bande ist sowohl bei 8 mM Magnesium mit 0.8 mM EDTA (Spur 1) als auch bei 1 mM Calcium (Spur 3) und ebenso bei Anwesenheit beider Ionen (1 mM Calcium und 8 mM Magnesium ohne EDTA, Spur 5) mit etwa derselben Intensität detektierbar.

Dieses steht allerdings nicht im Widerspruch zu den Enzymaktivitätstests, bei welchen zwar eine hemmende Wirkung von Magnesium als alleinigem Effektor zu beobachten war, aber in diesen Ansätzen immer noch 10 % der maximalen Enzymaktivität (100 % unter optimalen Bedingungen) im Vergleich zu 18 % ohne jeglichen Effektor erzielt wurden (BÄUMER et al. 2001). Demnach scheint die Substratbindung nicht hochspezifisch von der Anwesenheit von Calcium-Ionen abhängig zu sein. Eine Bindung und ein Umsatz von UDP-Glucose ist offensichtlich auch in Anwesenheit von Magnesium-Ionen möglich, wie die Enzymaktivitätstests (BÄUMER et al. 2001) und die Photoaffinitäts-Markierungs-Experimente dieser Arbeit zeigen. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der Markierung in Anwesenheit von Magnesium oder EDTA könnte eine sehr feste Bindung der für die Substratbindung und den -umsatz benötigten Calcium-Ionen im katalytischen Zentrum der Glucosyltransferase sein. Die Calcium-Bindung müsste demnach so stabil sein, dass die Ionen auch während der Isolierung der Paramylon-Synthase-Komplexe sowie in Anwesenheit von 8 mM Magnesium und 0.8 mM EDTA nicht aus der Bindungsstelle dissoziieren.

Bei genauerer Betrachtung der Autoradiographie-Filme ist zu erkennen, dass neben der prominenten Bande auch noch weitere Polypeptide mit sehr schwacher Intensität markiert werden. Es scheint so zu sein, dass die Kombination von Calcium und Magnesium (Spur 5) sowie höhere Substratkonzentrationen (Spur 12) die Markierung anderer Proteine des Komplexes fördern. Aufgrund der erkennbar geringeren Intensität, die zudem nicht bei allen Versuchsbedingungen deutlich sichtbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um unspezifische Reaktionen der $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UDP-Glucose}$ mit affinen Strukturen anderer Proteine handelt. Besonders die reaktiven Doppelbindungen des Substrat-Moleküls UDP-Glucose (Abb. 3.8) sind geeignet, um bei Energiezufuhr (UV-Bestrahlung) beispielsweise mit den basischen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K) zu reagieren.

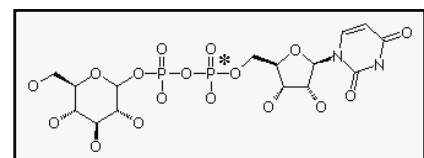


Abb. 3.8 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UDP-Glucose}$
(Uridin-5'-diphosphat Glucose).
* radioaktives Phosphat.

In den ersten Photoaffinitäts-Markierungsexperimenten von BÄUMER et al. (2001) mit dem isolierten Paramylon-Synthase-Komplex wurde neben dem auch in dieser Arbeit gefundenen prominenten 54 kDa Protein (siehe Kapitel 3.4) eine zweite, etwas schwächer markierte Proteinbande mit einer molaren Masse von etwa 37 kDa detektiert. Diese Markierung wurde von BÄUMER et al. (2001) mit 10 µl [α - 32 P]-UDP-Glucose in Anwesenheit von 8 mM Magnesium und 0.8 mM EDTA bei einer UV-Expositionszeit von 20 min erhalten, also entsprechend dem in dieser Arbeit gezeigten Versuchsansatz von Spur **12** in Abbildung 3.7. Da für diese ersten Experimente kein radioaktiver Proteinmarker zur Verfügung stand und die Radioaktivität in den getrockneten SDS-Gelen nicht über Autoradiographie-Filme, sondern mit Hilfe eines Phosphoimager-Screens (BIORAD) detektiert wurde, erwies sich die genaue Bestimmung der molaren Massen der markierten Proteine und die Zuordnung zu den Proteinbanden im Gel als schwierig. Zudem erfolgte die Auftrennung der markierten Proteine in dieser Arbeit in 10 %igen Polyacrylamid-Gelen statt der von BÄUMER et al. (2001) verwendeten Gradientengele, so dass ein direkter Vergleich des Bandenmusters erschwert wird. In dieser Arbeit konnte eine etwa 37 kDa Proteinbande in keinem Versuchsansatz unter keinen Bedingungen mit der von BÄUMER et al. (2001) gezeigten Intensität reproduziert werden. Aufgrund der schwierigen Molekulargewichts-Bestimmung kann deshalb vermutet werden, dass die in dieser Arbeit gefundene unspezifische Markierung eines Proteins knapp unterhalb des 46.5 kDa [14 C]-Markerproteins bzw. unterhalb des 49.5 kDa Prestained Markerproteins (am deutlichsten zu erkennen in Spur **12** in Abb. 3.7) der zweiten von BÄUMER et al. (2001) gefundenen Bande entspricht, wenn sie auch in den vorliegenden Versuchen mit sehr viel niedrigerer Intensität auftritt.

FAZIT

Der isolierte 669 kDa Paramylon-Synthase-Komplex aus den Paramylon-Granula-Membranen von *Euglena gracilis* bindet im Photoaffinitäts-Markierungs-Experiment (bei 0 bis 4 °C und unter UV-Bestrahlung) das Substrat [α - 32 P]-UDP-Glucose. Diese Markierung ist eindeutig abhängig von der UV-Exposition und der Substratkonzentration, wird aber nicht durch die Anwesenheit von Calcium- oder Magnesium-Ionen beeinflusst. Der isolierte 669 kDa Paramylon-Synthase-Komplex synthetisiert im Enzymtest (wie in Kapitel 3.2 gezeigt) aus UDP-Glucose beta-1,3-Glucan (Paramylon), welches als weißes Präzipitat ausfällbar ist. Bei dem prominent und reproduzierbar markierten Protein handelt es sich den Photoaffinitäts-Markierungs-Experimenten zufolge um die substratbindende Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes, also um die UDP-Glucose:beta-1,3-Glucan 3-beta-D-Glucosyltransferase.

Zur weiteren Identifizierung und Größenbestimmung des substratbindenden Proteins mit dem Ziel der anschließenden Isolierung wurden die Autoradiographie-Filme mit den Silber- oder Coomassie[®] Brilliant Blau-gefärbten SDS-Gelen verglichen (Abb. 3.9 in Kapitel 3.4).

3.4 GRÖßENBESTIMMUNG UND ISOLIERUNG DER SUBSTRATBINDENDEN UNTEREINHEIT DES PARAMYLON-SYNTHASE-KOMPLEXES AUS *EUGLENA GRACILIS*

Der in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte, denaturierte 669 kDa Paramylon-Synthase-Komplex besteht aus sieben prominenten Proteinen und weiteren neun Polypeptiden geringerer Ausprägung. Die Größen der Untereinheiten liegen zwischen 28 und mehr als 102 kDa, wobei die prominenten Banden apparente Molekularmassen von 124, 89, 78, 54, 45, 29 und 27 kDa aufweisen. Die in der Photoaffinitäts-Markierung mit [α - 32 P]-UDP-Glucose reproduzierbar gefundene Autoradiographie-Bande zwischen 49.5 und 78 kDa lässt sich in den gefärbten SDS-Gelen des denaturierten Paramylon-Synthase-Komplexes der distinkten **54 kDa Proteinbande** zuordnen (Abb. 3.9 Spuren 1 und 2). Mit diesem Molekulargewicht weist das substratbindende Protein des Komplexes eine vergleichbare Größe zu Photoaffinitäts-markierten Polypeptiden von Callose-Synthasen aus Höheren Pflanzen und der Cellulose-Synthase aus *Acetobacter xylinum* auf (FROST et al. 1990, DELMER et al. 1991, MAYER et al. 1991, MEIKLE et al. 1991, LI et al. 1993).

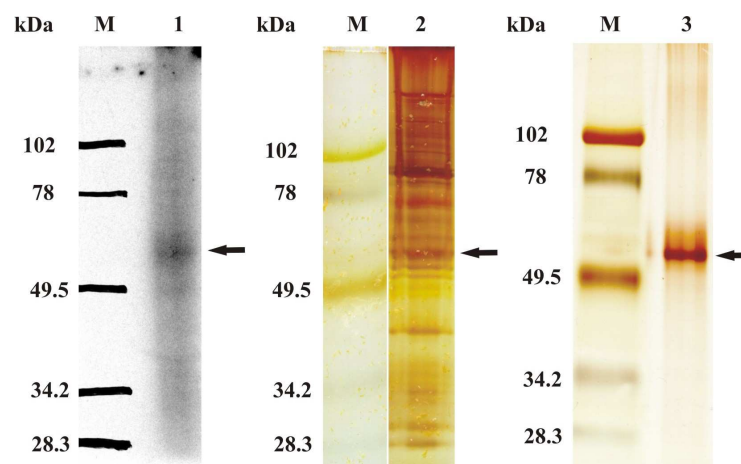


Abb. 3.9 Identifizierung und Isolierung der substratbindenden Untereinheit des über Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation isolierten Paramylon-Synthase-Komplexes. Der Pfeil bezeichnet die prominente radioaktiv markierte Bande bzw. das zugehörige Protein. **1 Autoradiographie-Film** der Photoaffinitäts-Markierung des isolierten Paramylon-Synthase-Komplexes mit [α - 32 P]-UDP-Glucose nach SDS-Gelelektrophorese (Spur 1 aus Abb. 3.7; 20 min UV_{254nm}, 6 μ l Substrat, 8 mM Mg²⁺, 0.8 mM EDTA) **2 Silber-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel** des aufgetrennten denaturierten Paramylon-Synthase-Komplexes **3 Isoliertes 54 kDa-Protein** in der SDS-PAGE. **M** Prestained Marker-Proteine in kDa (Die Proteinbanden des nicht radioaktiven Prestained Markers wurden nach Entwicklung des Autoradiographie-Filmes im Abgleich mit dem gefärbten SDS-Gel auf den Film übertragen).

Im Anschluss an die Identifizierung und Größenbestimmung des substratbindenden Proteins wurde die 54 kDa Proteinbande des denaturierten Paramylon-Synthase-Komplexes aus invers gefärbten präparativen Polyacrylamid-Gelen ausgeschnitten. Bei den verwendeten Färbemethoden (Kupferchlorid- bzw. Imidazol/Zink-Färbung) werden nur die proteinfreien Bereiche des Gels gefärbt, so dass die Proteinbanden selbst unverändert bleiben und nicht durch die Färbung denaturiert oder fixiert werden.

Die Elution des Proteins aus den ausgeschnittenen Gelbanden erfolgte mit dem Detergenz SDS in einer Konzentration von 0.1 % (Elutionspuffer nach HAGER & BURGESS 1980). Höhere SDS-Konzentrationen erwiesen sich als ungeeignet, da das Detergenz bei der anschließenden Fällung des eluierten Proteins ebenfalls präzipitierte. Zur Überprüfung der Reinheit des eluierten und gefällten Proteins wurde erneut eine SDS-Page mit anschließender Silberfärbung durchgeführt (Abb. 3.9 Spur 3).

In Abhängigkeit von der weiteren Fragestellung wurde das isolierte 54 kDa Protein im Folgenden auf eine PVDF-Membran geblottet (für die N-terminale Ansequenzierung durch automatischen Edman-Abbau) oder in der ausgeschnittenen Gelbande mit der Serinprotease Trypsin gespalten (für massenspektrometrische Messungen und Sequenzierungen). Diese Protein-Analysen sollten über Peptidmassen-Bestimmungen sowie Aminosäure-Sequenzierung die Identifizierung des Proteins ermöglichen bzw. Anhaltspunkte für die Identifizierung des zugehörigen Gens liefern.

3.5 MASSENSPEKTROMETRISCHE PROTEIN-ANALYSE DER 54 kDa SUBSTRATBINDENDEN UNTEREINHEIT DES PARAMYLON-SYNTASE-KOMPLEXES AUS *EUGLENA GRACILIS*

3.5.1 PEPTIDMASSEN-BESTIMMUNG VON TRYPSIN-FRAGMENTEN DES 54 kDa PROTEINS DURCH MALDI-TOF- UND ESI-QTOF-MASSENSPEKTROSKOPIE

In der MALDI-TOF-MS [Matrix-Assisted Laserdesorptions/Ionisations-Time of flight-Massenspektroskopie] werden die Trypsin-gespaltenen Peptide eines Proteins mit einer UV-absorbierenden Matrix kokristallisiert und anschließend im Hochvakuum durch den Beschuss mit einem UV-Laserpuls ionisiert. Dabei entstehen monoisotopische $[M+H]^+$ Molekül-Ionen, die im Flugzeitanalysator (TOF) nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis $[m/z]$ aufgetrennt und detektiert werden.

Bei der ESI-QTOF-MS/MS [Electrospray Ionisations-Quadrupol-Time of flight-Massenspektroskopie] werden die Trypsin-Fragmente aus einer ionisierten Dispersion in die Gasphase gebracht. Die erhaltenen Peptid-Ionen sind im Unterscheid zur MALDI-TOF-MS zweifach $[M-2H]^{2+}$ oder dreifach $[M-3H]^{3+}$ geladen und werden im Folgenden zur besseren Vergleichbarkeit in monoisotopische Massen $[M+H]^+$ umgerechnet. Das auch als Tandem-Massenspektroskopie bezeichnete Verfahren ermöglicht nicht nur die Massenbestimmung von Peptiden, sondern kann auch durch Fragmentierung eines mit Hilfe des Quadrupols ausgewählten Peptids dessen Aminosäure-Sequenz ermitteln.

Die Serinprotease Trypsin spaltet Peptidbindungen spezifisch an der Carboxy-Seite der basischen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R), nicht aber wenn die Aminosäure Prolin (P) folgt. Die durchschnittliche theoretische Fragmentgröße bei einer Trypsin-Spaltung liegt bei etwa 9 Aminosäuren (LOTTSPREICH & ZORBAS 1998).

Als Anhaltspunkt für die Anzahl der entstehenden Peptide wird mit etwa einer Spaltstelle pro kDa Protein gerechnet. Für das 54 kDa Protein aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis* wurden demnach theoretisch etwa 55 Trypsin-Fragmente erwartet. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass nicht alle Trypsin-Fragmente eines Proteins detektiert werden, da zum einen nicht jedes ionisierte Trypsin-Fragment den Flugzeitanalysator (TOF) passiert. Zum anderen können in dem ausgewählten Messbereich (größer als 460 Da) sehr kleine Fragmente, die nur aus einer oder wenigen Aminosäuren bestehen, nicht erfasst werden.

Die Bestimmung der Peptidmassen des im Polyacrylamidgel Trypsin gespaltenen 54 kDa Proteins erfolgte mit einem Reflektor-MALDI-TOF-Massenspektrometer am Zentrum für Genomforschung an der Universität Bielefeld. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.10 und in Tabelle 3.1 dargestellt. Die Messung erfolgte mit zwei parallel durchgeführten Spaltungsansätzen, so dass durch einen Abgleich der beiden erhaltenen Peptidmassen-Spektren mehr Information erhalten werden konnte. Da die Ladung z der Molekül-Ionen im ausgewerteten MALDI-Spektrum einfach positiv ist, also $[M+H]^{1+}$ (monoisotopisch), erhält man mit dem Masse zu Ladungs-Verhältnis $[m/z]$ die Masse des Peptid-Ions in Dalton (Da).

MALDI-MS UND ESI-QTOF-MS TRYP SIN-FRAGMENTE

Es wurden für jeden der beiden gemessenen Spaltungsansätze 43 Peptidmassen gefunden. Beide mittels MALDI-MS gefundenen Spektren der parallel durchgeführten Spaltungsansätze zeigen sich trotz eines vergleichbaren Peak-Musters nicht vollkommen identisch (Abb. 3.10), da nicht jedes ionisierte Trypsin-Fragment den Flugzeitanalysator (TOF) passiert. So konnten mit dem zweiten Spaltungsansatz im Vergleich zur ersten Probe vermehrt kleinere Peptide (unter 1500 Da) detektiert werden. Insgesamt wurden mittels MALDI-MS 55 verschiedene Trypsin-Fragmente gemessen. Diese Anzahl liegt in der erwarteten Größenordnung für ein 54 kDa Protein. Da aber, wie oben erwähnt, aufgrund des ausgewählten Messbereichs und der unvollständigen Detektion im Flugzeitanalysator nicht alle Trypsin-Fragmente erfasst werden, liegt die tatsächliche Fragment-Anzahl der Spaltungsansätze vermutlich noch höher. Dieses wurde nachfolgend durch weitere Peptidmassen-Bestimmungen im Rahmen der Aminosäure-Sequenzierung der Trypsin-Fragmente der 54 kDa Proteinbande aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis* mittels ESI-QTOF-Tandem-Massenspektroskopie bestätigt.

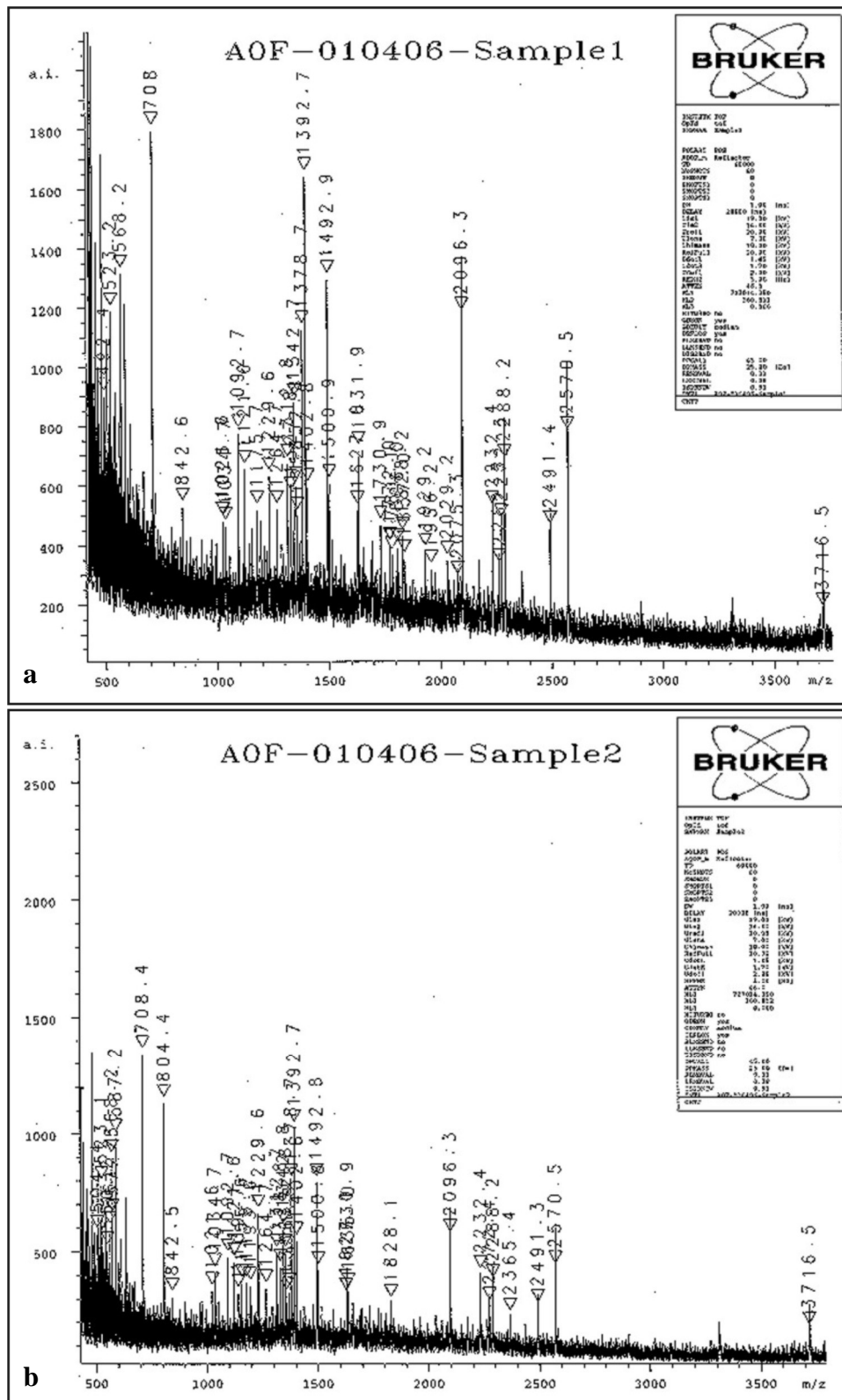


Abb. 3.10 MALDI-TOF-Massenspektren der Trypsin gespaltenen 54 kDa substratbindenden Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes. Gemessen wurden zwei parallel durchgeführte Spaltungsansätze des Proteins nach Kokristallisation mit einer CHCA-Matrix. **a** MALDI-TOF-Massenspektrum der Probe 1, **b** MALDI-TOF-Massenspektrum der Probe 2. Die Einheit der x-Achse (m/z , Masse zu Ladung) bzw. die Beschriftung der Peaks entspricht der Peptidmasse in [Da], da die Peptid-Ionen einfach positiv geladen sind. Beide Spektren zeigen ein ausreichend ähnliches aber kein identisches Muster.

Weitere Trypsin-Fragment-Massen des 54 kDa Proteins wurden mittels ESI-QTOF-MS/MS am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum von Dr. Markus Piotrowski bestimmt. Da das primäre Ziel dieser Messungen die Aminosäure-Sequenzierung der Peptide war (siehe Kapitel 3.5.2), wurde mit dieser Methode kein vollständiges Spektrum aufgenommen. Von den gemessenen 26 Peptidmassen waren 15 nicht in den MALDI-TOF-Massenspektren zu finden. Der Übersichtlichkeit halber werden alle erhaltenen Peptidmassen aus beiden massenspektrometrischen Methoden zusammen in Tabelle 3.1 dargestellt:

Peptid Nr.	MALDI-MS Probe 1 Peptidmasse $[m/z]^{1+}$	MALDI-MS Probe 2 Peptidmasse $[m/z]^{1+}$	ESI-MS Peptidmasse $[m/z]^{1+}$	Peptid Nr.	MALDI-MS Probe 1 Peptidmasse $[m/z]^{1+}$	MALDI-MS Probe 2 Peptidmasse $[m/z]^{1+}$	ESI-MS Peptidmasse $[m/z]^{1+}$
1	492.4			36	1392.7	1392.7	1392.7
2		504.4		37			1394.6
3	523.2	523.1		38	1402.8	1402.8	
4		550.2		39			1443.0
5		561.2		40	1492.9	1492.9	1492.9
6	568.2	568.2		41	1500.9	1500.8	
7		572.5		42			1513.4
8		587.2		43			1516.8
9	708.5	708.4		44			1538.0
10		804.4		45	1627.0	1627.0	
11	842.6	842.6		46			1630.8
12			991.2	47	1631.9	1631.9	
13			1015.5	48		1635.0	
14	1021.6	1021.6		49			1728.0
15	1025.7			50	1730.9		
16	1034.7	1034.7	1034.7	51	1772.0		
17	1092.7	1092.7		52	1781.1		
18	1121.6	1121.6	1121.6	53	1806.0		
19		1139.7		54			1822.0
20			1150.4	55	1828.2	1828.1	
21		1155.6		56	1837.0		1837.0
22	1175.7	1175.7		57			1861.8
23		1193.6		58	1929.2		
24	1229.6	1229.6	1229.6	59	1956.2		
25	1264.7	1264.7		60	2029.2		
26			1292.3	61	2075.3		
27	1312.8	1312.7		62	2096.3	2096.3	2096.3
28	1327.8	1328.8		63	2232.4	2232.4	
29	1342.7	1342.8	1342.3	64	2262.3		
30			1343.8	65	2272.3	2272.4	
31	1352.8	1352.8	1352.8	66	2288.2	2288.2	
32	1356.7	1356.7		67		2365.4	
33			1360.8	68	2491.4	2491.3	
34		1370.8	1370.8	69	2570.5	2570.5	2570.5
35	1378.7	1378.7		70	3716.5	3716.5	

Tab. 3.1 Massenspektrometrische Peptidmassen (MALDI-TOF-MS und ESI-QTOF-MS) der isolierten 54 kDa substratbindenden Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes. Durch die Messungen am MALDI-TOF-Massenspektrometer wurden sowohl in Probe 1 als auch in Probe 2 (parallel durchgeführte Spaltungsansätze) je 43 Peptidmassen bestimmt, mit dem ESI-QTOF-Massenspektrometer weitere 26 Peptide. Da nicht alle Peptide in allen Messungen detektiert wurden, erhält man in der Summe (grau unterlegt) **insgesamt 70 Peptidmassen** von 492.4 bis 3716.5 Da. Die 2-fach und 3-fach geladenen Peptide aus den ESI-QTOF-MS-Analysen wurden zu 1-fach positiv geladenen Ionen umgerechnet und gerundet. Die Einheit Masse zu Ladung $[m/z]$ entspricht demnach der Peptidmasse in Da.

In der ESI-QTOF-Massenspektroskopie erhält man zweifach $[M-2H]^{2+}$ oder dreifach $[M-3H]^{3+}$ geladene Peptidmassen, die zur besseren Vergleichbarkeit in monoisotopische Peptid-Ionen $[M+H]^{1+}$ umgerechnet wurden. Insgesamt konnten für das 54 kDa Protein mit den beiden massenspektrometrischen Verfahren 70 Trypsin-Fragmente mit molekularen Massen zwischen 492.4 und 3716.5 Da erhalten werden.

ANZAHL DER TRYPSIN-FRAGMENTE

Die gefundene Anzahl von 70 Peptiden wäre für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 54 kDa ungewöhnlich hoch. Dieses gilt vor allem unter dem Gesichtspunkt, dass nicht alle Trypsin-Fragmente den Flugzeitanalysator (TOF) passieren und durch den eingeschränkten Messbereich sehr kleine Fragmente mit drei oder weniger Aminosäuren nicht erfasst werden. Bei der aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis* isolierten Proteinbande handelt es sich demnach entweder um ein Protein mit besonders vielen basischen Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R), den Spaltstellen der Protease Trypsin, oder aber um zwei kogereinigte Proteine mit gleichen Molekularmassen. Im ersten Fall müssten bei einer Spaltung besonders viele kleine und sehr kleine Peptide entstehen, da man bei 69 Spaltstellen im Durchschnitt Fragmente von etwa 7 Aminosäuren (im Mittel von etwa 755 Da) erhalten würde. In den vorliegenden Spektren sind aber lediglich 12 % der Peptidmassen kleiner als 750 Da. Die erhaltenen Peptidmassen ergeben demnach keinen eindeutigen Hinweis auf ein besonders Lysin- und Arginin-haltiges Protein. Die in Kapitel 3.5.2 dargestellten Ergebnisse der Aminosäure-Sequenzierung mittels ESI-QTOF-MS/MS und Edman-Abbau sprechen dagegen ebenfalls für die zweite Möglichkeit, nämlich die Koexistenz von zwei Proteinen in der isolierten 54 kDa Bande.

ANALYSE DER PEPTIDMASSEN-SPEKTREN

Die Analyse der erhaltenen Peptidmassen im Abgleich mit den massenspektrometrischen Datenbanken (MASCOT <http://www.matrixscience.com/home.html>, PERKINS et al. 1999) führte bei einer Peptidmassen-Toleranz von 0.04 % nicht zu signifikanten Ergebnissen. Bei bereits bekannten Protein-Sequenzen (bzw. Sequenzen der entsprechenden Gene) wäre die Identifikation von biochemisch isolierten Proteinen anhand der Peptidmassen dagegen möglich. Das bedeutet, dass es sich bei den isolierten 54 kDa Proteinen um zwei bei *Euglena gracilis* bisher unbekannte Proteine mit bezüglich der Peptidmassen geringen Übereinstimmungen zu Proteinen anderer Organismen handelt. Die Auswertungen der Massenspektren ermöglichten keine Zuordnungen der Peptide zu einem der beiden in der ausgeschnittenen Bande enthaltenen Proteine und demzufolge auch keine Identifizierung der beiden Proteine.

Einige Peptidmassen führten zu Ergebnissen unterhalb der Signifikanz-Schwelle, weisen aber eine Bedeutung im Hinblick auf die angenommene Funktion eines der beiden isolierten Proteine auf:

A. Die UDP-Glucose 4-Epimerase aus dem alpha-Proteobakterium *Brucella melitensis* katalysiert die Umwandlung von UDP-Glucose in UDP-Galactose und ist damit ein UDP-Glucose-bindendes Enzym. Die Übereinstimmung des 30.8 kDa Proteins zu den Peptidmassen der 54 kDa Proteinbande aus *Euglena gracilis* beschränkt sich auf fünf Peptide:

A. NC_003317 UDP-Glucose 4-Epimerase [*Brucella melitensis*], Mr Protein: 30857 Da, Score: 34

gemessen [m/z] ¹⁺	Mr gemessen	Mr kalkuliert	Delta	AS von	AS bis	Miss	Peptid
804.40	803.39	803.49	-0.10	240	- 247	0	FLLGGIGK
1121.60	1120.59	1120.59	0.00	176	- 185	0	SFVSLLENVAR
1193.60	1192.59	1192.64	-0.04	202	- 211	0	VFHLAEPQPR
1394.60	1393.59	1393.71	-0.12	20	- 32	0	LEAAGHNV MPLSR
2491.40	2490.39	2491.15	-0.76	33	- 55	0	EDIHDADFSGVETVVHCAALHR

B. Eine beta-1,4-Acetylgalactosaminyltransferase aus dem epsilon-Proteobakterium *Campylobacter jejuni* stimmt ebenfalls mit fünf Peptidmassen mit der 54 kDa Proteinbande aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis* überein. Das 41.6 kDa Enzym verwendet UDP-N-Acetylgalactosamin als Substrat für die Zellwandsynthese:

B. AF130984 β-1,4-Acetylgalactosaminyltransferase [*Campylobacter jejuni*], Mr Protein: 41635 Da, Score: 34

gemessen [m/z] ¹⁺	Mr gemessen	Mr kalkuliert	Delta	AS von	AS bis	Miss	Peptid
1092.70	1091.69	1091.60	0.09	137	- 145	0	QYPSFIPIK
1121.60	1120.59	1120.65	-0.05	10	- 18	0	IICLFIPFR
1328.80	1327.79	1327.64	0.15	309	- 318	0	YNWISIEEFK
1392.70	1391.69	1391.71	-0.02	146	- 156	0	YPYEIQIQNPK
1727.98	1726.97	1726.86	0.11	162	- 175	0	LYSYNYVASFIPK

C. Außerdem konnte ein beta-1,3-Glucan-bindendes Protein, die 34 kDa beta-1,3-Endoglucanase aus Gerste (*Hordeum vulgare*, Poaceae) gefunden werden. Es dient der Hydrolyse von beta-1,3-Glucane und weist ebenfalls eine Übereinstimmung in fünf Peptiden zur 54 kDa Proteinbande aus *Euglena gracilis* auf:

C. AY239038 Glucan-endo-1,3-beta-D-Glucosidase V [*Hordeum vulgare*], Mr Protein: 34034 Da, Score: 34

gemessen [m/z] ¹⁺	Mr gemessen	Mr kalkuliert	Delta	AS von	AS bis	Miss	Peptid
587.20	586.19	586.32	-0.13	181	- 185	0	GQNIR
1121.60	1120.59	1120.53	0.06	66	- 75	0	DPSYAAGWVR
1342.80	1341.79	1341.68	0.11	253	- 263	0	NYNQGLIDHIR
1537.92	1536.91	1536.79	0.12	76	- 88	0	SNVQAYYPDVLIR
2029.20	2028.19	2027.99	0.20	269	- 285	0	RPGAITYIFAMFNENR

Auffallend ist vor allem das in allen drei Proteinen hervorgehoben dargestellte Peptid mit einer monoisotopischen Masse von **1121.60 Da**, welches sowohl in UDP-Glucose bindenden Proteinen (A.) als auch in Glycosyltransferasen (B.) und Glucan-abbauenden Glucosidasen (C.) vorkommt. Hinweise auf typische beta-1,3-Glucan-Synthase-Peptide konnten dagegen nicht einmal mit geringer Signifikanz gefunden werden, obwohl die UDP-Glucose:beta-1,3-Glucan 3-beta-D-Glucosyltransferase ebenfalls zu dem Glycosyltransferasen gehört. Dieses Ergebnis lässt weiterhin den Schluss zu, dass die Glucosyltransferase, die bei *Euglena gracilis* für die Paramylon-Synthese verantwortlich ist, keine hohen Sequenzübereinstimmungen zu anderen beta-1,3-Glucan-Synthasen besitzt.

3.5.2 AMINOSÄURE-SEQUENZIERUNG DER 54 kDA PROTEINBANDE DURCH N-TERMINALEN EDMAN-ABBAU SOWIE VON TRYPSIN-FRAGMENTEN DER 54 kDA PROTEINBANDE DURCH ESI-QTOF-TANDEM-MASSENSPEKTROSKOPIE

Durch den automatischen Edman-Abbau der auf PVDF-Membran geblotteten 54 kDa Proteinbande aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis* an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Tschesche sowie die massenspektrometrische ESI-QTOF-MS/MS-Sequenzierung von Trypsin-Fragmenten am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum durch Dr. Markus Piotrowski wurden die eindeutigen Aminosäure-Sequenzen von 21 Trypsin-Fragmenten der isolierten 54 kDa Proteinbande erhalten. Diese sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

In der massenspektrometrischen Sequenzierung ist es aufgrund von gleichen monoisotopischen Massen nicht möglich, die Aminosäuren Leucin (L, 113.084 Da) und Isoleucin (I, 113.084 Da) zu unterscheiden. Weiterhin erhöht sich die Masse von Methionin (M, 131.04 Da) durch Oxidation um rund 16 Da auf 147.035 Da (M*) und entspricht damit annähernd der Masse von Phenylalanin (F, 147.068 Da). Die entsprechenden Aminosäuren in den Peptidsequenzen wurden deshalb mit folgender Nomenklatur angegeben:

X: sehr sichere Aminosäure	x: eventuelle Aminosäure
(X/Y): X oder Y	(XY): XY oder YX
n-: N-Terminus	-c: C-Terminus
X*: Aminosäure ist modifiziert (z.B. oxidiertes Methionin)	

Durch Analyse der Peptide mit dem NCBI-Programm BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, ALTSCHUL et al. 1990) konnten die mittels Edman-Abbau und ESI-QTOF-MS/MS erhaltenen Peptidsequenzen die Annahme bestätigen, dass es sich bei der ausgeschnittenen Bande um zwei Proteine handelt. Die Nummerierung der Peptide in Tabelle 3.2 erfolgte im Nachhinein und richtet sich nach der Position der Peptide in den Sequenzen. Die erhaltenen Peptide lassen sich aufgrund von Sequenz-Übereinstimmungen zu anderen Proteinen in zwei Gruppen einteilen und sind in der Tabelle bereits entsprechend geordnet.

N-TERMINUS

Zunächst konnte der durch die Edman-Sequenzierung identifizierte N-Terminus eindeutig durch die massenspektrometrische Analyse verifiziert werden. Das bedeutet, dass die zur Edman-Sequenzierung verwendete Proteinprobe N-terminal einheitlich vorlag, so dass die Sequenzierung nicht durch abgespaltene Aminosäuren des anderen Proteins überlagert wurde. Da es sich bei der ausgeschnittenen Bande offensichtlich um zwei Proteine gleicher Molekulargewichte handelt, kann man durch die erfolgreiche Sequenzierung eines N-Terminus mit beiden Methoden davon ausgehen, dass der N-Terminus eines der beiden Proteine blockiert und damit einem Edman-Abbau nicht zugänglich ist.

Der gefundene N-Terminus ergibt keine einheitlich signifikanten Sequenz-Übereinstimmungen in den lokalen Alignments zu anderen Sequenzen der Datenbanken. Dieses liegt an der häufig sehr hohen Variabilität der N-Termini auch bei sehr konservierten Proteinen. Deshalb konnte aufgrund dieser Daten zu diesem Zeitpunkt nicht entschieden werden, zu welchem der beiden Proteine der ermittelte N-Terminus gehört. Außerdem konnten die ersten beiden Aminosäuren

des Proteins mit beiden Methoden nicht sicher bestimmt werden. Dieses könnte ein Hinweis auf eine Modifizierung an einer der ersten beiden Aminosäuren sein, welche deren eindeutige Identifizierung erschwert.

Nr.	Peptidmasse [m/z]	[m/z] ¹⁺	Aminosäure-Sequenz der Peptide	AS
Edman-Abbau			H ₂ N-xIAPATAADVQVx	11 (12)
	508.2 (2+)	1015.4	n-xxAPATAADVK-c xx = (at/ta)/(gl/lg)/(gi/ig)	9
Ia	1048.6 (2+)	2096.2	vvVVNTGSQ(I/L)TVPV(GE/W)AT(I/L)GR-c	19
IIb	697.9 (2+)	1394.8	n-(I/L)(M*/F)NVMGDA(I/L)DQR-c	12
IIIc	696.8 (2+)	1392.6	n-GHGGYSVFAGVGER-c	14
IVd	758.9 (2+)	1516.8	n-VAQTA(I/L)TMAEYFR-c	13
Ve	919.0 (2+)	1837.0	DV(I/L)(I/L)FVD	7
VI f	746.9 (2+)	1492.8	n-(FT)QANSEVSA(I/L)(I/L)GR-c	14
VIIg	911.5 (2+)	1822.0	ePfAVaev	8
1A	722.0 (2+)	1443.0	n-(I/L)PAATSQ(I/L)(I/L)TNVSK-c	14
2B	448.1 (3+)	1342.3	n-(q(i/l))TFHG(I/L)(I/L)EER-c	11
3C	672.4 (2+)	1343.8	n-(I/L)M(I/L)DEVTEsYK-c	11
4D	505.1 (3+)	1513.3	n-((qn)/(e(I/L))FYSHYTgqlr-c	12
5E	769.5 (2+)	1538.0	n-((i/l)y/ef)DGTSTV(I/L)(I/L)(I/L)TNK-c	14
6F	496.1 (2+)	991.2	n-TEVEDgWR-c	8
7G	685.8 (2+)	1370.5	n-LANQFLLLpWR-c	11
8H	561.3 (2+)	1121.6	FVSNAWNQR-c	9
9I	680.9 (2+)	1360.8	(I/L)QALSDDE(I/L)K-c	10
10J	575.7 (2+)	1150.4	n-((QN)/E(I/L))SWLM*tvr-c	9
11K	864.5 (2+)	1728.0	n-NP(M*/F)(I/L)V(I/L)AWQTgg	12
12L	931.4 (2+)	1861.8	SPEDD(I/L)Peas	10
13M	815.9 (2+)	1630.8	n-(VH)P(A(I/L))YPNSHLA((I/L)A)K-c	15

Tab. 3.2 Aminosäure-Sequenzen von 21 Trypsin-Fragmenten der 54 kDa Proteinbande aus *Euglena gracilis*. Die Sequenzierung erfolgte mittels **Edman-Abbau** und **ESI-QTOF-MS/MS**. Die 2-fach und 3-fach positiv geladenen Peptidmassen der ESI-QTOF-MS-Messungen wurden auf monoisotopische Massen [m/z]¹⁺ umgerechnet und gerundet. Die Nummerierung der Peptide erfolgte im Nachhinein und richtet sich nach der Position der Peptide in den zugehörigen Sequenzen. Nomenklatur für die Darstellung der Aminosäuren: **X** sicher identifizierte Aminosäure, **x** nicht sicher oder nicht identifizierte Aminosäure, **(X/Y)** Aminosäure X oder Y, **(XY)** Aminosäuren XY oder YX, **n-** N-Terminus des Peptids, **-c** C-Terminus des Peptids, **X*** modifizierte Aminosäure.

PEPTIDE Ia BIS VIIg

Die in der Tabelle 3.2 mit Ia bis VIIg bezeichneten mittels ESI-QTOF-Massenspektroskopie sequenzierten Peptide der 54 kDa Proteinbande wurden in den BLAST-Analysen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, ALTSCHUL et al. 1990) zur Suche nach lokalen Alignments eindeutig identifiziert und sollen deshalb an dieser Stelle zuerst beschrieben werden.

Diese Peptide konnten einer bei *Euglena gracilis* bisher unbekanntes ATPase beta-Untereinheit zugeordnet werden. Wie das Alignment in Abbildung 3.11 zeigt, handelt es sich dabei nicht um die plastidäre ATPase beta-Untereinheit von *Euglena gracilis*, deren Gen bereits sequenziert ist

(HALLICK et al. 1993). Die Sequenzunterschiede zwischen den gefundenen Peptiden der 54 kDa Proteinbande und der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz der plastidären ATPase beta-Untereinheit von *Euglena gracilis* betreffen zwar nur wenige Aminosäuren, ermöglichen aber dennoch eine eindeutige Unterscheidung. Dieses soll am Beispiel des vollständig sequenzierten Peptides_IVd gezeigt werden (Abb. 3.11): Die theoretische Masse des sequenzierten Peptides_IVd VAQTA(I/L)TM*AEYFR beträgt 1500.75 Da (tatsächlich gemessen wurden dagegen 1516.8 Da, so dass daraus geschlossen werden kann, dass die Aminosäure Methionin des Peptides oxidiert vorliegt), die des entsprechenden Peptides VGLTALTMAEYFR aus der plastidären beta-Untereinheit der ATPase dagegen nur 1471.76 Da. Entsprechend eindeutige Massenunterschiede konnten für alle vollständig sequenzierten Peptide mit Übereinstimmungen zu ATPase beta-Untereinheiten gefunden werden.

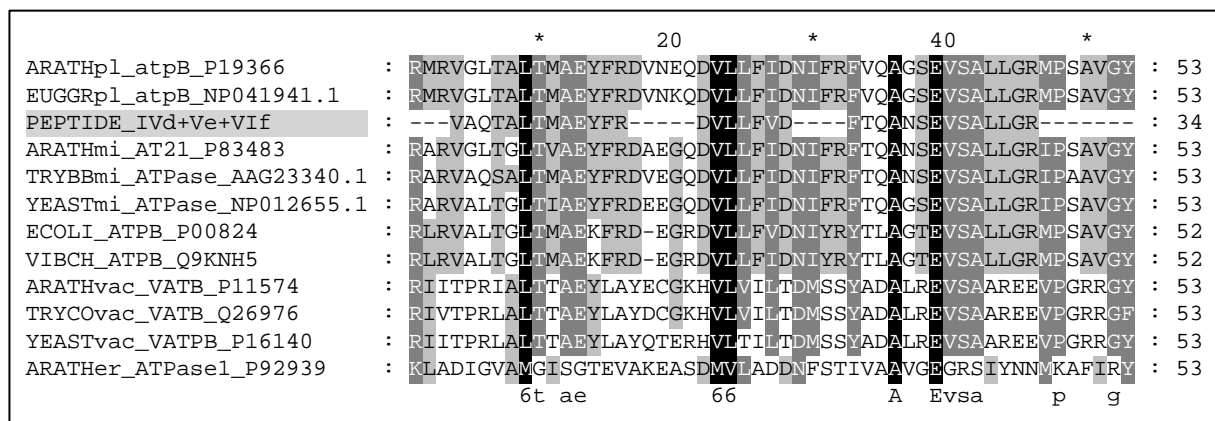


Abb. 3.11 Ausschnitt aus einem Aminosäure-Alignment (erstellt mit CLUSTALX, korrigiert mit GENEDOC) verschiedener ATPase beta-Untereinheiten aus *Arabidopsis thaliana* (ARATH), *Escherichia coli* (ECOLI), *Euglena gracilis* (EUGGR), *Trypanosoma congolense* (TRYCO), *Trypanosoma brucei brucei* (TRYBB), *Saccharomyces cerevisiae* (YEAST) und *Vibrio cholerae* (VIBCH). Die Lokalisation der eukaryotischen ATPasen in der Zelle wird durch die Buchstaben hinter den Artnamen gekennzeichnet: **er** Endoplasmatisches Retikulum, **mi** Mitochondrium, **pl** Plastiden, **vac** Vakuole. Eingefügt sind die sequenzierten Peptide_IVd, _Ve und _Vif aus der ausgeschnittenen 54 kDa Bande des Paramylon-Synthase-Komplexes von *Euglena gracilis* mit Übereinstimmungen zu ATPase beta-Untereinheiten.

Die sequenzierten Peptide Ia bis VIIg entsprechen mit leichten Abweichungen den Sequenzen von plastidären, mitochondrialen und bakteriellen ATPase beta-Untereinheiten aus anderen Spezies. Zu den Sequenzen von vakuolären ATPasen oder zu denen im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierten ATPasen finden sich dagegen nur geringe Ähnlichkeiten (Abb. 3.11). Weitere BLAST-Alignments der zur ATPase beta-Untereinheit gehörenden Peptide sind in Anhang B dargestellt. Da es für die anderen 13 mittels ESI-QTOF-Massenspektroskopie sequenzierten Peptide eindeutig keine Sequenz-Übereinstimmungen zu ATPasen gab, wurde mit diesen Trypsin-Fragmenten (1A bis 13M) in den nachfolgenden Arbeiten das Ziel der Identifizierung der UDP-Glucose:beta-1,3-Glucosyltransferase (Paramylon-Synthase) aus *Euglena gracilis* weiter verfolgt. Die Existenz einer unbekannt ATPase beta-Untereinheit aus *Euglena gracilis* in Solubilisaten von Protein-Komplexen aus der Paramylon-Granula-Membran wird in Kapitel 4 dieser Arbeit diskutiert werden.

		*	
HORVU_1,3bGlucosidase	: DPSYAAGWV-R	: 10	
CAMJE_b1,4AgalAT	: --IICLFIPFR	: 9	
PEPTID_8H_1121.6Da (1+)	: --FVSNAWNQR	: 9	
BRUME_UDPglcEpimerase	: -SFVSLNVAR	: 10	
			R

Abb. 3.13 Alignment der **Peptide mit einer monoisotopischen Masse von 1121.6 Da** (erstellt mit GENEDOC). Das **Peptid_8H** des 54 kDa Proteins aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis* im Vergleich mit der Glucan-endo-1,3-beta-D-Glucosidase V (34 kDa) aus *Hordeum vulgare* [HORVU_1,3bGlucosidase, AY239038], der beta-1,4-Acetylgalactosaminyltransferase (41.6 kDa) aus *Campylobacter jejuni* [CAMJE_b1,4AgalAT, AF130984] und der UDP-Glucose 4-Epimerase (30.8 kDa) aus *Brucella melitensis* [BRUME_UDPglcEpimerase, NC_003317].

FAZIT

In der ausgeschnittenen 54 kDa substratbindenden Proteinbande aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis* wurden massenspektrometrisch sequenzierte Peptide von zwei verschiedenen Proteinen gefunden. Die eine Gruppe der Peptide (Ia bis VIIg) gehört eindeutig zu einer in *Euglena gracilis* noch nicht bekannten ATPase beta-Untereinheit. Für die Trypsin-Fragmente des anderen Proteins (1A bis 13M) ergaben sich sowohl durch die Peptidmassenspektren als auch durch die Aminosäure-Sequenzen deutliche Hinweise auf Glycosyltransferasen bzw. Übereinstimmungen zu UDP-Glucose- oder beta-1,3-Glucanbindenden Proteinen. Die Analysen konnten allerdings aufgrund der hohen Sequenz-Divergenz von *Euglena gracilis* und der vergleichsweise geringen Sequenz-Ähnlichkeiten der sehr divergenten Familien der Glycosyltransferasen nicht zu einer eindeutigen Identifikation des 54 kDa Proteins aus dem Paramylon-Synthase-Komplex beitragen. Da das Ziel dieser Arbeit die Identifizierung des Gens der UDP-Glucose:beta-1,3-Glycosyltransferase (Paramylon-Synthase) aus *Euglena gracilis* ist, wird die Existenz einer bisher unbekannt ATPase beta-Untereinheit in den Solubilisaten aus den Paramylon-Granula-Membranen in Kapitel 4 diskutiert werden.

Aufgrund ihrer Übereinstimmungen zu Glycosyltransferasen wurden zur Amplifikation des kodierenden Gens für die Peptide 1A bis 13M zunächst degenerierte Primer aus den Aminosäure-Sequenzen abgeleitet. Die eindeutige Zuordnung des N-Terminus zu der Paramylon-Synthase-Sequenz und die Ermittlung der Reihenfolge der mittels ESI-QTOF-MS/MS sequenzierten Peptide in dem zugehörigen Protein war jedoch zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich. Zudem beruht die bevorzugte Verwendung bestimmter Nukleotide für die Kodierung der Aminosäuren („codon usage“) aus *Euglena gracilis* bisher nur auf vergleichsweise wenigen Sequenz-Informationen. Aus diesem Grund erwies sich das Screening einer bereits existierenden cDNA-Phagen-Bank von *Euglena gracilis* (Kapitel 3.6) als die geeignete Methode zur Identifizierung des kodierenden Gens für das UDP-Glucose-bindende 54 kDa Protein aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis*.

3.6 SCREENING DER cDNA-PHAGEN-BANKEN VON *EUGLENA GRACILIS*

Ausgehend von den massenspektrometrisch mittels ESI-QTOF-MS/MS sequenzierten Peptiden des 54 kDa Proteins aus dem Paramylon-Synthase-Komplex ohne Übereinstimmungen zur ATPase beta-Untereinheit (1A bis 13M) wurde zunächst eine in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. William F. Martin (Institut für Botanik III an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf) angefertigte, ansequenzierte cDNA-Phagen-Bank von *Euglena gracilis* durchsucht. Bei dieser computergestützten Analyse der EST's von *Euglena gracilis* wurden in zwei Plasmiden (eg0040_11053r und eg0040_15012r) Sequenzen gefunden, die unter anderem für vier der mittels ESI-QTOF-MS/MS sequenzierten Peptide kodieren. Beide Plasmide wurden isoliert und vollständig sequenziert. Da sich die 382 Nukleotide umfassenden Inserts beider Plasmide als identisch erwiesen, wird in Abbildung 3.14 exemplarisch das Insert von Plasmid eg0040_11053r zusammen mit den identifizierten Peptiden aus den massenspektrometrisch sequenzierten Trypsin-Fragmenten dargestellt. Die aus mRNA synthetisierte cDNA von *Euglena gracilis* wurde vor dem Anlegen der cDNA-Phagen-Bank mit *EcoR* I / *NotI*-Adaptoren versehen, so dass die gezeigte EST-Sequenz am 5'-Ende mit der verbleibenden *NotI*-Schnittstelle beginnt.

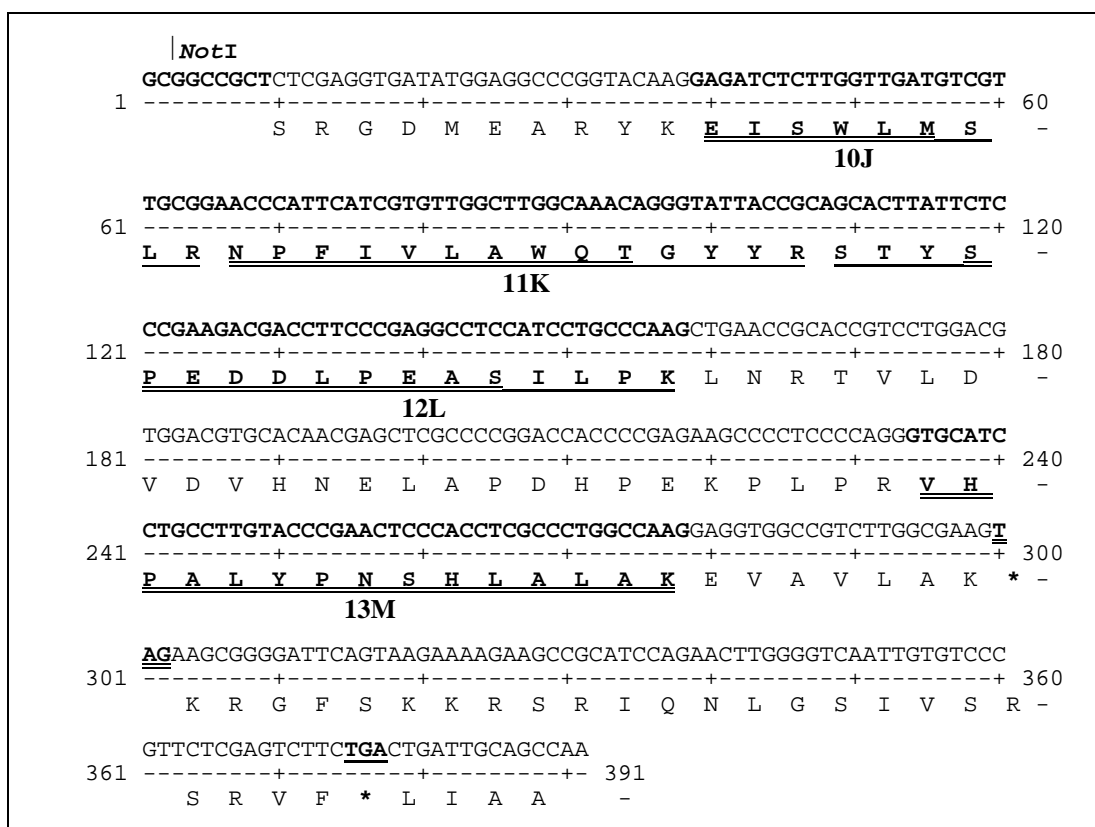


Abb. 3.14 Insert des Plasmids eg0040_11053r aus der ansequenzierten cDNA-Phagen-Bank von *Euglena gracilis* mit dem korrekten Leserahmen. Die mittels ESI-QTOF-MS/MS sequenzierten Aminosäuren der **Peptide 10J, 11K, 12L und 13M** sind doppelt unterstrichen, die entsprechenden vollständigen Trypsin-Fragmente sind einfach unterstrichen und ebenso wie die zugehörigen Nukleotide hervorgehoben dargestellt. Das Stoppcodon der kodierenden Sequenz (TAG, Nukleotide 300-302) ist doppelt unterstrichen, ein weiteres Stoppcodon in der 3'-UTR (TGA, Nukleotide 375-377) ist einfach unterstrichen. Das *EcoR* I-geschnittene Insert dieses Plasmids diente als Vorlage für die Hybridisierungs-Sonde für das Screening der cDNA-Phagen-Banken von *Euglena gracilis* (siehe auch Abbildung 3.16 b).

Das Insert des Plasmids wurde in die sechs möglichen Leserahmen übersetzt, von denen in Abb. 3.14 die Aminosäure-Sequenz dargestellt ist, in der die mittels ESI-QTOF_MS/MS sequenzierten Peptide 10J, 11K, 12L und 13M identifiziert wurden. Dabei zeigte sich, dass alle als sicher sequenzierten Aminosäuren dieser Peptide (in Abb. 3.14 doppelt unterstrichen) zu 100 % mit der abgeleiteten Sequenz des Inserts übereinstimmen. Die kodierende cDNA-Sequenz umfasst bei diesem Plasmid-Insert 294 Nukleotide und endet mit einem TAG-Stoppocodon. In dem sich anschließenden Sequenzabschnitt wurden keine weiteren Peptid-Sequenzen gefunden, da es sich offensichtlich um eine nicht translatierte Region der mRNA (3'-UTR) handelt. Darin findet sich ein weiteres Stoppocodon (TGA).

Da es sich bei den Inserts der sequenzierten Plasmide lediglich um ein 3'-Fragment der kodierenden cDNA handelte, wurde im Anschluss durch eine cDNA-Bank-Hybridisierung nach einem Plasmid mit voller Genlänge gesucht. Bei der Verwendung von Oligo-dT-Primern, die am 3'-Poly-Adenin-Ende einer eukaryotischen mRNA binden, erfolgt die cDNA-Synthese aus mRNA in 3' - 5'-Richtung. Aus diesem Grund liegt bei unvollständiger Synthese der cDNA der N-Terminus (das 5'-Ende des Gens) nicht immer in den Klonen vor.

CDNA-PHAGEN-BANKEN VON *EUGLENA GRACILIS*

Es wurden zwei verschiedene cDNA-Phagen-Banken durchsucht, die beide von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. William F. Martin (Institut für Botanik III an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf) angefertigt wurden und hier kurz charakterisiert werden sollen: Ausgangsmaterial für beide cDNA-Phagen-Banken war jeweils derselbe *Euglena gracilis*-Stamm, der auch für die anderen Experimente dieser Arbeit verwendet wurde. Die Anzucht erfolgte in Medium 9a (*Euglena*-Medium mit Mineralien nach SCHLÖSSER 1994).

Zum einen wurden die Zellen aerob (2 % CO₂ in Luft) und mit Beleuchtung, also unter mixotrophen Nahrungsbedingungen kultiviert. Diese cDNA-Phagen-Bank wird im Folgenden als **aerob (eg0030)** bezeichnet. Die andere cDNA-Phagen-Bank stammt aus 2-tägig im Dunkeln, also heterotroph kultivierten Zellen, die mit 2 % CO₂ in N₂ versorgt wurden und deshalb im Folgenden mit **anaerob (eg0040)** bezeichnet wird. Während die aerobe Bank einen Titer von 3.6 x 10⁷ Plaques/μl bei einer Insertionsrate von 90 % aufwies, hatte die anaerobe Bank einen Titer von 6 x 10⁶ bis 1.3 x 10⁷ Plaques/μl bei einer Insertionsrate von 10 %, d.h. einer von 10 Plaques trägt ein Insert. Von den 2039 EST's der ansequenzierten aeroben Bank liegen 1386 als „single sequence“ und 653 als geklusterte Sequenzen vor. Bei der ansequenzierten anaeroben Bank gibt es von den insgesamt 739 EST's weniger „single sequences“ (361) als geklusterte (378), d.h. dass alle „single sequences“ auch in den Klustern vorkommen.

HYBRIDISIERUNGS-SONDE UND SCREENING DER CDNA-PHAGEN-BANKEN

Als Vorlage für die Hybridisierungs-Sonde diente das *EcoR* I-geschnittene Insert des sequenzierten cDNA-Bank-Plasmids eg0040_11053r (siehe auch Abbildung 3.16 b). Dieses insgesamt 405 Nukleotide umfassende Fragment setzt sich aus 294 Nukleotiden des 3'-Endes der Paramylon-Synthase-cDNA, der 3'-UTR (89 Nukleotide) sowie den verbleibenden Reste der *EcoR* I/*Not*I-Schnittstellen (23 Nukleotide) zusammen. Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmente dieses Inserts erfolgte durch „random priming“ mit [alpha-³²P].

Das Screening der cDNA-Phagen-Banken von *Euglena gracilis* erfolgte durch zwei aufeinanderfolgende Hybridisierungen (1. Screen und 2. Screen) der Nitrocellulose-Replika der ausplattierten Phagen. Aus den im ersten Screen positiven Phagen-Plaques wurden die im nachfolgenden Vereinzlungs-Screen positiven Phagen-Klone isoliert, deren Plasmid-Inserts anschließend in einem geeigneten *E. coli*-Stamm ausgeschleust wurden (Transfektion). Die Anzahl der erhaltenen positiven Phagen-Plaques bzw. Bakterienkolonien des cDNA-Phagen-Bank-Screenings werden in nachfolgender Übersicht zusammengefasst:

cDNA-Phagen-Bank	positive Phagen-Plaques		Transfektion in <i>E. coli</i> SOLR
	1. Screen	2. Screen (Vereinzlung)	
aerob (eg0030)	6	6	5
anaerob (eg0040)	16	13	4
insgesamt	22	19	9

Von den 22 positiven Phagen-Plaques des ersten Screens konnten 19 im zweiten Vereinzlungs-Screen wiedergefunden werden. Nach der Transfektion der Phagemide in den *E. coli*-Stamm SOLR wurden schließlich 9 Klone erhalten. Diese wurden zunächst im Hinblick auf die Größen der Inserts in den pBluescriptSK⁻ Plasmiden überprüft. Für ein 54 kDa Protein werden ca. 490 Aminosäuren benötigt, so dass eine etwa 1470 Nukleotide umfassende cDNA-Sequenz erwartet wurde.

Die Insertgrößen der erfolgreich ausgeschleusten Plasmide wurden experimentell über *Eco*R I-Spaltungen der isolierten Plasmide oder über PCR-Amplifikation mit im Vektor bindenden M13-Sequenzierprimern bestimmt und werden in Tabelle 3.3 dargestellt:

Aerobe Bank (eg0030)	Insertgröße	Anaerobe Bank (eg0040)	Insertgröße
eg0030_2	~ 750 nt	eg0040_16a	~ 800 nt
eg0030_11	~ 1200 nt	eg0040_29a1	~ 700 nt
eg0030_12	~ 800 nt	eg0040_29a3	~ 1500 nt
eg0030_26	~ 1500 nt	eg0040_32a3	~ 1000 nt
eg0030_28	~ 1500 nt		

Tab. 3.3 Experimentell ermittelte Insertgrößen der ausgeschleusten Plasmide aus den Klonen der aeroben (eg0030) und der anaeroben (eg0040) cDNA-Phagen-Banken. Die hervorgehoben dargestellten Plasmide wurden vollständig sequenziert, die anderen Plasmide wurden ansequenziert.

Insgesamt wurden drei Klone mit etwa 1500 Nukleotide umfassenden Inserts in der erwarteten Größenordnung gefunden, zwei in der aeroben Bank und ein weiterer in der anaeroben Bank. Diese drei Plasmide sowie ein nur 1200 Nukleotide umfassendes Insert von Klon eg0030_11 aus der aeroben Bank wurden in überlappenden Fragmenten vollständig sequenziert. Die anderen erhaltenen Plasmide mit kleineren Inserts wurden zur Identifizierung ansequenziert, um zu überprüfen, ob die Fragmente der Hybridisierungs-Sonde eventuell ein weiteres Gen im Genom von *Euglena gracilis* detektieren.

Es zeigte sich, dass alle Inserts am 5'-Ende der cDNA-Sequenz einen unterschiedlich langen Poly-Adenin oder Poly-Thymin-Abschnitt besaßen, so dass die Sequenzierung der Plasmide in 3' - 5'-Richtung mit internen reversen Oligonukleotid-Primern erfolgte. Eine für eukaryotische mRNA typische 3'-Polyadenylierung konnte dagegen nicht gefunden werden.

SEQUENZVARIANZ

Alle ansequenzierten und vollständig sequenzierten Plasmide (Tab. 3.4) enthielten die der EST-Sequenz entsprechende cDNA in unterschiedlicher Leseweite. Es wurde also kein anderes unbekanntes Gen durch die für die Paramylon-Synthase spezifischen Fragmente der Hybridisierungs-Sonde detektiert. Die Konsensus-Sequenzen der Plasmide sind zudem bis auf zwei Nukleotid-Positionen identisch. Da die Sequenzierungen an beiden Nukleotid-Positionen eindeutig sind, kann es sich bei dieser Sequenzvarianz nur um zwei verschiedene Genkopien bzw. Isoformen der Paramylon-Synthase handeln. Eine genauere Beschreibung und Analyse dieser Unterschiede in der Paramylon-Synthase-Sequenz erfolgt in Kapitel 3.8 im Rahmen der Sequenzanalyse der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz.

LESEWEITE

Das Insert des vollständig sequenzierten Plasmides eg0030_28 aus der aeroben Bank erreichte mit 1521 nt (1462 nt ohne 3'-UTR) die längste Leseweite (Tab. 3.4). Dennoch beginnt die gefundene Sequenz am 5'-Ende nicht mit einem für Eukaryoten typischen Startcodon ATG. Durch die vorliegenden massenspektroskopisch ermittelten Peptid-Sequenzen ist der Leserahmen der kodierenden Sequenz bekannt, so dass das 5'-Ende des längsten cDNA-Inserts der aeroben Phagen-Bank von *Euglena gracilis* (Plasmid eg0030_28) mit XXG ACG GCC beginnt (siehe Sequenz eg0030_28 in Abbildung 3.15). Auch an der Anzahl der kodierenden 1462 Nukleotide lässt sich erkennen, dass es sich bei diesem Insert noch nicht um die vollständige Sequenz für die Paramylon-Synthase handeln kann, da noch mindestens zwei Nukleotide für ein proteinkodierendes Gen fehlen.

		Insertgröße experimentell	Insertgröße sequenziert	kodierende Sequenz ohne 3'-UTR	3'-UTR
Aerobe Bank (eg0030)	eg0030_11	~ 1200 nt	1181 nt	1099 nt	82 nt
	eg0030_26	~ 1500 nt	1500 nt	1415 nt	85 nt
	eg0030_28	~ 1500 nt	1521 nt	1462 nt	59 nt
Anaerobe Bank (eg0040)	eg0040_29a3	~ 1500 nt	1429 nt	1354 nt	75 nt

Tab. 3.4 Vergleich der experimentellen und der tatsächlichen Insertgrößen der vollständig sequenzierten Plasmide aus den Klonen der aeroben (eg0030) und der anaeroben cDNA-Phagen-Bank von *Euglena gracilis*. Das hervorgehoben dargestellte Plasmid eg0030_28 enthält mit einer kodierenden Sequenz von 1462 nt das längste Insert, aber nicht die vollständige kodierende Sequenz für die Paramylon-Synthase.

Da in beiden cDNA-Phagen-Banken von *Euglena gracilis* kein Insert mit voller Genlänge vorlag, wurde eine RT-PCR durchgeführt, um den 5'-Anfang der Paramylon-Synthase-cDNA zu identifizieren. Dabei wurde die für *Euglena gracilis* charakteristische „spliced leader“-Sequenz, die durch einen *trans*-Spleiß-Mechanismus mit der prä-mRNA verbunden wird, als Bindestelle für einen in 5' - 3'-Richtung orientierten Primer verwendet.

3.7 VERVOLLSTÄNDIGUNG DES 5'-ENDES DER cDNA FÜR DIE PARAMYLON-SYNTHESE VON *EUGLENA GRACILIS* DURCH VERWENDUNG EINES „SPLICED LEADER“-SPEZIFISCHEN OLIGONUKLEOTID-PRIMERS IN DER RT-PCR

Um das 5'-Ende der cDNA für die Paramylon-Synthase zu erhalten, welches in den Klonen der cDNA-Phagen-Banken nicht enthalten war, wurde zunächst aus mRNA von *Euglena gracilis* mittels Oligo-dT-Primern die entsprechenden cDNA synthetisiert (Reverse Transkription). Die cDNA diente als Template für eine nachfolgende PCR mit dem spezifischen Oligonukleotid-Primer für den „spliced leader“ (Primer EgSL, forward) sowie einem für die Paramylon-Synthase-cDNA spezifischen reversen Primer. In der Abbildung 3.15 sind die „spliced leader“-RNA-Sequenz von *Euglena gracilis*, der daraus abgeleitete Primer und der Anfang des damit erhaltenen RT-PCR-Produktes dargestellt:

	*	20	*	40	*
spliced_leader_RNA	: ACTTTCTGAGTGTCTATTTTTTTTCG	-----	-----	-----	-----
RTPCR_EgSL	: -----CTGAGTGTCTATTTTTTTTCG	GTGATG	ACGGCCGTAGTGAAGAATTTGGCG		
5'-Ende_eg0030_28	: -----	-----	-----GACGGCCGTAGTGAAGAATTTGGCG		
cDNA_Paramylon_Synthase	: -----	-----	-----ATG	ACGGCCGTAGTGAAGAATTTGGCG	
SL+cDNA	: ACTTTCTGAGTGTCTATTTTTTTTCG	GTGATG	GACGGCCGTAGTGAAGAATTTGGCG		

Abb. 3.15 Alignment der Sequenzen der „spliced leader“-RNA von *Euglena gracilis* (spliced_leader_RNA), dem RT-PCR-Produkt, welches mit dem „spliced leader“-Primer (EgSL, grünblau unterlegt) und einem cDNA-spezifischen reversen Primer erhalten wurde (RTPCR_EgSL) und dem 5'-Ende des Plasmid-Inserts eg0030_28 mit der längsten Leseweite aus der cDNA-Phagen-Bank von *Euglena gracilis*. Daraus ergibt sich die am 5'-Ende vollständige cDNA-Sequenz der Paramylon-Synthase mit dem Startcodon ATG (gelb unterlegt). Das Vorliegen einer charakteristischen „spliced leader“-RNA konnte damit auch für dieses Gen gezeigt werden. SL „spliced leader“.

Daraus ergibt sich in Übereinstimmung mit der Sequenz des Plasmides eg0030_28 aus der aeroben cDNA-Phagen-Bank von *Euglena gracilis* das Startcodon ATG für die Paramylon-Synthase cDNA. Weiterhin konnte damit gezeigt werden, dass auch die für die Paramylon-Synthase kodierende mRNA zusammen mit einer für *Euglena gracilis* charakteristischen „spliced leader“-RNA vorliegt. Zwischen der „spliced leader“-Sequenz und dem ATG-Startcodon findet sich ein ebenfalls nicht kodierendes Triplet GTG.

3.8 ANALYSE DER cDNA-SEQUENZ (EGPAS) FÜR DIE 54 kDA SUBSTRATBINDEnde UNTEREINHEIT DES PARAMYLON-SYNTHESE-KOMPLEXES AUS *EUGLENA GRACILIS*

Im Folgenden wird zunächst die cDNA-Sequenz der Paramylon-Synthase aus *Euglena gracilis* und die daraus abgeleitete Aminosäure-Sequenz (Kapitel 3.9) analysiert. Anschließend erfolgt die Identifizierung und Beschreibung des zugehörigen Gens (Kapitel 3.10).

Mit der vollständigen cDNA-Sequenz (cDs) liegen erstmals molekulare Daten für die substratbindende Untereinheit der Paramylon-Synthase (UDP-Glucose:beta-1,3-Glucosyltransferase) aus *Euglena gracilis* vor. Das bisher unbekannte Gen wurde in Anlehnung an die von DELMER 1999 vorgeschlagene Nomenklatur für Callose-Synthasen *egpas* (**EgPaS** für *Euglena gracilis* Paramylon-Synthase) genannt. Die vollständige cDNA-Sequenz der Paramylon-Synthase aus *Euglena gracilis* wird in Abbildung 3.16 zusammen mit der

5'-„spliced leader“-RNA (26 Nukleotide), dem nicht kodierenden Triplet **GTG** und der 89 Nukleotide umfassenden 3'-UTR dargestellt.

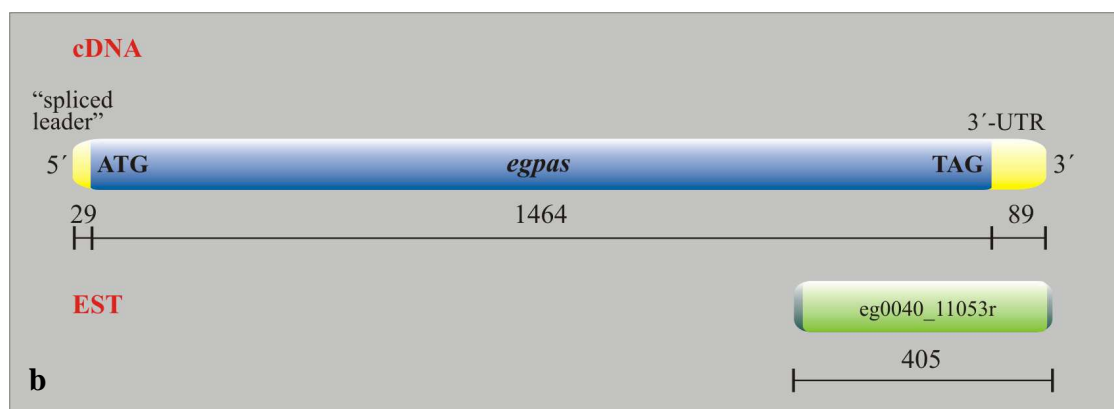
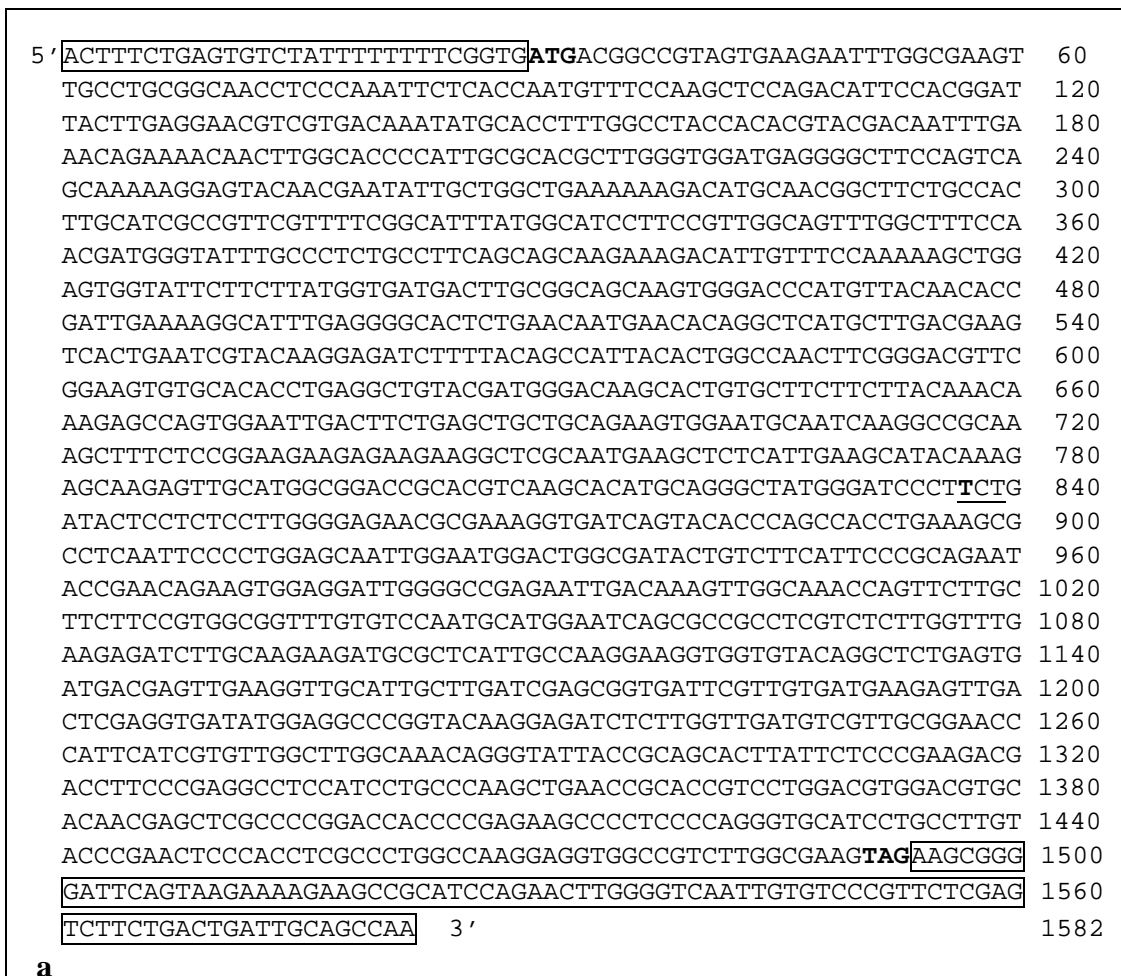


Abb. 3.16 a Vollständige cDNA-Sequenz der Paramylon-Synthase aus *Euglena gracilis* (*egpas*) mit der vorangestellten 5'-„spliced leader“-RNA + **GTG** (eingerahmt) und der sich anschließenden 3'-UTR (eingerahmt). Der „spliced leader“ umfasst 26 Nukleotide, die kodierende Sequenz 1464 Nukleotide und die 3'-UTR weitere 89 Nukleotide. Die kodierende Sequenz beginnt mit einem **ATG**-Startcodon und endet mit einem **TAG**-Stoppocodon. Das unterstrichene Triplet **TCT** bezeichnet die Stelle der Sequenzvarianz mit Auswirkungen auf die Aminosäure-Sequenz, die in Kapitel 3.9 näher beschrieben wird.

b Schematische Darstellung der vollständigen cDNA-Sequenz der Paramylon-Synthase aus *Euglena gracilis* (*egpas*, blau) mit der vorangestellten 5'-„spliced leader“-RNA (gelb) und der sich anschließenden 3'-UTR (gelb). Das als Vorlage für die Hybridisierungs-Sonde verwendete Insert des Plasmids eg0040_11053r (EST-Fragment) ist grün dargestellt und entsprechend seiner Position in der Sequenz angeordnet.

Die kodierende Sequenz der substratbindenden Untereinheit der Paramylon-Synthase aus *Euglena gracilis* (*egpas*) weist 1464 Nukleotide auf und kodiert für 487 Aminosäuren. Sie beginnt mit einem ATG-Startcodon und wird von dem Stoppcodon TAG terminiert. Das Nukleotid an Position 808 der kodierenden cDNA aus dem Triplet TCT bezeichnet die Stelle der Sequenz, an der in den Plasmiden der cDNA-Phagen-Banken von *Euglena gracilis* eine Varianz mit Auswirkungen auf die Aminosäure-Sequenz gefunden wurde (GCT kodiert für Alanin, TCT kodiert für Serin). Diese Varianz wird in Kapitel 3.9 (Abb. 3.17 und Tab. 3.8) bei der Analyse der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz detaillierter beschrieben.

NUKLEOTID-ZUSAMMENSETZUNG

Sowohl die 5'-„spliced leader“-RNA als auch die kodierende Sequenz (cds) und die 3'-UTR wurden bezüglich ihrer Basen-Zusammensetzung untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.5 dargestellt. Es zeigte sich, dass der GC-Gehalt der „spliced leader“-RNA + GTG mit 34.48 % deutlich niedriger als für die kodierende cDNA (51.98 %) und auch niedriger als der GC-Gehalt der 3'-UTR (49.44 %) liegt. Der GC-Gehalt der kodierenden Sequenz für die Paramylon-Synthase liegt mit 51.98 % deutlich höher als der durchschnittliche GC-Gehalt aller bekannten Gene von *Euglena gracilis* mit 41.43 % (<http://www.kazusa.or.jp/codon/countcodon.html>).

Nukleotide	„spliced leader“-RNA		cds			3'-UTR		
	Anzahl	Prozent %	Anzahl	Prozent %		Anzahl	Prozent %	
gesamt	26+GTG	100	1464	100		89	100	
A (Adenin)	3	10.34	369	25.20	48.02	24	26.97	50.56
T (Thymin)	16	55.17	334	22.81		21	23.60	
C (Cytosin)	4	13.79	371	25.34	51.98	20	22.47	49.44
G (Guanin)	6	20.69	390	26.64		24	26.97	

Tab. 3.5 Analyse der Nukleotid-Zusammensetzung der „spliced leader“-RNA + GTG, der kodierenden Sequenz (cds) und der 3'-UTR der cDNA der substratbindenden Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *Euglena gracilis*.

Weder die „spliced leader“-RNA (5'-UTR) noch die 3'-UTR des Gens weisen eine der charakteristischen funktionellen UTR-Muster auf, die von dem Online-Programm UTRSCAN (<http://www.ba.itb.cnr.it/BIG/UTRScan/>) erfasst werden. Auch das in der 3'-UTR lokalisierte Polyadenylierungssignal AAUAAA, welches sich bei eukaryotischen mRNA's etwa 10 bis 30 Nukleotide vor dem Poly-A-Ende der mRNA befindet (COLGAN & MANLEY 1997), konnte nicht gefunden werden. Dieses spricht möglicherweise für das Vorliegen einer 3'-UTR, die im nativen Zustand der reifen mRNA länger als 89 Nukleotide ist. Ein weiterer Hinweis auf eine längere 3'-UTR ist die Tatsache, dass in keinem der Plasmide der cDNA-Phagen-Bank Hinweise auf eine Poly-Adenin-Sequenz am 3'-Ende der mRNA gefunden werden konnten.

LOKALE ALIGNMENTS (BLAST-ANALYSEN)

Zur Identifizierung der kodierenden Sequenz wurde mit dem NCBI-Programm BLASTX (Vergleich der abgeleiteten Protein-Sequenz gegen die Protein-Datenbanken, GISH & STATES 1993) nach Sequenz-Übereinstimmungen in lokalen Alignments gesucht. Diese Analysen wurden mit einem EXPECTvalue von 1000 durchgeführt, da aufgrund der bekannten hohen genetischen Diversität bei *Euglena gracilis* auch geringere Ähnlichkeiten erfasst werden

sollten. Die Ergebnisse der BLAST-Analyse für die kodierende Sequenz der UDP-Glucose:beta-1,3-Glucosyltransferase (Paramylon-Synthase) aus *Euglena gracilis* ergaben ebenso wie bei den Peptidmassen-Spektren und den Peptid-Sequenzen mit mittlerer Unterstützung Übereinstimmungen zu Glycosyltransferasen, Glycan-abbauenden oder Glycan-bindenden Enzymen.

Die Exoglycosidase Xylan 1,4-beta-Xylosidase aus dem Bakterium *Bacteroides ovatus* hydrolysiert 1,4-beta-D-xylane und weist in dem lokalen Alignment 41 % Identität und 53 % Übereinstimmungen („Positives“) zur Paramylon-Synthase-Sequenz auf:

```
>gi|1364170|pir||S55893 Xylan 1,4-beta-Xylosidase (EC 3.2.1.37) / alpha-L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) - Bacteroides ovatus (strain V975) Length = 325
Score = 34.3 bits (77), Expect = 6.1, Identities = 23/56 (41%), Positives = 30/56 (53%), Gaps = 3/56 (5%), Frame = +1

Query: 1057 ILQEDALIAKEGGVQALSDDDELKVALLDRAVIRCDEE---LTRGDMEARKEISWL 1215
          IL E   A   V  LS+D ++ A   RAV+  DE+   LT GD E R+ E SW+
Sbjct: 173  ILPEGEEEEAIPSRVARLSEDMMEFAEEPRAVVILDEDGKPLTAGDTERFFFEASWM 228
```

Die Glycosyltransferase aus dem Proteobakterium *Magnetococcus* sp. katalysiert einen nicht näher beschriebenen Transfer eines Zuckerrestes und weist 44 % identische und 52 % übereinstimmende Aminosäuren im lokalen Alignment auf:

```
>gi|23000852|ref|ZP_00044771.1|COG0438 Glycosyltransferase [Magnetococcus sp. MC-1] Length= 394
Score = 30.8 bits (68), Expect = 67, Identities = 17/38 (44%), Positives = 20/38 (52%), Frame = +1

Query: 250 DMQRLLPPLASPFVFGIYGILPLAVWLSNDGYLPSAFSS 363
          DMQRLLP+A P   + G LP           GY P+A S
Sbjct: 176 DMQRLLPVADPSALVLLGNLPRMGIACRVGYRPAATRS 213
```

Etwa 30 % Identität und etwa 45 % Übereinstimmungen im lokalen Alignment bestehen schließlich zu der UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus*, die aus UDP-N-acetyl-D-Glucosamin UDP-N-acetyl-D-Mannosamin synthetisiert, sowie zu einer nicht näher beschriebenen Glycosyltransferase aus dem Proteobakterium *Nitrosomonas europaea*:

```
>gi|22299583|ref|NP_682830.1| UDP-N-acetylglucosamine 2-Epimerase [Thermosynechococcus elongatus BP-1] Length = 383
Score = 30.4 bits (67), Expect = 88, Identities = 25/82 (30%), Positives = 37/82 (45%), Gaps = 4/82 (4%), Frame = +1

Query: 757 ELHGGPH--VKHMQGYGIPSDTPLLGENAKGDQYTQPPEASAI-PLQLEWTGDTVFI 924
          +LH P   VK++Q G+   L G N   D   Q +   + P+ L+W   V +
Sbjct: 148 QLHFAPTEQAVKNLQAAGVTGTIHLTG-NTVIDALLQVADRQPVCVPGLDWQYRVLLA 206

Query: 925 AEYRTEVEDWGRELTKLANQFL 990
          +R E   +WG L   +AN FL
Sbjct: 207 TVHRE--NWGAPLEDIANGFL 226
```

```
>gi|30138611|emb|CAD84902.1| Glycosyltransferase family 28 [Nitrosomonas europaea ATCC 19718] Length = 357
Score = 27.3 bits (59), Expect = 629, Identities = 16/55 (29%), Positives = 24/55 (43%), Gaps = 5/55 (9%)

Query: 324 KLANQFLLLPWRFVSNAWNQRRLVSWFEEILQEDALIAKEGGVQALSDDDELKVAL 378
          K + +LLL PWR   W   R++   Q+ ++   GG AL   + V L
Sbjct: 60  KKLSSYLLLPWRLAQACWQSFRI LR-----RQQPQVVLGMGGYPALPGGIMAVLL 109
```

Auffallend ist bei allen lokalen Alignments mit den bakteriellen Sequenzen, dass die übereinstimmenden Bereiche in der kodierenden Sequenz der Paramylon-Synthase von *Euglena gracilis* nicht im N-terminalen Viertel bzw. am 5'-Ende liegen, sondern in den mittleren oder C-terminalen Abschnitten. Zu den bekannten beta-1,3-Glucan-Synthasen aus Höheren Pflanzen, Pilzen oder Bakterien wurden dagegen keine signifikanten Übereinstimmungen auf Nukleotidebene gefunden. Weitere BLAST-Analysen anhand der abgeleiteten Proteinsequenz werden in Kapitel 3.9 dargestellt.

„CODON USAGE“

Zur Analyse der Verwendung bestimmter Triplets für die Kodierung einzelner Aminosäuren („codon usage“) wurde die kodierende Sequenz mit der „codon usage“-Tabelle aus 185 CDS's (61939 codons) von *Euglena gracilis* mit Hilfe des Programms COUNTCODON (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>, NAKAMURA et al. 2000) verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

AS	Paramylon-Synthase cds	<i>Euglena gracilis</i> 185 CDS's (61939 codons)	AS	Paramylon-Synthase cds	<i>Euglena gracilis</i> 185 CDS's (61939 codons)
M (Met)	AUG: 100.0 %	AUG: 100.0 %	W (Trp)	UGG: 100.0 %	UGG: 100.0 %
L (Leu)	UUA: 2.986 %	UUA: 36.98 %	S (Ser)	AGU: 3.502 %	AGU: 15.939 %
	UUG: 35.833 %	UUG: 20.35 %		AGC: 25.043 %	AGC: 10.676 %
	CUA: 0.0 %	CUA: 4.376 %		UCA: 3.502 %	UCA: 16.992 %
	CUU: 25.345 %	CUU: 15.426 %		UCU: 32.224 %	UCU: 32.33 %
	CUG: 20.903 %	CUG: 16.849 %		UCG: 10.683 %	UCG: 7.969 %
V (Val)	CUC: 14.93 %	CUC: 6.017 %	UCC: 25.043 %	UCC: 16.09 %	
	GUA: 7.155 %	GUA: 16.571 %	R (Arg)	AGA: 0.0 %	AGA: 24.435 %
	GUU: 21.465 %	GUU: 41.571 %		AGG: 20.0 %	AGG: 9.034 %
	GUG: 46.422 %	GUG: 26.142 %		CGA: 20.0 %	CGA: 12.731 %
GUC: 24.956 %	GUC: 15.714 %	CGU: 11.96 %		CGU: 25.462 %	
G (Gly)			CGG: 28.039 %	CGG: 8.624 %	
	GGA: 13.555 %	GGA: 27.272 %	CGC: 20.0 %	CGC: 19.712 %	
	GGU: 22.666 %	GGU: 39.914 %	T (Thr)	ACA: 29.124 %	ACA: 31.568 %
	GGG: 27.333 %	GGG: 11.789 %		ACU: 45.824 %	ACU: 34.971 %
GGC: 36.444 %	GGC: 21.022 %	ACG: 8.35 %		ACG: 11.72 %	
		ACC: 16.7 %		ACC: 21.739 %	
A (Ala)	GCA: 32.496 %	GCA: 24.887 %	P (Pro)	CCA: 17.2 %	CCA: 24.475 %
	GCU: 13.474 %	GCU: 38.98 %		CCU: 20.741 %	CCU: 40.093 %
	GCG: 18.89 %	GCG: 10.494 %		CCG: 24.114 %	CCG: 11.188 %
	GCC: 35.138 %	GCC: 25.637 %		CCC: 37.942 %	CCC: 24.242 %
D (Asp)	GAU: 50.0 %	GAU: 60.706 %	Q (Gln)	CAA: 47.3 %	CAA: 53.115 %
	GAC: 50.0 %	GAC: 39.293 %		CAG: 52.699 %	CAG: 46.884 %
F (Phe)	UUU: 29.901 %	UUU: 70.035 %	C (Cys)	UGU: 67.213 %	UGU: 47.368 %
	UUC: 70.098 %	UUC: 29.964 %		UGC: 32.786 %	UGC: 52.631 %
H (His)	CAU: 25.0 %	CAU: 66.055 %	N (Asn)	AAU: 44.444 %	AAU: 63.03 %
	CAC: 75.0 %	CAC: 33.944 %		AAC: 55.555 %	AAC: 36.969 %
K (Lys)	AAA: 35.294 %	AAA: 60.662 %	Y (Tyr)	UAU: 40.888 %	UAU: 64.245 %
	AAG: 64.705 %	AAG: 39.337 %		UAC: 59.111 %	UAC: 35.754 %
I (Ile)	AUA: 0.0 %	AUA: 27.361 %	Stopp	UAA: 0.0 %	UAA: 66.666 %
	AUU: 52.873 %	AUU: 50.416 %		UAG: 100.0 %	UAG: 16.666 %
	AUC: 47.126 %	AUC: 22.222 %		UGA: 0.0 %	UGA: 16.666 %
E (Glu)	GAA: 47.619 %	GAA: 52.007 %			
	GAG: 52.38 %	GAG: 47.992 %			

Tab. 3.6 Vergleich des „codon usage“ der Paramylon-Synthase-cDNA mit dem „codon usage“ aus 185 kodierenden Sequenzen (CDS's) von *Euglena gracilis*. Die Aminosäuren, die von den entsprechenden Triplets des degenerierten Codes kodieren, sind im ein- und drei-Buchstaben-Code angegeben. Das jeweils am häufigsten verwendete Triplett ist hervorgehoben dargestellt.

Mit Ausnahme der Aminosäuren Isoleucin, Serin und Threonin sind die maximalen Häufigkeiten der Verwendung eines bestimmten Triplets bei *egpas* nicht übereinstimmend zu den Angaben des allgemeinen „codon usage“ von *Euglena gracilis*. Auffallend ist, dass für alle nur durch zwei verschiedene Triplets kodierten Aminosäuren in der Paramylon-Synthase-Sequenz das jeweils für *Euglena gracilis* untypischere Triplet verwendet wird. Selbst das TAG-Stoppcodon der Paramylon-Synthase-Sequenz (bzw. im Falle der mRNA UAG) entspricht nicht dem von *Euglena gracilis* bei den bereits bekannten Sequenzen am häufigsten verwendeten TAA bzw. UAA-Stoppcodon. Bei dieser Betrachtung ist allerdings zu berücksichtigen, dass in der verwendeten „codon usage“ Tabelle der 185 CDS's (COUNTCODON) auch einige plastidäre Gene mit in die Berechnungen eingeflossen sind.

3.9 ANALYSE DER ABGELEITEN PROTEIN-SEQUENZ FÜR DIE PARAMYLON-SYNTHESE EGPaS AUS *EUGLENA GRACILIS*

Die 1464 Nukleotide der cDNA-Sequenz für die substratbindende Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *Euglena gracilis* kodieren für das **487 Aminosäuren umfassende Protein EgPaS** mit einem theoretischen pI von 6.01 und einer molaren Masse von 55 935.82 Da. Das vorhergesagte Molekulargewicht entspricht demnach den experimentell in der SDS-PAGE gefundenen 54 kDa (Kapitel 3.4).

Zur Überprüfung der Identität der kodierenden Sequenz wurden die mittels ESI-QTOF-Massenspektroskopie sequenzierten Peptide aus der 54 kDa Proteinbande mit der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz verglichen. Dreizehn der 21 sequenzierten Peptide konnten in der abgeleiteten Sequenz identifiziert werden, die anderen Peptide wurden eindeutig einer bei *Euglena gracilis* bisher nicht bekannten mitochondrialen ATPase beta-Untereinheit zugeordnet. Die in Tabelle 3.2 (Kapitel 3.5.2) angegebene Nummerierung aller nicht zur ATPase beta-Untereinheit gehörenden Trypsin-Fragmente der 54 kDa Proteinbande erfolgte im Anschluss an deren Identifizierung in der kodierenden cDNA-Sequenz.

Die massenspektroskopisch identifizierten Peptide decken 32.4 % der EgPaS-Protein-Sequenz ab und die Identität der gefundenen cDNA-Sequenz ist damit eindeutig gezeigt. Die abgeleitete Protein-Sequenz der substratbindenden Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes von *Euglena gracilis* ist zusammen mit den massenspektrometrisch gefundenen Trypsin-Fragmenten in Abbildung 3.17 dargestellt.

ATG acggccgtagtgaagaatttggcgaagttgcctgctgaggcaacctcccaaattctcacc	60
M T A V V K N L A K L P A A T S Q I L T	20
aatgtttccaagctccagacattccacggattacttgaggaacgtcgtgacaaatatgca	120
<u>N V S K L Q T F H G L L E E R R D K Y A</u>	40
cctttggcctaccacacgtacgacaatttgaacagaaaacaacttggcaccctcattgcg	180
P L A Y H T Y D N L K Q K T T W H P I A	60
cacgcttgggtggatgaggggttccagtcagcaaaaaggagtacaacgaatattgctgg	240
H A W V D E G L P V S K K E Y N E Y C W	80
ctgaaaaaagacatgcaacggcttctgcccattgcatcgccggttcgtttccggcatttat	300
L K K D M Q R L L P L A S P F V F G I Y	100
ggcatccttccggttggcagtttggctttccaacgatgggtatttgcctctgccttcagc	360
G I L P L A V W L S N D G Y L P S A F S	120
agcaagaaagacattgtttccaaaagctggagtggtattcttcttatggatgacttg	420
S K K D I V S K K L E W Y S S Y G D D L	140
cggcagcaagtgggacctggttacaacaccgattgaaaaggcatttgaggggactctg	480
R Q Q V G P M L Q H R L K R H L R G T L	160
aacaatgaacacaggctcatgcttgacgaagtcactgaatcgtacaaggagatcttttac	540
<u>N N E H R L M L D E V T E S Y K E I F Y</u>	180
agccattacactggccaacttcgggacggttcggaagtgtgcacacctgaggctgtacgat	600
<u>S H Y T G Q L R D V R K C A H L R L Y D</u>	200
gggacaagcactgtgcttcttcttacaacaagagccagtggaattgacttctgagctg	660
<u>G T S T V L L L T N K E P V E L T S E L</u>	220
ctgcagaagtggaatgcaatcaaggccgcaaagctttctccggaagaagagaagaaggct	720
L Q K W N A I K A A K L S P E E E K K A	240
cgcaatgaagctctcattgaagcatacaagagcaagagttgcatggcggaccgcacgtc	780
R N E A L I E A Y K E Q E L H G G P H V	260
aagcacatgcagggtatgggatccct <u>TCT</u> gatactcctctccttggggagaacgcgaaa	840
K H M Q G Y G I P S D T P L L G E N A K	280
ggtgatcagtacaccagccacctgaaagcgcctcaattcccctggagcaattggaatgg	900
G D Q Y T Q P P E S A S I P L E Q L E W	300
actggcgatactgtcttcttcccgacagaataccgaacagaagtggaggattggggccga	960
<u>T G D T V F I P A E Y R T E V E D W G R</u>	320
gaattgacaaagtggcaaacagttcttcttcttccggtggcggttgggtccaatgca	1020
<u>E L T K L A N Q F L L L P W R F V S N A</u>	340
tggaatcagcgcgctcgtcttcttgggttgaagagatcttgcaagaagatgctgctcatt	1080
<u>W N Q R R L V S W F E E I L Q E D A L I</u>	360
gccaaggaaggtggtgtacaggctctgagtgatgacgagttgaaggttgcattgcttgat	1140
<u>A K E G G V Q A L S D D E L K V A L L D</u>	380
cgagcgggtgattcgttggatgaagagttgactcgaggtgatatggaggcccgggtacaag	1200
R A V I R C D E E L T R G D M E A R Y K	400
gagatctcttgggtgatgtcgttgcggaaccattcatcgtgttggcttggcaaacaggg	1260
<u>E I S W L M S L R N P F I V L A W Q T G</u>	420
tattaccgcagcacttattctcccgaagacgaccttcccgaggcctccatcctgccaag	1320
<u>Y Y R S T Y S P E D D L P E A S I L P K</u>	440
ctgaaccgcaccgtcctggacgtggacgtgcacaacgagctcgccccggaccaccccgag	1380
L N R T V L D V D V H N E L A P D H P E	460
aagccccctcccaggggtgcatcctgccttgatcccgaactcccacctcgccctggccaag	1440
K P L P R <u>V H P A L Y P N S H L A L A K</u>	480
gaggtggccgctcttggcgaag TAG	1464
E V A V L A K -	487

Abb. 3.17 Abgeleitete Aminosäure-Sequenz der substratbindenden Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes von *Euglena gracilis*. Die mittels ESI-QTOF-Massenspektroskopie identifizierten Peptide des Trypsin-gespaltenen Proteins sind unterstrichen dargestellt und decken 32.4 % der Sequenz ab. Das doppelt unterstrichene **Triplet** TCT für die Aminosäure Serin an Position 270 bezeichnet die Stelle der Sequenz, an der in den Plasmiden der cDNA-Phagen-Banken von *Euglena gracilis* eine Varianz mit Auswirkungen auf die Aminosäuren gefunden wurde (Nukleotid an Position 808: GCT kodiert für Alanin, TCT kodiert für Serin).

AMINOSÄUREN-ZUSAMMENSETZUNG

Die Analyse der Aminosäuren-Zusammensetzung der abgeleiteten Protein-Sequenz der substratbindenden Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes ergab die in Tabelle 3.7 angegebenen Häufigkeiten der 20 proteinogenen Aminosäuren. Auffallend ist hier besonders der niedrige Anteil der beiden schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein (C) und Methionin (M) sowie der kleinen neutralen Aminosäure Glycin (G). Die prozentuale Häufigkeit für die Aminosäuren Glutamat (E), Leucin (L), Lysin (K) und Prolin (P) zeigt sich dagegen deutlich erhöht. Insgesamt und in Übereinstimmung mit dem theoretischen pI von 6.01 handelt es sich aber bezüglich der Aminosäure-Zusammensetzung nicht um ein auffallend hydrophiles oder hydrophobes Protein. Dieses steht im Einklang mit der Überlegung, dass für die Funktion einer Membran-gebundenen Glycosyltransferase sowohl Transmembran-Bereiche (hydrophob) als auch cytoplasmatische Domänen (hydrophil) angenommen werden müssen.

AS	Eigenschaft	Anzahl	Prozent [%]	SWISSPROT Prozent [%]	AS	Eigenschaft	Anzahl	Prozent [%]	SWISSPROT Prozent [%]
A (Ala)	hydrophob	38	7.8	7.7	L (Leu)	hydrophob	67	13.8	9.6
R (Arg)	positiv	25	5.1	5.2	K (Lys)	positiv	34	7.0	6.0
N (Asn)	polar	18	3.7	4.3	M (Met)	hydrophob	7	1.4	2.4
D (Asp)	negativ	26	5.3	5.3	F (Phe)	hydrophob	10	2.1	4.1
C (Cys)	polar	3	0.6	1.6	P (Pro)	hydrophob	29	6.0	4.9
Q (Gln)	polar	19	3.9	3.9	S (Ser)	polar	27	5.5	7.0
E (Glu)	negativ	42	8.6	6.5	T (Thr)	polar	24	4.9	5.6
G (Gly)		22	4.5	6.9	W (Trp)	polar	13	2.7	1.2
H (His)	positiv	16	3.3	2.3	Y (Tyr)	polar	22	4.5	3.1
I (Ile)	hydrophob	17	3.5	5.9	V (Val)	hydrophob	28	5.8	6.7

Tab. 3.7 Analyse der Aminosäuren-Zusammensetzung der kodierenden Sequenz (487 Aminosäuren) der substratbindenden Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *Euglena gracilis* im Vergleich mit der Aminosäuren-Zusammensetzung der SWISSPROT Protein-Sequenz-Datenbank (BOECKMANN et al. 2003). Hellgrau: deutlich niedrigere Häufigkeiten; dunkelgrau: deutlich höhere Häufigkeiten.

THEORETISCHE TRYPSIN-SPALTUNG DER ABGELEITETEN PROTEIN-SEQUENZ

Der Vergleich der massenspektrometrisch sequenzierten Peptide (1A bis 13M) von EgPaS mit den aus einer theoretischen Trypsin-Spaltung der abgeleiteten Protein-Sequenz stammenden Peptiden wird in Tabelle 3.8 dargestellt und wurde mit dem EXPASY-Programm PEPTIDEMASS (<http://us.expasy.org/tools/peptide-mass.html>, WILKINS et al. 1997) durchgeführt.

Bis auf eine Aminosäure (Peptid_9I (I/L) statt V) sind alle als sicher sequenzierten Aminosäuren identisch zu denen, die sich aus der kodierenden Sequenz ergeben. Bei den meisten Peptiden stimmt zudem die massenspektrometrisch gemessene mit der theoretisch ermittelten Masse überein. Die Peptide 3C und 10J weisen dagegen in den massenspektrometrischen Messungen jeweils um 16 Da höhere Massen auf als theoretisch ermittelt. Das bedeutet, dass die Aminosäure Methionin bei diesen Peptiden oxidiert vorliegt (M*). Das Peptid aus den Aminosäure-Resten 262 bis 280 ist in der Tabelle ebenfalls hervorgehoben dargestellt, da sich bei der für dieses Peptid kodierenden cDNA die Sequenzvarianz mit Veränderungen in der Aminosäure-Sequenz gezeigt hat. Das Nukleotid an Position 808 aus dem Triplett GCT kodiert für Alanin, TCT kodiert für Serin). Diese Sequenzvarianz wird nachfolgend detaillierter beschrieben.

Ergebnisse ESI-QTOF-Massenspektroskopie			Ergebnisse PEPTIDEMASS		
Nr.	Peptid - Masse [m/z] ¹⁺	Sequenzen der Peptide	Peptid-Masse [m/z] ¹⁺	Aminosäuren	Sequenzen der Peptide
			490.2871	321-324	ELTK
			549.2449	84-87	DMQR
			561.3242	124-128	DIVSK
			599.3082	193-197	CAHLR
			631.3562	224-228	WNAIK
			648.3749	1-6	MTAVVK N-Terminus
			678.2875	393-398	GDMEAR
			686.4195	376-381	VALLDR
			729.4505	481-487	EVAVLAK C-Terminus
			831.4094	232-238	LSPEEEK
			865.3720	386-392	CDEELTR
			940.4595	158-165	GTLNNEHR
6F	991.2	n-TEVEDgwR-c	991.4479	313-320	TEVEDWGR
			1050.5466	242-250	NEALIEAYK
8H	1121.6	n-FVSNAWNQR-c	1121.5486	336-344	FVSNAWNQR
10J	1150.4	n-((QN)/E(I/L))SWLMtvr-c	1134.5976	401-409	EISWLM*SLR
			1193.6208	142-151	QQVGPMLQHR
			1230.6225	251-261	EQELHGGPHVK
			1247.5401	74-82	EYNEYCWLK
3C	1343.8	n-(I/L)M(I/L)DEVTEsYK-c	1327.6450	166-176	LM*LDEVTEsYK
2B	1342.3	n-(q(i/l))TFHG(I/L)(I/L)EER-c	1342.7113	25-35	LQTFHGLLEER
9I	1360.8	(I/L)QALSDDDE(I/L)K-c	1360.6590	363-375	EGGVQALSDDDELK
7G	1370.6	n-LANQF(I/L)(I/L)(I/L)PwR-c	1370.7943	325-335	LANQFLLLpWR
			1385.7522	212-223	EPVELTSELLQK
1A	1443.0	n-(I/L)PAATSQ(I/L)(I/L)TNVSK-c	1442.8213	11-24	LPAATSQILTNVSK
			1503.6750	130-141	LEWYSSYGDDLr
4D	1513.3	n-((qn)/(e(I/L))FYSHYTgqlr-c	1513.7434	177-188	EIFYSHYTgQLR
5E	1538.0	n-(i/l)y/ef)DGTSTV(I/L)(I/L)(I/L)TNK-c	1537.8472	198-211	LYDGTSTVLLLTNK
			1568.7743	39-51	YAPLAYHTYDNLK
13 M	1630.8	n-(VH)P(A(I/L))YPNSH(I/L)A((I/L)A)K-c	1630.9063	466-480	VHPALYPNSHLALAK
11K	1728.0	n-NP(M*/F)(I/L)V(I/L)AWQTgg	1727.8904	410-423	NPFIVLAWQTGYr
12L	1861.8	SPEDD(I/L)Peas	1861.9065	424-440	STYSPEDDLPEASILPK
			2004.0688	346-362	LVSWFEEILQEDALIAK
			2011.9905	262-280	HMQGYGIPADTPLLGENAK
			2027.9855	262-280	HMQGYGIPSDTPLLGENAK
			2144.0923	54-72	TTWHPIAHAWVDEGLPVSK
			2491.2939	444-465	TVLDVDVHNELAPDHPEKPL PR
			3637.7332	281-312	GDQYTQPPEASIPLEQLEW TGDTVFIPAEYr
			3753.0341	88-122	LLPLASPFVFGIYGILPLAV WLSNDGYLPSAFSSK

Tab. 3.8 Vergleich der Peptidmassen und -sequenzen der massenspektrometrischen ESI-QTOF-MS/MS-Analysen des 54 kDa Proteins aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis* mit den theoretischen Peptidmassen und -sequenzen der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz der Paramylon-Synthase. Die drei linken Spalten zeigen die mittels ESI-QTOF-MS/MS sequenzierten Peptide mit ihren aus den 2-fach bzw. 3-fach positiven Massen berechneten monoisotopischen Massen. Die drei rechten Spalten geben die mit dem EXPASY-Programm PEPTIDEMASS [<http://us.expasy.org/tools/peptide-mass.html>] ermittelten Ergebnisse einer theoretischen Trypsin-Spaltung an. Die Analyse wurde unter folgenden Annahmen durchgeführt: keine falschen Spaltungen, alle Cysteine in reduzierter Form, Methionine nicht oxidiert. Dargestellt sind nur die Peptide mit Massen größer als 490 Da. Die Peptide **3C** und **10J** (hervorgehoben dargestellt) weisen in den MS-Messungen um 16 Da höhere Massen auf als theoretisch ermittelt, d.h. dass die Aminosäure Methionin bei diesen Peptiden oxidiert vorliegt (M*). In dem Peptid der Aminosäurenreste 262-280 (hervorgehoben dargestellt) hat sich die Sequenzvarianz mit Auswirkungen auf die Aminosäure-Sequenz gezeigt (Nukleotid an Position 808: GCT kodiert für Alanin, TCT kodiert für Serin).

SEQUENZVARIANZ AN DER AMINOSÄURE-POSITION 270

Die Konsensus-Sequenzen aller sequenzierten und ansequenzierten Plasmide der cDNA-Phagen-Banken von *Euglena gracilis* (Kapitel 3.6) sowie des RT-PCR-Produktes, welches mit dem „spliced leader“-Primer erhalten wurde (Kapitel 3.7), sind bis auf zwei Nukleotid-Positionen identisch. Die Sequenzierungen sind an beiden Nukleotid-Positionen eindeutig, so dass es sich bei dieser Sequenzvarianz nur um zwei verschiedene Genkopien bzw. Isoformen der Paramylon-Synthase handeln kann.

An der Nukleotid-Position 1221 (3. Nukleotid eines kodierenden Triplets) wurde entweder das Triplet TCG oder das Triplet TCA gefunden. Aufgrund des degenerierten Codes kodieren beide Triplets für die Aminosäure Serin (S) an Position 407, so dass sich für die abgeleitete Aminosäure-Sequenz an dieser Stelle keine Änderung ergibt. Dagegen wurden für die Nukleotid-Position 808 (1. Nukleotid eines kodierenden Triplets) in beiden cDNA-Phagen-Banken sowohl Plasmid-Inserts mit dem Triplet GCT als auch mit dem Triplet TCT gefunden. Für die abgeleitete Aminosäure (**AS270**) ergibt sich dadurch entweder die hydrophobe Aminosäure Alanin (A, mit einer monoisotopischen Masse von 71.04 Da) oder die polare Aminosäure Serin (S, mit einer monoisotopischen Masse von 87.03 Da). Für das entsprechende Peptid an dieser Stelle der genetischen Varianz wurde keine mittels ESI-QTOF-MS/MS ermittelte Aminosäure-Sequenz erhalten, so dass nicht mit Sicherheit entschieden werden kann, welche Aminosäure in dem tatsächlichen Protein an Position 270 vorliegt bzw. welche mRNA translatiert wird.

Der Vergleich der beiden möglichen Peptidmassen mit den massenspektrometrischen Analysen ergab (Tab. 3.9), dass die monoisotopischen Massen $[m/z]^{1+}$ beider Peptide (2011.99 Da für das Peptid mit der Aminosäure Alanin270 bzw. 2027.99 Da für das Peptid mit der Aminosäure Serin270) nicht in den Spektren vorlagen. Weitere Analysen der beiden Peptide mit dem EXPASY-Programm FINDMOD (http://us.expasy.org/cgi-bin/findmod_form.pl, WILKINS et al. 1999) bezüglich möglicher Protein-Modifikationen waren nur für das 2027.99 Da Peptid mit der Aminosäure Serin an Position 270 erfolgreich (Tab. 3.9).

Nukleotid-Position → Aminosäure-Position	Sequenzen der Peptide	Aminosäuren	theoretische Peptid-Masse $[m/z]^{1+}$	gemessene Peptid-Masse $[m/z]^{1+}$	Massen-Differenz	mögliche Modifikation
G808 → A270	HMQGYGIP <u>A</u> DTPLLGENAK	262-280	2011.9905	/		
T808 → S270	HMQGYGIP <u>S</u> DTPLLGENAK	262-280	2027.9855	/		
				2029.2	+1.22	Deaminierung

Tab. 3.9 Vergleich der beiden möglichen Peptide (AS262-280) im Bereich der Sequenzvarianz der cDNA-Sequenz mit Auswirkungen auf die Aminosäure-Sequenz. Das Nukleotid an Position 808 lag in den cDNA-Sequenzen der Paramylon-Synthase in zwei Varianten vor: GCT kodiert für die Aminosäure Alanin (G808 → A270), TCT kodiert für Serin (T808 → S270). Für beide möglichen Peptide wurde ohne die Annahme von Modifikationen keine Masse in den Spektren gefunden. Mit der Annahme einer Deaminierung des Glutamins (Q) ergibt sich für das Peptid mit der Aminosäure Serin an Position 270 allerdings die in den Spektren gemessene Masse von 2029.2 Da.

Bei einer möglichen Modifikation der Aminosäure Glutamin (Q) durch eine Deaminierung erhält man ein Peptid mit einer Masse von 2029.2 Da, welches in dem MALDI-

Massenspektrum des 54 kDa Proteins detektiert wurde (Kapitel 3.5.1, Tab. 3.1). Bei einer Deaminierung entsteht durch Abspaltung von NH₃ aus dem Glutamin (Q, 128.06 Da) die Aminosäure Glutamat (E, 129.04 Da). Da nur für das Peptid mit der Aminosäure Serin an Position 270 mit der oben gezeigten Modifikation in den Peptidmassen-Spektren wiedergefunden wird und es für Alanin an derselben Position keine derartige Entsprechung gibt, wird in dieser Arbeit für alle Analysen diejenige Sequenz verwendet, die für die Aminosäure Serin kodiert.

LOKALE ALIGNMENTS (BLAST-ANALYSEN)

Weitere Übereinstimmungen der abgeleiteten Protein-Sequenz EgPaS mit Glycosyltransferasen aus Bakterien, Pilzen und Höheren Pflanzen konnten in Ergänzung zu den schon mit der cDNA-Sequenz durchgeführten BLASTX-Analysen (Kapitel 3.8) mit dem Programm BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) erhalten werden. Diese BLAST-Analysen wurden mit einem EXPECTvalue von 100 durchgeführt. Die Ähnlichkeiten der lokalen Alignments zur Paramylon-Synthase wurden mit mittlerer Identität und Übereinstimmung gefunden. Auffallend ist bei allen BLAST-Analysen (mit der cDNA oder mit der Protein-Sequenz), dass bevorzugt Glycosyltransferasen oder ähnliche Enzyme aus Bakterien gefunden werden. Bei Betrachtung von nur eukaryotischen Sequenzen wurden ebenfalls Übereinstimmungen in den lokalen Alignments zu Glycosyltransferasen identifiziert. Auch bei diesen lokalen Alignments betreffen die Bereiche der Sequenz-Übereinstimmung bei EgPaS wieder bevorzugt die in der C-terminalen Hälfte des Proteins liegenden Aminosäuren (mit Ausnahme von dem lokalen Alignment mit der beta-1,3-Glucan Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe*).

Die Glycosyltransferase aus dem Betaproteobakterium *Nitrosomonas europaea* gehört zur Glycosyltransferase Familie 28 und weist eine Transmembran-Helix auf:

```
>gi|30138611|emb|CAD84902.1| Glycosyltransferase family 28 [Nitrosomonas europaea ATCC
19718] Length = 357
Score = 27.3 bits (59), Expect = 629, Identities = 16/55 (29%), Positives = 24/55 (43%), Gaps = 5/55 (9%)

Query: 324  KLANQFLLLLPWR FVSNAWNQRRLVSWFEEILQEDALIAKEGGVQALSDDDELKVAL 378
          K  + +LLLLPWR      W  R++          Q+  ++  GG  AL    +  V  L
Sbjct: 60   KKLSSYLLLPLWRLAQACWQSFRILR-----RQQPQVVLGMGGYPALPGGIMAVLL 109
```

Die 1,3-beta-Glucan Synthase bgs2 aus *Schizosaccharomyces pombe* (Glycosyltransferase Familie 48) katalysiert die Verknüpfung von Glucose mit dem beta-1,3-Glucan der Zellwand und verwendet ebenso wie EgPaS UDP-Glucose als Substrat:

```
>gi|21542123|sp|O13967|BGS2_SCHPO 1,3-beta-glucan synthase component bgs2 (1,3-beta-D-
glucan-UDP glycosyltransferase) [Schizosaccharomyces pombe] Length = 1894
Score = 23.5 bits (49), Expect = 511, Identities = 10/34 (29%), Positives = 19/34 (55%), Gaps = 1/34 (2%)

Query: 47  YDNLKQKTTWHPIAHAWVDEGLPVSKKEYNEYCW 80
          ++N  +++T+ P  A++W D              EY +Y W
Sbjct: 33  FNNPGEESTY-PQANSWNDSNKTCDIAEYYDYSW 65
```

Das Substrat der Glycogenin Glucosyltransferase und auch der Indole-3-acetat **beta-Glucosyltransferase** aus *Arabidopsis thaliana* ist ebenfalls UDP-Glucose:

```
>gi|22330689|ref|NP_177838.2| glycogenin glucosyltransferase glycogenin-related [A. thaliana]
Score = 25.0 bits (53), Expect = 363, Identities = 12/29 (41%), Positives = 15/29 (51%)
```

```
Query: 447 DVDVHNELAPDHPEKPLPRVHPALYPNSH 475
      +VD+ E A D K RVH A+ N H
Sbjct: 508 NVDIFQEFASDEAHKTTWWRVHDAMPENLH 536
```

```
>gi|7433895|pir||T00511 indole-3-acetate beta-glucosyltransferase homolog At2g23210 UDP-
glycosyltransferase family - [Arabidopsis thaliana] Length = 453
Score = 24.3 bits (51), Expect = 732, Identities = 22/63 (34%), Positives = 32/63 (50%), Gaps = 12/63 (19%)
```

```
Query: 348 SWFEEILQEDALIAKEG-GVQA---LSDELKVALLDRAVIRCDEELTRG----DMEARY 399
      +WF++ L L+ G GV+ + D ELKVA V RC + +T+G DM R
Sbjct: 358 TWFDQPLDARLLVDVFGIGVRMKNDVVDGELKVA----EVERCIDAVTKGTDAADMRRRA 413
```

```
Query: 400 KEI 402
      E+
Sbjct: 414 AEL 416
```

N-TERMINUS

Der mittels Edman-Abbau gefundene N-Terminus $H_2N-x(1)APATAADV KQV_x$ aus der 54 kDa Proteinbande des Paramylon-Synthase-Komplexes von *Euglena gracilis* (Kapitel 3.5.2, Tabelle 3.2) kann anhand der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz eindeutig nicht der substratbindenden Untereinheit (dem Protein EgPaS) zugeordnet werden. Demnach ist EgPaS N-terminal blockiert und damit dem Edman-Abbau nicht zugänglich. Das tatsächliche N-terminale Peptid $H_2N-MTAVVK$ der Paramylon-Synthase findet sich mit einer theoretischen monoisotopischen Masse von 648.4 Da (Tab. 3.7) nicht in den massenspektrometrischen Spektren (Tab. 3.1). Mit keiner der bekannten Aminosäure-Modifikationen, die zu definierten Massenveränderungen eines Peptides führen und für die N-terminale Blockierung verantwortlich sein könnte, ergibt sich für das N-terminale Peptid von EgPaS eine in den Spektren gefundene Masse. Aus diesem Grund kann über die Art der N-terminalen Blockierung keine Aussage gemacht werden. Der im Edman-Abbau gefundene N-Terminus kann demnach dem zweiten in der 54 kDa Proteinbande identifizierten Protein, einer bei *Euglena gracilis* bisher nicht bekannten ATPase beta-Untereinheit (Kapitel 3.5.2, Tab. 3.2), zugeordnet werden.

PROTEIN-MODIFIKATIONEN

Es ist bekannt, dass bestimmte Aminosäure-Abfolgen (Muster) einen Hinweis auf mögliche Modifikationen des Proteins geben können. Bei der Suche nach den bekannten Mustern in der Proteinsequenz der substratbindenden Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes (EgPaS) mit dem EXPASY-Programm SCANPROSITE (<http://www.expasy.org/cgi-bin/scanprosite>, GATTIKER et al. 2002) wurden sieben Muster gefunden. Sie gehören allerdings alle zu den häufig vorkommenden Motiven und können deshalb nicht als eindeutig gelten. Auffallend im Hinblick auf die Tatsache, dass die bekannten Glycosyltransferasen häufig glycosyliert vorliegen, sind die beiden Asparagin-Glycosylierungs-Muster an den Aminosäure-Positionen 21 bis 24 (N-terminal) und 442 bis 445 (C-terminal).

Einen Hinweis auf eine Modifikation des N-Terminus, die zu dessen Blockierung und damit zu einer erfolglosen Sequenzierung mittels Edman-Abbau geführt hat, konnte nicht gefunden werden. Die massenspektrometrischen Ergebnisse ergaben ebenfalls keine Anhaltspunkte, welche die in Tabelle 3.10 aufgeführten Modifikationen unterstützen könnten.

Modifikation	allgemeines Muster	Position und Motiv in der Aminosäure-Sequenz
ASN_GLYCOSYLATION N-glycosylation site	N-{P}-[ST]-{P}.	21 - 24 NVSK 442 - 445 NRTV
SULFATION Tyrosine sulfation site	kein Muster verfügbar	129 - 143 klewyssYgddlrqq 168 - 182 ldevtesYkeifysh
PKC_PHOSPHO_SITE Protein kinase C phosphorylation site	[ST]-x-[RK]	71 - 73 SkK 120 - 122 SsK 121 - 123 SkK 127 - 129 SkK 174 - 176 SyK 209 - 211 TnK 407 - 409 SlR
CK2_PHOSPHO_SITE Casein kinase II phosphorylation site	[ST]-x(2)-[DE]	71 - 74 SkkE 121 - 124 SkkD 135 - 138 SygD 174 - 177 SykE 209 - 212 TnkE 233 - 236 SpeE 313 - 316 TevE 348 - 351 SwfE 370 - 373 SddE 391 - 394 TrgD 427 - 430 SpeD 444 - 447 TvLD
TYR_PHOSPHO_SITE Tyrosine kinase phosphorylation site	[RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y	392 - 399 RgdmEar.Y
MYRISTYL N-myristoylation site	G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}	67 - 72 GLpvSK 158 - 163 GTlnNE 364 - 369 GGvqAL
RGD Cell attachment sequence	R-G-D	392 - 394 RGD

Tab. 3.10 Ergebnis der **Suche nach Mustern für mögliche Modifikationen** in der Protein-Sequenz der Paramylon-Synthase mit dem Programm SCANPROSITE (<http://www.expasy.org/cgi-bin/scanprosite>). Bedeutung der Klammern: [XY] Aminosäure X oder Y, {X} jede außer Aminosäure X, x(2,3) zwei oder drei beliebige Aminosäuren. Alle gefundenen Muster gehören zu den häufig vorkommenden und können deshalb nicht als eindeutig gelten.

SIGNALPEPTID

Die Proteinsequenz der Paramylon-Synthase wurde mit dem EXPASY-Programm SIGNALP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>, NIELSEN et al. 1997) auf das Vorhandensein von Signalpeptiden untersucht. Es wurde eine eventuelle Spaltstelle zwischen den Aminosäuren 112 und 113 (SND-GY) gefunden, während die Programme PSORTII (<http://www.psорт.org>, HORTON & NAKAI 1997) und TARGETP V1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>, EMANUELSSON et al. 2000) kein N-terminales Signalpeptid detektieren konnten.

TRANSMEMBRAN-HELICES

Weiterhin konnte mit dem PSORTII-Unterprogramm ALOM eine Transmembran-Helix (TMH) in der Protein-Sequenz der Paramylon-Synthase EgPaS identifiziert werden. Diese umfasst die Aminosäuren 91 bis 107. Die Lage dieser Transmembran-Helix wurde von allen angewandten Programmen mit fast identischen Aminosäure-Positionen unterstützt (Tab. 3.11 und Abb. 3.18):

Programm	Aminosäure-Positionen der TMH
PSORTII ALOM (http://www.psорт.org/)	Number of TMS(s) for threshold 0.5: 1 INTEGRAL Likelihood = -2.66 Transmembrane 91-107 ALOM score: -2.66 (number of TMSs: 1)
DAS-Transmembrane Prediction server (http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/ , CSERZO et al. 1997)	91 bis 109 94 bis 107
TMHMM server v. 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/) SONNHAMMER et al. 1998, KROGH et al. 2001)	88 bis 110
TMFPRED (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html , HOFMANN & STOFFEL 1993)	88 bis 110
PREDICTPROTEIN server (PHDhtm) (http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/ , ROST 1996, ROST et al. 1996)	93 bis 110

Tab. 3.11 Identifizierung einer **Transmembran-Helix** (TMH) in der Proteinsequenz der Paramylon-Synthase EgPaS aus *Euglena gracilis*.

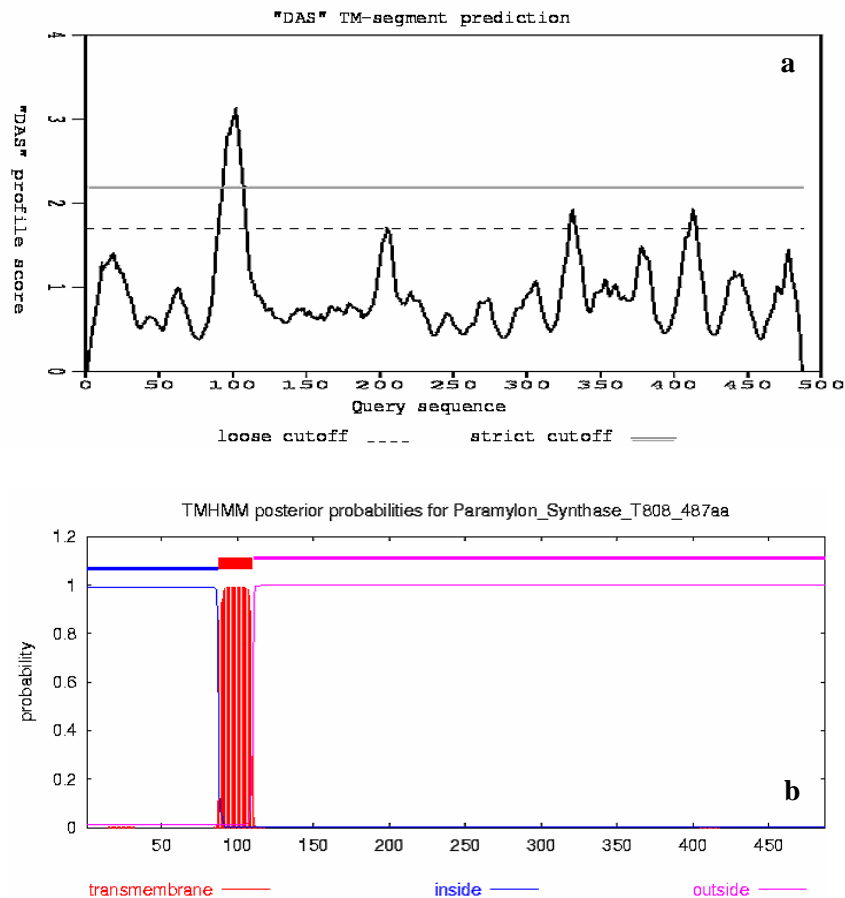


Abb. 3.18 Darstellung der Lage der **Transmembran-Helix** (TMH) in der Proteinsequenz der Paramylon-Synthase EgPaS aus *E. gracilis* mit den Programmen **a** DAS-Transmembrane Prediction server **b** TMHMM server v. 2.0.

MEMBRANTOPOLOGIE

Aufgrund von Vorhersagen zur Membrantopologie (PSORTII Unterprogramm MTOP) wird deutlich, dass es sich bei EgPaS, dem 54 kDa Protein aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis*, um ein **Typ II-Membranprotein** handelt. Diese zeichnen sich durch einen im Cytoplasma lokalisierten N-Terminus, eine Transmembran-Helix sowie einen in das nicht-cytoplasmatische Kompartiment reichenden, großen C-terminalen Anteil aus. Der cytoplasmatisch lokalisierte N-Terminus umfasst die Aminosäuren 1 bis 90, so dass sich die gefundene Transmembran-Helix direkt im Anschluss an den cytoplasmatisch lokalisierten Anteil des Proteins befindet. Diese Membrantopologie von EgPaS wurde auch von den anderen, in Tabelle 3.12 aufgeführten Programmen bestätigt:

PsortII MTOP Prediction of membrane topology	Center position for calculation: 98 Charge difference: -1.0 C(0.0) - N(1.0) N >= C: N-terminal side will be inside >> membrane topology: type 2 (cytoplasmic tail 1 to 91) >>> Seems to be a Type II (Ncyt Cexo) membrane protein, The cytoplasmic tail is from 1 to 90
TMHMM server v. 2.0	inside 1 87 TMhelix 88 110 outside 111 487
TMPRED	N-terminus inside
PREDICTPROTEIN server (PHDhtm) (http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/)	1- 92 inside region 1 93- 110 membrane helix 1 111- 487 outside region 1

Tab. 3.12 Membrantopologie der Paramylon-Synthase EgPaS aus *Euglena gracilis*.

In der entsprechenden Sequenz für die vorhergesagte Transmembran-Helix von EgPaS [88-LLPLASPFVFGIYGILPLAVWLS-110] finden sich besonders viele hydrophobe Aminosäuren, die für die Insertion in der Membran essentiell sind.

LOKALISIERUNG

Da EgPaS keine charakteristischen N-terminalen Signalsequenzen aufweist, wurde mit dem Programm PSORTII (<http://www.psорт.org/>, HORTON & NAKAI 1997) nach einem möglichen Insertionsort für die Transmembran-Helix gesucht. Für die Lokalisierung des Proteins in den Membran-Systemen einer eukaryotischen Zelle wurde folgende Vorhersage gefunden (Tab. 3.13):

44.4 %	Endoplasmatisches Retikulum
22.2 %	Golgi-Apparat
22.2 %	Kern
11.1 %	Mitochondrien

Tab. 3.13 Mögliche Lokalisierung der Paramylon-Synthase EgPaS aus *Euglena gracilis* im Membran-System einer eukaryotischen Zelle.

Für diese Lokalisierungs-Vorhersage ist außerdem relevant, dass im C-Terminus der Sequenz kein charakteristisches Retentions-Signal (KDEL) für das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums gefunden wurde.

DXD-MOTIV FÜR GLYCOSYLTRANSFERASEN

Als weiteres wichtiges charakteristisches Merkmal, dass es sich bei dem in dieser Arbeit identifizierten, in *Euglena gracilis* bisher unbekanntem Protein EgPaS um eine Glycosyltransferase handelt, kann vor allem auch das gefundene Glycosyltransferase-typische DXD-Motiv im C-terminalen Bereich der Protein-Sequenz gelten (Abb. 3.19). Entsprechend der gefundenen Vorhersage für die Membrantopologie ist das DXD-Motiv im nicht-cytoplasmatischen Kompartiment lokalisiert. Bei der Paramylon-Synthese von *Euglena gracilis* ist die für dieses Motiv beliebige Aminosäure zwischen den beiden sauren Aspartaten (D) die hydrophobe Aminosäure Valin (V), so dass sich das Motiv D447 V448 D449 ergibt.

```
>EgPaS_487aa
MTAVVKNLAKLPAATSQILTNVSKLQTFHGLLEERRDKYAPLAYHTYDNLKQKTTWHP IA
HAWVDEGLPVSKKEYNEYCWLKKDMQR LLPLASPFVFGIYGILPLAVWLSNDGYLP SAFS
SKKDIVSKKLEWYSSYGDDL RQQVGPMLQHRLKRHLRGTLNNEHRLMLDEVTESYKEIF Y
SHYTGQLRDVRKCAHLRLYDGTSTVLLL TNKEPVELTSELLQKWNAIKA AKLSPEEEKKA
RNEALIEAYKEQELHGGPHVKHMQGYGIPSDTPLLGENAKGDQYTQPPE SASI PLEQLEW
TGDTVFI PAEYRTEVEDWGRELTKLANQFLLLPWR FVSNAWNQRRLVSWFEEILQEDALI
AKEGGVQALSDDDELKVALLDRAVIRCDEELTRGDMEARYKEISWLM SLRNP FIVLAWQTG
YYRSTYSPEDDLPEASILPKLNRTVL DVDVHNELAPDHPEKPLPRVHPALYPNSHLALAK
EVAVLAK
```

Abb. 3.19 Darstellung der cytoplasmatischen N-terminalen Domäne (grünblau unterlegt), der **Transmembran-Helix** (gelb unterlegt) und des **Glycosyltransferase-typischen DXD-Motives** (im Falle von EgPaS D447 V448 D449) in der Proteinsequenz der Paramylon-Synthase EgPaS aus *Euglena gracilis*. Die nicht farbig unterlegten Bereiche des Proteins sind im nicht-cytoplasmatischen Kompartiment lokalisiert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass EgPaS aus einem cytoplasmatisch lokalisierten, 87 bis 92 Aminosäuren umfassenden N-Terminus, einer maximal von den Aminosäuren 88 bis 110 gebildeten Transmembran-Helix (TMH) und einem 377 Aminosäuren umfassenden nicht-cytoplasmatisch lokalisierten Anteil besteht. Damit handelt es sich um ein Typ II-Membranprotein, welches vorzugsweise in der Plasmamembran oder aber, wie von der Lokalisations-Vorhersage unterstützt wird, in dem Endomembransystem aus Endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat lokalisiert ist.

Mit dieser Topologie und dem für invertierende Glycosyltransferasen charakteristischen DXD-Motiv stimmt das UDP-Glucose-bindende Protein EgPaS aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis* mit den ebenfalls in den ER- und Golgi-Membranen inserierten Glycosyltransferasen überein, welche im Lumen dieser Kompartimente für die Glycosylierung der Proteine, Lipide und von Molekülen anderer Stoffklassen zuständig sind.

3.10 ANALYSE DER GEN-SEQUENZ DER 54 kDA SUBSTRATBINDENDEN UNTEREINHEIT DES PARAMYLON-SYNTASE-KOMPLEXES *EGPAS* AUF DNA-EBENE

Aus Gesamt-DNA von *Euglena gracilis* wurde die vollständige Sequenz des Genes *egpas* für die substratbindende Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes in fünf überlappenden Fragmenten über PCR-Amplifikation erhalten. Das Gen besteht aus fünf Exons, die von vier unterschiedlich langen Introns unterbrochen werden (Abb. 3.20, 3.21). Intron 1 ist mit 43 Nukleotiden das kleinste, gefolgt von Intron 2 mit 46 Nukleotiden und Intron 3 mit 47 Nukleotiden. Die drei auffallend kleinen Introns sind am 5'-Ende des Gens lokalisiert, während das größte, 153 Nukleotide umfassende Intron 4 erst nach 825 Nukleotiden kodierender Sequenz (Exon 4) am 3'-Ende der Sequenz folgt. Alle vier Introns weisen die charakteristischen Intron-Grenzen 5' GT und 3' AG für klassische spleißosomale Introns auf.

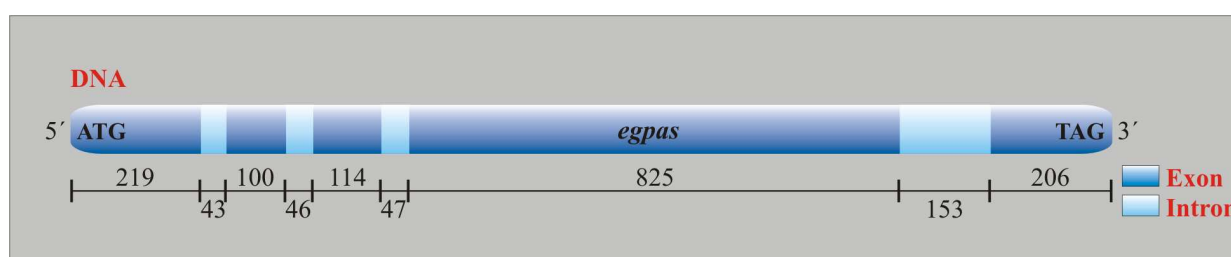


Abb. 3.20 Intron-Exon-Struktur des Gens *egpas* für die Paramylon-Synthase aus *Euglena gracilis*. Die vier Introns von 43 (Intron 1), 46 (Intron 2), 47 (Intron 3) und 153 (Intron 4) Nukleotiden Länge werden von den Intron-Grenzen GT-AG begrenzt (siehe Abb. 3.21).

Wie Tabelle 3.14 zeigt, sind die GC-Gehalte der Exons und Introns nicht über die gesamten Gensequenz-Abschnitte gleich verteilt. Besonders am 3'-Ende des Gens sind die GC-Gehalte mit 51.00 % für Exon 4, 55.56 % für Intron 4 und schließlich 64.56 % für Exon 5 deutlicher höher als im 5'-Bereich der Sequenz. Die Introns weisen generell einen niedrigeren GC-Gehalt auf als die kodierenden Exons.

	Nukleotide	Intron-Grenzen	GC-Gehalt [%]
Exon 1	219 nt		49.77
Intron 1	43 nt	GT - AG	37.21
Exon 2	100 nt		49.00
Intron 2	46 nt	GT - AG	41.30
Exon 3	114 nt		46.49
Intron 3	47 nt	GT - AG	38.30
Exon 4	825 nt		51.00
Intron 4	153 nt	GT - AG	55.56
Exon 5	206 nt		64.56

Tab. 3.14 Übersicht über die Exon-Intron-Struktur des Gens für die Paramylon-Synthase *egpas*. Angegeben sind die Anzahl der Nukleotide, die Intron-begrenzenden Nukleotide sowie die GC-Gehalte der Sequenz-Abschnitte.

```

*      20      *      40      *      60      *      80
cds : ATGACGGCCGTAGTGAAGAATTTGGCGAAGTTGCCTGCGGCAACCTCCCAAATTCACCAATGTTTCCAAGCTCCAGACATT : 83
DNA : ATGACGGCCGTAGTGAAGAATTTGGCGAAGTTGCCTGCGGCAACCTCCCAAATTCACCAATGTTTCCAAGCTCCAGACATT : 83

*      100     *      120     *      140     *      160
cds : CCACGGATTACTTGAGGAACGTCGTGACAAATATGCACCTTTGGCCTACCACACGTACGACAATTTGAAACAGAAAACAACCTT : 166
DNA : CCACGGATTACTTGAGGAACGTCGTGACAAATATGCACCTTTGGCCTACCACACGTACGACAATTTGAAACAGAAAACAACCTT : 166

*      180     *      200     *      220     *      240
cds : GGCACCCCATGCGCACGCTTGGGTGGATGAGGGGCTTCCAGTCAGCAAAAAG----- : 219
DNA : GGCACCCCATGCGCACGCTTGGGTGGATGAGGGGCTTCCAGTCAGCAAAAAGCTGTCAAGATGTCGTCATTTCTCCCATTC : 249

*      260     *      280     *      300     *      320     *
cds : -----GAGTACAACGAATATTGCTGGCTGAAAAAGACATGCAACGGCTTCTGCCACTTGCATCGCCGTTTCGTTT : 289
DNA : TCGTTTGATTTAGGAGTACAACGAATATTGCTGGCTGAAAAAGACATGCAACGGCTTCTGCCACTTGCATCGCCGTTTCGTTT : 332

*      340     *      360     *      380     *      400     *
cds : TCGGCATTTATGGCATCCTTCCGTTGGCAG-----TTTGGCT : 326
DNA : TCGGCATTTATGGCATCCTTCCGTTGGCAGGTTTCCAGATGATTTTAAACACTGTGCCTTCCACATTTGCTCTCAGTTTGGCT : 415

*      420     *      440     *      460     *      480     *      5
cds : TTCCAACGATGGGTATTTGCCCTCTGCCTTCAGCAGCAAGAAAGACATTGTTTCCAAAAGCTGGAGTGGTATTCTTCTTATG : 409
DNA : TTCCAACGATGGGTATTTGCCCTCTGCCTTCAGCAGCAAGAAAGACATTGTTTCCAAAAGCTGGAGTGGTATTCTTCTTATG : 498

*      520     *      540     *      560     *      580
cds : GTGATGACTTGCGGCAGCAAGTGG-----GACCCATGTTAC : 445
DNA : GTGATGACTTGCGGCAGCAAGTGGCTGTGTAACAAACATTTTCCCAATTTTGAAGTACCCATGTTACAGGACCCATGTTAC : 581

*      600     *      620     *      640     *      660
cds : AACACCGATTGAAAAGGCATTTGAGGGGCACTTGAACAATGAACACAGGCTCATGCTTGACGAAGTCACTGAATCGTACAAG : 528
DNA : AACACCGATTGAAAAGGCATTTGAGGGGCACTTGAACAATGAACACAGGCTCATGCTTGACGAAGTCACTGAATCGTACAAG : 664

*      680     *      700     *      720     *      740
cds : GAGATCTTTTACAGCCATTACACTGGCCAACCTTCGGGACGTTTCGGAAGTGTGCACACCTGAGGCTGTACGATGGGACAAGCAC : 611
DNA : GAGATCTTTTACAGCCATTACACTGGCCAACCTTCGGGACGTTTCGGAAGTGTGCACACCTGAGGCTGTACGATGGGACAAGCAC : 747

*      760     *      780     *      800     *      820     *
cds : TGTGCTTCTTCTTACAAACAAAGAGCCAGTGGAAATTGACTTCTGAGCTGCTGCAGAAGTGAATGCAATCAAGGCCGCAAAGC : 694
DNA : TGTGCTTCTTCTTACAAACAAAGAGCCAGTGGAAATTGACTTCTGAGCTGCTGCAGAAGTGAATGCAATCAAGGCCGCAAAGC : 830

*      840     *      860     *      880     *      900     *
cds : TTTTCCGGAAGAAGAGAAGGCTCGCAATGAAGCTCTCATGAAAGCATAAAAGAGCAAGAGTTGCATGGCGGACCGCAC : 777
DNA : TTTTCCGGAAGAAGAGAAGGCTCGCAATGAAGCTCTCATGAAAGCATAAAAGAGCAAGAGTTGCATGGCGGACCGCAC : 913

*      920     *      940     *      960     *      980     *
cds : GTCAAGCACATGCAGGGCTATGGGATCCCTTCTGATACTCCTCTCCTTGGGGAGAACGCGAAAGGTGATCAGTACACCCAGCC : 860
DNA : GTCAAGCACATGCAGGGCTATGGGATCCCTTCTGATACTCCTCTCCTTGGGGAGAACGCGAAAGGTGATCAGTACACCCAGCC : 996

*      1000    *      1020    *      1040    *      1060    *      108
cds : ACCTGAAAGCGCCTCAATTTCCCTGGAGCAATTGGAATGGACTGGCGATACTGTCTTATTCCCGCAGAATACCGAACAGAAG : 943
DNA : ACCTGAAAGCGCCTCAATTTCCCTGGAGCAATTGGAATGGACTGGCGATACTGTCTTATTCCCGCAGAATACCGAACAGAAG : 1079

*      1100    *      1120    *      1140    *      1160
cds : TGGAGGATTTGGGGCCGAGAATTGACAAAGTTGGCAAACAGTTCTTGCTTCTTCCGTGGCGGTTTGTGTCCAATGCATGGAAT : 1026
DNA : TGGAGGATTTGGGGCCGAGAATTGACAAAGTTGGCAAACAGTTCTTGCTTCTTCCGTGGCGGTTTGTGTCCAATGCATGGAAT : 1162

```

```

*      1180      *      1200      *      1220      *      1240
cds : CAGCGCCGCTCGTCTCTTGGTTTGAAGAGATCTTGCAAGAAGATGCGCTCATTGCCAAGGAAGGTGGTGTACAGGCTCTGAG : 1109
DNA : CAGCGCCGCTCGTCTCTTGGTTTGAAGAGATCTTGCAAGAAGATGCGCTCATTGCCAAGGAAGGTGGTGTACAGGCTCTGAG : 1245

*      1260      *      1280      *      1300      *      1320
cds : TGATGACGAGTTGAAGGTTGCATTGCTTGATCGAGCGGTGATTGCGTTGTGATGAAGAGTTGACTCGAGGTGATATGGAGGCC : 1192
DNA : TGATGACGAGTTGAAGGTTGCATTGCTTGATCGAGCGGTGATTGCGTTGTGATGAAGAGTTGACTCGAGGTGATATGGAGGCC : 1328

*      1340      *      1360      *      1380      *      1400      *
cds : GGTACAAGGAGATCTCTTGGTTGATGTCGTTGCCGGAACCCATTTCATCGTGTGGCTTGGCAAACAG----- : 1258
DNA : GGTACAAGGAGATCTCTTGGTTGATGTCGTTGCCGGAACCCATTTCATCGTGTGGCTTGGCAAACAGGTGTCCACTGTCCATCC : 1411

1420      *      1440      *      1460      *      1480      *
cds : ----- : -
DNA : TCCGTCTTTGAGCACACAAAACCAAGAAAAGTTTGGGGTAAGCATATGCCCGACCTGGGGTTTGGAGTGGCCCGCACGGA : 1494

1500      *      1520      *      1540      *      1560      *      1
cds : -----GGTATTACCGCAGCACTTATCTCCCGAAG : 1288
DNA : TGTATCATTGCCAAGGTTGGAGTTGGGTGCCATGCCTCTGGCGCGCGCAGGGTATTACCGCAGCACTTATCTCCCGAAG : 1577

580      *      1600      *      1620      *      1640      *      1660
cds : ACGACCTTCCCGAGGCTCCATCCTGCCAAGCTGAACCGCACCGTCTGGACGTGGACGTGCACAACGAGCTCGCCCGGAC : 1371
DNA : ACGACCTTCCCGAGGCTCCATCCTGCCAAGCTGAACCGCACCGTCTGGACGTGGACGTGCACAACGAGCTCGCCCGGAC : 1660

*      1680      *      1700      *      1720      *      1740
cds : CACCCCGAGAAGCCCTCCCGAGGTGCATCCTGCCTTGTACCCGAACCTCCACCTCGCCCTGGCCAAGGAGGTGGCCGTCTT : 1454
DNA : CACCCCGAGAAGCCCTCCCGAGGTGCATCCTGCCTTGTACCCGAACCTCCACCTCGCCCTGGCCAAGGAGGTGGCCGTCTT : 1743

*
cds : GGCGAAGTAG : 1464
DNA : GGCGAAGTAG : 1753

```

Abb. 3.21 Sequenz und Intron-Exon-Struktur des Gens *egpas* für die Paramylon-Synthase aus *Euglena gracilis* auf DNA-Ebene im Vergleich mit der kodierenden cDNA (cds). Die vier Introns von 43 (Intron 1), 46 (Intron 2), 47 (Intron 3) und 153 (Intron 4) Nukleotiden Länge werden von den Intron-Grenzen GT-AG begrenzt, die in der Sequenz blau unterlegt sind.

3.11 ERSTE DNA-SEQUENZINFORMATIONEN FÜR DIE PARAMYLON-SYNTHESE AUS ANDEREN ARTEN DER GATTUNG *EUGLENA*

Die ersten Sequenzinformationen für die Paramylon-Synthase aus anderen Euglenida wurden durch PCR-Amplifikation mit den für *Euglena gracilis* verwendeten Oligonukleotid-Primern aus Gesamt-DNA von zwei weiteren Arten der Gattung *Euglena* erhalten. Diese Spezies stammen aus Freilandisolaten von Dr. Ingo Busse und wurden als *Euglena* sp.3 BAPS4-2000 und *Euglena* sp.4 BAPS5-2001 bezeichnet. Der amplifizierte DNA-Abschnitt umfasst die Nukleotid-Positionen 239 bis 583 der *Euglena gracilis*-cDNA und beinhaltet die beiden bei *Euglena gracilis* 46 respektive 47 Nukleotide großen Introns 2 und 3 (Abb. 3.22). Auch bei *Euglena* sp.3 und *Euglena* sp.4 besitzen diese die klassischen GT-AG-Grenzen für spleißosomale Introns. Während Intron 2 bei allen drei Spezies keine auffälligen Sequenz-Übereinstimmungen besitzt, sind die Introns 3 bei *Euglena* sp.3 und *Euglena* sp.4 zueinander ähnlicher als zu dem Intron von *Euglena gracilis*.

Auch innerhalb der Exon-Bereiche sind die Nukleotide bei *Euglena* sp.3 und *Euglena* sp.4 zueinander ähnlicher als zu der kodierenden Sequenz von *Euglena gracilis*. Auf der Ebene der abgeleiteten Protein-Sequenz (Aminosäuren 85 bis 194 des Proteins von *Euglena gracilis*) haben diese Sequenz-Unterschiede bei den drei Spezies aufgrund des degenerierten genetischen Codes allerdings lediglich Auswirkungen auf zwei Aminosäure-Positionen (Abb. 3.23). Die große Varianz der kodierenden Sequenzen auf Nukleotidebene lässt sich also nicht auf die Protein-Ebene und damit auf die Struktur und die Funktionalität des Proteins übertragen.

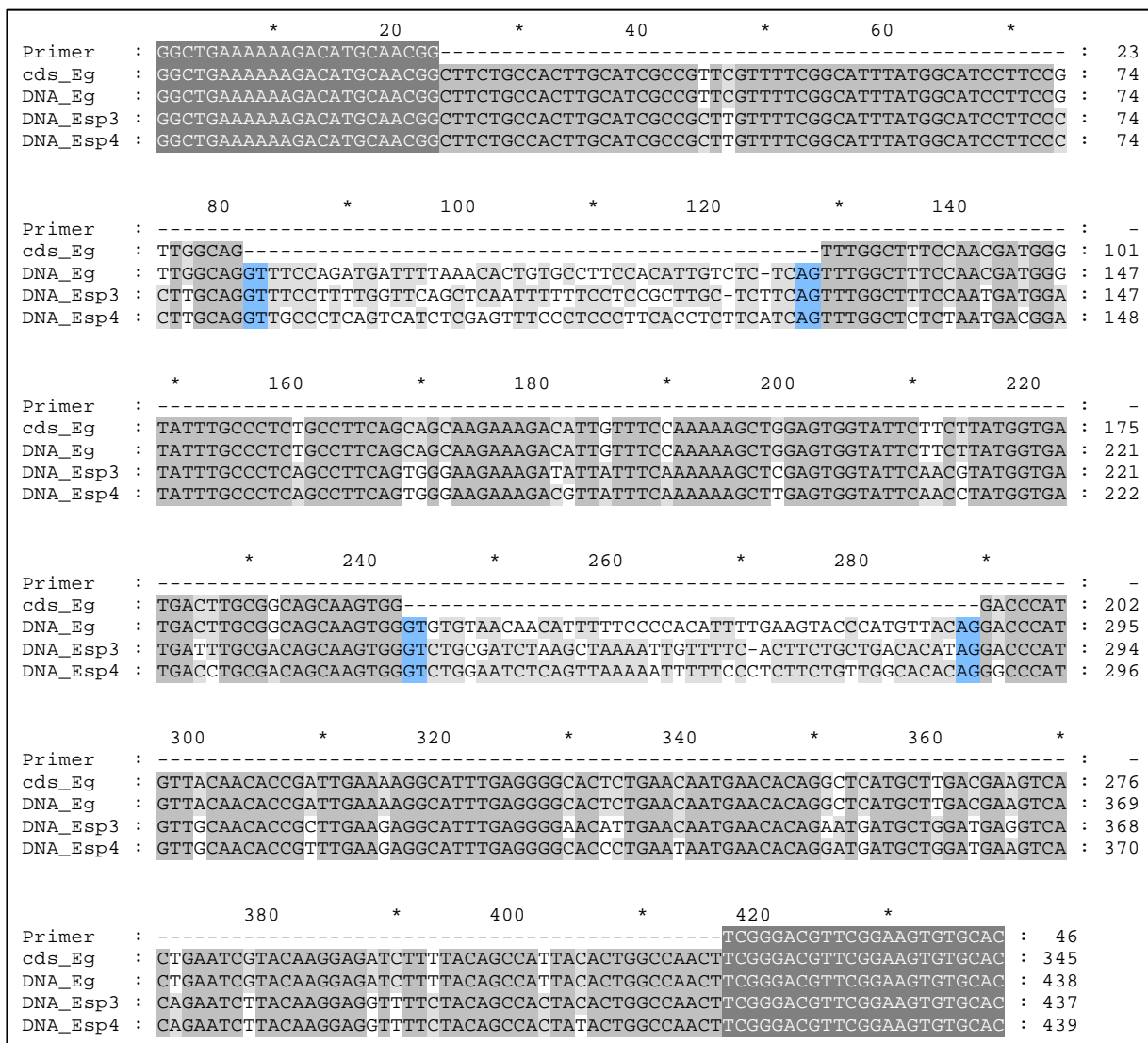


Abb. 3.22 Aligierte DNA-Sequenzen der amplifizierten Bereiche der Paramylon-Synthase *egpas* aus *Euglena gracilis*, *Euglena* sp.3 und *Euglena* sp.4. (Nukleotid-Positionen 239 bis 583 bei der cDNA-Sequenz *egpas* von *Euglena gracilis*) inklusive der Introns 2 und 3 mit den blau unterlegten Intron-Grenzen GT-AG.

		*	20	*	40	*	
AS_Eg	:	MQRLLPLASPFV	VFGIYGILPLAVWLSNDGYLPSAFSS	SKKDIVSKKLEWYSSYGDD	:	55	
AS_Esp3	:	MQRLLPLASPFV	VFGIYGILPLAVWLSNDGYLPSAFSS	GKKDIISKKLEWYSTYGDD	:	55	
AS_Esp4	:	MQRLLPLASPFV	VFGIYGILPLAVWLSNDGYLPSAFSS	GKKDVISKKLEWYSTYGDD	:	55	
		60	*	80	*	100	*
AS_Eg	:	LRQQVGPMLQHRLKRHLRGTLNNEHRLMLDEV	TESYKEIFYSHYTGQLRDVRKCA	:	110		
AS_Esp3	:	LRQQVGPMLQHRLKRHLRGTLNNEHRMMLDEV	TESYKEVFYSHYTGQLRDVRKCA	:	110		
AS_Esp4	:	LRQQVGPMLQHRLKRHLRGTLNNEHRMMLDEV	TESYKEVFYSHYTGQLRDVRKCA	:	110		

Abb. 3.23 Aligierte abgeleitete Aminosäure-Sequenzen der amplifizierten Bereiche der Paramylon-Synthase EgPaS aus *Euglena gracilis*, *Euglena* sp.3 und *Euglena* sp.4. (Aminosäure-Positionen 85 bis 194 bei EgPaS von *Euglena gracilis*).

Die Versuche zur Amplifizierung des Gens aus anderen Euglenida erwies sich bisher mit den vorliegenden Primern als nicht erfolgreich. Das gilt selbst für nahe Verwandte von *Euglena gracilis* wie den phototrophen Arten *Euglena deses* oder *Euglena mutabilis*, aber auch für die sekundär osmotrophen Arten *Euglena longa* (ehemals *Astasia longa*) und *Khawkinea quartana*, obwohl die genannten Arten in allen phylogenetischen Analysen ein Monophylum bilden. Ebenso führten Versuche mit weiteren Oligonukleotid-Primern, die sich aus den identischen Bereichen der bekannten DNA-Sequenz von *Euglena gracilis*, *Euglena* sp.3 und *Euglena* sp.4 ergaben, sowie Veränderungen der PCR-Bedingungen nicht zu den gesuchten PCR-Produkten. Die Versuche zur Amplifikation von *egpas* aus phylogenetisch weiter entfernten Gattungen wie den phagotrophen Arten *Peranema trichophorum*, *Ploetia costata*, *Entosiphon sulcatum* oder *Petalomonas cantuscygni* (VOLLMER 2004) erwiesen sich ebenfalls als nicht erfolgreich. Obwohl sich die bisher identifizierten Protein-Sequenz-Daten der drei analysierten Arten *Euglena gracilis*, *Euglena* sp.3 und *Euglena* sp.4 nicht als besonders variabel darstellen, liegen offensichtlich große Unterschiede in der Nukleotid-Sequenz vor. Dieses fordert die Verwendung von hochgradig degenerierten Oligonukleotid-Primern, mit denen sich wiederum vermehrt unspezifische Nebenprodukte ergeben.

4 DISKUSSION

Der Flagellat *Euglena gracilis* aus der morphologisch sehr heterogenen Gruppe der Euglenida ist ein ultrastrukturell, biochemisch und physiologisch gut untersuchter Organismus. Trotzdem ist bisher nichts über die molekularen und nur wenig über die biochemischen Grundlagen der Synthese des charakteristischen Reservekohlenhydrats Paramylon bekannt. Paramylon ist ein hochkristallines, unverzweigtes und wasserunlösliches beta-1,3-Glucan, das in Form von Membran-umschlossenen Granula im Cytoplasma der Zellen gespeichert wird. Sowohl die phototrophen als auch die meisten heterotrophen Arten des Taxons synthetisieren zum Teil auffallend große Mengen des Polysaccharids und bilden charakteristische Granula-Formen aus. Während über die Physiologie der Paramylon-Synthese bei heterotroph und phototroph wachsenden *Euglena gracilis* Zellen bereits zahlreiche Untersuchungen existierten (MARECHAL & GOLDEMBERG 1964, TOMOS & NORTHCOLE 1978, BRIAND & CALVAYRAC 1980, KAWABATA et al. 1982, KISS et al. 1986, INUI et al. 1992, SCHOLTEN-BECK 1992, MIBFELDT 1993, BARSANTI et al. 2001, BÄUMER et al. 2001), hat sich die Isolierung der Paramylon-Synthase als ebenso schwierig erwiesen wie die Reinigung anderer Glucan-Synthasen wie zum Beispiel der Stärke- oder der Cellulose-Synthasen (PREISS & SIVAK 1998, DELMER 1999). Die Untersuchungen von BÄUMER (1998) und BÄUMER et al. (2001) in unserer Arbeitsgruppe führten zu der Isolierung eines 669 kDa großen Multiprotein-Komplexes, der in den Membranen der Paramylon-Granula lokalisiert ist. Mit der Charakterisierung der Enzymaktivität des Paramylon-Synthase-Komplexes wurde der Ausgangspunkt dieser Arbeit gelegt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die substratbindende und katalytische Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes, die entsprechend der Enzym-Nomenklatur als UDP-Glucose:beta-1,3-Glucan 3-beta-D-Glucosyltransferase (EC 2.4.1.34) bezeichnet wird, zu identifizieren. Zunächst wurden Photoaffinitäts-Markierungsexperimente durchgeführt, die zur Identifikation eines 54 kDa UDP-Glucose-bindenden Proteins führten. Im Anschluss an die Isolierung des Proteins aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis* ergaben bereits die massenspektrometrische Peptidmassen-Bestimmungen und die Aminosäure-Sequenzierungen der Trypsin-gespaltenen substratbindenden Untereinheit Übereinstimmungen zu Glycosyltransferasen aus anderen Organismen. Auf der Basis der gefundenen Peptid-Sequenzen wurde durch das Screening von *Euglena gracilis*-cDNA-Phagen-Banken sowie über RT-PCR- und PCR-Amplifikationen die für die Paramylon-Synthase kodierende cDNA-Sequenz und anschließend die vollständige DNA-Sequenz für *Euglena gracilis*, sowie DNA-Teilsequenzen zweier weiterer Spezies der Gattung *Euglena* erhalten. Detaillierte Sequenzanalysen auf Nukleinsäure- und Aminosäuren-Ebene ermöglichen jetzt erstmals Aussagen über die zu Beginn der Arbeit unerwartete Domänenstruktur und die Membrantopologie der UDP-Glucose:beta-1,3-Glucan Glucosyltransferase aus *Euglena gracilis*.

4.1 DIE GLUCOSYLTRANSFERASE EGPaS IM VERGLEICH MIT ANDEREN GLYCOSYLTRANSFERASEN

In Anlehnung an die von DELMER 1999 vorgeschlagene Nomenklatur für Cellulose-Synthasen (CesA), Callose-Synthasen (CaSA) oder die Curdlan-Synthase aus *Agrobacterium* sp. (CrdS) wird die in diesen Untersuchungen identifizierte substratbindende katalytische Untereinheit der Paramylon-Synthase aus *Euglena gracilis* EgPaS genannt.

Die abgeleitete Protein-Sequenz von EgPaS umfasst 487 Aminosäuren und weist einen theoretischen pI von 6.01 auf, d.h. sie zeichnet sich nicht durch besondere polare bzw. hydrophile/hydrophobe Eigenschaften aus. Das Protein ist deutlich kleiner als andere beschriebene Glucan-Synthasen, die an der Synthese von Reservekohlenhydraten, Zellwandbestandteilen oder Exopolysacchariden in Prokaryoten und Eukaryoten beteiligt sind (Tab. 4.1). Die massenspektrometrisch identifizierten Peptide des isolierten Proteins decken 32.4 % der abgeleiteten EgPaS-Protein-Sequenz ab und sind bis auf eine Aminosäure-Position vollständig identisch zu der aus der cDNA abgeleiteten Proteinsequenz. Damit ist die Zuordnung der gefundenen cDNA-Sequenz zu dem isolierten UDP-Glucose-bindenden 54 kDa Protein eindeutig gezeigt. Weiterhin weist EgPaS sowohl in der Analyse der Peptidmassenspektren als auch in den lokalen Alignments überzeugende Ähnlichkeit zu Glycosyltransferasen, UDP-Glucose- und Glucan-bindenden Proteinen aus Bakterien, Hefen und Höheren Pflanzen auf.

Um Informationen zur Lokalisation des Enzyms in der Zelle zu erhalten, wurden Analysen der Proteinstruktur vorgenommen. In der Primärstruktur (Aminosäure-Sequenz) konnten weder charakteristische Signalpeptide noch Retentionssignale gefunden werden. Die vorhergesagte Sekundärstruktur des Proteins ergab dagegen eindeutige Hinweise. Aus der Membrantopologie ergibt sich eine Struktur, die sich interessanterweise von der üblichen und daher erwarteten Anordnung anderer Membran-integraler beta-Glucan-Synthasen unterscheidet (Abb. 4.1): Den Analysen zufolge ist der 87 Aminosäuren umfassende N-Terminus des Proteins im Cytoplasma lokalisiert. Daran anschließend folgt eine 23 Aminosäuren lange Transmembran-Helix, die in der Primärstruktur besonders viele hydrophobe Aminosäuren zur Verankerung des Proteins in der Membran aufweist. Eine große, globuläre Domäne auf der nicht-cytoplasmatischen Seite der Membran macht 77 % des Gesamtproteins aus und bildet den C-terminalen Anteil des Enzyms. Weitere Transmembran-Helices konnten nicht identifiziert werden.

Mit dieser Membrantopologie gehört die Paramylon-Synthase von *Euglena gracilis* unzweifelhaft zu den Typ II-Membranproteinen, die vorzugsweise im Endomembransystem (Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat), aber auch in den Cytoplasmamembranen eukaryotischer Zellen lokalisiert sind. Die beschriebene Membrantopologie von EgPaS führt aber nicht nur zur Klassifikation eines Typ II-Membranproteins, sondern entspricht außerdem der charakteristischen Domänen-Struktur zahlreicher Glycosyltransferasen, die im Folgenden näher beschrieben werden.

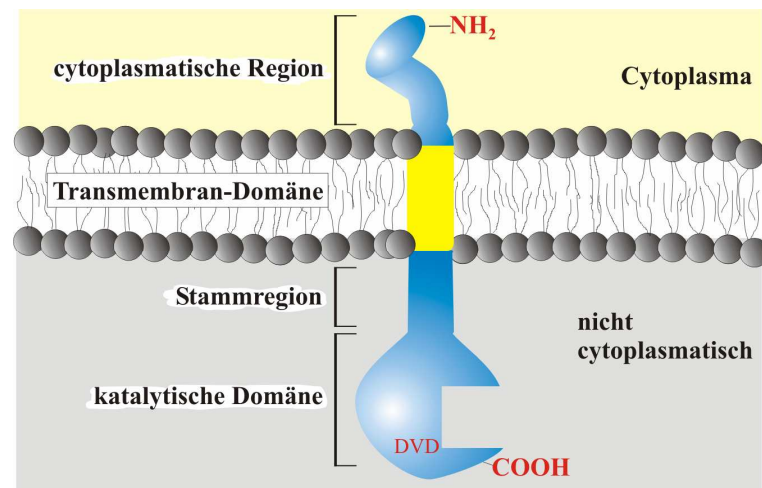


Abb. 4.1 Membrantopologie und Sekundärstruktur von EgPaS, der UDP-Glucose:beta-1,3-Glucan Glucosyltransferase aus *Euglena gracilis*. Die hydrophilen Domänen sind blau, die hydrophobe Transmembran-Helix ist gelb dargestellt. Der N-Terminus (NH₂) im Cytoplasma und der C-Terminus (COOH) im nicht-cytoplasmatischen Kompartiment sind rot markiert. Auf das in der katalytischen Domäne eingezeichnete DVD-Aminosäure-Motiv wird nachfolgend näher eingegangen.

Glycosyltransferasen bilden eine ihren zahlreichen Funktionen entsprechende sehr divergente Enzymfamilie, die aufgrund ihrer vielfältigen Substrate, zahlreicher konvergenter Entwicklungen und der unterschiedlichen Synthesemechanismen nur wenig Sequenz-Ähnlichkeiten aufweisen (BRETON et al. 2001, HU & WALKER 2002). Dennoch können die zur Zeit in 69 Glycosyltransferase-Familien eingeteilten Enzyme in zwei großen strukturellen Superfamilien (GT-A und GT-B) zusammengefasst werden (CAMPBELL et al. 1997, 1998, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>, HU & WALKER 2002). Die für diese Arbeit relevante Superfamilie GT-A (SpsA Superfamilie) umfasst zahlreiche prokaryotische sowie die meisten im Endomembransystem eukaryotischer Zellen (Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat) inserierten Glycosyltransferasen. Diese zeichnen sich vor allem durch das charakteristische DXD-Aminosäure-Motiv aus, welches die Bindestelle des essentiellen divalenten Metallions im katalytischen Zentrum der Glycosyltransferasen ist. Für die Paramylon-Synthase EgPaS aus *Euglena gracilis* konnte ein entsprechendes Motiv mit den Aminosäuren **D447 V448 D449** in der C-terminalen und damit katalytisch aktiven Domäne des Enzyms, die in das Lumen des Paramylon-Granulums hineinragt, gezeigt werden.

Bei vielen Glycosyltransferasen der GT-A-Superfamilie ist Mn²⁺ das divalente Metallion im katalytischen Zentrum. Bei der hier untersuchten Glycosyltransferase EgPaS aus *Euglena gracilis* ist vergleichbar mit der Callose-Synthase jedoch Ca²⁺ das verwendete Ion, da sich in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen die höchste Enzymaktivität des isolierten Paramylon-Synthase-Komplexes detektieren lässt (BÄUMER et al. 2001). Das divalente Metallion ermöglicht die Bindung des UDP-Zucker-Donors im aktiven Zentrum des Enzyms. Bei den meisten Vertretern der GT-A-Superfamilie ist das typische Akzeptormolekül für das transferierte Monosaccharid ebenfalls ein Saccharid (HU & WALKER 2002). In Übereinstimmung dazu überträgt EgPaS das Glucose-Monomer unter Abspaltung von UDP auf das beta-1,3-Glucan Paramylon (TOMOS & NORTHCOTE 1978).

Alle GT-A-Glycosyltransferasen sind Typ II-Membranproteine, die trotz ihrer Sequenz-Diversität einen übereinstimmenden Aufbau aufweisen (ÜNLIGIL & RINI 2000, BRETON et al. 2001, HU & WALKER 2002): Den N-Terminus bildet eine kurze cytoplasmatische Domäne, der eine aus etwa 20 Aminosäuren gebildete Transmembran-Helix mit Signalanker-Funktion folgt. Daran schließt sich eine flexible und sehr variable Stammregion sowie ein großer globulärer C-Terminus als katalytischer Region im nicht-cytoplasmatischen Kompartiment an (Abb. 4.1, 4.2). Während in EgPaS sowohl die C-terminale als auch die N-terminale Domäne mit der sich anschließenden Transmembran-Helix gefunden wurde, konnte eine distinkte Stamm-Region nicht eindeutig von der globulären katalytischen Domäne unterschieden werden. Dieser Bereich, der sich durch charakteristische Cysteine und Glycosylierungs-Motive auszeichnet, stellt die variabelste aller Domänen bei den bisher beschriebenen Glycosyltransferasen dar (PAULSON & COLLEY 1989, BRETON et al. 2001).

Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von EgPaS mit anderen bekannten Glycosyltransferasen aus der GT-A Superfamilie (Abb. 4.2) bezüglich ihrer charakteristischen Domänen belegt, dass die in dieser Arbeit identifizierte Glycosyltransferase EgPaS aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis* eindeutig dieser Superfamilie zuzuordnen ist: Sie weist alle charakteristischen Domänen dieser Superfamilie sowie das kennzeichnende divalente Metallionen-bindende DXD-Motiv (DVD) auf. Ein Beispiel für eine solche Glycosyltransferase stellt die beta-N-Acetylglucosaminylglycopeptid beta-1,4-Galactosyltransferase (GlcNAc beta-1,4-GT) aus der Golgi-Membran von Maus, Mensch und Rind dar: Dieses Enzym transferiert ein Galactose-Molekül von UDP-Galactose auf ein peptidgebundenes beta-1,4-GlcNAc (PAULSON & COLLEY 1989).

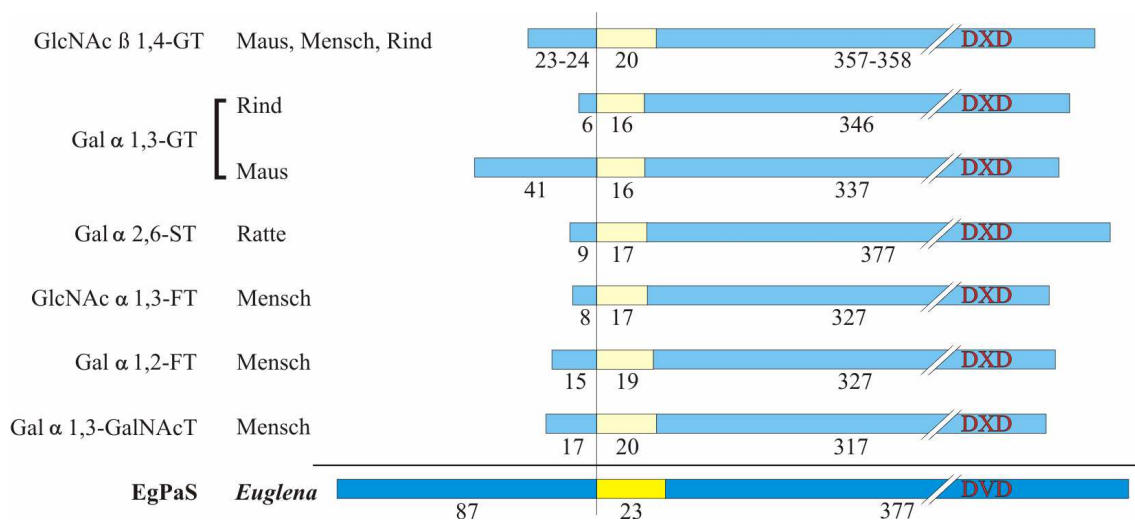


Abb. 4.2 Schematische Darstellung der Aminosäure-Sequenzen von verschiedenen eukaryotischen Glycosyltransferasen zur Darstellung der Domänen-Struktur (verändert nach PAULSON & COLLEY 1989). Galaktosyltransferasen: GlcNAc β1,4-GT (EC 2.4.1.38) und Gal α1,3-GT (EC 2.4.1.151). Sialyltransferase: Gal α2,6-ST (EC 2.4.99.1). Fucosyltransferasen: GlcNAc α1,3-FT (EC2.4.1.65) und Gal α1,2-FT (EC2.4.1.69). N-Acetylgalactosaminyltransferase: Gal α1,3-GalNAcT.

Anhand dieser Sequenz-Übereinstimmungen, des charakteristischen DVD-Motives und einer typischen Membrantopologie konnte EgPaS somit eindeutig als Glucosyltransferase identifiziert werden. Da weiterhin bekannt ist, dass das Enzym das Substrat UDP-alpha-Glucose zur Synthese des beta-1,3-Glucans Paramylon verwendet, kann ein invertierender Katalysemechanismus angenommen werden, bei dem die glycosidische Bindung unter Umkehrung der anomeren Konformation am C1-Atom des Saccharids gebildet wird (MARECHAL & GOLDEMBERG 1964, SAXENA et al. 1995). Darüber hinaus ermöglicht die Identifizierung von EgPaS als Typ II-Membran-Glucosyltransferase die Vorhersage, dass es sich um einen nicht-prozessiven Katalysemechanismus handeln muss. Dabei wird bei jedem Zuckertransfer immer nur ein Monosaccharid auf das Akzeptormolekül übertragen. Beide Mechanismen liegen ebenfalls für die meisten zur GT-A-Superfamilie gehörenden Glycosyltransferasen vor (HOLLAND et al. 2000, BRETON et al. 2001).

Bei den bisher bekannten beta-Glucan-Synthasen handelt es sich dagegen überwiegend um prozessive Glycosyltransferasen, die sich zudem durch eine völlig andere Membrantopologie mit zahlreichen Transmembran-Helices sowie zusätzlichen Sequenz-Motiven auszeichnen (Tab. 4.1). Zum Vergleich mit der beta-1,3-Glucan-Synthase EgPaS aus *Euglena gracilis* werden hier nur diejenigen Enzyme betrachtet, die sich ebenfalls in Membran-integralen Komplexen befinden. Die alpha-Glucan-Synthase für das Reservekohlenhydrat der Höheren Pflanzen und Grünalgen Stärke (alpha-1,4-1,6-Glucan) liegt dagegen entweder löslich oder an dem innerhalb der Chloroplasten gebildeten, nicht von einer Membran umgebenen Granulum vor und kann aus dem Grund nicht direkt mit den beta-Glucan-Synthasen verglichen werden (PREISS & SIVAK 1998).

Die in Tabelle 4.1 neben der Paramylon-Synthase aufgeführten Enzyme für die Synthese der hochpolymeren Polysaccharide Cellulose (beta-1,4-Glucan), Yeast-Glucan (beta-1,3-Glucan), Callose (beta-1,3-Glucan) und Curdlan (beta-1,3-Glucan) sind alle in den Cytoplasmamembranen lokalisiert. Sie besitzen deutlich größere molekulare Massen und weisen bis zu 16 Transmembran-Helices auf. Dabei liegt das katalytische Zentrum dieser Synthasen auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Hier findet die Verknüpfung der Monosaccharide mit der wachsenden Glucan-Kette statt, welche durch die von den Transmembran-Helices gebildeten Pore nach außen geschoben wird (INOUE et al. 1995, DELMER 1999, HOLLAND et al. 2000, HONG et al. 2001a, 2001b, KARNEZIS et al. 2003). Während für die Cellulose-Synthasen und auch für die interessanterweise mit diesen in vielen Aspekten übereinstimmende Curdlan-Synthase charakteristische Sequenzmotive gefunden wurde, die für die Substrat-, Akzeptor- und Metallionen-Bindung verantwortlich sind (D, D, D und QXXRW), konnte Ähnliches für die Callose-Synthase nicht gefunden werden. Dieses Enzym weist aber wiederum Übereinstimmungen zu den beta-1,3-Glucan-Synthasen auf, die beispielsweise bei *Saccharomyces cerevisiae* für die Zellwand-Synthese verantwortlich sind (HONG et al 2001a, 2001b) und die deshalb in der Glycosyltransferase Familie 48 zusammengefasst werden (CAMPBELL et al. 1997, 1998, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>).

Enzym	Organismus	Glycosyltransferase Familie	Molekulargewicht	Charakteristische Motive TMH	Literatur Accession-Nr.
Paramylon-Synthase beta-1,3-Glucan	<i>Euglena gracilis</i>	?	55.9 kDa (487 AS)	DXD (DVD) 1 TMH	diese Arbeit
Callose-Synthase beta-1,3-Glucan	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GT-48	217.7 kDa (1889 AS)	16 TMH	HONG et al. 2001a, b NP_196804
Yeast-Glucan-Synthase beta-1,3-Glucan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GT-48	214.8 kDa (1876 AS)	6 TMH	INOUE et al. 1995 AAR86937
Curdlan Synthase beta-1,3-Glucan	<i>Agrobacterium</i> sp.	GT-2	73.1 kDa (654 AS)	D, D, D, QXXRW 7 TMH	STASINOPOULOS et al. 1999 AAD20440
Cellulose-Synthase beta-1,4-Glucan	<i>Gossypium hirsutum</i>	GT-2	119.2 kDa (1067 AS)	D, D, D, QXXRW 8 TMH	DELMER 1999 AAD39534
Cellulose-Synthase beta-1,4-Glucan	<i>Acetobacter xylinum</i>	GT-2	168.1 kDa (1550 AS)	D, D, D, QXXRW 4 TMH	SAXENA et al. 1990, 1994 P21877

Tab. 4.1 Übersicht über verschiedene **beta-Glucan-Synthasen** im Vergleich mit der Paramylon-Synthase EgPaS aus *Euglena gracilis*. **TMH** Transmembran-Helix.

Über die genaue Zusammensetzung der Glucan-Synthase-Komplexe ist bisher wenig bekannt (DOBLIN et al. 2002). Bei den Cellulose-Synthase-Komplexen der Höheren Pflanzen mit Molekularen Massen von über 500 kDa bilden vermutlich 36 der eigentlichen Cellulose-Synthasen eine rosettenförmige Struktur aus. Für *Acetobacter xylinum* konnte gezeigt werden, dass das Operon neben der Cellulose-Synthase (*AxCeSA*) eine regulatorische Untereinheit (*AxCeSB*), ein für die Kristallisation der Cellulose-Fibrillen benötigtes Polypeptid (*AxCeSD*) sowie eine Untereinheit unbekannter Funktion enthält (SAXENA et al. 1994, DELMER 1999). Weiterhin gibt es sowohl für die Cellulose- als auch für einige Callose-Synthase-Komplexe Hinweise auf eine auf der cytoplasmatischen Seite der Membran assoziierte Sucrose-Synthase (SuSy), die aus UDP und Saccharose UDP-Glucose und Fructose synthetisiert und damit den Komplex direkt mit seinem Substrat UDP-Glucose versorgt (DELMER 1999, HONG et al. 2001b). Bei der Callose-Synthase aus *Phaseolus aureus* wurde ein 44 kDa Polypeptid gefunden, welches aufgrund seiner Fähigkeit zur auto-Glycosylierung möglicherweise als Protein-Primer für die Glucan-Synthase fungiert (DELMER et al. 1991).

Während die Synthase-Komplexe der hochpolymeren beta-Glucane Cellulose und Callose typischerweise in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind, werden die anderen Komponenten der pflanzlichen Zellwände (diverse Polysaccharide und Proteine) im Endomembransystem, also in den Lumina von Endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat, synthetisiert. Im ER-Golgi-Membrankomplex findet zudem die Synthese der Zellwand-Matrix-Polysaccharide wie beispielsweise Xyloglucan, Hemicellulose und Pectin sowie das Zusammenfügen der Synthase-Komplexe statt (HAIGLER & BROWN 1986, MUÑOZ et al. 1996, STERLING et al. 2001, DOBLIN et al. 2002) Bei *Zea mays* wurde allerdings auch eine in der Golgi-Membran lokalisierte Glucan-Synthase unbekannter Größe gefunden, die sowohl verzweigte beta-1,3-1,4-Glucane mit einer molekularen Masse von bis zu 250 kDa als auch Callose synthetisiert

(GIBEAUT & CARPITA 1993, 1994, DOBLIN et al. 2002). Ebenso konnte bei *Pisum sativum* eine beta-1,4-Glucan-Synthase in der Golgi-Membran gezeigt werden (DHUGGA & RAY 1994), so dass festgehalten werden kann, dass die beta-Glucan-Synthase bei eukaryotischen Zellen nicht auf die Plasmamembran beschränkt ist.

Obwohl die Paramylon-Synthase EgPaS aus *Euglena gracilis* im Gegensatz zu den bekannten beta-Glucan-Synthasen eine völlig andere Ultrastruktur und entsprechend auch einen anderen Katalysemechanismus aufweist, wurde in den Photoaffinitäts-Markierungs-Experimenten der substratbindenden Untereinheit EgPaS des Paramylon-Synthase-Komplexes aus den Granula-Membranen von *Euglena gracilis* ein Protein in einer entsprechenden Größenordnung markiert, wie es auch von anderen beta-Glucan-Synthasen bekannt ist (Tab. 4.2).

Das aus der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz vorhergesagte Molekulargewicht von 55.9 kDa entspricht den experimentell durch Photoaffinitäts-Markierung in der SDS-PAGE gefundenen 54 kDa für die substratbindende Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes. Substratbindende Untereinheiten anderer beta-Glucan-Synthase-Komplexe aus Höheren Pflanzen und Bakterien, wurden als Polypeptide zwischen 31 und 90 kDa markiert (Tab. 4.2):

Enzym	Organismus	Molekulargewicht der markierten Proteine	Literatur
Paramylon-Synthase	<i>Euglena gracilis</i>	54 kDa	diese Arbeit
Callose-Synthase (beta-1,3-Glucan)	<i>Beta vulgaris</i>	57 kDa	FROST et al. 1990
	<i>Daucus carota</i>	57 kDa	LAWSON et al. 1989
	<i>Gossypium hirsutum</i>	52 kDa	DELMER et al. 1991
	<i>Lolium multiflorum</i>	31 kDa	MEIKLE et al. 1991
	<i>Pisum sativum</i>	55 kDa	DHUGGA & RAY 1994
Cellulose-Synthase (beta-1,4-Glucan)	<i>Gossypium hirsutum</i>	37 kDa	LI et al. 1993
	<i>Acetobacter xylinum</i>	90, 67, 54 kDa	MAYER et al. 1991
		83 kDa	LIN et al. 1990

Tab. 4.2 Übersicht über die in **Photoaffinitäts-Markierungsexperimenten** identifizierten substratbindenden Untereinheiten der Glucan-Synthase-Komplexe.

Die Abhängigkeit der Photoaffinitäts-Markierung von der Anwesenheit bestimmter divalenter Metallionen zeigt sich in der Literatur recht unterschiedlich. Zum Teil erfolgt die Markierung der substratbindenden Untereinheit ausschließlich entsprechend der jeweiligen Metallionen-Abhängigkeit im *in vivo*-Enzymtest. So erzielten LI et al. (1993) die Markierung der substratbindenden Untereinheit der Cellulose-Synthase aus *Gossypium hirsutum* nur bei Anwesenheit von Mg^{2+} , da die Cellulose-Synthase ein Mg^{2+} -abhängiges Enzym ist. Für die Callose-Synthase aus *Gossypium hirsutum*, einer Ca^{2+} -abhängigen Synthase, konnten DELMER et al. (1991) entsprechend keine Markierung der 52 kDa substratbindenden Untereinheit bei Anwesenheit von Mg^{2+} finden. Im Unterscheid dazu ließ sich die 31 kDa substratbindende Untereinheit der Ca^{2+} -abhängigen Callose-Synthase aus *Lolium multiflorum* sowohl in Anwesenheit von Ca^{2+} als auch von Mg^{2+} markieren (MEIKLE et al. 1991).

In Übereinstimmung damit konnte auch für die in dieser Arbeit untersuchte Paramylon-Synthase aus *Euglena gracilis* keine ausgeprägte Metallionen-Abhängigkeit in der

Photoaffinitäts-Markierung der substratbindenden Untereinheit gefunden werden. Die Markierung der prominenten und reproduzierbaren 54 kDa Proteinbande erfolgte sowohl in Anwesenheit von Ca^{2+} , von Mg^{2+} sowie additiv mit Ca^{2+} und Mg^{2+} im Ansatz. Dieses befindet sich im Einklang mit den Enzymaktivitäts-Messungen der gereinigten Paramylon-Synthase-Komplexe von *Euglena gracilis*, bei denen sich der Umsatz von UDP-Glucose zwar in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen um etwa 40 % erhöhte, aber auch mit Mg^{2+} im Ansatz eine reduzierte beta-1,3-Glucan-Synthese stattfand (BÄUMER et al. 2001). Demnach scheint die Substratbindung bei der Paramylon-Synthase nicht so hochspezifisch von der Anwesenheit eines bestimmten Metallions abhängig zu sein, wie es etwa bei der Callose- und der Cellulose-Synthase der Baumwolle der Fall ist (DELMER et al. 1993, LI et al. 1993), sondern ist mit verschiedenen zweiwertigen Kationen möglich.

Die isolierten 669 kDa Paramylon-Synthase-Komplexe aus *Euglena gracilis* synthetisieren *in vivo* im Enzymtest aus UDP-Glucose ein ethanolisch präzipitierbares Polysaccharid. Dabei handelt es sich nachweislich um das charakteristische Reservekohlenhydrat von *Euglena gracilis*, das als reines, unverzweigtes beta-1,3-Glucan vorliegt, wie BÄUMER et al. (2001) durch die Spaltung mit spezifischen Glucanasen und anschließender Auftrennung und Identifizierung des radioaktiv markierten Produktes darstellen konnte. Aufgrund der eindeutigen Bindung des radioaktiven Substrates [α - ^{32}P]-UDP-Glucose wurde die 54 kDa katalytische Untereinheit des Komplexes isoliert, mit Trypsin gespalten und massenspektrometrisch sequenziert. Die erhaltenen Peptidsequenzen zeigten im weiteren Verlauf der Arbeiten dennoch, dass zusammen mit der identifizierten substratbindenden Glucosyltransferase des Paramylon-Synthase-Komplexes auch eine aus *Euglena gracilis* bisher unbekannte ATPase beta-Untereinheit isoliert wurde.

Es konnte anhand von lokalen Alignments und Sequenzanalysen deutlich gezeigt werden, dass es sich bei den Peptiden nicht um Fragmente der bereits sequenzierten plastidären ATPase beta-Untereinheit aus *Euglena gracilis* handelt (HALLICK et al. 1993), obwohl aufgrund der Ähnlichkeit von plastidären, mitochondrialen und bakteriellen ATPasen Sequenz-Homologien erkennbar sind. Weiterhin ist das Vorliegen einer vakuolären ATPase oder einer im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierten ATPase aufgrund ausgeprägter Sequenz-Unterschiede zu entsprechenden ATPase-Untereinheiten anderer Organismen nicht sehr wahrscheinlich. Da aber außer der plastidären keine anderen ATPase-Sequenzen aus *Euglena gracilis* bekannt sind, ist mit den vorliegenden Peptid-Sequenzen keine hundertprozentige Identifizierung möglich.

Dass es sich bei dem zusammen mit EgPaS isolierten Protein um eine mitochondriale ATPase beta-Untereinheit handelt, erscheint wegen ihrer Lokalisation in der inneren Mitochondrien-Membran ebenfalls nicht wahrscheinlich. Eine direkte funktionelle Beteiligung der ATPase an der Paramylon-Synthase, welche aus den Granula-Membranen isoliert wurde, ist daher aufgrund der unterschiedlichen Kompartimentierung *in vivo* auszuschließen. Zudem haben elektronenmikroskopische Untersuchungen der isolierten Paramylon-Granula deutlich gezeigt, dass die Isolate keine intakten Mitochondrien oder andere Organellen enthielten, aus denen

dieses Protein hätte isoliert werden können. Die identifizierten Peptide liegen in den mittleren Bereichen der ATPase-Sequenzen, so dass auch nicht entschieden werden kann, ob es sich um eine unprozessierte Vorläufer-Form des Proteins oder um eine reife, aus der inneren Mitochondrien-Membran stammende Untereinheit handelt.

Obwohl man das Vorliegen einer ATPase zur Versorgung der katalytischen Prozesse mit ATP oder Äquivalenten in der Paramylon-Granula-Membran annehmen könnte, wird doch eher davon ausgegangen, dass hier eine ATPase beta-Untereinheit kogereinigt wurde, wie es aus anderen Aufarbeitungen von Glucan-Synthasen bekannt ist (DHUGGA & RAY 1995).

4.2 NUKLEINSÄURE-ANALYSE DER GLUCOSYLTRANSFERASE *EGPAS*

Bei der Analyse der gefundenen Nukleinsäure-Sequenz von *egpas* haben sich zwei interessante Aspekte ergeben, die nachfolgend kurz erläutert werden sollen. Ausgehend von den massenspektrometrisch sequenzierten Peptiden der 54 kDa substratbindenden Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *Euglena gracilis* konnten die vollständige cDNA- und DNA-Sequenz durch ein Screening von *Euglena gracilis*-cDNA-Phagen-Banken sowie über RT-PCR- und PCR-Amplifikation erhalten werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die prä-mRNA des Gens *egpas* mit einer relativ ungewöhnlichen, aber für *Euglena gracilis* charakteristischen „spliced leader“-RNA in der Zelle vorliegt. Diese ist durch einen *trans*-Spleiß-Mechanismus mit dem 5'-Ende der prä-mRNA verbunden. Zwischen der 26 Nukleotide langen „spliced leader“-RNA und dem ATG-Startcodon wurde bei *egpas* die ebenfalls nicht kodierenden Nukleotide GTG gefunden. Bei anderen Genen derjenigen Euglenida, die ebenfalls eine ähnliche „spliced leader“-RNA besitzen, variiert die Anzahl der gefundenen Nukleotide zwischen dem „spliced leader“ und dem ATG-Startcodon je nach Spezies bzw. nach untersuchtem Gen: Für die bisher untersuchten mRNA's der phototrophen Art *Phacus curvicauda* wurden 6 Nukleotide gefunden, bei den osmotrophen Spezies *Menoidium pellucidum* und *Rhabdomonas costata* liegt sie dagegen bei 27 Nukleotiden. Die mRNA des Cbf5p-Proteins (Putative Pseudo-Uridin-Synthase) aus *Euglena gracilis* weist sogar eine 43 Nukleotide lange Sequenz zwischen dem „spliced leader“ und dem ATG-Startcodon auf (BRECKENRIDGE et al. 1999, EBEL et al. 1999, FRANTZ et al. 2000, WATANABE & GRAY 2000).

Dieser Vergleich zeigt erneut die Diversität dieser im Organismenreich nur bei wenigen Taxa vorkommenden RNA-Prozessierung, die bei den bisher untersuchten Euglenida höher ist als bei den Kinetoplastida, einer sehr nah verwandten Protistengruppe.

Interessanterweise wurden auch in der anaeroben *Euglena gracilis* cDNA-Phagen-Bank Plasmide mit der für die substratbindende Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes kodierenden Inserts gefunden. Das bedeutet, dass zum Zeitpunkt der cDNA-Synthese aus der in den Zellen vorhandenen mRNA Transkripte für die Paramylon-Synthase vorgelegen haben müssen. Da bekannt ist, dass *Euglena gracilis* unter anaeroben Bedingungen das vorhandene Paramylon abbaut und stattdessen eine Wachsester-Fermentation zur Aufrechterhaltung ihres Energiehaushaltes verwendet (INUI et al. 1992, ROTTE et al. 2001), ist es bemerkenswert, dass sich dennoch mRNA-Transkripte für ein vermutlich nicht benötigtes Protein in der Zelle befinden. Dieses spricht für eine post-transkriptionale Regulation der Paramylon-Synthase. In ähnlicher Weise scheint auch das mitochondriale Enzym Pyruvat:NAPD⁺ Oxidoreduktase (PNO) aus *Euglena gracilis* reguliert zu sein: auch bei einem Thiaminpyrophosphat-Mangel, einem essentiellen Kofaktor des Enzyms, konnte lediglich eine Reduktion der Protein-Menge, nicht aber ein deutliches Absinken des mRNA-Niveaus beobachtet werden (NAKAZAWA et al. 2003). Weder für die Gene der alpha-, beta- und gamma-Tubuline, noch für die Gene der Histone H2A und H3 konnte bei *Euglena gracilis* bisher eine transkriptionale Regulation der Gen-Expression gefunden werden, so dass die post-transkriptionale Regulation im Gegensatz zu anderen Organismen eine generelle Eigenschaft von *Euglena gracilis* zu sein scheint (SAINT-GUILY et al. 1994, CANADAY et al. 2001).

4.3 MODELL ZUR PARAMYLON-SYNTHESE IN DER GRANULA-MEMBRAN

Aufgrund der hier präsentierten Ergebnisse und nach Auswertung aller zur Verfügung stehenden Informationen wird im Folgenden ein Modell präsentiert, das die in dieser Arbeit identifizierte Glucosyltransferase EgPaS in einem funktionellen Zusammenhang in der Paramylon-Granula-Membran darstellt (Abb. 4.3).

In der Membran der hochgeordneten Paramylon-Granula befinden sich integrale Multiprotein-Komplexe mit einem nativen Molekulargewicht von 669 kDa, die *in vitro* aus UDP-Glucose das unverzweigte beta-1,3-Glucan Paramylon synthetisieren. Die substratbindende Untereinheit dieses Paramylon-Synthase-Komplexes, die Glucosyltransferase EgPaS, weist eine molekulare Masse von 54 kDa auf. Das Enzym besitzt eine charakteristische Membrantopologie sowie ein typisches DVD-Aminosäure-Motiv, die es als Glucosyltransferase der Superfamilie GT-A ausweist. Damit unterscheidet sich die Glucosyltransferase deutlich von den bisher bekannten beta-Glucan-Synthasen. Während der kurze N-Terminus des Proteins auf der cytoplasmatischen Seite der Membran liegt, gefolgt von einer etwa 20 Aminosäuren umfassenden Transmembran-Helix, befindet sich der überwiegende Teil des Proteins im Lumen des Paramylon-Granulums auf der nicht-cytoplasmatischen Seite der Membran. In diesem großen globulären C-Terminus ist das katalytische Zentrum der Glucosyltransferase mit dem für die Bindung des essentiellen divalenten Metallion (Ca²⁺) benötigten DVD-Motiv lokalisiert.

Aus der Membrantopologie und der vorgenommenen Klassifizierung lässt sich darüber hinaus ableiten, dass die Glucosyltransferase EgPaS in einem invertierenden, nicht-prozessiven Mechanismus den Transfer der Glucose an die beta-1,3-Glucan-Kette katalysiert, d.h. es wird jeweils nur ein Glucose-Molekül unter Umkehrung der anomeren Konformation am C1-Atom mit dem Glucan verknüpft.

Da das Substrat der Paramylon-Synthese im Cytoplasma synthetisiert wird, muss in der Granula-Membran ein UDP-Glucose Transporter postuliert werden, der das C-terminale aktive Zentrum mit UDP-Glucose versorgt, aber bisher nicht für *Euglena gracilis* beschrieben ist. Aus diesem Grund wird hier ein UDP-Glucose/UMP-Antiporter dargestellt, wie er in den Golgi-Membranen Höherer Pflanzen zu finden ist (STERLING et al. 2001).

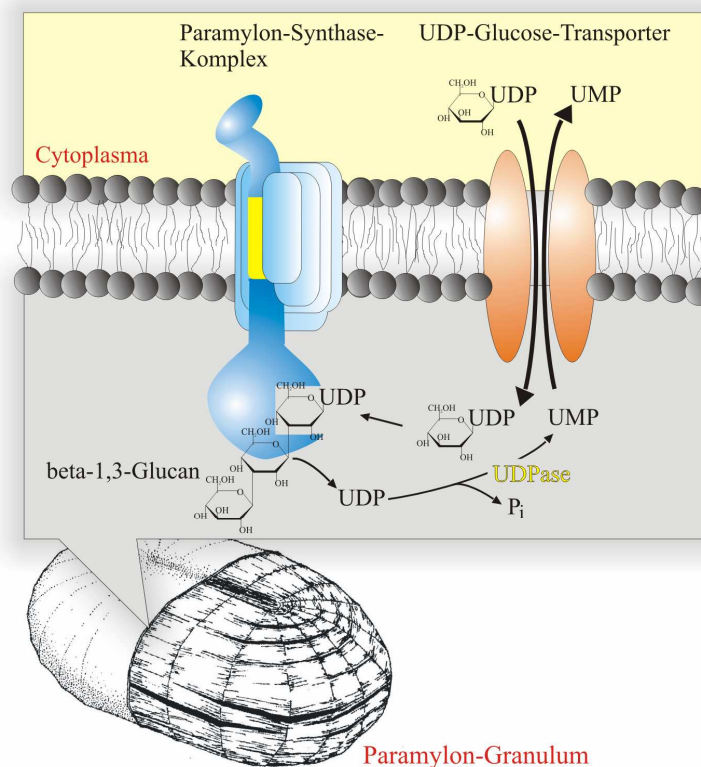


Abb. 4.3 Funktioneller Zusammenhang der in dieser Arbeit identifizierten **substratbindenden Untereinheit EgPaS** aus dem **Paramylon-Synthase-Komplexes** in der **Granula-Membran** von *Euglena gracilis*. Das katalytische Zentrum der UDP-Glucose:beta-1,3-Glucan Synthase EgPaS liegt auf der nicht-cytoplasmatischen Seite der Membran im Lumen des Paramylon-Granulums. Aus diesem Grund muss ein **UDP-Glucose/UMP-Antiporter** in der Granula-Membran zur Versorgung der Glucosyltransferase mit UDP-Glucose postuliert werden, wie er auch für Golgi-Kompartimente beschrieben wurde (MUÑOZ et al. 1996, STERLING et al. 2001). Das Protein EgPaS ist in dieser Abbildung vergrößert dargestellt.

4.4 HYPOTHESE ÜBER DIE HERKUNFT DER FÄHIGKEIT ZUR PARAMYLON-SYNTHESE INNERHALB DER EUGLENIDA

Über die Herkunft der Fähigkeit zur Paramylon-Synthese innerhalb der Euglenida kann trotz der Ergebnisse dieser Arbeit bisher nur spekuliert werden.

Zunächst lässt sich der Zeitpunkt der Etablierung der Fähigkeit zur Paramylon-Synthese innerhalb der Euglenida nach wie vor nicht genau bestimmen, obwohl aktuelle phylogenetische und ultrastrukturelle Untersuchungen neue Erkenntnisse erbracht haben (BUSSE et al. 2003, VOLLMER 2004). Unbestritten ist die Existenz von Paramylon in den phototrophen, primär und sekundär osmotrophen Spezies der Euglenida. Ebenso konnten für *Peranema trichophorum*, eine phagotrophe Art innerhalb des Monophylums aus Phototrophen, Osmotrophen und einigen Phagotrophen, eindeutig Paramylon-Granula mit einer vergleichbaren Struktur zu den Granula aus *Euglena gracilis* gezeigt werden (ARCHIBALD et al. 1963, VOLLMER 2004). Für die phagotrophen Spezies an der Basis der Euglenida wie *Entosiphon sulcatum*, *Petalomonas cantuscygni* und *Ploeotia costata* ergeben aktuelle Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe folgendes Bild: Für *Petalomonas trichophorum* und *Ploeotia costata* konnten eindeutig keine Paramylon-Granula nachgewiesen werden. Bei *Entosiphon sulcatum* wurden dagegen in immunocytochemischen und ultrastrukturellen Untersuchungen membranumschlossene Strukturen gefunden, die sich mit einem Antikörper gegen beta-1,3-Glucane markieren lassen. Auch wenn in diesen membranumschlossenen Granula, die sich bevorzugt in der Nähe der zahlreichen Nahrungsvakuolen befinden, nicht dieselbe hochgeordnete Struktur wie bei *Euglena gracilis* sichtbar ist, ist der Nachweis von unverzweigtem beta-1,3-Glucan eindeutig (VOLLMER 2004). Damit kann *Entosiphon sulcatum*, der bisher das Merkmal „besitzt kein Paramylon“ zugeordnet wurde (HUBER-PESTALOZZI 1955, LEEDALE 1967, FARMER 1988, LEANDER et al. 2001), im Hinblick auf eine auf morphologischen Kriterien basierenden phylogenetischen Hypothese neu eingeordnet werden.

Zudem ist die etwas fragwürdige Hypothese von LEANDER et al. (2001) nicht mehr aufrecht zu erhalten, dass erst mit der von ihnen so bezeichneten Eukaryotrophie, d. h. der Fähigkeit, Nahrung in Form von eukaryotischen Zellen aufzunehmen, die Paramylon-Synthese innerhalb der Euglenida etabliert wurde. Eine Beschränkung der Nahrung in Abhängigkeit von der Komplexität des Ingestionsapparates auf Eukaryoten ist niemals gezeigt worden und auch im Hinblick auf das Vorkommen von eukaryotischem Nano- und Picoplankton stark anzuzweifeln.

Auch über die bisher ungeklärte Herkunft der Membran um das Paramylon-Granulums, in welche die schon von KISS et al. (1988a) als transmembrane Partikel gefundenen Synthase-Komplexe inseriert sind, können nur Hypothesen aufgestellt werden.

Eine mögliche Beteiligung der Mitochondrien an der Synthese von Paramylon wurde von BRIAN & CALVAYRAC (1980) aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen vermutet. Sie beobachteten die Ausbildung vesikulärer Komplexe mitochondrialen Ursprunges, in dessen Innerem sich Paramylon-Granula fanden. Dieses kann aufgrund der bekannten physiologischen Eigenschaften eines Mitochondriums nicht für wahrscheinlich gehalten werden, auch wenn sich wiederholt gezeigt hat, dass sich bei *Euglena gracilis* ungewöhnliche Mechanismen etabliert haben. Im Gegensatz dazu spricht einiges für die Hypothese von MALKOFF & BUETOW (1964),

die ebenfalls auf ultrastrukturellen Untersuchungen basieren. Diese haben beobachtet, dass Paramylon-Granula direkt von den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums gebildet wurden. Da die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums mit der Plasmamembran über Vesikeltransport in beide Richtungen in Verbindung stehen, scheint die Herkunft der Granulamembran aus dem ER/Endomembransystem der Zelle im Hinblick auf ein eventuelles Endocytobiose-Ereignis plausibel. Für die Chlorarachniophyta werden als Ursprung der Vakuolen-Membran um die löslichen Reservekohlenhydrate die ebenfalls zum Endomembransystem gehörenden Golgi-Vesikel angenommen (MCFADDEN et al. 1997, HIBBERD & NORRIS 1984).

Abschließend stellt sich nun noch die Frage nach der evolutionären Herkunft des Gens für die Paramylon-Synthase.

Postuliert man eine vorübergehend etablierte Endocytobiose mit einem eukaryotischen oder prokaryotischen Beuteorganismus, der durch die Phagozytose von der Cytoplasmamembran der eugleniden Zelle umschlossen wurde, besteht die Möglichkeit eines horizontalen Gentransfers vom aufgenommenen Organismus in das Genom der phagotrophen eugleniden Zelle. Diese Hypothese wird unterstützt durch das in unserer Arbeitsgruppe entdeckte Gruppe I-Intron in der SSU rDNA von *Ploetia costata*, eines basalen phagotrophen Vertreters der Euglenida. Das gefundene Intron besitzt eine hohe Homologie zu Gruppe I-Introns aus Rhodophyceae und aus *Aureoumbra langunensis* (Stramenopila). Ein vertikaler Transport, also über die evolutionäre Linie kann aufgrund der sehr entfernten Verwandtschaft ausgeschlossen werden (BUSSE & PREISFELD 2003c). Einen ähnlichen Mechanismus kann man sich für das Paramylon-Synthase-Gen vorstellen.

Obwohl die lokalen Alignments zur Sequenz von EgPaS häufig Übereinstimmungen mit bakteriellen Sequenzen zeigten, kann es aufgrund der hohen Sequenzvariabilität von *Euglena gracilis* und von den Glycosyltransferasen nicht als eindeutiger Hinweis gewertet werden, dass das Gen prokaryotischen Ursprungs ist. Dafür würde allerdings sprechen, dass die Cellulose-Synthase-Gene der Höheren Pflanzen vermutlich cyanobakterieller Herkunft sind (NOBLES et al. 2001). Aber auch ein Gentransfer aus einer beta-1,3-Glucan-synthetisierenden eukaryotischen Alge wie beispielsweise aus den Heterokontophyta oder den Chlorarachniophyta als potentiellen Beuteorganismen wäre denkbar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der einzellige begeißelte Protist *Euglena gracilis* synthetisiert das lineare, wasserunlösliche, kristalline beta-1,3-Glucan Paramylon. Das Reservekohlenhydrat wird in Form von membranumschlossenen, hochgeordneten Granula im Cytoplasma der Zellen gespeichert und sowohl von den phototrophen als auch von den meisten heterotrophen Spezies des Taxons Euglenida gebildet. Außerhalb der Euglenida ist das Vorkommen von reinem beta-1,3-Glucan in granulärer Form mit der Funktion einer Energie- und Kohlenstoff-Reserve nicht weit verbreitet: Sowohl die Callose, eine Zellwandkomponente der Höheren Pflanzen, das „Yeast-Glucan“ aus Hefe-Zellwänden, das bakterielle Exopolysaccharid Curdlan als auch die in flüssiger Form in Vakuolen gespeicherten Reservekohlenhydrate der Heterokontophyta (Chrysolaminarin und Laminarin) bestehen aus beta-1,6-glycosidisch verzweigten beta-1,3-Glucanen. Während es für die Callose- und die Curdlan-Synthase bereits Sequenzinformationen gibt, liegen für die beta-1,3-Glucan-Synthasen aus Algen und auch für das Enzym aus *Euglena gracilis* bisher keine molekularen und nur wenige biochemische Untersuchungen vor.

Die Paramylon-Synthase (UDP-Glucose:1,3-beta-D-Glucan 3-beta-D-Glucosyltransferase, EC 2.4.1.34) ist Bestandteil eines in der Granula-Membran lokalisierten Multienzym-Komplexes mit einem nativen Molekulargewicht von 669 kDa. Die solubilisierten und isolierten Komplexe synthetisieren *in vitro* aus UDP-Glucose ein unverzweigtes beta-1,3-Glucan.

In dieser Arbeit konnte die substratbindende Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes mit einer molekularen Masse von 54 kDa durch Photoaffinitäts-Markierung mit [α - 32 P]-UDP-Glucose identifiziert werden. Das isolierte Protein wurde massenspektrometrisch analysiert und sequenziert. Über das Screening von cDNA-Phagen-Banken von *Euglena gracilis* sowie RT-PCR und PCR-Analysen konnte die für die Paramylon-Synthase kodierende cDNA-Sequenz und anschließend die vollständige DNA-Sequenz für *Euglena gracilis*, sowie DNA-Teilsequenzen zweier weiterer Spezies der Gattung *Euglena* erhalten werden.

Das Paramylon-Synthase-Gen *egpas* kodiert mit seinen 1464 Nukleotiden für ein 487 Aminosäuren großes Protein (EgPaS) mit einer molekularen Masse von 54 kDa, besitzt eine 26 Nukleotide umfassende „spliced leader“-RNA sowie eine mindestens 89 Nukleotide umfassende 3'-UTR (untranslated region). Auf DNA-Ebene konnten vier Introns mit 43, 47, 48 und 153 Nukleotiden identifiziert werden. Die abgeleitete Proteinsequenz wurde als Typ II-Membranprotein klassifiziert und weist einen cytoplasmatischen N-Terminus, eine Transmembran-Helix und eine große, nicht-cytoplasmatisch lokalisierte C-terminalen Domäne inklusive eines für Glycosyltransferasen der Superfamilie GT-A typischen DXD-Motives auf.

Damit ist die substratbindende Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *Euglena gracilis* eindeutig als zur GT-A-Superfamilie gehörende Glucosyltransferase identifiziert und weist interessanterweise eine grundsätzlich andere Domänenstruktur auf, als die bisher bekannten beta-Glucan-Synthasen aus Höheren Pflanzen, Pilzen und Bakterien. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Paramylon-Synthase werden in einem Modell veranschaulicht, in dem EgPaS als integrales Membranprotein Bestandteil eines Multi-Protein-Komplexes in der Paramylon-Granula-Membran ist. Als Hypothese für den Ursprung von EgPaS wird ein horizontaler Gentransfer aus einem beta-1,3-Glucan-synthetisierenden vorübergehenden Endocytobionten postuliert.

6 LITERATUR

- ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW & LIPMAN DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
- ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W & LIPMAN DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402
- ARCHIBALD AR, CUNNINGHAM WL, MANNERS DJ, STARK JR & RYLEY JF (1963) Studies on the metabolism of the protozoa. 10. The molecular structure of the reserve polysaccharides from *Ochromonas malhamensis* and *Peranema trichophorum*. *Biochem J* 88:444-451
- BALDAUF SL, ROGER AJ, WENK-SIEFERT I & DOOLITTLE WF (2000) A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* 290:972-977
- BARBER AA, BARTLETT TW & LEVEDAHL BH (1966) Isolation of paramylon from *Euglena gracilis* var *bacillarus* SML-1 by combined rate- and isopycnic-zonal centrifugation. In ANDERSON NG (ed.) The development of zonal centrifuges and ancillary systems for tissue fractionating and analysis. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Bethesda, Maryland. National Cancer Institute Monograph 21:303-316
- BARRAS DR & STONE BA (1968) Carbohydrate composition and metabolism in *Euglena*. In BUETOW DE (ed.) The biology of *Euglena*. Volume II: Biochemistry. Academic Press Inc., New York, London. Chapter 7:149-191
- BARSANTI L, VISMARA R, PASSARELLI V & GUALTIERI P (2001) Paramylon (β -1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *J Appl Phycol* 13:59-65
- BATEMAN A, BIRNEY E, DURBIN R, EDDY SR, FINN RD & SONNHAMMER ELL (1999) Pfam 3.1: 1313 multiple alignments and profile HMMs match the majority of proteins. *Nucleic Acids Res* 27:260-262
- BATEMAN A, BIRNEY E, CERRUTI L, DURBIN R, ETWILLER L, EDDY SR, GRIFFITHS-JONES S, HOWE KL, MARSHALL M & SONNHAMMER ELL (2002) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 30:276-280
- BÄUMER D (1998) Isolierung und partielle Charakterisierung der Paramylonsynthese aus *Euglena gracilis* (Euglenozoa). Dissertation Universität Bielefeld
- BÄUMER D, PREISFELD A & RUPPEL HG (2001) Isolation and characterization of paramylon synthase from *Euglena gracilis* (Euglenophyceae). *J Phycol* 37:38-46
- BERG JM; TYMOCZKO JL & STRYER L (2003) Biochemie - 5. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. Kapitel 11, Kohlenhydrate:323-347
- BLUM H, BEIER H & GROSS HJ (1987) Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99
- BOECKMANN B, BAIROCH A, APWEILER R, BLATTER M-C, ESTREICHER A, GASTEIGER E, MARTIN MJ, MICHOUK K, O'DONOVAN C, PHAN I, PILBOUT S, SCHNEIDER M (2003) The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res* 31:365-370
- BOUCK GB, ROGALSKI A & VALAITIS A (1978) Surface organization and composition of *Euglena*. II. Flagellar Mastigonemes. *J Cell Biol* 77:805-826
- 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
- BRECKENRIDGE DG, WATANABE Y, GREENWOOD SJ, GRAY MW & SCHNARE MN (1999) U1 small nuclear RNA and spliceosomal introns in *Euglena gracilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:852-856

- BRETON C, MUCHA J & JEANNEAU C (2001) Structural and functional features of glycosyltransferases. *Biochimie* 83:713-718
- BRIAND J & CALVAYRAC R (1980) Paramylon synthesis in heterotrophic and photoheterotrophic *Euglena* (Euglenophyceae). *J Phycol* 16:234-239
- BRUMPT E & LAVIER G (1924) Un nouvel Euglénien polyflagellé parasite du têtard de *Leptodactylus ocellatus* au Brésil. *Ann Parasit Hum Comp* 2:248-252
- BUSSE I & PREISFELD A (2002a) Phylogenetic position of *Rhynchopus* sp. and *Diplonema ambulator* as indicated by analyses of euglenozoan SSU rDNA. *Gene* 284:83-91
- BUSSE I & PREISFELD A (2002b) Unusually expanded SSU ribosomal DNA of primary osmotrophic euglenids: molecular evolution and phylogenetic inference. *J Mol Evol* 55:757-767
- BUSSE I & PREISFELD A (2003a) Systematics of primary osmotrophic euglenids: A molecular approach to the phylogeny of *Distigma* and *Astasia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:617-624
- BUSSE I & PREISFELD A (2003b) Application of spectral analysis to examine phylogenetic signal among euglenid SSU rDNA data sets (Euglenozoa). *ODE* 3:1-12
- BUSSE I & PREISFELD A (2003c) Discovery of a group I intron in the SSU rDNA of *Ploeotia costata* (Euglenozoa). *Protist* 154:57-69
- BUSSE I (2003) Die SSU rDNA und rRNA der Euglenida: Phylogenetische Analyse und molekulare Evolution. Dissertation, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld
- BUSSE I, PATTERSON DJ & PREISFELD A (2003) Phylogeny of phagotrophic euglenids Euglenozoa A molecular approach based on culture material and environmental samples *J Phycol* 39:828-836
- BÜTSCHLI O (1906) Beiträge zur Kenntnis des Paramylons. *Arch Protistenkd* 7:197-228
- CAMPBELL JA, DAVIES GJ, BULONE V & HENRISSAT B (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities *Biochem J* 326:929-939
- CAMPBELL JA, DAVIES GJ, BULONE V & HENRISSAT B (1998) Correction: A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities *Biochem J* 329:719
- CANN JP & PENNICK NC (1986) Observations on *Petalomonas cantuscygni* n. sp., a new halo-tolerant strain. *Arch Protistenkd* 132:63-71
- CAVALIER-SMITH T (1981) Eukaryote kingdoms: seven or nine? *BioSystems* 14:461-481
- CAVALIER-SMITH T (1993) Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev* 57:953-994
- CHUAH CT, Sarko A, Deslandes Y & Marchessault RH (1983) Triple-helical crystalline structure of curdlan and paramylon hydrates. *Macromolecules* 16:1375-1382
- CLARKE AE & STONE BA (1960) Structure of the paramylon from *Euglena gracilis*. *Biochim Biophys Acta* 44:161-163
- COLGAN DF & MANLEY JL (1997) Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* 11:2755-2766
- COOK JR (1967) Quantitative measurement of paramylum in *Euglena gracilis*. *J Protozool* 14:634-636
- COUTINHO PM & HENRISSAT B (1999) CAZy - Carbohydrate-Active Enzymes server at: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>
- CRAIGIE JS (1974) Storage products. In: STEWART WDP (ed.) *Algal physiology and biochemistry*. University of California Press, Berkley, CA. Chapter 7:206-235
- CRAMER M & MYERS J (1952) Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis*. *Arch Microbiol* 17:384-402

- CSERZO M, WALLIN E, SIMON I, VON HEIJNE G & ELOFSSON A (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Prot Eng* 10:673-676
- CUI X, SHIN H, SONG C, LAOSINCHAI W, AMANO Y & BROWN RM JR (2001) A putative plant homolog of the yeast β -1,3-glucan synthase subunit FKS1 from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibers. *Planta* 213:223-230
- DAWSON NS & WALNE PL (1994) Evolutionary trends in euglenoids. *Arch Protistenkd* 144:221-225
- DEFLANDRE G (1934) Contributions à la connaissance des Flagellés libres I. *Ann Protistologie* 3:219-239
- DELMER DP (1999) Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:245-276
- DELMER DP, SOLOMON M & READ SM (1991) Direct photolabeling with [³²P]UDP-glucose for identification of a subunit of cotton fiber callose synthase. *Plant Physiol* 95:556-563
- DELWICHE CF (1999) Tracing the thread of plastid diversity through the tapestry of life. *Am Nat Suppl* 154:S164-S169
- DESLANDES Y, Marchessault RH & Sarko A (1980) Triple-helical structure of (1→3)- β -D-glucan. *Macromolecules* 13:1466-1471
- DHUGGA KS & RAY PM (1994) Purification of 1,3- β -D-glucan synthase activity from pea tissue. Two polypeptides of 55 kDa and 70 kDa copurify with enzyme activity. *Eur J Biochem* 220:943-953
- DHUGGA KS & RAY PM (1995) Plant cell wall synthesis:molecular cloning of putative β -glucan synthase genes from pea. *Plant Physiol (suppl)* 108:51
- DOBLIN MS, KUREK I, JACOB-WILK D & DELMER DP (2002) Cellulose Biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol* 43:1407-1420
- DOOIJES D, CHAVES I, KIEFT R, DIRKS-MULDER A, MARTIN W & BORST P (2000) Base J originally found in kinetoplastida is also a minor constituent of nuclear DNA of *Euglena gracilis*. *Nucleic Acids Res* 28:3017-3021
- DWYER M & SMILLIE RM (1971) β -1,3-glucan: a source of carbon and energy for chloroplast development in *Euglena gracilis*. *Aust J Biol Sci* 24:15-22
- EBEL C, FRANTZ C, PAULUS F & IMBAULT P (1999) Trans-splicing and cis-splicing in the colourless Euglenoid, *Entosiphon sulcatum*. *Curr Genet* 35:542-550
- EDMAN P (1970) Sequence determination. Review. *Mol Biol Biochem Biophys* 8:211-255
- EDMAN P & BEGG G (1976) A protein sequenator. *Eur J Biochem* 1:80-91
- EKELUND F & PATTERSON DJ (1997) Some heterotrophic flagellates from a cultivated garden soil in Australia. *Arch Protistenkd* 148:461-478
- EMANUELSSON O, NIELSEN H, BRUNAK S & VON HEIJNE G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300:1005-1016
- FAIRBANKS G, STECK TL & WALLACH DFH (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10:2606-2617
- FARMER MA (1988) A re-evaluation of the taxonomy of the Euglenophyceae based on ultrastructural characteristics. PhD thesis, Rutgers University, Piscataway, New Jersey
- FARMER MA & TRIEMER RE (1988) Flagellar systems in the euglenoid flagellates. *Biosystems* 21:283-291
- FERNANDEZ-PATRON C, CASTELLANOS-SERRA L & RODRIGUEZ P (1992) Reverse staining of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels by imidazole-zinc salts: sensitive detection of unmodified proteins. *BioTechniques* 12:564-573

- FRANTZ C, EBEL C, PAULUS F & IMBAULT P (2000) Characterization of trans-splicing in Euglenoids. *Curr Genet* 37:349-355
- FROST DJ, READ SM, DRAKE RR, HALEY BE & WASSERMAN BP (1990) Identification of the UDP-glucose-binding polypeptide of callose synthase from *Beta vulgaris* L. by photoaffinity labeling with 5-azido-UDP-glucose. *J Biol Chem* 265:2162-2167
- GATTIKER A, GASTEIGER E & BAIROCH A (2002) ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Appl Bioinf* 1:107-108
- GIBBS SP (1978) The chloroplasts of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. *Can J Bot* 56:2883-2889
- GIBBS SP (1990) The evolution of algal chloroplasts. In: WIESSNER W, ROBINSON DG & STARR RC (eds.): *Experimental phycology. Cell walls and surfaces, reproduction, photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 145-157
- GIBEAUT DM & CARPITA NC (1993) Synthesis of (1→3),(1→4)- β -D-glucan in the golgi apparatus of maize coleoptiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3850-3854
- GISH W & STATES DJ (1993) Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics* 3:266-272
- GOCKEL G & HACHTEL W (2000) Complete gene map of the plastid genome of the nonphotosynthetic euglenoid flagellate *Astasia longa*. *Protist* 151:347-351
- GOLDEMBERG SH & MARECHAL LR (1963) Biosynthesis of paramylon in *Euglena gracilis*. *Biochim Biophys Acta* 71:743-744
- GOODMAN HM & MACDONALD RJ (1979) Cloning of hormone genes from a mixture of cDNA molecules. *Meth Enzymol* 68:75-90
- GOTTLIEB J (1850): Ueber eine neue, mit Stärkemehl isomere Substanz. *Ann Chem Pharm* 75:51-61
- GREENWOOD SJ, SCHNARE MN, COOK JR & GRAY MW (2001) Analysis of intergenic spacer transcripts suggests 'read-around' transcription of the extrachromosomal circular rDNA in *Euglena gracilis*. *Nucleic Acids Res* 29:2191-2198
- HAGER DA & BURGESS RR (1980) Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA Topoisomerase, and other enzymes. *Anal Biochem* 109:76-86
- HAIGLER CH & BROWN RM JR (1986) Transport of rosettes from the Golgi apparatus to the plasma membrane in isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans* during differentiation. *Protoplasma* 134:111-120
- HALL TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98
- HALLICK RB, HONG L, DRAGER RG, FAVREAU MR, MONFORT A, ORSAT B, SPIELMANN A & STUTZ E (1993) Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Res* 21:3537-3544
- HANNAERT V, BRINKMANN H, NOWITZKI U, LEE JA, ALBERT M-A, SENSEN CW, GAASTERLAND T, MÜLLER M, MICHELS P & MARTIN W (2000) Enolase from *Trypanosoma brucei*, from the amitochondriate protist *Mastigamoeba balamuthi*, and from the chloroplast and cytosol of *Euglena gracilis*: Pieces in the evolutionary puzzle of the eukaryotic glycolytic pathway. *Mol Biol Evol* 17:989-1000
- HÄNSEL, R (1987) Polysaccharide, die immun-stimulierend wirken: Eine Übersicht über entsprechende Fertigarzneimittel. *Farm Tijdschr Belg* 64:313-326
- HENZE K, BADR A, WETTERN M, CERFF R & MARTIN W (1995) A nuclear gene of eubacterial origin in *Euglena gracilis* reflects cryptic endosymbiosis during protist evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9122-9126

- HEUKESHOVEN J & DERNICK R (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6:103-112
- HIBBERD DJ & NORRIS RE (1984) Cytology and ultrastructure of *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophyta divisio nova, Chlorarachniophyceae classis nova). *J Phycol* 20:310-330
- HILLIS DM, MORITZ C & MABLE BK (1996) *Molecular Systematics*. Second edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts USA
- HOFMANN K & STOFFEL W (1993) TMbase - a database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 374:166
- HOHAM RW & BLINN DW (1979) Distribution of cryophilic algae in an arid region, the American Southwest. *Phycologia* 18:133-145
- HOLLAND N, HOLLAND D, HELENTJARIS T, DHUGGA KS, XOCONOSTLE-CAZARES B & DELMER DP (2000) A Comparative analysis of the plant cellulose synthase (CesA) gene family¹. *Plant Physiol* 123:1313-1323
- HONG Z, DELAUNEY AJ & VERMA DPS (2001a) A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. *Plant Cell* 13:755-768
- HONG Z, ZHANG Z, OLSON JM, VERMA DP (2001b) A novel UDP-glucose transferase is part of the callose synthase complex and interacts with phragmoplastin at the forming cell plate. *Plant Cell* 13:769-79
- HORTON P & NAKAI K (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 5:147-152
- HU Y & WALKER S (2002) Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases. *Chem Biol* 9:1287-1296
- HUBER-PESTALOZZI G (1955) *Das Phytoplankton des Süßwassers*. 4. Teil: Euglenophyceen. E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart
- HUNKAPILLER MW, HEWICK RM, DREYER WJ & HOOD LE (1983a) High-sensitivity sequencing with a gas-phase sequenator. *Methods Enzymol* 91:399-413
- HUNKAPILLER MW, LUJAN E, OSTRANDER F & HOOD LE (1983b) Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. *Methods Enzymol* 91:227-236
- HUTNER SH, ZAHALSKY AC, AARONSEN S, BAKER H & FRANK O (1966) Culture media for *Euglena gracilis*. *Meth Cell Physiol* 2:217-228
- INOUE SB, TAKEWAKI N, TAKASUKA T, MIO T, ADACHI M, FUJII Y, MIYAMOTO C, ARISAWA M, FURNICHI Y & WATANABE T (1995): Characterization and gene cloning of 1,3- β -D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 231:845-854
- INUI H, MIYATAKE K, NAKANO Y & KITAOKA S (1992) Synthesis of reserved polysaccharide from wax esters accumulated as the result of anaerobic energy generation in *Euglena gracilis* returned from anaerobic to aerobic conditions. *Int J Biochem* 24:799-803
- JAHN TL (1946) The euglenoid flagellates. *Q Rev Biol* 21:246-274
- JENSEN ON, WILM M, SHEVCHENKO A & MANN M (1998) Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly form 2-DE gels. In: LINK AJ (ed.) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 112. 2-D Proteome Analysis Protocols. Humana Press, Inc., Totowa, NJ. Chapter 52:513-530
- JONES DT (1944) Two protozoans from the Great Salt Lake. *Bull Univ Utah Biol Ser* 8:3-10
- KARNEZIS T, EPA VC, STONE BA & STANISICH VA (2003): Topological characterization of an inner membrane (1->3)- β -D-glucan (curdian) synthase from *Agrobacterium sp.* strain ATCC31749. *Glycobiology* 13:693-706

- KAWABATA A, MIYATAKE K & KITAOKA S (1982) Effect of temperature on the contents of the two energy-reserve substances, paramylon and wax esters, in *Euglena gracilis*. J Protozool 29:421-423
- KISS JZ & TRIEMER RE (1988) A comparative study of the storage carbohydrate granules from *Euglena* (Euglenida) and *Pavlova* (Prymnesiida). J Protozool 35:237-241
- KISS JZ, VASCONCELOS AC & TRIEMER RE (1986) Paramylon synthesis and chloroplast structure associated with nutrient levels in *Euglena* (Euglenophyceae). J Phycol 22:327-333
- KISS JZ, VASCONCELOS AC & TRIEMER RE (1987) Structure of the euglenoid storage carbohydrate, paramylon. Amer J Bot 74:877-882
- KISS JZ, VASCONCELOS AC & TRIEMER RE (1988a) The intramembranous particle profile of the paramylon membrane during paramylon synthesis in *Euglena* (Euglenophyceae) J Phycol 24:152-157
- KISS JZ, ROBERTS EM, BROWN RM & TRIEMER RE (1988b) X-ray and dissolution studies of paramylon storage granules from *Euglena*. Protoplasma 146:150-156
- KIVIC PA & WALNE PL (1984) An evaluation of a possible phylogenetic relationship between the euglenophyta and kinetoplastida. Orig Life 13:269-288
- KOIZUMI N, SAKAGAMI H, UTSUMI A, FUJINAGA S, TAKEDA M, ASANO K, SUGAWARA I, ICHIKAWA S, KONDO H, MORI S, MIATAKE K, NAKANO Y, NAKASHIMA H, MURAKAMI T, MIYANO N, YAMAMOTO N (1993) Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of sulfated paramylon. Antiviral Res 21:1-14
- KREGER DR & MEEUSE BJD (1952) X-ray diagrams of *Euglena*-paramylon, of the acid insoluble glucan of yeast cell walls and of laminarin. Biochim Biophys Acta 9:699-700
- KREGER DR & VAN DER VEER J (1970) Paramylon in a chrysophyte. Acta Bot. Neerl. 19:401-402
- KROGH A, LARSSON B, VON HEIJNE G & SONNHAMMER ELL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol 305:567-580
- KUDLICKA K & BROWN RM JR (1997) Cellulose and callose biosynthesis in higher plants. I. Solubilization and separation of (1→3)- and (1→4)- β -glucan synthase activities from mung bean. Plant Physiol. 115:643-656
- LÄMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685
- LARSEN J & PATTERSON DJ (1990) Some flagellates (Protista) from tropical marine sediments. J Nat Hist 24:801-937
- LAWSON SG, MASON TL, SABIN RD, SLOAN ME, DRAKE RR, HALEY BE & WASSERMAN BP (1989): UDP-glucose: (1,3)- β -glucan synthase from *Daucus carota* L. Characterization, photoaffinity labeling, and solubilization. Plant Physiol 90:101-108
- LEANDER BS & FARMER MA (2000) Comparative morphology of the euglenid pellicle. I. Patterns of strips and pores. J Eukaryot Microbiol 47:469-479
- LEANDER BS, TRIEMER RE & FARMER MA (2001) Character evolution in heterotrophic euglenids. Europ J Protistol 37:337-356
- LEE C, LEVIN A & BRANTON D (1987) Copper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Anal Biochem 166:308-12
- LEEDALE GF (1958a) Nuclear structure and mitosis in the Euglenineae. Arch Mikrobiol 32:32-64
- LEEDALE GF (1958b) Mitosis and chromosome numbers in the Euglenineae. Nature 181:502-503
- LEEDALE GF (1967) Euglenoid flagellates. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey
- LEEDALE GF (1978) Phylogenetic criteria in euglenoid flagellates. BioSystems 10:183-187

- LEEDALE GF, MEEUSE BJD & PRINGSHEIM EG (1965) Structure and physiology of *Euglena spirogyra*. III and IV. Arch Mikrobiol 50:133-155
- LI L, DRAKE RR, CLEMENT S & BROWN RM JR (1993) β -Glucansynthesis in the cotton fiber III. Plant Physiol 101:1149-1156.
- LIN FC, BROWN RM JR, DRAKE RR JR & HALEY BE (1990): Identification of the uridine 5'-diphosphoglucose (UDP-glc) binding subunit of cellulose synthase in *Acetobacter xylinum* using the photoaffinity probe 5-azido-UDP-glc. J Biol Chem 265:4782-4784
- LINTON EW & TRIEMER RE (1999) Reconstruction of the feeding apparatus in *Ploeotia costata* (Euglenophyta) and its relationship to other euglenoid feeding apparatuses. J Phycol 35:313-324
- LOTTSPEICH F & ZORBAS H (1998) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. Kapitel 8:179-194
- LOWRY OH, ROSENBOUGH NJ, FARR AL & RANDALL RL (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275
- MALKOFF DB & BUETOW DE (1964) Ultrastructural changes during carbon starvation in *Euglena gracilis*. Exp Cell Res 35:58-68
- MANNERS DJ & TAYLOR DC (1967) Studies on carbohydrate metabolizing enzymes. XVI. Specificity of laminaribiose phosphorylase from *Astasia ocellata*. Arch Biochem Biophys 121:443-451
- MARCHESSAULT RH & DESLANDES Y (1979) Fine structure of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans: curdlan and paramylon. Carbohydr Res 75:231-242
- MARECHAL LR & GOLDEMBERG SH (1964) Uridine diphosphate glucose- β -1,3-glucan β -3-glucosyltransferase from *Euglena gracilis*. J Biol Chem 239:3163-3167
- MARIN B, PALM A, KLINGBERG M & MELKONIAN M (2003) Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. Protist 154:99-145
- MARTIN C & SMITH AM (1995) Starch biosynthesis. Plant Cell 7:971-985
- MARTIN W, MÜLLER M (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. Nature 392:37-41
- MAYER R, ROSS P, WEINHOUSE H, AMIKAM D, VOLMAN G, OHANA P, CALHOON RD, WONG HC, EMERICK AW & BENZIMAN M (1991) Polypeptide composition of bacterial cyclic diguanylic acid-dependent cellulose synthase and the occurrence of immunologically crossreacting proteins in higher plants. Proc Natl Acad Sci USA 88:5472-5476.
- MAZUR P, MORIN N, BAGINSKY W, EL-SHERBEINI M, CLEMAS JA, NIELSEN JB & FOOR F (1995) Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3- β -D-glucan synthase. Mol Cell Biol 15:5671-5681
- MCFADDEN GI, GILSON PR & SIMS I (1997) Preliminary characterization of carbohydrate stores from chlorarachniophytes (Division: Chlorarachniophyta). Phycol Res 45:145-151
- MEIKLE PJ, NG KF, JOHNSON E, HOOGENRAAD NJ & STONE BA (1991) The β -glucan synthase from *Lolium multiflorum*. J Biol Chem 266:22569-22581
- MIGNOT J-P (1963) Quelques particularités de l'ultrastructure d' *Entosiphon sulcatum* (Duj.) Stein, flagellé euglénien. C R Hebd Acad Sci Paris 257:2530-2533
- MIBFELDT T (1993) Untersuchungen über den Kohlenhydratspeicher von *Euglena gracilis* im Stickstoffmangel. Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld
- MORDEN CW, DELWICHE CF, KUHSEL M & PALMER JD (1992) Gene phylogenies and the endosymbiotic origin of plastids. BioSystems 28:75-90
- MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G & ERLICH H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Sym 51:263-273

- MUÑOZ P, NORAMBUENA L & ORELLANA A (1996) Evidence for a UDP-glucose transporter in golgi apparatus-derived vesicles from pea and its possible role in polysaccharide biosynthesis. *Plant Physiol* 112:1585-1594
- NAKAI K & HORTON P (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the *k* nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 5:147-152
- NAKAMURA Y, GOJOBORI T & IKEMURA T (2000) Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year. *Nucleic Acids Res* 28:292
- NAKAZAWA M, TAKENAKA S, UEDA M, INUI H, NAKANO Y & MIYATAKE K (2003) Pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase is stabilized by its cofactor, thiamin pyrophosphate, in mitochondria of *Euglena gracilis*. *Arch Biochem Biophys* 411:183-188
- NATH V, DUTTA GP & DHILLON B (1960) Origin and cytochemistry of paramylum bodies in *Khawkinea* sp. *Res Bull Panjab Univ Sci* 11:159-161
- NICHOLAS KB, NICHOLAS HB JR & DEERFIELD DW II (1997) GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBnet.NEWS* 4:1-4
- NIELSEN H, ENGELBRECHT J, BRUNAK S & VON HEIJNE G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Prot Eng* 10:1-6
- NOBLES DR, ROMANOVICZ DK & BROWN RM JR (2001) Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? *Plant Physiol* 127:529-542
- PALMER JD (2003) The symbiotic birth and spread of plastids: how many times and whodunit? *J Phycol* 39:4-11
- PAULSON JC & COLLEY KJ (1989) Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem* 264:17615-17618
- PERKINS DN, PAPPIN DJ, CREASY DM & COTTRELL JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20:3551-3567
- PESOLE G, LIUNI S, GRILLO G, LICCIULLI F, LARIZZA A, MAKALOWSKI W & SACCONI C (2000) "UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 28:193-196
- PHILIPPE H & ADOUTTE A (1998) The molecular phylogeny of Eukaryota: solid facts and uncertainties. In: Coombs GH, Vickerman K, Sleigh MA & Warren A (eds) *Evolutionary Relationships Among Protozoa*. Chapman & Hall, London. Chapter 2:25-56
- PONCE GORDO F, HERRERA S, CASTRO AT, GARCIA DURAN B & MARTINEZ DIAZ RA (2002) Parasites from farmed ostriches (*Struthio camelus*) and rheas (*Rhea americana*) in Europe. *Vet Parasitol* 107:137-160
- PREISFELD A, BERGER S, BUSSE I, LILLER S & RUPPEL HG (2000) Phylogenetic analyses of various euglenoid taxa (Euglenozoa) based on 18S rDNA sequence data. *J Phycol* 36:220-226
- PREISFELD A, BUSSE I, KLINGBERG M, TALKE S & RUPPEL HG (2001) Phylogenetic position and interrelationships of the osmotrophic euglenids based on SSU rDNA data, with emphasis on the Rhabdomonadales (Euglenozoa). *Int J Syst Evol Microbiol* 51:751-758
- PREISS J & SIVAK MN (1998) Biochemistry, molecular biology and regulation of starch synthesis. *Genet Eng (NY)* 20:177-223
- QUENTMEIER H (1987) Reinigung löslicher und membrangebundener Glucosyltransferasen von *Daucus carota* L. und Charakterisierung ihrer Produkte. Dissertation Universität Tübingen
- QUESEDA LA DE LUSTIG ES, MARECHAL LR & BELOCOPITOW E (1976) Antitumor activity of paramylon on sarcoma-180 in mice. *Gann* 67:455-459
- ROE JH (1955) The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J Biol Chem* 212:335-343

- ROESSLER PG (1987) UDP glucose pyrophosphorylase activity in the diatom *Cyclotella cryptica*. Pathway of chrysolaminarin biosynthesis. *J Phycol* 23:494-498
- ROST B (1996) PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks. *Meth Enzymol* 266:525-539
- ROST B, FARISELLI P & CASADIO R (1996) Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Prot Science* 7:1704-1718
- ROTTE C, STEJSKAL F, ZHU G, KEITHLY JS & MARTIN W (2001) Pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase from the mitochondrion of *Euglena gracilis* and from the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*: a biochemical relic linking pyruvate metabolism in mitochondriate and amitochondriate protists. *Mol Biol Evol* 18:710-720
- RYCHLIK W (1995a) Priming efficiency in PCR. *Biotechniques* 18:84-90
- RYCHLIK W (1995b) Selection of primers for polymerase chain reaktion. *Mol Biotechnol* 3:129-134
- RYCHLIK W & RHOADS RE (1989) A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 17:8543-8551
- SAINT-GUILY A, SCHANTZ ML & SCHANTZ R (1994) Structure and expression of a cDNA encoding a histone H2A from *Euglena gracilis*. *Plant Mol Biol* 24:941-948
- SAMBROCK J, FRITSCH EF & MANIATIS T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press
- SANGER F, NICKLEN S & COULSON AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
- SAXENA IM & BROWN RM JR (1997) Identification of cellulose synthase(s) in higher plants: sequence analysis of processive β -glycosyltransferases with the common motif 'D, D, D35Q(R,Q)XRW'. *Cellulose* 4:33-49
- SAXENA IM & BROWN RM JR (2000) Cellulose synthases and related enzymes. *Curr Opin Plant Biol* 3:523-531
- SAXENA IM, LIN FC & BROWN RM JR (1990) Cloning and sequencing of the cellulose synthase catalytic subunit gene of *Acetobacter xylinum*. *Plant Mol Biol* 15:673-683
- SAXENA IM, KUDLICKA K, OKUDA K & BROWN RM JR (1994): Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: Implications for cellulose crystallization. *J Bacteriol* 176:5735-5752
- SAXENA IM, BROWN RM JR, FEVRE M, GEREMIA RA & HENRISSAT B (1995) Multidomain architecture of β -glycosyl transferases: implications for mechanism of action. *J Bacteriol* 177:1419-1424
- SCHLEGEL HG (1992) Allgemeine Mikrobiologie. 7. überarbeitete Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart.
- SCHLÖSSER UG (1994) SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen. Catalogue of strains 1994. *Bot Acta* 107:113-186
- SCHNEPF E (1994) Light and electron microscopical observations in *Rhynchopus coscinodiscivorus* spec. nov., a colorless, phagotrophic euglenozoan with concealed flagella. *Arch Protistenkd* 144:63-74
- SCHOLTEN-BECK G (1992) Untersuchungen zur Komplementsensitivität von *Euglena gracilis* unter besonderer Berücksichtigung des Magnesium-Mangels. Dissertation, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld
- SHAPER NL, HOLLIS GF, DOUGLAS JG, KIRSCH IR & SHAPER JH (1988) Characterization of the full length cDNA for murine beta-1,4-galactosyltransferase. Novel features at the 5'-end predict two translational start sites at two in-frame AUGs. *J Biol Chem* 263:10420-10428
- SHEMATEK EM, BRAATZ JA & CABIB E (1980) Biosynthesis of the yeast cell wall. 1. Preparation and properties of β -(1 \rightarrow 3) glucan synthetase. *J Biol Chem* 255:888-894

- SIMPSON AGB (1997) The identity and composition of the Euglenozoa. Arch Protistenkd 148:318-328
- SIMPSON AGB, VAN DEN HOFF J, BERNARD C, BURTON H & PATTERSON DJ (1997) The ultrastructure and systematic position of the euglenozoon *Postgaardi mariagerensis*, Fenchel et al. Arch Protistenkd 147:213-225
- SINGH KP (1956) Studies in the genus *Trachelomonas*. I. Description of six organisms in cultivation. Am J Bot 43:258-266
- SITTE P, WEILER EW, KADEREIT JW, BRESINSKY A & KÖRNER C (2002) Strasburger – Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- SOMMER JR & BLUM JJ (1965) Cell division in *Astasia longa*. Exp Cell Res 39:504-527
- SONNHAMMER ELL, VON HEIJNE G & KROGH A (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In: Glasgow J, Littlejohn T, Major F, Lathrop R, Sankoff D & Sensen C (eds) Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. AAAI Press, Menlo Park, CA: 175-182
- STASINOPOULOS SJ, FISHER PR, STONE BA & STANISICH VA (1999) Detection of two loci involved in (1→3)- β -glucan (curdian) biosynthesis by *Agrobacterium* sp. ATCC31749, and comparative sequence analysis of the putative curdian synthase gene. Glycobiology 9:31-41
- STERLING JD, QUIGLEY HF, ORELLANA A & MOHNEN D (2001) The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme α -1,4-galacturonosyltransferase is located in the lumen of the golgi. Plant Physiol 127:360-371
- STILLER JW, HALL BD (1999) Long-branch attraction and the rDNA model of early eukaryotic evolution. Mol Biol Evol 16:1270-1279
- STONE BA & CLARKE AE (1992) Chemistry and biology of (1→3)- β -glucans. La Trobe University Press, Victoria, Australia; 803 pp
- SUMIDA S, EHARA T, OSAFUNE T & HASE E (1987) Ammonia- and light-induced degradation of paramylum in *Euglena gracilis*. Plant Cell Physiol 28:1587-1592
- TALKE S (2000) Morphologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Evolution der Euglenida. Dissertation, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld
- TESSIER LH, KELLER M, CHAN RL, FOURNIER R, WEIL JH & IMBAULT P (1991) Short leader sequences may be transferred from small RNAs to pre-mature mRNAs by trans-splicing in *Euglena*. EMBO J 10:2621-2625
- THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F & HIGGINS DG (1997) The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 24:4876-4882
- TOMOS AD & NORTHCOTE DH (1978) A protein-glucan intermediate during paramylon synthesis. Biochem J 174:283-290
- TRIERER RE (1997) Feeding in *Peranema trichophorum* revisited. J Phycol 33:649-654
- TRIERER RE & FARMER MA (1991) The ultrastructural organisation of the heterotrophic euglenids and its evolutionary implications. In: PATTERSON DJ & LARSEN J (eds.) The Biology of Free-Living Heterotrophic Flagellates. Clarendon Press, Oxford. Chapter 13:185-204
- ÜNLIGIL UM & RINI JM (2000) Glycosyltransferase structure and mechanism. Curr Opin Struct Biol 10:510-517
- VAN DEN HOEK C, JAHNS HM & MANN DG (1993) Algen. 3. neubearbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- VICKERMAN (1990): Phylum Zoomastigina class Kinetoplastida. In: MARGULIS L, CORLISS JO, MELKONIAN M & CHAPMAN DJ (eds.): Handbook of Protoctista. Jones & Bartlett Publishers, Boston. Chapter 14:215-238

- VOGEL K & MEEUSE BJD (1968) Characterization of the reserve granules from the dinoflagellate *Thecadinium inclinatum* Balech. J Phycol 4:317-318
- VOLLMER A (2004): An ultrastructural and molecular study of paramylon and its synthesis in phagotrophic Euglenida. Diplomarbeit, Universität Bielefeld
- WALNE PL (1980) Euglenoid flagellates. In: COX ER (ed.): Phytoflagellates. Elsevier/North-Holland. 165-212
- WALNE PL & KIVIC PA (1990) Phylum Euglenida. In: MARGULIS L, CORLISS JO, MELKONIAN M & CHAPMAN DJ (eds.) Handbook of Protozoology. Jones & Bartlett Publishers, Boston. Chapter 15:270-287
- WALNE PL & DAWSON NS (1993) A comparison of paraxial rods in the flagella of euglenoids and kinetoplastids. Archiv Protistenkd 143:177-194
- WALNE PL, MOESTRUP Ø, NORRIS RE & ETTL H (1986) Light and electron microscopical studies of *Eutreptiella eupharyngea* sp. nov. (Euglenophyceae) from Danish and American waters. Phycologia 25:109-126
- WATANABE Y & GRAY MW (2000) Evolutionary appearance of genes encoding proteins associated with box H/ACA snoRNAs: cbf5p in *Euglena gracilis*, an early diverging eukaryote, and candidate Gar1p and Nop10p homologs in archaeobacteria. Nucleic Acids Res 28:2342-2352
- WEHNER R & GEHRING W (1990) Zoologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- WESSEL D & FLÜGGE UI (1984) A method for the quantitative recovery of proteins in dilute solution in the presence of detergents and lipids. Anal Biochem 138:141-143
- WILKINS MR, LINDSKOG I, GASTEIGER E, BAIROCH A, SANCHEZ J-C, HOCHSTRASSER DF & APPEL RD (1997) Detailed peptide characterisation using PEPTIDEMASS - a world-wide web accessible tool. Electrophoresis 18:403-408
- WILKINS MR, GASTEIGER E, BAIROCH A, SANCHEZ J-C, WILLIAMS KL, APPEL RD & Hochstrasser DF (1998) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. In: LINK AJ (ed.) Methods in Molecular Biology, Vol. 112. 2-D Proteome Analysis Protocols. Humana Press, Inc., Totowa, NJ. Chapter 53:531-552
- WILKINS MR, GASTEIGER E, GOOLEY A, HERBERT B, MOLLOY MP, BINZ PA, OU K, SANCHEZ J-C, BAIROCH A, WILLIAMS KL & HOCHSTRASSER DF (1999) High-throughput mass spectrometric discovery of protein post-translational modifications. J Mol Biol 289:645-657
- WONG HC, FEAR AL, CALHOON RD, EICHINGER GH, MAYER R, AMIKAM D, BENZIMAN M, GELFAND DH, MEADE JH, EMERICK AW, BRUNER R, BEN-BASSAT A & TAL R (1990) Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. Proc Natl Acad Sci USA 87:8130-8134
- XU QY & SHIVELY JE (1988) Microsequence analysis of peptides and proteins. VIII. Improved electroblotting of proteins onto membranes and derivatized glass-fiber sheets. Anal Biochem 170:19-30

7 ABKÜRZUNGEN

AMV	engl. <i>Avian Myeloblastosis Virus</i> ; Retrovirus, aus dem Reverse Transkriptase gewonnen wird
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BAPS	Bielefelder Algen- & Protozoen-Sammlung
bar	SI-Einheit des Druckes
bp	engl. <i>base pairs</i> ; Basenpaare
Bq	Bequerel = SI-Einheit, Zerfälle pro Sekunde
BSA	engl. <i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-di-methylammonio]-1-propane-sulfonat
CHCA	engl. <i>alpha-Cyanohydroxycinnamic acid</i> ; alpha-Cyano-4-hydroxy Zimtsäure
Ci	Curie
ddH₂O	Bidestilliertes Wasser
dNTP	desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DNA	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	engl. <i>enzyme commission</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
emend.	engl. <i>emended</i> ; berichtigt, verbessert
ESI-QTOF-MS/MS	engl. <i>Electro-spray-ionisation-quadrupol-time of flight-tandem-mass spectrometry</i> ; Elektrospray-Ionisations-Quadrupol-Flugzeit-Massenspektroskopie
EST	engl. <i>expressed sequence tag</i>
EtOH	Ethanol
h	Stunde
H₂O_{nano}	Nanopore Wasser
HCA	engl. <i>hydrophobic cluster analysis</i> ; Hydrophobie Clusteranalyse
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HMW	engl. high molecular weight; hochmolekular
Kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
K_M	Substratkonzentration, bei der ein Enzym die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht
KOH	Kaliumhydroxid
LSC	engl. <i>liquid scintillation counting</i> ; Flüssigszintillationsmessung
Lux	SI-Einheit für Beleuchtungsstärke E
MALDI-TOF-MS	engl. <i>matrix-assisted laserdesorptions/ionisations-time of flight-mass spectrometry</i> ; Matrix-unterstützte-Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektroskopie
MeOH	Methanol
MeV	Mega-Elektronenvolt = Energie des radioaktiven Zerfalls-
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MS	Massenspektrometrie
Mox	oxidiertes Methionin
Na	Natrium
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge

PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PFU	engl. <i>plaques forming units</i> ; Plaque bildende Einheiten
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration
pmol	Picomol
ppm	engl. <i>parts per million</i> ; Teile pro Million
psi	engl. <i>pounds per square inch</i> ; Druck pro Fläche
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
rpm	engl. <i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
SAG	Sammlung für Algenkulturen Göttingen
SDS	engl. <i>sodium dodecylsulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
SSPE	engl. <i>saline sodium phosphate EDTA</i> ;
TA	TRIS/Acetat-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> ; thermophiles Bakterium, aus dem DNA-Polymerase gewonnen wird
TCA	engl. <i>trichloroacetic acid</i> ; Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit, internationale Enzymeinheit
UDP	Uridin diphosphat
UV	Ultraviolett
Vh	Voltstunden (Zeit, die eine bestimmte Spannung anliegt)
VOL	Volumeneinheit
10X	10fach konzentriert
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung $g = 9.81 \text{ m/sec}^2$
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl beta-D-Galactopyranosid

ANHANG A

LOKALE ALIGNMENTS (MIT DEM NCBI-PROGRAMM BLAST) UND MASSEN-SPEKTREN DER MITTELS ESI-QTOF-MASSENSPEKTROSKOPIE SEQUENZIIERTEN PEPTIDE DER 54 kDa PARAMYLON-SYNTASE EGPaS AUS DEM SYNTHASE-KOMPLEX VON *EUGLENA GRACILIS*

Im Folgenden werden die Spektren einiger mittels ESI-QTOF-Massenspektroskopie sequenzierten Peptide der 54 kDa **Paramylon-Synthase EgPaS** aus *Euglena gracilis* dargestellt. Die Nummerierung der Peptide mit **1A bis 13M** sowie die Angaben der Aminosäurepositionen (AS) in der Paramylon-Synthase erfolgte im Nachhinein in einer der Lage im abgeleiteten Protein entsprechenden Reihenfolge. Für die massenspektrometrischen Aminosäure-Sequenzen gilt folgende Nomenklatur:

X: sehr sichere Aminosäure	x: eventuelle Aminosäure
(X/Y): X oder Y	(XY): XY oder YX
n-: N-Terminus	-c: C-Terminus
X*: Aminosäure ist modifiziert (z.B. oxidiertes Methionin)	

Die **Alignments** stammen aus den BLAST-Analysen der Peptide und wurden unter dem Modus für Proteine „Suche nach kurzen, annähernd exakten Treffern“ mit einem EXPECTvalue von 20 000 und der PAM30-Matrix für Sequenzlängen unter 35 Aminosäuren durchgeführt (<http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), da nur eine geringe Sequenz-Übereinstimmung des bisher unbekanntes Proteins aus *Euglena gracilis* zu den Sequenzen der Datenbanken erwartet wurde. Während die N-terminal gelegenen Peptide 1A und 2B nur mit wenigen Glycosyltransferasen Sequenz-Übereinstimmungen aufweisen, finden sich bei den weiter C-terminal lokalisierten Proteinen signifikante Ähnlichkeiten zu Glycosyltransferasen und beta-Glucan-Synthasen.

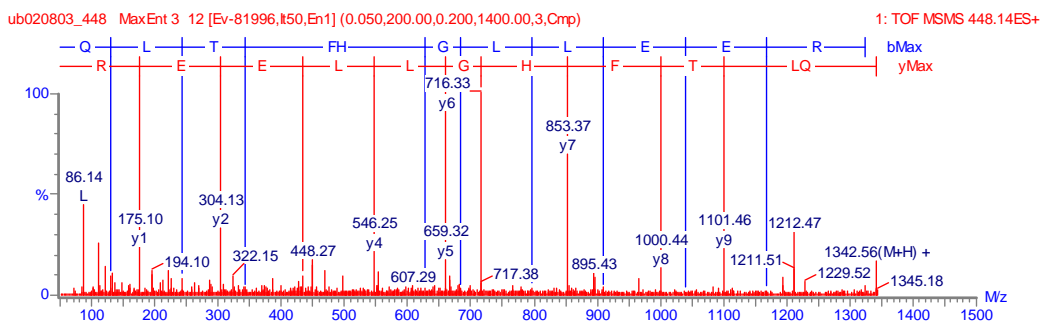
Peptid_1A	721.97 (2+)	n-(I/L)PAATSQ(I/L)(I/L)TNVSK-c
Paramylon-Synthase Protein	AS 11 - 24	L PAATSQ I L TNVSK

```
>gi|9858846|gb|AAG01165.1| beta-glucanase [Aspergillus niger] Length = 92
Score = 21.4 bits (43), Expect = 1505, Identities = 7/8 (87%), Positives = 7/8 (87%)
Query: 4  ATSQILTN 11
        ATSQI TN
Sbjct: 79  ATSQIPTN 86
```

```
>gi|19352194|dbj|BAB85988.1| beta-glucosidase [Phanerochaete chrysosporium,
Fungi] Length = 802
Score= 21.0 bits (42), Expect= 2187, Identities= 7/12 (58%), Positives= 8/12 (66%)
Query: 2  PAATSQIITNVS 13
        P A SQ + NVS
Sbjct: 73  PPAPSQTVANVS 84
```

```
>gi|29338659|gb|AA076459.1| putative Glycosyltransferase HI1698 [Bacteroides
thetaiotaomicron VPI-5482] Length = 389
Score= 19.7 bits (39), Expect= 5284, Identities= 5/5 (100%), Positives= 5/5 (100%)
Query: 7  QIITN 11
        QIITN
Sbjct: 322  QIITN 326
```

Peptid_2B 448.14 (3+) n-(q(i/l))TFHG(I/L)(I/L)EER-c
Paramylon-Synthase Protein AS 25 - 35 L Q TFHG L L EER-c



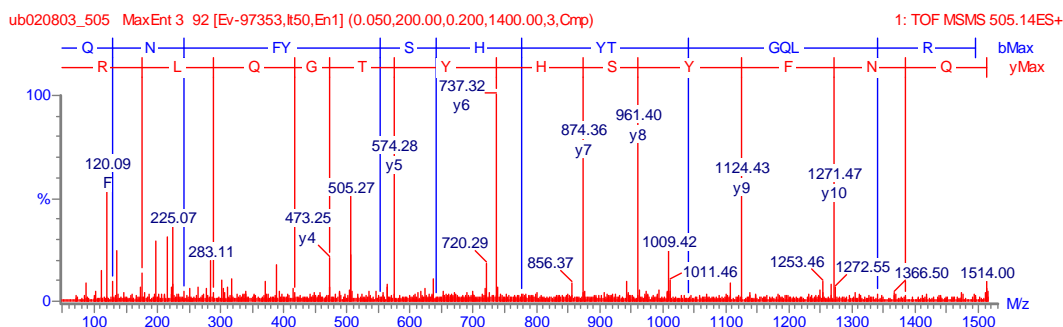
>gi|29344153|gb|AAO81913.1| **Glycosyltransferase**, group 2 family protein
 [Enterococcus faecalis V583] Length = 1047
 Score= 22.3 bits (45), Expect= 853, Identities= 7/10 (70%), Positives= 8/10 (80%),
 Gaps= 1/10(10%)
 Query: 3 TF-HGLLEER 11
 TF H LL+ER
 Sbjct: 357 TFIHALLDER 366

Peptid_3C 672.4 (2+) n-(I/L)M(I/L)DEVTESyK-c
Paramylon-Synthase Protein AS 166 - 176 L M L DEVTESYK-c

>gi|8778721|gb|AAF79729.1|AC005106_10 similar to **beta-1,3-Glucan synthase catalytic subunit 1** [Arabidopsis thaliana] Length = 901
 Score= 23.1 bits(47), Expect = 149, Identities= 9/13 (69%) Positives= 9/13 (69%),
 Gaps=4/13 (30%)
 Query: 3 IDEV--T--ESYK 11
 IDEV T ESYK
 Sbjct: 224 IDEVEQTHKESYK 236

>gi|4836907|gb|AAD30609.1|AC007153_1 Highly similar to putative **Callose synthase catalytic subunit** [Arabidopsis thaliana] Length = 1878
 Score= 23.1 bits (47), Expect = 149, Identities= 9/13 (69%), Positives= 9/13 (69%),
 Gaps=4/13(30%)
 Query: 3 IDEV--T--ESYK 11
 IDEV T ESYK
 Sbjct: 1202 IDEVEQTHKESYK 1214

Peptid_4D 505.14 (3+) n-((qn)/(e(I/L))FYSHYTgq(i/l)r-c
Paramylon-Synthase Protein AS 177 - 188 E I FYSHYTGQ L R



>gi|15898440|ref|NP_343045.1| **Glycosyltransferase** [*Sulfolobus solfataricus*]
 Length = 405
 Score= 22.3 bits (45), Expect= 851, Identities= 7/11 (63%), Positives= 9/11 (81%),
 Gaps= 2/11 (18%)
 Query: 2 IFYSHYTGQLR 12
 IFY++YT LR
 Sbjct: 139 IFYTYYT--LR 147

>gi|5545326|dbj|BAA82541.1| putative **Glycosyltransferase** [*Actinobacillus actinomycetemcomitans*]
 Length = 452
 Score= 21.8 bits (44), Expect = 1142, Identities= 5/7 (71%), Positives= 6/7 (85%)
 Query: 2 IFYSHYT 8
 +FY HYT
 Sbjct: 50 VFYRHYT 56

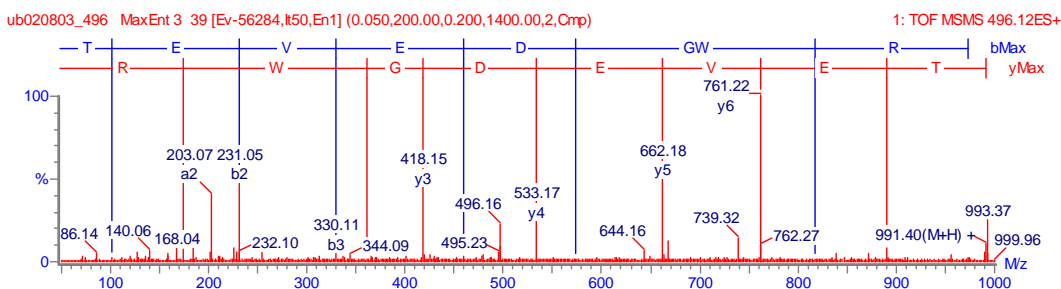
Peptid_5E	769.46 (2+)	n-((i/l)y/ef)DGTSTV(I/L)(I/L)(I/L)TNK-c
Paramylon-Synthase Protein	AS 198 - 211	L Y DGTSTV L L L TNK

>gi|4455123|gb|AAD21086.1| (AF127218) **flavonoid 3-O-Glycosyltransferase**
 [*Forsythia x intermedia*]
 Length = 454
 Score = 21.4 bits (43), Expect = 114, Identities = 6/6 (100%), Positives = 6/6 (100%)
 Query: 2 FDGTST 7
 FDGTST
 Sbjct: 433 FDGTST 438

>gi|3130103|dbj|BAA26119.1| **Glucosyltransferase-I** [*Streptococcus mutans*]
 Length = 1476
 Score= 21.4 bits (43), Expect= 1522, Identities= 6/6 (100%), Positives= 6/6 (100%)
 Query: 9 LLLTNK 14
 LLLTNK
 Sbjct: 620 LLLTNK 625

>gi|15225711|ref|NP_180820.1| (NM_128820) putative **Cellulose synthase**
 [*Arabidopsis thaliana*]
 Length=748
 Score= 21.4 bits (43), Expect = 114, Identities= 10/20 (50%), Positives= 10/20 (50%),
 Gaps= 7/20 (35%)
 Query: 2 FD-----GTS-TVIIITNK 14
 FD G S TV IIT K
 Sbjct: 610 FDITLKLLGISSETVFIITKK 629

Peptid_6F	496.12 (2+)	n-TEVEDgwR-c
Paramylon-Synthase Protein	AS 313 - 320	TEVEDWGR

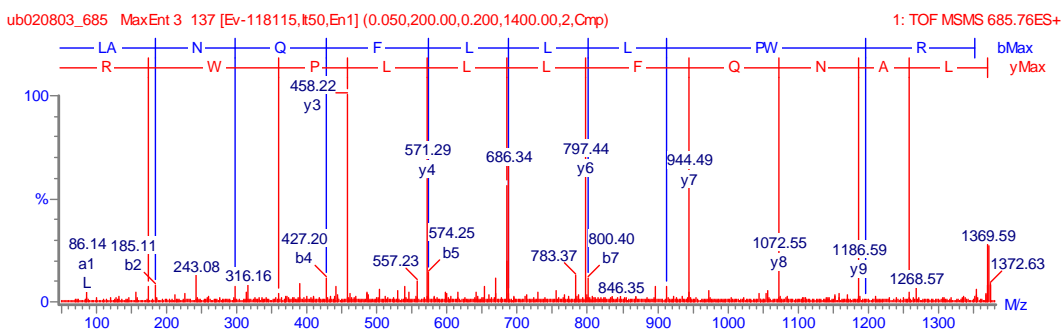


>gi|23492543|dbj|BAC17516.1| putative **phosphosugar mutase** [*Corynebacterium efficiens* YS-314] Length = 555
 Score = 27.8 bits (58), Expect = 19, Identities = 7/7 (100%), Positives = 7/7 (100%)
 Query: 2 EVEDWGR 8
 EVEDWGR
 Sbjct: 547 EVEDWGR 553

>gi|34098539|sp|Q8DPS6|GLGB_STRR6 **1,4-alpha-Glucan branching enzyme**
 (Glycogen branching enzyme) (BE) (1,4-alpha-D-glucan:1,4-alpha-D-glucan 6-
Glucosyltransferase) [*Streptococcus pneumoniae* R6]
 Score = 21.0 bits (42), Expect = 2221, Identities = 5/7 (71%), Positives = 7/7 (100%)
 Query: 1 TEVEDWG 7
 TE+E+WG
 Sbjct: 576 TELEEWG 582

>gi|11034535|dbj|BAB17059.1| putative **Glucosyltransferase** [*Oryza sativa*
 (japonica cultivar-group)] Length = 498
 Score = 19.3 bits (38), Expect = 7200, Identities = 4/5 (80%), Positives = 5/5 (100%)
 Query: 2 EVEDW 6
 EVE+W
 Sbjct: 336 EVEEW 340

Peptid_7G	685.76 (2+)	n- (I/L)ANQF (I/L) (I/L) (I/L)PwR-c
Paramylon-Synthase Protein	AS 325 - 335	L ANQF L L L PWR



>gi|30138611|emb|CAD84902.1| **Glycosyltransferase family 28** [*Nitrosomonas europaea* ATCC 19718] Length = 357
 Score = 25.2 bits (52), Expect = 107, Identities = 6/7 (85%), Positives = 7/7 (100%)
 Query: 5 FLLLPWR 11
 +LLLPWR
 Sbjct: 65 YLLLPWR 71

>gi|28201769|sp|P59270|B3G2_MOUSE **Beta-1,3-Glucuronyltransferase 2** (GlcAT-S)
 (UDP-glucuronosyltransferase-S) [*Mus musculus*] Length = 324
 Score = 21.4 bits (43), Expect = 1510, Identities = 5/6 (83%), Positives = 6/6 (100%)
 Query: 5 FLLLPW 10
 F+LLPW
 Sbjct: 10 FILLPW 15

Peptid_8H	561.32 (2+)	n-FVSNAWNQR-c
Paramylon-Synthase Protein	AS 336 - 334	FVSNAWNQR

>gi|1352399|sp|P49426|EXG1_COCCA **Glucan 1,3-beta-Glucosidase** precursor (exo-
 beta 1,3 glucanase) (1,3-beta-D-glucanohydrolase) [*Cochliobolus carbonum*]
 Length = 788
 Score = 19.7 bits (39), Expect = 4926, Identities = 5/8 (62%), Positives = 7/8 (87%)
 Query: 1 FVSNAWNQ 8
 FV +AW+Q
 Sbjct: 323 FVDSAWSQ 330

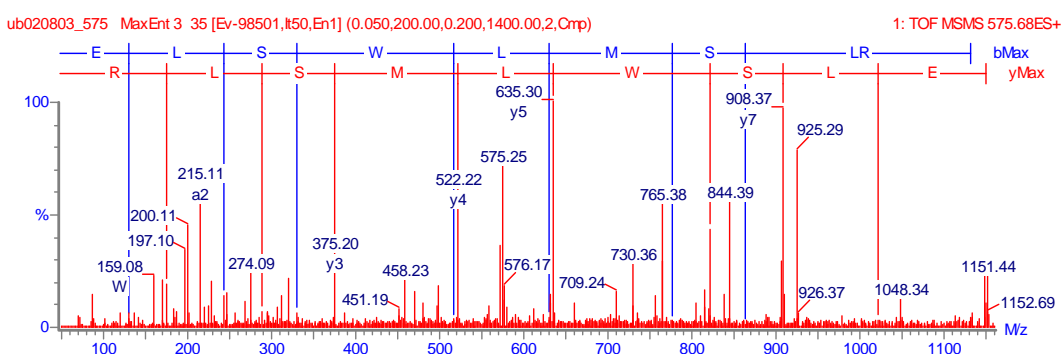
>gi|11281436|pir|T43403 **1,3-beta-Glucan synthase** (EC 2.4.1.34) similarity
 [*Schizosaccharomyces pombe*] Length = 1729
 Score = 18.0 bits (35), Expect = 415, Identities = 4/4 (100%), Positives = 4/4 (100%)
 Query: 5 AWNQ 8
 AWNQ
 Sbjct: 65 AWNQ 68

Peptid_9I	680.88 (2+)	(I/L)QALSDDE(I/L)K-c
Paramylon-Synthase Protein	AS 363 - 375	EGG V QALSDDE L K

>gi|15558866|emb|CAC69670.1| (AJ249371) **beta 1,3 Glucan synthase**
 [*Schizosaccharomyces pombe*] Length = 1826
 Score = 20.2 bits (40), Expect = 95, Identities = 6/7 (85%), Positives = 6/7 (85%)
 Query: 1 IQALSDD 7
 IQ LSDD
 Sbjct: 14 IQILSDD 20

>gi|14349253|dbj|BAB60721.1|(AB052558) **Glucosyltransferase** [*Nicotiana tabacum*]
 Length = 479
 Score = 21.4 bits (43), Expect = 116, Identities = 6/6 (100%), Positives = 6/6 (100%)
 Query: 3 ALSDD 8
 ALSDD
 Sbjct: 231 ALSDD 236

Peptid_10J	575.68 (2+)	n-((QN)/E(I/L))SW(I/L)M*tvr-c
Paramylon-Synthase Protein	AS 401 - 409	E I SW L M SLR



>gi|4883602|gb|AAD31571.1| putative **Glucan synthase** [*Arabidopsis thaliana*]
 Length = 784
 Score = 19.7 bits (39), Expect = 5366, Identities = 4/5 (80%), Positives = 5/5 (100%)
 Query: 2 ISWLM 6
 +SWLM
 Sbjct: 583 VSWLM 587

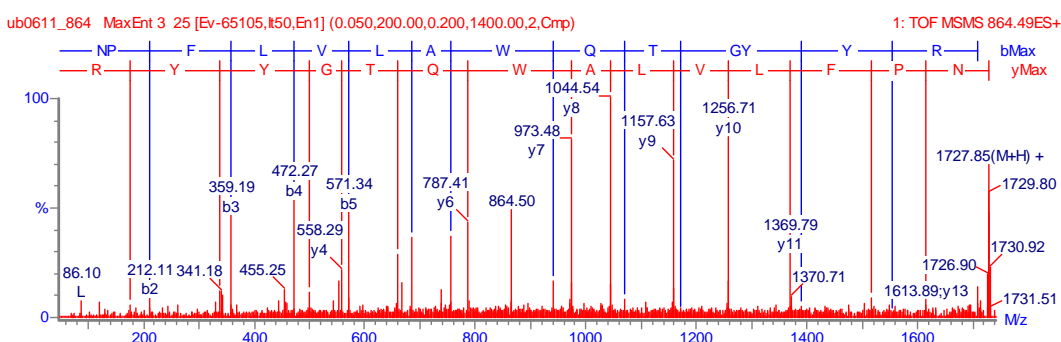
>gi|28809771|dbj|BAC62746.1| putative capsular **polysaccharide biosynthesis Glycosyltransferase** [*Vibrio parahaemolyticus*]
 Length = 466
 Score = 21.8 bits (44), Expect = 1234, Identities = 5/5 (100%), Positives = 5/5 (100%)
 Query: 3 SWLMT 7
 SWLMT
 Sbjct: 85 SWLMT 89

>gi|22966893|ref|ZP_00014488.1| COG0438 **Glycosyltransferase** [*Rhodospirillum rubrum*]
 Length = 761
 Score = 20.2 bits (40), Expect = 3999, Identities = 4/5 (80%), Positives = 5/5 (100%)
 Query: 4 WLMTV 8
 WLMT+
 Sbjct: 627 WLMTI 631

>gi|22294035|dbj|BAC07866.1| ORF_ID:t110314~probable **Glycosyltransferase**
 [*Thermosynechococcus elongatus* BP-1] Length = 365
 Score= 19.3 bits (38), Expect= 7200, Identities= 4/4 (100%), Positives= 4/4 (100%)
 Query: 4 WLMT 7
 WLMT
 Sbjct: 289 WLMT 292

>gi|38081650|ref|XP_355669.1| similar to **beta 3-Glycosyltransferase-like**
 [*Mus musculus*] Length = 554
 Score = 19.3 bits (38), Expect = 7200, Identities = 5/7 (71%), Positives = 6/7 (85%)
 Query: 2 ISWLMTV 8
 ISWL+ V
 Sbjct: 360 ISWLVIV 366

Peptid_11K	864.27 (2+)	n-NP (M* / F) (I / L) V (I / L) AWQTgg
Paramylon-Synthase Protein	AS 410 - 423	NP F I V L AWQTGYR



>gi|18461174|dbj|BAB84371.1| (AP003223) **putative 1,3-beta-Glucan synthase**
 [*Oryza sativa*] Length = 1769
 Score = 21.4 bits (43), Expect = 115, Identities = 5/6 (83%), Positives = 6/6 (99%)
 Query: 3 FLVLAW 8
 FLVL+W
 Sbjct: 1515 FLVLSW 1520

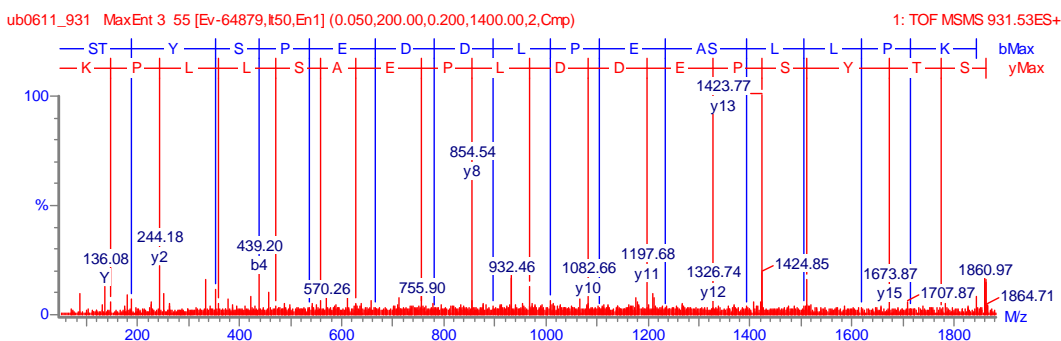
>gi|13872534|emb|CAC37505.1| (AL590972) **Glycosyltransferase**
 [*Schizosaccharomyces pombe*] Length = 511
 Score = 19.3 bits (38), Expect = 171, Identities = 6/8 (75%), Positives = 7/8 (87%)
 Query: 2 PFLVLAWQ 9
 PFL+LA Q
 Sbjct: 123 PFLLLASQ 130

>gi|17506631|ref|NP_493088.1| **Glycosyltransferase**, family 31 precursor
 (1M827) [*Caenorhabditis elegans*] Length = 376
 Score= 24.0 bits (49), Expect= 261, Identities= 8/19 (42%), Positives= 9/19 (47%),
 Gaps= 9/19 (47%)
 Query: 5 VLAWQTG-----YYR 14
 VLAW TG +YR
 Sbjct: 337 VLAWHTGKNDQQFLDYFYR 355

>gi|1076977|pir||S50235 **1,3-beta-Glucan synthase** (EC 2.4.1.34) chain FKS1 -
 yeast [*Saccharomyces cerevisiae*] Length=1876
 Score = 18.5 bits (36), Expect = 307, Identities = 5/5 (100%), Positives = 5/5 (100%)
 Query: 3 FLVLA 7
 FLVLA
 Sbjct: 1805 FLVLA 1809

>gi|15221507|ref|NP_172136.1| (NM_100528) **Glucan synthase**, putative
 [Arabidopsis thaliana] Length=1933
 Score = 19.7 bits (39), Expect = 372, Identities = 6/8 (75%), Positives = 7/8 (87%)
 Query: 3 FLVLAWQT 10
 FLVL+ QT
 Sbjct: 505 FLVLSLQT 512

Peptid_12L	931.38 (2+)	SPEDD(I/L) Peas
Paramylon-Synthase Protein	AS 424 - 440	STYSPEDD L PEASILPK



>gi|16764507|ref|NP_460122.1| (NC_003197) membrane **Glycosyltransferase**;
 synthesis of membrane-derived oligosaccharide (MDO)/synthesis of OPGs
 (osmoregulated periplasmic glucans) [Salmonella typhimurium LT2] Length= 847
 Score= 24.4 bits (50), Expect= 177, Identities= 8/13 (61%), Positives= 10/13 (76%)
 Query: 25 TYSPEDDLPEASI 37
 TYS EDD P+ S+
 Sbjct: 39 TYSREDDSPQGSV 51

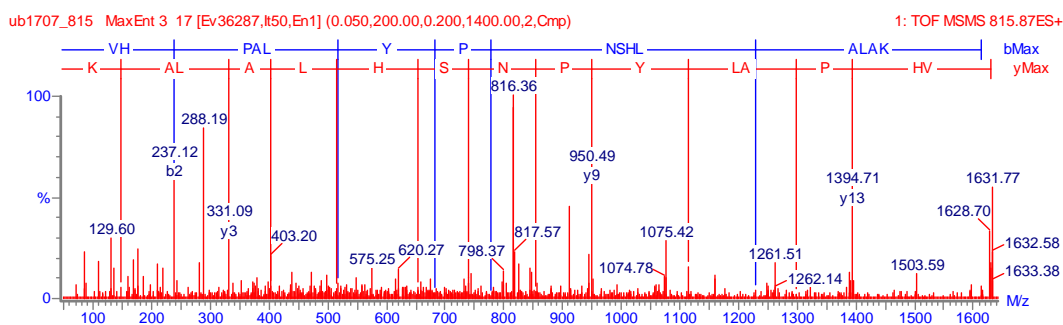
>gi|29137831|gb|AA069392.1| **periplasmic glucans biosynthesis protein** MdoH
 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi Ty2] Length = 847
 Score= 24.4 bits (50), Expect= 189, Identities= 8/13 (61%), Positives= 10/13 (76%)
 Query: 2 TYSPEDDLPEASI 14
 TYS EDD P+ S+

Sbjct: 39 TYSREDDSPQGSV 51

>gi|6226510|sp|Q9ZSK5|ZOG_PHALU **Zeatin O-Glucosyltransferase** (Zeatin O-beta-D-glucosyltransferase) [Phaseolus lunatus] Length = 459
 Score= 21.4bits (43), Expect= 116, Identities= 9/16 (56%), Positives= 9/16 (56%),
 Gaps= 7/16 (43%)
 Query: 2 PEDD-----IP--EAS 10
 PEDD IP EAS
 Sbjct: 84 PEDDFPSHLIPSFEAS 99

>gi|15233091|ref|NP_188793.1| (NM_113051) **UDP-glucose:indole-3-acetate beta-D-Glucosyltransferase**, putative [Arabidopsis thaliana] Length = 496
 Score= 20.6 bits (41), Expect = 208, Identities= 7/9 (77%), Positives= 7/9 (77%),
 Gaps= 2/9(22%)
 Query: 2 PEDDIPEAS 10
 PEDD EAS
 Sbjct: 82 PEDD--EAS 88

Peptid_13M 815.87 (2+) n-(VH)P(A(I/L))YPNSH(I/L)A((I/L)A)K-c
Paramylon-Synthase Protein AS 466 - 480 VH P A L YPNSH L A L A K



>gi|14916968|sp|P78611|CHSD_EMENI Chitin synthase D (**Chitin-UDP acetylglucosaminyltransferase** D) (Class-V chitin synthase D) [*Aspergillus nidulans*] Length = 1184
Score= 21.4 bits (43), Expect = 1517, Identities = 7/9 (77%), Positives = 7/9 (77%), Gaps = 2/9 (22%)

Query: 4 AL--YPNSH 10
AL YPNSH
Sbjct: 691 ALTDYPNSH 699

>gi|23617140|dbj|BAC20820.1| putative **Glucosyltransferase-2** [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)] Length = 571
Score= 20.2 bits (40), Expect= 395, Identities= 7/11 (63%), Positives= 8/11 (72%), Gaps = 3/11 (27%)

Query: 2 HPALYPNSHLA 12
HPAL +HLA
Sbjct: 305 HPAL---THLA 312

>gi|15219457|ref|NP_177480.1| sucrose synthase (UDP-glucose-fructose Glucosyltransferase/ **Sucrose-UDP Glucosyltransferase**), putative [*Arabidopsis thaliana*] Length= 942
Score = 19.7 bits (39), Expect = 530, Identities = 5/6 (83%), Positives = 5/6 (83%)

Query: 1 VHPALY 6
V PALY
Sbjct: 674 VQPALY 679

ANHANG B

LOKALE ALIGNMENTS (MIT DEM NCBI-PROGRAMM BLAST) DER MITTELS ESI-QTOF-MASSENSPEKTROSKOPIE SEQUENZIERTEN PEPTIDE MIT ÜBEREINSTIMMUNG ZUR ATPASE BETA-UNTEREINHEIT AUS DER 54 kDa-PROTEIN-BANDE VON *EUGLENA GRACILIS*

Im Folgenden werden die BLAST-Alignments derjenigen mittels ESI-QTOF-Massenspektroskopie sequenzierten Peptide dargestellt, die zu der gefundenen **ATPase beta Untereinheit** gehören (**Ia** bis **VIIg**). Die Suche wurde mit den gleichen Parametern wie bei den Peptiden der Paramylon-Synthase durchgeführt (PAM30-Matrix für Peptide unter 35 Aminosäuren, „Suche nach kurzen, annähernd exakten Treffern“ mit einem EXPECTvalue von 20 000). Die Nummerierung der Peptide erfolgte ebenfalls im Nachhinein aufgrund ihrer Reihenfolge in den bereits bekannten Sequenzen der ATPase beta-Untereinheiten. Es werden für jedes Peptid einige repräsentative Beispiele aufgeführt.

Die Analysen ergaben Übereinstimmungen mit beta-Untereinheiten aus mitochondrialen und bakteriellen ATPasen, sowie aus plastidären ATPasen Höherer Pflanzen und Algen. Signifikante Ähnlichkeiten zu vakuolären oder im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierten ATPasen wurden nicht gefunden. Die lokalen Alignments mit der ATPase beta-Untereinheit aus *Euglena gracilis* zeigen, dass es sich bei der mit der Paramylon-Synthase kogereinigten ATPase beta-Untereinheit nicht um die plastidäre Form des Enzyms aus *Euglena gracilis* handelt, deren Sequenz bereits bekannt ist (HALLICK et al. 1993). Die Sequenzunterschiede zwischen den gefundenen Peptiden der 54 kDa Proteinbande und der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz der plastidären ATPase beta-Untereinheit von *Euglena gracilis* betreffen zwar zum Teil nur wenige Aminosäuren, ermöglichen aber dennoch aufgrund der Peptidmassen eine eindeutige Unterscheidung.

Peptid_Ia	1048.58 (2+)	Mr: 2095.16	vvVVNTGSQ(I/L)TVPV(GE/W)AT(I/L)GR-c
<pre>>gi 3676296 gb AAD03392.1 mitochondrial ATPase beta subunit [<i>Nicotiana sylvestris</i>] Length = 556 Score= 43.5 bits (95), Expect= 3e-04, Identities= 15/19 (78%), Positives= 17/19 (89%) Query: 3 VVNTGSQLTVPVPGWATLGR 21 V+NTGS +TVPVG ATLGR Sbjct: 150 VLNTGSPITVPVGRATLGR 168</pre>			
<pre>>gi 114552 sp P06284 ATPB_MARPO ATP synthase beta chain [<i>Marchantia polymorpha</i>] chloroplast Length = 492 Score= 40.9 bits (89), Expect= 7e-04, Identities= 13/19 (68%), Positives= 18/19 (94%) Query: 3 VVNTGSQITVPVGEATIGR 21 V++TG+ +TVPVGEAT+GR Sbjct: 89 VIDTGAPLTVPVGEATLGR 107</pre>			
<pre>>gi 418792 pir S34547 H+-transporting ATP synthase (EC 3.6.1.34) beta chain - [<i>Euglena gracilis</i>] chloroplast Length = 480 Score= 29.1 bits (61), Expect= 0.037, Identities= 10/19 (52%), Positives= 16/19 (83%) Query: 3 VVNTGSQITVPVGEATIGR 21 V++TG+ ++VPVG T+GR Sbjct: 80 VIDTGAPLSVPVGVTTTLGR 98</pre>			

Peptid_IIb	697.87 (2+)	Mr: 1393.74	n-(I/L)(M/F)NVMGDA(I/L)DQR-c
-------------------	-------------	-------------	------------------------------

>gi|15642757|ref|NP_232390.1| **ATP synthase F1**, beta subunit [*Vibrio cholerae*] Length= 467
 Score= 29.9 bits (63), Expect= 4.2, Identities= 8/11 (72%), Positives= 11/11 (100%)
 Query: 2 MNVMGDALDQR 12
 MNV+GDA+D+R
 Sbjct: 89 MNVLGDAIDER 99

>gi|11908130|gb|AAG23340.1| **mitochondrial ATPase** beta subunit [*Trypanosoma brucei brucei*] Length = 518
 Score= 28.2 bits (59), Expect= 14, Identities= 8/10 (80%), Positives= 10/10 (100%)
 Query: 3 NVMGDALDQR 12
 NV+GDA+DQR
 Sbjct: 123 NVLGDAIDQR 132

Peptid_IIIc	696.80 (2+)	Mr: 1391.60	n-GHGGYSVFAGVGER-c
--------------------	-------------	-------------	--------------------

>gi|114564|sp|P05038|ATPB_RHORU **ATP synthase** beta chain (EC 3.6.3.14) - [*Rhodospirillum rubrum*] Length = 474
 Score= 45.6 bits(100), Expect= 8e-05, Identities= 14/14(100%), Positives= 14/14(100%)
 Query: 1 GHGGYSVFAGVGER 14
 GHGGYSVFAGVGER
 Sbjct: 172 GHGGYSVFAGVGER 185

>gi|11908130|gb|AAG23340.1|(AY007706) **mitochondrial ATPase** beta subunit [*Trypanosoma brucei brucei*] Length = 518
 Score= 42.2 bits (92), Expect= 4e-06, Identities= 13/14 (92%), Positives= 14/14 (99%)
 Query: 1 GHGGYSVFAGVGER 14
 GHGG+SVFAGVGER
 Sbjct: 203 GHGGFSVFAGVGER 216

>gi|418792|pir||S34547 **H+-transporting ATP synthase** (EC 3.6.1.34) beta chain - [*Euglena gracilis*] **chloroplast** Length = 480
 Score= 32.5 bits (69), Expect= 0.004, Identities= 11/13 (84%), Positives= 11/13 (84%)
 Query: 2 HGGYSVFAGVGER 14
 HGG SVF GVGER
 Sbjct: 182 HGGVSVFAGVGER 194

Peptid_IVd	758.89 (2+)	Mr: 1515.79	n-VAQTA(I/L)TMAEYFR-c
-------------------	-------------	-------------	-----------------------

>gi|11908130|gb|AAG23340.1| **mitochondrial ATPase beta subunit** [*Trypanosoma brucei brucei*] Length = 518
 Score= 42.6 bits(93), Expect= 6e-04, Identities= 12/13(92%), Positives= 13/13(100%)
 Query: 1 VAQTALTMAEYFR 13
 VAQ+ALTMAEYFR
 Sbjct: 258 VAQSALTMAEYFR 270

>gi|4519346|dbj|BAA75588.1| **ATP synthase beta-subunit** [*Chlamydomonas moewusii*] **chloroplast** Length = 376
 Score= 40.1 bits (87), Expect= 0.004, Identities= 12/13 (92%), Positives= 12/13 (92%)
 Query: 1 VAQTALTMAEYFR 13
 VA TALTMAEYFR
 Sbjct: 173 VALTALTMAEYFR 185

>gi|418792|pir||S34547 **H+-transporting ATP synthase** (EC 3.6.1.34) beta chain - [*Euglena gracilis*] **chloroplast** Length = 480
 Score= 36.7 bits(79), Expect= 2e-04, Identities= 10/10(100%) Positives= 10/10(100%)
 Query: 1 VAQTALTMAEYFR 13
 V TALTMAEYFR
 Sbjct: 241 VGLTALTMAEYFR 250

Peptid_Ve	919.01 (2+) Mr: 1836.02	DV(I/L)(I/L)FVD
------------------	-------------------------	-----------------

>gi|49227|emb|CAA49882.1| **ATP synthase** (beta); H(+)-transporting ATP synthase [*Synechococcus* sp.] Length = 482
 Score = 25.7 bits (53), Expect = 88, Identities = 7/7 (100%), Positives = 7/7 (100%)
 Query: 1 DVLLFVD 7
 DVLLFVD
 Sbjct: 257 DVLLFVD 263

>gi|7708335|emb|CAB89909.1| **ATP synthase** beta subunit [*Humulus lupulus*] **chloroplast** Length=489
 Score = 23.5 bits (48), Expect = 381, Identities = 6/7 (85%), Positives = 7/7 (100%)
 Query: 1 DVLLFVD 7
 DVLLF+D
 Sbjct: 265 DVLLFID 271

>gi|418792|pir||S34547 H+-transporting **ATP synthase** (EC 3.6.1.34) beta chain - [*Euglena gracilis*] **chloroplast**
 Score = 23.5 bits (48), Expect = 1.7, Identities = 6/7 (85%), Positives = 7/7 (99%)
 Query: 1 DVLLFVD 7
 DVLLF+D
 Sbjct: 256 DVLLFID 262

Peptid_VIf	746.89 (2+) Mr: 1491.78	n-(FT)QANSEVSA(I/L)(I/L)GR-c
-------------------	-------------------------	------------------------------

>gi|3676296|gb|AAD03392.1| **mitochondrial ATPase** beta subunit [*Nicotiana sylvestris*] Length = 556
 Score= 45.2 bits(99), Expect= 1e-04, Identities= 14/14(100%), Positives= 14/14(100%)
 Query: 1 FTQANSEVSALLGR 14
 FTQANSEVSALLGR
 Sbjct: 338 FTQANSEVSALLGR 351

>gi|11908130|gb|AAG23340.1| **mitochondrial ATPase** beta subunit [*Trypanosoma brucei brucei*] Length = 518
 Score= 45.2 bits(99), Expect= 1e-04, Identities= 14/14(100%), Positives= 14/14(100%)
 Query: 1 FTQANSEVSALLGR 14
 FTQANSEVSALLGR
 Sbjct: 287 FTQANSEVSALLGR 300

>gi|418792|pir||S34547 **H+-transporting ATP synthase** (EC 3.6.1.34) beta chain - [*Euglena gracilis*] **chloroplast** Length = 480
 Score= 29.5 bits (62), Expect= 0.027, Identities= 10/14 (71%), Positives= 12/14 (85%)
 Query: 1 FTQANSEVSAIIGR 14
 F QA SEVSA++GR
 Sbjct: 267 FVQAGSEVSALLGR 280

Peptid_VIIg	911.48 (2+) Mr: 1820.96	ePfAVaev
--------------------	-------------------------	----------

>gi|1483632|gb|AAC49475.1| **F1-ATPase** beta-subunit [*Saccharomyces cerevisiae*] **mitochondrial** Length = 511
 Score = 25.2 bits (52), Expect = 110, Identities = 7/8 (87%), Positives = 8/8 (100%)
 Query: 1 EPFAVAEV 8
 +PFVAEV
 Sbjct: 449 QPFAVAEV 456

>gi|418792|pir||S34547 **H+-transporting ATPase** (EC 3.6.1.34) beta chain - [*Euglena gracilis*] **chloroplast** Length = 480
 Score = 19.3 bits (38), Expect = 32 Identities = 6/8 (75%), Positives = 7/8 (87%)
 Query: 1 EPFAVAEV 8
 +PF VAEV
 Sbjct: 422 QPFFVAEV 429

DANKSAGUNG

Frau PD Dr. A. M. Preisfeld danke ich für die interessante Aufgabenstellung, ihre engagierte Betreuung und Unterstützung sowie für alles, was ich in dieser Zeit gelernt habe.

Frau Prof.'in Dr. E. K. Pistorius möchte ich für die Erstellung des Zweitgutachtens, ihre Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. H. G. Ruppel und Herrn Prof. Dr. Armin Hallmann als Lehrstuhlinhaber zu Beginn bzw. zum Ende dieser Arbeit danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und ihre Unterstützung.

Bei Prof. Dr. William Martin, seiner Arbeitsgruppe an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und insbesondere bei Dr. Carmen Rotte möchte ich mich ganz herzlich bedanken für ihre Kooperationsbereitschaft, die Überlassung eines Laborarbeitsplatzes sowie die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

Dr. Markus Piotrowski von der Ruhr-Universität Bochum danke ich für die massenspektroskopische Sequenzierung und die über die Sequenzinformationen hinausgehenden wertvollen Anregungen. Danke auch an Marc Oliver Lutter von Zentrum für Genomforschung an der Universität Bielefeld für seine Kooperationsbereitschaft.

Meiner Arbeitsgruppe und insbesondere Susanne Talke und Ingo Busse möchte ich besonders herzlich danken für die wunderbare wissenschaftliche und persönliche Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft. Danke auch an Bodo Müller für seine Unterstützung. Dietrich Bäumer danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. K.-J. Dietz und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe sowie den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Prof.'in Dr. E. K. Pistorius möchte ich für die Bereitstellung von Geräten und Einrichtungen danken und für ihre Unterstützung.

Meinen Eltern, Katja und Michael danke für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihren Beistand (und das Zip-Laufwerk).

Danke Jörg, besonders natürlich für die zweite Hälfte !

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben.

Ich erkläre ebenso, dass diese Dissertation keiner anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben.

Bielefeld, im Januar 2004