

**Molekulare Biochemie ausgewählter Enzyme des
anaeroben Energiestoffwechsels in den
fakultativ anaeroben Mitochondrien von *Euglena gracilis***

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Carmen Rotte
aus Osterode

Düsseldorf 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Referent: Prof. Dr. William Martin

2. Referent: Prof. Dr. Peter Westhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2003

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. William Martin für die Überlassung des Themas, seine ausgezeichnete fachliche Betreuung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seinem Institut. Seine hilfreichen Anregungen, sein schier unerschöpfliches Wissen und die zahlreichen interessanten Diskussionen rund um den Ursprung der Eukaryoten haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Seine ansteckende Begeisterung für die Wissenschaft hat mich stets motiviert.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Westhoff bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik danke ich für das schöne erste Jahr in Braunschweig. Mein herzlicher Dank gilt Frau Christiane Lindemann, die mich so geduldig und kompetent in zahlreiche Methoden der Molekularbiologie eingeführt hat.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Botanik III in Düsseldorf bedanke ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre und die gemütlichen Teerunden. Mein herzlichster Dank gilt Frau Margarete Stracke, deren goldene Hände mich hervorragend bei der Durchführung der Hybridisierungen unterstützt haben. Bei Frau Eva Walla bedanke ich mich für die fachkundige technische Hilfe bei dem *Trypanosoma*-Projekt. Frau Dipl. Biol. Meike Hoffmeister danke ich von ganzem Herzen für die wirklich schöne Zeit zusammen, die wunderbare Teamarbeit und liebevolle Unterstützung. Herrn Dipl. Biol. Thomas Lins danke ich für seine Hilfsbereitschaft in jeder Notlage und die vielen Diskussionen, Herrn Dr. Ulrich Nowitzki danke ich für die geduldige Beantwortung meiner Fragen. Bei Frau Marianne Limpert bedanke ich mich besonders für die geduldige Unterstützung bei so manch bürokratischem und organisatorischem Vorgang und für so manch hilfreiches Gespräch.

Herrn Prof. Dr. Peter Reichert gilt mein herzlicher Dank für die Bereitstellung der Peptidsequenzen für die Ribonukleotid Reduktase. Bei Herrn Prof. Dr. Miklos Müller bedanke ich mich für die interessanten und hilfreichen Diskussionen.

Meinen Eltern danke ich für ihren Beistand und ihre Anteilnahme.

Ernst gilt mein Dank für die liebevolle Unterstützung, seine geduldigen stets offenen Ohren, seine ermutigenden Worte und ganz besonders dafür, dass er immer für mich da war.

Für das gewährte Stipendium danke ich der Studienstiftung des deutschen Volkes.

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Betreuers in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Tielens AGM, Rotte C, van Hellemond J und Martin W (2001) Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.* 27:545-592

Martin W, Hoffmeister M, Rotte C und Henze K (2001) An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biol. Chem.* 382:1521-1539

Rotte C und Martin W (2001) Does endosymbiosis explain the origin of the nucleus? *Nature Cell Biol.* 3:E173-E174

Rotte C, Stejskal F, Zhu G, Keithly JS und 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.

Rotte C, Henze K, Müller M und Martin W (2000). Origins of hydrogenosomes and mitochondria. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:482-486

Tagungsbeiträge

Rotte C und Martin W. Pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase from *Euglena gracilis*: A missing link of pyruvate metabolism between mitochondria and hydrogenosomes. Botanikertagung Jena, 2000.

Hoffmeister M, Rotte C und Martin W. ATP-Synthese der fakultativ anaeroben Mitochondrien von *Euglena gracilis*: Ein Vergleich aerober und anaerober mitochondrialer Proteine. 15. Tagung "Molekularbiologie der Pflanzen", Dabringhausen 2002.

Rotte C und Martin W. Pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase and pyruvate dehydrogenase from *Euglena* mitochondria link mitochondrial and hydrogenosomal pyruvate metabolism in a single organelle. Botanikertagung, Freiburg 2002.

Patent

Pyruvate: NADP⁺ oxidoreductase and uses thereof. European Patent 00117730.2

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Mitochondrien – Organellen des Energiestoffwechsels eukaryotischer Zellen	3
2.2 Der endosymbiontische Ursprung der Mitochondrien	4
2.3 Die Diversität anaerober ATP-Synthesewege in heutigen Eukaryoten	6
2.3.1 Anaerobe Formen der Mitochondrien – ATP-Synthese ohne Sauerstoff	6
2.3.2 Anaerobe ATP-Synthese in Eukaryoten, die keine Mitochondrien besitzen.....	8
2.4 Hydrogenosomen – eine weitere Form anaerober Mitochondrien?	10
2.5 Das fakultativ anaerobe Mitochondrium von <i>Euglena gracilis</i>	12
2.5.1 Aerober Energiestoffwechsel in den Mitochondrien von <i>Euglena gracilis</i>	14
2.5.2 Anaerober Energiestoffwechsel in den Mitochondrien von <i>Euglena gracilis</i> : die Wachsesterfermentation	14
2.5.3 Das Schlüsselenzym der Wachsesterfermentation: Die mitochondriale Pyruvat:NADP ⁺ Oxidoreduktase	16
2.6 Zwei Hauptenzyme des Pyruvat-Stoffwechsels in Eukaryoten im Detail: Pyruvat Dehydrogenase und Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase	17
2.6.1 Der Pyruvat Dehydrogenase Multienzymkomplex	17
2.6.2 Die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase	20
2.7 Die Ribonukleotid Reduktase aus <i>Euglena gracilis</i> : ein für Eukaryoten ungewöhn- liches, sauerstoffunabhängiges Enzym.....	22
2.8 Fazit	24
2.9 Aufgabenstellung.....	25
3 Material und Methoden	26
3.1 Geräte:	26
3.2 Allgemeine Chemikalien	27
3.3 Radiochemikalien	27
3.4 Filtermaterialien und Membranen	27
3.5 Materialien für die Chromatographie	28
3.6 Materialien für die Autoradiographie und Fotografie.....	28
3.7 Reagenzsätze	28

3.8	Enzyme.....	28
3.9	Biologisches Material.....	29
3.9.1	<i>Euglena gracilis</i>	29
3.9.2	Bakterienstämme.....	29
3.10	Plasmid- und Bakteriophagen-Vektoren.....	29
3.11	Kultivierung von <i>Euglena gracilis</i>	29
3.12	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	30
3.13	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	30
3.13.1	Präparation, Reinigung und Analyse von Nukleinsäuren.....	30
3.13.2	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren.....	31
3.13.3	Weitere molekularbiologische Techniken.....	31
3.13.4	PCR-Techniken.....	31
3.13.4.1	Ansatz und Reaktionsbedingungen zur Durchführung der PCR.....	31
3.13.4.2	Reamplifikation von PCR-Produkten.....	31
3.13.4.3	Klonierung von PCR-Fragmenten.....	32
3.13.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Euglena gracilis</i>	32
3.13.6	Isolierung von Poly(A) + RNA aus <i>Euglena gracilis</i>	33
3.13.7	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Euglena gracilis</i>	33
3.13.8	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	34
3.13.9	cDNA-Banken aus <i>Euglena gracilis</i>	34
3.13.10	Identifizierung rekombinanter Klone.....	34
3.13.11	Southern-Hybridisierung.....	36
3.13.12	Northern-Hybridisierung.....	36
3.13.13	Isolierung von Einzelstrang-DNA.....	37
3.13.14	Herstellen von Deletionsmutanten mit Hilfe der Exonuklease III.....	37
3.13.15	Sequenzierung nach Sanger.....	38
3.13.16	Herstellung von subtraktiven cDNA-Banken mit Hilfe des "Clontech PCR-Select™ cDNA-Subtraction Kit".....	40
3.13.16.1	Spaltung der cDNA mit RsaI.....	43
3.13.16.2	Adapterligation an die experimentelle Tester cDNA.....	43
3.13.16.3	Erste und zweite Hybridisierung.....	43
3.13.16.4	Subtraktive <i>suppression</i> PCR Amplifikation.....	43
3.13.17	Identifizierung differentiell exprimierter cDNAs.....	44
3.13.17.1	Herstellung der subtrahierten cDNA-Sonden.....	44
3.13.17.2	Hybridisierung mit subtrahierten cDNA-Sonden.....	45
3.13.18	Differentielle, nicht subtrahierte, Hybridisierung.....	45
3.13.18.1	Synthese einzelsträngiger radioaktiv markierter cDNA.....	45
3.13.18.2	Hybridisierung mit einzelsträngigen cDNA-Sonden.....	46
3.13.19	Dot Blot Hybridisierung.....	46
3.13.19.1	Herstellung der Dot Blots.....	46
3.13.19.2	Hybridisierung der Dot Blots.....	47
3.13.19.3	Quantifizierung der Hybridisierungssignale.....	47
3.14	Bioinformatische Methoden.....	47
3.14.1	Sequenzanalyse.....	47
3.14.2	Datenbankvergleiche.....	47
3.14.3	Multiple Alignments.....	48

3.14.4	Phylogenetische Analysen.....	48
3.14.5	Voraussagen über mögliche Transitpeptide	48
3.15	Verwendete Oligonukleotide.....	49
4	Ergebnisse.....	50
4.1	Klonierung, Sequenzierung und Expressionsanalyse der Pyruvat: NADP ⁺ Oxido- reduktase aus <i>Euglena gracilis</i>	50
4.1.1	PCR-Amplifikation und Subklonierung einer PFO-spezifischen DNA-Sonde.....	50
4.1.1.1	Auswahl der PCR-Primer	50
4.1.1.2	Optimierung der PCR-Parameter.....	51
4.1.1.3	Ergebnisse der PCR-Reaktionen	51
4.1.2	Isolierung der cDNA für die PNO aus einer cDNA-Bank von aerob angezo- genen <i>Euglena</i> -Kulturen.....	53
4.1.3	Sequenzierung und molekulare Charakterisierung der PNO cDNA	53
4.1.4	Genomische Southern-Hybridisierung der <i>Euglena</i> PNO.....	58
4.1.5	Northern-Hybridisierung der <i>Euglena</i> PNO.....	59
4.2	Klonierung, Sequenzierung und Expressionsanalyse der E1 α , E2- und E3-Untereinheit des PDH-Multienzymkomplexes aus <i>Euglena gracilis</i>	60
4.2.1	Isolierung und Sequenzierung der cDNA für die Pyruvat Dehydrogenase- Untereinheit (E1 α) aus einer cDNA-Bank von anaerob kultivierten <i>Euglena</i> - Kulturen.....	60
4.2.1.1	Isolierung der cDNA für die PDH E1 α aus einer cDNA-Bank von <i>Euglena</i> <i>gracilis</i>	60
4.2.1.2	Sequenzierung und molekulare Charakterisierung der PDH E1 α cDNA.....	62
4.2.2	Isolierung und Sequenzierung der cDNA für die Dihydrolipoyl-Transacetylase (E2) aus einer cDNA-Bank von aerob angezogenen <i>Euglena</i> -Kulturen	66
4.2.2.1	Isolierung der cDNA für die PDH E2 aus einer cDNA-Bank von <i>Euglena</i> <i>gracilis</i>	66
4.2.2.2	Sequenzierung und molekulare Charakterisierung der PDH E2 cDNA	66
4.2.3	Isolierung und Sequenzierung der cDNA für die Dihydrolipoyl Dehydrogenase Untereinheit (E3) aus einer cDNA-Bank aerob angezogenen <i>Euglena</i> -Kulturen ..	71
4.2.3.1	Isolierung der cDNA für die PDH E3 aus einer aeroben cDNA-Bank von <i>Euglena gracilis</i>	71
4.2.3.2	Sequenzierung und molekulare Charakterisierung der PDH E3 cDNA	71
4.2.4	Northern Hybridisierung der Pyruvat Dehydrogenase, der Dihydrolipoyl Transacetylase- und der Dihydrolipoyl Dehydrogenase- Untereinheit des PDH-Multienzymkomplexes aus <i>Euglena gracilis</i>	75
4.3	Identifizierung, Sequenzierung und molekulare Charakterisierung der Ribonukleotid Reduktase aus einer cDNA-Bank von <i>Euglena gracilis</i>	77
4.3.1	Identifizierung der cDNA für die RNR aus einer cDNA-Bank von aerob angezogenen <i>Euglena</i> -Kulturen	77
4.3.2	Sequenzierung und molekulare Charakterisierung der cDNA für die <i>Euglena</i> Ribonukleotid Reduktase.....	77
4.4	Identifizierung weiterer Protein-kodierender Gene, die differentiell unter anaeroben Bedingungen exprimiert werden	81

4.4.1	Erstellung subtrahierter cDNA-Banken mit Hilfe des "Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kits"	81
4.4.1.1	Spaltung der cDNA in kleinere Fragmente und Ligation der Adaptoren	81
4.4.1.2	Subtraktive Hybridisierung und <i>suppression</i> PCR	81
4.4.1.3	Southern Blot Hybridisierung zur Ermittlung der Subtraktionseffizienz	83
4.4.2	Differentielle Hybridisierung mit den subtrahierten cDNA-Sonden	84
4.4.2.1	Auswahl von Kandidaten durch differentielle Hybridisierung mit den subtrahierten cDNA-Sonden	85
4.4.2.2	Ergebnisse der Hybridisierung einer cDNA-Bank aus anaerob angezogenen Kulturen mit den subtrahierten cDNA-Sonden	86
4.4.2.3	Ergebnisse der Dot Blot Hybridisierung	87
4.4.3	Differentielle Hybridisierung mit nicht subtrahierten cDNA-Sonden	89
4.4.3.1	Auswahl der Kandidaten durch differentiellen Hybridisierung einer cDNA-Bank von anaerob angezogenen Kulturen mit einzelsträngigen cDNA-Sonden	90
4.4.3.2	Ergebnisse der differentiellen Hybridisierung der anaeroben <i>Euglena</i> cDNA-Bank mit den einzelsträngigen aeroben und anaeroben cDNA-Sonden	91
4.4.3.3	Ergebnisse der Dot Blot Hybridisierung	93
5	Diskussion	95
5.1	Die mitochondriale Pyruvat:NADP ⁺ Oxidoreduktase (PNO) aus <i>Euglena gracilis</i>	95
5.1.1	Die <i>Euglena</i> PNO: eine Genfusion von Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase und NADPH-Cytochrom P450 Reduktase	95
5.1.2	Die <i>Euglena</i> PNO – in Mitochondrien mehr als eine funktionale PFO ?	96
5.1.3	Die <i>Euglena</i> PNO – ein sauerstoffsensitives Enzym in einem sauerstoffverbrauchenden Organell	97
5.1.4	Die <i>Euglena</i> PNO ist vermutlich durch Genfusion und Rekombinationsereignissen unterschiedlicher Domänen entstanden	98
5.2	Phylogenetische Analysen der PFO- und CPR-Domänen der <i>Euglena</i> PNO	102
5.2.1	Eukaryotische PFO-Sequenzen sind monophyletisch	102
5.2.2	FMN-, FAD-, und NADP-Bindedomänen der Hefe Sulfitreduktase stammen vom gleichen Fusionsereignis ab, welches zur Bildung der <i>Euglena</i> PNO führte	105
5.2.3	Die monophyletische Abstammung eukaryotischer PFO ist nicht mit allen Modellen zum endosymbiontischen Ursprung der Mitochondrien (und Hydrogenosomen) kompatibel	106
5.2.3.1	Klassische Modelle können die Monophylie eukaryotischer PFO (und weiterer Enzyme der anaeroben ATP-Synthese) mit ihren Annahmen nicht direkt erklären	108
5.2.3.2	Fusionsmodelle können die Monophylie eukaryotischer PFO unter der Prämisse eines primär amitochondrialen Eukaryoten erklären	108
5.2.3.3	Die Wasserstoffhypothese kann die Monophylie eukaryotischer PFO direkt mit der Annahme eines gemeinsamen fakultativ anaeroben Vorfahrens für die Mitochondrien und Hydrogenosomen erklären	110
5.3	Der mitochondriale Pyruvat Dehydrogenase Multienzymkomplex aus <i>Euglena gracilis</i>	113
5.3.1	Molekulare Charakterisierung und Expressionsanalyse der Pyruvat Dehydrogenase- (E1), der Dihydrolipoyl Transacetylase- (E2) und der Dihydrolipoyl Dehydrogenase-Untereinheit (E3) des <i>Euglena</i> PDH-Multienzymkomplexes	113

5.3.2	Die Untereinheiten des mitochondrialen PDH-Komplexes aus <i>Euglena gracilis</i> sind Akquisitionen des α -proteobakteriellen Vorfahren der Mitochondrien	117
5.3.3	Die meisten eukaryotischen Enzyme des Energiestoffwechsels sind – wie die PDH und die PFO – eubakteriellen Ursprungs.....	121
5.4	Identifizierung differentiell exprimierter Gene mittels subtraktiver und differentieller Hybridisierung	123
5.5	Die Ribonukleotid Reduktase (RNR) aus <i>Euglena gracilis</i>	126
5.5.1	Molekulare Charakterisierung der Ribonukleotid Reduktase Klasse II aus <i>Euglena gracilis</i>	127
5.5.2	RNR Genphylogenie der Klasse II Enzyme: Die <i>Euglena</i> RNR könnte eine Genakquisition aus der Plastide repräsentieren	128
6	Literaturverzeichnis	133

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1:	Die klassische Version der Endosymbiontenhypothese für den Ursprung der Mitochondrien nach John und Whatley (1975).	5
Abb. 2-2:	Energiestoffwechsel in amitochondrialen Protisten	9
Abb. 2-3:	Aerober und anaerober Energiestoffwechsel in den Mitochondrien von <i>Euglena gracilis</i>	13
Abb. 3-1:	Sequenzen der Adaptoren und der PCR Primer in der subtraktiven <i>suppression</i> -PCR.	41
Abb. 3-2:	Schematische Darstellung der "PCR-Select cDNA Subtraction"	43
Abb. 4-1:	Mittels PCR amplifizierte PNO-Fragmente.	52
Abb. 4-2:	Sequenz der cDNA für die PNO aus <i>Euglena gracilis</i>	53
Abb. 4-3:	Vergleich der translatierten pEgPNO3 mit Peptidsequenzen, welche durch direkte Sequenzierung des aus isolierten Mitochondrien von <i>Euglena</i> aufgereinigten Proteins erhalten wurden	57
Abb. 4-4:	N-terminale Aminosäuresequenzen der Untereinheiten I, II und IX des mitochondrialen Komplexes CIII von <i>Euglena gracilis</i> im Vergleich mit der N-terminalen Aminosäuresequenz der pEgPDHE1 α	58
Abb. 4-5:	Genomische Southern-Hybridisierung der PNO.	59
Abb. 4-6:	Northern-Hybridisierung von <i>Euglena gracilis</i> Poly(A)+ RNA, die mit pEgPNO3 hybridisiert wurde.	59
Abb. 4-7:	Vergleich der EgPDHE1 α _14 mit 5'-Enden von <i>Euglena</i> cDNAs, die für kernkodierte Proteine kodieren.	61
Abb. 4-8:	Sequenz der E1 α -Untereinheit der PDH aus <i>Euglena gracilis</i>	62
Abb. 4-9:	Alignment der Aminosäuresequenzen verschiedener eukaryotischer E1 α -Untereinheiten.	64
Abb. 4-10:	Sequenz-Alignment N-terminaler E1 α -Sequenzen und der aufgereinigten E1 α - Untereinheit aus <i>Crithidia fasciculata</i>	65
Abb. 4-11:	Sequenz der E2-Untereinheit der PDH aus <i>Euglena gracilis</i>	67
Abb. 4-12:	Aminosäuresequenz-Alignment von pro- und eukaryotischen E2-Untereinheiten.	69
Abb. 4-13:	Sequenz-Alignment N-terminaler E2-Sequenzen und der aufgereinigten E2-Untereinheit aus <i>Crithidia fasciculata</i>	70
Abb. 4-14:	Sequenz der E3-Untereinheit der PDH aus <i>Euglena gracilis</i>	72
Abb. 4-15:	Ausschnitt aus dem Aminosäuresequenz-Alignment von pro- und eukaryotischen E3-Untereinheiten, Gluthation Reduktase, Quecksilber Reduktase und Trypanothion Reduktase	74

Abb. 4-16:	Ausschnitt aus dem Sequenz-Alignment N-terminaler E3-Sequenzen und der aufgereinigten PDH E3-Untereinheit aus <i>Crithidia fasciculata</i>	75
Abb. 4-17:	Northern-Hybridisierung von Poly(A)+ RNA aus <i>Euglena gracilis</i> , die mit pEg-PDHE1 α _14, pEgPDHE2_3 bzw. pEgPDHE3_13 hybridisiert wurden.....	76
Abb. 4-18:	Sequenz der Ribonukleotid Reduktase aus <i>Euglena gracilis</i>	78
Abb. 4-19:	Aminosäuresequenz-Alignment der <i>Euglena</i> pEgRNR3-Translation mit der RNR Reduktase von <i>Lactobacillus leichmannii</i>	80
Abb. 4-20	Negativ-Darstellung der PCR-Amplifikate der vorwärts- und rückwärts subtrahierten experimentellen cDNAs und der unsubtrahierten Kontrollen nach dem 2. PCR-Zyklus.....	82
Abb. 4-21:	Hybridisierung der homologen PNO- und GapC-Sonde gegen die sekundären PCR-Produkte der vorwärts- und rückwärts subtrahierten Banken sowie der Kontrollen nicht-subtrahierter Banken	84
Abb. 4-22:	Schematische Darstellung der Auswahl von Kandidaten bei der subtraktiven Hybridisierung.....	85
Abb. 4-23:	Identifizierung von differentiell hybridisierenden Klonen durch Dot Blot Hybridisierung mit einzelsträngiger anaerober und aerober cDNA	88
Abb. 4-24:	Schematische Darstellung der Auswahl von Kandidaten bei der differentiellen, nicht subtraktiven Hybridisierung.	90
Abb. 4-25:	Identifizierung von differentiell hybridisierenden Klonen durch Dot Blot Hybridisierung mit einzelsträngiger anaerober und aerober cDNA als Sonde.....	93
Abb. 5-1:	Sequenzähnlichkeit und Domänen-Organisation unter PFO, CPR und verwandten Proteinen.	99
Abb. 5-2:	Mit ProtML konstruierte Protein-Phylogenien der PFO- und CPR-Domäne der PNO.	103
Abb. 5-3:	Alternative Erklärungsmöglichkeiten für den Ursprung eubakterieller Gene der anaeroben ATP-Synthese in Eukaryoten.....	107
Abb. 5-4:	Mit ProtML konstruierte Protein-Phylogenien für die einzelnen PDH-Untereinheiten.	119
Abb. 5-5:	Mit ClustalW konstruierte Neighbor Joining Phylogenie und mit ProtML konstruierte Protein-Phylogenien für die RNR Klasse II.	129

Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1:	Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten internen Sequenzierprimer, fluoreszenz-markierten Sequenzierprimer und Oligonukleotide	49
Tab. 4-1:	PCR Primer für die Amplifizierung der Gensonde für die <i>Euglena</i> PNO	50
Tab. 4-2:	Annotierung der Kandidaten _{plasmid} , die durch Hybridisierung mit der vorwärts subtrahierten Sonde AA- identifiziert wurden.....	86
Tab. 4-3:	Annotierung der Kandidaten _{plasmid} , die durch Hybridisierung mit der rückwärts subtrahierten Sonde A- identifiziert wurden.	87
Tab. 4-4:	Über Dot Blot Hybridisierung verifizierte Kandidaten _{positiv} der subtraktiven Hybridisierung, die differentiell exprimiert werden.....	89
Tab. 4-5:	Annotierung der Kandidaten _{plasmid} , die durch Hybridisierung mit anaerober einzelsträngiger cDNA als Sonde identifiziert wurden.....	91
Tab. 4-6:	Annotierung der Kandidaten _{plasmid} , die durch Hybridisierung mit der aeroben einzelsträngiger cDNA-Sonde identifiziert wurden.....	92
Tab. 4-7:	Über Dot Blot Hybridisierung verifizierte Kandidaten _{positiv-anaerob} , die differentiell exprimiert werden.....	94
Tab. 5-1:	N-Termini kernkodierter mitochondrialer Proteine aus Kinetoplastiden im Vergleich mit den N-Termini der <i>Euglena</i> PDH E1 α , E2 und E3.....	116

Abkürzungsverzeichnis

A (Aminosäure)	Alanin
A	Adenin
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäuren
B	Asparagin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
c	Konzentration [mg/ml]
C (Aminosäure)	Cystein
C	Cytosin
CPR	NADPH-Cytochrom P450 Reduktase
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
D	Asparaginsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotid
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
deion.	deionisiert
dest.	destilliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
F	Phenylalanin
FAD	Flavinadenindinukleotid (oxidierte Form)

FADH	Flavinadenindinukleotid (reduzierte Form)
FMN	Flavinmononukleotid (oxidierte Form)
G (Aminosäure)	Glycin
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
H	Histidin
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
I	Isoleucin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
K	Lysin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
L	Leucin
lx	Lux
M (Aminosäure)	Methionin
M	molar
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	2-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
N	Asparagin
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
OD	Optische Dichte
P	Prolin
PDH	Pyruvat Dehydrogenase
PEG	Polyethylenglykol
PFO	Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase
PNO	Pyruvat:NADP ⁺ Oxidoreduktase
PuSR	putative Sulfitreduktase
PVP	Polyvinylpyrrolidon

Q	Glutamin
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNR	Ribonukleotid Reduktase
RT	Raumtemperatur
S	Serin
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR α	alpha-Untereinheit der assimilatorischen Sulfitreduktase
T (Aminosäure)	Threonin
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TCA	Tricarbonsäure
Tris	Tri-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TPP	Thiaminpyrophosphat
U	Unit
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Tryptophan
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indol- β -D-Galactopyranosid
Y	Tyrosin

1 Zusammenfassung

Die Mehrzahl der Eukaryoten nutzt zur oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat in Mitochondrien den Pyruvat Dehydrogenase Multienzymkomplex (PDH). Eukaryoten, denen die Mitochondrien fehlen, besitzen keine PDH. Stattdessen verwenden sie das sauerstoffsensitive Enzym Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFO), welches entweder im Cytosol oder in Hydrogenosomen – Organellen der anaeroben ATP-Synthese in amitochondrialen Eukaryoten – lokalisiert ist. Die fakultativ anaeroben Mitochondrien des photosynthetischen Protisten *Euglena gracilis* stellen in dieser Hinsicht eine interessante Ausnahme dar. In diesen Organellen erfolgt die Oxidation von Pyruvat mittels eines sauerstoffempfindlichen Enzyms, der Pyruvat:NADP⁺ Oxidoreduktase (PNO).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unabhängige, vollständige cDNA-Klone für die *Euglena* mitochondriale PNO kloniert und molekular charakterisiert. Diese cDNAs mit einer Größe von 5,8 kb kodieren für ein mitochondriales Transitpeptid, gefolgt von einer N-terminalen PFO-Domäne, welche mit einer C-terminalen NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (CPR) Domäne fusioniert ist. Subdomänen dieser PFO-CPR Genfusion sind in den Genomen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* konserviert und kodieren dort für Proteine der Schwefelassimilation. Durch Northern Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale PNO von *Euglena* sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Anzuchtbedingungen exprimiert wird, die stärkste mRNA-Expression erfolgte jedoch bei anaerober Kultivierung im Dunkeln. Die Genorganisation und Phylogenie der PNO sprechen dafür, dass eukaryotische Kerngene für mitochondriale, hydrogenosomale und cytosolische PFO einen gemeinsamen eubakteriellen Ursprung besitzen.

Das systematische Durchsuchen einer *Euglena* EST-Datenbank ergab, dass *Euglena* jedoch nicht nur Homologe für PFO sondern auch für die Untereinheiten des PDH Multienzymkomplexes exprimiert. Durch Klonierung und Expressionsanalyse vollständiger cDNA-Klone für die E1 α -, E2- und E3-Untereinheiten der PDH konnte gezeigt werden, dass die PDH ebenfalls bei aerober und anaerober Kultivierung exprimiert wird, die stärkste Expression erfolgte jedoch unter anaeroben Kulturbedingungen im Licht. Somit liegt im *Euglena* Mitochondrium eine Ko-Expression von der PDH und der PNO vor, die Enzyme weisen jedoch in Abhängigkeit von der O₂-Konzentration reziproke Expressionsmuster auf. Genphylogenien für die Untereinheiten des mitochondrialen PDH-Komplexes von *Euglena* zeigten, dass diese Enzyme die größte Ähnlichkeit zu Homo-

logen aus α -Proteobakterien besitzen und dass *Euglena*, wie andere Eukaryoten, ihre PDH von dem mitochondrialen Endosymbionten akquiriert hat.

Euglena gracilis stellt damit bezüglich des mitochondrialen Energiestoffwechsels eine physiologische Zwischenform zwischen Mitochondrien und Hydrogenosomen dar und liefert Evidenz für die Abstammung dieser Organellen aus einem gemeinsamen Vorfahren. Die Koexistenz der PDH und PFO im *Euglena* Mitochondrium spricht weiterhin dafür, dass dieser Vorfahr eine fakultativ anaerobe Lebensweise besaß und Spuren der fakultativ anaeroben Lebensweise in einigen Mitochondrien erhalten geblieben sind. Ferner sind die PDH und die PFO sehr viel enger mit ihren eubakteriellen als mit ihren archaeobakteriellen Homologen verwandt und gehen aus einer einzigen eubakteriellen Akquisition hervor. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen damit direkt die wesentlichen Voraussagen der These, der zufolge Mitochondrien und Hydrogenosomen einen gemeinsamen Ursprung besitzen und von demselben, fakultativ anaeroben, α -proteobakteriellen Vorfahren abstammen.

Zur Identifizierung weiterer Enzyme des fakultativ anaeroben Energiestoffwechsels wurden die Methoden der subtraktiven und differentiellen Hybridisierung angewandt. Ein differentiell exprimierter Klon konnte identifiziert, welcher für die PNO kodiert. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die Enzyme des anaeroben Energiestoffwechsels in *Euglena* Mitochondrien bereits unter aeroben Bedingungen exprimiert werden.

Durch Klonierung und molekulare Charakterisierung einer cDNA für die *Euglena* Ribonukleotid Reduktase (RNR) konnte ferner gezeigt werden, dass *Euglena gracilis* nicht nur in Bezug auf seine mitochondriale ATP-Synthese, sondern auch in Hinblick auf die DNA-Replikation eine Anpassung an unterschiedliche O_2 -Konzentrationen in seiner Umwelt aufweist. Anders als alle bisher untersuchte Eukaryoten, welche eine O_2 -abhängige RNR besitzen, nutzt *Euglena* zur DNA-Replikation eine O_2 -unabhängige, Cobalamin-abhängige RNR. Die für die RNR kodierende vollständige cDNA besitzt eine Größe von 2,5 kb und zeigt in Genphylogenen die größte Sequenzidentität zu den Ribonukleotid Reduktasen aus Cyanobakterien. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die *Euglena* RNR im Zuge der Evolution durch endosymbiontischen Gentransfer von der *Euglena* Plastide in den Zellkern transferiert wurde und dort die ursprüngliche RNR der Wirtszelle dieser sekundären Endosymbiose funktionell ersetzt haben könnte.

2 Einleitung

2.1 Mitochondrien – Organellen des Energiestoffwechsels eukaryotischer Zellen

Mitochondrien sind die Orte der Atmung, des wichtigsten Energie liefernden Vorgangs aerober Eukaryoten, die keine Photosynthese betreiben. Der Mechanismus der Sauerstoff-verbrauchenden ATP-Synthese (oxidative Decarboxylierung von Pyruvat, Tricarbonsäure-Zyklus, Elektronentransportkette und oxidative Phosphorylierung) typischer Mitochondrien vieler Pilze, höherer Pflanzen und Tiere zeigt eine weitestgehend einheitliche Biochemie (Saraste 1999). Das in der Glykolyse aus der Oxidation von Glukose gebildete Pyruvat wird zunächst in die Mitochondrien importiert. Die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat erfolgt mittels des mitochondrialen Pyruvat Dehydrogenase Multienzymkomplexes (PDH) unter Bildung von CO_2 , Acetyl-CoA und NADH. Acetyl-CoA wird in den Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus) eingeschleust und in einem zyklischen Prozess zu zwei Molekülen CO_2 oxidiert, wobei weitere Reduktionsäquivalente in Form von NADH und FADH entstehen. Die Reduktionsäquivalente werden in die innere Membran der Elektronentransportkette eingespeist. Über eine Kette von mehreren Proteinkomplexen und einzelnen Komponenten mit zunehmend positivem Redoxpotential werden die Elektronen schließlich zumeist auf molekularen Sauerstoff als terminalem Endakzeptor übertragen. Der Sauerstoff wird dabei zu Wasser reduziert. An diesen exergonen Elektronentransport gekoppelt ist ein Transport von Protonen in den Intermembranraum. Der daraus resultierende Protonengradient ermöglicht unter Rückfluss von Protonen die Synthese von ATP aus ADP und P_i durch die membranständige ATPase. In diesen Mitochondrien führt ein Entzug von Sauerstoff zum Stillstand mitochondrialer ATP-Synthese, oftmals sogar zum Zelltod.

Die Funktion dieser Organellen beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Synthese von ATP. Mitochondrien übernehmen eine Vielzahl weiterer biosynthetischer Vorgänge wie die β -Oxidation von Fettsäuren und die Biosynthese von Ubichinon, Häm und Aminosäuren. Sie sind primärer Ort der Synthese von Fe-S Clustern und spielen damit eine zentrale Rolle in der Bildung von Fe-S-Proteinen (Lill und Kispal 2000, Seeber 2002). In Hefe-Mitochondrien scheint die Bildung von Fe-S Clustern möglicherweise sogar die einzige essentielle Funktion dieses Organells zu sein (Lill und Kispal 2000). Mitochondrien sind fernerhin direkt an regulatorischen Vorgängen der Zelle wie programmiertem Zelltod (Apoptose) und Alterungsprozessen beteiligt.

2.2 Der endosymbiontische Ursprung der Mitochondrien

Zur Entstehung der Mitochondrien aus einst frei lebenden Bakterien existiert eine Vielzahl endosymbiontischer Modelle, die zumeist den Ursprung dieser Organellen mit Sauerstoff in Verbindung bringen. Die Erkenntnis, dass die ATP-Synthese in aeroben Mitochondrien charakteristische Ähnlichkeiten zur ATP-Synthese in Sauerstoffatmenden α -Proteobakterien aufweist (John und Whatley 1975), war einer der Gründe für das Wiederaufleben bereits früher formulierter endosymbiontischer Theorien für die Entstehung dieser Organellen. Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde ein Ursprung der Mitochondrien aus frei lebenden Prokaryoten postuliert (Portier 1918, Wallins 1927), diese Symbiosetheorien fanden unter damaligen Biologen jedoch wenig Anklang (siehe z. Bsp. Wilson 1928, S. 712). In den 70-er Jahren wurden diese Ideen erneut aufgegriffen (Sagan 1967, de Duve 1969, Margulis 1970, Raven 1970, Stanier 1970, John und Whatley 1975) und erlangten schließlich aufgrund von Gensequenzanalysen weitgehende Anerkennung. Die Abstammung der Mitochondrien aus der Gruppe der Proteobakterien (ebenso wie die der Chloroplasten aus Cyanobakterien) ist durch die eubakterielle Organisation und Sequenzähnlichkeit von Organell-Genomen überzeugend belegt (Lang et al. 1997, Unseld et al. 1997, Andersson et al. 1998, Gray et al. 1998, Martin et al. 1998).

Die seit dieser Zeit vorherrschende Vorstellung ist, dass Mitochondrien sich aus einem aerob lebenden, Sauerstoff-atmenden Bakterium entwickelt haben, welches im Laufe der Evolution von einer mitochondrienlosen eukaryotischen Wirtszelle aufgenommen wurde (siehe u. a. Doolittle 1998, Martin et al. 2001). Solche Vorstellungen können anhand des Modells von John und Whatley (1975) erläutert werden. Dieses explizite Modell (vgl. Abb. 2-1) beschreibt den mitochondrialen Symbionten als aeroben, *Paracoccus*-ähnlichen Symbionten, der von einem mitochondrienlosen Proto-Eukaryoten aufgenommen wurde. Dieser war dem Modell zufolge möglicherweise ähnlich zur anaeroben, fermentierenden Riesen-Amöbe *Pelomyxa palustris*. Als Substrat für die Atmung nutzte der mitochondriale Endosymbiont das Endprodukt des fermentativen Stoffwechsels der Wirtszelle, Laktat. Durch Akquisition eines ADP/ATP Transporters profitierte die Wirtszelle wiederum von der ATP-Synthese durch ihren Symbionten (John und Whatley 1975). Damit bestand der unmittelbare Nutzen der Wirtszelle in der gesteigerten ATP-Synthese von 38 Mol ATP im Zuge der Atmung gegenüber

2 Mol ATP durch anaerobe Fermentationen. Insbesondere dieses Modell beherrschte nachfolgend die Vorstellungen der Evolutionsbiologen über den Ursprung der Mitochondrien.

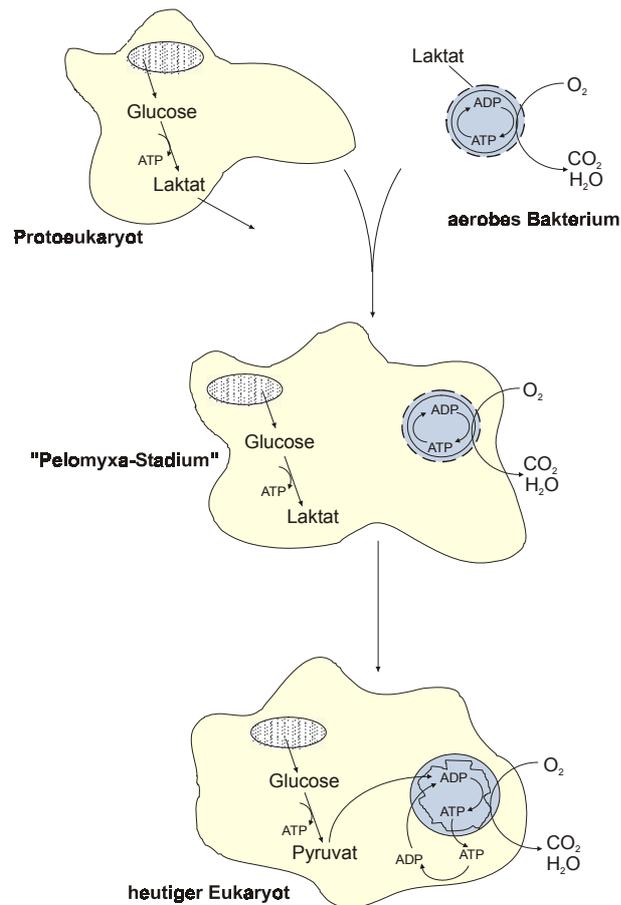


Abb. 2-1: Die klassische Version der Endosymbiontenhypothese für den Ursprung der Mitochondrien nach John und Whatley (1975).

Ein nahe liegender Grund, den Ursprung der Mitochondrien und die damit verbundene Evolution zu heutigen Eukaryoten direkt mit Sauerstoff in Verbindung zu bringen, ist die Tatsache, dass das Auftreten der ersten eukaryotischen Zellen vermutlich erst nach Akkumulation von Sauerstoff in der Atmosphäre erfolgte (Kasting 1993, Knoll 1994). Die Einlagerung von Eisenoxid in gebänderten Eisenformationen (BIF) in der Zeit vor 3,5 bis 2 Ga (Milliarden Jahre vor Gegenwart) wird weitestgehend als Evidenz für die biologische Produktion von molekularem Sauerstoff in den Ozeanen angesehen (Holland und Beukens 1990, Kasting 1993). Die Anreicherung von freiem Sauerstoff in der Atmosphäre und an der Oberfläche der Meere begann vor etwa 2 Ga. Früheste eukaryotische Fossile werden auf kurz nach dieser Zeit datiert. So genannte Architarche, einzellige und vermutlich eukaryotische Algen, werden auf etwa 1,5 Ga geschätzt (Javaux et al. 2001, Anbar und Knoll 2002). Der Ursprung der Mitochondrien liegt daher mindestens 1,5 Ga zurück, weil die ersten Algen bereits Mitochondrien besaßen

haben müssen. Das Auftreten bangiophytischer Rotalgen erfolgte vermutlich vor etwa 1,2 Ga (Butterfield et al. 1990, Butterfield 2000). Die tiefen Schichten der Ozeane jedoch, wo die Diversifizierung der Eukaryoten stattgefunden hat, blieben vermutlich sehr viel länger – zwischen 2,5 und 0,5 Ga – weiterhin anoxisch. Sie waren zudem mit extrem hohen Konzentrationen von H_2S belastet. Zu jener Zeit waren so die marinen Gewässer nicht nur anoxisch, sondern auch sulfidisch (Anbar und Knoll 2002). Damit war ein Großteil der vorhandenen Lebensräume zur Zeit der Entstehung der ersten Eukaryoten noch immer frei von Sauerstoff. Eines der wichtigsten Leitmotive der Literatur zur endosymbiontischen Abstammung der Mitochondrien ist damit die keineswegs bewiesene Annahme, dass der Ursprung der Mitochondrien (und die Evolution der Eukaryoten) unmittelbar mit Sauerstoff verbunden ist (Doolittle 1998, Martin und Müller 1998, Rotte et al. 2000).

2.3 Die Diversität anaerober ATP-Synthesewege in heutigen Eukaryoten

2.3.1 Anaerobe Formen der Mitochondrien – ATP-Synthese ohne Sauerstoff

Jedoch sind nicht alle Mitochondrien in ihrer Funktion strikt sauerstoffabhängig. Es gibt eine Reihe von Mitochondrien, bei denen die ATP-Synthese ohne Nutzung von Sauerstoff als terminalem Endakzeptor erfolgt (Tielens et al. 2002). Anaerobe Mitochondrien wurden sowohl für einzellige Protisten (Finlay et al. 1983, Inui et al. 1984a, Kobayashi et al. 1996, Rotte et al. 2001, Tielens et al. 2002) als auch für mehrzellige Organismen wie parasitische Würmer (Platyhelminthen) (Tielens 1994, Komuniecki und Harris 1995), Nematoden (Kita 1992) und Muscheln (Doeller et al. 2001) beschrieben. Die anaeroben Mitochondrien synthetisieren ATP mittels einer Protonen pumpenden Elektronentransportkette. Mit Hilfe alternativer terminaler Oxidasen nutzen sie jedoch andere Elektronenendakzeptoren. Je nach Verwendbarkeit des Elektronenakzeptors können anaerobe Mitochondrien vereinfacht in zwei Typen eingeteilt werden: solche, die externe Elektronenakzeptoren wie Nitrit verwenden und solche, die endogen erzeugte organische Elektronenakzeptoren wie Fumarat nutzen.

Verschiedene Ciliaten wie *Fusarium oxysporum* und *Cylindrocarpon tonkinense* besitzen Mitochondrien des ersten Typs. Sie verwenden Nitrat oder Nitrit als Elektronenendakzeptor ihrer membran-assoziierten Elektronentransportkette (Kobayashi et al. 1996, Takaya et al. 1999), als reduzierte Endprodukte entstehen Stickstoffoxide. Diese Mitochondrien besitzen eine Nitrit Reduktase, die Nitrit mit Hilfe von Elektronen aus dem Cytochrom *c* Pool zu Stickstoffmonoxid reduziert. Einige besitzen zusätzlich eine Nitrat Reduktase, welche Nitrat unter Bildung von Nitrit reduziert. Die für diese Reaktion be-

nötigten Elektronen entstammen dem Ubichinon-Pool (Zumft 1997). Mitochondrien des zweiten Typs kommen bei einigen parasitischen Würmern (Helminthen) wie *Fasciola hepatica* oder *Ascaris suum* vor. In diesen Mitochondrien dient Fumarat als Elektronenendakzeptor der anaeroben Elektronentransportkette (Tielens und Van Hellemond 1998, Tielens et al. 2002). Die adulten Stadien der meisten Helminthen schalten unter anaeroben Bedingungen auf einen Stoffwechselweg um, der als Malat-Dismutation bezeichnet wird. Das in der Glykolyse gebildete Phosphoenolpyruvat wird über Oxalacetat zu Malat reduziert und in die Mitochondrien importiert. Dort wird unter Erhalt des Redox-Gleichgewichts ein Teil des Malats unter Substratkettenphosphorylierung zu Acetat oxidiert. Der andere Teil des Malats wird zu Succinat, und manchmal weiter bis zur Stufe des Propionats reduziert (Tielens 1994, Tielens et al. 2002). Die Reduktion von Malat zu Succinat entspricht formal einer Umkehr dieser Schritte im TCA-Zyklus. Die Reduktion des Fumarats durch das Enzym Fumarat Reduktase ist der eigentliche, NADH verbrauchende Schritt und direkt mit Elektronentransport und ATP-Synthese gekoppelt. Anders als die Succinat Dehydrogenase im TCA-Zyklus dient bei der Fumarat Reduktase nicht Ubichinon sondern Rhodochinon als Elektronencarrier. Anaerobe Mitochondrien des Ciliaten *Nyctotherus ovalis* können mit Hilfe einer Hydrogenase direkt Protonen als Elektronenendakzeptor nutzen, wobei molekularer Wasserstoff als Endprodukt des mitochondrialen Energiestoffwechsels entsteht (Akhmanova et al. 1998; Embley und Martin 1998).

Trotz der biochemischen Diversität anaerober Mitochondrien haben die oben beschriebenen Typen mit den aeroben Formen gemeinsam, dass die für die ATP-Synthese herangezogenen Elektronen aus organischen Verbindungen stammen. Es gibt jedoch in einigen aquatischen Invertebraten wie beispielsweise der Muschel *Geukensia demissa* und dem Wattwurm *Arenicola marina* eine interessante Ausnahme. Hier erfolgt die mitochondriale ATP-Synthese mittels Chemolithoheterotrophie, d. h. diese Mitochondrien gewinnen ihr ATP durch Redox-Reaktionen, die mit anorganischen Elektronendonatoren verbunden sind (Doeller et al. 2001). Diese Invertebraten leben in sauerstoffarmen, sulfidreichen Sedimenten (Völkel und Grieshaber 1996, Grieshaber und Völkel 1998). Die Mitochondrien dieser Organismen atmen, wenn Sauerstoff zur Verfügung steht und wechseln unter hypoxischen Bedingungen oder hohen Sulfidkonzentrationen (welche die Cytochrom *c* Oxidase hemmen) zur Fumarat-Atmung (Doeller et al. 2001). Bemerkenswerterweise ist die mitochondriale Atmung in diesen Organismen – unabhängig davon ob sie mit Hilfe von Sauerstoff oder Fumarat erfolgt – mit der Oxidation von Sulfid verbunden. Sulfid dient als anorganischer Elektronendonator für den respiratorischen Elektronentransport und die damit gekoppelte ATP-Synthese, dabei wird Sulfid zu Thiosulfat oxidiert (Doeller et al. 1999, Doeller et al. 2001).

Mit wenigen Ausnahmen (Martin und Müller 1998, Vellai et al. 1998) erklären klassische Versionen der Endosymbiontentheorie nur den Ursprung der ATP-Synthese in aeroben Mitochondrien (John und Whatley 1975, Whatley et al. 1979, Doolittle 1980, Gray und Doolittle 1982, Blackstone 1995, Andersson et al. 1998, Gray 1998, Andersson und Kurland 1999). Der Ursprung der anaeroben Formen ließ sich nicht in die vorherrschende Vorstellung einpassen, dass Mitochondrien von einem strikt aerob lebenden Bakterium abstammen. Ebenso können diese Modelle der Endosymbiontenhypothese nur schwer erklären, woher die große Diversität anaerober Stoffwechselwege der ATP-Synthese in heutigen Protisten stammt (Müller 1988, 1993). Anaerobe Mitochondrien stellen jedoch nur eine Möglichkeit dar, ATP mit Hilfe alternativer Elektronenendakzeptoren zu synthetisieren und den Energiebedarf der Zelle auch ohne Sauerstoff zu decken. Es gibt eine Vielzahl heute lebender Eukaryoten, denen die Mitochondrien gänzlich fehlen (Fenchel und Finlay 1995), die aber dennoch zur anaeroben ATP-Synthese befähigt sind.

2.3.2 Anaerobe ATP-Synthese in Eukaryoten, die keine Mitochondrien besitzen

Einige Gruppen einzelliger Eukaryoten decken ihren ATP-Bedarf vollständig über anaerobe Fermentationen, sie besitzen entweder gar kein ATP-produzierendes Organell oder aber Hydrogenosomen – spezielle Organellen der anaeroben ATP-Synthese (Lindmark und Müller 1973, Müller 1993). Diese amitochondrialen Protisten sind obligate oder aerotolerante Anaerobier und leben in Habitaten wie anoxischen Sedimenten, Schlamm oder im Pansen und Intestinaltrakt höherer Organismen. Sie umfassen sowohl parasitische und als auch nicht-parasitische Formen. Als gemeinsames Merkmal ihres Stoffwechsels erfolgt die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat nicht wie in Mitochondrien durch den Pyruvat Dehydrogenase (PDH) Multienzymkomplex, sondern mittels eines sauerstoffempfindlichen Enzyms: der Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFO) (Hrady und Müller 1995, Müller 1998). Bezüglich ihres kompartimentierten Energiestoffwechsels und ihrer weiteren Verstoffwechslung von Pyruvat können sie in zwei Grundtypen eingeteilt werden. Diese werden in der Literatur als Typ I und Typ II Eukaryoten bezeichnet (Müller 1988, 1996, 1998, Martin und Müller 1998) (siehe Abb. 2-2).

Typ I Protisten wie *Giardia lamblia* besitzen keine Organellen der ATP-Synthese. Die Enzyme ihrer Fermentationen sind vollständig im Cytosol lokalisiert. Die im Zuge der PFO-katalysierten Reaktion freiwerdenden Elektronen werden zunächst auf Ferredoxin, und schließlich unter Bildung von Ethanol, auf Acetyl-CoA übertragen (vgl. Abb. 2-2) (Müller 1998). Amitochondriale Protisten des Typs II wie *Trichomonas vaginalis* besitzen Hydrogenosomen.

ohne Mitochondrien, anaerob

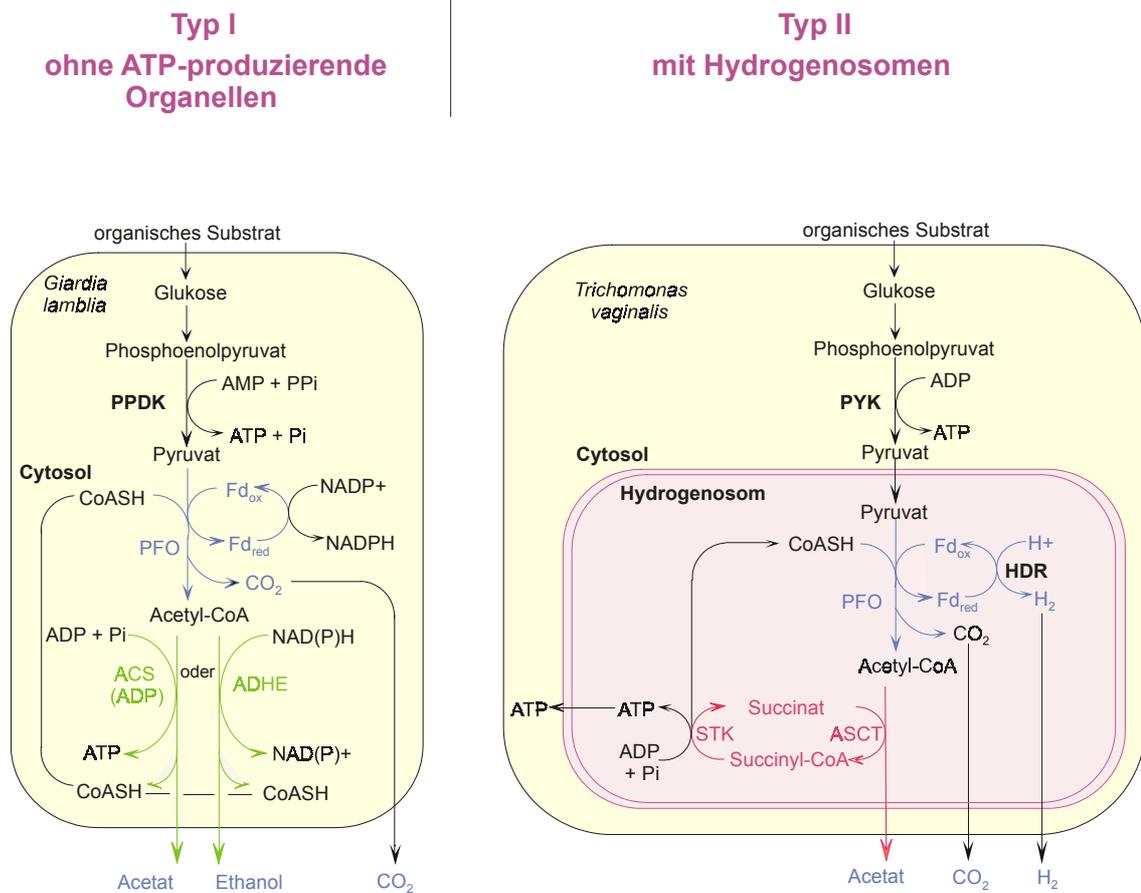


Abb. 2-2: Energiestoffwechsel in amitochondrialen Protisten (verändert nach Martin et al. 2001). Abkürzungen: PPDK, Pyruvat:Pyrophosphat Dikinase; PFO, Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase; ACS, Acetyl-CoA Synthase; ADHE, bifunktionale Aldehyd Reduktase/Alkohol Dehydrogenase; PYK, Pyruvat Kinase; STK, Succinat Thiokinase (auch Succinyl-CoA Synthase); ASCT, Acetat:Succinat CoA Transferase; HDR, Hydrogenase.

Wie Mitochondrien sind Hydrogenosomen von zwei Membranen umgeben (Benchimol und Souza 1983, Benchimol et al. 1996), importieren Pyruvat und synthetisieren ATP, das sie ins Cytosol exportieren. Im Gegensatz zu Mitochondrien gewinnen Hydrogenosomen das ATP ohne TCA-Zyklus und Atmungskette, sondern mittels Substratkettensphosphorylierung (vgl. Abb. 2-2). Wie in Typ I Protisten erfolgt der oxidative Abbau von Pyruvat mittels PFO, allerdings ist die PFO hier kein cytosolisches Enzym, sondern in den Hydrogenosomen lokalisiert. Die Biochemie der ATP-Synthese in Hydrogenosomen umfasst nur wenige Schritte (siehe Abb. 2-2). Das aus dem Cytosol importierte Pyruvat wird mittels PFO oxidativ decarboxyliert. Wie bei der Pyruvat Dehydrogenase wird bei dieser Reaktion CO_2 abgespalten und Acetyl-CoA aus dem als Cosubstrat benötigten CoA-SH gebildet. Das Elektronen-Paar wird auf Ferredoxin

übertragen. Die Elektronen werden mittels [Fe]Hydrogenase unter Bildung von Wasserstoff auf Protonen übertragen. Die Regeneration des CoA-SH erfolgt durch den nur zwei Enzyme umfassenden Acetat:Succinat CoA Transferase/Succinat Thiokinase Zyklus. Die Acetat:Succinat CoA-Transferase (ASCT) überträgt die CoA-Moietät auf Succinat. Dabei entstehen Succinyl-CoA und Acetat, letzteres wird als Endprodukt ausgeschieden. Das Succinyl-CoA wird durch die Succinat-Thiokinase (STK, auch Succinyl-CoA-Synthase genannt) gespalten, Succinat und CoA-SH werden dabei regeneriert. Die freie Enthalpie der energiereichen Thioesterbindung des Succinyl-CoA ist ausreichend, um bei dieser Spaltung auf Ebene der Substratkettenphosphorylierung aus ADP und Phosphat ATP zu bilden. Pro Mol Pyruvat wird ein Mol ATP gewonnen und je ein Mol H₂, CO₂ und Acetat als Endprodukt gebildet.

Weder Typ I noch Typ II Eukaryoten repräsentieren natürliche taxonomische Gruppen (Biagini, Finlay und Lloyd 1997, Embley und Hirt 1998, Müller 1998, Roger 1999). Typ I Eukaryoten finden sich unter Vertretern der Diplomonaden (Roger et al. 1998), Amöben (Tovar, Fischer und Clark 1999) und Mikrosporidien (Hirt et al. 1999). Eukaryoten des Typs II sind in so unterschiedlichen eukaryotischen Abstammungsgemeinschaften wie Trichomonaden (Pathogene des Urogenitaltraktes) (Müller 1993), Ciliaten (sowohl Darmbewohner als auch frei lebende Formen) (Embley et al. 1995), Pilzen (Chytridiomyceten) (Hackstein et al. 1999) und Amöboflagellaten (Müller 1993, Hackstein et al. 1998) vertreten. Der Ursprung der Diversität anaerober Stoffwechselwege in heutigen Eukaryoten wurde, sofern er überhaupt Berücksichtigung fand, bisher vereinfachend auf die generelle Formel "horizontaler Gentransfer aus anaeroben Bakterien" reduziert. Auch wird die anaerobe ATP-Synthese in Hydrogenosomen in einigen Modellen (siehe z. Bsp. Andersson und Kurland 1999) bis heute als Ergebnis unabhängiger lateraler Genakquisitionen von verschiedenen prokaryotischen Donatoren angesehen, eine Vorstellung, die sich jedoch aufgrund neuer Befunde im Wandel befindet.

2.4 Hydrogenosomen – eine weitere Form anaerober Mitochondrien?

Nach heutiger Ansicht sind Hydrogenosomen, analog zu Mitochondrien, endosymbiontischen Ursprungs und es gibt gute Belege dafür, dass beide Organellen aus ein und demselben Symbionten hervorgegangen sind. Die Evidenz, welche diese Aussicht stützt, wird in diesem Abschnitt kurz zusammengefasst. Die meisten Hydrogenosomen enthalten kein Genom, welches Aufschluss über die Abstammung dieses Organells geben könnte (Clemens und Johnson 2000). Doch mit fortschreitender biochemischer Analyse der Hydrogenosomen von Vertretern verschiedener Gruppen sowie mit der Verfügbarkeit molekularer Sequenzen ihrer Proteine zeichnen sich die Ähnlichkeiten

und Gemeinsamkeiten von Hydrogenosomen und Mitochondrien immer deutlicher ab. Dazu zählen:

- die grundsätzlich identische Funktion im Energiestoffwechsel (ATP-Synthese aus Pyruvat),
- das Vorkommen von funktions- und sequenzhomologen Enzymen wie Adenylat-Kinase, Succinat-Thiokinase, Acetat:Succinat CoA Transferase (Steinbüchel und Müller 1986, van Hellemond et al. 1998), Malat Enzym (Hrady und Müller 1995, van der Giezen et al. 1997) und Ferredoxin (Steinbüchel und Müller 1986, Müller 1993) in beiden Organellen,
- die alkalische Matrix und das Membranpotential (Humphreys et al. 1994, Biagini et al. 1997),
- Mitochondrien-homologe Hitzeschockproteine (Bui et al. 1996, Germot et al. 1996, Horner et al. 1996, Roger et al. 1996) in Hydrogenosomen und
- die Konservierung des Protein-Imports (Johnson et al. 1993, Dyall et al. 2000, van der Giezen et al. 2002, Voncken et al. 2002)

Obwohl hydrogenosomale Transitpeptide in der Regel kürzer sind als mitochondriale Importsequenzen, ermöglichen sie den korrekten Import von Proteinen in Mitochondrien von Kinetoplastiden und Hefe (Häusler et al. 1997, van der Giezen et al. 1997). Die Entdeckung eines Relikt-Genoms in den Hydrogenosomen des Ciliaten *Nyctotherus ovalis* enthüllte ferner einen gemeinsamen Ursprung dieses Organells mit Mitochondrien (Akhmanova et al. 1998, van Hoek et al. 2000). Diese Ergebnisse erhärten die bereits früher geäußerte Hypothese (Johnson et al. 1993), dass Mitochondrien und Hydrogenosomen anaerobe bzw. aerobe Spezialisierungen ein und desselben Organells darstellen und Hydrogenosomen in der Tat anaerobe Formen von Mitochondrien repräsentieren (Embley et al. 1995, 1997; Doolittle 1996, Müller 1997, Akhmanova et al. 1998, Embley und Hirt 1998, Embley und Martin 1998, Roger 1999, Rotte et al. 2000, 2001; van der Giezen et al. 2002, Voncken et al. 2002).

Den Gemeinsamkeiten von Hydrogenosomen und Mitochondrien, aber auch der Biochemie der anaeroben ATP-Synthese Rechnung tragend, ist eine Hypothese zum Ursprung dieser Organellen die Vorstellung, dass ihr gemeinsamer Vorfahr ein fakultativ anaerobes Proteobakterium war. Dieses konnte seinen ATP-Bedarf sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen decken. Unter heutigen α -Proteobakterien sind zahlreiche Vertreter bekannt, die tatsächlich fakultativ anaerob leben (z. B. *Rhodobacter*, *Paracoccus*) und unter anaeroben Bedingungen molekularen Wasserstoff als Endprodukt des Stoffwechsels bilden. Demnach wären die Enzyme der fakultativ anaeroben Lebensweise des symbiontischen Bakteriums in den aeroben Stoffwechsel-

wegen der Mitochondrien, aber auch im anaeroben Stoffwechsel der Hydrogenosomen manifestiert (Martin und Müller 1998). Dieses als Wasserstoffhypothese (Martin und Müller 1998) bezeichnete Modell unterscheidet sich in wichtigen Punkten von der klassischen Endosymbiontenhypothese und wird daher als Alternative dazu angesehen (Doolittle 1998, Gray 1999). Zwei in diesem Zusammenhang wichtige Unterschiede zu klassischen Formulierungen der Endosymbiontentheorie sind, dass (i) der Symbiont ein fakultativ anaerobes Eubakterium war und dass (ii) die primäre Triebkraft der Symbiose nicht im Sauerstoff und gesteigerter ATP-Synthese, sondern im Wasserstoff bestand (Martin und Müller 1998). Eine der prüfbaren Voraussagen der Wasserstoffhypothese ist, dass es Zwischenformen von Mitochondrien geben könnte, welche den fakultativ anaeroben Energiestoffwechsel des gemeinsamen Vorfahrens der Hydrogenosomen und Mitochondrien beibehalten haben. Die Charakterisierung fakultativ anaerober Mitochondrien in rezenten Eukaryoten könnte daher wichtige Aufschlüsse über die Entstehung der Mitochondrien (und Hydrogenosomen) gewähren und somit wertvolle Erkenntnisse zur Frühgeschichte eukaryotischer Zellen und ihres Stoffwechsels liefern. Dem heutigen Kenntnisstand zufolge ist einer der erfolgversprechendsten Organismen bei der Suche nach fakultativ anaeroben Mitochondrien ein photosynthetischer Protist aus der Gruppe der Eugleniden, *Euglena gracilis*.

2.5 Das fakultativ anaerobe Mitochondrium von *Euglena gracilis*

In stammesgeschichtlicher und systematischer Hinsicht bilden die Eugleniden eine heterogene Gruppe von Einzellern, die phototrophe, phagotrophe und osmotrophe Vertreter umfasst. Mit dem Maß der Sequenzähnlichkeit ihrer ribosomalen RNA (sowie anderer Gene) aber auch mit dem Maß ihrer morphologischen Eigenschaften sind die Eugleniden mit der Gruppe der Trypanosomatiden (zu denen *Trypanosoma*, *Leishmania* und andere Humanpathogene zählen) eng verwandt (Vickermann 1990, Henze et al. 1995, Yasuhira und Simpson 1997). Die Trypanosomatiden und Eugleniden werden als Abstammungsgemeinschaft angesehen und unter dem Begriff Euglenozoa (auch Euglenophyta) zusammengefasst.

Es ist seit längerem bekannt, dass zumindest einige Arten von *Euglena* zur Adaptation an einen weiten Bereich unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen befähigt sind und sehr geringe Sauerstoffkonzentrationen tolerieren können (Buetow 1989). Für *Euglena deses* wurde ein Überleben unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln bis zu 30 Tagen bei 5°C oder weniger berichtet (Buetow 1989). *Euglena gracilis* Z kann bei Wachstum auf Laktat bis zu sechs Monaten unter Anaerobiose im Dunkeln überleben (Carre et al. 1988). Die Mitochondrien von *Euglena gracilis* Z sind an der ATP-Synthese unter anaeroben Bedingungen wesentlich beteiligt (Inui et al. 1982, 1983, 1984a; Buetow 1989).

Unter aeroben Bedingungen sind *Euglena* Mitochondrien zur normalen Atmung befähigt (Buetow 1989). Unter Anaerobiose erfolgt die Umstellung des Energiestoffwechsels auf Fermentation unter Bildung von Wachsen. Diese für Eukaryoten äußerst ungewöhnliche Wachsesterfermentation wurde in ihren Grundzügen biochemisch beschrieben (Inui et al. 1982, 1983, 1984a; Schneider und Betz 1985), ist jedoch bisher nicht im Detail verstanden (vgl. Abb. 2-3).

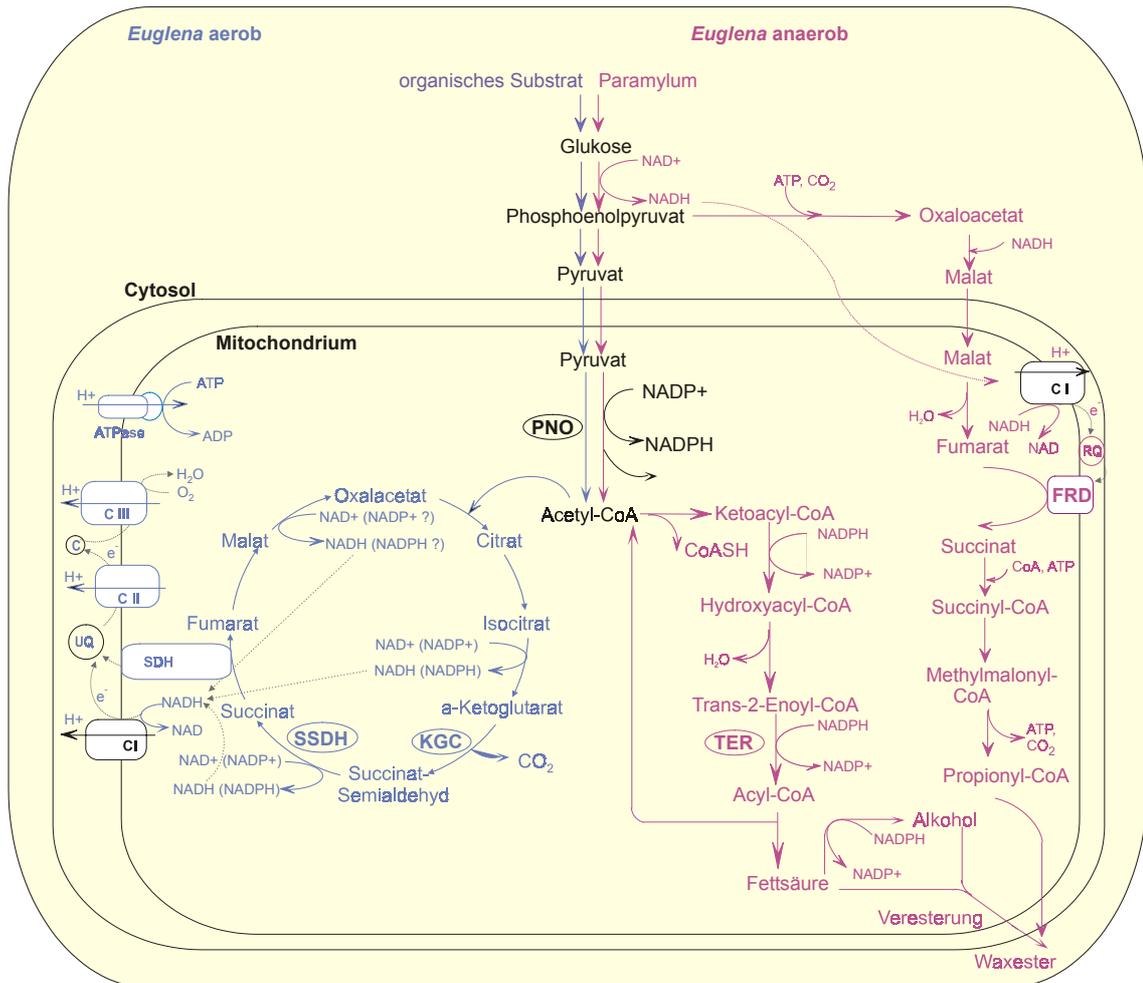


Abb. 2-3: Aerobere und anaerobe Energiestoffwechsel in den Mitochondrien von *Euglena gracilis*, zusammengefasst aus verschiedenen Quellen (Schneider und Betz 1985, Pönsen-Schmidt et al. 1988, Buetow 1989, Kitaoka et al. 1989, Tielens et al. 2002). Transport von Elektronen ist durch gestrichelte Linien gekennzeichnet, Enzymnamen sind eingekreist. Abkürzungen: C, Cytochrom c; C I, Komplex I der Atmungskette, C II, Komplex II der Atmungskette; C III, Komplex III der Atmungskette; PNO, Pyruvat:NADP⁺ Oxidoreduktase; SDH, Succinat Dehydrogenase; SSDH, Succinat Semialdehyd Dehydrogenase; KGC, α-Ketoglutarat Decarboxylase; TER, Trans-2-Enoyl-CoA Reduktase; FRD, Fumarat Reduktase; UQ, Ubichinon, RQ, Rhodochinon.

Bis zur Stufe des Pyruvats stimmen aerober und anaerober Energiestoffwechsel überein. Kohlenhydrate – im Fall der anaeroben Wachsesterfermentation stammen sie aus dem Reservekohlenhydrat Paramylum (β -1,3-Glukan) – werden zunächst in die Glykolyse eingeschleust und bis zur Stufe des Pyruvats abgebaut. Dieses wird in die Mitochondrien importiert. Während jedoch in klassischen Mitochondrien die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat mit Hilfe des PDH Multienzymkomplexes erfolgt, nutzt *Euglena* zur Oxidation von Pyruvat ein ungewöhnliches sauerstoffempfindliches Enzym, die Pyruvat:NADP⁺ Oxidoreduktase (PNO) (Inui et al. 1985, 1987; Buetow 1989).

2.5.1 Aerober Energiestoffwechsel in den Mitochondrien von *Euglena gracilis*

Unter aeroben Bedingungen erfolgt in den Mitochondrien von *Euglena* die ATP-Synthese durch Atmung unter Verwendung von Sauerstoff als terminalem Endakzeptor (vgl. Abb. 2-3). Das durch oxidative Decarboxylierung von Pyruvat gebildete Acetyl-CoA tritt in einen modifizierten TCA-Zyklus ein, in dem Succinat Semialdehyd anstelle von Succinyl-CoA als Intermediärprodukt gebildet wird (Shigeoka et al. 1980, Buetow 1989). Die Oxidation von α -Ketoglutarat zu Succinat erfolgt hier mit Hilfe einer Thiaminpyrophosphat-abhängigen α -Ketoglutarat-Decarboxylase (α -KGDC) und einer nachgeschalteten Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase (SSDH) (siehe Abb. 2-3). Interessanterweise ist der TCA-Zyklus des α -Proteobakteriums, *Bradyrhizobium japonicum* (Green et al. 2000), in gleicher Weise modifiziert. Hier bildet der Weg über Succinat Semialdehyd eine zusätzliche funktionale Alternative zum regulären TCA-Zyklus (Green et al. 2000). Die mitochondriale Atmungskette über die Cytochrom *c* Oxidase in *Euglena* scheint ähnlich zur Atmungskette höherer Pflanzen und Tiere zu sein (Buetow 1989).

2.5.2 Anaerober Energiestoffwechsel in den Mitochondrien von *Euglena gracilis*: die Wachsesterfermentation

Bei der unter Anaerobiose im Dunkeln ablaufenden Wachsesterfermentation in den Mitochondrien von *Euglena* (siehe Abb. 2-3) wird das aus der Oxidation von Paramylum stammende Pyruvat mittels der PNO – dem Schlüsselenzym dieses Stoffwechselweges – oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert. Im Gegensatz zu den Hydrogenosomen, wo der Acetyl-Rest des Acetyl-CoA als Acetat ausgeschieden wird, wird das Acetyl-CoA unter anaeroben Bedingungen in den Mitochondrien von *Euglena* direkt zur Fettsäuresynthese herangezogen (Inui et al. 1982, Inui et al. 1984, Buetow 1989) (vgl. Abb. 2-3). Es dient sowohl als Primer und C2-Donator für die Synthese von Fettsäuren, am häufigsten werden C14-Fettsäuren gebildet. Die dabei entstehenden Fettsäuren dienen somit letztendlich als Elektronenendakzeptoren der Fermentation, da sie die

Regeneration von NADP^+ ermöglichen. Die so gebildeten Fettsäuren werden vermutlich mit Hilfe einer Carnitin Acyltransferase ins Cytosol transferiert, wo die Hälfte der Fettsäuren bis zur Stufe des Alkohols reduziert wird. Die reduzierten Fettsäuren werden mit der anderen Hälfte der Fettsäuren in den Mikrosomen unter Bildung von Wachsestern verestert (Inui et al. 1984a). Diese Wachsester bestehen vor allem aus Fettsäuren und Alkoholen mit einer Länge zwischen 10 und 17 Kohlenstoffatomen, am häufigsten sind Myristylsäure und Myristylalkohol mit einer Kettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen vertreten (Inui et al. 1983). Die Wachsester werden schließlich parakristallin im Cytosol abgelagert, ohne das osmotische Gleichgewicht der Zelle zu beeinträchtigen (Buetow 1989). Durch die Degradation von Paramylum entstehen so pro Mol Glucose je nach Beteiligung der Paramylum-degradierenden Enzyme, β -1,3-Glukanase und β -1,3-Glukan Phosphorylase, 2-3 Mol ATP und 4 Mol NADH (Inui et al. 1982). Bei Rückkehr zu aeroben Bedingungen erfolgt die β -Oxidation dieser Wachse unter Sauerstoffverbrauchender ATP-Synthese.

Formal entspricht die Wachsesterfermentation einer Umkehr der β -Oxidation mit der Ausnahme, dass die Trans-2-Enoyl-CoA Reduktase (EC 1.3.1.44) die Acyl-CoA Dehydrogenase ersetzt (s. Abb. 2-3). Unter anaeroben Bedingungen (unter 10^{-5} M O_2) ist die Synthese von Fettsäuren durch das mitochondriale Fettsäuresystem mit Pyruvat als Substrat etwa 30-mal höher als mit Acetyl-CoA (Inui et al. 1985). Die Aktivität des Fettsäuresystems ist ebenfalls um etwa den Faktor sechs erhöht, wenn ein künstliches Acetyl-CoA generierendes System vorhanden ist (Buetow 1989). Offensichtlich ist ein Kontrollfaktor für die Aktivität dieses Fettsäuresystems das Verhältnis von Acetyl-CoA zu CoA. Unter aeroben Bedingungen werden in den Mitochondrien von *Euglena* keine Fettsäuren aus Pyruvat synthetisiert (Inui et al. 1985). Hervorzuheben ist, dass die Synthese von Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen in *Euglena gracilis* ausschließlich aus Succinat und Propionat über den Methylmalonyl-CoA Weg (Nagai et al. 1971, Schneider und Betz 1985, Pönsgen-Schmidt et al. 1988) mit Hilfe einer Fumarat Reduktase und unter Verwendung von Rhodochinon als Elektronencarrier (Tielens et al. 2002) erfolgt (siehe Abb. 2-3).

Die Wachsesterfermentation bildet sowohl im Vergleich mit anderen Fettsäuresynthesewegen als auch im Vergleich mit typischen anaeroben Fermentationen eine Ausnahme. Sie ist Malonyl-CoA unabhängig und erfordert keinen Transfer der Acetyl-Einheit aus den Mitochondrien zu einem anderen Ort der Zelle. Damit wird in der Wachsesterfermentation kein zusätzliches ATP benötigt, das in der Glykolyse gebildete Netto-ATP bleibt erhalten (Inui et al. 1984). Fernerhin werden in klassischen Fermentationen typische Endprodukte wie Ethanol oder Acetat schließlich aus der Zelle exportiert und damit dem Stoffwechsel entzogen. Im Gegensatz dazu werden in *Euglena* die

Wachsester als nahezu unlösliche Endprodukte der Fermentation im Cytosol gespeichert und dienen bei Rückkehr zu aeroben Bedingungen als Kohlenstoff- und Energiequelle.

2.5.3 Das Schlüsselenzym der Wachsesterfermentation: Die mitochondriale Pyruvat:NADP⁺ Oxidoreduktase

Als Schlüsselenzym der Wachsesterfermentation katalysiert die Pyruvat:NADP⁺ Oxidoreduktase (PNO, EC 1.2.1.51) (Inui et al. 1984b) die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA gemäß der Reaktionsgleichung:



Diese Enzymreaktion ist reversibel, in der umgekehrten Reaktion wird durch reduktive Carboxylierung von Acetyl-CoA unter Verwendung von NADPH als Elektronendonator Pyruvat gebildet. Ferner katalysiert die PNO, wie die PFO, einen Austausch zwischen der Carboxylgruppe des Pyruvats und externem ¹⁴CO₂ unter Bildung von [¹⁴C]Pyruvat (Inui et al. 1990). Die PNO kann darüber hinaus Elektronen von NADPH auf andere Elektronenakzeptoren übertragen (Diaphorase-Aktivität) (Inui et al. 1991). Die PNO zeigt hohe Aktivität mit NADP⁺, nicht jedoch mit NAD⁺. Dieses Enzym benötigt ferner die Cofaktoren FAD, FMN und Thiaminpyrophosphat (Inui et al. 1987). Als Elektronen-akzeptoren können daneben Viologenfarbstoffe wie Methylviologen und Benzylviologen fungieren. Ferredoxine aus Spinat oder *Clostridium* dagegen sind inaktiv (Inui et al. 1987). PNO zeigt die höchste Aktivität mit Pyruvat als Substrat, mit geringerer Enzymaktivität werden jedoch auch 2-Oxobutyrat, 3-Hydroxypyruvat und Oxaloacetat umgesetzt.

Die *Euglena* PNO ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 309 kDa. Proteolyse-Experimente mit Trypsin zeigten, dass dieses Enzym aus zwei funktionalen Domänen besteht. Eine Domäne enthält Thiaminpyrophosphat und 3 [4Fe-4S] Cluster und kann nach Proteolyse mit Trypsin als Homodimer von 220 kDa isoliert werden. Die andere Domäne enthält 1 Mol FAD und wird als Monomer mit einem Molekulargewicht von 55 kDa freigesetzt (Inui et al. 1987). Die beiden Domänen sind kovalent über die trypsinsensitive Region verbunden (Inui et al. 1987). Als besonderes Merkmal zeichnet sich die PNO durch eine hohe Sauerstoffempfindlichkeit aus, sie wird wie die hydrogenosomale PFO durch direkten Kontakt mit Sauerstoff inaktiviert (Inui et al. 1990, 1991). Neben der Sauerstoffempfindlichkeit stimmen PNO und PFO auch in wichtigen anderen Eigenschaften überein. Dazu zählen (i) die Verwendung von FAD und Viologenfarbstoffen als Elektronenakzeptoren, (ii) der katalysierte Pyruvat-CO₂

Austausch und (iii) die Katalyse der reversen Reaktion unter Bildung von Pyruvat (Inui et al. 1987, 1991).

Die ähnliche Biochemie beider Enzyme deutet auf eine enge Verwandtschaft der PNO mit der sonst für Hydrogenosomen charakteristischen Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFO) hin. Die PNO ist damit das einzige bisher bekannte Beispiel eines möglichen PFO-homologen Enzyms, welches in Mitochondrien nachgewiesen werden konnte. Von besonderer Bedeutung im Rahmen dieses Vorhabens ist die Frage, ob die PNO von *Euglena* gemäß ihrer Sequenzähnlichkeit ebenfalls der Gruppe der hydrogenosomalen PFO zugeordnet werden kann. Fernerhin ist von großem Interesse, ob die PNO die PDH in diesen Mitochondrien funktionell ersetzt oder ob diese Organellen sowohl die hydrogenosomale PFO als auch die mitochondriale PDH besitzen. Die parallele Existenz beider Enzyme ist bisher nur von einigen Eubakterien wie *E. coli* bekannt (Kerscher und Oesterhelt 1982). Der Arbeitshypothese zufolge, dass der Vorläufer der Mitochondrien und Hydrogenosomen ein fakultativ anaerobes Bakterium war, kann erwartet werden, dass es Organellen der ATP-Synthese gibt, die möglicherweise beide Enzyme besitzen. Für das Verständnis der Evolution der anaeroben Biochemie der ATP-Synthese ist daher die Abstammung, aber auch die differentielle Verteilung der PFO und PDH als Schlüsselenzyme dieser Stoffwechselwege von besonderer Bedeutung. In diesem Zusammenhang ist von großem Interesse, ob *Euglena* neben einem PFO-homologen Enzym auch den Pyruvat Dehydrogenase Komplex besitzt. Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass die PNO in *Euglena* Mitochondrien die PDH funktionell ersetzt (Buetow 1989), in einer einzelnen Arbeit wurde jedoch PDH-Aktivität in *Euglena* Mitochondrien nachgewiesen (Yokota et al. 1982).

2.6 Zwei Hauptenzyme des Pyruvat-Stoffwechsels in Eukaryoten im Detail: PDH und PFO

2.6.1 Der Pyruvat Dehydrogenase Multienzymkomplex

Die Pyruvat Dehydrogenase (PDH) ist ein Multienzymkomplex aus drei verschiedenen Enzymen, der Pyruvat Dehydrogenase (E1 α - und E1 β -Untereinheit, EC 1.2.4.1), der Dihydrolipoyl-Transacetylase (E2-Untereinheit, EC 2.3.1.12) und der Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E3-Untereinheit, EC 1.8.1.4) und katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat.

Die Nettoreaktion der PDH wird durch die folgende Reaktionsgleichung beschrieben:



Die von der PDH katalysierte Reaktion ist unter physiologischen Bedingungen nicht reversibel. Zusätzlich zu den stöchiometrischen Cofaktoren CoA und NAD^+ dienen Thiaminpyrophosphat (TPP), Liponamid und FAD als katalytische Cofaktoren. Der PDH Multienzymkomplex ist üblicherweise in den Mitochondrien lokalisiert. Pflanzen besitzen zusätzlich eine plastidäre PDH (Luethy et al. 1996). Die mitochondriale PDH verbindet die Glykolyse mit dem TCA-Zyklus. Sie kontrolliert damit in entscheidender Weise die TCA-Zyklus-Aktivität und ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung (Mooney et al. 2002). Das plastidäre Enzym liefert Acetyl-CoA und NADH für die Fettsäuresynthese (Camp und Randall 1985). Pyruvat Dehydrogenase gehört, zusammen mit den verwandten Enzymen α -Ketoglutarat Dehydrogenase und der verzweigtkettigen α -Ketosäure Dehydrogenase zur Familie der α -Ketosäure Dehydrogenase Komplexe. Die Pyruvat Dehydrogenase kommt sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vor, die Struktur und Regulation des prokaryotischen Enzyms unterscheidet sich jedoch deutlich von der eukaryotischen PDH. In *E. coli* beträgt das Molekulargewicht des Komplexes 4600 kDa. Dieser besteht aus insgesamt 60 Polypeptidketten. Vierundzwanzig E2-Untereinheiten bilden den Kern, an den 24 E3-Dimere assoziiert sind. Die 12 E1-Dimere sind ebenfalls nicht-kovalent an die E2-Untereinheiten gebunden (Oliver und Reed 1983). Der aus dem Rinderherz isolierte eukaryotische PDH Komplex besitzt ein Molekulargewicht von 8400 kDa und besteht aus einem Kern von 60 E2-Monomeren, an den 30 E1 $\alpha\beta$ -Tetramere und 6 E3-Dimere nicht-kovalent gebunden sind (Barrera et al. 1972).

In den meisten Eukaryoten sowie Eubakterien (mit Ausnahme Gram-negativer Bakterien) besteht die Pyruvat Dehydrogenase E1-Untereinheit aus zwei unterschiedlichen Proteinen $\text{E1}\alpha$ und $\text{E1}\beta$ und besitzt eine Tetramer-Struktur $(\alpha\beta)_2$. In Gram-negativen Bakterien dagegen liegt E1 als Homodimer vor. $\text{E1}\alpha$ enthält die TPP-Bindestelle, während $\text{E1}\beta$ vermutlich an der Bindung der E1-Untereinheit an E2 beteiligt ist (Wexler et al. 1991). Bindeexperimente zeigen, dass die PDH E1 und E3 direkt an die E2-Untereinheit gebunden sind, E1 und E3 selbst aber in keinem direkten Kontakt miteinander stehen. Die E2-Untereinheit besitzt damit sowohl eine katalytische als auch eine strukturelle Funktion, welche sich in ihrer Domänenstruktur widerspiegelt. Je nach Organismus enthalten E2 eine bis drei N-terminale Lipoyl-Domänen, gefolgt von einer E3- und E1-Bindedomäne und einer C-terminalen katalytischen Domäne (Reed und

Hackert 1990). Die Dihydroliponamid Dehydrogenase E3 ist ein Flavoprotein aus der Klasse der Disulfid Oxidoreduktasen und liegt als Homodimer vor. Pro Untereinheit ist 1 Mol FAD nicht-kovalent gebunden.

Bakterielle sowie plastidäre PDH werden über allosterische Mechanismen und Produktinhibition reguliert. Mitochondriale PDH besitzen zusätzlich die regulatorischen Proteine PDH Kinase, PDH Phosphatase und das E3-Bindeprotein (Protein X) (Mooney et al. 2002). PDH Kinase und PDH Phosphatase regulieren über Phosphorylierung/Dephosphorylierung die Aktivität der E1 α -Untereinheit (Reed 1974). Die Funktion des Protein X ist die Bindung und Positionierung der E3-Untereinheit an den E2-Kern, es ist damit essentiell für eine funktionale PDH (Lawson et al 1991). Der Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungszyklus mittels PDH Kinase und PDH Phosphatase reagiert auf intramitochondriale Erhöhung der Verhältnisse von NADH/NAD⁺, Acetyl-CoA/CoA und ATP/ADP durch Erhöhung der Phosphorylierung (Abnahme der PDH-Aktivität). Hohe Konzentrationen von Pyruvat und Erhöhung der Mg²⁺- und Ca²⁺-Konzentration führt zur Erhöhung der PDH-Aktivität durch Dephosphorylierung (Patel und Roche 1990).

Der katalytische Mechanismus der Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA erfolgt in vier Schritten (Patel und Roche 1990). Zunächst wird das Pyruvat nach Bindung an TPP unter Bildung von Hydroxyethyl-TPP oxidativ decarboxyliert. Diese Reaktion wird von der Pyruvat Dehydrogenase-Untereinheit des Multienzymkomplexes katalysiert. Als zweite von der Pyruvat Dehydrogenase katalysierten Reaktion wird die an TPP gebundene Hydroxyethylgruppe zu einer Acetylgruppe oxidiert und dabei gleichzeitig auf Liponamid übertragen. Die Disulfidgruppe des Liponamids wird dabei in die Sulfhydrylform überführt. Die Dihydrolipoyl Transacetylase überträgt schließlich die Acetylgruppe des in der Pyruvat Dehydrogenase Reaktion gebildeten Acetylliponamids auf CoA, dabei entsteht Acetyl-CoA. Die E3-Untereinheit des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes, Dihydrolipoyl Dehydrogenase, regeneriert die oxidierte Form des Liponamids. Ein Hydridion wird dabei auf die prosthetische FAD-Gruppe des Enzyms und schließlich auf NAD⁺ übertragen.

2.6.2 Die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase

Die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFO) (EC 1.2.7.1) katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat gemäß der Reaktionsgleichung:



Diese Reaktion ist strikt CoA- und TPP-abhängig. Pro Mol Pyruvat werden je 1 Mol Acetyl-CoA und CO₂ sowie 2 Mol Ferredoxin gebildet. Neben Ferredoxin können jedoch auch Flavodoxin (Yakunin und Hallenbeck 1998), künstliche Elektronenakzeptoren wie Viologen-Farbstoffe (Raeburn und Rabinowitz 1971) und, in einem beschriebenen Fall, Protonen (Menon und Ragsdale 1996) als Elektronenakzeptor dienen. Im Gegensatz zur PDH-katalysierten Oxidation von Pyruvat ist die PFO-katalysierte Reaktion reversibel. In einigen Organismen läuft die Reaktion in die CO₂-fixierende Richtung unter Synthese von Pyruvat ab.

Aufgrund ihrer molekularen Struktur können drei Typen von PFO unterschieden werden. (1) In Eukaryoten und den meisten Eubakterien ist PFO ein Homodimer aus zwei identischen Untereinheiten, die ein Molekulargewicht von 120 kDa aufweisen (Pieulle et al. 1997, 1999). Die Enzyme dieses Typs enthalten 1 Mol TPP und entweder 4 oder 8 Mol Fe/S pro Untereinheit. (2) Die PFO vieler anaerober Archaeobakterien wie *Pyrococcus furiosus*, *Archaeoglobus fulgidus* und *Methanosarcina barkeri*, aber auch die einiger Eubakterien wie *Thermotoga maritima* und *Helicobacter pylori* bestehen aus vier unterschiedlichen Untereinheiten mit Molekulargewichten von etwa 45, 33, 24 und 13 kDa (Pieulle et al. 1997). Pro Heterotetramer enthalten sie 1 Mol TPP und 8 Mol Fe/S. (3) Als bisher einziges bekanntes Beispiel ist die PFO des anaeroben Archaeobakteriums *Halobacterium halobium* ein $\alpha_2\beta_2$ -Heterodimer bestehend aus einer 68 kDa- und einer 34 kDa Untereinheit, welches 1 Mol TPP und 4 Mol Fe/S enthält (Kerscher und Oesterhelt 1981, 1982).

Die PFO ist unter anaeroben und fakultativ anaeroben Prokaryoten und Eukaryoten weit verbreitet. Die Funktion dieses Enzyms sowie die nachfolgende Verstoffwechslung von Acetyl-CoA und reduzierten Elektronencarriern unterscheidet sich jedoch in den einzelnen Organismengruppen. In Prokaryoten ist PFO an einer Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen beteiligt. In strikt anaeroben Prokaryoten einschließlich der Clostridien (Wahl und Orme-Johnson 1987), Hyperthermophilen (Kletzin und Adams 1996) und einigen Methanogenen (Bock et al. 1996) wird Acetyl-CoA zur Substratkettenphosphorylierung herangezogen. In vielen stickstofffixierenden Bakterien werden die Elektro-

nen direkt von reduziertem Flavodoxin (oder Ferredoxin) auf Nitrogenase übertragen und so zur Stickstofffixierung genutzt (Bauer et al. 1993, Steibl et al. 1995). In *Clostridium* ist die PFO am H₂-produzierenden fermentativen Stoffwechsel beteiligt (Menon und Ragsdale 1997). Ferner fungiert das Enzym als hocheffiziente Pyruvat Synthase in der CO₂-Fixierung bei grünen photosynthetischen und acetogenen Bakterien (Yoon et al. 1999, Chabriere et al. 2001). Die PFO ist auch eines der Schlüsselenzyme des Energiestoffwechsels Sulfat-reduzierender Bakterien wie *Desulfovibrio*. Diese verwenden Malat, Formiat und Fumarat als Elektronendonatoren und reduzieren dabei Sulfat zu Schwefelwasserstoff. In manchen Archaeobakterien fungiert PFO zusätzlich zu den beschriebenen Funktionen als CoA-abhängige Pyruvat Decarboxylase, wo sie in einer Ferredoxin-unabhängigen Reaktion die Bildung von Acetaldehyd aus Pyruvat katalysiert (Ma et al. 1997). In Eukaryoten ist die bisher einzig bekannte Funktion von PFO die Decarboxylierung von Pyruvat unter Bildung von Acetyl-CoA, CO₂ und reduziertem Ferredoxin (Müller 1995, 1998). Die nachfolgende Umwandlung von Acetyl-CoA zu Acetat ermöglicht die Synthese von ATP durch Substratkettenphosphorylierung. Das reduzierte Ferredoxin wird durch Übertragung der Elektronen auf Protonen unter Bildung von H₂ reoxidiert.

Alle bisher bekannten PFO besitzen zwei hochkonservierte [4Fe-4S] Zentren sowie eine konservierte Thiaminpyrophosphat-Bindestelle. Diese zeigt geringe Sequenzähnlichkeit zu den Bindestellen anderer TPP-abhängigen Enzyme wie der Pyruvat Dehydrogenase E1-Untereinheit, Transketolase oder 1-Deoxyxylulose-5-Phosphat Synthase (Lange et al. 2000). In der PFO-Reaktion müssen anfänglich zwei Elektronen von TPP auf die [FeS] Cluster übertragen werden. Da [FeS] Zentren nur jeweils ein Elektron aufnehmen können, bleibt ein Elektron zunächst unter Bildung eines freien Radikal-Intermediates an TPP gebunden (Chabriere et al. 2001, Kerscher und Oesterhelt 1982, Menon und Ragsdale 1997). Besonders gut untersucht ist der Reaktionsmechanismus für die *Desulfovibrio* PFO (Chabriere et al. 1999, 2001; Charon et al. 1999, Pieulle et al. 1999). In einem ersten Schritt wird Pyruvat an TPP gebunden. Der grundsätzliche Katalysemechanismus wird wie folgt postuliert: Durch Abziehen eines Elektrons bildet sich ein freies Acetyl-Radikal. CoA bindet an das Enzym, reduziert eines der beiden [FeS] Zentren des Enzyms und bildet so ein Thiyl-Radikal. Acetyl-CoA bildet sich schließlich durch Kondensation der beiden Radikale (Chabriere et al. 2001). Die beiden reduzierten [FeS] Zentren werden schließlich durch Transfer der Elektronen auf Ferredoxin reoxidiert. Aufgrund der hohen Konservierung katalytischer Domänen in allen drei Typen von PFO (Adams und Kletzin 1996) ist vermutlich der grundlegende katalytische Mechanismus in allen drei Typen von PFO gleich. An dieser Stelle soll hervorgehoben werden, dass die PNO aus den Mitochondrien von *Euglena* keiner dieser drei Typen von

PFO zugeordnet werden kann, sondern aufgrund der Verwendbarkeit von NADP^+ als Elektronenakzeptor einem anderen katalytischen Mechanismus unterliegt.

2.7 Die Ribonukleotid Reduktase aus *Euglena gracilis*: Ein für Eukaryoten ungewöhnliches, sauerstoffunabhängiges Enzym

Als Schlüsselenzym der Wachsesterfermentation ist PNO eines der Enzyme, welches in *Euglena* eine fakultativ anaerobe Lebensweise ermöglicht. Interessanterweise ist *Euglena* auch hinsichtlich der DNA-Replikation von der Sauerstoffkonzentration in seiner Umgebung unabhängig. *Euglena* besitzt eine für Eukaryoten ungewöhnliche, sauerstoffunabhängige Form der Ribonukleotid Reduktase (RNR), die bisher nur in Prokaryoten beschrieben wurde und die sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Sauerstoff aktiv ist. Das Enzym Ribonukleotid Reduktase (RNR, EC 1.17.4.2) katalysiert die Synthese aller vier Desoxyribonukleotide, die für die DNA-Replikation und DNA-Reparatur benötigt werden. Das Enzym ersetzt die OH-Gruppe des C2-Atoms aller vier Ribonukleotide durch Wasserstoff. Obwohl dies eine essentielle Reaktion in den meisten Zellen darstellt, ist die Primärstruktur der RNR nicht hochkonserviert. Hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz, Substrat- und Cofaktorspezifität können drei Klassen von RNR unterschieden werden (Reichert 1993, Jordan und Reichard 1998, Torrents et al. 2002).

Gemeinsames Merkmal aller drei Typen von RNR ist, dass der Katalysemechanismus über die Bildung eines freien Radikals erfolgt. Die einzelnen Klassen unterscheiden sich jedoch bezüglich der Art und Generierung dieses Radikals und ihres Vorkommens in den einzelnen Organismengruppen (Reichard 1997). Klasse I Enzyme kommen in vielen Prokaryoten und, mit Ausnahme von *Euglena gracilis*, in allen bisher untersuchten Eukaryoten vor. Sie besitzen eine $\alpha\beta_2$ -Struktur: die größere α -Untereinheit trägt die katalytischen und allosterischen Zentren, die kleinere β_2 -Untereinheit enthält ein [Fe-O-Fe]-Zentrum und benötigt Sauerstoff zur Bildung eines Tyrosyl-Radikals (Reichert 1997). Klasse I Ribonukleotid Reduktasen werden weiter in die Unterklassen Ia und Ib unterteilt, die sich funktionell und in ihrer Primärstruktur unterscheiden. Als wichtiges Unterscheidungsmerkmal werden Klasse Ib Enzyme nicht allosterisch reguliert (Jordan et al. 1996). Klasse II Enzyme sind einfacher aufgebaut und bestehen zumeist aus einem Homodimer. Ein separater Cofaktor, Adenosylcobalamin, ist hier an der Radikalbildung beteiligt und ersetzt die β_2 -Untereinheit als Radikal-Generator (Eliasson et al. 1999). Dieses Enzym ist sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Sauerstoff funktionell. Obwohl dieses Enzym bisher nur in Prokaryoten nachgewiesen wurde, scheint *Euglena gracilis* als große Ausnahme unter den Eukaryoten ebenfalls eine Klasse II Ribonukleotid Reduktase zu besitzen – die RNR aus *Euglena* ist ebenfalls ein Desoxya-

denosylcobalamin-abhängiges Enzym (Gleason und Hogenkamp 1970). Ribonukleotid Reduktasen der Klasse III besitzen wie Klasse I Enzyme eine $\alpha 2\beta 2$ -Struktur. Das stabile sauerstoffempfindliche Glycyl-Radikal (Logan et al. 1999) ist hier jedoch auf der großen $\alpha 2$ -Untereinheit lokalisiert, die kleinere $\beta 2$ -Untereinheit besitzt ein [4Fe-4S] Zentrum anstelle des [Fe-O-Fe]-Zentrums der Klasse I Ribonukleotid Reduktase. Zusätzlich benötigt die Glycyl-Radikalbildung ein S-Adenosylmethionin, welches funktional das Adenosylcobalamin des Klasse II Enzyms ersetzt. Klasse III Ribonukleotid Reduktasen teilen damit in modifizierter Form Eigenschaften der Radikalbildung sowohl mit Klasse I als auch mit Klasse II Enzymen (Reichard 1997). Als einzige Klasse der RNR sind sie aufgrund des Glycyl-Radikals strikt sauerstoffempfindlich und kommen nur in anaeroben oder fakultativ aeroben Prokaryoten vor, die in Abwesenheit von Sauerstoff wachsen. Für Klasse I und II lässt sich die Reaktionsgleichung wie folgt beschreiben:



Ferner wird für diese Reaktion der Klasse II Enzyme Cobalt als Cofaktor benötigt. Ribonukleotid Reduktasen der Klasse III verwenden anstelle von Thioredoxin Formiat als Elektronendonator.

Die Substratspezifität des katalytischen Zentrums für ein bestimmtes Ribonukleotid wird bestimmt durch die Bindung eines bestimmten dNTPs oder ATP an das allosterische Zentrum. So induziert die Bindung von ATP oder dATP eine Enzymaktivität zugunsten von Pyrimidin Ribonukleotiden, Bindung von dTTP induziert die Aktivität gegenüber GTP und Bindung von dGTP induziert die Aktivität für ATP. Diese Effekte sind, mit Ausnahme der viralen Enzyme, für alle RNR gleich (Eliasson et al. 1999). Einige Reduktasen besitzen zusätzlich ein zweites allosterisches Zentrum, an welches durch Bindung von ATP die Gesamtaktivität des Enzyms stimuliert oder aber durch Bindung von dATP gehemmt wird (Jordan und Reichard 1998).

Die *Euglena* RNR wurde bisher partiell aufgereinigt (Gleason und Hogenkamp 1970). Zur Reduktion der Ribonukleotide benötigt dieses Enzym neben 5'-Deoxyadenosylcobalamin ein Dithiol und ein Ribonukleosidtriphosphat (Gleason und Hogenkamp 1970). Im Rahmen dieser Arbeit soll die *Euglena* RNR kloniert und sequenziert werden mit dem Ziel, Hinweise auf die Abstammung dieses Enzyms zu finden. Als die einfachsten Erklärungsmöglichkeiten könnte dieses Gen entweder (i) von der eukaryotischen Flagellaten-Wirtszelle stammen, (ii) von der eukaryotischen Alge, die von diesem Flagellaten im Zuge sekundärer Endosymbiose aufgenommen wurde oder (iii) von einem prokaryotischen Donator im Zuge lateralen Gentransfers akquiriert worden sein.

2.8 Fazit

Trotz ihrer Komplexität und Diversität können eukaryotische Zellen hinsichtlich der Kompartimentierung ihres Energiestoffwechsels dem derzeitigen Kenntnisstand nach in drei Kategorien eingeteilt werden:

- Aerobier und Anaerobier, die Mitochondrien besitzen
- Anaerobier, die weder Mitochondrien noch Peroxisomen, dafür aber Hydrogenosomen besitzen
- Anaerobier, die keine intrazelluläre Kompartimentierung der ATP-Synthese aufweisen

Die Diversität anaerober Stoffwechselwege der ATP-Synthese in Eukaryoten lässt sich im wesentlichen auf zwei mögliche Ursachen zurückführen: als das Erbe vom fakultativ anaeroben Vorfahren der Mitochondrien und Hydrogenosomen oder aber als Ergebnis lateraler Genakquisitionen von verschiedenen prokaryotischen Donatoren. Beide Möglichkeiten erlauben die Modifikation vererbter oder modifizierter Gene im Zuge der Evolution. Unter der Annahme, dass die Gene für Enzyme der anaeroben ATP-Synthese das Ergebnis unabhängiger Gentransfer-Ereignisse von verschiedenen prokaryotischen Donatoren sind, müssten diese in phylogenetischen Analysen ihren multiplen Ursprung widerspiegeln. Die gleichen Gene aus verschiedenen eukaryotischen Abstammungsgemeinschaften wären demnach über den gesamten phylogenetischen Baum verteilt und besäßen unterschiedliche prokaryotische Vorfahren. Wäre jedoch die Diversität anaerober ATP-Synthesewege bei Eukaryoten das Erbe eines fakultativ anaeroben Proteobakteriums (dem gemeinsamen Vorfahren der Mitochondrien und Hydrogenosomen), so lassen sich die folgenden Voraussagen ableiten:

- (1) eukaryotische Gene der anaeroben ATP-Synthese sollten einen gemeinsamen, eubakteriellen Ursprung haben,
- (2) es sollte rezente Eukaryoten geben, die sowohl Enzyme des anaeroben als auch des aeroben Energiestoffwechsels besitzen (z. Bsp. PFO und PDH),
- (3) einige Organellen der ATP-Synthese sollten Zwischenformen des Energiestoffwechsels von Mitochondrien und Hydrogenosomen darstellen, die mögliche Entwicklungsstufen auf dem Weg der Spezialisierung an aerobe und anaerobe Lebensweisen repräsentieren.

Die Fähigkeit der Mitochondrien von *Euglena*, je nach Sauerstoffverfügbarkeit entweder Bestandteile des aeroben oder anaeroben Energiestoffwechsels zu nutzen, legt die These nahe, dass diese Organellen solche intermediären Formen zwischen Hydrogenosomen und Mitochondrien darstellen. Sie bilden damit möglicherweise eine

biochemische Brücke zum gemeinsamen, fakultativ anaeroben Vorfahren beider Organellen. Dieser Zwischenstadium-Charakter des Organells verleiht *Euglena* den Status eines interessanten Modellorganismus für die Untersuchung phylogenetischer und funktioneller Zusammenhänge zwischen Hydrogenosomen und Mitochondrien.

2.9 Aufgabenstellung

Vor diesem Hintergrund ist Ziel dieser Arbeit, Enzyme des mitochondrialen Energiestoffwechsels von *Euglena* molekular zu charakterisieren. Besondere Berücksichtigung sollen dabei die Enzyme finden, (i) die den Mitochondrien von *Euglena* und Hydrogenosomen gemeinsam sind und (ii) durch welche sich die Mitochondrien von *Euglena gracilis* in charakteristischer Weise von typischen Mitochondrien unterscheiden, d. h. Enzyme des anaeroben Energiestoffwechsels. Anhand dieser Daten soll die Frage beantwortet werden, ob in den molekularen Grundlagen der anaeroben Biochemie der Mitochondrien von *Euglena gracilis* Evidenz für die fakultativ anaerobe Lebensweise des Symbionten erhalten ist. Folgende Ziele sollten im Rahmen dieses Dissertationsprojekts erreicht werden.

- Es sollen Gensonden für die Pyruvat:NADP⁺ Oxidoreduktase und die Pyruvat Dehydrogenase isoliert und vollständige cDNAs für diese Proteine charakterisiert werden. Vergleichend soll die Genexpression in aerob und anaerob angezogenen Zellen untersucht werden. Aus diesen Versuchen wird ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen des aeroben und anaeroben Energiestoffwechsels von *Euglena gracilis* erwartet.
- Mittels der Methode der subtraktiven und differentiellen Hybridisierung sollen weitere Proteine des anaeroben Energiestoffwechsels in den Mitochondrien von *Euglena* identifiziert werden, um so ein vollständigeres Bild über den Stoffwechselweg der anaeroben ATP-Synthese zu erhalten.
- Durch phylogenetische Analysen der untersuchten Gene soll die Frage beantwortet werden, ob die für Proteine der anaeroben ATP-Synthese kodierenden Gene einen gemeinsamen eubakteriellen Ursprung haben oder aber das Ergebnis unabhängiger lateraler Genakquisitionen darstellen.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte:

Autoklav	Fedegari
Automatischer Sequenzierer für DNA	Licor
Bilddokumentationssystem	LTF Labortechnik, mit Mitsubishi Thermoprinter
Bio-Imager FLA 3000-2R	Fuji, mit folgenden Software-Programmen: Image Reader V1.8E und Image Gauge V3.0 (beide ebenfalls Fuji)
Brutschränke	GFL
Computersoftware	Microsoft Word Office XP; Canvas 6.0; CorelDraw 8.0; Photoshop 5.0; GCG Pro- gramm Paket, Genetics Computer Group, Uni- versity of Wisconsin, Version 10.0; Phylogeny Inference Package PHYLIP 3.5c, CLUSTALW Version 1.82, MOLPHY Version 2.3b3, TREE- PUZZLE Version 5.0, TreeView Version 1.6.6
Computersysteme	Windows, Linux
Destillator für bidest H ₂ O	Fisons
Dot Blot Apparatur	V und P Scientific, Inc. San Diego
Elektrophorese-Kammern	Biorad
Elektrophorese-Netzgeräte	für Agarosegele: BioRad, für Sequenzgele: Amersham Biosciences ECPS 3000/150
Fluoreszenzphotometer	Amersham Biosciences
Geltrockner	Biotec Fischer PH-t 40
Heizblock	HLC
Kontaminations-Handmonitor	Berthold LB 123
Kühlwasserbad	MGW
Leuchttisch	Messinstrumentebau GmbH Erlangen
Magnetrührer	Jahnke und Kunkel IKA-Comimag RET
Mikrowellenherd	Daewoo
pH-Meter	Schott

Pipetten Gilson	P 2, P 20, P 200, P 1000
RoboAmp® 4200	MWG Biotech
Thermocycler	Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400, Biometra TGradient, MWG Primus 96 ^{plus}
Schüttelbäder	GFL
Schüttelinkubatoren	GFL
Sterilbank	Heraeus
Transilluminator	GFL
Waagen	Sartorius
Wasserbäder	GFL
Zentrifugen	
- Kühlzentrifugen	Sovall RC5B, Sorvall RC5B plus
- Tischzentrifugen	Heraeus Biofuge fresco
- Untertischzentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0R mit Rotoren: Sorvall GS-3, GSA, SLA-1500, SLA-3000, SA600, SS34

3.2 Allgemeine Chemikalien

Alle verwendeten, nicht spezifisch aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Acros Organics, Amersham Biosciences, J.T. Baker, Biomol, Bio-Rad, Biozym, Calbiochem, Difco, Fluka, Gibco-BRL, ICN, Linde, Merck, Qiagen, Riedel-de Haën, Roche, Roth, Serva und Sigma bezogen. Bestandteile der Kulturmedien stammen von Gibco-BRL. Wässrige Lösungen für PCR-Reaktionen wurden mit Aqua bidest angesetzt, für alle anderen Lösungen wurde standardmäßig deionisiertes (vollentsalztes) Wasser der Aufbereitungsanlagen der Universität Düsseldorf bzw. der Universität Braunschweig verwendet.

3.3 Radiochemikalien

Folgende Radiochemikalien wurden von der Firma Hartmann Analytik bezogen

- ³⁵S-dATP, > 1000 Ci / mmol
- ³²P-dCTP, > 3000 Ci / mmol

3.4 Filtermaterialien und Membranen

Hybond-N Nylonmembran	Amersham Biosciences
Nitrocelluloserundfilter Biotrace NT 82 mm, 0,45 µm	Gelman Sciences

3.5 Materialien für die Chromatographie

DE-52	Whatman
Sephacryl S-300, S-400	Amersham Biosciences
Sephadex G-50 DNA Grade	Amersham Biosciences

3.6 Materialien für die Autoradiographie und Fotografie

Röntgenfilme X-OMAT AR 5	Kodak
Entwickler, Fixierer	Kodak
Thermalpapier für Videodokumentation	Mitsubishi

3.7 Reagenzsätze

Die verwendeten Reagenzsätze wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit	Clontech
GigapackII Gold	Stratagene
ThermoSequenase DYEnamic direct cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Biosciences
Nucleospin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Nucleospin Extraction Kit	Macherey-Nagel
Gelextraction Kit	Qiagen
Jetstar Plasmidprep	Genomed
HotScribe™ First-Strand cDNA Labelling Kit	Amersham Biosciences

3.8 Enzyme

Die verwendeten Enzyme einschließlich ihrer Reaktionspuffer wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Alkalische Phosphatase (CIP)	Stratagene
DNase I	Roche
Exonuclease III	MBI Fermentas
Klenow-Fragment	Amersham Biosciences
Mung-Bean Nuclease	Amersham Biosciences
Proteinase K	Merck

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, MBI Fermentas, Roche
RNase A	Serva
Taq-Polymerase	Roche, Gibco_BRL, Perkin-Elmer
T4-DNA-Ligase	Clontech, Amersham Biosciences
T4-DNA-Kinase	MBI Fermentas
T7-DNA-Polymerase	Amersham Biosciences

3.9 Biologisches Material

3.9.1 *Euglena gracilis*

Der *Euglena gracilis* Stamm Z (SAG 1224-5/25) wurde von der Sammlung von Algenkulturen (SAG) Göttingen bezogen.

3.9.2 Bakterienstämme

Folgende *E. coli*-Stämme wurden verwendet: NM 522 (Gough und Murray 1983), POP13 (Schwarz-Sommer et al. 1987), XL1-Blue MRF' (Stratagene), SOLR (Stratagene).

3.10 Plasmid- und Bakteriophagen-Vektoren

Als Plasmid-Vektor wurde der pBluescript SK+ von Stratagene (Alting-Mees und Short 1989) eingesetzt. Für die Klonierung der cDNA-Banken wurde der λ -Vektor ZAP[®] II von Stratagene verwendet (Short et al. 1988).

3.11 Kultivierung von *Euglena gracilis*

Die Anzucht einer Vorkultur erfolgte durch Animpfen von 50 ml *Euglena* Medium 9 mit Mineralien, jedoch ohne Bodenextrakt (Schlösser 1997) in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit 1 ml einer Stammkultur von *Euglena gracilis*. Diese Kultur wurde bei 27°C unter permanenter Beleuchtung mit 6000 lx angezogen. Nach 5 Tagen erfolgte ein Transfer dieser Kultur in einen 10 l Kolben mit 5 l Medium 9 (Schlösser 1997) mit Mineralien, aber ohne Bodenextrakt. Aerobe Behandlung von Zellen wurde durch ständige Belüftung mit 2 l/min 2 % CO₂ in Luft erreicht (Filterkerze). Anaerob behandelte Kulturen wurden bei gleicher Durchflussrate mit 2 % CO₂ in N₂ kultiviert. Für eine Dunkelbehandlung wurden die Zellen zunächst für zwei Tage im Licht mit 2 % CO₂ in N₂ angezogen, dann abgedun-

kelt und nach weiteren 48 h geerntet. Die Ernte der Kulturen erfolgte nach Erreichen der stationären Phase durch Zentrifugation bei 4000 x g für 5 min und sofortigem Einfrieren in flüssigen N₂. Nach etwa 4 Tagen konnten unter aeroben und anaeroben Bedingungen etwa 2 g Zellmasse (Frischgewicht) pro Liter Kultur erhalten werden.

3.12 Arbeiten mit *E. coli*

Folgende Arbeiten mit *E. coli*-Stämmen wurden nach Standardprotokollen von Sambrook et al. (1989) durchgeführt:

- die Anzucht der Bakterienstämme auf Fest- und Flüssigmedium
- Die Herstellung und Transformation von CaCl₂-kompetenten *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA
- Die Transfektion von *E. coli* Zellen mit λ-Phagen und die Vermehrung von λ-Phagen in kleinem Maßstab
- Glycerin-Dauerkulturen
- Zur Anzucht von *E. coli* Kulturen wurden folgende Medien verwendet: CY-Medium, LB-Medium, M9-Medium und NZ-Medium.
- *E. coli* NM522 and XL1-BLue MRF' wurden nach erfolgter Transformation mit rekombinanter pBluescript-Plasmid-DNA zur Blau-Weiß-Selektion auf LB-Platten mit 0, 1 mg/ml Ampicillin, 0,047 mg/ml IPTG und 0,04 mg/ml X-Gal plattiert.

3.13 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Die Arbeiten mit Nukleinsäuren erfolgten, sofern nicht anders angegeben, nach den Protokollen von Sambrook et al. (1989). Folgende Methoden wurden dabei eingesetzt:

3.13.1 Präparation, Reinigung und Analyse von Nukleinsäuren

- Mini- und Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (nach Birnboim und Doly (1979), modifiziert von Ish-Horowitz und Burke (1981)) oder nach Herstellerangaben mit dem Jetstar System von Genomed
- Phenolextraktion und Konzentrierung von DNA aus wässrigen Lösungen durch Ethanol- und Isopropanol-Präzipitation
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Trennung von Nukleinsäuren bzw. DNA-Fragmenten sowie deren Größenbestimmung durch Agarosegelelektrophorese

- DE-52 Chromatographie von DNA
- Sephadex-G50 Chromatographie von DNA
- Elektroelution von Restriktionsfragmenten

3.13.2 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

- Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen
- Ligationen von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase
- Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA Polymerase
- Phosphorylierung von DNA mit T4-DNA-Kinase
- Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase
- Mung-Bean Nuklease Behandlung von DNA

3.13.3 Weitere molekularbiologische Techniken

- Synthese von cDNA (nach Herstellerprotokoll, Amersham Biosciences)
- Identifizierung rekombinanter Phagen durch Plaque-Hybridisierung

3.13.4 PCR-Techniken

3.13.4.1 Ansatz und Reaktionsbedingungen zur Durchführung der PCR

Ein typischer PCR-Ansatz wurde in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt. Dieser Standardansatz enthielt 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1,5 mM je dNTP, 1 µM je Primer und 0,5 U Taq-DNA-Polymerase. Die Zugabe der Taq-DNA-Polymerase erfolgte erst nach anfänglicher 10-minütiger Denaturierung der DNA bei 98°C. Üblicherweise wurden 30 Zyklen von 1 min bei 94°C (Denaturierung), 1 min bei 50°C (Hybridisierung) und 1 min bei 72°C (Synthese) im Thermocycler durchgeführt. Die eingesetzte DNA-Menge variierte von 10 ng für Plasmid-DNA bis 20 ng für genomische und cDNA. Abweichungen von den hier aufgeführten Standardbedingungen sind gesondert angegeben. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Reaktionsansätze kurz bei 15.000 x g zentrifugiert und 5-15 µl zur Kontrolle auf einem Agarosegel getrennt. Je nach Größe des zu erwartenden PCR-Fragmentes wurden 1 bis 2 %-ige Gele gewählt.

3.13.4.2 Reamplifikation von PCR-Produkten

Um eine ausreichende Menge eines PCR-Fragmentes herzustellen, wurden 10 –15 µl des PCR-Ansatzes auf einem 2 %-igen *low melting*-Agarosegel bei 3.5 V/cm aufgetrennt. Das

amplifizierte Fragment wurde mit dem spitzen Ende einer sterilen Pasteurpipette unter UV-Licht aus dem Gel ausgestochen, in 200 μl H_2O überführt und bei 65°C aufgeschmolzen. Für eine erneute PCR-Reaktion wurden 2 μl eingesetzt.

3.13.4.3 Klonierung von PCR-Fragmenten

Für die Klonierung eines PCR-Fragmentes mit glatten Enden (*Blunt-End-Klonierung*) wurde die PCR-Reaktion in einem Vierfach-Ansatz (s. 3.13.4.1) durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz über den Macherey-Nagel Nucleospin Plasmid Prep Reagensatz nach Herstellerangaben aufgereinigt und in einem Volumen von 60 μl mittels 20 U T4-DNA-Kinase und 0,01 M ATP für 30 min bei 37°C phosphoryliert. Nachfolgend wurde 1 μl eines dNTP-Gemisches (2,5 mM je dNTP) und 2 U Klenow-Fragment hinzugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Enzymreaktion mit 5 μl 0,5 M EDTA, pH 8,0 wurde das Volumen mit TE auf 100 μl aufgefüllt, phenolisiert, gefällt und das Pellet in 100 μl TE gelöst. Nach Abtrennung der dNTPs über den Macherey-Nagel Nucleospin Plasmid Prep Reagensatz erfolgte die Ligation der Fragmente mit T4-DNA-Ligase in die HincII-Schnittstelle des HincII-geschnittenen, dephosphorylierten Vektors pBluescript SK+ (Stratagene) bei 12°C über Nacht. Zur Transformation wurde der komplette Ligationsansatz eingesetzt.

3.13.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Euglena gracilis*

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden Zellkulturen wie unter 3.11 beschrieben kultiviert und geerntet. Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden 5 – 7 g tiefgefrorenes Zellmaterial in 25 ml 80°C warmem Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 9,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2 % (w/v) SDS, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K) mittels French Press aufgeschlossen. Nach Zugabe weiterer 75 ml des 80°C warmen Extraktionspuffers und Homogenisierung des Ansatzes durch kräftiges Schütteln wurden sofort 100 ml Phenol und, zur Verminderung der Schaumbildung, ca. 1 ml Isoamylalkohol zugegeben und der Ansatz abermals kräftig durchmischt. Nach Zentrifugation des Gemisches bei 10.000 x g (GSA-Rotor) für 5 min wurde die wässrige obere Phase abermals wie zuvor zentrifugiert, um eventuelle Reste der Interphase zu entfernen, abdekantiert, mit 1/10 Vol. 3 M NaOAc, pH 6,5 und 100 ml Isopropanol versetzt und die RNA ü. N. bei -20°C ausgefällt. Am folgenden Tag wurde das RNA-Präzipitat durch Zentrifugation bei 16.000 x g (GSA-Rotor) bei 4°C für 20 min gewonnen, an der Luft getrocknet und in 25 ml Bindepuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 400 mM NaCl, 0,2 % (w/v) SDS, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K) aufgenommen und resuspendiert.

3.13.6 Isolierung von Poly(A) + RNA aus *Euglena gracilis*

Zur Isolierung der Poly(A)+ RNA wurde Oligo-(dT)-Cellulose im Batch-Verfahren viermal mit je 25 ml Bindepuffer gewaschen. Das Gesamt-RNA-Präzipitat (s. Abschnitt 3.13.5) wurde für 60 min im Batch-Verfahren mit 0,5 g Oligo-(dT)-Cellulose (Typ 7, Pharmacia) in 40 ml Bindepuffer (400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,2 % (w/v) SDS, 10 mg/ml Proteinase K) aufgenommen und inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Oligo-(dT)-Cellulose dreimal im Batchverfahren mit je 25 ml Bindepuffer und einmalig mit 25 ml Waschpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,2 % (w/v) SDS, 200 µg/ml Proteinase K) gewaschen und in eine 1 x 10 cm Säule überführt. Das Säulenbett wurde mit 100 ml Waschpuffer bis zu einer konstanten OD₂₆₀ des Eluates von 0,005 gewaschen. Die mRNA wurde bei 50°C mit 3 x 3 ml Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 µg/ml Proteinase K) eluiert. Diese Fraktionen wurden vereinigt und mit 1 Volumen 2 x Bindepuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 800 mM NaCl, 0,4 % (w/v) SDS, 400 µg/ml Proteinase K) versetzt. Anschließend wurde das Volumen mit Bindepuffer auf 40 ml erhöht und die Poly(A)+ RNA erneut wie zuvor über Oligo-(dT)-Cellulose gereinigt. Die mRNA wurde wiederum bei 50 °C mit 2 x 3 ml Elutionspuffer eluiert und die Fraktionen wurden einzeln mit Ethanol bei -20°C ü. N. präzipitiert. Am folgenden Tag erfolgte die Pelletierung der mRNA durch Zentrifugation bei 10.500 x g (Ausschwingrotor HB-4) für 45 min bei 4°C. Das Pellet wurde in 500 µl TE + 200 µg/ml Proteinase K gelöst, phenolisiert und erneut für 2 h mit Ethanol bei -20°C präzipitiert. Nach Gewinnung des Poly(A)+ RNA Präzipitats durch Zentrifugation bei 15.000 x g für 30 min bei 4°C wurde das Pellet gewaschen und getrocknet. Nach photometrischer Quantifizierung der RNA-Konzentration wurde die Poly(A)+ RNA in einer Konzentration von 1 µg/µl in TE aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Auf diese Weise wurden zwischen 600 µg und 800 µg zweifach Oligo-(dT)-gereinigte mRNA gewonnen.

3.13.7 Isolierung von genomischer DNA aus *Euglena gracilis*

Zellkulturen wurden wie unter Abschnitt 3.11 kultiviert und geerntet. Für die Isolierung von genomischer DNA aus *Euglena gracilis* wurden 5 –7 g Zellmaterial in einem vorgekühlten Mörser mit flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zermahlen und in 20 ml Aufnahmebuffer (50 mM Tris-HCl pH 9,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 30 mM 2-Mercaptoethanol, 2 % (w/v) SDS, 4 M Guanidiniumthiocyanat, 5 % (w/v) Polyklar AT) aufgenommen. Nach einmaligem Phenolisieren mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) und Zentrifugation bei 5000 x g und RT (SS34-Rotor) wurde die obere wässrige Phase abgenommen und schrittweise unter ständigem Schwenken mit 0,2 Vol Ethanol versetzt. Diese wurde mit 1 Vol. (w/v) Chloro-

form/Isoamylalkohol (24:1, v/v) abermals extrahiert und unter Zugabe von 1 Vol. Isopropanol 1 h bei -20°C präzipitiert. Die Nukleinsäuren wurden durch Zentrifugation bei $6000 \times g$ und 4°C für 5 min (HB-4-Rotor) abgetrennt, gewaschen und in 5 ml TE mit $10 \mu\text{g/ml}$ Proteinase K und 30 mM Mercaptoethanol gelöst. Sichtbare Mengen unlöslicher Substanzen wurden durch abermaliges 10-minütiges Zentrifugieren bei $20.000 \times g$ (SS-34 Rotor) entfernt und der Überstand für die nachfolgende LiCl-Fällung mit 10 M LiCl eingesetzt. Nach Zugabe von $1,25 \text{ ml}$ LiCl erfolgte die Fällung bei -20°C ü. N. Am folgenden Tag wurde für 30 min bei $10.000 \times g$ und 4°C (HB-4 Rotor) zentrifugiert und die sich im Überstand befindliche DNA mit 2 Vol. Ethanol präzipitiert. Das Nukleinsäurepräzipitat wurde durch Zentrifugation bei $10.000 \times g$ und 4°C für 10 min gewonnen, gewaschen und nach dem Trocknen in 18 ml H_2O gelöst. Nach Zugabe von $360 \mu\text{l}$ $0,5 \text{ M}$ EDTA pH 8,0, $2,25 \mu\text{l}$ 5 M NaCl, $2,7 \text{ ml}$ TE und $2,7 \text{ ml}$ 2 % CTAB wurde abermals bei $12.000 \times g$ und 4°C für 10 min zentrifugiert, das Präzipitat gewaschen und 5 ml TE aufgenommen. Die anschließende Dichtegradientenzentrifugation in CsCl-Gradienten erfolgte nach den Angaben von Sambrook et al. (1989)

3.13.8 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1984) wurden zwischen 50 und 200 ng DNA in $37 \mu\text{l}$ H_2O für 15 min bei 100°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden $5 \mu\text{l}$ $10 \times$ Oligopuffer (50 OD_{260} Units pd(N)₆ Random Hexamers von Amersham Biosciences, 100 mM MgCl_2 , 500 mM Tris-HCl pH 7,5, je $500 \mu\text{M}$ dATP, dGTP, dTTP, 70 mM 2-Mercaptoethanol), $5 \mu\text{l}$ BSA ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), $5 \mu\text{l}$ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dCTP ($>3000 \text{ Ci/mMol}$) und $2,5 \text{ U}$ Klenow-Fragment zugesetzt und 2-3 h bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit $2 \mu\text{l}$ $0,5 \text{ M}$ EDTA pH 8,0 gestoppt und die Sonde über eine Sephadex-G50 Säule (Pasteurpipette) aufgereinigt.

3.13.9 cDNA-Banken aus *Euglena gracilis*

Euglena cDNA-Banken aus aerob behandelten und anaerob dunkel behandelten Zellen wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Ulrich Nowitzki und von Frau Dipl. Biologin Meike Hoffmeister zur Verfügung gestellt.

3.13.10 Identifizierung rekombinanter Klone

Die Identifizierung rekombinanter Klone folgte Standardprotokollen bei der Herstellung von Replikafiltern, der Plaquehybridisierung und der Subklonierung von λ -Insertionen in Plasmid-Vektoren (Sambrook et al. (1989). Vorbereitend wurden *E. coli* POP13 Zellen

ü. N. in CY-Medium mit 0,4 % Maltose angezogen, am nächsten Tag bei 4000 rpm abzentrifugiert und in 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Etwa 200.000 Klone der jeweiligen cDNA-Bank wurden mit den so vorbehandelten *E. coli* POP13 (20 µl/Platte) auf 40 Platten ausplattiert, ü. N. bei 37°C inkubiert, 3 h bei 4°C abgekühlt und nach der Methode von Sambrook et al. (1989) auf Nitrocelluloserundfilter (82 mm Durchmesser) transferiert. Für die Hybridisierung mit zwei unterschiedlichen Sonden wurde ein doppelter Satz an Replikafiltern hergestellt. Die Filter wurden bei zweimaligem Pufferwechsel 2 h bei 68°C in 6 x SSPE (900 mM NaCl, 60 mM NaH₂PO₄, 7,5 mM EDTA, pH 7,5), 0,1% (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) PVP90, 0,02 % (w/v) Ficoll 400 und 5 µg/ml Poly A vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte, sofern nicht anders angegeben, für 16 h bei 68°C in 3 x SSPE, 0,1% (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) PVP90, 0,02 % (w/v) Ficoll 400, 5 µg/ml Poly A und 10 ng/ml Hybridisierungssonde (vgl. Abschnitt 3.13.8). Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Filter 2 x 30 min in 2 x SSPE, 0,1 % SDS gewaschen, getrocknet und auf XAR-Filmen bei -80°C (Kodak) ü. N. mit Verstärkerfolie exponiert.

Die Isolierung von Klonen der E1 α -, E2- und E3- Untereinheit der PDH erfolgte durch Hybridisierung von cDNA-Banken mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden PDH-E1 α _Hyb, PDHE2_Hyb und PDH-E3_Hyb (s. Abschnitt 3.15). Zur Auswahl geeigneter Oligonukleotide wurde das Online verfügbare Programm Primerfinder (<http://eatworms.swmed.edu/~tim/primerfinder/>) verwandt. Die Markierung von 20 pmol eines jeden Oligonukleotids erfolgte durch die T4-DNA-Kinase abhängige Phosphorylierung mit 20 pmol γ -³²P-ATP und wurde von der Firma Hartmann Analytik im Rahmen ihres Oligo-Markierungsservices durchgeführt. Nach 1-stündiger Vorhybridisierung mit 6 x SSPE, 0,1% (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) PVP90, 0,02 % (w/v) Ficoll 400, 5 µg/ml Poly A bei 60°C wurden die Filter 16 h bei 60°C in 3 x SSPE, 0,1% (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) PVP90, 0,02 % (w/v) Ficoll 400, 5 µg/ml PolyA und 0,5 pmol/ml Oligosonde hybridisiert. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Filter 2 x 30 min und 1 x 10 min in 2 x SSPE, 0,1% SDS gewaschen, getrocknet und bei -80°C auf XAR-Filmen (Kodak) mit Verstärkerfolie für 48 h exponiert. Plaques, die ein positives Signal aufwiesen, wurden mit dem stumpfen Ende einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen, in 500 µl SM-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 0,01% Gelatine) überführt und für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Zur Vereinzelung wurden 1–5 µl einer 1: 10.000-Verdünnung dieser Phagensuspensionen ausplattiert. Nach Herstellung von Filtern wurde mit der gleichen Sonde wie zuvor hybridisiert. Einzelne Plaques, die sich eindeutig einem Signal auf dem Röntgenfilm zuweisen ließen, wurden nachfolgend für die Subklonierung in pBluescript SK+ verwendet und die Sequenzen entsprechend des Dideoxy-Verfahrens (Sanger et al., 1977) ermittelt (vgl. Abschnitt 3.13.15).

3.13.11 Southern-Hybridisierung

Je 20 µg der *Euglena* genomischen DNA wurden mit 25 U eines Restriktionsenzym *u. N.* geschnitten und auf einem 0,7 % Agarosegel bei 2 V/cm *u. N.* vollständig aufgetrennt. Das Gel wurde mit EtBr angefärbt, photographiert und in folgenden Lösungen gewaschen: 2 x 10 min in Southern I (0,5 M NaOH, 1 M NaCl), 2 x 10 min in Southern II (0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 3 M NaCl) und 1 x 10 min in 20 x SSPE (3 M NaCl, 0,2 M NaH₂PO₄, 20 mM EDTA, pH 7,5). Danach wurde die DNA mit 20 x SSPE durch Kapillartransfer nach Sambrook et al. (1989) *u. N.* auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) übertragen. Die Membran wurde nachfolgend 5 min in 6 x SSPE gewaschen, getrocknet und zur Immobilisierung der DNA 3 min mit UV-Licht bestrahlt (312 nm). Die Membran wurde bei 68°C in 6 x SSPE für 1 h vorhybridisiert, die Hybridisierung erfolgte bei 68°C in 3 x SSPE, 0,1% (w/v) SDS, 0,02 % PVP 90, 0,02 % (w/v) Ficoll 400, 5 µg/ml Poly A und 10 ng/ml Hybridisierungssonde für 16 h *u. N.* Als Hybridisierungssonde wurde die pEgPNO3 (s. Abschnitt 3.1.3) eingesetzt. Nach Abschluss der Hybridisierung wurde 2 x 10 min bei 60°C mit 2 x SSPE, 0,1 % (w/v) SDS gewaschen, die Membran getrocknet und *u. N.* auf XAR-Filmen (Kodak) bei -80°C mit Verstärkerfolie exponiert.

3.13.12 Northern-Hybridisierung

Die Auftrennung der RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch in einem 1, 2 %igen Agarosegel, welches mit 1 x MOPS-Puffer (20 mM MOPS pH 7,0, 5 mM Natriumacetat pH 6,4, 1 mM EDTA pH 8,0) und 6,6% (v/v) Formaldehyd angesetzt wurde. Alle Lösungen bzw. Puffer, mit denen das Agarosegel in Kontakt kam, wurden zum Schutz vor RNasen mit Proteinase K (10 µg/ml) versetzt. Alle Materialien wurden, soweit möglich, mit Hypochlorit behandelt. Pro Spur wurden 2 µg Poly(A)⁺ RNA in 20 µl TE gelöst und mit 34 µl Northern Ladepuffer (57% (v/v) Formamid, 17,5 mM MOPS pH 7,0, 4,4 mM Natriumacetat pH 6,4, 0,8 mM EDTA, 8% (v/v) Formaldehyd, 1,4 % (w/v) Ficoll 400, 0,09 mg/ml Bromphenolblau) versetzt. Je 2 µg RNA-Größenstandard wurden in 10 µl TE und 17 µl Northern Ladepuffer gelöst. Der Größenstandard und die RNA-Proben wurden für 15 min bei 60°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Der Größenstandard wurde mit 0,5 µl EtBr (5 mg/ml (v/v)) versetzt. Die RNA-Proben wurden nach 5-minütigem Vorlauf des Agarosegels bei 5 V/cm aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 4 V/cm für 4 h unter einmaligem Wechsel des Laufpuffers (1 x MOPS-Laufpuffer: 0,04 M MOPS pH 7,0, 0,01 M NaOAc, 0,001 M EDTA). Nach Ende des Gellaufes wurde das Gel mit einmaligem Pufferwechsel 1 h in H₂O gewaschen und 1 h in 20 x SSC-Puffer (3 M NaCl, 0,3 M Trinatriumcitrat) equilibriert, das während dieser Zeit zweimal ausgetauscht wurde. Der nachfolgende Transfer

der RNA auf eine Nylonmembran erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook et al. 1989) über Kapillartransfer auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham Biosciences) mit 20 x SSC ü. N. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran getrocknet und die RNA für 3 min unter UV-Licht (312 nm) immobilisiert. Die Vorhybridisierung erfolgte bei 68°C in 6 x SSPE, 0,1% (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) PVP90, 0,02 % (w/v) Ficoll 400 und 5 µg/ml Poly A für 1 h. Die Hybridisierung wurde für 16 h bei 68°C in 3 x SSPE, 0,1% (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) PVP90, 0,02 % (w/v) Ficoll 400, 5 µg/ml Poly A mit 10 ng/ml Hybridisierungssonde durchgeführt. Die Sonden wurden nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1984) mit α -³²P-dCTP radioaktiv markiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran 2 x 30 min mit 2 x SSPE, 0,1% (w/v) SDS gewaschen, getrocknet und auf einem XAR-Film (Kodak) bei -80°C mit Verstärkerfolie exponiert.

3.13.13 Isolierung von Einzelstrang-DNA

Der Phagemid pBluescript SK+ (Stratagene) erlaubt die Herstellung von Einzelstrang-DNA mittels M13-Helferphagen. Der Helferphagenstamm VCS-M13 (Stratagene) wurde gemäß des Herstellerprotokolls vermehrt. Zur Bestimmung des Phagentiters wurden 50 µl CaCl₂-kompetente *E. coli* JM101-Zellen in 5 ml Top-Agar (0,7 % Agarose in 10 mM MgSO₄) auf LB-Medium ausplattiert und jeweils 1 µl einer Phagenverdünnungsreihe von 10⁰ bis 10¹⁰ aufgetropft. Vor der Infektion mit den Helferphagen wurden die Plasmid-enthaltenen *E. coli* NM522 Transformanten auf prolinfreiem M9-Medium ausgestrichen. Die Infektion mit M13-Helferphagen und die Isolierung der Einzelstrang-Phagen-DNA folgten dem Standardprotokoll nach Sambrook et al. (1989) sowie gemäß den Angaben des Herstellers (Stratagene). Die Einzelstrang-DNA wurde in 20 µl TE aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.13.14 Herstellen von Deletionsmutanten mit Hilfe der Exonuklease III

Exonuklease III Deletionsmutanten im pBluescript SK+ Vektor (Stratagene) wurden in Anlehnung an das Protokoll von Henikoff (1984) hergestellt. Etwa 100 µg DNA (oder mindestens 2 µg DNA/ Exonuklease III Inkubationszeitpunkt) wurden mit dem ersten ausgewählten Restriktionsenzym, das 5'-überstehende Enden erzeugt, in einem Reaktionsvolumen von 1000 µl gespalten. Nach dem Phenolisieren wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert und das Pellet in 100 µl H₂O aufgenommen. Zum Schutz vor einem Abbau durch Exonuklease III wurden die 5'-überhängenden Enden mit α S-dNTPs aufgefüllt. Die Auffüllreaktion erfolgte bei 37°C für 30 min in einem 500 µl Reaktionsansatz, welcher linearisiertes Plasmid, 50 µl 10 x Klenowpuffer (500 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂,

10 mM DTT), 2,5 μ M DTT, 5 μ M α S-dATP, 5 μ M α S-dCTP, 5 μ M α S-dGTP, 5 μ M α S-dTTP und 5 U Klenow-Fragment enthielt. Der Ansatz wurde mit 10 μ l 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt, phenolisiert und mit Ethanol gefällt. Nach Präzipitation der Nukleinsäuren durch Zentrifugation wurde das DNA-Pellet gewaschen, getrocknet und erneut in 100 μ l H₂O aufgenommen. Die Abtrennung der Nukleotide erfolgte über eine Sephacryl S 300 Spun column (Amersham Biosciences). Das Eluat der Säule (~ 80 μ l) wurde für die Spaltung des zweiten, ebenfalls 5'-überhängende Enden erzeugenden Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 1000 μ l eingesetzt. Nach Beendigung der Restriktionsspaltung wurde der Ansatz phenolisiert, mit Ethanol gefällt und in einer Konzentration von 1 μ g/ μ l in H₂O gelöst. Für eine Reaktion von beispielsweise 25 Exonuklease III Inkubationszeitpunkten wurden 50 μ g DNA in einem Reaktionsansatz mit 250 μ l 2 x Exonuklease III Puffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂), 10 mM 2-Mercaptoethanol und 600 U Exonuclease III in einem Gesamtvolumen von 500 μ l eingesetzt. Ab dem Startpunkt t_0 (Zugabe der Exonuklease III) wurden dem Ansatz im Abstand von 60 s 25 μ l entnommen und sofort auf Eis mit 175 μ l Exonuklease III- Stopp-Lösung (20 μ l 10 x Mung-Bean-Puffer (300 mM Natriumacetat pH 5,2, 500 mM NaCl, 10 mM ZnCl₂, 50 % (v/v) Glycerin) und 155 μ l H₂O) gemischt. Anschließend wurde für 15 min bei 68°C denaturiert und nach kurzem Abkühlen auf Eis mit 15 U Mung-Bean-Nuklease bei 30°C für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 20 μ l Mung-Bean-Stopp-Lösung (500 mM Tris-HCl pH 9,5, 0,25 M EDTA, 10 μ g Proteinase K) wurden die Ansätze 15 min bei 37°C inkubiert und phenolisiert. Nach Präzipitation der DNA mit Ethanol wurde die DNA in 20 μ l TE aufgenommen, ligiert und zur Transformation von *E. coli* NM 522 bzw. *E. coli* XL1-Blue MRF' eingesetzt. Pro Zeitpunkt der Exonuklease III Kinetik wurden 3 Kolonien entweder auf LB-Medium oder AIX-Medium angeimpft (5 ml Über-Nacht-Kultur) und DNA-Minipräparationen durchgeführt. Klone mit abnehmender Insertionslänge wurden ausgewählt und zur Sequenzierung eingesetzt (vgl. Abschnitt 3.13.15).

3.13.15 Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode von Sanger et al. (1977) nach den Angaben von Sambrook et al. (1989). Für das Sequenzieren der DNA im pBluescript SK+ Vektor (Stratagene) wurden die Standardprimer ("Universal"- und "Reverse"-Primer, Stratagene) eingesetzt. Zusätzlich wurden die unter Kapitel 3.15 angegebenen internen Sequenzierprimer verwendet. Doppelsträngige Plasmid-DNA wurde alkalisch denaturiert (Chen und Seeburg, 1985), indem 1 – 2 μ g Plasmid-DNA in 8 μ l TE-Puffer mit 2 μ l 2 M NaOH für 10 min bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurde die DNA durch Mischen mit 3 ml 3 M NaOAc pH 4,7, 7 μ l H₂O und 60 μ l Ethanol 15 min auf Eis gefällt. Nach

dem Abzentrifugieren wurde das Pellet mit 500 μl 70 %-igem Ethanol gewaschen und in 10 ml H_2O aufgenommen. Die Hybridisierung des Primers an denaturierte Doppelstrang-DNA erfolgte durch Inkubation des Ansatzes mit 2 μl Hybridisierungspuffer (280 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl_2 , 160 mM DTT) und 2 μl des Sequenzierprimers (1 ng/ μl für Standardprimer, 5 ng/ μl für interne Primer) für 20 min bei 37°C und nachfolgend für 10 min bei RT. Für die Sequenzierreaktion wurden dem Ansatz 3 μl Labelling-Mix (je 1,3 μM dNTP, 33 mM NaCl), 0,5 μl α - ^{35}S -dATP (>1000 Ci/mmol) und 2 μl T7-DNA-Polymerase (1,5 U/ μl) zugesetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 4 x 4,5 μl des Reaktionsansatzes auf 2,5 μl der entsprechenden ddNTP-Terminations-Gemische in einer Mikrotiterplatte verteilt, 5 min bei 37°C weiterinkubiert und mit 5 μl Stopp-Lösung (95 % (v/v) Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol FF) versetzt. Die Proben wurden für 2 min bei 80°C denaturiert und auf einem 0,25 mm dicken, 6 %-igen Polyacrylamidgel mit 1 x TBE-Puffer (90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA, pH 8,0) bei 23 mA aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurden die Gele auf Whatman-Papier übertragen, zunächst im Gel Trockner und nachfolgend bei 80°C im Trockenschrank getrocknet. Die Exposition auf XAR-Filmen (Kodak) erfolgte bei RT.

Enthielten DNA-Sequenzen Stellen mit starker Kompression, wurden diese Bereiche der Sequenz mit 25%-igen Formamid-Gelen nachsequenziert. Dazu wurden zunächst 100 ml Formamid mit Hilfe des Ionenaustauschers Serdolit MB-1 (Serva) durch einstündiges Rühren bei RT deionisiert und anschließend filtriert. Für das 6 %-ige Acrylamid-Gelmix wurden 21 g Harnstoff, 7,5 ml 38 % Acrylamid/2 % Bisacrylamid, 10 x TBE-Puffer (90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA, pH 8,0) und 12,5 ml deionisiertes Formamid mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt, mit 75 μl TEMED und 1 ml 10 % APS versetzt, das Gel gegossen und auspolymerisieren lassen. Die Elektrophorese erfolgte bei 34 mA. Vor der Trocknung wurden die Gele in 5 % Essigsäure/20 % Methanol fixiert. Konnten starke Kompressionen auch über 25 %-ige Formamid-Gele nicht aufgelöst werden, wurde Einzelstrang-DNA isoliert und diese sequenziert.

Laserfluoreszenz-Sequenzierung erfolgte mit dem DNA Sequencer Long Readir 4200 (Licor). Die Isolierung von Plasmid-DNA für die Sequenzierung erfolgte ausschließlich über den Macherey-Nagel Plasmid Prep Reagensatz. Für die Sequenzierung wurden zwischen 2 und 3 μg Plasmid-DNA in einem Volumen von 20 μl H_2O eingesetzt. Die Sequenzreaktion wurde mit dem DYEnamic Direct cycle sequencing Kit (Amersham Biosciences) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Sequenzreaktionen wurden in einem automatisierten Verfahren über den RoboAmp[®] 4200 (MWG Biotech) pipettiert. Dazu wurden 16 μl der vorgelegten 20 μl mit je 2 μl eines jeden Fluorescein-markierten

(IRD™700, IRD™800) Sequenzierprimers M13(24)for (1 µM) und M13(24)rev (1 µM) versetzt und gut durchmischt. Aus diesem Ansatz wurden je 3 µl auf vier neue Reaktionsansätze verteilt. Zu jedem dieser vier Reaktionsansätze wurden 3 µl des mit H₂O 1:3 verdünnten, entsprechenden Terminationsmixes zugegeben und abermals gut durchmischt. Die PCR-Reaktion wurde in einem Volumen von 6 µl im angeschlossenen Thermocycler des RoboAmp® 4200 durchgeführt. Nach einmaliger Denaturierung bei 98°C für 150 s wurden 25 Zyklen mit 60 s bei 98°C (Denaturierung), 35 s bei 68,5°C (Annealing) und 120 s bei 71°C (Synthese) gefahren. Nach Beendigung der PCR wurden die Proben mit 6 µl Formamid-Ladepuffer (200 µl 0,5 M EDTA pH 8,0, 100 µl Pararosanilin (100 mg/ml), 9,5 ml Formamid) versetzt, für 3 min bei 70°C denaturiert, sofort auf Eis abgekühlt und jeweils 1,5 µl einer jeden Reaktion auf das Sequenzgel aufgetragen. Das Gießen, der Aufbau des Gels, sowie die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzierreaktionen erfolgte ebenfalls nach Angaben des Herstellers (Licor).

3.13.16 Herstellung von subtraktiven cDNA-Banken mit Hilfe des "Clontech PCR-Select™ cDNA-Subtraction Kits"

Die subtraktive Hybridisierung ermöglicht den Vergleich von zwei doppelsträngigen cDNA-Populationen und die Isolierung von Genen, die in der einen Population stärker vertreten sind als in der anderen (Diatchenko et al. 1996). Für die Herstellung von subtrahierten cDNA-Banken wurde das „Clontech PCR-Select™ cDNA-Subtraction Kit“ Reagenzsystem (Clontech) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die cDNA, welche die differentiellen Transkripte enthält, wird "Tester", die Referenz-cDNA "Driver" genannt. Beide werden mit dem Restriktionsenzym RsaI geschnitten. Die kürzeren, glatt gespaltenen cDNA-Fragmente ermöglichen die Ligation von Adaptoren (s. Abb. 3-1) und sind für die subtraktive Hybridisierung geeignet. An die experimentelle Tester cDNA werden in zwei getrennten Ansätzen die Adaptoren 1 und 2R (vgl. Abb. 3-1 und Abb. 3-2) ligiert (*Tester_{T-1}* und *Tester_{T-2R}*). Die Enden der Adaptoren tragen keine Phosphatgruppe, so dass sie nur an die 5'-Enden der cDNA-Fragmente ligiert werden können. In einem ersten Hybridisierungsschritt werden *Tester_{T-1}* und *Tester_{T-2R}* jeweils mit einem 25-fachen Überschuss von Driver cDNA hitzedenaturiert und 8 h zum Annealen bei 68°C inkubiert. Dabei bilden sich verschiedene Hybrid-Typen und Einzelstränge (s. Abb. 3-2, a, b, c, d) in Abhängigkeit von der Häufigkeit und der Verteilung der cDNA-Fragmente. Differentielle und gering konzentrierte Sequenzen treffen seltener auf ihre komplementäre Sequenz und reichern sich so unter den verbliebenen einzelsträngigen cDNA-Fragmenten an (vgl. Abb. 3-2, a) (Gurskaya et al. 1996).

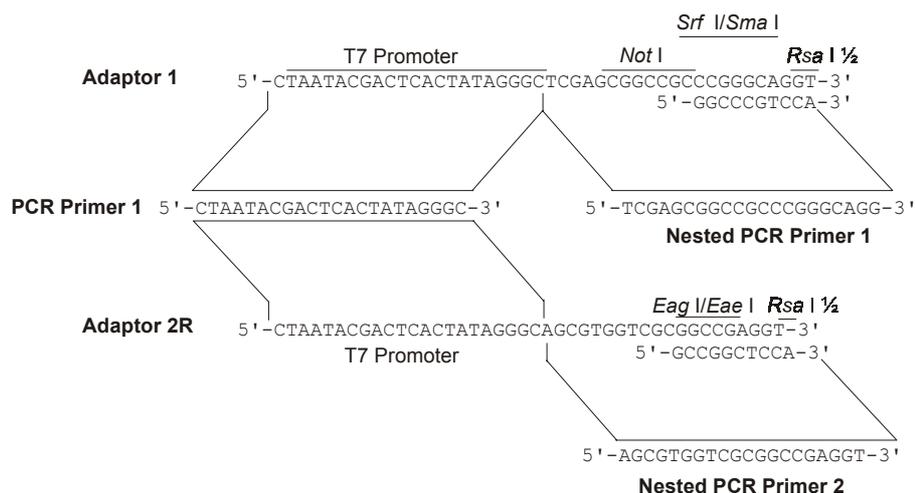


Abb. 3-1: Sequenzen der Adaptern und der PCR Primer in der subtraktiven *suppression*-PCR. Die Ligation der Adaptern an RsaI gespaltene cDNA stellt die RsaI Schnittstelle wieder her. Modifiziert nach Diatchenko et al. (1996).

In einem zweiten Hybridisierungsschritt werden die beiden Ansätze der ersten Hybridisierung ohne Denaturierung miteinander inkubiert, so dass die subtrahierten einzelsträngigen Tester cDNAs reassoziieren und neue Hybridmoleküle mit unterschiedlichen Enden (entsprechen den beiden unterschiedlichen Adaptern) formen können (s. Abb. 3-2, e). Die gleichzeitige Zugabe von frisch denaturiertem „Driver“ forciert die weitere Anreicherung von differentiell exprimierten Sequenzen. Die überstehenden Enden der Hybridmoleküle werden mittels DNA-Polymerase Reaktion aufgefüllt. Durch die anschließende erste *suppressive* PCR (mit PCR-Primer 1, s. Abb. 3-1) werden nur die Hybridmoleküle exponentiell amplifiziert, die zwei unterschiedliche Adaptern besitzen und differentiell exprimierte Sequenzen repräsentieren. Moleküle mit zwei gleichen Adaptern formen unter den PCR-Bedingungen nicht amplifizierbare "Lasso-Strukturen" (s. Abb. 3-2, b), indem die komplementären Anteile ihrer Adaptern im sogenannten *Suppressions*-Effekt miteinander annealen (Siebert et al. 1995). Die cDNA-Moleküle, die nur auf einer Seite einen Adapter tragen, werden linear amplifiziert (s. Abb. 3-2, c). Ist kein Adapter vorhanden, können die cDNA-Fragmente nicht amplifiziert werden (s. Abb. 3-2, d). In einem zweiten PCR-Schritt mit den beiden Adapter-spezifischen Primern Nested Primer 1 und Nested Primer 2 (s. Abb. 3-1) werden diese differentiell exprimierten Sequenzen weiter angereichert und der Hintergrund reduziert. Die verwendeten Reagentien wurden, soweit nicht anders vermerkt, vom Hersteller bereitgestellt. Für die PCR-Amplifikation wurde das GeneAmp PCR System 2400 von Perkin Elmer benutzt.

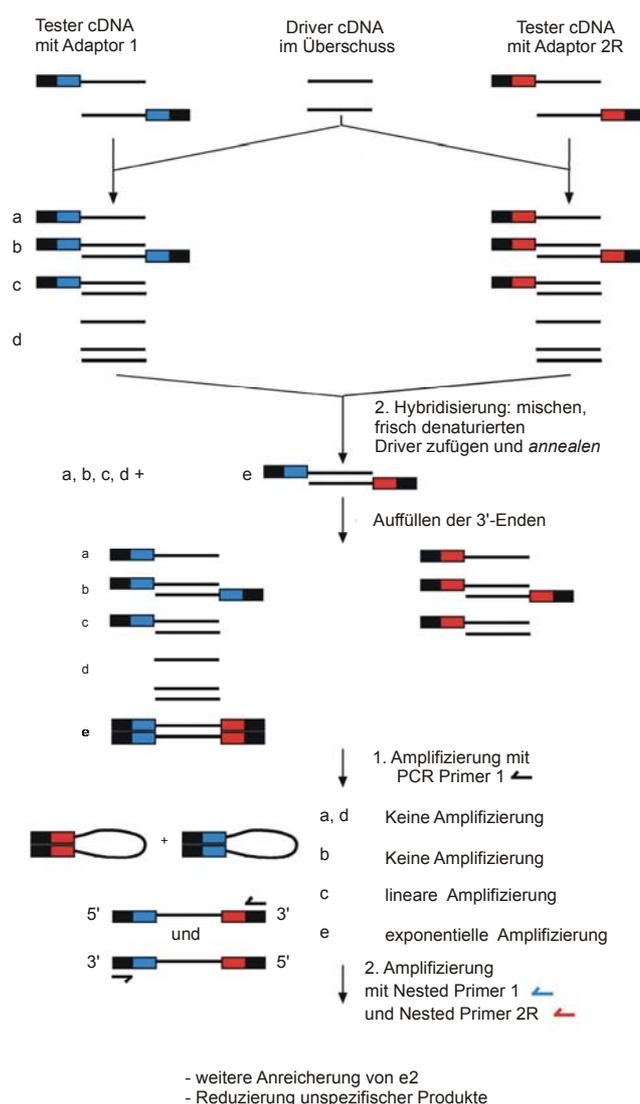


Abb. 3-2: Schematische Darstellung der "PCR-Select cDNA Subtraction" (modifiziert nach Diatchenko et al. 1999). Schwarz ausgefüllte Boxen repräsentieren die äußeren Abschnitte der Adaptor 1 und Adaptor 2R (entsprechen PCR Primer 1). Blaue Boxen stellen den inneren Teil der Adaptersequenz 1 dar und korrespondieren mit der Nested Primer Sequenz 1. Entsprechend stellen rote Boxen den inneren Teil der Adaptersequenz 2R und korrespondieren mit der Nested Primer 2R Sequenz.

Es wurden je 4 µg Poly(A)+ RNA aus aerob behandelten Zellen und aus anaerob dunkel behandelten Zellen zur subtraktiven Hybridisierung eingesetzt. In einer Vorwärts-Subtraktion diente die anaerobe cDNA als Tester, hier sollten Transkripte angereichert werden, die verstärkt unter anaeroben Bedingungen exprimiert werden. In der ebenfalls durchgeführten Rückwärts-Subtraktion zur Anreicherung von aerob stärker exprimierten Transkripten diente aerobe cDNA als Tester.

3.13.16.1 Spaltung der cDNA mit RsaI

Die Tester und Driver cDNA-Fraktionen wurden mit je 15 U RsaI für 2 h bei 37°C gespalten. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde gelelektrophoretisch überprüft. Nach erfolgreicher Spaltung der cDNA-Fragmente wurden diese in Gegenwart von 1,3 M Ammoniumacetat und 75 % Ethanol präzipitiert und in je 11 µl H₂O resuspendiert.

3.13.16.2 Adapterligation an die experimentelle Tester cDNA

Zur Ligation der Adaptern wurde die Tester cDNA auf zwei Ansätze verteilt. Ein Teil wurde mit Adapter 1 (*Tester_{T-1}*), der andere Teil entsprechend mit Adapter 2R (*Tester_{T-2R}*) ligiert. Die Driver cDNA wird nicht ligiert. Für die Ligation wurden 2 µl 1:6 verdünnte Tester cDNA (*Tester_{T-1}* und *Tester_{T-2R}*), 3 µl H₂O, 2 µl 5 x Ligationspuffer, 400 U T4-DNA-Ligase und 2 µl des jeweiligen Adaptors ü. N. bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 µl EDTA/Glykogen (0,2 M EDTA, 1 mg/ml Glykogen) gestoppt und die Ligase 5 min bei 72°C hitzeinaktiviert.

3.13.16.3 Erste und zweite Hybridisierung

Die Adapter-ligierten Tester cDNAs (*Tester_{T-1}* und *Tester_{T-2R}*) wurden einzeln mit je einem 25-fachen Überschuss von Driver cDNA und 4 µl 1 x Hybridisierungspuffer versetzt, für 1,5 min bei 98°C durch Hitze denaturiert und 8 h bei 68°C im Wasserbad inkubiert. In der unmittelbar anschließenden zweiten Hybridisierung wurden die beiden Ansätze der ersten Hybridisierung vermengt (*Tester_{I_H}*). Die Bildung von Hybriden mit zwei unterschiedlichen Adaptern sollte bevorzugt differentiell exprimierte Sequenzen repräsentieren. Die Driver cDNA wurde 90 s bei 98°C in 4 x Hybridisierungspuffer denaturiert. Die Zugabe des Drivers in etwa achtfachem molaren Überschuss und die Vermischung der beiden Tester-Fraktionen wurden so gleichzeitig wie möglich durchgeführt. Die zweite Hybridisierung erfolgte durch Inkubation im Wasserbad bei 68°C ü. N. Danach wurde der Ansatz in 200 µl Dilutionbuffer verdünnt, für 7 min auf 68°C erhitzt und bei -20°C gelagert.

3.13.16.4 Subtraktive *suppression* PCR Amplifikation

Von der unter Abschnitt 3.13.16.2 hergestellten subtrahierten Tester cDNAs wurde 1 µl des 1:200 verdünnten *Testers_{I_H}* und 1 µl der 1:1000 verdünnten Driver cDNA in einem 25 µl PCR-Reaktionsansatz (0,4 µM PCR Primer 1, 0,2 mM dNTPs, 1 x Advantage cDNA Polymerase Mix, 1 x PCR-Reaktionspuffer) zunächst für 5 min auf 75°C erhitzt. In diesem Schritt werden fehlende Stränge komplementär zu den überhängenden Adaptern aufge-

füllt. Danach wurden die differentiellen Sequenzen in 27 PCR-Zyklen "primärer PCR" amplifiziert.

Programm	1. Denaturierung	94°C 25 s
	2. 27 Zyklen	94°C 10 s, 66°C 30 s, 72°C 1,5 min
	3. Kühlen	4°C halten

In der sekundären PCR wurden die 1:10 verdünnten, primären PCR-Produkte in 25 µl Reaktionsansätzen (0,2 mM dNTPs, 1 x Advantage cDNA Polymerase Mix, 1 x PCR-Reaktionspuffer) mit 0,4 µM Nested PCR Primer 1 und 4 µM Nested PCR Primer 2R in 12 Zyklen amplifiziert. Um genug Material für die Sondenherstellung zur Verfügung zu haben, wurde die PCR mit einem Vierfach-Reaktionsansatz durchgeführt.

Programm	1. 12 Zyklen	94°C 10 s, 68°C 30 s, 72°C 1,5 min
	2. Kühlen	4°C halten

Zur Kontrolle der Subtraktionsbedingungen wurden Aliquots der primären und sekundären PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt.

3.13.17 Identifizierung von differentiell exprimierten cDNAs

In den subtrahierten cDNAs sind die seltenen differentiellen Sequenzen angereichert, so dass es bei differentieller Expression zu einem detektierbaren Hybridisierungssignal mit der vorwärts subtrahierten cDNA-Population (*Tester-AA⁻*) kommen kann. Differentielle Kandidaten hybridisieren mit der vorwärts subtrahierten Sonde (*Tester-AA⁻*) stärker als mit der rückwärts subtrahierten (*Tester-A⁻*) Sonde.

3.13.17.1 Herstellung der subtrahierten cDNA-Sonden

Für die cDNA-Sonden wurden jeweils vier identische Ansätze (etwa 100 µl) sekundäres PCR-Produkt (*Tester-AA⁻* und *Tester-A⁻*) vereint. Um unspezifische Hintergrundhybridisierung durch die an die cDNAs ligierten Adaptern zu vermeiden, wurden die Amplifikate der 2. PCR zur Abtrennung der Adaptern mit dem Restriktionsenzym RsaI gespalten. Der Restriktionsansatz wurde phenolisiert und mit Ethanol gefällt. Die Abtrennung der Adaptern erfolgte über das Macherey-Nagel Nucleospin Plasmid Prep Reagenzsystem. Jeweils 200 ng der aerob und anaerob subtrahierten Proben ohne Adaptern wurden von der Firma Hartmann im Rahmen ihres Markierungsservices über „Random priming“ mit einer spezifische Aktivität von $\sim 6 \times 10^9$ cpm/µg radioaktiv markiert (Sonde AA⁻ = radioaktiv mar-

kierte anaerob subtrahierte *Tester-AA⁻*, Sonde A- = radioaktiv markierte aerob subtrahierte *Tester-A⁻*).

3.13.17.2 Hybridisierung mit subtrahierten cDNA-Sonden

Etwa 120.000 Klone einer cDNA-Bank aus anaerob, dunkel angezogenen *Euglena* Zellen wurden mit *E. coli* POP13 auf 40 Platten ausplattiert und auf Nitrocelluloserundfilter (82 mm Durchmesser) transferiert. Für die Hybridisierung mit unterschiedlichen Sonden wurde ein doppelter Satz an Replikafiltern hergestellt. Die Filter wurden bei zweimaligem Pufferwechsel 3 h bei 68°C in 6 x SSPE (900 mM NaCl, 60 mM NaH₂PO₄, 7,5 mM EDTA, pH 7,5), 0,1% (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) PVP90, 0,02 % (w/v) Ficoll 400 und 5 µg/ml Poly A vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte für 16 h bei 68°C in 3 x SSPE, 0,1% (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) PVP90, 0,02 % (w/v) Ficoll 400, 5 µg/ml Poly A und 10 ng/ml Hybridisierungssonde. Ein Filtersatz wurde mit Sonde AA-, der andere mit Sonde A- hybridisiert. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Filter 2 x 45 min in 2 x SSPE, 0,1% SDS gewaschen, getrocknet und auf XAR-Filmen bei -80°C (Kodak) für eine Woche mit Verstärkerfolie exponiert. Die entsprechenden Plaques, die ein positives Signal aufwiesen, wurden mit dem stumpfen Ende einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen, in 500 µl SM-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 0,01% Gelatine) überführt und für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Zur Vereinzlung wurden 1–5 µl einer 1:10.000-Verdünnung dieser Phagensuspensionen ausplattiert. Nach Herstellung von Filtern wurde mit der gleichen Sonde erneut wie zuvor hybridisiert. Die Plaques, die sich eindeutig einem Signal auf dem Röntgenfilm zuweisen liessen, wurden nachfolgend für die Subklonierung in pBluescript SK+ verwendet (Kandidaten_{Plasmid}) und die Sequenzen entsprechend des Didesoxy-Verfahrens (Sanger et al. 1977) ermittelt und über BLAST-Analysen mit bekannten Sequenzen verglichen.

3.13.18 Differentielle, nicht subtrahierte Hybridisierung

3.13.18.1 Synthese von einzelsträngiger radioaktiv markierter cDNA

Die Synthese von radioaktiv markierter einzelsträngiger cDNA erfolgte aus 2 µg Poly(A)+ RNA mit Hilfe des HotScribe™ First-Strand cDNA Labelling Kits (Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben. Für die differentielle Hybridisierung wurden 2 µg Poly(A)+ RNA (1 µg/µl) mit 2 µl H₂O und 2 µl Random nonamer Primer (Kit) versetzt und für 3 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 8 µl 5 x Reverse Transkriptase Puffer, 4 µl 0,1 M DTT, 4 µl dATP/dCTP/dGTP/dTTP- Nukleotid-Mix, 4 µl dCTP-Lösung, 12 µl

α -³²P-dCTP (> 3000 Ci/mMol) und 2 μ l CyScript™ Reverse Transkriptase erfolgte die Erststrangsynthese in einem Gesamtvolumen von 40 μ l bei 42°C für 90 min. Nach Beendigung der Synthesereaktion wurde die einzelsträngige cDNA über eine Sephadex-G50 Sonde aufgereinigt. 400 μ l Eluat wurden mit 100 μ l 2,5 M NaOH für 15 min bei 37°C denaturiert, mit 250 μ l HEPES neutralisiert und zur Hybridisierung (s. Abschnitt 3.13.10) eingesetzt.

3.13.18.2 Hybridisierung mit einzelsträngigen cDNA-Sonden

Etwa 160.000 Klone einer cDNA-Bank aus anaerob, dunkel angezogenen Zellen wurden mit *E. coli* POP13 auf 40 Platten ausplattiert, auf Nitrocellulosefilter (82 mm Durchmesser) transferiert und ein doppelter Satz an Replikafiltern hergestellt. Ein Filtersatz wurde mit radioaktiv markierter einzelsträngiger cDNA aus Poly(A)+ RNA aus aerob kultivierten Zellen hybridisiert, der zweite Filtersatz wurde mit radioaktiv markierter einzelsträngiger cDNA aus Poly(A)+ RNA aus anaerob, dunkel angezogenen Zellen hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte wie unter Abschnitt 3.13.17.2 angegeben, abweichend wurde 24 h hybridisiert. Die Plaques, die sich eindeutig einem Signal auf dem Röntgenfilm zuweisen liessen, wurden nachfolgend für die Subklonierung in pBluescript SK+ verwendet (Kandidaten_{plasmid}) und die Sequenzen entsprechend des Didesoxy-Verfahrens (Sanger et al. 1977) ermittelt und über BLAST-Analysen mit bekannten Sequenzen verglichen.

3.13.19 Dot Blot Hybridisierung

3.13.19.1 Herstellung der Dot Blots

Für die Herstellung der Dot Blots wurden die Kandidaten_{plasmid} (siehe Abschnitt 3.13.17.2 und 3.13.18.2) zunächst mit TE auf eine Konzentration von 100 ng/ μ l verdünnt. Mit Hilfe einer Dot Blot Apparatur (V und P Scientific, Inc. San Diego) wurden 2,5 μ l der verdünnten Plasmid-DNA (250 ng) auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham Biosciences) transferiert. Zur Kontrolle wurde jede Plasmid-DNA zweimal aufgetragen. Nachfolgend wurde die DNA für 10 min in Southern I (0,5 M NaOH, 1 M NaCl) denaturiert, für weitere 10 min in Southern II (0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 3 M NaCl) neutralisiert und schließlich in 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Trinatriumcitrat, pH 7,0) äquilibriert. Die Fixierung der DNA erfolgte durch Hitze bei 80°C für 45 min.

3.13.19.2 Hybridisierung der Dot Blots

Die Dot Blots wurden mit einzelsträngigen cDNA-Sonden aus aeroben und anaeroben Kulturen (s. Abschnitt 3.13.18.1) wie unter Abschnitt 3.13.17.2 beschrieben hybridisiert. Nach Waschen des Dot Blots mit 2 x SSPE, 0,1% (w/v) SDS wurde die Membran gründlich getrocknet und in Frischhaltefolie eingeschweißt.

3.13.19.3 Quantifizierung der Hybridisierungssignale

Zur Quantifizierung der Hybridisierungssignale wurden die in Folie eingeschweißten Dot Blots für ca. 8 h bei RT mit strahlungssensitiven Imager-Platten (BAS-IP-MS 2340) belegt und mit einem Bio-Imager (Bio-Imager Fuji FLA 3000/2R) mit dem Image Reader V1.8E Programm eingelesen. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit dem Programm Image Gauge V3.0. Anhand der Signalstärke wurden positive Klone ermittelt. Dabei wurde ein Kandidat dann als positiv eingestuft, wenn sein Signal relativ zur entgegengesetzt subtrahierten Sonde um mindestens den Faktor zwei intensiver war.

3.14 Bioinformatische Methoden

3.14.1 Sequenzanalyse

Zur Eingabe, Analyse und weiteren Bearbeitung der Sequenzen wurde das GCG Programm-Paket in der Version 10.0 der Genetics Computer Group, University of Wisconsin, verwendet (Devereux et al. 1984).

3.14.2 Datenbankvergleiche

Für die Suche nach homologen Sequenzen in Sequenz-Datenbanken wurden die BLASTn, tBLASTn, BLASTp und tBLASTx Programme des BLAST2 (basic local alignment tool)-Paketes am NCBI (Web-Interface) verwendet (Altschul et al. 1990). Zusätzlich wurden Optionen zur BLAST-Suche in Sequenz-Datenbanken und Genomprojekten folgender anderer Institute über das Webinterface genutzt:

- TIGR comprehensive microbial resource (CMR): <http://www.tigr.org/tdb/>,
- EBI Parasite WU-Blast2: <http://www.ebi.ac.uk/blast2/parasites.html>,
- CBI Blast with Microbial genomes: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/genom_table.cgi?organism=euk

3.14.3 Multiple Alignments

Für die Erstellung multipler Alignments wurde das Programm ClustalW Version 1,5 (Thompson, Higgins und Gibson 1994) verwendet. Für die automatische Entfernung von Positionen im Alignment, an denen eine oder mehrere Sequenzen keine Aminosäure aufwiesen (engl. *gaps*), wurden die Sequenzen über das Programm *clus2mol* (MOLPHY Version 2.3, Adachi und Hasegawa, 1996) in das MOLPHY-Format umgewandelt und in einem zweiten Schritt mit dem Programm *rmsindel* des MOLPHY-Programms alle Spalten in dem Alignment gelöscht, die mindestens eine Lücke (*gap*) enthalten.

3.14.4 Phylogenetische Analysen

Nach der Erstellung und Kontrolle der multiplen Alignments wurden diese mit dem Programm ClustalW für die weiteren phylogenetischen Analysen in das PHYLIP-Format umgeschrieben (Felsenstein 1980). Maximum-Likelihood Analysen der Protein-Alignments wurden mit dem Programm PROTML (Adachi und Hasegawa 1996) in MOLPHY unter Verwendung der heuristischen *quick-add OTU search* und *local-rearrangement* Methoden auf Basis der JTT-F Substitutionsmatrize durchgeführt. PROTML führt kein Bootstrapping durch, sondern schätzt mit der REL (resampling of estimated log-likelihood) Methode einen Wert für 1000 Replikationen ab (Hasegawa und Kishino 1994). Bootstrap Analysen wurden mit dem Programm *seqboot* des PHYLIP-Paketes auf der Basis von 100 Stichproben durchgeführt. Ferner wurde das Programm-Paket PUZZLE (Strimmer und von Haeseler 1997) zur Überprüfung eingesetzt, ob die Aminosäurezusammensetzung einzelner Sequenzen signifikant von der des gesamten Datensatzes abweicht. Der phylogenetische Baum wurde anhand der berechneten Daten mit dem Programm TreeView dargestellt und mit Hilfe von Grafikprogrammen nachbearbeitet.

3.14.5 Voraussagen über mögliche Transitpeptide

Aminotermini einzelner Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des MitoProtII- (Claros und Vincens 1996) (<http://www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/proj/medgen/mitofilter>) und des iPSORT Programms (Bannai et al. 2001, Bannai et al. 2002) (<http://psort.nibb.ac.jp/>) auf mögliche mitochondriale Importsequenzen überprüft.

3.15 Verwendete Oligonukleotide

Nachfolgend sind Oligonukleotide aufgeführt, die für Sequenzier- und Hybridisierungsreaktionen eingesetzt wurden. Oligonukleotide, die für PCR-Reaktionen zur Amplifikation Gen-spezifischer Sonden eingesetzt wurden, sind im entsprechenden Abschnitt gesondert aufgeführt. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion und MWG-Biotech synthetisiert.

Tab. 3-1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten internen Sequenzierprimer, fluoreszenz-markierten Sequenzierprimer und Oligonukleotide

Interne Sequenzierprimer	Sequenz
SeqPNOExoklon1r:	5' –GGC TGC AAC GTG GAT GAC AG– 3'
SeqPNOExoklon22r	5' –CCA ACG TCA GCA ACG TCG A– 3'
SeqPNOExoklon33r	5' –CTT GGG GTC ATC TCG GCT G– 3'
SeqPNO_gap2-3	5' –GGA TGG GCT ATG CTG TG– 3'
SeqPNO_gap5-6	5' –GTG GAC CTT CTT GTG AAG– 3'
SeqPNO_gap35	5' –AAC CCT CTA ACC ACC AC– 3'
fluoreszenz-markierte Sequenzierprimer	
M13(24)for	5'-IRD700-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3'
M13(24)rev	5'-IRD800-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'
Oligonukleotide für Oligohybridisierungen	
PDH-E1 α _Hyb	5' –AAT CTC CTT GTC CAC CTC CTT GTT AGT CTC CTT CTC GAC TGC CTT– 3'
PDH-E2_Hyb	5' –TTT CAA ATC AGC ATT GTA GAC AAC TGG GGT GAT CAG TCC GTT– 3'
PDH-E3_Hyb	5' –CCT TGG AAG GGG ACA AGA AGG TGA AGG TCG TTG GAG AAA CGA– 3'

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung, Sequenzierung und Expressionsanalyse der Pyruvat: NADP⁺ Oxidoreduktase (PNO) aus *Euglena gracilis*

Trotz umfassender biochemischer Charakterisierung der aufgereinigten PNO aus isolierten Mitochondrien von *Euglena gracilis* konnte die Sequenz dieses Enzyms bisher nicht ermittelt werden. Um seine mögliche Homologie zur PFO mittels Sequenzvergleichen und phylogenetischer Analysen zu überprüfen, war ein Ziel dieser Arbeit die Klonierung und Sequenzierung des Gens für die PNO aus *Euglena*.

4.1.1 PCR-Amplifikation und Subklonierung einer PFO-spezifischen DNA-Sonde

4.1.1.1 Auswahl der PCR-Primer

In Sequenzdatenbanken verfügbare prokaryotische und eukaryotische Aminosäuresequenzen der Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase wurden mit geeigneten Programmen (GCG, ClustalW) bearbeitet, um eine Einrastrung (Sequenz-Alignment) der homologen Sequenzregionen zu erhalten. Zur Amplifizierung PFO-spezifischer DNA-Sonden wurden Kombinationen degenerierter Primer gegen die konservierten Aminosäuremotive LFEDNAEFG(F/YW)G, GGDGWAYDIG(F/Y) und TE(M/V)YSNTGGQ eingesetzt. Die Primer für die Amplifizierung der Gensonde mit Angabe der gemittelten Schmelztemperaturen und Degeneriertheit können Tab. 4-1 entnommen werden.

Tab. 4-1: PCR-Primer für die Amplifizierung der Gensonde für die *Euglena* PNO

Bezeichnung	Sequenz	Degeneriertheit	T _m
pno1F953	5' TITTYGARGAYAA YGCIGARTTYGGITTYGG 3'	128x	64,4°C
pno2R1095	5' AAICCDATRTCRTAIGCCCAICCRTCICC 3'	24x	66,0°C
pno3R1125	5' GICCICIGTRTTISWR TACATYTCRTC 3'	64x	64,8°C

Y: C oder T R: A oder G
S: C oder G D: nicht C

W: A oder T I: Inosin

Inosin (I) wurde an vierfach degenerierten Positionen verwendet. Die Schmelztemperaturen $T_{m(\min)}$ und $T_{m(\max)}$ wurden für die Primer nach der folgenden Formel geschätzt [$T_m = 69.3 + GC\% \cdot 0.41 - 650/(nA+nC+nG+nT)$]. Die Degeneriertheit wurde ohne Berücksichtigung von Inosin berechnet. Die Redundanz der Primer wurde durch die für *Euglena* beobachtete Codon-Präferenz für G+C-reiche Synonyme herabgesetzt.

4.1.1.2 Optimierung der PCR-Parameter

Bei der PCR mit degenerierten Primern bedingt ein hohes Maß an Degeneriertheit eine Herabsetzung der Konzentration des homologen Primers im Reaktionsansatz. Die Primerkonzentration in den Versuchen zur Isolierung einer homologen PNO-Sonde aus *Euglena* wurde daher im Vergleich zu den für nicht-degenerierte PCR-Primer üblichen Standardkonzentrationen von 0,1 bis 0,5 μM (Standard PCR Protokoll Qiagen, 7/97) auf 1,6 μM erhöht. Aufgrund des erhöhten GC-Gehaltes der *Euglena*-DNA (Henze et al. 1995) wurden auch die Parameter für die Denaturierung optimiert. Die Denaturierungstemperatur wurde auf 95°C erhöht und eine anfängliche Denaturierung von 10 min bei 98°C eingesetzt. Die Taq-Polymerase wurde erst nach dieser anfänglichen Denaturierung zugesetzt. Für das *Annealing* der Primer musste die optimale Temperatur in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Primer sowie der jeweiligen erzielten Ergebnisse empirisch ermittelt werden. Aufgrund der Degeneriertheit der Primer konnte ihre Schmelztemperatur nicht genau ermittelt, sondern nur über Berechnung des Minimal- und Maximalwertes abgeschätzt werden. Alle weiteren PCR-Bedingungen entsprachen den Standardbedingungen (vgl. Abschnitt 3.13.4.1).

4.1.1.3 Ergebnisse der PCR-Reaktionen

Mittels der Primerkombination pno1F953 und pno2R1095 wurde ein 695 bp umfassendes PCR-Produkt amplifiziert. Die Kombination von Primer pno1F953 mit pno3R1125 ergab ein 850 bp großes PCR-Amplifikat (s. Abb. 4-1). Beide Amplifikate lagen deutlich über den gemäß des Sequenz-Alignments zu erwartenden Größen von ~300 bp für die erste Primerkombination und ~400 bp für die zweite Primerkombination. Für beide Kombinationen von Primern wurden 30 Zyklen mit 30 s bei 95°C, 30 s bei 67°C und 1 min bei 72°C durchgeführt. Es wurden pro Reaktionsansatz je 10 ng genomische DNA als Matrize und 40 pmol der jeweiligen Primer eingesetzt (vgl. Abschnitt 3.13.4.1). Bei Einsatz von cDNA als Matrize konnte unter identischen Reaktionsbedin-

gungen kein Produkt amplifiziert werden. Die Kontrollen ohne DNA sowie mit jeweils nur einem Primer führten zu keiner Amplifikation von PCR-Produkten.

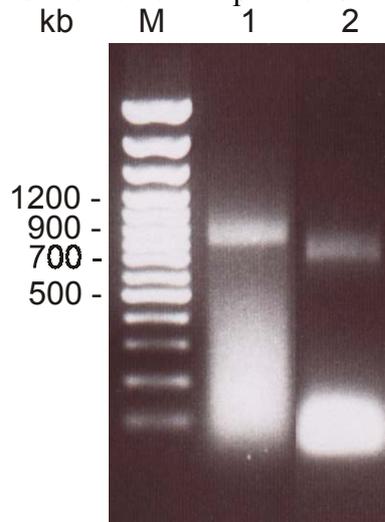


Abb. 4-1: Mittels PCR amplifizierte PNO-Fragmente. M: Größenstandard. Spur 1: PCR-Ansatz mit Primerkombination pno1F- pno2R. Substrat: *Euglena* genomische DNA. Spur 2: PCR-Ansatz mit Primerkombination pno1F – pno3R. Substrat: *Euglena* genomische DNA.

Eine unspezifische Amplifikation mit nur einem Primer konnte daher ausgeschlossen werden. Die Fragmente wurden reamplifiziert (s. Abschnitt 3.13.4.2) und in den Vektor pBluescript SK+ subkloniert (vgl. Abschnitt 3.13.4.3). Je drei Subklone mit der zu erwartenden Größe von ~700 bp bzw. ~850 bp wurden sequenziert. Die Klone waren jeweils untereinander identisch, jedoch nur das mit Hilfe der Primerkombination pno1F953 – pno2R195 erhaltene Amplifikat konnte durch Sequenzdatenbank-Vergleiche mit anderen PFO-Sequenzen als eine PFO-homologe Sequenz identifiziert werden. Das ~700 bp große Fragment zeigte auf Nukleinsäureebene etwa 50 % Sequenzidentität zu anderen bekannten eukaryotischen und eubakteriellen PFO. Von Klon PCR1F/2R_PFO2 wurde eine Plasmid-Großkultur hergestellt und die Insertion nach Restriktionsspaltung mit XhoI/ClaI durch Gelelektrophorese und anschließende Elektroelution isoliert. Die Sequenzierung von Klon PCR1F/2R_PFO2 ergab einen PFO-kodierenden Bereich von insgesamt 300 bp, der von zwei Introns der Größe von 221 bp und 174 bp unterbrochen wurde. Da für die Fragestellung die Intronsequenzen weniger interessant sind als die Sequenzen des kodierten Proteins selbst, wurde nachfolgend der Ansatz der cDNA-Klonierung dem genomischen Ansatz vorgezogen. Das ~700 bp Fragment wurde nachfolgend radioaktiv markiert und als Sonde gegen eine cDNA-Bank aus aerob angezogenen Kulturen von *Euglena gracilis* eingesetzt (vgl.

Abschnitt 3.13.8 und 3.13.10). Die spezifische Aktivität der Sonde betrug $4,5 \times 10^7$ cpm/ μ g.

4.1.2 Isolierung der cDNA für die PNO aus einer cDNA-Bank von aerob angezogenen *Euglena*-Kulturen

Durch homologe Hybridisierung von 200.000 rekombinanten cDNA-Klonen der *Euglena* cDNA-Bank wurden 30 unabhängige Klone identifiziert, die mit der Sonde hybridisierten. Diese Klone wurden nach Protokoll des Herstellers *in vivo* exzisiert (s. Abschnitt 3.13.10) und nachfolgend terminal von beiden Enden ansequenziert. Von diesen cDNA-Insertionen zeigten 13 in Sequenzdatenbank-Vergleichen Homologien zur PFO und waren fernerhin in sich überlappenden Bereichen identisch. Diese Klone repräsentierten somit das gleiche Transkript und unterschieden sich lediglich in ihrer Größe voneinander. Die Klone pEgPNO12 (5840 bp) und pEgPNO3 (5812 bp) wiesen im 5'-Bereich im Vergleich mit dem N-Terminus des reifen Proteins (Inui et al. 1991) die vollständige Länge auf (vgl. Abb. 4-3)

4.1.3 Sequenzierung und molekulare Charakterisierung der PNO cDNA

Der Klon pEgPNO3 wurde über Exonuklease III-Deletionen doppelsträngig sequenziert (vgl. Abschnitt 3.13.14). Zur Erstellung der Deletionsmutanten wurde SalI als erstes und HindIII als zweites Restriktionsenzym ausgewählt, die beide nicht in der Insertion schneiden. Die nach Transformation aus *E. coli* NM522 isolierten Plasmide wurden durch Restriktionsspaltung mit EcoRI und XhoI auf die Länge ihrer Insertionen überprüft. Eine Auswahl von 35 Deletionsmutanten abnehmender Länge wurde für die radioaktive Sequenzierung ausgewählt. Durch Sequenzierung der überlappenden Deletionsplasmide und das Schließen von Lücken mittels interner Sequenzierprimer (s. Abschnitt 3.15) wurde der Klon pEgPNO3 komplett sequenziert. Die Nukleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz sind in Abb. 4-2 dargestellt.

```
tacaacATGAAGCAGTCTGTCCGCCAATTATTTCCAATGTACTGCGCAAGGAGGTTGCT      60
      M K Q S V R P I I S N V L R K E V A
CTGTACTCAACAATCATTGGACAAGACAAGGGGAAGGAACCAACTGGTTCGAACATACACC      120
L Y S T I I G Q D K G K E P T G R T Y T
AGTGGCCCAAACCGGCATCTCACATTGAAGTTCCCCATCATGTGACTGTGCCTGCCACT      180
S G P K P A S H I E V P H H V T V P A T
GACCGCACCCCGAATCCCGATGCTCAATTCTTTTCAGTCTGTAGATGGGTCAACAAGCCACC      240
D R T P N P D A Q F F Q S V D G S Q A T
AGTCACGTTGCGTACGCTCTGTCTGACACAGCGTTTCAATTTACCCAATTACACCCAGTTCT      300
S H V A Y A L S D T A F I Y P I T P S S
GTGATGGGCGAGCTGGCTGATGTTTGGATGGCTCAAGGGAGGAAGAACGCCTTTGGTCAG      360
```

V M G E L A D V W M A Q G R K N A F G Q
GTTGTGGATGTCCGTGAGATGCAATCTGAGGCTGGAGCCGCAGGCGCCCTGCATGGGGCA 420
V V D V R E M Q S E A G A A G A L H G A
CTGGCTGCTGGAGCCATTGCTACAACCTTCACTGCCTCTCAAGGGTTGTTGTTGATGATT 480
L A A G A I A T T F T A S Q G L L L M I
CCCAACATGTATAAGATTGCAGGTGAGCTGATGCCCTCTGTCCATCCACGTTGCAGCCCGA 540
P N M Y K I A G E L M P S V I H V A A R
GAGCTTGCAGGCCACGCTCTGTCCATTTTTGGAGGACACGCTGATGTCATGGCTGTCCGC 600
E L A G H A L S I F G G H A D V M A V R
CAAACAGGATGGGCTATGCTGTGCTCCCACACAGTGCAGCAGTCTCACGACATGGCTCTC 660
Q T G W A M L C S H T V Q Q S H D M A L
ATCTCCACGTGGCCACCTCAAGTCCAGCATCCCCTTCGTTCACTTCTTTGATGGTTTC 720
I S H V A T L K S S I P F V H F F D G F
CGCACAAGCCACGAAGTGAACAAAATCAAATGCTGCCTTATGCAGAAGTGAAGAAACTG 780
R T S H E V N K I K M L P Y A E L K K L
GTGCCCTCCTGGCACCATGGAACAGCACTGGGCTCGTTCGCTGAACCCCATGCACCCACC 840
V P P G T M E Q H W A R S L N P M H P T
ATCCGAGGAACAAACCAGTCTGCAGACATCTACTTCCAGAATATGGAAAGTGCAAACCAG 900
I R G T N Q S A D I Y F Q N M E S A N Q
TACTACACTGATCTGGCCGAGGTCGTTCCAGGAGACAATGGACGAAGTTGCACCATAACATC 960
Y Y T D L A E V V Q E T M D E V A P Y I
GGTCGCCACTACAAGATCTTTGAGTATGTTGGTGCACCAGATGCAGAAGAAGTGACAGTG 1020
G R H Y K I F E Y V G A P D A E E V T V
CTCATGGGTTCTGGTGAACCACAGTCAACGAGGCAGTGGACCTTCTTGTGAAGCGTGA 1080
L M G S G A T T V N E A V D L L V K R G
AAGAAGTTGGTGCAGTCTTGGTGCACCTCTACCGACCATGGTCAACAAAGGCATTTGAA 1140
K K V G A V L V H L Y R P W S T K A F E
AAGTCCCTGCCAAGACAGTGAAGCGCATTGCTGCTCTGGATCGCTGCAAGGAGGTGACT 1200
K V L P K T V K R I A A L D R C K E V T
GCACTGGGTGAGCCTCTGTATCTGGATGTGTGCGCAACTCTGAATTTGTTCCCGGAACGC 1260
A L G E P L Y L D V S A T L N L F P E R
CAGAATGTGAAAGTCATTGGAGGACGTTACGGATTGGGCTCAAAGGATTTTCATCCCGGAG 1320
Q N V K V I G G R Y G L G S K D F I P E
CATGCCCTGGCAATTTACGCCAACTTGGCCAGCGAGAACCCCATTCAAAGATTCACTGTG 1380
H A L A I Y A N L A S E N P I Q R F T V
GGTATCACAGATGATGTCACTGGCACATCCGTTCCCTTTCGTCAACGAGCGTGTGACACG 1440
G I T D D V T G T S V P F V N E R V D T
TTGCCCCGAGGGCACCCGCCAGTGTGTCTTCTGGGGAATTGGTTTCAGATGGAACAGTGGGA 1500
L P E G T R Q C V F W G I G S D G T V G
GCCAATCGCTCTGCCGTGAGAATCATTGGAGACAACAGCGATTTGATGGTTTCAGGCCTAC 1560
A N R S A V R I I G D N S D L M V Q A Y
TTCCAATTTGATGCTTTCAAGTCAAGTGGTGTCACTTCCCTCGCATCTCCGTTTTGGACCA 1620
F Q F D A F K S G G V T S S H L R F G P
AAGCCCATCACAGCGCAATACCTTGTACCAATGCTGACTACATCGCGTGCCACTTCCAG 1680
K P I T A Q Y L V T N A D Y I A C H F Q
GAGTATGTCAAGCGCTTTGACATGCTTGATGCCATCCGTGAGGGGGGCACCTTTGTTCTC 1740
E Y V K R F D M L D A I R E G G T F V L
AATTCTCGGTGGACCACGGAGGACATGGAGAAGGAGATTCCGGCTGACTTCCGGCGCAAC 1800
N S R W T T E D M E K E I P A D F R R N
GTGGCACAGAAGAAGTCCGCTTCTACAATGTGGATGCTCGAAAGATCTGTGACAGTTTTT 1860
V A Q K K V R F Y N V D A R K I C D S F
GGTCTTGGGAAGCGCATCAATATGCTGATGCAGGCTTGTCTTCAAGCTGTCTGGGGTG 1920
G L G K R I N M L M Q A C F F K L S G V
CTCCCCTGGCCGAAGCTCAGCGGCTGCTGAACGAGTCCATTGTGCATGAGTATGGAAAG 1980
L P L A E A Q R L L N E S I V H E Y G K
AAGGGTGGCAAGGTGGTGGAGATGAACCAAGCAGTGGTGAATGCTGTCTTTGCTGGTGAC 2040
K G G K V V E M N Q A V V N A V F A G D
CTGCCCCAGGAAGTTCAAGTCCCTGCCGCTGGGCAAACGCAGTTGATACATCCACCCGT 2100
L P Q E V Q V P A A W A N A V D T S T R

ACCCCCACCGGGATTGAGTTTGTGACAAGATCATGCGCCCGCTGATGGATTTCAAGGGT 2160
T P T G I E F V D K I M R P L M D F K G
GACCAGCTCCCAGTCAGTGTGATGACTCCTGGTGAACCTTCCCTGTGCGGACAACACAG 2220
D Q L P V S V M T P G G T F P V G T T Q
TATGCCAAGCGTGAATTGCTGCTTTTCATTCCCCAGTGGATTCCCTGCCAACTGCACACAG 2280
Y A K R A I A A F I P Q W I P A N C T Q
TGCAACTATTGTTTCGTATGTTTGCCCCACGCCACCATCCGACCTTTTCGTGCTGACAGAC 2340
C N Y C S Y V C P H A T I R P F V L T D
CAGGAGGTGCAGCTGGCCCCGAGAGCTTTGTGACACGCAAGGCGAAGGGTGATTACCAG 2400
Q E V Q L A P E S F V T R K A K G D Y Q
GGGATGAATTTCCGCATCCAAGTTGCTCCTGAGGATTGCACTGGCTGCCAGGTGTGCGTG 2460
G M N F R I Q V A P E D C T T G C Q V C V
GAGAGTGGCCCGATGCCCCTGGAGATGACCGACGCTTTACCGCCACCCCTGTGCAA 2520
E T C P D D A L E M T D A F T A T P V Q
CGCACCAACTGGGAGTTCGCCATCAAGGTGCCCAACCGCGGCACCATGACGGACCGCTAC 2580
R T N W E F A I K V P N R G T M T D R Y
TCCCTGAAGGGCAGCCAGTTCAGCAGCCCCCTCCTGGAGTTCTCCGGGGCCTGCGAGGGC 2640
S L K G S Q F Q Q P L L E F S G A C E G
TGCGGCGAGACCCCATATGTCAAGCTGCTCACCCAGCTCTTCGGCGAGCGGACGGTCATC 2700
C G E T P Y V K L L T Q L F G E R T V I
GCCAACGCCACCGGCTGCAGTTCATCTGGGGTGGCACTGCCGGCCTGGCGCCGTACACC 2760
A N A T G C S S I W G G T A G L A P Y T
ACCAACGCCAAGGGCCAGGGCCCCGGCCTGGGGCAACAGCCTGTTTCGAGGACAACGCCGAG 2820
T N A K G Q G P A W G N S L F E D N A E
TTCGGCTTTGGCATTGCAGTGGCCAACGCCCAGAAGAGGTCCCAGCTGAGGGACTGCATC 2880
F G F G I A V A N A Q K R S R V R D C I
CTGCAGGCAGTGGAGAAGAAGGTCCCGCATGAGGGTTTGACCACATTGTTGGCGCAATGG 2940
L Q A V T E K K V A D E G L T T L L A A Q W
CTGCAGATTGGAACACAGGAGACAAGACCTTGAAGTACCAAGACCAGATCATTGCAGGG 3000
L Q D W N T G D K T L K Y Q D Q I I A G
CTGGCACAGCAGCGCAGCAAGGATCCCCCTTCTGGAGCAGATCTATGGCATGAAGGACATG 3060
L A Q Q R S K D P L L E Q I Y G M K D M
CTGCCTAACATCAGCCAGTGGATCATTGGTGGTATGGCTGGGCCAACGACATTGGTTTC 3120
L P N I S Q W I I G G D G W A N D I G F
GGTGGGCTGGACCACGTGCTGGCCTCTGGGCAGAACCTCAACGTCCTGGTGCTGGACACC 3180
G G L D H V L A S G Q N L N V L V L D T
GAGATGTACAGCAACACCGGTGGGCAGGCCTCCAAGTCCACCCACATGGCCTCTGTGGCC 3240
E M Y S N T G G Q A S K S T H M A S V A
AAGTTTGGCCCTGGGAGGGAAGCGCACCAACAAGAAGAACTTGACGGAGATGGCAATGAGC 3300
K F A L G G K R T N K K N L T E M A M S
TATGGCAACGTCTATGTGGCCACCGTCTCCCATGGCAACATGGCCCAGTGGCTCAAGGCG 3360
Y G N V Y V A T V S H G N M A Q C V K A
TTTGTGGAGGCTGAGTCTTATGATGGACCTTCGCTCATTGTTGGCTATGCGCCATGCATC 3420
F V E A E S Y D G P S L I V G Y A P C I
GAGCATGGTCTGCGTGTGGTATGGCAAGGATGGTTCAAGAGTCTGAGGCTGCCATCGCC 3480
E H G R A G M A R M V Q E S E A A I A
ACGGGATACTGGCCCCTGTACCGCTTTGACCCCCGCTGGCGACCGAGGGCAAGAACCCC 3540
T G Y W P L Y R F D P R L A T E G K N P
TTCCAGCTGGACTCCAAGCGCATCAAGGGCAACCTGCAGGAGTACCTGGACCGCCAGAAC 3600
F Q L D S K R I K G N L Q E Y L D R Q N
CGGTATGTCAACCTGAAGAAGAACAACCCGAAGGGTGCAGGATCTGCTGAAGTCTCAGATG 3660
R Y V N L K K N N P K G A D L L K S Q M
GCCGACAACATCACCGCCCGGTTCAACCGCTACCGACGCATGTTGGAGGGCCCCAATACA 3720
A D N I T A R F N R Y R R M L E G P N T
AAAGCCGCCGCCCCAGCGGCAACCATGTGACCATCCTGTACGGCTCCGAACTGGCAAC 3780
K A A A P S G N H V T I L Y G S E T G N
AGTGAGGGTCTGGCAAAGGAGCTGGCCACCGACTTCGAGCGCCGGGAGTACTCCGTCGCA 3840
S E G L A K E L A T D F E R R E Y S V A
GTGCAGGCTTTGGATGACATCGACGTTGCTGACTTGGAGAACATGGGCTTCGTGGTCATT 3900

V Q A L D D I D V A D L E N M G F V V I 3960
 GCGGTGTCCACCTGTGGGCAGGGACAGTTCCCCCGCAACAGCCAGCTGTTCTGGCGGGAG
 A V S T C G Q G Q F P R N S Q L F W R E 4020
 CTGCAGCGGGACAAGCCTGAGGGCTGGCTGAAGAAGTTGAAGTACACTGTCTTCGGGGCTG
 L Q R D K P E G W L K N L K Y T V F G L 4080
 GGCGACAGCACATACTACTTCTACTGCCACACCGCCAAGCAGATCGACGCTCGCCTGGCC
 G D S T Y Y F Y C H T A K Q I D A R L A 4140
 GCCTTGGGCGCTCAGCGGGTGGTGGCCATTGGCTTCGGCGACGATGGGGATGAGGACATG
 A L G A Q R V V P I G F G D D G D E D M 4200
 TTCCACACCGGCTTCAACAAGTGGATCCCCAGTGTGTGGAATGAGCTCAAGACCAAGACT
 F H T G F N N W I P S V W N E L K T K T 4260
 CCGGAGAAGCTGTTACCCCGAGCATCGCCGTGCAGCTCACCCCCAACGCCACCCCG
 P E E A L F T P S I A V Q L T P N A T P 4320
 CAGGATTTCCATTTCCGCAAGTCCACCCAGTGCTGTCCATCACCGGTGCCGAACGCATC
 Q D F H F A K S T P V L S I T G A E R I 4380
 ACGCCGGCAGACCACCCCGCAACTTCGTCACTATCCGATGGAAGACCGATTTGTCTGTAC
 T P A D H T R N F V T I R W K T D L S Y 4440
 CAGGTGGGTGACTCTCTTGGTGTCTTCCCTGAGAACACCCGGTCAGTGGTGGAGGAGTTC
 Q V G D S L G V F P E N T R S V V E E F 4500
 CTGCAGTATTACGGCTTGAACCCCAAGGACGTCATCACCATCGAAAACAAGGGCAGCCGG
 L Q Y Y G L N P K D V I T I E N K G S R 4560
 GAGTTGCCCCACTGCATGGCTGTTGGGGATCTTTCACGAAGGTGTTGGACATCTTGGGC
 E L P H C M A V G D L F T K V L D I L G 4620
 AAACCCAACAACCGGTTCTACAAGACCCTTTCTTACTTTGCAGTGGACAAGGCCGAGAAG
 K P N N R F Y K T L S Y F A V D K A E K 4680
 GAGCGCTTGTGAAGATCGCCGAGATGGGGCCGGAGTACAGCAACATCCTGTCTGAGATG
 E R L L K I A E M G P E Y S N I L S E M 4740
 TACCATTACGGACATCTTCCACATGTTCCCGTCCCGCCCGCCACGCTGCAGTACCTC
 Y H Y A D I F H M F P S A R P T L Q Y L 4800
 ATCGAGATGATCCCCAACATCAAGCCCCGGTACTACTCCATCTCCTCCGCCCCCATCCAC
 I E M I P N I K P R Y Y S I S S A P I H 4860
 ACCCCTGGCGAGGTCCACAGCCTGGTGCTCATCGACACCTGGATCACGCTGTCCGGCAAG
 T P G E V H S L V L I D T W I T L S G K 4920
 CACCGCACGGGGCTGACCTGCACCATGCTGGAGCACCTGCAGGCGGGCCAGGTGGTGGAT
 H R T G L T C T M L E H L Q A G Q V V D 4980
 GGCTGCATCCACCCACGGCGATGGAGTTCCCCGACCACGAGAAGCCGGTGGTGTGTGC
 G C I H P T A M E F P D H E K P V V M C 5040
 GCCATGGGCAGTGGCCTGGCACCGTTGCTTTCCTGCGCGAGCGCTCCACGCTGCGG
 A M G S G L A P F V A F L R E R S T L R 5100
 AAGCAGGGCAAGAAGACCGGGAACATGGCATTGTACTTCGGCAACAGGTATGAGAAGACG
 K Q G K K T G N M A L Y F G N R Y E K T 5160
 GAGTTCCTGATGAAGGAGGAGCTGAAGGGTACATCAACGATGGTTTGTGACTTTCGA
 E F L M K E E L K G H I N D G L L T L R 5220
 TGCGCTTTCAGCCGAGATGACCCCAAGAAGAAGGTGTATGTGCAGGACCTTATCAAGATG
 C A F S R D D P K K K V Y V Q D L I K M 5280
 GACGAAAAGATGATGTACGATTACCTCGTGGTGCAGAAGGGTTCATGTATTGCTGTGGA
 D E K M M Y D Y L V V Q K G S M Y C C G 5340
 TCCCGCAGTTTCATCAAGCCTGTCCAGGAGTCATTGAAACATTGCTTCATGAAAGCTGGT
 S R S F I K P V Q E S L K H C F M K A G 5400
 GGGCTGACTGCAGAGCAAGCTGAGAACGAGGTCATCGATATGTTACGACCGGGCGGTAC
 G L T A E Q A E N E V I D M F T T G R Y 5460
 AATATCGAGGCATGGTAAgctgtgccaactggtgtggaccatttttaaccctetaaccacc
 N I E A W * 5520
 acttttttttttggaaatcgatgcgtcaaagcgagtatatactgtattgtttcttttttgct
 gggtgtgatggtcaccattctcattgggcgatccataacacagtggtgtcaccgggaaca 5580
 ggagcggactttctgacctggctgacatttcagaactctccctccagccccaccacctct 5640

```

gactgaggatgcatgttgactgactgctgcccacttccttagcggatcatttgaatgg      5700
tgggatatgcattttgactctgctgtcatgtgcacttacggctcgaccaaccgtctccg    5760
agctggccccgaagcgacaacccatgatgatcgatttgagcggccgcgaattc        5812

```

Abb. 4-2: (Seite 53 bis 56) Sequenz der cDNA für die PNO aus *Euglena gracilis*. Nichtkodierende Nukleotide sind durch Kleinbuchstaben dargestellt. Unterhalb der Nukleotidsequenz ist die abgeleitete Aminosäuresequenz der PNO aufgeführt. Die Aminosäuresequenz des Transitpeptids abgeleitet aus dem Vergleich mit der N-terminalen Sequenz des gereinigten Proteins (Inui et al. 1991) ist kursiv gedruckt.

Dem 37 AS langen mitochondrialen Transitpeptid (vgl. Abb. 4-2) folgt der N-Terminus des reifen Proteins. Die Aminosäuresequenz der PNO enthält zwei wichtige Peptid-Sequenzen, die durch direkte Sequenzierung der aufgereinigten *Euglena* PNO (Inui et al. 1991) bestimmt wurden. Da die Aufreinigung dieses Proteins direkt aus isolierten Mitochondrien von *Euglena gracilis* erfolgte, wird das kodierte Genprodukt eindeutig als mitochondriale PNO identifiziert. Die N-terminalen 12 AS des aktiven mitochondrialen Proteins (Inui et al. 1991) sind identisch mit denen der translatierten pEgPNO3 beginnend mit Threonin (T)₃₈ (s. Abb. 4-3). Diese Übereinstimmung bestätigt die funktionelle Identität des Klones und zeigt fernerhin die Prozessierungsstelle des mitochondrialen Transitpeptids auf. Von den 15 AS, die vom N-Terminus des kleineren tryptischen Fragments bestimmt wurden, stimmten beginnend mit Alanin (A)₁₂₄₂ 13 AS mit dem pEgPNO3 Protein überein (s. Abb. 4-3). Die 5'- und 3'- nichtkodierenden Regionen sind 6 bp bzw. 397 bp groß. Das errechnete Molekulargewicht des prozessierten Proteins beträgt 194 kDa. Dies entspricht annähernd der Summe der Größen zweier Hauptbanden mit Molekulargewichten von 120 und 55 kDa, die nach Proteolyse des nativen Proteins im SDS-Gel zu beobachten sind (Inui et al. 1991). Das mitochondriale Protein selbst migrierte als einzelne Proteinbande im SDS-Gel mit einem Molekulargewicht von ca. 166 kDa (Inui et al. 1987).

EgPNOmt	
MKQSVRPPIISNVLKKEVALYSTIIGQDKGKEPTGRTY	T ₃₈
	TSGPKPASHIEVPHHV>>
	<u>TSGPKPASXIEVSXAK</u>
Transitpeptid	N-Terminus des aufgereinig-
	ten mitochondrialen Enzyms
	(Inui et al. 1991)
EGPNOmt	
<<ADNITARFNRYRRMLEGPNTKAAAPSGNHVTILYGSETGNSE>>	A ₁₂₄₂
	<u>AAAPSGNXVTILYGSEEGNS</u>

N-Terminus des tryptischen Fragmentes mit Diaphorase-Aktivität (CPR-Domäne) (Inui et al. 1991)

Abb. 4-3: Vergleich der translatierten pEgPNO3 mit Peptidsequenzen (unterstrichen), die durch Sequenzierung des aus isolierten Mitochondrien von *Euglena* aufgereinigten Proteins (Inui et al. 1991) bestimmt wurden.

Die N-terminalen 1239 AS zeigten eine hohe Sequenzähnlichkeit zur PFO, die C-terminalen 564 AS dagegen zeigten eine hohe Sequenzhomologie mit der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (CPR). Sowohl die Länge als auch die Aminosäurezusammensetzung (positiv geladene und hydroxylierte Seitenketten) des Transitpeptids entsprechen dem bekannter mitochondrialer Transitpeptide aus *Euglena gracilis* (s. Abb. 4-4).

<i>E. gracilis</i>	
CIII SU I	MTTPSLSSILRHTRPIFKETLRAARPTLQN ALPNGFRIASESKDGD>>
CIII SU II	MKSVVRSKGTQALFRRFSSALGDSINPNQVGVDNVIRVNGR LFEVDKVQEKGLKTSV>>
CIII SU IX	MQTHVRRVALQALRPLRAGLMAKFPVRF ATTAVSGELLTKTPYT>>
EgPNOmt	MKQSVRPPIISNVLKKEVALYSTIIGQDKGKEPTGRTY TSGPKPASHIEVPHHV>>

Abb. 4-4: N-terminale Aminosäuresequenzen der Untereinheiten I, II und IX des mitochondrialen Komplexes CIII von *Euglena gracilis* (Cui et al. 1994) im Vergleich mit der N-terminalen Aminosäuresequenz der pEgPNO3. Die Prozessierungsstelle ist durch einen senkrechten Strich gekennzeichnet.

4.1.4 Genomische Southern-Hybridisierung der *Euglena* PNO

Um zu überprüfen, ob die PNO im Genom von *Euglena gracilis* als einzelnes Gen oder als Genfamilie vorliegt, wurde eine Southern-Hybridisierung durchgeführt (s. Abschnitt 3.13.11). Dazu wurden jeweils 20 µg genomische DNA mit den Restriktionsenzymen HindIII, KpnI, EcoRI und SalI gespalten. Die gespaltene DNA wurde auf einem 0,7 %-igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Nach Hybridisierung ü. N. bei 68°C erfolgte das Waschen des Blots bei niedriger Stringenz (55°C in 2 x SSPE, 0,1 % SDS). Als Sonde fungierte die 5812 bp große pEgPNO3. In Abb. 4-5 ist das Ergebnis der Southern-Hybridisierung nach vier Tagen Exposition bei -80°C gezeigt. Es waren jeweils ein bis drei Banden zu beobachten. Damit lässt die

Southern-Hybridisierung darauf schließen, dass die PNO im Genom von *Euglena* nicht als Einzelgen, sondern in bis zu drei Kopien vorliegt.

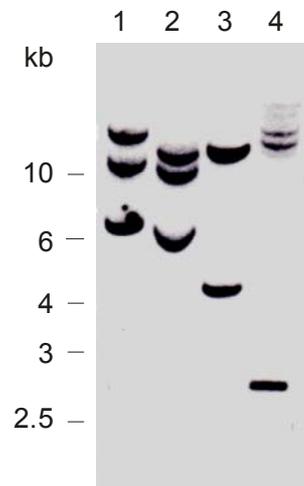


Abb. 4-5: Genomische Southern-Hybridisierung der PNO. Pro Spur wurden 20 μg genomische DNA aus *Euglena gracilis* aufgetragen. Als Sonde diente pEgPNO3. Spur 1: EcoRI, Spur 2: HindIII, Spur 3: XhoI, Spur 4: KpnI. Der Größenstandard ist angegeben.

4.1.5 Northern-Hybridisierung der *Euglena* PNO

Die Northern-Hybridisierung wurde wie in Abschnitt 3.13.12 beschrieben mit isolierter Poly(A)⁺ RNA aus *Euglena* Kulturen durchgeführt, die mit Luft unter Zusatz von 2 % CO₂ im Licht, mit 2 % CO₂ in N₂ im Licht und mit 2 % CO₂ in N₂ im Dunkeln angezogen wurden. Die Auftrennung der Poly(A)⁺ RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in einem 1,2 %-igen Agarosegel durchgeführt. Nach Transfer der RNA auf eine Hybond-N Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung ü. N. bei 68°C mit pEgPNO3 als Sonde. Der Blot wurde fünf Tage bei -80°C exponiert.

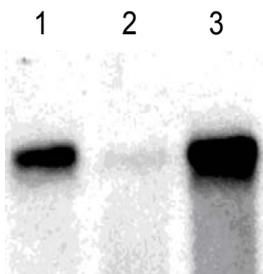


Abb. 4-6: Northern-Hybridisierung von *Euglena gracilis* Poly(A)+ RNA, die mit pEgPNO3 hybridisiert wurde. Die Poly(A)+ RNA wurde aus Zellen extrahiert, die unter folgenden Kulturbedingungen angezogen wurden: 1: Luft mit 2 % CO₂, im Licht; 2: 2 % CO₂ in N₂, im Licht; 3: 2 % CO₂ in N₂, im Dunkeln. Pro Spur wurden 5 µg Poly(A)+ RNA aufgetragen.

Auf dem Autoradiogramm war eine einzelne Bande zu beobachten, die auf eine Transkriptgröße von 5,8 kb weist. Die Northern-Hybridisierung (s. Abb. 4-6) zeigt, dass PNO sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen exprimiert ist. Die mRNA-Expression in dunkel angezogenen Zellen unter 2 % CO₂ in N₂ war etwa zweimal höher als in Zellen, die unter 2 % CO₂ in Luft kultiviert wurden. Zellen, die unter 2 % CO₂ in N₂ im Licht wuchsen, zeigten eine deutlich reduzierte Expression der PNO mRNA.

4.2 Klonierung, Sequenzierung und Expressionsanalyse der E1 α , E2- und E3-Untereinheit des PDH-Multienzymkomplexes aus *Euglena gracilis*

PDH Aktivität mit NAD⁺ wurde in den Mitochondrien von *Euglena gracilis* gemessen (Yokota et al. 1982). Versuche, den PDH-Multienzymkomplex aus diesen Organellen zu isolieren, blieben jedoch erfolglos (Inui et al. 1984b, Buetow 1989). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, das Vorhandensein einzelner Untereinheiten des PDH-Multienzymkomplexes auf Genebene zu prüfen. Durch Vergleiche der *Euglena* EST-Sequenzen mit bekannten Sequenzen in Sequenzdatenbanken mittels BLAST konnten EST-Sequenzen mit hoher Sequenzhomologie zur α -Untereinheit der Pyruvat Dehydrogenase (E1 α), zur Dihydrolipoyl Transacetylase (E2) und zur Dihydrolipoyl Dehydrogenase (E3) identifiziert werden.

4.2.1 Isolierung und Sequenzierung der cDNA für die Pyruvat Dehydrogenase-Untereinheit (E1 α) aus einer cDNA-Bank von anaerob angezogenen *Euglena*-Kulturen

4.2.1.1 Isolierung der cDNA für die PDH E1 α aus einer cDNA-Bank von *Euglena gracilis*

Der *Euglena* EST-Klon eg0040008028r mit einer Größe von 514 bp zeigte zwischen 50 und 55 % Sequenzähnlichkeit zu PDH E1 α -Untereinheiten verschiedener tierischer Eukaryoten. Zur Hybridisierung wurde aus diesem Sequenzabschnitt eine Oligosonde (45-mer) entworfen (s. Abschnitt 3.13.8). Nachfolgend wurden 20 pmol dieses Oligos (PDH-E1 α _Hyb) radioaktiv markiert. Es wurden 200.000 rekombinante Phagen ausplattiert und von den Platten Nitrocellulose-Replikafilter hergestellt. Diese Filter wurden mit der Oligosonde hybridisiert (s. Abschnitt 3.13.10). Durch positive Reaktion mit der Sonde konnten 12 unabhängige Klone identifiziert werden. Mit diesen Klonen wurde eine *in vivo* Exzision durchgeführt (s. Abschnitt 3.13.10) und alle Klone wurden von beiden Enden terminal ansequenziert. Acht dieser Klone waren in sich überlappenden Sequenzbereichen identisch und zeigten in Sequenzdatenbank-Vergleichen Homologien zur E1 α -Untereinheit der PDH. Bezüglich ihrer Größe variierten die Insertionen zwischen 1550 und 1586 bp. Nur einer dieser Klone, pEgPDHE1 α _14, repräsentierte ein vollständiges Transkript mit einer 10 bp *spliced leader* Sequenz am 5'-terminalen Ende (vgl. Abb. 4-7).

Die überwiegende Mehrheit cytoplasmatischer mRNAs in *Euglena* enthalten an ihrem 5'-Ende sehr nahe verwandte kurze Sequenzen, die in den entsprechenden Kerngenen fehlen (Tessier et al. 1991). Diese *spliced leader* repräsentieren die 5'-Enden einer Familie kleiner RNAs und werden posttranskriptional mittels Trans-Spleißens auf die prä-mRNA übertragen (Tessier et al. 1991). Die *spliced leader* Sequenz von pEgPDHE1 α _14 stimmt in Länge und Abfolge der Nukleotide mit denen bereits publizierter *Euglena* *spliced leader* Sequenzen überein (vg. Abb. 4-7). Gemeinsames Merkmal aller bisher bekannten *spliced leader* Sequenzen ist das Sequenzmotiv T(n)CG.

Untereinheit I	TTTTTTTTCG		AAAAACCCAAAATG>>
Untereinheit II	TTTTTTTTTTTTCG		GGAGAATG>>
Untereinheit IX	TTTTTTTTCG		AAGATG>>
Cytochrom c	TTTTTTTTTTTTCG		GAAACATG>>
HMBS	TTTTTTTTTTTTCG		GGAAGATG>>

```

TUB           AAAGTGTCTATTTTTTTTTTCG | ATCACAAAATG>>
EF           TTTCTGAGTGTCTATTTTTTTTTTCG | CAAATATG>>
pEgPDHE1α    TTTTTTTTTTCG | GAGCCTGCCTGATG>>

```

Abb. 4-7: 5'-terminale Nukleotidsequenzen der Untereinheiten I, II und IX des mitochondrialen Komplexes CIII von *Euglena gracilis* (Cui et al. 1994) im Vergleich mit der 5'-terminalen Nukleotidsequenz der pEgPDHE1α; Cytochrom *c* (Mukai et al. 1989); HMBS: Hydroxymethylbilan Synthase (Sharif et al. 1989); TUB: β-Tubulin (Schantz und Schantz 1989); EF: cytoplasmatischer Translations-Elongations-Faktor EF-1α (Montandon und Stutz 1990). Das Zeichen " | " zeigt das 3'-Ende vom *spliced leader* an, mögliche Translations-Initiationscodons sind unterstrichen (Cui et al. 1994).

4.2.1.2 Sequenzierung und molekulare Charakterisierung der PDH E1α cDNA

Der Klon pEgPDHE1α_14 wurde über Exonuklease III-Deletionen doppelsträngig sequenziert (vgl. Abschnitt 3.13.14). Deletionsmutanten wurden von beiden Enden der Insertion (vorwärts und rückwärts) erzeugt. Für die Erstellung der Rückwärts-Deletionsmutanten wurde XbaI als erstes Restriktionsenzym und BamHI als zweites Restriktionsenzym gewählt. Vorwärts-Deletionsmutanten wurden mittels XhoI als erstem und ClaI als zweitem Restriktionsenzym erzeugt. Keines dieser Restriktionsenzyme schnitt in der Insertion. Nach Transformation dieser Deletionsmutanten in *E. coli* XL1-Blue MRF' wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsspaltung mit EcoRI und KpnI (Vorwärts-Deletionsmutanten) bzw. EcoRI und NotI (Rückwärts-Deletionsmutanten) auf die Länge ihrer Insertionen überprüft. Für die nachfolgende automatische Sequenzierung wurden je sieben Deletionsmutanten abnehmender Größe ausgewählt. Mit einer durchschnittlichen Leseweite von ~700 bp wurde durch Sequenzierung sich überlappender Klone der Klon pEgPDHE1α_14 doppelsträngig sequenziert. Die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind in Abb. 4-8 gezeigt.

```

ttttttttcggagcctgcctgATGAATCCATTCCGTCTGTTGCTGCAGCGGGCTGGTGGT           60
                M N P F R L L L Q R A G G
GACCTCATGCGCCTTAAACTGCAATCGACCTTCAAGGTTACACTCCTGAAGGCATGCCA           120
D L M R L K L Q S T F K V H T P E G M P
GAGTTCACAGGTCCAAATGACTTCACGGAAGTCACGGTGGACCAGATCAAGCGGTTCCAC           180
E F T G P N D F T E V T V D Q I K R F H
ACTGATATGGTACGCATCCGGCGCATGGAGACGAAAGCGAGCCAGATGTACTACTCAGAAG           240
T D M V R I R R M E T K A S Q M Y T Q K
AAGATCCGTGGATTCTGCCATTTGTACATTGGCCAGGAGGCAGTCTGCGTTGGCATGGAG           300
K I R G F C H L Y I G Q E A V C V G M E
TCATCTCTGACGTTCAAAGACGCCATCATCACAGCATATCGGGACCATGCCTGGCATTTG           360

```

S S L T F K D A I I T A Y R D H A W H L	
ACCCGCGGCGGAACCATCACGGAGGTGATCGCGGAGATGCAGGGCAAGGCGGCGGGCTGC	420
T R G G T I T E V I A E M Q G K A A G C	
TCCAAGGGAAAGGGGGTTCATGCACATGTACAAGGCGGCAAACAACCTTCTACGGTGGC	480
S K G K G G S M H M Y K A A N N F Y G G	
AACGGGATCGTCGGGGCACAGTGCCCGGTGGGGGCTGGCATTGCGTTTGGGCTGGCCTAT	540
N G I V G A Q C P V G A G I A F G L A Y	
GAAGACCCCAAGGCCCAAGGGGTGTGCCTCTCGCTGTACGGGGACGGGGCAGCCAAC	600
E D P K A P K G V C L S L Y G D G A A N	
CAGGGCCAGCTGTTTCGAGGCCATGAACATGGCGTTCGCTGTGGAAGCTTCCGGTGATCTTT	660
Q G Q L F E A M N M A S L W K L P V I F	
TCTTGCGAGAACAACCGATTTCGCGATGGGCACCTCCGTGAAGCGTGGCTCCGCGCAACAG	720
V C E N N Q F A M G T S V K R G S A Q Q	
GTGTTTTACAAGCGGAGCGACTACATCCCCGGGCTGTGGGTGGACGGGATGGACGTCCTG	780
V F Y K R S D Y I P G L W V D G M D V L	
GCCTGCCGGGAGGGGATGCGGTACGCCAAAGAGTGGTGCATGGCAGGGAATGGCCCGGTG	840
A C R E G M R Y A K E W C M A G N G P V	
TGCATGGAGATGCAGACGTACCGGTACATGGGCCATTCCATGTCCGACCCGGGGACGAGC	900
C M E M Q T Y R Y M G H S M S D P G T S	
TACCGGACCCGGGACGAGGTGCAGAAGGTGAAGGAGGAGGGACTGCATCAGCAAGCTG	960
Y R T R D E V Q K V K E E R D C I S K L	
AGCTCCCGGCTCATCGCGGAGGGGATCAGCACCGAGGCGGAGCTGAAGACAGTCGAGAAG	1020
S S R L I A E G I S T E A E L K T V E K	
GAGACTAACAAGGAGGTGGACAAGGAGATTGCGGCGGTGGAAGCCCTGCCTCCTACCCCC	1080
E T N K E V D K E I A A V E A L P P T P	
TTTGAGGAGATCGGCCGAGATATCTTCGATGTCCCCATCACCGTACGCGCCTGCGACCAC	1140
F E E I G R D I F D V P I T V R A C D H	
ACCATCGTGTATGGACAATGAggacagggccaagccactgcgagggcacgtgcgcatggcc	1200
T I V Y G Q *	
ctgagggattctctgcgcgccgtgcgccaccagcccagtcctgaaccaaccacccccgcc	1260
agaggtggactgtcagacgtgatggcgctccttcccatccggtggcgctcaaccaactgc	1320
tgctgatgcggtaccctcctccccctctcgacacctgtttgtcagtgctccctgctgt	1380
ggtacactgctatgatgccctgctgttgctgtttcggcaactcactgccccgccccctgt	1440
cgagaatttgaggtcccacccagcaccctggtctgctgcggggtttccgtggcctaa	1500
actgtggtgctcaccctcaggacttggtgaacagaattgctctcagtcacaacgcatgct	1560
caaaccggtgacaagcgtccgtgaca	1586

Abb. 4-8: (Seite 62 bis 63) Sequenz der E1 α -Untereinheit der PDH aus *Euglena gracilis*. Kleinbuchstaben repräsentieren nichtkodierende Nukleotide. Unterhalb der Nukleotidsequenz ist die abgeleitete Aminosäuresequenz dargestellt. Die *spliced leader* Sequenz ist kursiv gedruckt.

Der Klon pEgPDHE1 α _14 besitzt eine Größe von 1586 bp und kodiert ein offenes Leseraster für 379 AS. Die 5'- und 3'- nichtkodierenden Bereiche sind 21 bp bzw. 426 bp groß. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von pEgPDHE1 α _14 mit anderen publizierten E1 α -Sequenzen zeigt die höchsten Sequenzhomologien zu *Trypanosoma* (52 %), *Ascaris suum* (51 %), *Homo sapiens* (50 %), *Solanum tuberosum* (50%)

und *Mus musculus* (49 %). Die abgeleitete Aminosäuresequenz der pEgPDHE1 α _14 weist sowohl das Motiv der TPP-Bindestelle (vgl. Abb. 4-9, T) (Perham et al. 1991) als auch die postulierte E1 β -Bindedomäne auf (vgl. Abb. 4-9, E). Die pEgPDHE1 α _14 Translation enthält ferner drei Serinreste, welche im Protein vom Mensch phosphoryliert werden (Patel und Roche 1990, Johnson et al. 1992) (s. Abb. 4-9). Die hohe Konservierung der pEgPDHE1 α _14 Translation in den Bereichen funktioneller Domänen liefert weitere Hinweise darauf, dass das klonierte Gen tatsächlich für die PDHE1 α kodiert.



Abb. 4-9. Alignment der Aminosäuresequenzen verschiedener eukaryotischer E1 α -Untereinheiten. Bereiche hoher Konservierung sind schwarz hervorgehoben. Die TPP-Bindestelle (T) (Hawkins et al. 1989, Buscaglia et al. 1996) und die postulierte E1 β -Bindestelle (E) (Wexler et al. 1991) sind durch durchgezogene Linien über der Sequenz markiert. Sternchen kennzeichnen phosphorylierbare Serinreste (Patel und Roche 1990). Abkürzungen der Organismennamen und Zugangsnummern sind wie folgt: e_gr, *Euglena gracilis* pEgDPDE1 α _14; t_cru, *Trypanosoma cruzi* (AAD11551); a_suu, *Ascaris suum* (P26267); s_cer, *Saccharomyces cerevisiae* (NP_011105); h_sa, *Homo sapiens* (AAB59581); a_th, *Arabidopsis thaliana* (NP_171617).

Da bisher noch keine N-terminale Aminosäuresequenz der reifen E1 α -Untereinheit aus *Euglena gracilis* vorliegt, kann die Prozessierungsstelle nicht genau bestimmt werden. Mitochondriale Transitpeptide weisen trotz ihrer Längenvariabilität und des Fehlens von Sequenzhomologien eine Reihe von Gemeinsamkeiten auf, sind außerordentlich reich an den AS Arginin, Leucin und Serin und enthalten mindestens zwei positiv geladene Aminosäurereste (von Heijne 1986a, 1986b). Bedingt durch den außerordentlich geringen Gehalt an sauren Aminosäureresten haben mitochondriale Transitpeptide im allgemeinen eine positive Nettoladung (von Heijne 1986a, 1986b, Claros und Vincens 1996, Schatz 1987). Die Abb. 4-10 zeigt den N-Terminus von pEgPDHE1 α _14 im Vergleich mit den N-Termini weiterer E1 α -Untereinheiten, von denen das Transitpeptid bekannt ist, sowie der Aminosäuresequenz des reifen Proteins aus *Crithidia*, einem nahen Verwandten von *Trypanosoma*.

```

          1                                     50
s_tub  ----MALSTS RAINHIMKPL SAAVCATRRL SSDSTATITV ETSLPFTSHN >>
e_gr   ----- --MNPFRLLL QRAGGDLMRL KLQSTFKVHT PEGMPEFTG- >>
c_fa   ----- ----- ---ATKTVPL KPPHPFKLHA A-----
t_cru  ----- ---MFRSASC ILLAAKTIPI NPQKPFKLHT AGRDDVPPVP >>
h_sa   MRKMLAAVSP VLSGASQKPA SRVLVASRNF ANDATFEIKK CDLHRLEEG- >>

```

Abb. 4-10: Sequenz-Alignment N-terminaler E1 α -Sequenzen und der aufgereinigten E1 α - Untereinheit aus *Crithidia fasciculata* (Diaz und Komuniecki 1995). Abkürzungen der Organismennamen und Zugangsnummern sind wie folgt: s_tub, *Solanum tuberosum* (P52903); e_gr, *Euglena gracilis* pEgPDHE1 α _14; c_fa, *Crithidia fasciculata*; t_cru, *Trypanosoma cruzi* (AAD11551); h_sa, *Homo sapiens* (AAB59581). Transitpeptide sind fett gedruckt. Das postulierte Transitpeptid für die E1 α -Untereinheit aus *Trypanosoma* (Diaz und Komuniecki 1995) und *Euglena* (MitoProtII, Claros und Vincens 1996) ist unterstrichen.

Mehrere Indizien sprechen dafür, dass die *Euglena* pEgPDHE1 α _14 ein Transitpeptid besitzt. Dazu zählen der nahezu identische Startpunkt der *Euglena*-Sequenz im Vergleich zur *Trypanosoma* E1 α im Sequenz-Alignment, die Einraasterung der Sequenz in den Bereich mit anderen Transitpeptiden und die für mitochondriale Transitpeptide typische Häufigkeit von Arginin und Leucin bei gleichzeitigem Fehlen von Aspartat, Glutamat, Valin und Isoleucin (von Heijne 1986a, 1986b). Zudem ist der N-Terminus der aufgereinigten E1 α aus dem Trypanosomatiden *Crithidia* im Alignment im Vergleich zu den E1 α -Aminosäuresequenzen aus *Trypanosoma* und *Euglena* deutlich kürzer (s. Abb. 4-10). Zur weiteren Überprüfung wurde das MitoProtII Programm (Claros und Vincens 1996) angewendet, welches in Übereinstimmung mit der Länge des Tran-

sitpeptids aus *Trypanosoma* die ersten 12 AS als mitochondriale Importsequenz berechnet. Die Analyse des N-terminalen Bereiches der *Euglena* pEgPDHE1 α _14 mit Hilfe des iPSORT Programms (Bannai et al. 2001, Bannai et al. 2002) führte gleichermaßen zur Voraussage eines mitochondrialen Transitpeptids. Die Länge dieses Transitpeptids läge damit deutlich unter der Länge bekannter mitochondrialer Importsequenzen aus *Euglena*, die zwischen 30 und 40 AS variiert (Cui et al. 1994; Rotte et al. 2001) (vgl. Abb. 4-4). Das errechnete Molekulargewicht des Proteins würde damit 40480 Da betragen.

4.2.2 Isolierung und Sequenzierung der cDNA für die Dihydrolipoyl-Transacetylase (E2) aus einer cDNA-Bank von aerob angezogenen *Euglena* Kulturen

4.2.2.1 Isolierung der cDNA für die PDH E2 aus einer cDNA-Bank von *Euglena gracilis*

Der *Euglena* EST-Klon eg003014043r zeigte bei Sequenzvergleich mit bekannten E2-Untereinheiten zwischen 50 % und 55 % Sequenzidentität auf Aminosäureebene zur Dihydrolipoyl Transacetylase aus Pilzen und Tieren. Auf dem 350 bp großen Sequenzabschnitt dieses EST-Klones basierend wurde eine 42-mer Oligosonde entworfen (s. Abschnitt 3.13.8). Zwanzig pmol dieses Oligos (PDH-E2_Hyb) wurden nachfolgend radioaktiv markiert. Es wurden 200.000 rekombinante Phagen ausplattiert und von den Platten Nitrocellulose-Replikafilter hergestellt. Diese Filter wurden mit der Oligosonde hybridisiert (vgl. Abschnitt 3.13.10) Es konnten 12 unabhängige Klone identifiziert werden. Nach *in vivo* Exzision dieser Klone (s. Abschnitt 3.13.10) wurden die 1600 bis 1900 bp großen Insertionen von beiden Enden terminal ansequenziert. Alle 12 Klone zeigten in Datenbank-Suchen Sequenzähnlichkeiten zur E2-Untereinheit der PDH und waren nach Assemblierung in sich überlappenden Sequenzbereichen identisch. Sieben dieser Klone wiesen am 5'-Ende eine *spliced leader* Sequenz mit der Nukleotidabfolge T(7)CG auf und repräsentierten damit vollständige Transkripte.

4.2.2.2 Sequenzierung und molekulare Charakterisierung der PDH E2 cDNA

Der im 3'-Bereich längste Klon, pEgPDHE2_3, wurde über Exonuklease III-Deletionen doppelsträngig sequenziert (s. Abschnitt 3.13.14). Deletionsmutanten wurden für beide Enden der Insertion erstellt. Für die Erzeugung von Rückwärts-Deletionsmutanten wurde für den ersten Schnitt XbaI als Restriktionsenzym ausgewählt, der zweite Schnitt

erfolgte mit BamHI. Vorwärts-Deletionsmutanten wurden mittels Sall als erstem und ClaI als zweitem Restriktionsenzym generiert. Keines dieser Restriktionsenzyme schnitt innerhalb der Insertion. Nach Transformation in *E. coli* X11Blue MRF' wurden die Klone durch Restriktionsspaltung mit EcoRI und XhoI (Vorwärts-Klone) bzw. EcoRI und NotI (Rückwärts-Klone) auf ihre Insertionslänge überprüft. Für die nachfolgende nicht-radioaktive Sequenzierung wurden je fünf Deletionsmutanten von beiden Enden der Insertion ausgewählt und pEgPDHE2_3 auf beiden Strängen sequenziert. Die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind in Abb. 4-11 gezeigt.

```

tttttttcgccATGCTGCCAAGGCGCCTCCTCGTCCCCTTGTTCCAAGCAGCAAGAACAC      60
      M L P R R L L V P L F Q A A R T R
GTGGATATGCTGAAAAAATCCTAATGCCTGCCCTTTCTCCTACCATGGAGGCAGGGACAA      120
      G Y A E K I L M P A L S P T M E A G T I
TTGCAACTTGGAAAAAGAAAGTAGGGGACAAGCTTCGGCCTGGTGATGTGCTTTGTTCCGG      180
      A T W K K K V G D K L R P G D V L C S V
TGGAGACAGACAAGGCAACATTGGACTTTGAGTGGGCTGGTGATGAAGGAATTGTTGCAC      240
      E T D K A T L D F E W A G D E G I V A Q
AGCTTGCCCTTGAGCCAGGGCATGAGCCTGTCCCTGTTGGGACACCAATTGCTGTGTTGG      300
      L A L E P G H E P V P V G T P I A V L A
CAGACGATGAGTCCGATTTACCTGCAGCAAAGGCGATGGACCTGTCACAGGGCACCTCAA      360
      D D E S D L P A A K A M D L S Q G T S K
AGGCAGCAAAAAGTTCGCCCTGCTGCACCAGCAGCTGCAGCTCCCCCATCAGAGGCACCAG      420
      A A K S S P A A P A A A A P P S E A P A
CTGTGAAAGCCCCATCCTCATCTCCAAAGAGTGAAGGAGTCAAGCCAGAGCCTTACACCT      480
      V K A P S S S P K S E G V K P E P Y T S
CTGCCAAAGTGC GCGCATCACCTGCTGCGATGGCTGTGTTTGCCAAGCATATCCAGGGAA      540
      A K V R A S P A A M A V F A K H I Q G T
CAGGGCCTAATGGGCGGATTGTTGAGGCTGACGTGGAAGCTTTCTTGAAGGATGCCGGCA      600
      G P N G R I V E A D V E A F L K D A G S
GTGGGAAAGTTGCTGGTGCTGCTGCAACGCCGGCGCCATCTGCTGCAGGCACATTGCCTG      660
      G K V A G A A A T P A P S A A G T L P A
CTCAGTACGAAGACACTCCTGCCAGTTTGATGCGGAAGTCCATCGCAAGCCGCCTCACAG      720
      Q Y E D T P A S L M R K S I A S R L T A
CAAGCAAAGTGGAAATCCCTCATT TTTATCTGACAGTGGACGTTGCTGTGGAAAAGATGA      780
      S K V E I P H F Y L T V D V A V E K M K
AGGAGATGGTTGCAGCCCTCAATGCCGGAGCCAAAGATAAGGAGTACAAGATCACAGTCA      840
      E M V A A L N A G A K D K E Y K I T V N
ATGATTTCCCTGGTCAAAGCCTGCGCTTTGGCATGCAAGAAGGTGCCTGCTGCCAACAGTC      900
      D F L V K A C A L A C K K V P A A N S Q
AGTGGCACGGAGACAAAATCCGTCGTTTTCCACAGTGTGGATATCAGTGTGCGCCGTTGCCA      960
      W H G D K I R R F H S V D I S V A V A T
CACCCACCGGACTGATCACCCAGTTGTCTACAATGCTGATTTGAAAGGTCTGAAGGAAA      1020
      P T G L I T P V V Y N A D L K G L K E I
TCAGCAACGACATCAGGACGCTTGCAGCACTCGCTCGAGAGGGAAAGTTGACTCCTGAGC      1080
      S N D I R T L A A L A R E G K L T P E Q
AGTACATCGGAGGAACCTTACCATCAGCAACCTGGGGTCTTACGGGGTGAAGCATTTC      1140
      Y I G G T F T I S N L G S Y G V K H F T
CCGCCATCATCAACCCGCCGAGGCCTGCATCCTGGCCGTGGGGGCTGCGCAGGAGAATG      1200
      A I I N P P Q A C I L A V G A A Q E N G
GGCTGATGAGTGTGACTGTCTTGCATCACCGCGTGGTTCGATGGGGCCGTTGGCGCAA      1260
      L M S V T L S C D H R V V D G A V G A T
CCTGGTTGCAGGCCTTCAAGGGGTACGTGGAGACCCCTTCTTCCCTCCTGCTGTGAagct      1320

```

W L Q A F K G Y V E T P S S L L L *	
<i>gctggcagtcctcccacgctctgctatcttcgcaagcagcgcagcctggggctctgtatgaa</i>	1380
<i>caaacggcgccgctgtccgggggtcgccacagggcatgacgtggattcagtcctctgtgcc</i>	1440
<i>gtgccctcacccaaccctgaccaccgacatctccagtcacgccttttaggaatgttcctg</i>	1500
<i>catccctccacagtccttatttcgtggagattggcctcagcacaggatgcagacatttg</i>	1560
<i>acgacgcccacatgtgaagtgtggccaaaactggctaccagtcgctgctatcccaggtagga</i>	1620
<i>aggtccaccctgcatgacgcacctcagtatgtgtgcctggcttggctctgcagattt</i>	1680
<i>ctcttcctgaacagccttcacagccttcctgaacagcacatgtgtgcctccgaccatgaa</i>	1740
<i>aaccaggcgctgaagggccgcccgcagagggcggaattcgcgcttggtttttttttttt</i>	1800
<i>tt</i>	1834

Abb. 4-11: (Seite 67 bis 68) Sequenz der E2-Untereinheit der PDH aus *Euglena gracilis*. Nichtkodierende Nukleotide sind durch Kleinbuchstaben dargestellt. Unterhalb der Nukleotidsequenz ist die abgeleitete Aminosäuresequenz aufgeführt. Die *spliced leader* Sequenz ist kursiv gedruckt.

Der Klon pEgPDHE2_3 besitzt eine Größe von 1834 bp einschließlich einer 9 bp *spliced leader* Sequenz am 5'-terminalen Ende und kodiert ein offenes Leseraster für 434 AS. Die 5'- und 3'- nichtkodierenden Bereiche sind 11 bp bzw. 518 bp groß. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von pEgPDHE2_3 mit anderen E2-Sequenzen zeigt die höchste Sequenzähnlichkeit zu *Arabidopsis thaliana* (43 %), *Mus musculus* (42 %), *Homo sapiens* und *Schizosaccharomyces pombe* (41 %) sowie *Rickettsia prowazekii* (38 %). Das Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenz des isolierten Klons mit Transacetylase-Untereinheiten anderer Organismen zeigt drei Bereiche mit hoher Sequenzhomologie, die Lipoyl-Domäne (s. Abb. 4-13, L), die Untereinheit-bindende (s. Abb. 4-13, B) und die innere katalytische Domäne (s. Abb. 4-13, I). Der Klon pEg_PDHE2_3 kodiert wie die plastidäre *A. thaliana*-, *Synechocystis* sp.-, *S. cerevisiae*- und die *B. subtilis*-Sequenz für nur für eine N-terminale Lipoyl-Domäne. Die mitochondrialen E2-Untereinheiten aus *A. thaliana* und *H. sapiens* enthalten zwei Lipoyl-Domänen. Die Lipoyl-Domäne enthält mehrere konservierte Motive mit identischen AS in mindestens fünf der sieben Sequenzen: MPALSxTM, KKxGDK, ExDKA und GYLAXIXVxEG. Das Aminosäuremotiv ExDKA enthält einen über alle sechs Sequenzen konservierten Lysin-Rest, der vermutlich die Bindestelle des Liponsäurerestes darstellt (Reed 1974, Russel und Guest 1991, Dardel et al. 1993). Die katalytische Domäne der translatierten pEgPDHE2_3 enthält ferner ein Aminosäuremotiv, welches ähnlich zum konservierten Aminosäuremotiv DHRXXDG des aktiven Zentrums von

Acetyltransferasen ist (Guest 1987). Konservierte Aminosäuresequenzmotive sind in Abb. 4-13 durch doppelt gezeichnete Linien markiert.

Abb. 4-12 (vorherige Seite): Aminosäuresequenz-Alignment von pro- und eukaryotischen E2-Untereinheiten. Bereiche hoher Konservierung sind schwarz hervorgehoben. Funktionelle Domänen sind durch durchgezogene Linien über der Sequenz markiert: L, Lipoyl-Domäne; B, Untereinheit-bindende Domäne; I, innere katalytische Domäne (Mooney et al. 1999). Konservierte Sequenzmotive sind durch doppelt durchgezogene Linien hervorgehoben. Die Position des konservierten Lysin-Restes, welcher an der Lipoylsäure-Bindung beteiligt ist, ist durch einen Punkt gekennzeichnet. Abkürzungen der Organismennamen und Zugangsnummern sind wie folgt: a_th_1, *Arabidopsis thaliana*, mitochondriale E2 (Z46230); s_sp, *Synechocystis* sp (D90915); h_sa, *Homo sapiens* (J03866); s_cer, *Saccharomyces cerevisiae* (J04096); e_gr, *Euglena gracilis* pEgPDHE2_3; a_th_2, *Arabidopsis thaliana*, plastidäre E2 (AF066079); b_sub, *Bacillus subtilis* (M57435).

Da bisher noch keine N-terminale Aminosäuresequenz der reifen E2-Untereinheit aus *Euglena* vorliegt, kann die Prozessierungsstelle nicht exakt bestimmt werden.

```

      1                                     50
c_fa ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
s_po MLSANMLRRM HHGVAVTRML LVSNGKVQVK KSALYPVMAK LARTYATKNY
n_cr ~~~~~ ~~~~~~M IVPVLSRQAL RHASVARVAL PSLTRWYASY
e_gr ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ MLPRLL VPLFQAARTR

      51                                     100
c_fa LTITPIPMPLSPTMEKGKI ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
s_po PAHTVINMPALSPMTTGNI GAFQKKIGDK IEPGDVLCEI ETDKAQIDFE >>
n_cr PPHTVVKMPALSPMTSGGI GAWQKKPGDK IEPGEVLVEI ETDKAQMDFE >>
e_gr GYAEKILMPALSPMEAGTI ATWKKKVGDK LRPGDVLCVS ETDKATLDFE >>

```

Abb. 4-13: Sequenz-Alignment N-terminaler E2-Sequenzen und der aufgereinigten E2-Untereinheit aus *Crithidia fasciculata* (Diaz und Komuniecki 1995). Abkürzungen der Organismennamen und Zugangsnummern sind wie folgt: c_fa, *Crithidia fasciculata*; s_po, *Schizosaccharomyces pombe* (O59816); n_cr, *Neurospora crassa* (P20285); e_gr, *Euglena gracilis* pEgPDHE2_3. Transitpeptide sind fett gedruckt. Das mittels MitoProtII Analyse postulierte Transitpeptid für die E2-Untereinheit aus *Euglena* ist unterstrichen.

Mehrere Indizien sprechen dafür, dass die *Euglena* pEgPDHE2_3 ein Transitpeptid besitzt. Der N-Terminus der translatierten pEgPDHE2_3 beginnt im Alignment 17 AS vor der Proteinsequenz der aufgereinigten E2 aus dem Trypanosomatiden *Crithidia fasciculata*. Ferner erfolgt die Einrasterung des N-Terminus in den Bereich mit anderen Transitpeptiden und dieser enthält die für mitochondriale Transitpeptide häufigen Aminosäurereste Arginin und Leucin bei gleichzeitigem Fehlen von Aspartat, Glutamat und Isoleucin (von Heijne 1986a, 1986b) (vgl. Abb. 4-13). Eine Überprüfung mittels des MitoProtII Programms berechnete die ersten 20 AS als mitochondriale Importsequenz. Die Analyse des N-terminalen Bereichs der pEgPDHE2_3 durch iPSORT (Bannai et al. 2001, Bannai et al. 2002) sagt jedoch kein mitochondriales Transitpeptid vorher. Unter

Annahme eines Transitpeptids wie in Abb. 4-13 postuliert, läge das errechnete Molekulargewicht des Proteins bei 45540 Da.

4.2.3 Isolierung und Sequenzierung der cDNA für die Dihydrolipoyl Dehydrogenase Untereinheit (E3) aus einer cDNA-Bank von aerob angezogenen *Euglena* Kulturen

4.2.3.1 Isolierung der cDNA für die PDH E3 aus einer cDNA-Bank von *Euglena gracilis*

Der EST-Klon eg003036002r zeigte 62 % Sequenzähnlichkeit zur Dihydrolipoyl Dehydrogenase aus *Trypanosoma* und etwa 56 % Sequenzhomologie zu pflanzlichen Dihydrolipoyl Dehydrogenasen. Aus dem 517 bp umfassenden Sequenzabschnitt dieses EST-Klones wurde ein 42-Oligomer entworfen und 20 pmol dieses Oligos (PDHE3_Hyb) wurden nachfolgend radioaktiv markiert. Es wurden 200.000 rekombinante Phagen ausplattiert und von den Platten Nitrocellulosefilter hergestellt. Durch Hybridisierung dieser Filter mit der Oligosonde (s. Abschnitt 3.13.10) wurden vier unabhängige positive Klone identifiziert. Die Klone wurden *in vivo* exzisiert (s. Abschnitt 3.13.10) und von beiden Enden terminal ansequenziert. Alle vier Klone wiesen in Sequenzdatenbank-Vergleichen Homologie zur Dihydrolipoyl Dehydrogenase-Untereinheit der PDH auf. Nach Assemblierung stimmten alle vier Klone in sich überlappenden Regionen in ihrer Sequenz überein und variierten lediglich hinsichtlich ihrer Insertionsgröße. Diese lag zwischen ~1720 bp und 1810 bp. Der im 5'-Bereich längste dieser 4 Klone, pEgPDHE3_13, wurde über Exonuklease III-Deletionen doppelsträngig sequenziert (s. Abschnitt 3.13.14).

4.2.3.2 Sequenzierung und molekulare Charakterisierung der PDH E3 cDNA

Zur Erstellung der Deletionsmutanten von beiden Seiten der Insertion wurden die Restriktionsenzyme XbaI und BamHI (Vorwärts-Deletionen) bzw. XhoI und HindIII (Rückwärts-Deletionen) ausgewählt. Die Insertion wies für keines dieser Enzyme Schnittstellen auf. Nach Transformation der Deletionsplasmide in *E. coli* XL1Blue MRF' wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsspaltung mit EcoRI und KpnI bzw. EcoRI und NotI auf die Länge ihrer Insertionen kontrolliert. Fünf Klone abnehmender Länge wurden nachfolgend nichtradioaktiv sequenziert. Durch Assemblierung sich überlappender Sequenzen konnte der Klon pEgPDHE3_13 komplett doppelsträngig sequenziert werden.

Die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind in Abb. 4-14 dargestellt.

ATGTTTCGGCAGTCCTTCATCCAGCTTGCCAAGCATGATCTTATTGTGATTGGTGGTGGC	60
M F R Q S F I Q L A K H D L I V I G G G	
CCAGGCGGCTACGTGGCTGCCATCAAGGCAGCCCAACTGGGGCTGAATGTGCGGTGCGTG	120
P G G Y V A A I K A A Q L G L N V A C V	
GAGAAGCGGGGGACCCTGGGTGGCACCTGCCTGAACGTCGGGTGCATTTCCTTCCAAGGCT	180
E K R G T L G G T C L N V G C I P S K A	
CTTCTGAATGCCTCCCATCATTACCATGATGCCAAGCATAAGTTTGCCGGATACGGAATC	240
L L N A S H H Y H D A K H K F A G Y G I	
GACATCCCCAGCGTCTCCATGGACATTCCGAAAATGCAGGGGACAAAGGCGAAGTCAGTC	300
D I P S V S M D I P K M Q G T K A K S V	
ACCCGCCTCACAGGGGGCATCGAGCTCCTCTTCAAGAAAAACAAGGTGACGTACTACAAG	360
T R L T G G I E L L F K K N K V T Y Y K	
GGTTCGCTTCTTTGGAAGGGGACAAGAAGGTGAAGGTCGTTGGAGAAACGACCGAGGTC	420
G F A S L E G D K K V K V V G E T T E V	
CACGAAGCGGACAAGATCCTCATCGCCACGGGCAGCGAGCCGATTGAACTCCCATTTTTG	480
H E A D K I L I A T G S E P I E L P F L	
AAGTTCGACGAGAAGGTGGTCTGCTCATCAACAGGGGCACTGGACTTCCAGGAAGTCCCC	540
K F D E K V V C S S T G A L D F Q E V P	
GCTCACCTCGTGGTGATTGGCGCTGGGGTGATTGGTTTGGAGCTGGGCTCCGTGTGGTCC	600
A H L V V I G A G V I G L E L G S V W S	
CGGCTGGGGTCCAAGGTCACGGTGGTGGAGTTCATGGACCGCATCTGCCCGTTCATGGAC	660
R L G S K V T V V E F M D R I C P F M D	
GCCGACGTCGGGAAGGAGTTCCACCGCATCCTGAAGAAGCAAGGGCTGCAGATCAAGACG	720
A D V G K E F H R I L K K Q G L Q I K T	
TCGACGAAGGTGGTGGCCGGCAAAGTGGAGGGCGGCCAGGTCATCCTGGAGCTGGAGAGC	780
S T K V V A G K V E G G Q V I L E L E S	
GTTGATGGGGCGAAGAAGGAGACGCTGCAGGCCAACGCGGTCTCGTCAGTGTGCGACGA	840
V D G A A K K E T L Q A N A V L V S V G R	
CGGCCATTCACTGATGGGCTTGGCTGGACAAGGTCGGGGTGGAGCTGAACGCCAAGAAG	900
R P F T D G L G L D K V G V E L N A K K	
TTCATTGTTGTGGACGACCACTTCAAGACGAACAAGGACGGCATTACGCCGTCGCGCAT	960
F I V V D D H F K T N K D G I Y A V G D	
GTCATCCACCGAGGGCCGATGCTTGCCCAAGGCTGAGGATGAGGGCATCTGTGTGGCC	1020
V I H R G P M L A H K A E D E G I C V A	
GAGATGTTTGTGGCAAGGCCGGGCACATCAACTACGACACCATCCCCAACGTGATCTAC	1080
E M F A G K A G H I N Y D T I P N V I Y	
ACCCACCCAGAGGTGGCCTGGGTGGGCAAGACTGAGGAGGACCTGAAGAAGGAGGGCCGA	1140
T H P E V A W V G K T E E D L K K E G R	
AAGCTCAAGACCTCCAAGTTCCCCTTCCAGGCCAACTCCCGGGCAGTCACGAACGTCGAT	1200
K L K T S K F P F Q A N S R A V T N V D	
ACCGAAGGGTTTGTCAAGGTGGTACCACGCGGACACCGACAGGCTACTGAGCATGTCC	1260
T E G F V K V V T D A D T D R L L S M S	
ATCATCAACTCAAATGCCGGCGAGGCCATTGCAGAGGCAGTGCTTGAATGGAGTATTCT	1320
I I N S N A G E A I A E A V L A M E Y S	
GGTAGCGCGGAGGACATCGGGCGGACGTGCCACGCCACCCGACCCTGTGCGGAGGCCATC	1380
G S A G E D I G R T C H A H P T L S E A I	
AAGGAGCGTGCATGGCGGCTACGACAAGCCCATCCACGTGTGAgggccggcgcggcgcg	1440
K E A C M A A Y D K P I H V *	
cgcccgggctgtaccttgcttcaccggaactgatacctttttttcccacgctgtgacagg	1500
tgaccatccaaatagttttgtgatccctgccattgtgatggtgactctgtcccactgcac	1560

tgcgatgggcattgatgggcaaggatctagttttacaagcatgcatctgtcattcacagtg	1620
cccggtcctgtttcccattttgttcttcacatgtaccaaaactatcactgtgattaacccg	1680
agtccatttgaaaaagcgggccgcgaattcgcgcttttttttttttttttttttttttttt	1740
tt	1800
tttttttttttt	1811

Abb. 4-14: (Seite 72 bis 73) Sequenz der E3-Untereinheit der PDH aus *Euglena gracilis*. Nichtkodierende Nukleotide sind durch Kleinbuchstaben dargestellt. Unterhalb der Nukleotidsequenz ist die abgeleitete Aminosäuresequenz aufgeführt.

Der Klon pEgPDHE3_13 repräsentierte ein vermutlich vollständiges Transkript mit der Länge von 1811 bp und kodierte für ein offenes Leseraster von 474 AS. Der 3'- nicht-kodierende Bereich umfasst 386 bp. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von pEgPDHE3_13 mit anderen E3-Sequenzen ergab die höchste Sequenzähnlichkeit zu *Trypanosoma* (60 %), sowie Pilzen und Pflanzen (55 %). Ein Sequenzvergleich der *Euglena* pEgPDHE3_13 mit eukaryotischen und prokaryotischen E3-Sequenzen sowie mit den verwandten Proteinen Glutathion-, Trypanothion- und Quecksilber Reduktase (vgl. Abb. 4-15) zeigt eine Sequenzkonservierung in vier Sequenzregionen, die basierend auf der Kristallstruktur der menschlichen Glutathion Reduktase (Carothers et al. 1989) als FAD-Domäne (s. Abb. 4-15, F), NAD-Bindedomäne (s. Abb. 4-15, N), zentrale Domäne (s. Abb. 4-15, Z) und Interface-Domäne (s. Abb. 4-15, I) identifiziert wurden (Rice et al. 1984, Carothers et al. 1989, Patel und Roche 1990). Die E3-Untereinheit aus *Euglena* besitzt sowohl im Bereich der FAD-Domäne als auch im Bereich der NAD-Domäne der Glutathion Reduktase das konservierte Dinukleotid Bindemotiv GxGxxG (Rossmann et al. 1975) (s. Abb. 4-15). Pro- und eukaryotische E3-Sequenzen sind untereinander über ihre gesamte Länge konserviert, sie zeigen den höchsten Grad an Konservierung im Sequenzbereich der FAD- und NADH-Bindestelle, des Disulfid-Reaktionszentrums sowie in der Interface-Domäne am C-terminalen Ende (s. Abb. 4-15). Im Vergleich mit anderen verwandten Reduktasen ist die Sequenzähnlichkeit in der Region der Dinukleotid-Bindemotive sowie des Disulfid-Reaktionszentrums am höchsten. Da die mitochondriale E3-Untereinheit der PDH bisher aus *Euglena gracilis* noch nicht direkt aufgereinigt wurde, ist die N-terminale Aminosäuresequenz und damit die Prozessierungsstelle unbekannt. Die Einrasterung der *Euglena* pEgPDHE3_13 mit Aminosäuresequenzen anderer E3-Untereinheiten zeigt beginnend mit D₄₃ (s. Abb. 4-16) eine hohe Sequenzkonservierung in der Glycinreichen Dinukleotid-Binderegion.



Abb. 4-15 Ausschnitt aus dem Aminosäuresequenz-Alignment von *Euglena* pEgPDHE3_13 mit anderen E3-Untereinheiten, Glutathion Reduktase (gor), Quecksilber Reduktase (mera) und Trypanothion Reduktase (tryr). Bereiche hoher Konservierung sind schwarz hervorgehoben. Auf der Kristallstruktur der menschlichen Glutathion Reduktase (Carothers et al. 1989) basierende funktionelle Domänen sind durch durchgezogene Linien über der Sequenz wie folgt markiert: F, FAD-Domäne; N, NAD-Domäne; Z, zentrale Domäne und I, Interface-Domäne (Rice et al. 1984). Die Glycinreichen Dinukleotid-Bindestellen sind durch doppelte Linien hervorgehoben. Das Disulfid-Reaktionszentrum ist durch doppelte gepunktete Linien markiert. Abkürzungen der Organismen- und Enzymnamen und Zugangsnummern sind wie folgt: e_col_gor, *Escherichia coli* Glutathion Reduktase (M13141); h_sa_gor *Homo sapiens* Glutathion Reduktase (X15722); t_br_tryr, *Trypanosoma brucei* Trypanthion Reduktase (X63188); e_gr, *Euglena gracilis* pEgPDHE3_13; t_br, *Trypanosoma brucei* E3 (J03645); a_th, *Arabidopsis thaliana* E3 (NP_175237); h_sa, *Homo sapiens* E3 (XP_027212); s_cer, *Saccharomyces cerevisiae* E3 (J03645); e_col, *Escherichia coli* E3 (V01498); s_file_mer, *Shigella flexneri* Quecksilber Reduktase (P08332).

Dies beschränkt die Länge eines möglichen Transitpeptids auf die ersten 12 AS. Wie für Transitpeptide charakteristisch (von Heijne 1986a, 1986b), enthält dieser Bereich der pEgPDHE3_13 die AS Leucin, Arginin und Serin, die Aminosäurereste Glutamat, Aspartat und Valin fehlen. Die *Euglena*-Sequenz zeigt ferner im Alignment einen identischen Startpunkt mit Sequenzen aus *Trypanosoma brucei* (Else et al. 1993; 1994) und *Trypanosoma cruzi* (Lohrer und Krauth-Siegel 1990), für welche die Prozessierungsstelle und damit die kurzen, jeweils neun AS umfassenden, mitochondrialen Importsequenzen bekannt sind. Diese Indizien lassen vermuten, dass die ersten neun AS der pEgPDHE3_13-Translation das Transitpeptid repräsentieren. Eine Überprüfung mit Hilfe des MitoProtII und des iPSORT-Programms sagte keine Importsequenz oder Prozessierungsstelle voraus, diese Programme liefern jedoch auch für die kurzen Transitpeptide aus *T. brucei* und *T. cruzi* widersprüchliche Ergebnisse. Das iPSORT-Programm berechnet nur für die E3 aus *T. cruzi* ein Transitpeptid. Das MitoProtII Programm sagt nur für die E3 aus *T. brucei* ein Transitpeptid voraus. Unter Annahme des für die *Euglena* E3 Sequenz postulierten kurzen Transitpeptids läge das errechnete Molekulargewicht des Proteins bei 55150 Da.

```

1                                                                                               60
t_br ~~~~~ MFRRCFPIFN PYDVVVVGGG PGGGYVAAIK>
t_cr ~~~~~ MFRRCAVKLN PYDVVVIGGG PGGGYVAAIK>
c_fa ~~~~~ ~~~~~~A SYDVTVIGGG PGGGYVAAIK>
e_gr ~~~~~ MFRQSFQILA KHDLVIVIGGG PGGGYVAAIK>
p_sa ~~~~MAMANL ARKGYSLLS SETLRYSFSL RSRAFASGSD ENDVVIIGGG PGGGYVAAIK>
c_ca MQSWSRVYCS LAKRGHFSRI SHGLQAVSAV PLRTYADQPI DADVTVIGSG PGGGYVAAIK>

```

Abb. 4-16: Ausschnitt aus dem Sequenz-Alignment N-terminaler E3-Sequenzen und der aufgereinigten PDH E3-Untereinheit aus *Crithidia fasciculata* (Diaz und Komuniecki 1995). Abkürzungen der Organismennamen und Zugangsnummern sind wie folgt: t_br, *Trypanosoma brucei* (Q04933); t_cr, *Trypanosoma cruzi* (CAA72131); c_fa, *Crithidia fasciculata*; e_gr, *Euglena gracilis* pEgPDHE3_13; p_sa, *Pisum sativum* (P31023); c_ca, *Canis canis* (P49819). Transitpeptide sind fett hervorgehoben.

4.2.4 Northern-Hybridisierung der Pyruvat Dehydrogenase, der Dihydrolipoyl Transacetylase- und der Dihydrolipoyl Dehydrogenase- Untereinheit des PDH-Multienzymkomplexes aus *Euglena gracilis*

Die Northern-Hybridisierung wurde wie in Abschnitt 3.13.12 beschrieben durchgeführt. Poly(A)+ RNA wurde aus Zellen isoliert, die mit Luft unter Zusatz von 2 % CO₂ im Licht, mit 2 % CO₂ in N₂ im Licht oder mit 2 % CO₂ in N₂ im Dunkeln angezogen wur-

den. Die Auftrennung der Poly(A)+ RNA erfolgte in einem 1,2 %-igen Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen.

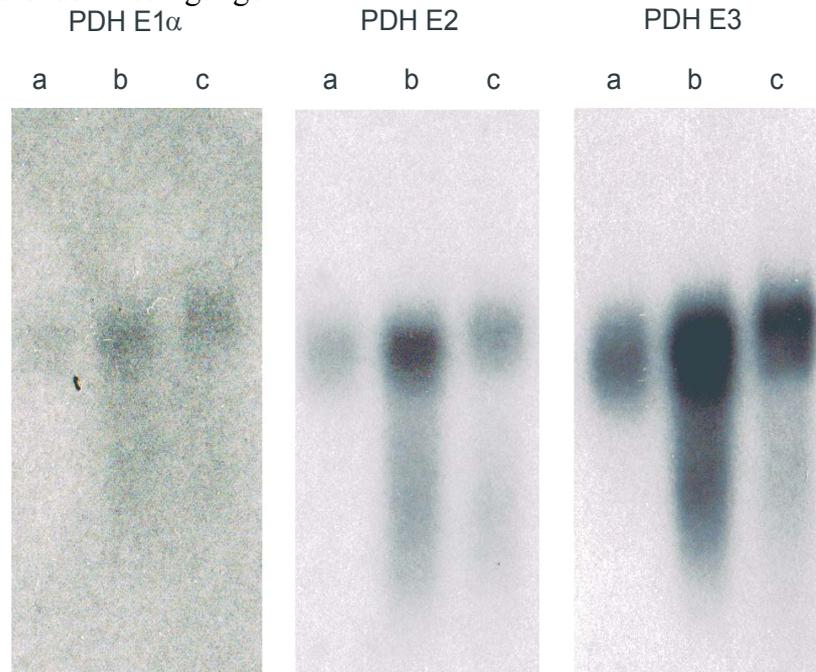


Abb. 4-17: Northern-Hybridisierung von Poly(A)+ RNA aus *Euglena gracilis*, die mit pEg-PDHE1 α _14, pEgPDHE2_3 bzw. pEgPDHE3_13 hybridisiert wurden. Für die Poly(A)+ RNA Isolation wurden Zellen unter folgenden Anzuchtbedingungen kultiviert: a: Luft mit 2 % CO₂, im Licht; b: 2 % CO₂ in N₂, im Licht; c: 2 % CO₂ in N₂, im Dunkeln. Pro Spur wurden 5 μ g Poly(A)+ RNA aufgetragen.

Nach Transfer der RNA auf eine Hybond-N Nylonmembran wurde die Hybridisierung ü. N. bei 68°C mit pEgPDHE1 α _14, pEgPDHE2_3 bzw. pEgPDHE3_13 als Sonde durchgeführt. Der Blot wurde fünf Tage bei -80°C exponiert. Auf den Autoradiogrammen für die einzelnen Untereinheiten der PDH war jeweils nur eine einzelne Bande zu beobachten (s. Abb. 4-17). Diese weist im Fall der PDH E1 α auf eine Transkriptgröße von ~1,6 kb, im Fall der PDH E2 und E3 auf ~1,8 kb hin. Die Northern-Hybridisierung zeigt ferner, dass die drei untersuchten PDH-Untereinheiten koordiniert exprimiert werden. Die mRNA-Expression aller drei PDH-Untereinheiten waren in hell angezogenen Zellen unter 2 % CO₂ in N₂ etwa zweimal höher als in Zellen, die dunkel unter 2 % CO₂ in Luft kultiviert wurden. Zellen, die hell unter 2 % CO₂ in Luft wuchsen, zeigten die stärkste Reduzierung der Expression für die PDH-Untereinheiten auf.

4.3 Isolierung, Sequenzierung und molekulare Charakterisierung der Ribonukleotid Reduktase aus einer cDNA-Bank von aerob angezogenen *Euglena* Kulturen

4.3.1 Isolierung der cDNA für die RNR aus einer cDNA-Bank von *Euglena gracilis*

Durch Vergleiche der *Euglena* EST-Sequenzen mit bekannten Sequenzen in GenBank mittels BLAST konnten sieben Klone identifiziert werden, die einen Treffer mit der Ribonukleotid Reduktase Klasse II aus Prokaryoten und Bakteriophagen zeigten. Vorliegende Plasmide für diese EST-Klone wurden zunächst durch EcoRI-Spaltung auf ihre Insertionsgröße überprüft und von beiden Seiten terminal ansequenziert. Die Größe der EcoRI-Insertionen lag zwischen ~1700 bp und ~2500 bp, die Klone unterschieden sich in ihrer Länge sowohl im 5'- als auch im 3'-Bereich. Als einziger Klon wies pEgRNR3 eine acht bp *spliced leader* Sequenz auf und repräsentierte damit ein vollständiges Transkript.

4.3.2 Sequenzierung und molekulare Charakterisierung der cDNA für die *Euglena* Ribonukleotid Reduktase

Der Klon pEgRNR3 wurde mittels Exonuklease III-Deletionen auf beiden Strängen sequenziert. Dazu wurden Deletionsmutanten von beiden Enden der Insertion generiert. Für die Erstellung von Vorwärts-Deletionsmutanten wurde das Restriktionsenzym XbaI für den ersten Schnitt und PstX für den zweiten Schnitt verwendet. Entsprechend wurden Rückwärts-Deletionsmutanten durch einen ersten Schnitt mit Sall und einem zweiten Schnitt mit HindIII erzeugt. Die Methoden zur Gewinnung der Deletionsmutanten sind unter Abschnitt 3.13.14 beschrieben. Diese Deletionsmutanten wurden nachfolgend in *E. coli* XL1Blue MRF' transformiert. Nach Isolierung der Plasmide wurden diese durch Restriktionsspaltung mit EcoRI und XhoI bzw. EcoRI und KpnI auf die Größe ihrer Insertionen überprüft. Für die nachfolgende nicht-radioaktive Sequenzierung wurden von jedem Ende der Insertion acht Klone abnehmender Größe ausgewählt. Durch Sequenzierung der überlappenden Deletionsplasmide wurde der Klon pEgRNR3 komplett doppelsträngig sequenziert. Die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz können Abb. 4-18 entnommen werden. Der Klon pEgRNR3 besitzt eine Größe von 2458 bp und kodiert ein offenes Leseraster für 729 AS. Das berechnete Molekulargewicht des Proteins beträgt 80190 Da. Die 5'-und 3'-untranslatierten Bereiche sind 19 bzw. 249 bp lang.

ttttttcgtccacagtccaATGGCTGAAAAGGAGAACGTCCACCCCAAGTCATCAGTTC 60
M A E K E N V H P Q V I S S
CTTCCCGACTCCGTGCGAAGGCTTTGAAATTGTCCGAAAAGTCTTCGTTGAAGGACGTTCA 120
F P T P S K A L K L S E K S S L K D V Q
GACAGACAACGCAGCCGTTCCACTGGTGGTGGACGAGACCTTATCCCCGAACCGACCTG 180
T D N A A V P L V V D E T S Y P E P T C
TGAGTTTTATGGCGGCCCTTCTTGGCCCACAGCTGCCAGAAGCTGAACGGTTTGTCTGGA 240
E F Y G G L L G P Q L P E A E R F V L D
TCCAGCTCTTGTGAGGAGTACAGGCACAAAAAGCCTCCATTCCGGGTTCAATGGTCTCGG 300
P A L V E E Y R H K K P P F G F N G L G
AGAAGTTGTGTACCTCCGCACATATGCCCCGAGAGAAGGACAATGGGCAGAGCGAAGTTTG 360
E V V Y L R T Y A R E K D N G Q S E V W
GCTTGACACTGTGCAGCGAGTTGTGACAGGCACGTTTCAAGTCTGCAACACCATGTTGT 420
L D T V Q R V V T G T F E V L Q H H V V
GAACAAGCTCCATTGCCATTGGGATGCCGAGAAGGCAAAAGAAAGATCTGAAGATGTT 480
N K L H C H W D A Q K A K E R S E D M F
CCGCAGAATTTTTGAAATGAAATTCCTGCCTCCAGGTCGAGGACTCTGGGCAATGGGTT 540
R R I F E M K F L P P G R G L W A M G S
ACCCATCTGCCGAAAGAAGGGCTTTGCGGCTGCTCTGAACAATTGTGCCTTCGTCTCCAC 600
P I C R K K G F A A A L N N C A F V S T
GGCAACCCTTGAAAAGACAGGGTTGGCCCTTCTTGTTCCTCATGGACGCCTCCATGCT 660
A T L E K D R V G P F L F L M D A S M L
GGGTGTCGGAGTTGGCTTTGACAACGCTGGTGTGTTTCACTGTTCTCGGCCCTGA 720
G V G V G F D N A G A G S F T V P G P D
TGACACCCAGCCAACCTACAAGTTTATGATTCTGACAAGCGAGAAGGATGGGTGGAGTC 780
D T Q P T Y K F M I P D K R E G W V E S
TCTCAAACGCCTCCTGAAAGCACATTTCTGCCACACAGCGGATGTGGAGTTTGACTACTC 840
L K R L L K A H F C H T A D V E F D Y S
AAAAATTCGTGAGATGGGAACAAAGCTGAAGACCTTCGGAGGGACTTCTTCTGGACCTGG 900
K I R E M G T K L K T F G G T S S G P G
TCCTCTGATCAACCTGCACAAAAGCATTTCGAAAATTCCTTGTGGAGAGAAGGGGAAGCC 960
P L I N L H K S I R K I L V G E K G K P
AATCAGTGTGACGTGCATCACAGACATCATGAACCTGATTGGTGTGGTGCACAGTTGCAGG 1020
I S V T C I T D I M N L I G V C T V A G
AAACATCAGACGGTCAGCGGAAATTCATTTGGAGAAGCAGATTGCAAGGAATTCCTTGG 1080
N I R R S A E I A F G E A D C K E F L D
TTTGAAGAGCTACGAGACGAACCCACACCGCGTGGAGTACGGCTGGGCTTCGAACAACCTC 1140
L K S Y E T N P H R V E Y G W A S N N S
CATCTTTGCGAAGGTCGGCATGGACTATTTCAGATGCCTGTGAACGGGTTTCGCACCAATGG 1200
I F A K V G M D Y S D A C E R V R T N G
CGAACCTGGGTTTGTCTGGCTGAGCAACATGCAGGCTTTCTCGCGAATGAACGGCAAGCC 1260
E P G F A W L S N M Q A F S R M N G K P
AGATTATCGCGACCAACGTGTGCTTGGCGGCAACCCCTGCCTCGAACAAAGTCTGGAATC 1320
D Y R D Q R V L G G N P C L E Q S L E S
CATGGAGTTGTGTTGCTTGGTGGAGACCTTCCCTGACAAGCACGAGACTTTGGAGGACTT 1380
M E L C C L V E T F P D K H E T L E D F
CAAACGCACACTGTACTCTGCGTTGCTCTATGAAAACTGTGACACTCTTGCCTTTGCA 1440
K R T L Y S A L L Y A K T V T L L P L H
CTGGCGGGAGTCAAACGAGATCATGTTGCGCAATCGCCGAATTGGCTGCTCTGTGTCGGG 1500
W R E S N E I M L R N R R I G C S V S G
AATTGCCAGTTCATACCAACCGTGGCCTCCACGAGTTGAAGACCTGGCTCGAGGAGGG 1560
I A Q F I T N R G L H E L K T W L E E G
TTACGACATTCTTACCAATACGACTGCCAGATCTCTGAATGGCTGTGCATTTCGGCAGAG 1620
Y D I L H Q Y D C Q I S E W L C I R Q S
CATCAAGCTGACCTCTGTCAAGCCGTCGGGCACCATTTCACTGGTGGCTGGGGCAACCCC 1680
I K L T S V K P S G T I S L V A G A T P
CGGCGTCCATTATCCCGAATCGTGCTATTACACCCGTCGCTGCGGATGGCTCGTGACTC 1740
G V H Y P E S C Y Y T R R L R M A R D S

GCCACTTCTGGAGCGCCTCATCAAGGCGGGCTACCACGTGGAACCGTGCTGCGTGGCCCC	1800
P L L E R L I K A G Y H V E P C C V A P	
GGACGTCACTGCCATCGTGGAGTTCCCGGTTGCGGCGGGCAACAGCATTTCGCACCACCCG	1860
D V T A I V E F P V A A G N S I R T T R	
CGACATCACCATGTGGGAGCAGCTCTCTCTGGCGGCGTTTCATGCAGAGATACTGGGCAGA	1920
D I T M W E Q L S L A A F M Q R Y W A D	
CAACCAGGTCTCAGCAACGATCACTTTTCGACCCCGAGACTGAGGGACTTCACCTCAACCA	1980
N Q V S A T I T F D P E T E G L H L N Q	
AGCACTTCAGTATTTCCAGTACCAACTGAAGGGCATCTCTTTTCCCTCCCACGTTACCCGAT	2040
A L Q Y F Q Y Q L K G I S F L P R Y P M	
GGGTGCATTCAAGCAGATGCCATATGAAGCCATCACCAAGGAACAGTATGAGGAGGCCAT	2100
G A F K Q M P Y E A I T K E Q Y E E A I	
TCGCAAAGTGAAGGAGACGTTTCATTGTCTCTGCGAATGCGATCGCTGAAACGGTGGGA	2160
R K V K E D V S L S S A N A I A E T V E	
GGAGAACCAGCAGACGTTCTGTGACAATGATCGCTGCATTAAGCTCTGAtgatggggcca	2220
E N Q Q T F C D N D R C I K L *	
tctaccacaagtctagtggtgccatztatctcgtccggttcgcttttagttttatttcatcc	2280
tctttttgccttttacttcattatgcttgagtgctgtttggtttccgttaacacacacacgg	2340
catttcggttgctcatctggttgccgtgtctcttggcgccactgattgctggttgagtt	2400
gtggtgctcctctgtgcaccagatgacagctcgctttgatcactgtctgcagagttgca	2458

Abb. 4-18: (Seite 78 bis 79) Sequenz der Ribonukleotid Reduktase aus *Euglena gracilis*. 5'-und 3'- nicht-kodierende Nukleotide sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Unterhalb der Nukleotidsequenz ist die abgeleitete Aminosäuresequenz aufgeführt. Die *spliced leader* Sequenz ist kursiv gedruckt.

Alle internen Peptide sind identisch mit denen der translatierten pEgRNR3. Die Übereinstimmung dieser Peptide mit der abgeleiteten Proteinsequenz von pEgRNR3 bestätigt damit die funktionelle Identität des Klonen. Bei Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz der pEgRNR3 mit anderen Ribonukleotid Reduktase Sequenzen ist die Sequenzähnlichkeit zur RNR aus *Lactobacillus leishmanii* mit 32 % am höchsten. Die *Euglena* Ribonukleotid Reduktase zeigt ferner 29 % Sequenzähnlichkeit zur RNR aus Mycobacteriophage und etwa 25 % zu cyanobakteriellen Homologen aus *Synechocystis*, *Nostoc* und *Thermosynechococcus*. Ein Aminosäuresequenz-Alignment der translatierten *Euglena* pEgRNR3 zu der RNR aus *Lactobacillus* zeigt, dass die fünf Cysteinreste, die im *Lactobacillus* Enzym an der Katalyse beteiligt sind (Booker et al. 1994), in der abgeleiteten Aminosäuresequenz der pEgRNR3 konserviert vorliegen (vgl. Abb. 4-19).

51	EPTCEFYGGLLGPQLPEAERFVLDPALVEEYRHK.KPPFGFNGLGEVVYL	99	<i>Euglena</i>
1MSEEEISLSAEFIDRVKASVKPHWG..KLGWVTYK	32	<i>Lactobacillus</i>
100	RTYAR.EKDNQSEVWLDTVQRVVTGTFEVLQHHVVNKLHCHWDAQKAKE	148	<i>Euglena</i>
33	RTYARWLPEKGRSENWDETVKRVVEGNIN.LDPRLQDSPSLEL.KQSLTE	80	<i>Lactobacillus</i>
149	RSEDMFRRIFEMKFLPPGRGLWAMGSPICRKKGFAAALNNCAFVS.....	193	<i>Euglena</i>
81	EAERLYKLIYGLGATPSGRNLWISGTDYQRRTG..DSLNNCWFWAIRPQK	128	<i>Lactobacillus</i>
194TATLEKDRVGPFLFLMDASMLGVGVGFDNAGAGSFTVPG.	232	<i>Euglena</i>
129	YGDSKIVPSYLGKQEKAVSMPFSCLFDELKGGGVGFVSARSNISQIPRV	178	<i>Lactobacillus</i>
233PDDTQPTYK.....FMIPDKREGWV	252	<i>Euglena</i>
179	DFAIDLQLVVDETSESYDASVKVGVGKNELVQDADSIYYRLPDTREGWV	228	<i>Lactobacillus</i>
253	ESLKRLLKAHFCHT.....ADVEFDYSKIREMGTCLKTFGGTSSGGPPLI	297	<i>Euglena</i>
229	LANALLIDLHFAQTNPDRKQKLIIDLSDIRPYGAEIHGFGGTASGPMPLI	278	<i>Lactobacillus</i>
298	NLHKSIRKILVGEKGPISVTCITDIMNLIIGVCTVAGNIRRSAEIAFGEA	347	<i>Euglena</i>
279	SMLLDVNEVLNNKAGGRLTAVDAADICNLIGKAVVAGNVRRSAELALGSN	328	<i>Lactobacillus</i>
348	DCKEFLDLKSYETNPHRVEYGWASNNISIFAKVGMD.YSDACERVRTNGEP	396	<i>Euglena</i>
329	DDQDFISMK..QDQEKLMHHRWASNNNSVAVDSAFSGYQPIAAGIRENGEP	376	<i>Lactobacillus</i>
397	GFAWLSNMQAFSR.MNGKPDYRDQRVLGNGPCLEQSLESMELCCLVETFP	445	<i>Euglena</i>
377	GIVNLDLSEKNGYGRIVDGYQAGIDGVEGTNPGGEISLANGEPCNLFEVFP	426	<i>Lactobacillus</i>
446	.DKHETLEDFKRTLYSALLYAKTVTLLPLHWRESNEIMLRNRIRIGCSVSG	494	<i>Euglena</i>
427	LIAEEQGWDLQEVFALAAARYAKRVTFSPYDWEISREIIQKNRRIRIGISMSG	476	<i>Lactobacillus</i>
495	IAQFITNR.....GL.....HE.LKT.....WLEEGYDILH	519	<i>Euglena</i>
477	IQDWLLTRLGNRVVTGFKDDFDPEHAEIKVPVYDKRAIKMVDQLYKAVV	526	<i>Lactobacillus</i>
520	QYDCQISEWLICIRQSIKLTSVKPSGTISLVAGATPGVHYPESCYYTRRLR	569	<i>Euglena</i>
527	KADQDYSKTLGCNESIKHTTVKPSGTVAKLAGASEGMHFHYGAYLIQRIR	576	<i>Lactobacillus</i>
570	MARDSPLLERLIKAGYHVEPCCVAPDVTAIVEFP..VAAGN.SIRTRD	615	<i>Euglena</i>
577	FQSDPDLPLPALKACGYRTE.ADIYTENTTCVEFPIKAVGADNPNFASAGT	625	<i>Lactobacillus</i>
616	ITMWEQLSLAAFMRQYWADNQVSATITFDPETEGLHLNQALQYFQYQLKG	665	<i>Euglena</i>
626	VSIAEQFATQAFLOQTYWSDNAVSTITFQ.DSEGDQVESLLRQYRFITKS	674	<i>Lactobacillus</i>
666	ISFLPRYPMGAFKQMPYEAITKEQYEEAIRKVKEDVS..LSSANAIAETV	713	<i>Euglena</i>
675	TSLLP.YFGGSLQQAPKEPIDKETYEKRSQEITGNVEEVFSQLNSDVKDL	723	<i>Lactobacillus</i>
714	EENQOTFCNDNRC.IKL	729	<i>Euglena</i>
724	ELVDQTDCEGGACPIK.	739	<i>Lactobacillus</i>

Abb. 4-19: Aminosäuresequenz-Alignment der *Euglena* pEgRNR3-Translation mit der Ribonukleotid Reduktase aus *Lactobacillus leichmannii* (L20047). Die fünf Cystein-Reste, welche den Cystein-Resten im aktiven Zentrum der *Lactobacillus* RNR (Booker et al. 1994) entsprechen, sind durch ein schwarzes Dreieck gekennzeichnet. Das Alignment wurde mit Hilfe des GAP Programms (GCG) erstellt.

4.4 Identifizierung weiterer Protein-kodierender Gene, die differentiell unter anaeroben Bedingungen exprimiert werden

4.4.1 Erstellung von subtrahierten cDNA-Banken mit Hilfe des "Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kits"

In einer subtrahierten cDNA-Bank sind die cDNA-Fragmente angereichert, die mit mRNAs korrespondieren, welche in höherer Konzentration in dem "Tester" als in dem "Driver" cDNA-Gemisch vorliegen. Mit der Poly(A)+ RNA aus aerob (2% CO₂ in Luft) im Licht und anaerob (2% CO₂ in N₂) im Dunkeln angezogenen *Euglena*-Zellen wurden nach cDNA-Synthese zwei Subtraktionen durchgeführt. In der Vorwärts-Subtraktion diente die anaerobe cDNA als Tester, die aerobe cDNA als Driver. Mit Hilfe dieser Subtraktion sollte eine Anreicherung anaerob exprimierter Gene bei *Euglena* erzielt werden. Parallel dazu wurde eine Rückwärts-Subtraktion durchgeführt, in der Driver und Tester vertauscht wurden. Das experimentelle Vorgehen für die Herstellung der subtrahierten cDNA-Banken ist unter Abschnitt 3.13.16 ausführlich beschrieben.

4.4.1.1 Spaltung der cDNA in kleinere Fragmente und Ligation der Adaptoren

Die Spaltung der aeroben und anaeroben cDNA mit dem Restriktionsenzym RsaI erzeugte kleinere, für die Subtraktion vorteilhafte cDNA-Fragmente. Die Adapterligation an cDNA generierte die Testerpopulation, entsprechend repräsentierte nicht-ligierte cDNA die Driverpopulation. Zur Kontrolle der RsaI-Spaltung wurden Aliquots der gereinigten cDNA-Populationen vor und nach der RsaI-Inkubation über ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetrennt. Nach der Spaltung lag der Molekulargewichtsbereich der gespaltenen DNA zwischen 0,2 und 1 kb. Damit war die RsaI-gespaltene cDNA deutlich kleiner als ungespaltene cDNA (Daten nicht gezeigt), so dass von einer erfolgreichen Reaktion ausgegangen werden konnte. Nach Reinigung der cDNA-Spaltprodukte wurde eine Hälfte der Tester-cDNA mit Adapter 1, die andere Hälfte der Tester-cDNA mit Adapter 2R ligiert (vgl. Abschnitt 3.13.16.2).

4.4.1.2 Subtraktive Hybridisierung und *suppression* PCR

In der ersten Hybridisierungsrunde wurden die zwei Tester-cDNA-Populationen getrennt mit den zugehörigen Driver-cDNAs denaturiert und hybridisiert. Für die zweite Hybridisierungsrunde wurden die beiden Ansätze aus der ersten Hybridisierung miteinander vermischt und gleichzeitig mit frisch denaturiertem Driver versetzt (vgl. Abschnitt 3.13.16.3). Aliquots der resultierenden Subtraktionen wurden zur Bildung der

anaerob und aerob subtrahierten cDNA-Banken amplifiziert. Die nicht subtrahierten anaeroben und aeroben Kontroll-Banken wurden von den entsprechenden Ligationsansätzen ausgehend exponentiell vermehrt (vgl. Abschnitt 3.13.16.4). In Abb. 4-20 ist das Ergebnis der ersten und zweiten PCR für die Anreicherung aerob bzw. anaerob exprimierter cDNA-Fragmente gezeigt.

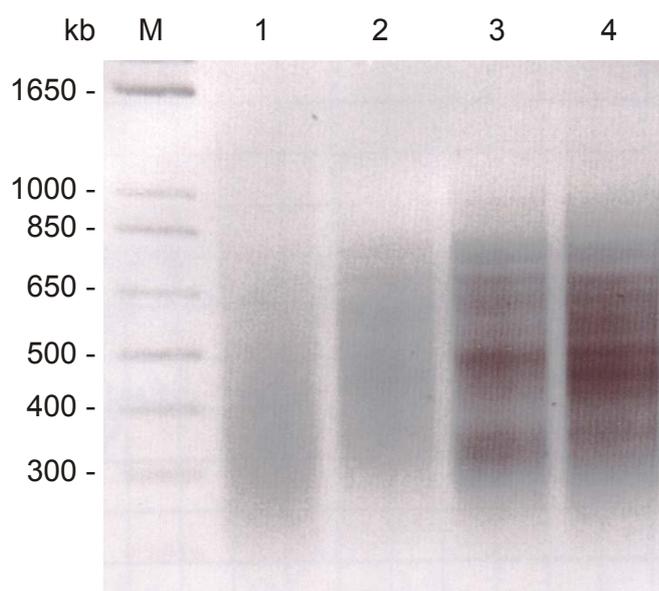


Abb. 4-20 Negativ-Darstellung der PCR-Amplifikate der vorwärts- und rückwärts subtrahierten experimentellen cDNAs und der unsubtrahierten Kontrollen nach dem 2. PCR-Zyklus. M: Marker. Spur 1: 2. PCR der vorwärts subtrahierten experimentellen cDNA. Spur 2: 2. PCR der unsubtrahierten Kontrolle für die Vorwärts-Subtraktion. Spur 3: 2. PCR der rückwärts subtrahierten experimentellen cDNA. Spur 4: 2. PCR der unsubtrahierten Kontrolle für die Rückwärts-Subtraktion.

In beiden Fällen konnten im subtrahierten Ansatz cDNA-Fragmente amplifiziert werden (s. Abb. 4-20, Spur 1 und 3). Im Vergleich der vorwärts subtrahierten Bank zu ihrer nicht subtrahierten Kontrolle zeigten die subtrahierte Proben keine klaren Banden auf und ihre Produkte waren kleiner (s. Abb. 4-20, Spur 1 und 2). Bei Vergleich der rückwärts subtrahierten Bank mit ihrer nicht subtrahierten Kontrolle waren deutliche Unterschiede im Bandenmuster erkennbar, insbesondere im Bereich zwischen 350 bp und 500 bp (s. Abb. 4-20, Spur 3 und 4). Wie erwartet, zeigte sich auch eine Verschie-

bung der Fragmentgröße bei Vergleich der Amplifikate der ersten PCR mit denen der zweiten PCR (Daten nicht gezeigt). Der Größenunterschied zwischen erster und zweiter PCR erklärt sich durch die Position der verwendeten Primer in den Adaptoren (vgl. Abb. 3-1). Banden, die differentiell exprimierte cDNAs repräsentieren, werden in der zweiten PCR kleiner.

4.4.1.3 Southern-Hybridisierung zur Ermittlung der Subtraktionseffizienz

Southern Blot Analysen der subtrahierten und unsubtrahierten sekundären PCR-Produkte können durch Hybridisierung dieser Proben gegen verschiedene Gene Aufschluss über die Subtraktionseffizienz geben. Die Häufigkeit sogenannter "housekeeping" Gene, d. h. Gene, die konstitutiv exprimiert werden, sollte nach der Subtraktion abnehmen. Erwartungsgemäß sind diese Gene nach der Subtraktion unterrepräsentiert. Entsprechend sollte die Häufigkeit der cDNAs zunehmen, von denen bekannt ist, dass sie unter den entsprechenden Kulturbedingungen hochreguliert werden. Um zu untersuchen, ob in beiden subtrahierten PCR-Ansätzen im Vergleich zu den nicht subtrahierten Kontrollen Gene angereichert wurden, die anaerob stärker exprimiert werden, wurde zunächst die PNO als homologe Sonde gewählt. Die PNO ist bei Anzucht der *Euglena*-Zellen unter Anaerobiose im Dunkeln deutlich stärker exprimiert als unter Aerobiose (Rotte et al. 2001, s. auch Abb. 4-6). Zusätzlich wurde die konstitutiv exprimierte cytosolische Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GapC) aus *Euglena gracilis* als homologe Sonde eingesetzt. Die Ergebnisse der Hybridisierung mit der PNO sind in Abb. 4-21 (A) gezeigt. In den PCR-Proben beider unsubtrahierter Kontrollen für die Vorwärts- und Rückwärts-Subtraktion (s. Abb. 4-21 A, Spur 1 und 2) lässt sich das cDNA-Fragment für die PNO nachweisen, die Häufigkeit dieses Fragmentes ist jedoch in der unsubtrahierten Kontrolle für die Rückwärts-Subtraktion geringer (vgl. Abb. 4-21 A, Spur 2). Wie erwartet, ist die Häufigkeit des cDNA-Fragmentes für die PNO nach der Vorwärts-Subtraktion (s. Abb. 4-21 A, Spur 3) deutlich höher, während es sich in den rückwärts-subtrahierten Proben nicht mehr nachweisen lässt (vgl. Abb. 4-21 A, Spur 4). In Abb. 4-21 B ist die Hybridisierung der homologen GapC-Sonde gegen die sekundären PCR-Produkte gezeigt. In den PCR-Proben beider unsubtrahierter Kontrollen für die Vorwärts- und Rückwärts-Subtraktion lässt sich das GapC-Gen nachweisen (s. Abb. 4-21 B, Spur 1 und 3), die Häufigkeit dieses cDNA-Fragmentes ist jedoch in der unsubtrahierten Kontrolle für die Vorwärts-Subtraktion deutlich geringer (vgl. Abb. 4-21 B, Spur 1). Wie erwartet, ist die Häufigkeit des GapC-Fragmentes nach der Vorwärts-Subtraktion deutlich geringer (s. Abb. 4-21 B, Spur 2), nach der Rückwärts-Subtraktion deutlich höher (s. Abb. 4-21 B, Spur 4). In den Tester cDNA-Populationen

waren demnach die subtraktiven Hybridisierungen und die *supression* subtraktive PCR erfolgreich

verlaufen, d. h. cDNA-Fragmente, die mit differentiell exprimierten Transkripten korrespondierten, wurden angereichert. Die effizient subtrahierten cDNA-Populationen wurden im Folgenden verwendet, um differentiell exprimierte Transkripte zu isolieren.

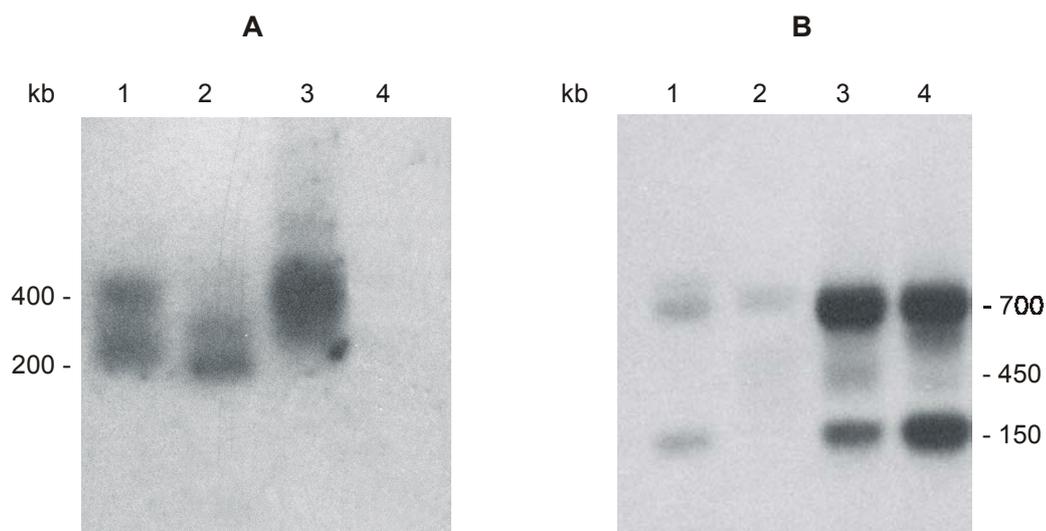


Abb. 4-21: (A) Hybridisierung der homologen PNO-Sonde gegen die sekundären PCR-Produkte der vorwärts- und rückwärts subtrahierten Banken sowie der Kontrollen nicht-subtrahierter Banken. Spur 1: unsubtrahierte Kontrolle für die Vorwärts-Subtraktion. Spur 2: unsubtrahierte Kontrolle für die Rückwärts-Subtraktion. Spur 3: vorwärts subtrahierte experimentelle cDNA. Spur 4: rückwärts subtrahierte experimentelle cDNA. (B) Hybridisierung der homologen GapC-Sonde gegen die sekundären PCR-Produkte der vorwärts- und rückwärts subtrahierten Banken sowie der Kontrollen nicht-subtrahierter Banken. Spur 1: unsubtrahierte Kontrolle für die Vorwärts-Subtraktion. Spur 2: vorwärts subtrahierte experimentelle cDNA. Spur 3: unsubtrahierten Kontrolle für die Rückwärts-Subtraktion. Spur 4: rückwärts subtrahierte experimentelle cDNA.

4.4.2 Differentielle Hybridisierung mit den subtrahierten cDNA-Sonden

Wie jede subtrahierte cDNA-Bank enthalten auch die hier hergestellten vorwärts und rückwärts subtrahierten cDNA-Sonden cDNA-Fragmente, die nicht mit differentiell exprimierten Transkripten korrespondieren und den sogenannten Hintergrund bilden. Mit Hilfe der differentiellen Hybridisierung wird versucht, tatsächlich differentiell ex-

primierte Transkripte zu isolieren. Ein Ansatz zur differentiellen Hybridisierung einer cDNA-Bank verwendet sowohl die vorwärts als auch die rückwärts subtrahierten cDNA-Populationen als Sonden und vergleicht die mit den unterschiedlichen Sonden erhaltenen Hybridisierungssignale. Klone, die entweder mit den vorwärts oder aber mit den rückwärts subtrahierten Sonden ein stärkeres Signal zeigten, wurden als Kandidaten bezeichnet. Differentielle, unter anaeroben Bedingungen exprimierte Kandidaten hybridisieren mit der vorwärts subtrahierten Sonde (Sonde AA-) stärker als mit der rückwärts subtrahierten Sonde (Sonde A-), unter aeroben Bedingungen differentiell exprimierte Kandidaten hybridisieren stärker mit der rückwärts subtrahierten Sonde.

4.4.2.1 Auswahl von Kandidaten durch differentielle Hybridisierung mit den subtrahierten cDNA-Sonden

Die Auswahl der Kandidaten durch differentielle Hybridisierung erfolgte wie in Abb. 4-22 gezeigt.

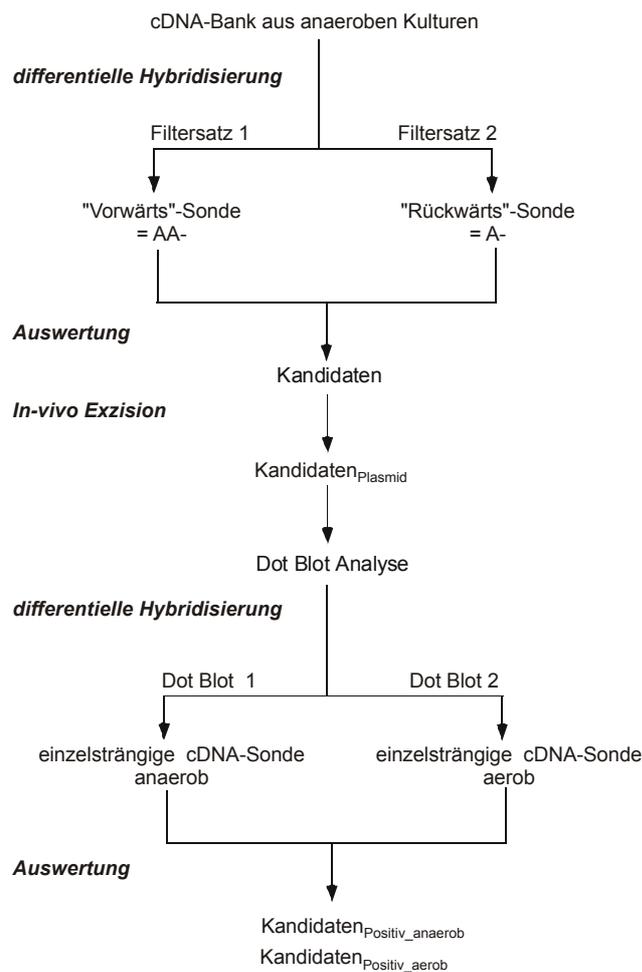


Abb. 4-22: Schematische Darstellung der Auswahl von Kandidaten bei der subtraktiven Hybridisierung. Identische Replikafiltersätze einer anaeroben cDNA-Bank wurden mit der subtrahierten cDNA-Sonde AA- bzw. der subtrahierten cDNA-Sonde A- hybridisiert. Differenziell exprimierte Kandidaten wurden gepickt und *in vivo* exzisiert. Die so erhaltenen Plasmide (Kandidaten_{Plasmid}) wurden einer Dot Blot Analyse unterzogen. Replika-Dot Blots wurden mit aerober und bzw. anaerober einzelsträngiger cDNA-Sonde erneut hybridisiert, um tatsächlich differenziell exprimierte Kandidaten zu identifizieren (Kandidaten_{Positiv}).

Die entsprechenden Plaques, die in der ersten Hybridisierung ein positives Signal aufwiesen, wurden vereinzelt, verdünnt und erneut ausplattiert (s. Abschnitt 3.13.10). Nach Herstellung von Filtern wurde mit den gleichen Sonden erneut wie zuvor hybridisiert. Nach der 2. Hybridisierung stärker hybridisierende Plaques wurden nachfolgend *in vivo* exzisiert (Kandidaten_{Plasmid}). Diese Kandidaten_{Plasmid} wurden einer Dot Blot Analyse unterzogen. Dazu wurden identische Dot Blots mit aerober einzelsträngiger cDNA bzw. anaerober einzelsträngiger cDNA hybridisiert. Über Dot Blot Hybridisierung (vgl. Abschnitt 3.13.19) erfolgreich verifizierte Kandidaten wurden als tatsächlich differenziell exprimierte Transkripte gewertet (Kandidaten_{Positiv}).

4.4.2.2 Ergebnisse der Hybridisierung einer cDNA-Bank aus anaerob angezogenen Kulturen mit den subtrahierten cDNA-Sonden

In der ersten Hybridisierung konnten 35 positive Signale (Kandidaten) für aerob angereicherte cDNAs mit Sonde A- und 46 positive Signale (Kandidaten) für anaerob angereicherte cDNAs mit Sonde AA- erhalten werden. Nach der 2. Hybridisierung ließen sich 24 aerob stärker exprimierte Kandidaten mit Sonde A- und 31 anaerob stärker angereicherte Kandidaten mit Sonde AA- identifizieren. Diese Kandidaten wurden sequenziert und mit Hilfe von Datenbank-Vergleichen soweit möglich bekannten Sequenzen zugeordnet. Von den mit der vorwärts subtrahierten Sonde identifizierten 31 Kandidaten konnten 16 erfolgreich *in vivo* exzisiert und sequenziert werden. Sechs dieser 16 Kandidaten konnten bereits bekannten Sequenzen zugeordnet werden (s. Tab. 4-2).

Tab. 4-2: Annotierung der Kandidaten_{Plasmid}, die durch Hybridisierung mit der vorwärts subtrahierten Sonde AA- identifiziert wurden.

Funktion	Anzahl der cDNA-Fragmente
Inosin-Monophosphat Dehydrogenase	1
Pyruvat:NADP ⁺ Oxidoreduktase	1

Ribosomales Protein	3
Transketolase	1

Fünf weitere Kandidaten enthielten Sequenzen mit sogenannten Dinukleotid-Sequenzwiederholungen (*dinucleotide repeats*). Für weitere fünf cDNA-Fragmente konnte unter den öffentlich zugänglichen Sequenzen in Datenbanken keine Homologie gefunden werden. Von den unter Einsatz der rückwärts subtrahierten Sonde identifizierten 24 Kandidaten konnten 18 erfolgreich *in vivo* exzidiert und ansequenziert werden. Von diesen 18 Klonen konnten 16 bekannten Sequenzen zugeordnet werden.

Tab. 4-3: Annotierung der Kandidaten_{plasmid}, die durch Hybridisierung mit der rückwärts subtrahierten Sonde A- identifiziert wurden.

Funktion	Anzahl der cDNA-Fragmente
Carbon Anhydrase	3
Ankyrin-repeat containing Protein	2
AsparaginyI-tRNA Synthase	2
Ribosomales Protein	2
Calmodulin	1
ADP/ATP Carrier Protein	1
ABC-Transporter	1
Polyubiquitin	1
O ₂ -freisetzendes <i>enhancer</i> Protein (PsbP)	1
Kälteschockprotein	1
Phytochrom	1

Drei Klone korrespondierten mit Carbon Anhydrase, sie besaßen den größten Anteil an der Redundanz in dieser cDNA-Bank (s. Tab. 4-3). Zwei weitere Sequenzen konnten dem Ankyrin-repeat containing Protein zugeordnet werden. AsparaginyI-tRNA Synthase wurde ebenfalls durch mehrere Kandidaten repräsentiert. Weitere cDNA-Sequenzen zeigten Sequenzähnlichkeit zu Calmodulin, zum ADP/ATP Carrier Protein, zu ribosomalen Proteinen, zum ABC-Transporter, zu Polyubiquinon und zum O₂-

freisetzenden Protein (PsbP) (vgl. Tab. 4-3). Für zwei cDNA-Fragmente konnte unter den öffentlich zugänglichen Gensequenzen keine Sequenzähnlichkeit detektiert werden.

4.4.2.3 Ergebnisse der Dot Blot Hybridisierung

Die Dot Blot Analyse wurde wie unter Abschnitt 3.13.19 beschrieben durchgeführt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit dieser Methode wurden die Dot Blots in doppelter Ausführung hergestellt. Als zusätzliche interne Kontrolle wurde auf jedem Dot Blot die Plasmid-DNA leicht versetzt doppelt aufgetragen. Exemplarisch wurde je ein Kandidat-Plasmid einer jeden Kategorie gewählt, die mittels BLAST-Suche ermittelt wurden (vgl. Tab. 4-2 und Tab. 4-3). Die Abb. 4-23 zeigt am Beispiel eines Dot Blots die Hybridisierung mit den Sonden AA- und A-. Der zweite Kontroll-Dot Blot (nicht gezeigt) replizierte exakt die Ergebnisse des ersten Dot Blot Experiments. Zum Auffinden tatsächlich differentiell exprimierter Kandidaten wurden die Signale digitalisiert und ihre Stärke unter Subtraktion des Hintergrundsignals quantifiziert (s. Abschnitt 3.13.19.3). Ein Kandidat wurde dann als positiv gewertet, wenn sein Signal relativ zur Signalstärke mit der entgegengesetzt subtrahierten Sonde um mindestens den Faktor zwei intensiver war.

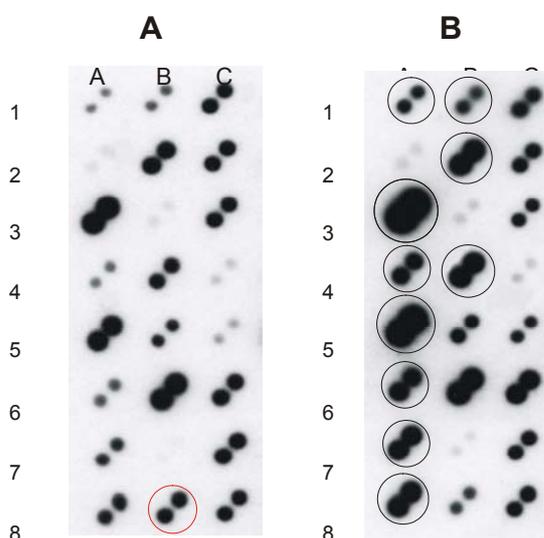


Abb. 4-23: Auffinden von differentiell hybridisierenden Klonen durch Dot Blot Hybridisierung mit (A) anaerober einzelsträngiger cDNA und (B) aerober einzelsträngiger cDNA. A1 bis B5 repräsentieren Kandidaten_{Positiv_Aerob}. B6-C8 repräsentieren Kandidaten_{Positiv_Anaerob}. Als Kandidaten_{Positiv-Anaerob} eingestufte Signale sind rot, als Kandidaten_{Positiv-Aerob} eingestufte Signale sind schwarz eingekreist. Der zweite Kontroll-Dot Blot (nicht gezeigt) reproduzierte exakt die Ergebnisse der ersten Dot Blot Analyse.

Von den 24 aufgetragenen experimentellen Plasmiden konnten 11 tatsächlich differentiellen Kandidaten_{positiv} zugerechnet werden. Nur ein Klon der Kandidaten_{positiv-anaerob}, die Pyruvat:NADP⁺ Oxidoreduktase, war tatsächlich unter anaeroben Bedingungen stärker exprimiert. Dagegen zeigten zehn der Kandidaten_{positiv-aerob} unter aeroben Bedingungen eine stärkere Expression. Diese umfassen Proteine der Translation wie ribosomale Proteine und Asparaginyl-tRNA Synthase, Importer wie den ABC-Transporter oder den ADP/ATP Carrier, Proteine der Photosynthese wie das O₂-freisetzende *enhancer* Protein (die 23 kDa Untereinheit des O₂-freisetzenden Komplexes von Photosystem II) sowie Calmodulin und Ubiquitin.

Tab. 4-4: Über Dot Blot Hybridisierung verifizierte Kandidaten_{positiv} der subtraktiven Hybridisierung, die differentiell exprimiert werden.

<i>aerob stärker exprimierte Kandidaten</i>					
Plasmid-Nr.	Blot-Position	Sequenzähnlichkeit %	Zugangsnummer	BLAST Nukleotid Suchergebnis	Organismus
1_Aerob	A1	100	P11118	Calmodulin	<i>Euglena</i>
4_Aerob	A3	31	AF034387	Ankyrin-repeat containing Protein	<i>Arabidopsis</i>
5_Aerob	A4	31	NP_356511.1	Hypothetical Protein	<i>Agrobacterium</i>
6_Aerob	A5	49	P31692	ADP/ATP Carrier	<i>Chlorella</i>
8_Aerob	A6	50	AF370277	40S ribosomales Protein	<i>Arabidopsis</i>
9_Aerob	A7	52	NP_503105.1	ABC-Transporter	<i>Caenorhabditis</i>
10_Aerob	A8	42	NP_125939.1	Asparaginyl-tRNA Synthase	<i>Pyrococcus</i>
13_Aerob	B1	42	NC_001263	Carbon Anhydrase	<i>Deinococcus</i>
15_Aerob	B2	98	X98063	Polyubiquitin	<i>Pinus</i>
20_Aerob	B4	42	P93566	O ₂ -freisetzendes <i>enhancer</i> Protein	<i>Solanum</i>

<i>anaerob stärker exprimierte Kandidaten</i>					
Plasmid-Nr.	Blot-Position	Sequenzähnlichkeit %	Zugangsnummer	BLAST Nukleotid Suchergebnis	Organismus
8_Anaerob	B8	100	AJ278425	Pyruvat:NADP ⁺ Oxidoreduktase	<i>Euglena</i>

4.4.3 Differentielle Hybridisierung mit nicht subtrahierten cDNA-Sonden

Ebenso wie die Methode der subtraktiven Hybridisierung ermöglicht auch die Methode der differentiellen Hybridisierung mit nicht subtrahierten Sonden den Vergleich von unterschiedlichen cDNA-Populationen und die Isolierung von Genen, die in einer cDNA-Population stärker vertreten sind als in der anderen (Kandidaten). Sie unterscheidet sich vom subtraktiven Ansatz jedoch in einigen wichtigen Punkten: i) Transkripte, die beiden cDNA-Populationen gemeinsam sind, werden nicht subtrahiert und damit nicht aus der cDNA-Population entfernt, d. h. die Gesamtheit der cDNA-Population bleibt erhalten, ii) mögliche differentielle Transkripte werden nicht exponentiell mittels PCR-Amplifikation vermehrt, iii) seltene Transkripte werden nicht bevorzugt angereichert, iv) cDNAs werden nicht mit Hilfe eines Restriktionsenzym fragmentiert.

4.4.3.1 Auswahl der Kandidaten durch differentiellen Hybridisierung einer cDNA-Bank von anaerob angezogenen Kulturen mit einzelsträngigen cDNA-Sonden

Das experimentelle Vorgehen bei der differentiellen Hybridisierung ist schematisch in Abb. 4-1 gezeigt.

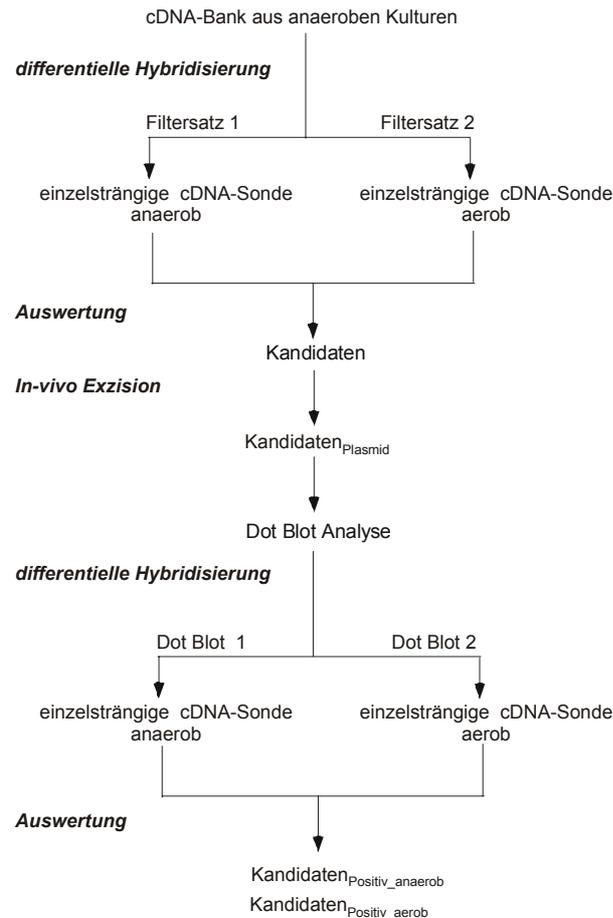


Abb. 4-24: Schematische Darstellung der Auswahl von Kandidaten bei der differentiellen, nicht subtraktiven Hybridisierung. Identische Replikafiltersätze einer anaeroben cDNA-Bank wurden mit den aeroben bzw. anaeroben einzelsträngigen cDNA-Sonden hybridisiert. Differentiell exprimierte Kandidaten wurden gepickt und *in vivo* exzidiert. Die so erhaltenen Plasmide ($\text{Kandidaten}_{\text{Plasmid}}$) wurden einer Dot Blot Analyse unterzogen. Replika-Dot Blots wurden mit aeroben und bzw. anaeroben einzelsträngiger cDNA-Sonde erneut hybridisiert, um tatsächlich differentiell exprimierte Kandidaten zu identifizieren ($\text{Kandidaten}_{\text{Positiv}}$).

Für die differentielle Hybridisierung mit nicht subtrahierten Sonden wurde radioaktiv markierte einzelsträngige cDNA von aerob, im Licht angezogenen Zellen sowie radioaktiv markierte einzelsträngige cDNA von anaerob, dunkel kultivierten Zellen (vgl. Abschnitt 1.13.18.1) als Sonden gegen eine *Euglena* cDNA-Bank aus anaerob angezogenen Kulturen eingesetzt. Entsprechenden Plaques, die der 1. Hybridisierung ein positives Signal aufwiesen, wurden vereinzelt, verdünnt und erneut ausplattiert (s. Abschnitt 3.13.10). Nach Herstellung von Filtern wurde mit den gleichen Sonden wie zuvor hybridisiert. Nach der 2. Hybridisierung stärker hybridisierende Plaques wurden nachfolgend *in vivo* exzidiert ($\text{Kandidaten}_{\text{Plasmid}}$). Die $\text{Kandidaten}_{\text{Plasmid}}$ wurden anschließend einer Dot Blot Analyse unterzogen. Dazu wurden die Dot Blots abermals mit einzel-

strängiger aerober bzw. einzelsträngiger anaerober cDNA hybridisiert. Über Dot Blot Hybridisierung (vgl. Abschnitt 3.13.19) erfolgreich verifizierte Kandidaten_{Positiv} wurden als tatsächlich differentiell exprimierte Transkripte gewertet (Kandidaten_{Positiv}).

4.4.3.2 Ergebnisse der differentiellen Hybridisierung der anaeroben *Euglena* cDNA-Bank mit den einzelsträngigen aeroben und anaeroben cDNA-Sonden

Nach der 2. Hybridisierung ließen sich 17 Plaques identifizieren, die ein deutlich stärkeres Signal mit der einzelsträngigen anaeroben cDNA-Sonde zeigten. Von diesen wiesen 14 Plaques ein deutlich stärkeres Signal mit der einzelsträngigen aeroben cDNA-Sonde auf. Diese Kandidaten wurden sequenziert und soweit möglich mit Hilfe von Sequenzdatenbank-Vergleichen bekannten Sequenzen zugeordnet.

Tab. 4-5: Annotierung der Kandidaten_{Plasmid}, die durch Hybridisierung mit anaerober einzelsträngiger cDNA als Sonde identifiziert wurden.

Funktion	Anzahl der cDNA-Fragmente
Endonuklease	1
Chlorophyll-Bindeprotein	1
Glutamin Synthase	1
Hsp 70	1
Phosphodiesterase	1
40S ribosomales Protein	1
Cyclin	1
Hypothetisches Protein	3

Von den über Hybridisierung mit anaerober einzelsträngigen cDNA identifizierten 17 Kandidaten konnten 13 erfolgreich *in vivo* exzisiert und sequenziert werden. Von diesen konnten wiederum zehn bekannten Sequenzen zugeordnet werden, drei davon zeigten Sequenzähnlichkeit zu hypothetischen Proteinen unbekannter Funktion (s. Tab. 4-5). Ein weiterer Kandidat wies eine Sequenz mit sogenannten Dinukleotid-Sequenzwiederholungen (*dinucleotide repeats*) auf. Für weitere zwei cDNA-Fragmente wurde unter den öffentlich zugänglichen Sequenzen keine Homologie gefunden. Von den mit Hilfe der aeroben einzelsträngigen cDNA-Sonde identifizierten 14 Kandidaten konnten 13 bekannten Sequenzen zugeordnet werden (vgl. Tab. 4-6).

Tab. 4-6: Annotierung der Kandidaten_{Plasmid}, die durch Hybridisierung mit der aeroben einzelsträngigen cDNA-Sonde identifiziert wurden.

Funktion	Anzahl der cDNA-Fragmente
Guanidinnukleotid-Bindeprotein	1
ADP/ATP Carrier	4
ribosomales Protein	2
Elongationsfaktor 1 alpha	1
Ubiquitin	1
Ankyrin- <i>repeat containing</i> Protein	1
Cytosolische GAPDH	1
O ₂ -freisetzendes <i>enhancer</i> -Protein	1
Hypothetisches Protein	1

Vier der Kandidaten korrespondierten mit dem ADP/ATP Carrier. Dieser Transporter besaß den größten Anteil an der Redundanz in dieser cDNA-Bank. Ein cDNA-Fragment enthielt ebenfalls Dinukleotid-Sequenzwiederholungen.

4.4.3.3 Ergebnisse der Dot Blot Hybridisierung

Die Dot Blot Analyse wurde wie unter Abschnitt 3.13.19 beschrieben durchgeführt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden die Dot Blots in doppelter Ausführung hergestellt und auf jedem Dot Blot die Plasmid-DNA leicht versetzt doppelt aufgetragen. Aufgetragen wurde exemplarisch je ein Kandidat_{Plasmid} aus jeder Kategorie, die mittels BLAST-Suche ermittelt wurden (s. Tab. 4-5 und Tab. 4-6). Zum Auffinden tatsächlich differentiell exprimierter Kandidaten wurden die Signale digitalisiert und ihre Signalstärke quantifiziert (s. Abschnitt 3.13.19.4). Ein Kandidat wurde dann als positiv gewertet, wenn sein Signal relativ zur Signalstärke mit der entgegengesetzt subtrahierten Sonde um mindestens den Faktor zwei intensiver war. Von den 21 aufgetragenen experimentellen Plasmiden konnten zehn differentiellen Kandidaten_{Positiv} zugerechnet werden.

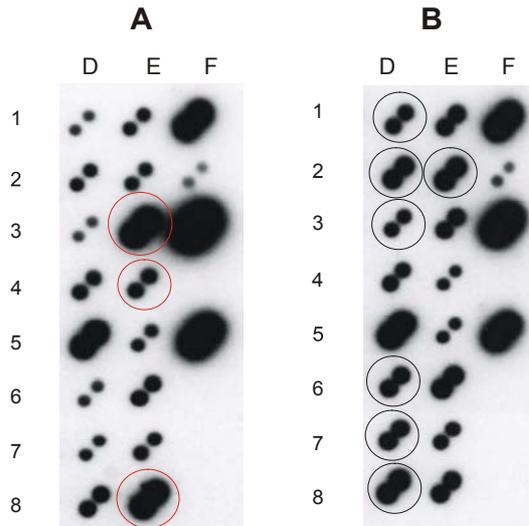


Abb. 4-25: Auffinden von differentiell hybridisierenden Klonen durch Dot Blot Hybridisierung mit (A) anaerober einzelsträngiger cDNA als Sonde und (B) mit aerober einzelsträngiger cDNA als Sonde. D1-E2 repräsentieren Kandidaten_{Positiv_aerob}, E3-F5 repräsentieren Kandidaten_{Positiv_anaerob}. Als Kandidaten_{Positiv_Anaerob} eingestufte Signale sind rot, als Kandidaten_{Positiv-Aerob} eingestufte Signale sind schwarz eingekreist. Der zweite Kontroll-Dot Blot (nicht gezeigt) reproduzierte exakt die Ergebnisse der ersten Dot Blot Analyse.

Drei davon entfielen auf Kandidaten_{Positiv-anaerob}, die unter anaeroben Bedingungen stärker exprimiert waren (vgl. Tab. 4-7). Die Endonuklease und das Chlorophyll-Bindeprotein wurden als differentiell unter anaeroben Bedingungen exprimierte Gene identifiziert. Sieben der Kandidaten_{Positiv_aerob} zeigten unter aeroben Bedingungen eine stärkere Expression (s. Tab. 4-7). Dazu zählen Proteine der Translation und Transkription wie ribosomale Proteine, das Guanidinnukleotid-Bindeprotein und der Elongationsfaktor 1 α , an der Photosynthese beteiligte Proteine wie das O₂-freisetzende *enhancer* Protein, aber auch die cytosolische GAPDH.

Tab. 4-7: Über Dot Blot Hybridisierung verifizierte Kandidaten_{Positiv-anaerob}, die differentiell exprimiert werden. Abkürzungen: *Chlamydom.*, *Chlamydomonas*.

<i>aerob stärker exprimierte Kandidaten</i>					
Plasmid-Nr.	Blot-Position	Sequenzähnlichkeit %	Zugangsnummer	BLAST Nukleotid Suchergebnis	Organismus
1b_Aerob	D1	67	P25387	Guaninnukleotid-Bindeprotein	<i>Chlorella</i>
2b_Aerob	D2	51	D83069	ADP/ATP Carrier	<i>Halocynthia</i>

4a_Aerob	D3	51	D83069	ADP/ATP Carrier	<i>Halocynthia</i>
8a_Aerob	D6	65	Y17004	Ubiquitin	<i>Sulberites</i>
9a_Aerob	D7	31	AF3252797	Ankyrin-Repeat Protein	<i>Nicotiana</i>
11_Aerob	D8	100	L21903	Cytosolische GAPDH	<i>Euglena</i>
13_Aerob	E2	46	X13832	O ₂ -freisetzendes <i>enhancer</i> Protein	<i>Chlamydom.</i>

<i>anaerob stärker exprimierte Kandidaten</i>					
Plasmid-Nr.	Blot-Position	Sequenzähnlichkeit %	Zugangs-Nummer	BLAST Nukleotid Suchergebnis	Organismus
1b_Anaerob	E3	61	AF139998	Endonuklease	<i>Oryza</i>
3_Anaerob	E4	100	S53597	Chlorophyll-Bindeprotein	<i>Euglena</i>
8a_Anaerob	E8	77	AF421549	CDH1-D	<i>Gallus</i>

5 Diskussion

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, Enzyme des Energiestoffwechsels der fakultativ anaeroben Mitochondrien des photosynthetischen Protisten *Euglena gracilis* molekular und phylogenetisch zu analysieren. Anhand der molekularen Grundlagen der anaeroben Biochemie in diesem Organell sollte die Frage beantwortet werden, ob das Mitochondrium von *Euglena* ein echtes *Missing Link* des Energiestoffwechsels zwischen Mitochondrien und Hydrogenosomen darstellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen in Hinblick auf die phylogenetischen und funktionellen Zusammenhänge zwischen Hydrogenosomen und Mitochondrien diskutiert werden. Anhand der gewonnenen Daten im Vergleich zu prokaryotischen Homologen sollen ferner die daraus resultierenden Erkenntnisse über den möglichen Ursprung und den Verlauf der funktionellen Spezialisierung der Mitochondrien und Hydrogenosomen erörtert werden.

5.1 Die mitochondriale Pyruvat:NADP⁺ Oxidoreduktase aus *Euglena gracilis*

5.1.1 Die *Euglena* PNO: eine Genfusion von Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase und NADPH-Cytochrom P450 Reduktase

Die fakultativ anaeroben Mitochondrien von *Euglena gracilis* verwenden für die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat die sauerstoffempfindliche Pyruvat:NADP⁺ Oxidoreduktase (PNO) (Inui et al. 1985, 1987, 1991, Buetow 1989, Kitaoka et al. 1989). Dieses Enzym ist in Hinsicht auf seine biochemischen Eigenschaften und die Struktur und Größe seiner Untereinheiten zur Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFO) aus amitochondrialen Protisten ähnlicher als zum mitochondrialen Pyruvat Dehydrogenase (PDH) Multienzymkomplex (Inui et al. 1987, 1990, 1992). Die PNO wurde als vollständiger cDNA-Klon isoliert, komplett sequenziert und einer Expressions- sowie einer phylogenetischen Analyse unterzogen. Mit Hilfe von degenerierten PCR-Primern gegen konservierte Regionen der PFO konnten zwei unabhängige, vollständige cDNA-Klone isoliert werden. Die Klone pEgPNO3 (5812 bp) und pEgPNO12 (5840 bp) kodieren für ein Protein von 1803 AS mit einem berechneten Molekulargewicht von 170 kDa. Die Struktur der PNO cDNA zeigt, dass es sich dabei um eine Genfusion zwischen der Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase und der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (CPR, EC 1.6.2.4) handelt. Die N-terminale, 1239 bp umfassende PFO-Domäne ist C-terminal mit der 564 bp großen CPR fusioniert. Zusätzlich enthält pEgPNO3 am

N-Terminus ein Transitpeptid von 37 AS, welches dem Import in die Mitochondrien dient. pEgPNO3 und pEgPNO12 repräsentieren zwei unabhängige Klone derselben mRNA mit der gleichen Genfusion. Kürzlich wurde die cDNA-Sequenz einer *Euglena* PNO von einer anderen Arbeitsgruppe isoliert (Nakazawa et al. 2000), welche sich von der pEgPNO3 cDNA in sechs Nukleotiden und fünf Aminosäure-Abweichungen auf Ebene der abgeleiteten Aminosäuresequenzen unterscheidet. Ferner existieren zwei Peptidsequenzen (s. Abschnitt 3.1.3) für die aus isolierten Mitochondrien von *Euglena* aufgereinigte aktive PNO (Inui et al. 1991). Die Übereinstimmung dieser beiden Peptide mit der pEgPNO3 Translation belegt, dass dieser Klon für die mitochondriale PNO kodiert. Das Ergebnis der Southern-Hybridisierung lässt auf eine bis drei Kopien des PNO-Gens im Genom schließen (Rotte et al. 2001). Die PFO-CPR-Fusion in der *Euglena* PNO zeigt, dass die Mitochondrien von *Euglena gracilis* tatsächlich bezüglich des Pyruvat-Stoffwechsels eine physiologische Zwischenform zwischen Mitochondrien und Hydrogenosomen darstellen, in der die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat mittels PFO – als Domäne der PNO – mit dem TCA-Zyklus gekoppelt ist.

5.1.2 Die *Euglena* PNO – in Mitochondrien mehr als eine funktionale PFO?

Die Genfusion von PFO und CPR in der mitochondrialen PNO von *Euglena* verbindet zwei unterschiedliche Proteine zu einem Enzym mit neuer Funktionalität. In Eukaryoten ist die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat die bisher einzige bekannte Funktion der PFO. In der Regel werden die Elektronen von der PFO direkt auf Ferredoxin übertragen, im Fall der Stickstofffixierung dient vor allem Flavodoxin als Elektronenakzeptor. Die CPR dient v. a. als Elektronendonator für Cytochrom P450, Squalen Monooxygenase und Häm Oxygenase und ist ferner Bestandteil von Stickstoffoxid Synthasen und Methionin Synthase Reduktasen (Elmore und Porter 2002). Die CPR ist darüber hinaus direkt an der Cholesterin- und Steroid Synthese beteiligt. Reduziertes NADPH überträgt zwei Elektronen auf FAD, welches wiederum die Elektronen einzeln auf FMN transferiert. FMN agiert schließlich als Bindeglied zwischen der CPR und seinem Protein-Akzeptor (Elmore und Porter 2002). Die mitochondriale *Euglena* PNO katalysiert zwar die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat, im Unterschied zur PFO überträgt die PNO ihre Elektronen jedoch nicht auf Ferredoxin oder Flavodoxin, sondern über einen intramolekularen Elektronentransport auf die NADP-Domäne der C-terminal fusionierten CPR (Inui et al. 1991). Das dabei gebildete Acetyl-CoA wird unter Aerobiose in den modifizierten TCA-Zyklus eingeschleust (Buetow 1989, Kitaoka et al. 1989). Unter anaeroben Bedingungen ist die PNO das Schlüsselenzym der Wachsesterfermentation. In diesem Fall dient das durch die PNO-Reaktion gebildete Acetyl-CoA sowohl

als Primer und C2-Donator für die mitochondriale Fettsäuresynthese (s. Abschnitt 1.5) (Inui et al. 1985, Kitaoka et al. 1989).

Die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat ist möglicherweise nicht die einzige Funktion der PNO. Ein als Aquacobalamin Reduktase isoliertes und aufgereinigtes Enzym stellte sich nach Ansequenzierung als NADPH-Cytochrom P450 Reduktase Domäne der PNO heraus (Watanabe et al. 1993). Es ist in 16 Aminosäuren des N-Terminus der

Aquacobalamin Reduktase (Watanabe et al. 1993) identisch mit dem dem N-Terminus des kleineren tryptischen CPR-Fragments der PNO (Inui et al. 1991) und wurde vermutlich im Zuge der Behandlung des mitochondrialen Homogenats mit Trypsin von der PNO abgespalten (Watanabe et al. 1993). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis besitzt die aufgereinigte *Euglena* PNO Aquacobalamin Reduktase Aktivität und reduziert unter Verwendung von NADPH Aquacobalamin zu Cob(II)alamin (Watanabe et al. 1987, 1993). Die Aktivitäten der Aquacobalamin Reduktase und die vollständige Umwandlung von Aquacobalamin zu 5'-Desoxy-adenosylcobalamin wurden in *Euglena* bisher ausschließlich in den Mitochondrien nachgewiesen (Watanabe et al. 1987). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PNO zusätzlich eine Rolle in der Reduktion von Aquacobalamin und damit in der Synthese von Cobalamin-abhängigen Cofaktoren spielen könnte (Watanabe et al. 1993).

5.1.3 Die *Euglena* PNO – ein sauerstoffsensitives Enzym in einem sauerstoffverbrauchenden Organell

Die Northern Hybridisierung zeigt, dass die mitochondriale PNO von *Euglena* sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen exprimiert wird. Die mRNA-Expression ist in dunkel, anaerob (2 % CO₂ in N₂) angezogenen Zellen gegenüber aerob (2 % CO₂ in Luft) kultivierten Zellen etwa zweimal höher. *Euglena* Kulturen, die anaerob, jedoch im Licht wuchsen, zeigten eine deutliche Reduktion der mRNA-Expression (Rotte et al. 2001). Es stellt sich somit die Frage, wie ein sauerstoffsensitives Enzym wie die PNO seine Funktion in Anwesenheit von Sauerstoff aufrechterhalten kann.

Mit Ausnahme der *Desulfovibrio* PFO (Pieulle et al. 1997) werden alle bisher bekannten PFO reversibel durch Sauerstoff gehemmt. Die Unempfindlichkeit der *Desulfovibrio* PFO scheint mit einer zusätzlichen Domäne von 60 AS am C-Terminus des Proteins zusammenzuhängen, die anderen bekannten PFO-Enzymen fehlt (Pieulle et al.

1997). Dennoch ist PFO das funktionelle Enzym der oxidativen Decarboxylierung in einigen aerotoleranten oder sogar sauerstoffverbrauchenden Organismen. Diese umfassen Prokaryoten wie Cyanobakterien und stickstofffixierende Rhizobien, aber auch eukaryotische Protisten wie *Euglena*. In Cyanobakterien findet die Stickstofffixierung in spezialisierten Zellen, den Heterozysten, statt, die keine oxygene Photosynthese durchführen und folglich keinen Sauerstoff in ihren Zellen produzieren. *Bradyrhizobium* besitzt eine alternative *cbb₃*-Typ Oxidase mit einer sehr viel höheren Affinität zu Sauerstoff ($K_m = 7 \text{ nm}$) als die terminale *aa3* Cytochrom *c* Oxidase (Zufferey et al. 1998). Diese hält die Sauerstoffkonzentration im Cytosol gering und gewährleistet so die Funktion sowohl der sauerstoffempfindlichen PFO als auch der sauerstoffempfindlichen Nitrogenase. *Azotobacter* ist zur Stickstofffixierung unter einer Bandbreite unterschiedlicher O_2 -Konzentrationen befähigt, obwohl sich ihr Nitrogenase-Komplex bezüglich seiner Sauerstoffsensitivität nicht von anderen Nitrogenasen unterscheidet (Bertsova und Bogachev 2002). Diese stickstofffixierenden Bakterien besitzen sogar drei verschiedene Typen von terminalen Oxidasen, welche die Sauerstoffkonzentration im Cytoplasma dieses Prokaryoten senken (Bertsova und Bogachev 2002). In Eukaryoten ist bisher keine alternative *cbb3*-Typ terminale Oxidase mit einer erhöhten Affinität zu Sauerstoff beschrieben worden. *Euglena gracilis* besitzt zusätzlich zur *aa3*-Typ Cytochrom Oxidase eine alternative terminale Oxidase (Buetow 1989). Zwar besitzt diese im Vergleich zur *aa3* Typ Cytochrom Oxidase eine deutlich geringere Affinität zu Sauerstoff ($K_m = 0,02 - 0,05 \text{ }\mu\text{M}$ gegenüber $K_m = 3,7 \text{ }\mu\text{M}$) (Buetow 1989), doch könnte dieses zusätzliche respiratorische System, ähnlich wie für *Azotobacter* postuliert, dazu beitragen, die Atmungsaktivität zu erhöhen und dadurch die Sauerstoffkonzentration in den Mitochondrien niedrig zu halten.

5.1.4 Die *Euglena* PNO ist vermutlich durch Genfusion und Rekombinationsereignisse unterschiedlicher Domänen entstanden

Euglena gracilis ist der bislang einzige Organismus, für den eine funktionale, mitochondrial lokalisierte PNO beschrieben wurde. Bemerkenswerterweise besitzt jedoch ein Organismus aus der Gruppe der Apikomplexen die gleiche Genfusion von PFO und CPR (Rotte et al. 2001). Aus *Cryptosporidium parvum* wurde kürzlich eine PNO isoliert, welche kollinear zur *Euglena* PNO ist (s. Abb. 5-1, E). Jedoch sind in *Cryptosporidium* weder die physiologische Funktion noch die Lokalisation der PNO bekannt (Rotte et al. 2001).

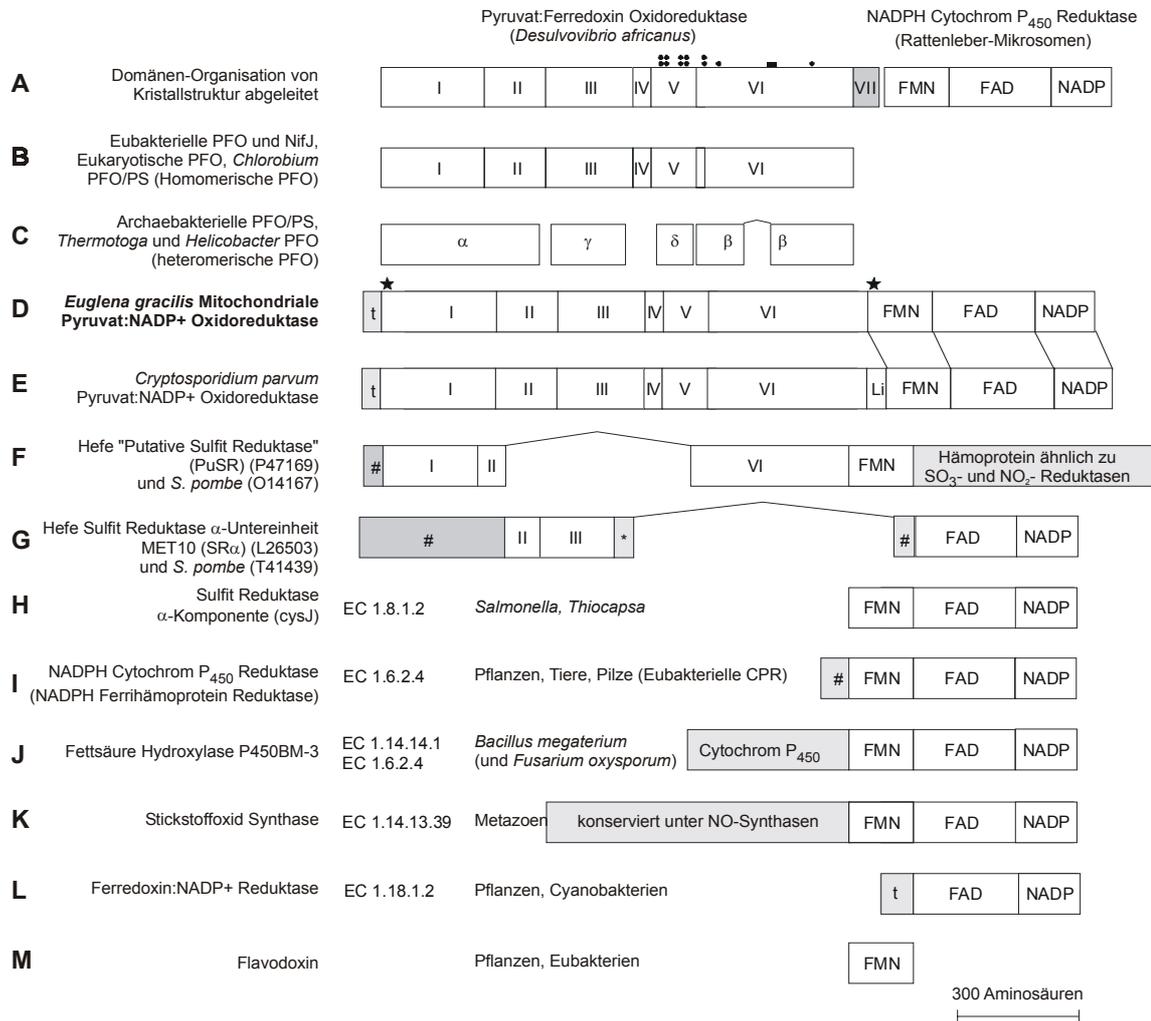


Abb. 5-1 Sequenzähnlichkeit und Domänen-Organisation unter PFO, CPR und verwandten Proteinen. Sternchen kennzeichnen Sequenzbereiche, die keinen BLAST Treffer zu anderen Proteinen zeigen. (A) *Desulfovibrio* PFO (Charon et al. 1999) und NADPH-Cytochrom P₄₅₀ Reduktase von Rattenleber-Mikrosomen (Wang et al. 1997); Domänen sind der Kristallstruktur entnommen. Schwarze Punkte: Konservierte Cystein-Reste von Eisen-Schwefel-Clustern; schwarzer Balken: konservierte TPP-Bindestelle. (B) homodimerische eukaryotische PFO, eubakterielle PFO, NifJ und *Chlorobium* Pyruvat Synthase. (C) Heterotetramerische PFO/Pyruvat Synthase von Archaeobakterien, *Thermotoga* und *Helicobacter*. (D) und (E) *Euglena* und *Cryptosporidium* PNO. t: mitochondriales Transitpeptid; Li: Linker-Region. Sternchen kennzeichnen die Lage der Peptide, welche durch Sequenzierung des aufgereinigten Enzyms erhalten wurden (Inui et al. 1991). (F) Konservierung zwischen PNO und der putativen Sulfidreduktase aus *Saccharomyces cerevisiae* (PuSR; P47169) und *Schizosaccharomyces pombe* (O14167). (G) Sulfidreduktase α-Untereinheit (MET10) von *S. cerevisiae* (L26504) und *S. pombe* (T41439). (H) NADPH Sulfidreduktase (α-Untereinheit aus *Salmonella* und *Thiocapsa*). (I) CPR aus Eubakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren. (J) Fettsäure Hydroxylase (P450BM-3) von *Bacillus megaterium* (Govindaraj und Poulos 1997) und *Fusarium oxysporum* (AB030037). (K) Stickstoffoxid Synthase aus Metazoen. (L) Eubakterielles und pflanzliches Flavodoxin. (M) Cyanobakterielle und pflanzliche Ferredoxin:NADP⁺ Oxidoreduktase.

Die Proteinsequenz aus *Cryptosporidium* unterscheidet sich von der *Euglena* PNO Sequenz in einigen wichtigen Punkten: i) mit einer Gesamtlänge von 1934 AS ist sie um 131 AS länger, ii) sie enthält kein Transitpeptid und iii) die N-terminale PFO-Domäne ist von der C-terminalen CPR-Domäne durch eine 42 AS lange Linkerregion getrennt, welche in BLAST Suchen keine signifikanten Homologien zu bekannten Sequenzen aufweist (Rotte et al. 2001). Die Sequenzidentität der *Euglena* und *Cryptosporidium* PNO auf Aminosäureebene beträgt 40 %.

Datenbank-Vergleiche mit der mitochondrialen pEgPNO sowie den einzelnen Domänen der PFO und CPR zeigen Sequenzähnlichkeiten zu einer Vielzahl von Proteinen. Die in Abb. 5-1 D gezeigten funktionellen Domänen der PNO entsprechen den strukturellen Domänen I – VI (s. Abb. 5-1 A), die von der Kristallstruktur der *Desulfovibrio* PFO abgeleitet wurden (Charon et al. 1999). Die in Abb. 5-1 A dargestellten FMN-, FAD-, und NADP-Bindedomänen der mikrosomalen NADPH-Cytochrom P450 Reduktase wurden ebenfalls über die Kristallstruktur des Enzyms bestimmt (Wang et al. 1997). Wie in derselben Abbildung gezeigt, teilt die PNO Domänen mit einer Vielzahl weiterer Proteine. In diesen Proteinen sind einzelne Subdomänen der PNO mit anderen Domänen oder Proteinen fusioniert und rekombiniert. Bedeutenderweise sind die *Euglena*- und *Cryptosporidium*-PNO-Fusionen einzigartig unter den bisher bekannten PFO-Enzymen. Typische prokaryotische und eukaryotische PFO bestehen aus einem einzigen Polypeptid. Sie sind miteinander kollinear und sind wie die *Desulfovibrio* PFO organisiert (Horner, Hirt und Embley 1999), allerdings fehlt ihnen die für die *Desulfovibrio* PFO spezifische Domäne VII (s. Abb. 5-1 B). Im Gegensatz dazu bestehen die archaebakteriellen PFO und die PFO aus *Thermotoga* und *Helicobacter* aus mehreren unabhängigen Proteinen, die als α -, β -, γ -, und δ -Untereinheit bezeichnet werden (s. Abb. 5-1 C) (Horner, Hirt und Embley 1999). Die *Euglena* PNO ist kollinear mit den eubakteriellen und eukaryotischen PFO, ist aber mit einer C-terminalen CPR fusioniert (s. Abb. 5-1 E). Die PNO teilt 30 – 35 % Sequenzidentität zu den eubakteriellen und eukaryotischen Enzymen, jedoch nur etwa 20 – 25 % Sequenzhomologie zu den archaebakteriellen PFO. Obwohl die Fusion eines kompletten PFO-Proteins mit der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase in der *Euglena*- und *Cryptosporidium* PNO unter bisher bekannten Sequenzen einzigartig ist, sind in vielen Eukaryoten Subdomänen dieser beiden Proteine zu einem Protein neuer Funktion fusioniert. So sind die PNO-Domänen in Hefe auf zwei verschiedene Proteine verteilt. Die vom MET10-Gen kodierte α -Untereinheit der assimilatorischen Sulfitreduktase (SR α) (Hansen, Cherest und Kielland-Brandt 1994) in *Saccharomyces cerevisiae* besitzt – wie sein Homolog in *Schizosaccharomyces pombe* (T41439) – Regionen, die homolog zur PFO-Domäne III,

eines Teil der PFO-Domäne II sowie der FAD- und NADP-Domäne der CPR sind (s. Abb. 5-1 G). DOTPLOT Analysen ergaben ferner Sequenzähnlichkeiten zwischen der PNO und einem weiteren Protein aus Pilzen, welches als putative Sulfitreduktase (in der Abb. 5-1 bezeichnet als PuSR) aus *S. cerevisiae* (P47169) und *S. pombe* (O14167) annotiert ist (s. Abb. 5-1 F). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten von Horner, Hirt und Embley (1999). PuSR kodiert für eine translationale Fusion der PFO-Domänen I, eines Teils der Domäne II und VI. Diese sind mit der FMN-Domäne der CPR verbunden, die wiederum mit einer Hämoprotein-Domäne fusioniert ist. Die PFO-Domänen von PuSR zeigen mit der eubakteriellen PFO 30 % Sequenzidentität in konservierten Regionen. Die Sequenzidentität der FMN-Domäne von PuSR zu den FMN-Domänen eubakterieller und eukaryotischer CPR beträgt ebenfalls etwa 30 %. Mit der FMN-Domäne der *Euglena* und *Cryptosporidium* PNO ist sie dagegen nur zu etwa 20 – 25 % identisch. Die C-terminale Hämoprotein-Domäne von PuSR zeigt 40 % Identität mit den Hämoprotein-Komponenten der eubakteriellen Sulfitreduktase und 25 % Identität mit eubakteriellen Nitritreduktasen. Bemerkenswerterweise wurde in den Analysen der Hefe SR α von Hansen, Cherest und Kielland-Brandt (1994) das Vorhandensein einer Flavodoxin-Domäne in der Hefe Sulfitreduktase β -Untereinheit vorausgesagt. Die Gesamtheit der Daten über PuSR bestätigen diese Voraussage.

Die CPR-Domäne der *Euglena* und *Cryptosporidium* CPR teilt Sequenzähnlichkeit mit der α -Untereinheit der NADPH Sulfitreduktase (CysJ) von *Salmonella* (s. Abb. 5-1 H) und mit der eigentlichen CPR (s. Abb. 5-1 I). Die CPR ist ein aus mehreren Domänen bestehendes Protein. Subdomänen der CPR liegen als einzelne Proteine vor. Die FAD- und NADP(H)-Domänen sind homolog mit der Ferredoxin:NADP⁺ Oxidoreduktase (s. Abb. 5-1 L), welche die Elektronen genau wie PNO auf NADP⁺ überträgt. Die FMN-Domäne ist homolog zu Flavodoxin (s. Abb. 5-1 M), welches im Zuge der Stickstofffixierung als Elektronenakzeptor für PFO fungiert. Damit könnte die CPR selbst durch eine anzestrale Genfusion entstanden sein (Porter und Kasper 1986). Das typische Substrat der CPR, Cytochrom P450 (Wang et al. 1997), ist in der Fettsäure-Hydroxylase P450BM-3 von *Bacillus megaterium* direkt an die CPR-Domäne fusioniert (s. Abb. 5-1 J, Govindaraj und Poulos 1997). Identisch organisiert ist das Homolog aus dem Pilz *Fusarium oxysporum* (AB030037). Darüber hinaus ist die CPR-Domäne Bestandteil der Stickstoffoxid Synthasen von Metazoen (s. Abb. 5-1 K). Die Genfusionen einzelner Subdomänen der PNO verbinden so zahlreiche Proteine ganz unterschiedlicher Reduktionspotentiale miteinander.

Die Konservierung der PFO-CPR Fusion sowohl im Apikomplexen *Cryptosporidium parvum* als auch im photosynthetischen Flagellaten *Euglena gracilis* lässt vermuten, dass die PNO entweder i) bereits im gemeinsamen Vorfahren der eukaryotischen Wirtszelle vorhanden war oder aber ii) von der eukaryotischen Alge akquiriert wurde, von welcher die komplexen Plastiden der Apikomplexen und Eugleniden abstammen. Die fragmentierten, jedoch konservierten PFO-CPR-Fusionen in *S. cerevisiae* und *S. pombe* PuSR und SR α deuten ferner darauf hin, dass diese Proteine von demselben ancestralen Gen abstammen wie die *Euglena* und *Cryptosporidium* PNO.

5.2 Phylogenetische Analysen der PFO- und CPR-Domänen der *Euglena* PNO

5.2.1 Eukaryotische PFO-Sequenzen sind monophyletisch

Eukaryotische PFO und PNO teilen nur etwa 20 – 25 % Identität auf Aminosäureebene mit heteromeren PFO von Archaeobakterien und Eubakterien und mit PFO-Domänen in SR α und PuSR von Pilzen. Aufgrund dieser geringen Sequenzidentität wurden heteromere PFO und Sulfitreduktasen von den phylogenetischen Analysen ausgeschlossen. Maximum Likelihood Analysen mit *local rearrangement* und der JTT-F Substitutionsmatrize ausgehend von einem Neighbor-Joining Baum von Maximum Likelihood Distanzen zeigen einen gemeinsamen Ursprung eukaryotischer PFO – wenngleich mit schwacher Unterstützung. Unter Verwendung der *Quicksearch* Option von PROTML wurden 1000 Bäume generiert und über das approximierte Likelihood Kriterium (Adachi und Hasegawa 1996) evaluiert. Der beste dieser 1000 Bäume positionierte den Ast mit der *Trichomonas*-, *Giardia*-, und *Spiroplasma*-PFO-Sequenz basal zum Ast mit den eubakteriellen Homologen von *Treponema* bis *Chlorobium*. Wurde auf diese 1000 Bäume der Kishino-Hasegawa Test (Adachi und Hasegawa 1996) angewandt, so war keiner dieser Bäume signifikant besser ($P = 0,95$) und 465 nicht signifikant schlechter ($P = 0,95$) als die Starttopologie. Von den 465 Bäumen, die nicht schlechter waren als der in Abb. 5-2 gezeigte, ergaben 162 der Bäume eine Monophylie eukaryotischer PFO-Sequenzen. Voraussetzung für das korrekte Funktionieren von PROTML-Analysen mit Aminosäuresequenzen ist, dass die Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Sequenzen nicht signifikant von der des gesamten Datensatzes abweicht (Adachi und Hasegawa 1996). Mögliche derartige Abweichungen in der Aminosäurezusammensetzung wurden mit Hilfe des PUZZLE-Programms überprüft (Strimmer und von Haeseler 1997).

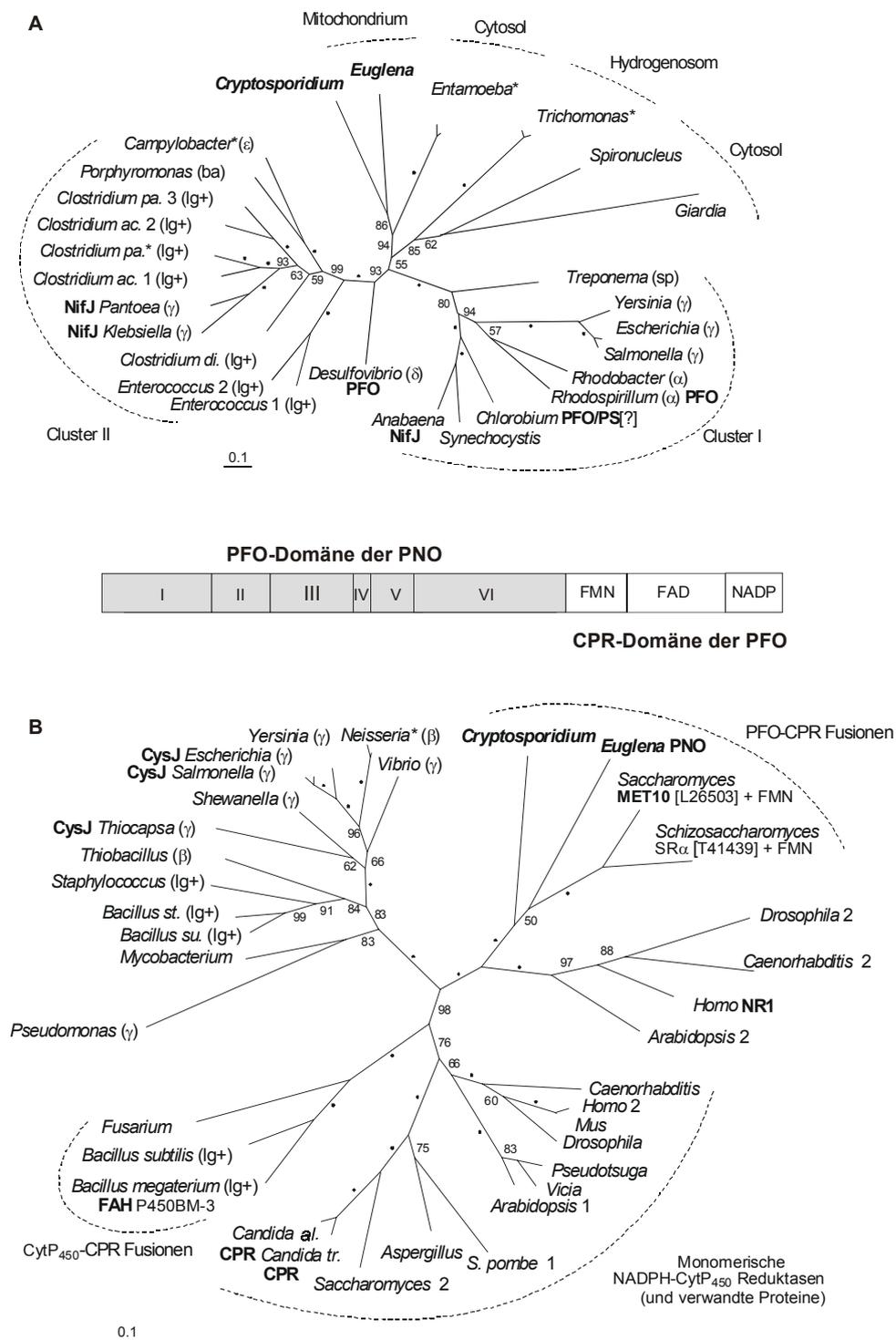


Abb. 5-2: Mit ProtML (Adachi und Hasegawa 1996) konstruierte Protein-Phylogenien der PFO- und CPR-Domäne der PNO. Die einzelnen Bootstrap-Werte wurden mit Hilfe der RELL-Methode bestimmt und sind neben den Ästen angegeben, Bootstrap-Werte von 100 sind durch einen Punkt markiert. Der unten links angegebene Maßstab bezeichnet 0,1 Substitutionen pro Position. (A) PFO-Phylogenie. Sofern bekannt, ist die Lokalisation der Proteine genannt. Eubakterielle Taxa sind in Klammern hinter dem Organismenamen angegeben; α, β, γ, δ, ε, Proteobakterien; sp, Spirochaeten; lg+, gram-positive Bakterien; ba, Bakterioide; cy, Cyanobakterien. Bekannte Funktionen der PFO-Sequenzen sind fett hervorgeho-

ben. *Desulfovibrio* PFO (Charon et al. 1999); *Pantoea* (Steibl, Siddarattam und Klingmüller 1995), *Klebsiella* (Arnold et al. 1988) und *Anabaena* (Bauer, Scappino und Haselkorn 1993) NifJ; *Rhodospirillum* (Lindblad et al. 1996); *Chlorobium* PFO/Pyruvat Synthase (das aufgereinigte Enzym (Yoon et al. 1999) ist durch die PFO-Sequenz kodiert, welche dem *Chlorobium* Genomprojekt entnommen ist (F.R. Tabita, persönliche Mitteilung)). Abkürzungen der *Clostridium*-Artnamen entsprechen: pa., *pasteurianum*; ac., *acetobutylicum*; di., *difficile*. (B), CPR-Phylogenie. C. al., *Candida albicans*; C. tr., *Candida tropicalis*. Weitere Symbole entsprechen denen aus (A). Sequenzen stammen aus GenBank und von den fertiggestellten und laufenden Genomprojekten durch TIGR (<http://www.tigr.org/tdb>) und NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/genom_table.cgi).

Die Aminosäurezusammensetzung der PFO-Sequenzen von *E. coli*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Rhodobacter*, *Rhodospirillum*, *Klebsiella* und *Clostridium* zeigten dem PUZZLE-Programm zufolge signifikante Abweichungen ($P = 0,95$) vom Gesamt-Datensatz. Der Ausschluss dieser Sequenzen und eine erneute Analyse der Daten wie oben beschrieben (Datensatz_25), ergab als besten der 1000 Bäume eine Topologie, in der alle eukaryotischen PFO-Sequenzen monophyletisch sind. Von diesen Bäumen waren 95 nicht signifikant schlechter ($P = 0,95$) als der mit dem reduzierten Datensatz gefundene Baum, 43 der 95 Bäume wiederum ergaben eine Monophylie eukaryotischer PFO. Wurde PUZZLE mit der JTT-F Matrix und einer Gamma-Distribution für die Variabilität der Substitutionsraten über die Positionen und 16 Kategorien von Variabilität verwendet, so waren die eukaryotischen PFO monophyletisch. Das gilt sowohl für den gesamten ($\alpha = 0,81$) als auch für den reduzierten Datensatz_25 ($\alpha = 0,86$). Damit deuten die Maximum Likelihood Analysen auf eine Monophylie eukaryotischer PFO hin, allerdings mit geringer Bootstrap-Unterstützung. Auch die Analysen von Horner et al. (1999) deuten darauf hin, dass eukaryotische PFO einmalig akquiriert wurden. Rosenthal et al. (1997) postulierten im Gegensatz dazu, dass die PFO Gene von *Entamoeba* und *Giardia* vermutlich durch lateralen Gentransfer von unterschiedlichen Eubakterien entstanden sind.

Bemerkenswerterweise werden im PFO-Baum proteobakterielle PFO mit starker Bootstrap-Unterstützung in zwei Gruppen geteilt, die kürzlich als Cluster I und Cluster II bezeichnet wurden (Horner et al. 1999). Da γ -Proteobakterien eine monophyletische Gruppe bilden (Van de Peer et al. 1994, Eisen 1995) könnte das Auftreten von γ -proteobakteriellen PFO-Sequenzen sowohl in Cluster I als auch in Cluster II darauf hindeuten, dass zwischen den Prokaryoten ein gewisser Grad an lateralem Gentransfer von PFO erfolgt ist. Alternativ wäre auch denkbar, dass im gemeinsamen Vorfahren der Eubakterien zwei Kopien des PFO-Gens vorhanden waren (Horner et al. 1999). So existieren verschiedene Kopien der PFO in den Genomen von *Giardia*, *Trichomonas*, *Clostridium acetobutylicum* und *Clostridium pasteurianum*. Cluster I und II könnten

damit eine unvollständige Erfassung aller PFO-Sequenzen widerspiegeln, sei es durch nicht entdeckte PFO-Gene oder sei es durch individuellen Verlust einer Kopie aus manchen Genomen. Die Position der PFO des δ -Proteobakteriums *Desulfovibrio* ist ebenfalls ungewöhnlich. *Desulfovibrio* fällt weder in Cluster I noch in Cluster II, obwohl 16S rRNA Analysen (Olsen, Woese und Overbeek 1994), Analysen des Elongationsfaktors EF-Tu (Ludwig et al. 1993) und GroEL (Viale et al. 1994) auf eine Verwandtschaft von *Desulfovibrio* zu δ -Proteobakterien und anderen Proteobakterien hindeuten. Möglicherweise ist auch hier die unvollständige Erfassung der PFO-Gendiversität und/oder aber ein einzelnes horizontales Gentransfer-Ereignis die Ursache für die ungewöhnliche Position der *Desulfovibrio* PFO im PFO-Baum. Die Analysen der eukaryotischen PFO deuten ferner daraufhin, dass die eukaryotischen PFO ähnlicher zu ihren eubakteriellen Homologen sind und damit eine Akquisition von Eubakterien, nicht von Archaeobakterien, darstellt (Hrdy und Müller 1995, Horner, Hirt und Embley 1999, Rotte et al. 2001). Charakterisierte eukaryotische PFO sind, wie viele eubakterielle PFO, Homodimere (Hrdy und Müller 1995, Rosenthal et al. 1997). Alle bisher charakterisierten archaeobakteriellen PFO dagegen bestehen aus vier unabhängigen Polypeptiden. Diese sind homolog zu homodimerischen PFO (vgl. Abb. 5-1), in phylogenetischen Bäumen sind sie mit diesen jedoch nur entfernt verwandt (Kletzin und Adams 1996, Müller 1998). Es wurde in Übereinstimmung mit den Analysen von Horner et al. (1999) weder Unterstützung für eine direkte Verwandtschaft der eukaryotischen PFO-Sequenzen mit den α -Proteobakterien *Rhodospirillum* oder *Rhodobacter* (Cluster I) noch mit γ -proteobakteriellen PFO-Sequenzen aus Cluster II erhalten.

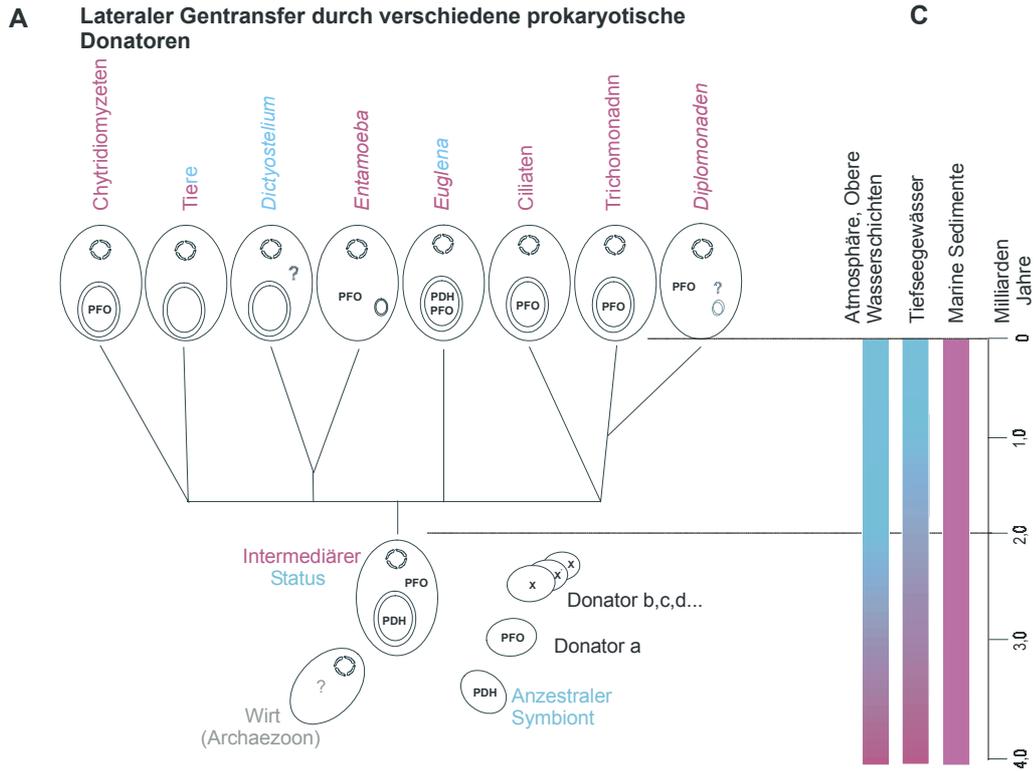
5.2.2 FMN-, FAD-, und NADP-Bindedomänen der Hefe Sulfitreduktase stammen vom gleichen Fusionsereignis ab, welches zur Bildung der *Euglena* PNO führte

Für die phylogenetische Analyse der CPR-Domäne der PFO wurden aus einem Datensatz von über 200 identifizierten CPR-verwandten Proteinen von Eubakterien und Eukaryoten eine repräsentative Teilmenge mit Proteinen ausgewählt, welche die größte Ähnlichkeit zur CPR in *Euglena* und *Cryptosporidium* aufwies. Die Maximum Likelihood Analysen der CPR zeigen mit großer Bootstrap-Unterstützung ein gemeinsames Abzweigen mit fusionierten FAD- und NADP-Bindedomänen vom C-Terminus der *Saccharomyces* Sulfitreduktase (SR α) und dem *Schizosaccharomyces* Homolog. Die Monophylie der eukaryotischen CPR Homologe wird durch einen Ast unterbrochen, an dem die *Fusarium* Cytochrom P450-CPR-Fusion mit der homologen Fettsäure-Hydroxylase-Fusion (FAH) aus *Bacillus megaterium* und *Bacillus subtilis* gemeinsam

abzweigt. Diese Unterbrechung der Monophylie eukaryotischer CPR deutet darauf hin, dass auch an diesem Ast ein horizontaler Gentransfer in die eine oder andere Richtung erfolgt sein kann (Rotte et al. 2001). In Archaeobakterien konnten keine CPR Homologe identifiziert werden. Die FMN-Domänen von *S. cerevisiae* und *S. pombe* PuSR weisen die größte Sequenzähnlichkeit zur *Euglena* und *Cryptosporidium* PNO auf. Die CPR-Phylogenie weist darauf hin, dass die FMN-, FAD-, und NADP-Bindedomänen der PuSR und SR α vom gleichen Fusionsereignis abstammen, welches zur Bildung der *Euglena* und *Cryptosporidium* PNO führte.

5.2.3 Die monophyletische Abstammung eukaryotischer PFO ist nicht mit allen Modellen zum endosymbiontischen Ursprung der Mitochondrien (und Hydrogenosomen) kompatibel

Aus dem Blickwinkel "klassischer" Versionen der Endosymbiontenhypothese betrachtet, ist der Ursprung der Mitochondrien eng mit Sauerstoff verbunden (John und Whatley 1975, Whatley et al. 1979, Doolittle 1980, Gray und Doolittle 1982, Blackstone 1995, Andersson et al. 1998, Gray 1998, Andersson und Kurland 1999). Doch die Vielzahl anaerober Formen von Mitochondrien (vgl. Abschnitt 1.3.1) und die enge Verwandtschaft der Mitochondrien zu den Hydrogenosomen (vgl. Abschnitt 1.4) können unter dieser Annahme nur schwer erklärt werden (Martin et al. 2001, Rotte et al. 2001, Tielens et al. 2002). Die kernkodierte Gene für Enzyme des anaeroben Energiestoffwechsels (einschließlich der PFO) in Mitochondrien und Hydrogenosomen werden unter diesen Modellen als das Ergebnis vieler unabhängiger Gentransfer-Ereignisse aus anaeroben Prokaryoten angesehen (s. Abb. 5-3 A) (Andersson und Kurland 1999, Rosenthal et al. 1997). Alternative Erklärungsmodelle, welche den Ursprung der Mitochondrien nicht direkt mit Sauerstoff in Verbindung bringen, haben zur Annahme, dass die kernkodierte Gene für die Enzyme des anaeroben Energiestoffwechsels in Mitochondrien und Hydrogenosomen entweder von einer eubakteriellen Wirtszelle (z. Bsp. die Syntrophie-Hypothese, Moreira und Lopez-Garcia 1998) oder aber vom gemeinsamen eubakteriellen Vorfahren dieser Organellen (Wasserstoff-Hypothese, Martin und Müller 1998) vererbt wurden (s. Abb. 5-3 B). Unter dem Prinzip Vererbung müssten die kernkodierte Gene für Enzyme des anaeroben Energiestoffwechsels das Ergebnis einer einmaligen Akquisition sein. Die Frage nach dem Ursprung der anaeroben Biochemie in heutigen Eukaryoten ist demnach eng mit der Frage verknüpft, ob die für Proteine der anaeroben ATP-Synthese kodierenden Gene wie PFO in Eukaryoten einen einzigen, gemeinsamen Ursprung besitzen oder nicht.



B Vererbung vom gemeinsamen, fakultativ anaeroben Vorfahren oder von der eubakteriellen Wirtszelle

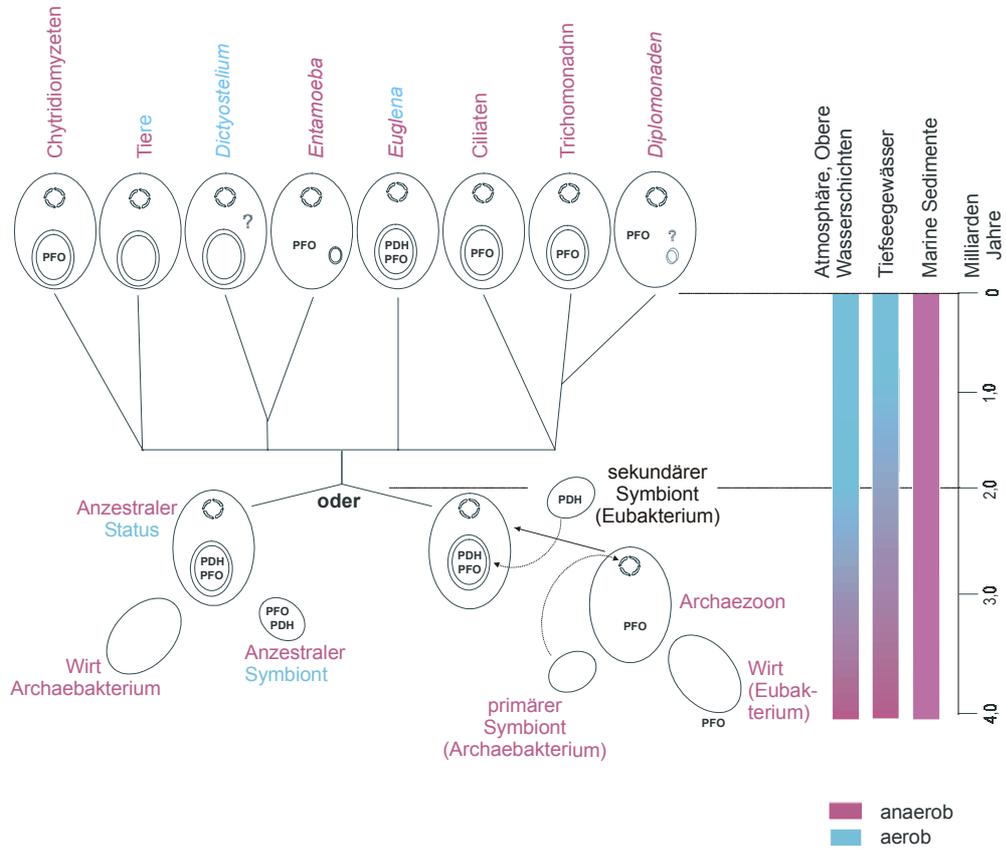


Abb. 5-3 (vorherige Seite): Alternative Erklärungsmöglichkeiten für den Ursprung eubakterieller Gene der anaeroben ATP-Synthese in Eukaryoten. (A), lateraler Gentransfer von unterschiedlichen prokaryotischen Donatoren (Rosenthal et al. 1997, Andersson und Kurland 1999). (B), Endosymbiontischer Gentransfer aus einem fakultativ anaeroben Vorfahren der Mitochondrien (nach Martin und Müller 1998, Martin 1999a und Tielens et al. 2002). (C), Sauerstoffverfügbarkeit in der Atmosphäre und in den oberen Wasserschichten der Ozeane, in der Tiefsee und in marinen Sedimenten während der Erdgeschichte (nach Holland und Beukens 1990, Kasting 1993, Knoll 1994, Anbar und Knoll 2002). PFO, Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase; PDH, Pyruvat Dehydrogenase; x, beliebiges Gen, welches für ein Protein der anaeroben ATP-Synthese kodiert.

5.2.3.1 Klassische Modelle können die Monophylie eukaryotischer PFO (und weiterer Enzyme der anaeroben ATP-Synthese) mit ihren Annahmen nicht direkt erklären

Unterschiedlichen Formulierungen der klassischen Endosymbiontenhypothese gemeinsam ist die Annahme, dass die kernkodierten Gene für die Enzyme des anaeroben Energiestoffwechsels in Mitochondrien und Hydrogenosomen das Ergebnis vieler unabhängiger Gentransfer-Ereignisse aus anaeroben Prokaryoten sind. Das gemeinsame Abzweigen der eukaryotischen Sequenzen im PFO-Stammbaum lässt jedoch darauf schließen, dass die PFO der Diplomonaden, der Trichomonaden, der Amöben, der Eugleniden, der Apikomplexen und die der Pilze (durch die fragmentierte PFO-CPR-Fusion in SR α und PuSR) von ein und demselben ancestralen eubakteriellen Gen des gemeinsamen Vorfahren dieser Organismengruppen stammt. Zwar weist eine frühere phylogenetische Analyse zum evolutiven Ursprung der eukaryotischen PFO unter Berücksichtigung dreier eukaryotischer PFO-Gensequenzen (Rosenthal et al. 1997) auf einen multiplen Ursprung der PFO von verschiedenen prokaryotischen Donatoren hin. Eine erneute Analyse mit vier eukaryotischen PFO-Sequenzen dagegen deutet, in Übereinstimmung mit Abb. 5-2, auf eine einmalige Akquisition dieser Gene hin (Horner, Hirt und Embley 1999). Damit scheint die eukaryotische PFO im Zuge der Evolution einmalig akquiriert worden zu sein. Gleichmaßen sprechen auch die Daten für ein weiteres Enzym der anaeroben ATP-Synthese, die [Fe]Hydrogenase der Hydrogenosomen (Horner et al. 2000), der Mitochondrien (Akhmanova et al. 1998) und des Cytosols (Horner et al. 2000), eindeutig dafür, dass die [Fe]Hydrogenase ebenso wie die PFO einmalig im gemeinsamen Vorfahren aller Eukaryoten akquiriert wurde und nicht mehrmals in unabhängigen Abstammungsgemeinschaften.

5.2.3.2 Fusionsmodelle können die Monophylie eukaryotischer PFO unter der Prämisse eines primär amitochondrialen Eukaryoten erklären

Eine denkbare Erklärungsmöglichkeit, welche die Monophylie der eukaryotischen PFO erklären könnte, sind Fusionsmodelle wie die Syntrophie-Hypothese (Moreira und Lopez-Garcia 1998, diskutiert in Horner et al. 1999). Dieser Hypothese zufolge führte die Verschmelzung eines Archaeobakteriums mit einem Eubakterium zur Bildung eines Archaeozoon, welcher nachfolgend den mitochondrialen Symbionten aufnahm (Variationen der Fusionshypothese finden sich bei Zillig et al. 1989, Lake und Rivera 1994, Gupta und Golding 1996 und Horiike et al. 2001). Diesen Modellen zufolge hätten Eukaryoten das PFO-Gen von einer eubakteriellen Wirtszelle erworben. Das Genprodukt wäre zunächst ein cytosolisches Protein, welches letztendlich in das etablierte Organell transferiert wird (z. Bsp. in die Hydrogenosomen der Trichomonaden, Ciliaten oder Chytridiomyceten oder in die Mitochondrien von *Euglena*). Diese Vorstellungen sind jedoch in zwei wesentlichen Punkten problematisch.

Erstens setzt dieses Modell voraus, dass der erste primitive Eukaryot zwar einen Zellkern, jedoch kein Mitochondrium besass, d. h. dieser war ein sogenannter Archezoon (Cavalier-Smith 1987a, 1987b). Mit der Entdeckung von Eukaryoten, die zwar einen Zellkern, jedoch keine Mitochondrien besitzen, schien man zunächst direkte Abkömmlinge einer solchen hypothetischen Wirtszelle gefunden zu haben. Die Archeza-Hypothese (Cavalier-Smith 1987a, 1987b) scheint jedoch mit der Gesamtheit der verfügbaren Daten nicht mehr kompatibel zu sein (Doolittle 1998, 1999; Gray et al. 1999). So besitzen Typ I Protisten wie *Giardia* oder *Entamoeba* zwar keine Organellen der ATP-Synthese, doch besitzen sie Kerngene wie GAPDH (Henze et al. 1995), Hsp10 (Bui et al. 1996), Hsp 60 (Bui et al. 1996, Roger et al. 1996), Hsp70 (Germot et al. 1996, 1997; Hirt et al. 1997), Triosephosphat-Isomerase (Keeling und Doolittle 1997), die überzeugend dafür sprechen, dass diese Organismen einst Mitochondrien besaßen. Ferner zeigen verschiedene Arbeiten (Keeling und McFadden 1998, Hirt et al. 1999), dass Mikrosporidien (die weder funktionelle Mitochondrien noch Hydrogenosomen besitzen) keinesfalls sehr ursprüngliche Vertreter der Eukaryoten darstellen (Vossbrink et al. 1987). Vielmehr haben sie sich als Verwandte der Pilze aus mitochondrialen Vorläufern entwickelt. Mikrosporidien besitzen Proteine, die üblicherweise mit Mitochondrien assoziiert werden (Hirt et al. 1997, Peyretailade et al. 1998, Katinka et al. 2001), einige von ihnen enthalten sogar ein Relikt-Mitochondrium (Williams et al. 2002). Ein Relikt-Organell wurde auch im Cytosol der Amöbe *Entamoeba histolytica* (Tovar et al. 1999, Mai et al. 1999) nachgewiesen. Damit scheinen alle bisher untersuchten Euka-

ryoten primär einen Symbionten besessen, diesen aber im Zuge reduktiver Evolution sekundär verloren zu haben (Embley et al. 1995, Embley und Hirt 1998, Martin und Müller 1998, Roger et al. 1998, Gray, Burger und Lang 1999, Hirt et al. 1999, Roger 1999, Tovar, Fischer und Clark 1999, Lloyd et al. 2002, Williams et al. 2002). Damit gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt keinen Beweis für die Annahme, dass die Wirtszelle, welche den mitochondrialen Symbionten aufnahm, ein Eukaryot war. Vielmehr rückt der Ursprung der Eukaryoten in der neueren Literatur eng mit dem Ursprung der Mitochondrien zusammen (Martin und Müller 1998, Doolittle 1998, 1999; Gray et al. 1999, Roger 1999).

Ein zweites Problem mit der Vorstellung, dass der Zellkern aus einem einst freilebenden Prokaryoten (in diesem Modell ein Archaeobakterium) abstammt, ist, dass es keine ausreichende Erklärung für typische Eigenschaften des Zellkerns bietet (Martin 1999a, Rotte und Martin 2001). Auf Ebene der Ultrastruktur zeigt der Aufbau der Kernhülle keinerlei Parallelen zu bakteriellen Membranen. Die Kernhülle besteht aus einer Reihe einzelner membranumschlossener Vesikel, die direkt mit dem Endoplasmatischen Retikulum verbunden sind. Ferner wird die Kernhülle in Eukaryoten mit offener Mitose während der Zellteilung aufgelöst und entsteht *de novo* in den Tochterzellen. Von keiner Bakterienmembran ist eine vergleichbare Auflösung der Plasmamembran bekannt. Der Kernporenkomplex besitzt zudem keine Ähnlichkeit zu prokaryotischen Transmembran-Poren. Auch sind aus Archaeobakterien keine linearen Chromosomen mit Telomeren bekannt. Aber auch andere Faktoren sprechen gegen einen endosymbiontischen Ursprung des Zellkerns. So zeigt dieser, anders als Chloroplasten und Mitochondrien, weder biochemisch noch physiologisch Ähnlichkeit zu einer freilebenden Zelle. Der Zellkern besitzt weder Spuren von ATP-generierenden Stoffwechselwegen noch eine andere Form des Grundstoffwechsels. Vielmehr ist der Zellkern ein Kompartiment der reinen Informationsspeicherung und -verarbeitung.

5.2.3.3 Die Wasserstoffhypothese kann die Monophylie eukaryotischer PFO direkt mit der Annahme eines gemeinsamen fakultativ anaeroben Vorfahren für die Mitochondrien und Hydrogenosomen erklären

Ein explizites Modell, welches direkt für die Monophylie der PFO-Sequenzen aufkommen kann, ist die Wasserstoffhypothese (Martin und Müller 1998). Dieser Vorstellung zufolge stammte das PFO Gen vom gemeinsamen, fakultativ anaeroben Vorfahren der Mitochondrien und Hydrogenosomen. Dieser Vorfahr war ein fakultativ anaerobes α -Proteobakterium, welches seinen ATP-Bedarf sowohl aerob über Atmung als auch

anaerob über Fermentation decken konnte. Unter den heutigen α -Proteobakterien sind viele Vertreter bekannt, die fakultativ anaerob leben (z.B. *Rhodobacter*, *Paracoccus* u.v.a.) und unter anaeroben Bedingungen molekularen Wasserstoff als Endprodukt des Stoffwechsels bilden. Durch spätere Spezialisierung der komplexen, Organellen enthaltenen Zellen an eine aerobe oder anaerobe Lebensweise führte ein differentieller Verlust von Stoffwechselwegen zum aeroben bzw. anaeroben Energiestoffwechsel in Mitochondrien und Hydrogenosomen (Typ II Protisten). Die Reduktion des Organells führte zur beschriebenen Kompartimentierung von Typ I Protisten. Dieses Modell bietet daher eine Erklärungsmöglichkeit dafür, dass die in der phylogenetischen Analyse berücksichtigten Typ I amitochondrialen Abstammungsgemeinschaften einen mitochondrialen (oder hydrogenosomal) Endosymbionten in ihrer Vergangenheit besaßen, diesen jedoch nachfolgend verloren (Roger et al. 1998, Gray, Burger und Lang 1999, Roger 1999). Unter diesem Modell war (i) die Wirtszelle ein strikt anaerobes methanogenes Archaeobakterium und kein Eukaryot, (ii) der Symbiont war ein fakultativ anaerobes Eubakterium (iii) die Wirtszelle war nicht heterotroph, sondern autotroph und (iv) die primäre Triebkraft der Symbiose bestand nicht im Sauerstoff und gesteigerter ATP-Synthese, sondern im Wasserstoff (Martin und Müller 1998). Aus diesem Modell folgen direkt drei prüfbare Voraussagen, die nachfolgend anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Daten diskutiert werden sollen.

(1) Eukaryotische PFO-Sequenzen (ebenso wie Sequenzen für andere Gene, die für Proteine des anaeroben Energiestoffwechsels in Eukaryoten kodieren) sollten einen einzigen, eubakteriellen (genauer α -proteobakteriellen) Ursprung besitzen. Der hier durchgeführten phylogenetischen Analyse der PFO zufolge besitzen die PFO-Sequenzen einen gemeinsamen Ursprung. Wie in Abb. 5-2 gezeigt, zweigen die eukaryotischen PFO jedoch nicht spezifisch mit dem α -proteobakteriellen Homolog ab (Horner et al. 1999, Rotte et al. 2001). Ein spezifisches Abzweigen mit einem α -proteobakteriellen Homolog konnte auch im Fall eines weiteren Enzyms der anaeroben ATP-Synthese, [Fe]-Hydrogenase, nicht gezeigt werden (Horner et al. 2000). Für das Ausbleiben eines gemeinsamen Astes für die eukaryotischen und α -proteobakteriellen Homologe sind mehrere Erklärungen denkbar. Zum einen gilt zu berücksichtigen, dass erst wenige aus der Vielzahl α -proteobakterieller Genome vollständig sequenziert sind. Auch schließt die Abwesenheit von PFO-Homologen im Genom des α -Proteobakteriums *Rickettsia prowazekii* (Andersson et al. 1998) oder in den Genomen heutiger Mitochondrien (Gray et al. 1998) nicht aus, dass der Vorläufer von *Rickettsia* und Mitochondrien in seinem Genom ursprünglich PFO-Gene besessen hat. Sowohl das *Rickettsia*-Genom als auch mitochondriale Genome wurden im Laufe der Evolution in

Anpassung an eine intrazelluläre Lebensweise signifikant reduziert (Andersson et al. 1998, Gray et al. 1999, Rotte et al. 2001). Zum anderen ist gut bekannt, dass horizontaler Gentransfer zwischen heutigen freilebenden Prokaryoten ein häufiges Phänomen ist (Doolittle 1999, Ochman, Lawrence und Groisman 2000). Es ist anzunehmen, dass horizontaler Gentransfer auch in der entfernten Vergangenheit zwischen freilebenden Prokaryoten erfolgte. Das Abzweigen gleicher Gruppen von Bakterien an unterschiedlichen Ästen (insbesondere in der Gruppe der γ -Proteo-bakterien) ist ein Hinweis darauf, dass zu einem gewissen Ausmass ein lateraler PFO-Gentransfer zwischen Prokaryoten erfolgt ist. So ist anzunehmen, dass der freilebende, α -proteobakterielle Vorfahr der Mitochondrien und Hydrogenosomen Gene mit anderen Eubakterien ausgetauscht hat, nachdem sich das Organell etablierte. Daher ist gut möglich, wenn nicht wahrscheinlich, dass keines der heute lebenden Bakterien den identischen Satz an Genen enthält wie jenes, aus dem die Organellen direkt hervorgegangen sind (Martin 1999b). Neben lateralem Gentransfer könnten auch Paralogie und nachfolgender differentieller Verlust von Genen die unerwarteten eubakteriellen PFO-Verwandschaftsbeziehungen erklären. Wenn jedoch differentieller Verlust von Genen alle Unterschiede erklären sollte, die in allen Stammbäumen für alle bakteriellen Gene beobachtet wird, so müsste die Größe des "Vorfahrens aller Genome" bei weitem die Größe der Genome aller heute bekannten Prokaryoten übertreffen. Im Gegensatz dazu ist lateraler Gentransfer ein beobachtbares Phänomen (Ochman, Lawrence und Groisman 2000).

(2) Es sollte ATP-synthetisierende Organellen geben, die Zwischenformen zwischen Mitochondrien und Hydrogenosomen darstellen. Die Koexistenz der hydrogenosomalen PNO und der PDH im *Euglena* Mitochondrium verbindet direkt den Energiestoffwechsel von Hydrogenosomen mit dem der Mitochondrien in einem Organell. Damit stellen die fakultativ anaeroben *Euglena* Mitochondrien bezüglich des Pyruvatstoffwechsels eine echte Zwischenform zwischen diesen beiden Organellen dar. Interessanterweise gibt es ein weiteres Beispiel für ein Mitochondrium mit Zwischenformcharakter aus der Gruppe der Trypanosomatiden, der Schwestergruppe der Eugleniden. Die Mitochondrien der Insektenstadien von *Trypanosoma brucei* sind zwar obligat aerobe Organellen, trotzdem oxidieren sie ihre Substrate nicht vollständig zu CO₂ und produzieren stattdessen Fermentationsprodukte (Clayton und Michels 1996). Als Hauptendprodukt des Kohlenhydratabbaus wird – analog zum hydrogenosomalen Energiestoffwechsel – mit Hilfe der Acetat:Succinat CoA Transferase und Succinat Thiokinase Acetat gebildet und aus der Zelle ausgeschieden (Van Hellemond et al. 1998).

(3) Einige Eukaryoten sollten Gene sowohl für die PDH als auch für die PFO besitzen. Wenn die eukaryotische PFO tatsächlich vom fakultativ anaeroben mitochondrialen Symbionten (Martin und Müller 1998) akquiriert wurde, sollte es einige Eukaryoten geben, die funktionelle Gene sowohl für die PFO als auch für die PDH behalten haben. In der Tat wurde für den Euglenozoon *Trypanosoma brucei* eine Koexistenz von der PFO und des klassischen PDH-Multienzymkomplexes postuliert (Rotte et al. 2001). *Trypanosoma brucei* besitzt Homologe für die PDH-Untereinheiten E1 α , E1 β , E2 und E3 (Rotte et al. 2001). Ein genomisches Fragment (EMBL B13566) kodiert fernerhin für ein Protein mit deutlicher Homologie zur PFO (Horner et al. 1999). Die Translation besitzt über 61 AS 57 % Identität mit der PFO-Domäne VI der *Euglena* PNO (Rotte et al. 2001). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Versuche, die PFO unter Verwendung der Sequenzinformation in diesem genomischen PFO-Fragment aus einer genomischen Bank von *T. brucei* zu isolieren, blieben jedoch erfolglos. Weder konnte mit Hilfe von homologen Primern aus genomischer DNA von *T. brucei* ein PCR-Produkt amplifiziert werden, noch konnte mittels Oligonukleotid-Hybridisierung ein für die PFO kodierender Klon aus einer genomischen *Trypanosoma*-Bank isoliert werden. Computeranalysen zeigen, dass das PFO-Fragment die höchste Sequenzähnlichkeit zu prokaryotischen, und nicht zu eukaryotischen Homologen besitzt. So betrug die Sequenzhomologie zur PFO aus *Clostridium* auf Proteinebene 85 %, zur PFO aus *Euglena* nur 59 %. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das genomische PFO-Fragment aus den *T. brucei* Genomsequenzierungsdaten eine bakterielle Kontamination darstellt und nicht aus dem Genom von *T. brucei* stammt. Tatsächlich jedoch besitzt *Euglena gracilis* als zusätzlich zu einer funktionellen PFO auch eine funktionelle PDH.

5.3 Der mitochondriale Pyruvat Dehydrogenase Multienzymkomplex aus *Euglena gracilis*

5.3.1 Molekulare Charakterisierung und Expressionsanalyse der Pyruvat Dehydrogenase- (E1), der Dihydrolipoyl Transacetylase- (E2) und der Dihydrolipoyl Dehydrogenase-Untereinheit (E3) des *Euglena* PDH-Multienzymkomplexes

Die isolierte PDH E1 α -kodierende cDNA aus *Euglena gracilis* repräsentierte ein vollständiges Transkript mit einer Länge von 1586 bp einschließlich einer 10 bp *spliced leader* Sequenz am 5'-terminalen Ende und kodiert ein offenes Leseraster für 379 AS. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt eine Sequenzhomologie von 50 bis 55 % zu anderen eukaryotischen mitochondrialen E1 α -Sequenzen. Sie enthält sowohl das Motiv

der TPP-Bindestelle (Hawkins et al. 1989) als auch die postulierte E1 β -Bindestelle sowie drei Serinreste, welche, wie für das Protein aus Mensch, Rind und Schwein gezeigt, phosphoryliert werden können (Yeaman et al. 1978, Sugden et al. 1979, Patel und Roche 1990). Die *Euglena* PDH E1 könnte somit wie andere mitochondriale E1 über einen Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungszyklus reguliert werden, der die beiden Enzyme PDH Kinase und PDH Phosphatase einschließt. Letztere beiden Enzyme wurden aus *Euglena* bisher nicht identifiziert. Das errechnete Molekulargewicht des Proteins von 41690 Da stimmt mit dem über SDS-Gelelektrophorese ermittelten Molekulargewicht pflanzlicher E1 α -Untereinheiten von 43000 Da überein (Patel und Roche 1990). Versuche, die cDNA für die E1 β -Untereinheit aus *Euglena gracilis* zu klonieren, blieben erfolglos. Unter Einsatz von PCR-Primern, die gegen konservierte Aminosäuremotive verschiedener eukaryotischer E1 β -Untereinheiten konstruiert wurden, ließen sich ausschließlich unspezifische Produkte amplifizieren. Proteomanalysen mit Hilfe von 2D-Gelen (unveröffentlichte Ergebnisse der Promotionsarbeit von Dipl.- Biol. Meike Hoffmeister) identifizierten jedoch die fehlende β -Untereinheit. Wie alle bisher charakterisierten eukaryotischen und viele der eubakteriellen PDH E1 α (mit Ausnahme der PDH E1 α aus Gram-negativen Bakterien) besitzt damit auch die *Euglena* E1 sowohl eine α - als auch eine β -Untereinheit.

Die aus *Euglena* isolierte, PDH E2-kodierende cDNA repräsentierte ein vollständiges Transkript mit einer Größe von 1834 bp einschließlich einer 9 bp *spliced leader* Sequenz am 5'-terminalen Ende und kodiert ein offenes Leseraster für 434 AS. Auch die Aminosäuresequenz der E2 weist mit 40 bis 43 % Homologie die größte Sequenzähnlichkeit zu anderen eukaryotischen mitochondrialen E2-Sequenzen auf. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der *Euglena* E2 zeigt charakteristische Eigenschaften einer Acetyltransferase. Sie besitzt drei heterologe Domänen, die als Lipoyl-Domäne, Untereinheit-bindende und katalytische Domäne bezeichnet werden (vgl. Abb. 4-12). Die Lipoyl-Domäne entspricht dem N-terminalen Bereich des Proteins. Dieser ist reich an den unpolaren AS Alanin und Prolin und enthält wie die E3-Sequenzen von *Synechocystis* sp., *S. cerevisiae* und *B. subtilis* sowie die plastidäre *A. thaliana* E3 nur eine etwa 100 AS umfassende Lipoyl-Domäne. Die mitochondriale *A. thaliana*- sowie die menschliche E2-Sequenz besitzen zwei Lipoyl-Domänen. Die *E. coli* und *Azotobacter vinelandii* Sequenzen weisen sogar drei Lipoyl-Domänen auf, jedoch führt die Deletion von einer oder gar zwei dieser Domänen nicht zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Aktivität (Guest et al. 1985). Nachweislich ist die Anwesenheit einer einzelnen Lipoyl-Domäne ausreichend für eine katalytische Funktion des α -Ketoglutarat Dehydrogenase Komplexes (Reed und Hackert 1990, Mooney et al. 1999). Die Untereinheit-

bindende und katalytische Domäne entspricht dem verbleibenden C-terminalen Ende des Proteins. Das errechnete Molekulargewicht des Proteins beträgt 47740 kDa. Über SDS-Gelelektrophorese bestimmte Molekulargewichte liegen über diesem errechneten Wert. So wurden für die E2-Untereinheit der PDH aus *Crithidia fasciculata* (Diaz und Komuniecki 1995) und Säugetieren (Patel und Roche 1990) Molekulargewichte von 60000 Da bestimmt.

Die *Euglena* PDH E3 cDNA repräsentierte ein vollständiges Transkript mit einer Größe von 1811 bp und kodiert ein offenes Leseraster für 474 AS. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt erwartungsgemäß die höchste Sequenzhomologie zu anderen eukaryotischen mitochondrialen E3-Sequenzen, diese beträgt zwischen 55 und 60 %. Als Flavoprotein gehört E3 zu einer Familie von Pyridindinukleotid-Disulfid Oxidoreduktasen, die entweder NADH oder NAD(P)H nutzen (Williams 1976). Die Sequenzähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenz der *Euglena* PDH E3 zu weiteren Mitgliedern dieser Enzymfamilie wie den eubakteriellen Quecksilber (II) Reduktasen und den eukaryotischen Glutathion- und Trypanothion Reduktasen liegt bei 30 - 35 % bzw. 25 - 30 %, wobei die Sequenzähnlichkeit im Bereich der Dinukleotid-Bindemotive der Nukleotid-Binderegionen und in der Sequenzregion des Disulfid-Reaktionszentrums am höchsten ist. Ein Vergleich der strukturell gut charakterisierten menschlichen Glutathion Reduktase (Pons et al. 1988) mit der molekularen Struktur der E3 aus Hefe (Takenaka et al. 1988) zeigt ferner mit Ausnahme der N- und C-terminalen Enden eine bemerkenswerte Übereinstimmung bezüglich der Tertiärstruktur beider Enzyme (Carothers et al. 1989) und spiegelt so die Homologie in ihrer Primärstruktur wider. Das errechnete Molekulargewicht des Proteins entspricht 52140 Da und stimmt mit der im SDS-Gel beobachteten Größe der gereinigten PDH E3 aus *Trypanosoma brucei* überein.

Da bisher keine der Untereinheiten des mitochondrialen PDH-Multienzymkomplexes aus *Euglena* direkt aufgereinigt wurde, ist die N-terminale Aminosäuresequenz und damit die Prozessierungsstelle für keines dieser Proteine bekannt. Erschwert werden Voraussagen über mögliche mitochondriale Importsequenzen in der *Euglena* PDH E1 α , E2 und E3 dadurch, dass erst wenige mitochondriale Importsequenzen aus *Euglena* bekannt sind. Die wenigen aus diesem Organismus publizierten mitochondrialen Transitpeptide (Cui et al. 1994, Rotte et al. 2001) ähneln bezüglich ihrer Länge und AS-Zusammensetzung typischen mitochondrialen Signalpeptiden. Sie enthalten zwischen 30 und 40 AS, wobei Arginin, Leucin, Serin und Alanin häufig vertreten sind (Claros et al. 1997), und sie sind zur Bildung amphipathischer α -Helices befähigt (Cui et al. 1994). Sehr viel mehr ist über den mitochondrialen Import in der Schwestergruppe

der Eugleniden, den Trypanosomatiden, bekannt. In Trypanosomen können zwei Klassen mitochondrialer Importsequenzen unterschieden werden. Die erste Klasse umfasst Transitpeptide mit einer Länge von 15 bis 20 AS. Zur zweiten Gruppe zählen ungewöhnlich kurze Transitpeptide mit einer Länge von 7 bis 9 AS, diese ähneln in ihrer Aminosäurezusammensetzung den mitochondrialen Signalpeptiden aus anderen Organismen (Häusler et al. 1997, Clayton et al. 1995). Mehr als die Hälfte der bekannten Transitpeptide in Kinetoplastiden ist der zweiten Klasse zuzurechnen (Häusler et al. 1997). Die N-Termini der *Euglena* PDH E1 α und E3 Sequenzen sind im Vergleich mit Transitpeptiden aus Trypanosomatiden nicht nur in Bezug auf die Länge, sondern auch auf die AS-Zusammensetzung sehr ähnlich (s. Tab. 4-1) und ihre Einrasterung im Sequenzalignment erfolgt im gleichen Bereich. Zusammen mit der Vorhersage sehr kurzer mitochondrialer Importsequenzen für die *Euglena* E1 α und E3 mittels MitoProtII deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass auch in *Euglena gracilis*, analog zu Kinetoplastiden, eine weitere Klasse sehr kurzer, 7-12 AS umfassender, mitochondrialer Importsequenzen existiert.

Tab. 5-1: N-Termini kernkodierter mitochondrialer Proteine aus Kinetoplastiden im Vergleich mit den N-Termini der *Euglena* PDH E1 α , E2 und E3. Positiv geladene AS sind fett hervorgehoben. Bekannte Prozessierungsstellen sind mit | markiert. Art- und Proteinnamen sind wie folgt abgekürzt: *Trypanosoma cr.*, *T. cruzi*; *Trypanosoma br.*, *T. brucei*; *Leishmania ta.*, *L. tarentolae*, *Crithidia fc.*, *C. fasciculata*; *Euglena gr.*, *E. gracilis*; DNA Polymerase β , DNA Pol. β .

Organismus	Sequenz	Referenzen
<i>Trypanosoma cr.</i> PDH E3	M F R RCAV K L >>	Schöneck et al. 1997
<i>Trypanosoma br.</i> PDH E3	M F R R C F P I F >>	Else et al. 1994
<i>Trypanosoma br.</i> PDH E1 α	M F R SAS C IL L >>	Diaz und Komuniecki 1995
<i>Trypanosoma br.</i> Hsp60	M F R S A A R F >>	Giambiagi de Marval et al. 1993
<i>Leishmania ta.</i> p51	M L R AT L A R L >>	Bringaud et al. 1995
<i>Crithidia fc.</i> DNA Pol. β	M F R R T F L T R >>	Torri und Englund 1995
<i>Crithidia fc.</i> p16	M L F R V P R R L >>	Xu und Ray 1993
<i>Crithidia fc.</i> p17	M L R R S P T L L >>	Xu und Ray 1993
<i>Crithidia fc.</i> p18	M L R R T V S N F >>	Xu und Ray 1993
<i>Euglena gr.</i> PDH E1 α	M N P F R L L L Q R A >>	
<i>Euglena gr.</i> PDH E2	M L P R L L V P L F Q A A R T R G Y A E>>	
<i>Euglena gr.</i> PDH E3	M F R Q S F I Q L>>	

Die Northern-Hybridisierung zeigt für alle drei untersuchten PDH-Untereinheiten das gleiche mRNA-Expressionsmuster auf. Die mRNA-Expression ist unter anaerober Anzucht (2 % CO₂ in N₂) im Licht am höchsten. Die geringste mRNA-Expression erfolgt bei allen drei Untereinheiten der PDH in aerob (2 % CO₂ in Luft), mit Licht angezogenen *Euglena* Kulturen. Das Expressionsmuster der PDH im Vergleich mit dem der PNO

zeigt, dass bei Heraufregulierung der mRNA für die PDH die PNO-mRNA herunterreguliert wird und umgekehrt, beide mRNAs werden jedoch sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen ko-exprimiert

5.3.2 Die Untereinheiten des mitochondrialen PDH-Komplexes aus *Euglena gracilis* sind Akquisitionen des α -proteobakteriellen Vorfahrens der Mitochondrien

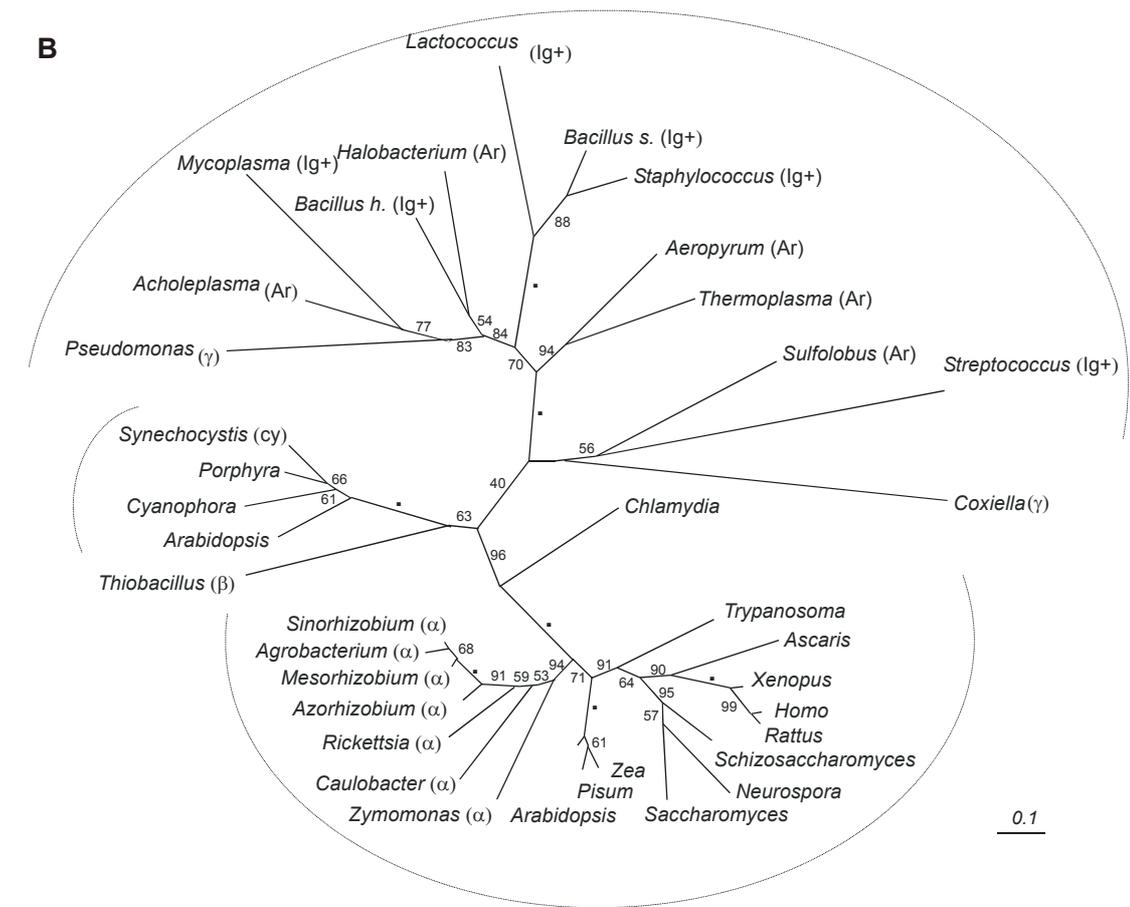
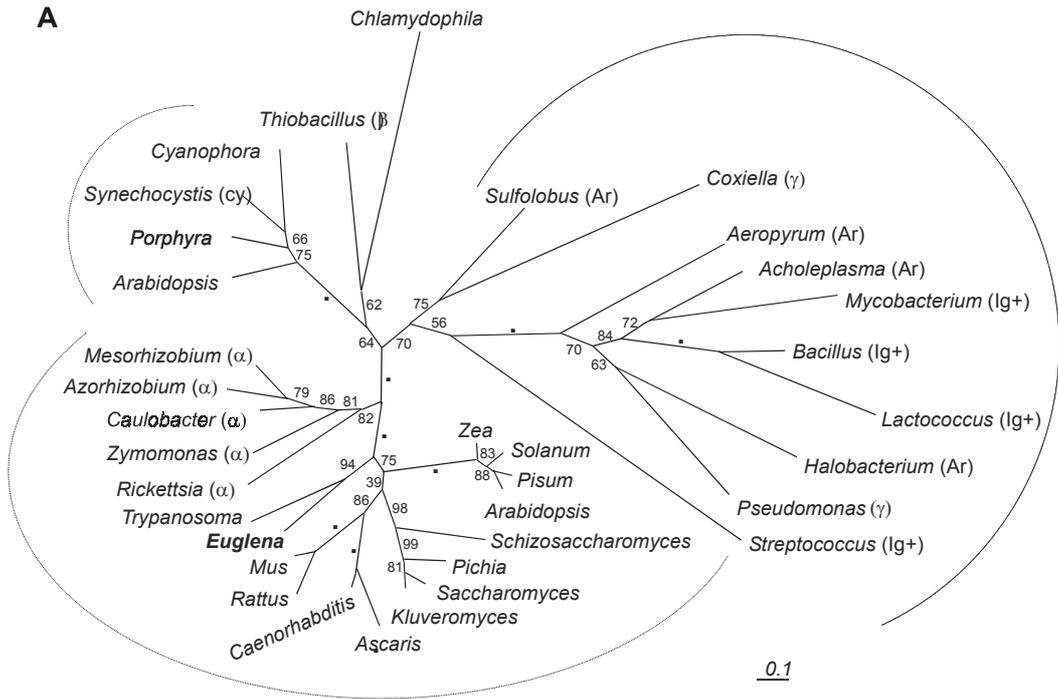
Maximum Likelihood Analysen der E1 α - und E1 β -Untereinheit der Pyruvat Dehydrogenase zeigen für beide Gene eine ähnliche Baumtopologie. Die Sequenzen fallen grob in drei Gruppen, in der eukaryotische und eubakterielle PDH miteinander überlappen (vgl. Abb. 5-4 A und B). Die *Euglena* PDH E1 α -Untereinheit ist am nächsten verwandt mit ihrem Homolog aus *Trypanosoma*, der Schwestergruppe der Eugleniden, mit denen sie 52 % Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene teilen. Gemeinsam mit den anderen eukaryotischen mitochondrialen PDH-Sequenzen bilden sie eine monophyletische Gruppe, die mit ihren α -proteobakteriellen Homologen abzweigen (s. Abb. 5-4 A). Ein weiterer Ast verknüpft die plastidäre PDH E1 α mit ihren cyanobakteriellen Homologen. Dieser Ast wird geteilt mit der E1 α aus *Thiobacillus* und *Chlamydomonas pneumoniae*. Die Sequenzähnlichkeit zwischen der plastidären und der mitochondrialen PDH aus *Arabidopsis* beträgt auf Aminosäureebene 40 %. Der dritte Ast verbindet ausschließlich bakterielle E1 α .

Mitochondriale E1 β zweigen ebenfalls mit ihren Homologen aus α -Proteobakterien ab, durch einen weiteren Ast sind plastidäre E1 β direkt mit ihren cyanobakteriellen Homologen verbunden (s. Abb. 5-4 B). Plastidäre und cyanobakterielle E1 β zweigen auch hier gemeinsam mit der E1 β aus *Thiobacillus* ab. Der dritte Ast enthält ausschließlich eubakterielle Sequenzen. Hierbei sei erwähnt, dass in einigen Gram-negativen Eubakterien wie *Neisseria* (Hein und Steinbüchel 1996), *Azotobacter* (Hengeveld et al. 1997) oder *E. coli* (Arjunan et al. 2002) die Pyruvat Dehydrogenase E1 Untereinheit kein Heterodimer, sondern ein homodimeres Protein aus zwei identischen Untereinheiten darstellt, welches im Sequenzalignment geringe Sequenzähnlichkeit sowohl zur PDH E1 α als auch zur PDH E1 β Untereinheit zeigt (Hawkins et al. 1989). Diese homodimeren E1 α 2 wurden in den Maximum Likelihood Analysen der E1 α und E1 β nicht berücksichtigt. Sowohl die E1 β als auch die E1 α 2 aus Gram-negativen Bakterien zeigen auf Aminosäureebene 20 – 30 % Sequenzähnlichkeit zu anderen Thiamin-abhängigen Enzymen wie Transketolase, 1-Deoxyxylulose_5-Phosphat Synthase und PFO, die biochemisch ähnliche Reaktionen katalysieren. Bemerkenswerterweise werden die E1 α und E1 β -Unter-

einheit der plastidären PDH in der Rotalge *Porphyra* noch immer vom Chloroplastengenom kodiert (Reith und Munholland 1995), während die Gene in höheren Pflanzen bereits erfolgreich in den Kern transferiert wurden.

Auch die Baumtopologie für die E2-Untereinheit der PDH lässt sich grob in drei Gruppen unterteilen, in denen wiederum eukaryotische und eubakterielle Sequenzen überlappen (vgl Abb. 5-4 C). Die *Euglena* PDH E2 zeigt die nächste Verwandtschaft zur E2 aus Ratte und Mensch, mit denen sie 42 bzw. 41 % Sequenzhomologie auf Aminosäureebene teilt. Auch hier zweigen die eukaryotischen E2 gemeinsam mit ihren α -proteobakteriellen Homologen ab. Geteilt wird dieser Ast von zwei weiteren Eubakterien, *Chlamydomonas* und *Klebsiella*. Die plastidäre E2 teilt einen gemeinsamen Ast mit ihrem cyanobakteriellen Homolog, von dem ferner auch die *Pelobacter* E2 abzweigt. Auch hier zweigen am dritten Ast ausschließlich bakterielle E2 ab. Die E3 Untereinheit der *Euglena* PDH zeigt die nächste Verwandtschaft zur E3 aus *Plasmodium* und *Trypanosoma*, zu denen die Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene 54 bzw. 60 % beträgt. Anders als für die E1 und E2 Untereinheit sind die α -proteobakteriellen Homologe in diesem Baum über mehrere Äste verteilt (s. Abb. 5-4 D). Die mitochondrialen E3 bilden einen gemeinsamen Ast sowohl mit α -Proteobakterien als auch mit Proteobakterien anderer Gruppen. Die plastidäre E3 aus *Arabidopsis* teilt auch hier eine gemeinsame Abstammung mit der cyanobakteriellen E3.

Wie für den mitochondrialen PDH-Komplex anderer Eukaryoten (Schnarrenberger und Martin 2002) gilt auch für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Untereinheiten der mitochondrialen PDH aus *Euglena*, E1 α , E2 und E3, dass sie die größte Ähnlichkeit zu Homologen aus Eubakterien, genauer α -proteobakteriellen Genomen besitzen. Wie andere Eukaryoten hat auch *Euglena* ihre PDH von dem mitochondrialen Endosymbionten akquiriert. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit allgemein akzeptierten Daten, welche die Abstammung der Mitochondrien aus der Gruppe der α -Proteobakterien belegen (Gray, Burger und Lang 1999).



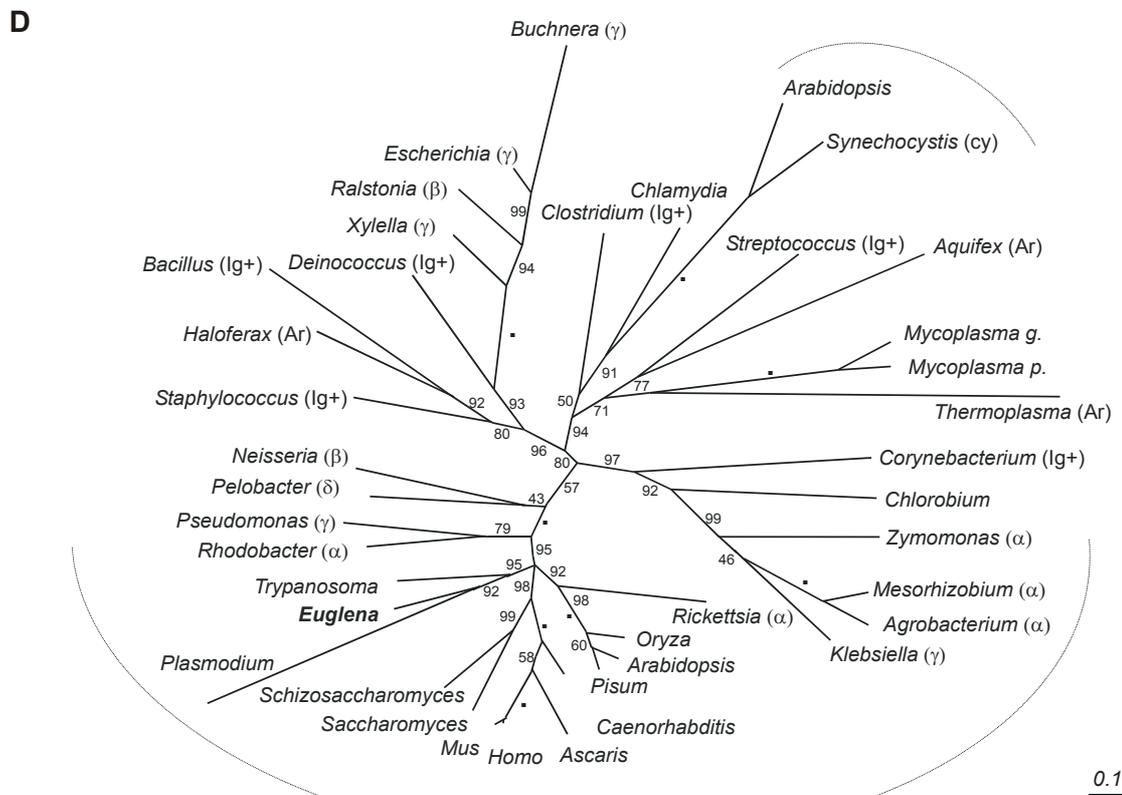
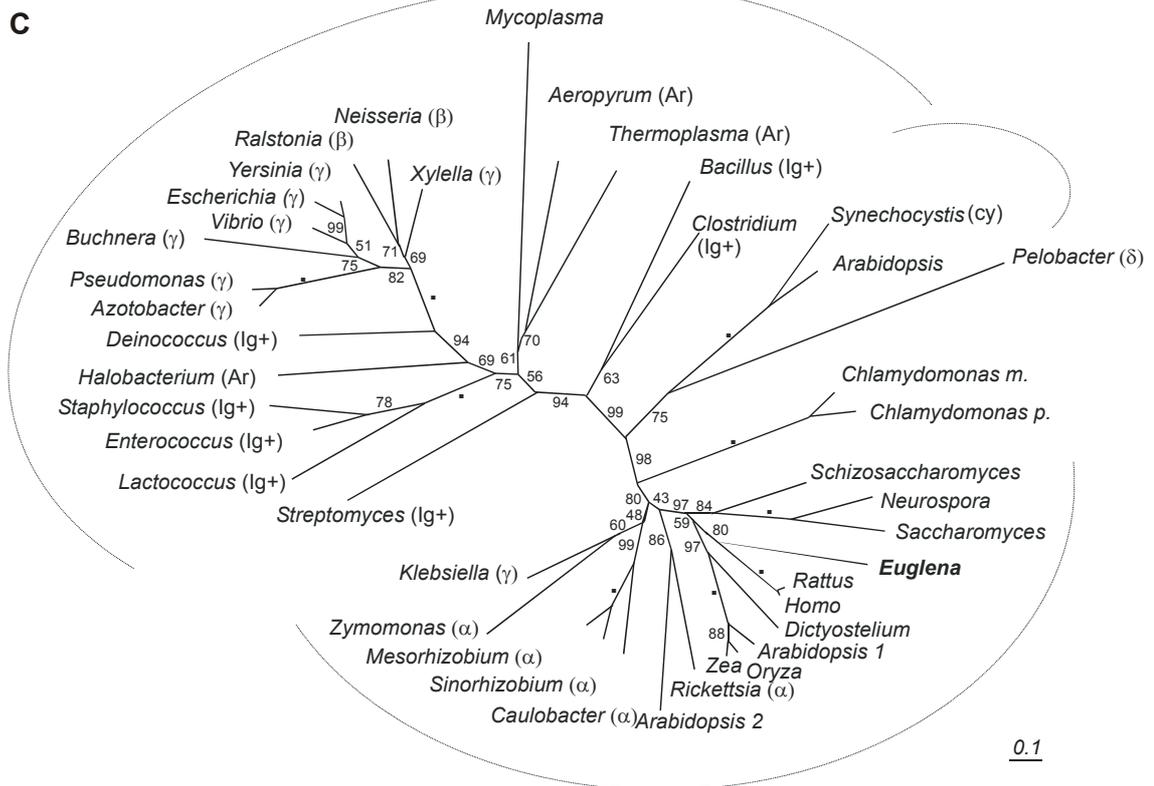


Abb. 5-4: (Seite 119-120) Mit ProtML (Adachi und Hasegawa 1986) konstruierte Protein-Phylogenien für die einzelnen PDH-Untereinheiten. Die einzelnen Bootstrap-Werte wurden mit Hilfe der REL-Methode (Adachi und Hasegawa 1986) bestimmt und sind an den Ästen angegeben. Bootstrap-Werte von 100 sind durch einen Punkt gekennzeichnet. Der Maßstab unten rechts steht für 0,1 Substitutionen pro Position. (A) Protein-Phylogenie für die PDH Untereinheit E1 α . (B) Protein-Phylogenie für die PDH Untereinheit E1 β . (C) Protein-Phylogenie für die PDH Untereinheit E2. (D) Protein-Phylogenie für die PDH Untereinheit E3. Taxa sind hinter den Organismennamen in Klammern angegeben: α , β , γ , δ , ϵ , Proteobakterien; Ig+, Gram-positive Bakterien; cy, Cyanobakterien. Archaeobakterien sind mit Ar gekennzeichnet. Sequenzen stammen aus GenBank und von den fertiggestellten und laufenden Genomprojekten durch TIGR (<http://www.tigr.org/tdb>) und NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/genom_table.cgi).

5.3.3 Die meisten eukaryotischen Enzyme des Energiestoffwechsels sind - wie die PDH und die PFO - eubakteriellen Ursprungs

Die eubakterielle Abstammung der PDH und der PNO aus *Euglena* fügt sich in ein generelles Muster ein, demgemäß Enzyme des eukaryotischen Energiestoffwechsels die größte Ähnlichkeit zu ihren eubakteriellen Homologen zeigen (Martin und Cerff 1986, Henze et al. 1995, Martin und Schnarrenberger 1997, Schnarrenberger und Martin 2002, Keeling und Doolittle 1997). Im Gegensatz dazu ist der genetische Apparat der eukaryotischen Zelle einschließlich der RNA-Polymerase (Langer et al. 1995), der Proteine der Transkription (Langer et al. 1995), der DNA-Replikation (Tye 2000) und der ribosomalen Proteine (Hansmann und Martin 2000) ähnlicher zu dem der Archaeobakterien. Dieses Muster wird auch auf Ebene Genom-weiter Phylogenien für Hefe im Vergleich zu eubakteriellen und archaeobakteriellen Referenzgenomen bestätigt (Rivera et al. 1998, Horiike et al. 2001).

Wie lässt sich der Mosaikcharakter eukaryotischer Genome erklären? Eine auf Gentransfer basierende Erklärungsmöglichkeit wäre, dass Eukaryoten ursprünglich phagozytierend waren und ihnen Prokaryoten direkt als Nahrung dienten. Viele der dabei aufgenommenen bakteriellen Gene wurden schließlich in ihre chromosomalen Gene inkorporiert, ebenso die Gene des später dazugekommenen mitochondrialen Symbionten ("You are what you eat" - Modell, Doolittle 1998). Verschiedenen Formulierungen des Fusionsmodells (Zillig et al. 1989, Lake und Rivera 1994, Gupta 1998, Moreira und Lopez-Garcia 1998) zufolge dagegen entstand durch Verschmelzung eines archaeobakteriellen Symbionten mit einer eubakteriellen Wirtszelle ein Eukaryot mit chimären Chromosomen. Sowohl gemäß der "You are what you eat" - Hypothese als auch gemäß der Fusionshypothese sollte jedoch erwartet werden, dass die Gene des eukaryotischen Energiestoffwechsels ein Gemisch aus eubakteriellen und archaeobakteriellen Homolo-

gen darstellen. Der Wasserstoffhypothese nach erhielt die archaebakterielle Wirtszelle die eubakteriellen Gene für die heterotrophe Lebensweise vom einst freilebenden Vorfahren der Mitochondrien. Diesem Modell zufolge sollten die Gene des eukaryotischen Energiestoffwechsels eubakteriellen Ursprungs sein.

Die Voraussage der Wasserstoffhypothese kommt damit dem Bild am nächsten, welches sich aufgrund der bisherigen Daten bezüglich der Abstammung der Enzyme des eukaryotischen Energiestoffwechsels abzeichnet. Von den rund 40 bisher untersuchten Enzymen des eukaryotischen Energiestoffwechsels einschließlich der Enzyme der Glykolyse (Martin und Cerff 1986, Henze et al. 1995, 2001; Keeling und Doolittle 1997, Martin und Schnarrenberger 1997, Nowitzki et al. 1998), des Glyoxylatzyklus (Schnarrenberger und Martin 2002) und des TCA-Zyklus (Schnarrenberger und Martin 2002) sind, mit wenigen Ausnahmen, alle diese Enzyme ähnlicher zu ihren eubakteriellen als zu ihren archaebakteriellen Homologen. Zu den erwähnten Ausnahmen zählen die Enolase (jedoch nicht die Enolase aus *Euglena* (Hannaert et al. 2000)), die Transketolase aus Tieren (Mittenhuber 2001, Martin 1998) und die Acetyl-CoA Synthetase aus amitochondrialen Protisten (Sánchez et al. 1999, 2000), welche die höchste Homologie zu den archaebakteriellen Enzymen zeigen. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten beiden Enzyme des Energiestoffwechsels von *Euglena*, PNO und PDH, erfüllen damit auch die vierte Voraussage, welche aus der Wasserstoffhypothese abgeleitet werden kann: Die Enzyme des eukaryotischen Kohlenhydratstoffwechsels sollten ähnlicher zu ihren eubakteriellen als zu ihren archaebakteriellen Homologen sein (Martin und Müller 1998).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen somit die wesentlichen Voraussagen der Wasserstoffhypothese. *Euglena gracilis* stellt bezüglich des mitochondrialen Energiestoffwechsels eine echte Zwischenform zwischen Mitochondrien und Hydrogenosomen dar. Die PNO als ein biochemisches *Missing link* des Pyruvat-Stoffwechsels zwischen Mitochondrien und Hydrogenosomen liefert weitere Evidenz für die Abstammung dieser Organellen von einem gemeinsamen Vorfahren. Die Koexistenz der PDH und der PFO im fakultativ anaeroben Organell dieses Protisten spricht ferner dafür, dass dieser Vorfahr tatsächlich eine fakultativ anaerobe Lebensweise besass. Die PDH und die PFO sind wie andere eukaryotische mitochondriale Enzyme sehr viel enger mit ihren eubakteriellen als mit ihren archaebakteriellen Homologen verwandt und gehen aus einer einzigen Akquisition an der Basis der Eukaryotenevolution hervor. Damit erscheinen die Zusatzannahmen der Wasserstoffhypothese zurzeit weniger gravierend sowohl im Ver-

gleich zur Fusions-Hypothese als auch im Vergleich zu klassischen Versionen der Endosymbionten-hypothese.

Es kann erwartet werden, dass das Studium von weiteren fakultativ anaeroben Eukaryoten oder solchen Eukaryoten, in denen die ATP-Synthese ohne Hilfe von Sauerstoff erfolgt, entscheidende Aufschlüsse über den Ursprung und die Evolution des anaeroben Energiestoffwechsels in Eukaryoten geben wird.

5.4 Identifizierung differentiell exprimierter Gene mittels subtraktiver und differentieller Hybridisierung

Um ein vollständigeres Bild über die anaeroben Stoffwechselwege in *Euglena gracilis* zu erhalten, wurden zur Identifizierung weiterer Enzyme des fakultativ anaeroben Energiestoffwechsels die Methoden der subtraktiven und differentiellen Hybridisierung angewandt. Bei der Methode der subtraktiven Hybridisierung werden im erfolgreichen Fall nur solche Gene identifiziert, die ausschließlich in einem von zwei zu vergleichenden Zell- oder Gewebetypen exprimiert werden. Vorteil – gleichzeitig aber auch Nachteil dieser Methode – ist die Anreicherung von Zell-, Gewebe-, oder wachstumsspezifischen seltenen mRNAs, da der Hintergrund abundanter mRNAs (Haushalts- und repetitive Gene) in der subtrahierten Probe reduziert ist. Mit dieser Methode werden daher selten exprimierte mRNAs gegenüber häufig exprimierten mRNAs deutlich bevorzugt. Zur Isolierung differentiell exprimierter Gene wurden *Euglena* Kulturen aerob (2 % CO₂ in Luft) im Licht und anaerob (2 % CO₂ in N₂) im Dunkeln angezogen. In einer Vorwärts-Subtraktion (*forward subtraction*) wurde die aerobe cDNA von der anaeroben cDNA subtrahiert, um eine Anreicherung anaerob exprimierter Gene zu erzielen. Parallel dazu wurde eine Rückwärts-Subtraktion (*reverse subtraction*) durchgeführt. Obwohl die Effizienz der Vorwärts- und Rückwärts-Subtraktion in den cDNA-Banken im Vergleich zu den nicht subtrahierten Kontrollen überprüft und als zufriedenstellend eingestuft wurde (vgl. Abb. 3.20), erwiesen sich die Anteile differentiell exprimierter cDNA-Fragmente insgesamt als unerwartet gering (vgl. Tab. 3.4)

In der Vorwärts-Subtraktion wurden 16 Klone identifiziert, die unter anaeroben Bedingungen verstärkt exprimiert sein sollten. Sechs dieser Klone ließen sich durch Sequenzdatenbank-Vergleiche einem Protein mit bekannter Funktion zuordnen. Insgesamt 30 % der identifizierten Klone zeigten in ihrer Sequenz jedoch einfache Dinukleotid Sequenzwiederholungen (*simple sequence repeats*, SSR). Diese auch als Mikrosatelliten bezeichneten Regionen der DNA enthalten ein kurzes (2-6 bp) Sequenzmotiv, welches mehrere Male wiederholt wird (z. Bsp. ...ATATATAT...). Sie kommen in den Genomen

aller lebenden Organismen vor, die Anzahl der Wiederholungen der Sequenzmotive variiert von Spezies zu Spezies (Renwick et al. 2001). Der überdurchschnittlich hohe prozentuale Anteil dieser Klone unter den Kandidaten_{positiv} im Vergleich zu ihrer Präsenz in einer nicht subtrahierten cDNA-Bank lässt vermuten, dass durch den Schritt der PCR-Amplifikation in der subtraktiven Hybridisierung bevorzugt solche Regionen mit Dinukleotid-Sequenzwiederholungen amplifiziert wurden. Die nachfolgende differentielle Hybridisierung zur Eliminierung des Hintergrunds reduzierte die Anzahl der echten, experimentell exprimierten Klone auf einen einzigen Kandidaten, dieser kodiert für die PNO. Eine verstärkte Expression der PNO bei Anzucht der *Euglena*-Zellen unter Anaerobiose im Dunkeln konnte bereits experimentell nachgewiesen werden, damit handelt es sich bei dem identifizierten Klon um ein tatsächlich differentiell exprimiertes Gen.

In der Rückwärts-Subtraktion wurden 18 Klone identifiziert, die unter aeroben Bedingungen verstärkt exprimiert sein sollten. Von diesen Klonen ließen sich 16 durch Vergleiche mit Sequenzdatenbanken einem Protein bekannter Funktion zuordnen. Den größten Anteil an der Redundanz unter diesen identifizierten Klonen besaß die Carbon Anhydrase, ein Enzym, welches am CO₂-Transport in der Zelle beteiligt ist. Die nachfolgende differentielle Hybridisierung reduzierte die Anzahl der echten, experimentell exprimierten Klone auf 10 für unterschiedliche Gene kodierende Klone. Zwei dieser Gene kodieren für Proteine, die direkt an der Photosynthese beteiligt sind, das O₂-freisetzende Enzym und die Carbon Anhydrase (Majeau und Coleman 1994). Die anderen acht Gene kodieren für essentielle Proteine, welche an Proteinimport und -export (ADP/ATP Carrier und ABC Transporter) und der Transkription beteiligt sind. Es konnten somit in der Rückwärts-Subtraktion zwei Gene identifiziert werden, für die eine differentielle Expression dieser Gene unter Aerobiose im Licht, nicht aber unter Anaerobiose im Dunkeln den Erwartungen entspräche.

Eine geringe Effizienz beim Auffinden von differentiell exprimierten Transkripten kann bei der Methode der subtraktiven Hybridisierung durch verschiedene Faktoren verursacht sein. (i) Die höchste Anreicherung (etwa 1000 x) wird für cDNA-Fragmente von geringer Häufigkeit und/oder mit großen Differenzen in den Expressionsniveaus in *Tester* und *Driver* cDNA erreicht. Die Detektion von Transkripten mit mittleren Unterschieden (zwei- bis vierfach) gilt als möglich, aber die optimalen Anreicherungs-effizienzen werden für sie nicht erreicht (Diatchenko et al. 1996). (ii) Selten exprimierte mRNAs werden gegenüber häufig exprimierten mRNAs deutlich bevorzugt angereichert (Diatchenko et al. 1996). (iii) Die Unterschiede in den mRNA-Expressionsmustern zwischen den beiden mRNA-Populationen kann für eine effiziente

Anreicherung zu gering sein. In der resultierenden subtrahierten cDNA-Bank wäre in diesem Fall der Hintergrund hoch und die differentiell exprimierte Transkripte nur gering angereichert. Tatsächlich jedoch wurde bei der differentiellen Hybridisierung mit nicht subtrahierten Sonden ein sehr ähnliches Ergebnis erhalten.

Durch parallele Hybridisierung mit aerober und anaerober einzelsträngiger cDNA gegen eine anaerobe *Euglena* cDNA-Bank konnten 17 Klone identifiziert werden, die ein stärkeres Signal mit der anaeroben einzelsträngigen cDNA-Sonde zeigten. Von diesen Klonen kodierten 10 für Proteine mit bekannter Funktion. Die nachfolgende Dotblot Analyse reduzierte die Anzahl der echten, experimentell exprimierten Klone auf drei für unterschiedliche Gene kodierende Klone, die Sequenzähnlichkeiten zu einer Endonuklease, einem Chlorophyll-Bindeprotein und einem Protein namens CDH1-D mit bisher unbekannter Funktion zeigten. Insgesamt 14 Klone hybridisierten stärker mit der aeroben einzelsträngigen cDNA-Sonde, von diesen Klonen ließen sich 13 in Gendatenbank-Vergleichen einem Protein mit bekannter Funktion zuordnen. Durch die nachfolgende Dotblot Analyse wurde die Anzahl der echten, experimentell exprimierten Klone auf sieben für unterschiedliche Gene kodierende Klone reduziert. Auch hier kodiert einer dieser Klone für ein Protein, welches an der Photosynthese beteiligt ist, das O₂-freisetzende *enhancer* Protein. Die anderen sechs Gene kodieren auch hier für Proteine, die essentielle Funktionen innerhalb der Zelle übernehmen. Dazu zählen Proteine, die an Transportvorgängen in der Zelle (ADP/ATP Carrier), an der Transkription und Translation oder am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt sind (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase). Mit der Methode der differentiellen Hybridisierung konnten somit keine Gene identifiziert werden, für die eine differentielle Expression dieser Gene unter Anaerobiose den Erwartungen entspräche.

Die erfolgreiche Identifizierung eines tatsächlich differentiell exprimierten Gens mit Hilfe der subtraktiven Hybridisierung spricht dafür, dass die Ursachen für die geringe Effizienz bei der Identifizierung positiver Kandidaten weniger in der methodischen Durchführung begründet sind. Wahrscheinlicher ist, dass die Differenzen in den Expressionsniveaus in aerober und anaerober cDNA zu gering für eine erfolgreiche Anreicherung ausfallen. So haben Proteom-Untersuchungen von isolierten *Euglena*-Mitochondrien gezeigt, dass es keine nennenswerte Neuakkumulation von mitochondrialen Proteinen beim Übergang von Aerobiose zu Anaerobiose gibt (M. Hoffmeister; unveröffentlichte Ergebnisse ihrer Doktorarbeit). Vielmehr zeigt *Euglena* bei fortgesetzter Kultur ohne Zufuhr von Sauerstoff eine deutliche Reduktion von Komponenten der Atmungskette, insbesondere der Cytochrome Cytochrom *c558*, Cytochrom *aa3* so-

wie der Cytochrom *c* Oxidase (Carre et al. 1988). Bei Rückkehr zu aeroben Bedingungen scheint *Euglena* zunächst von einer Cyanid-resistenten Atmungskette abzuhängen (Carre et al. 1988) wie sie von Pflanzen, einigen Pilzen und Protisten bekannt ist (Vanlerberghe und McIntosh 1997).

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Enzyme der anaeroben ATP-Synthese in *Euglena* Mitochondrien bereits unter aeroben Bedingungen exprimiert werden, und dass sie beim Wegfall von Sauerstoff als Elektronenendakzeptor durch das Abfangen überschüssiger Reduktionsäquivalente physiologisch relevant werden. Eine derartige Prä-Adaptation des mitochondrialen Energiestoffwechsels an anaerobe Bedingungen ist beispielsweise von einigen parasitischen Würmern wie dem großen Leberegel *Fasciola hepatica* bekannt (Boyunaga et al. 2001). Die Mitochondrien dieser Würmer nutzen bei Abwesenheit von Sauerstoff Fumarat als Elektronenendakzeptor ihrer anaeroben Elektronentransportkette. Hierbei dient Rhodochinon als Elektronendonator (Tielens und Van Hellemond 1998, Tielens et al. 2002) (vgl. Abschnitt 1.3.1). Eine schnelle Anpassung an die innerhalb seines Wirtes zeitweilig auftretenden anaeroben Bedingungen wird *Fasciola* u. a. durch seinen bereits unter Aerobiose hohen Gehalt von Rhodochinon ermöglicht (Boyunaga et al. 2001). In ähnlicher Weise würde in *Euglena gracilis* die Expression von Genen der anaeroben ATP-Synthese sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen eine unmittelbare Adaptation an wechselnde O₂-Konzentrationen in seiner Umgebung erlauben.

5.5 Die Ribonukleotid Reduktase (RNR) aus *Euglena gracilis*

Euglena gracilis weist jedoch nicht nur in Bezug auf seine mitochondriale ATP-Synthese eine Anpassung an unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen in der Umgebung auf, sondern auch in Hinsicht auf die DNA-Replikation. Hierzu nutzt *Euglena* im Gegensatz zu anderen bisher untersuchten Eukaryoten eine ungewöhnliche, sauerstoffunabhängige, cobalaminabhängige Form der Ribonukleotid Reduktase (RNR) Klasse II. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Ribonukleotid Reduktase Sequenz aus *Euglena* ist die erste bekannte Sequenz einer eukaryotischen RNR der Klasse II, alle anderen bisher bekannten RNR-Sequenzen aus Eukaryoten gehören zu der sauerstoffabhängigen Klasse Ia.

5.5.1 Molekulare Charakterisierung der Ribonukleotid Reduktase Klasse II aus *Euglena gracilis*

Durch BLAST-Analysen der *Euglena* EST-Daten konnten sieben Klone identifiziert werden, die zwischen 25 und 30 % Sequenzähnlichkeit zur Ribonukleotid Reduktase Klasse II aus Prokaryoten und Bakteriophagen zeigten. Nur der identifizierte Klon pEgRNR_3 repräsentierte ein vollständiges Transkript mit einer Größe von 1458 bp einschließlich einer 8 bp *spliced leader* Sequenz am 5'-terminalen Ende und kodiert ein offenes Leseraster für 729 AS. Das berechnete Molekulargewicht des Proteins liegt bei 80190 Da. Es ist damit deutlich geringer als das über Sucrose-Dichtegradienten bestimmte Molekulargewicht der aufgereinigten Ribonukleotid Reduktase aus *Euglena* von etwa 145000 Da (Gleason und Hogenkamp 1970). Eine Einrasterung der *Euglena* pEgRNR_3 mit der RNR aus *Lactobacillus leichmannii* zeigt, dass die fünf Cysteinreste, welche im *Lactobacillus* Enzym an der Katalyse beteiligt sind (Booker et al. 1994), in der abgeleiteten Aminosäuresequenz der pEgRNR_3 konserviert sind. Der Cysteinrest 408 in der *Lactobacillus* RNR ist Ort der Thiyl-Radikalbildung und entspricht dem Cysteinrest 427 in der *Euglena* RNR. Die Cysteinreste 119 und 419 in der *Lactobacillus* Sequenz bilden das aktive Redox-Paar von Cysteinen, welches an der Substratreduzierung beteiligt ist. Diese Cysteinreste entsprechen Cystein 189 bzw. 438 in der *Euglena* pEgRNR_3. Die Cysteinreste 731 und 736 in der *Lactobacillus* RNR fungieren als weiteres Redoxpaar, welches Elektronen vom Wasserstoff-Donator, Thioredoxin oder Glutaredoxin, akzeptiert. Elektronen von diesem Redox-Paar werden während der Reduktion auf das aktive Redox-Paar der Cysteinreste 119 und 419 übertragen. Die Homologie in den C-Termini der *Euglena* RNR und *Lactobacillus* Sequenz deutet darauf hin, dass die entsprechenden beiden Cysteinreste 721 und 726 in der *Euglena* Sequenz möglicherweise ebenfalls der Interaktion mit Wasserstoffdonatoren dient.

Die *Euglena* RNR zeigt die höchste Sequenzhomologie zu *Lactobacillus* (32 %), Bakteriophagen (26 %) sowie zu ihren cyanobakteriellen Homologen (25 %). Die Übereinstimmung der pEgRNR_3 Translation mit internen Peptidsequenzen für die aus *Euglena* aufgereinigte RNR (P. Reichard, pers Mitteilung) belegt, dass dieser Klon für die mitochondriale RNR kodiert und bestätigt die funktionelle Identität des Klones.

Die Abhängigkeit der *Euglena* RNR von Cobalamin als Cofaktor schafft möglicherweise direkt eine direkte Verbindung zur mitochondrialen PNO, für die neben der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat als weitere Funktion die Reduktion von Aquacobalamin zu Cob(II)alamin diskutiert wird (s. auch Abschnitt 5.1.2). Somit

könnte die *Euglena* PNO eine wichtige Rolle in der Synthese von Cobalamin-abhängigen Coenzymen spielen (Watanabe et al. 1993).

5.5.2 RNR Genphylogenie der Klasse II Enzyme: Die *Euglena* RNR könnte eine Genakquisition aus der Plastide repräsentieren

Obwohl die Reduktion der Ribonukleotide durch die Ribonukleotid Reduktase eine essentielle Reaktion in den meisten eukaryotischen Zellen darstellt, ist die primäre Struktur dieses Enzyms wenig konserviert. So beträgt die Sequenzähnlichkeit zwischen den einzelnen Klassen von RNR nur zwischen 10 und 25 % (Torrents et al. 2002). Aber auch innerhalb einer Klasse von RNR ist die Sequenzkonservierung über weit entfernt verwandte Prokaryoten überraschend gering. Aminosäuresequenz-Alignments mit der RNR Klasse II zeigen auffallend große Lücken, welche direkte phylogenetische Analysen erschweren. Eine sehr einfache phylogenetische Analyse von 14 Ribonukleotid Reduktasen der Klasse II wurde mit Hilfe des Programmpakets ClustalW (Thompson, Higgins und Gibson 1994) durchgeführt. Von den mit ClustalW unter Verwendung der Blosum Distanzmatrix erstellten Aminosäure-Alignments wurden automatisch alle Lücken entfernt und mit Hilfe des Neighbor Joining Algorithmus (Saitou und Nei 1987) ohne Korrektur für multiple Substitutionen eine einfache ungewurzelte Baum-Topologie berechnet. In der so erhaltenen Baum-Topologie fallen die Sequenzen in zwei Gruppen (Abb. 5-5 A). In der ersten Gruppe zweigen archaebakterielle RNR gemeinsam mit eubakteriellen Homologen ab. Im Gegensatz zu den archaebakteriellen RNR bilden die RNR der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt keine monophyletische Gruppe. In der zweiten Gruppe teilen die cyanobakteriellen RNR, wenn auch mit geringer Bootstrap-Unterstützung, eine gemeinsame Abstammung mit der RNR aus den Bakteriophagen *Roseophage* und *Mycobacteriophage* sowie mit der RNR aus *Euglena* und *Lactobacillus*, letztere beiden Sequenzen teilen direkt einen gemeinsamen Ast.

Eine weit verbreitete Methode im Fall wenig konservierter Alignments ist der Ausschluss von hoch variablen (und damit wenig konservierten und schwierig zu alignenden Positionen) aus dem Alignment. Der Ausschluss solch schlecht konservierter Positionen lässt sich damit rechtfertigen, dass diese Positionen aufgrund von stochastischer Ähnlichkeit oder systematischer Fehler, welche einer beliebigen Anzahl an Faktoren zuschreibbar ist, irreführende Informationen enthalten könnten (Hansmann und Martin 2000, Lockhart et al. 1999, Philippe und Laurent 1998).

Hilfe der RELL-Methode (Adachi und Hasegawa 1996) bestimmt, Bootstrap-Werte von 100 sind durch einen Punkt gekennzeichnet. Der Maßstab unterhalb der Bäume steht für 0,1 Substitutionen pro Position. Sequenzen stammen aus GenBank und von den fertiggestellten und laufenden Genomprojekten (UG) durch TIGR und NCBI. Abkürzungen der Organismennamen und Datenbank-Zugangsnummern sind wie folgt: Tel, *Thermosynechococcus elongatus* (AP005373); Syn, *Synechocystis* sp. (P74240); Pma, *Prochlorococcus marinus* (NZ_AAAW01000001); Lle, *Lactobacillus leichmannii* (L20047); Ros, *Roseophage* S101(NC002519); Myc, *Mycobacteriophage* L5 (S30995); Pfu, *Pyrococcus furiosus* (TIGR UG); Mth, *Methanobacterium thermoautotrophicum* (AE000666); Afu, *Archaeoglobus fulgidus* (AE000782); Tac, *Thermoplasma acidophilus* (AL445067); Tma, *Thermotoga maritima* (Y12877); Scl, *Streptomyces clavuligerus* (AJ224870); Cac, *Clostridium acetobutylicum* (NC 003030).

Unter der Annahme, dass die variabelsten Positionen im Alignment die höchste Wahrscheinlichkeit besitzen, irreführende Information zu enthalten, würde das systematische Ausschließen der variabelsten Positionen vom Alignment bis auf einen "Kern konservierter Positionen" potentiell irreführende Information entfernen. Doch gibt es bisher weder objektive Kriterien, um einen solchen Kern konservierter Positionen im Alignment zu definieren (Hansmann und Martin 2000) noch um eine Hierarchie der Variabilität aufzustellen, gemäß der Positionen sukzessive aus dem Alignment ausgeschlossen werden könnten. Eine Lösung ist die Gewichtung der Variabilität einer Position im Alignment durch Bestimmung der Anzahl unterschiedlicher AS an dieser Position (Hansmann und Martin 2000). Je höher die Anzahl verschiedener AS pro Position, umso variabler ist diese Position. Auf diese Weise können durch systematischen Ausschluss der variabelsten Positionen aus dem Alignment Teil-Datensätze mit zunehmender Sequenzkonservierung generiert und diese einer phylogenetischen Analyse unterzogen werden. Das Programm SORTAL (Hansmann und Martin 2000) ermöglicht die automatische Generierung solcher Datensätze unter Einordnung der Positionen gemäß ihrer Häufigkeit unterschiedlicher AS in Klassen. Positionen mit zwei, drei, vier oder entsprechend mehr unterschiedlichen AS werden in jeweils eine eigene Klasse gruppiert und das Alignment schließlich nach Klassen zunehmender Variabilität sortiert.

Teildatensätze von 200, 250 und 400 Positionen aus dem ursprünglich 1246 Aminosäurepositionen umfassenden Datensatz (s. Abb. 5-5 B) wurden in PROTML-Analysen (Adachi und Hasegawa 1996) mit *local rearrangement* und der JTT-F Substitutionsmatrix ausgehend von einem Neighbor-Joining Baum von Maximum Likelihood Distanzen untersucht. In den Baumtopologien für alle drei Teildatensätze fallen die Sequenzen in zwei Gruppen (vgl. Abb. 5-5 C). In der ersten Gruppe zweigen archaebakterielle und eubakterielle Sequenzen gemeinsam ab. Auch hier bilden Gram-positive Bakterien keine monophyletische Gruppe. In der zweiten Gruppe teilen die cyanobakteriellen RNR eine gemeinsame Abstammung mit der RNR aus den Bakteriophagen *Roseophage* und

Mycobacteriophage sowie den Homologen aus *Euglena* und *Lactobacillus*. Während die auf Datensätzen mit 250 und 400 Positionen beruhenden Baumtopologien nahezu identisch sind und die nächste Verwandtschaft der *Euglena* RNR mit ihren Homologen aus *Lactobacillus* und *Roseophage* zeigen, findet sich in der Baumtopologie des Datensatzes mit 200 Positionen ein direktes Abzweigen der *Lactobacillus*- und *Euglena* Sequenzen mit den cyanobakteriellen Homologen. Die RNR aus dem Bakteriophagen *Roseophage* ist in diesem Baum näher zu den cyanobakteriellen RNR und der RNR aus *Euglena* und *Lactobacillus* positioniert, die Position des Astes für die Bakteriophagen *Mycobacteriophage* ist in größerer Nähe zu den eubakteriellen und archaeobakteriellen RNR positioniert.

PROTML-Analysen erfolgen bekanntermassen effizienter, wenn die Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Sequenzen nicht signifikant von der des gesamten Datensatzes abweicht (Adachi und Hasegawa 1996). Mögliche derartige Abweichungen in der Aminosäurezusammensetzung in den Teil-Datensätzen wurden mittels PUZZLE überprüft (Strimmer und von Haeseler 1997). Im Teil-Datensatz mit 400 Positionen zeigten die RNR-Sequenzen von *Mycobacterium* und *Clostridium* dem PUZZLE Programm zufolge signifikante Abweichungen ($P = 0,95$) vom Gesamtdatensatz. Der Ausschluss dieser Sequenzen und eine erneute Analyse der Daten wie oben beschrieben (Datensatz_12), ergab als besten der 1000 Bäume eine Topologie, in der die archaeobakteriellen und alle eubakteriellen Sequenzen (mit Ausnahme der *Lactobacillus* Sequenz) eine Gruppe bilden. Die *Euglena*- und *Lactobacillus* Sequenzen bilden gemeinsam mit der RNR aus *Roseophage* eine weitere Gruppe (Daten nicht gezeigt). Die Aminosäurezusammensetzung der 14 RNR-Sequenzen in den Teil-Datensätzen mit 200 und 250 Positionen jedoch zeigten der PUZZLE-Analyse zufolge keine signifikanten Abweichungen ($P = 0,95$) vom Gesamt-Datensatz.

Ribonukleotid Reduktasen der Klasse II sind sowohl unter Eubakterien als auch unter Archaeobakterien verbreitet. Auch alle bisher bekannten Cyanobakterien besitzen eine RNR Klasse II, *Synechocystis* besitzt zusätzlich zur RNR Klasse II eine RNR Klasse Ia. Denkbar wäre eine Abstammung der für Eukaryoten untypischen Form der Ribonukleotid Reduktase Klasse II in *Euglena gracilis* sowohl i) von der eukaryotischen Flagellaten-Wirtszelle, ii) von einem prokaryotischen Donator im Zuge eines lateralen Gentransfer-Ereignisses, oder aber iii) von der eukaryotischen Alge, die von diesem Flagellaten im Zuge sekundärer Endosymbiose aufgenommen wurde. Da alle bisher bekannten eukaryotischen RNR der Klasse Ia angehören, gibt es keine Evidenz dafür, dass die eukaryotische Flagellaten-Wirtszelle eine andere RNR besessen haben sollte

als andere Eukaryoten. Im Fall einer Abstammung der RNR Klasse II von der eukaryotischen Wirtszelle sollte ferner die Schwestergruppe der Eugleniden, die Kinetoplastiden, die gleiche RNR Klasse II besitzen. *Trypanosoma* besitzt jedoch wie andere Eukaryoten eine RNR Klasse Ia. Nicht auszuschliessen ist, dass *Euglena* seine RNR im Zuge einer zufälligen Genakquisition aus einem prokaryotischen Donator erworben hat, der nicht unbedingt in dieser phylogenetischen Analyse erfasst sein muss. Durch das gemeinsame Abzweigen der *Euglena*-Sequenz mit *Lactobacillus* läge eine laterale Genakquisition aus diesem Bakterium zwar nahe. Doch interessanterweise ergab eine komplexe Analyse des *Arabidopsis*-Genoms sowie cyanobakterieller und Chloroplasten-Genome

(Martin et al. 2002), dass mehr Proteine aus *Arabidopsis* mit ihren Homologen aus dem Gram-positiven Bakterium *Mycobacterium* als mit ihren Homologen aus *Prochlorococcus* oder *Synechocystis* abzweigen. Prinzipiell könnte *Arabidopsis* spezifisch ihre Gene von Gram-positiven Bakterien akquiriert haben, wahrscheinlicher erscheint jedoch, dass das Gram-positive Signal in den *Arabidopsis* Daten am einfachsten Genen zugeordnet werden kann, welche von den Pflanzen mit dem Vorfahren der Plastide aufgenommen wurden (Martin et al. 2002). Die Abzweigung dieser Gene mit ihren Gram-positiven Homologen könnte einen extensiven lateralen Gentransfer zwischen Cyanobakterien und Gram-positiven Bakterien (Rujan und Martin 2000, Martin et al. 2002) widerspiegeln.

Analog könnte die Position der *Lactobacillus* RNR in größerer Nähe zu cyanobakteriellen Homologen als zu anderen Gram-positiven RNR auf ein laterales Gentransfer-Ereignis (aus Cyanobakterien) hindeuten. Durch das gemeinsame Abzweigen der *Euglena* RNR mit cyanobakteriellen Homologen ist denkbar, dass *Euglena* ihre RNR aus der eukaryotischen Alge, bzw. letztendlich aus deren Plastide, akquiriert hat, die von den Eugleniden im Zuge der Evolution aufgenommen wurde. Die Akquisition eines Gens aus der Wirtszelle des sekundären Symbionten in *Euglena* ist beispielsweise für die cytosolische *Euglena* Phosphoglycerat Kinase bekannt (Nowitzki 2001). Eugleniden und Trypanosomatiden erben möglicherweise von ihrer gemeinsamen eukaryotischen Flagellaten-Zelle eine RNR Klasse Ia. Die RNR Ia könnte in *Euglena* im späteren Verlauf der Evolution nach Aufnahme des photosynthetischen Symbionten durch die plastidäre RNR II ersetzt worden sein, weil diese durch die damit verbundene sauerstoffunabhängige DNA-Replikation einen klar erkennbaren Vorteil für die fakultativ anaerobe Lebensweise von *Euglena* lieferte.

6 Literaturverzeichnis

- Adachi J und Hasegawa M (1996) Computer Science Monographs, No. 28. MOLPHY Version 2.3: Programs for Molecular Phylogenetics Based on Maximum Likelihood. Institute of Statistical Mathematics, Tokyo
- Adams MW und Kletzin A (1996) Oxidoreductase-type enzymes and redox proteins involved in fermentative metabolisms of hyperthermophilic Archaea. *Adv Protein Chem.* 48:101-80
- Akhmanova A, Voncken F, Van Alen T, Van Hoek A, Boxma B, Vogels GD, Veenhuis M und Hackstein JHP (1998) A hydrogenosome with a genome. *Nature* 396:527-528
- Altling-Mees MA und Short JM (1989) pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res.* 17:9494
- Altschul SF, Gish W, Myers WMEW und Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410
- Anbar AD und Knoll AH (2002) Proterozoic ocean chemistry and evolution: a bioinorganic bridge. *Science* 297:1137-1142
- Andersson SG, Zomorodipour A., Andersson JO, Sicheritz-Ponten T, Alsmark UC, Podowski RM, Naslund AK, Eriksson AS, Winkler HH und Kurland CG (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396:133-140
- Andersson SGE und Kurland CG (1999) Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:535-541
- Arjunan P, Nemeria N, Brunskill A, Chandrasekhar K, Sax M, Yan Y, Jordan F, Guest JR und Furey W (2002) Structure of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex E1 component from *Escherichia coli* at 1.85 Å resolution. *Biochemistry* 41:5213-5221
- Arnold W, Rump A, Klipp W, Priefer UB und Pühler A (1988) Nucleotide sequence of a 24,206-basepair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* 203:715-738
- Bannai H, Tamada Y, Maruyama K, Nakai K und Miyano S (2001) Views: Fundamental building blocks in the process of knowledge discovery. In: Proceedings of the 14th International FLAIRS Conference. AAAI Press. S. 233-238.
- Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K und Miyano S (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18:298-305
- Barrera CR, Namihara G, Hamilton L, Munk P, Fley MH, Linn TC und Reed L (1972) α -Keto acid dehydrogenase complexes. XVI. Studies on the subunit structure of the pyruvate dehydrogenase complexes from bovine kidney and heart. *Arch. Biochem. Biophys.* 148:343-358
- Bauer CC, Scappino L und Haselkorn R (1993) Growth of the cyanobacterium *Anabaena* on molecular nitrogen: NifJ is required when iron is limited. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8812-8816
- Benchimol M und de Souza W (1983) Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. *J. Protozool.* 30:422-425

- Benchimol M, Johnson PJ und de Souza W (1996) Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study. *Biol. Cell* 87:197-205
- Bertsova YV und Bogachev AV (2002) Operation of the *cbb3*-type terminal oxidase in *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry* 67:622-626
- Biagini GA, Finlay BJ und Lloyd D (1997) The evolution of the hydrogenosome. *FEMS Microbiol. Lett.* 155:133-140
- Birnboim HC und Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1515-1523
- Blackstone NW (1995) A units-of-evolution perspective on the endosymbiont theory of the origin of the mitochondrion. *Evolution* 49:785-796
- Bock AK, Kunow J, Glasemacher J und Schönheit P (1996) Catalytic properties, molecular composition and sequence alignments of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from the methanogenic archaeon *Methanosarcina barkeri* (strain Fusaro). *Eur. J. Biochem.* 237:35-44
- Booker S, Licht S, Broderick J und Stubbe J (1994) Coenzyme B12-dependent ribonucleotide reductase: evidence for the participation of five cysteine residues in ribonucleotide reduction. *Biochemistry* 33:12676-12685
- Boyunaga H, Schmitz MG, Brouwers JF, Van Hellemond JJ und Tielens AG (2001) *Fasciola hepatica* miracidia are dependent on respiration and endogenous glycogen degradation for their energy generation. *Parasitol.* 122:169-173
- Bringaud F, Peris M, Zen KH und Simpson L (1995) Characterisation of two nuclear-encoded protein components of mitochondrial ribonucleoprotein complexes from *Leishmania tarentolae*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 71:65-80
- Buetow DE (1989) The mitochondrion. In: *The Biology of Euglena*, Vol. 4. Subcellular biochemistry and molecular biology (Buetow DE, Hrsg.). Academic Press, San Diego. S. 247-314
- Bui ET, Bradley PJ und Johnson PJ (1996) A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9651-9656
- Buscaglia CA, Pollevick GC, Veloso C, Lorca M, Frasch AC und Sánchez DO (1996) A putative pyruvate dehydrogenase alpha subunit gene from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1309:53-57
- Butterfield NJ, Knoll AH und Swett K (1990) A bangiophyte red alga from the Proterozoic of arctic Canada. *Science* 250:104-107
- Butterfield NJ (2000) *Bangiomorpha pubescens* n. gen., n. sp.: implications for the evolution of sex, multicellularity and the Mesoproterozoic-Neoproterozoic radiation of eukaryotes. *Paleobiology* 26:386-404
- Camp PJ und Randall DD (1985) Purification and characterization of the pea chloroplast pyruvate dehydrogenase complex. A source of acetyl-CoA and NADH for fatty acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 77:571-577
- Carothers DJ, Pons G und Patel MS (1989) Dihydrolipoamide dehydrogenase: functional similarities and divergent evolution of the pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductases. *Arch. Biochem. Biophys.* 268:409-425

- Carre I, Bomsel JL und Calvayrac R (1988) Decay of cytochromes and appearance of a cyanide-insensitive electron transfer pathway in *Euglena gracilis* grown in anoxia. *Plant Sci.* 54:193-202
- Cavalier-Smith T (1987a) Eukaryotes with no mitochondria. *Nature* 326:332-333
- Cavalier-Smith T (1987b) The origin of eukaryote and archaeobacterial cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 503:17-54
- Chabriere E, Volbeda A, Fontecilla-Camps JC, Roth M und Charon MH (1999) Combination of methods used in the structure solution of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from two crystal forms. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 55:1546-1554
- Chabriere E, Vernede X, Guigliarelli B, Charon MH, Hatchikian EC und Fontecilla-Camps JC (2001) Crystal structure of the free radical intermediate of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase. *Science* 294:2559-2563
- Charon MH, Volbeda A, Chabriere E, Pieulle L und Fontecilla-Camps JC (1999) Structure and electron transfer mechanism of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:663-669
- Claros MG und Vincens P (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequence. *Eur. J. Biochem.* 241:770-786
- Claros MG, Brunak S und von Heijne G (1997) Prediction of N-terminal protein sorting signals. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:394-398
- Clayton C, Häusler T und Blattner J (1995) Protein trafficking in kinetoplastid protozoa. *Microbiol. Rev.* 59:325-344
- Clayton CE und Michels P (1996) Metabolic compartmentation in african trypanosomes. *Parasitol. Today* 12:465-471
- Clemens DL und Johnson PJ (2000) Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. *Mol. Biochem. Parasitol.* 106:307-313
- Cui JY, Mukai K, Saeki K und Matsubara H (1994) Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNAs encoding subunits I, II, and IX of *Euglena gracilis* mitochondrial complex III. *J. Biochem.* 115:98-107
- Dardel J, Davis AL, Laue ED und Perham RN (1993) Threedimensional structure of the lipoyl domain from *Bacillus stearothermophilus* pyruvate dehydrogenase complex. *J. Mol. Biol.* 229:1037-1048
- De Duve C (1969) Evolution of the peroxisome. *Ann. NY Acad. Sci.* 168:369-381
- Devereux J, Haerberli P und Smithies O (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 2:387-395
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED und Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6025-6030

- Diaz F und Komuniecki R (1995) Pyruvate dehydrogenase complex from the primitive insect trypanosomatid, *Crithidia fasciculata*: dihydrolipoyl dehydrogenase-binding protein has multiple lipoyl domains. *Mol. Biochem. Parasitol.* 75:87-97
- Doeller JE, Gaschen BK, Parrino VV und Kraus DW (1999) Chemolithoheterotrophy in a metazoan tissue: sulfide supports cellular work in ciliated mussel gills. *J Exp Biol.* 202:1953-61
- Doeller JE, Grieshaber MK und Kraus DW (2001) Chemolithoheterotrophy in a metazoan tissue: thiosulfate production matches ATP demand in ciliated mussel gills. *J. Exp. Biol.* 204:3755-3764
- Doolittle WF (1980) Revolutionary concepts in evolutionary biology. *Trends Biochem. Sci.* 5:146-149
- Doolittle WF (1996) Some aspects of the biology of cells and their possible evolutionary significance. In: *Evolution of Microbial Life*, Roberts D, Sharp P, Alseron G, Collins M (Eds). 54th Symp. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge, Cambridge University Press. S. 1-21.
- Doolittle WF (1998) A paradigm gets shifty. *Nature* 392:15-16
- Doolittle WF (1999) Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* 284:2124-2128
- Dyall SD, Koehler CM, Delgadillo-Correa MG, Bradley PJ, Plumper E, Leuenberger D, Turck CW und Johnson PJ (2000) Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: Conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Mol. Cell Biol.* 20:2488-2497
- Eisen JA (1995) The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNA from the same species. *J. Mol. Evol.* 41:1105-1123
- Eliasson R, Pontis E, Jordan A und Reichard P (1999) Allosteric control of three B12-dependent (class II) ribonucleotide reductases. Implications for the evolution of ribonucleotide reduction. *J. Biol. Chem.* 274:7182-7189
- Elmore CL und Porter TD (2002) Modification of the nucleotide cofactor-binding site of cytochrome P-450 reductase to enhance turnover with NADH *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 277:48960-48964
- Else AJ, Hough DW und Danson MJ (1993) Cloning, sequencing, and expression of *Trypanosoma brucei* dihydrolipoamide dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 212:423-429
- Else AJ, Clarke JF, Willis A, Jackman SA, Hough DW und Danson MJ (1994) Dihydrolipoamide dehydrogenase in the *Trypanosoma* subgenus Trypanozoon. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64:233-239
- Embley TM, Finlay BJ, Dyal PL, Hirt RP, Wilkinson M und Williams AG (1995) Multiple origins of anaerobic ciliates with hydrogenosomes within the radiation of aerobic ciliates. *Proc. R. Soc. Lond. B* 262: 87-93
- Embley TM, Horner DA und Hirt RP (1997) Anaerobic eukaryote evolution: hydrogenosomes as biochemically modified mitochondria? *Trends Ecol. Evol.* 12:437-441
- Embley TM und Hirt RP (1998) Early branching eukaryotes? *Curr. Opin. Genet. Devel.* 8: 655-661

- Embley TM und Martin W (1998) A hydrogen-producing mitochondrion. *Nature* 396: 517-519
- Feinberg AP und Vogelstein B (1984) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochem.* 137:266-267
- Felsenstein J (1980) PHYLIP manual, version 3.3. - Berkeley: University Herbarium
- Fenchel T und Finlay BJ (1995) *Ecology and Evolution in Anoxic Worlds*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo
- Finlay BJ, Span ASW und Harman JMP (1983) Nitrate respiration in primitive eukaryotes. *Nature* 303:333-336
- Germot A, Philippe H und Le Guyader H (1996) Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14614-14617
- Germot A, Philippe H und Le Guyader H (1997) Evidence for loss of mitochondria in microsporidia from a mitochondrial-type Hsp70 in *Nosema locustae*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 87:159-168
- Giambiagi de Marval M, Gottesdiener K, Rondinelli E und Van der Ploeg LHT (1993) Predicted amino acid sequence and genomic organization of *Trypanosoma cruzi* hsp 60 genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58:25-31
- Gleason FK und Hogenkamp HPC (1970) Ribonucleotide reductase from *Euglena gracilis*, a deoxyadenosylcobalamin-dependent enzyme. *J. Biol. Chem.* 245:4894-4899
- Gough J und Murray N (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J. Mol. Biol.* 166:1-19
- Govindaray S und Poulos TL (1997) The domain architecture of cytochrome P450BM-3. *J. Biol. Chem.* 272:7915-7921
- Gray MW (1998) *Rickettsia*, typhus and the mitochondrial connection. *Nature* 396:109-110
- Gray MW (1999) Evolution of organellar genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:678-687
- Gray MW und Doolittle WF (1982) Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbol. Rev.* 46:1-42
- Gray MW, Lang BF, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Brossard M, Delage E, Littlejohn TG, Plante I, Rioux P, Saint-Louis D, Zhu Y und Burger G (1998) Genome structure and gene content in protists mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Res.* 26:865-878
- Gray MW, Burger G und Lang BF (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283:1476-1481
- Green LS, Li Y, Emerich DW, Bergersen FJ und Day DA (2000) Catabolism of alpha-ketoglutarate by a *sucA* mutant of *Bradyrhizobium japonicum*: evidence for an alternative tricarboxylic acid cycle. *J Bacteriol.* 182:2838-2844
- Grieshaber MK und Völkel S (1998) Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annu. Rev. Physiol.* 60:33-53
- Guest JR (1987) Functional implications of structural homologies between chloramphenicol acetyltransferase and dihydrolipoamide acetyltransferase. *FEMS Microbiol. Letters* 44:417-422

- Guest JR, Lewis HM, Graham LD, Packman LC und Perham RN (1985) Genetic reconstruction and functional analysis of the repeating lipoyl domains in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 185:743-754
- Gupta RS (1998) Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1435-1491
- Gupta RS und Golding GB (1996) The origin of the eukaryotic cell. *Trends Biochem. Sci.* 21:166-171
- Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik et al. (1996) Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem.* 240:90-7
- Hackstein JHP, Voncken FGJ, Vogels GD, Rosenberg J und Mackenstedt U (1998) Hydrogenosomes and plastid-like organelles in amoeboflagellates, chytrids, and apicomplexan parasites. In: *Evolutionary Relationships among Protozoa* (Coombes GH, Vickermann K, Sleigh MA and Warren A, Hrsg.). Kluwer, Dordrecht. S. 149-168.
- Hackstein JHP, Akhmanova A, Boxma B, Harhangi HR und Voncken GJ (1999) Hydrogenosomes, eukaryotic adaptations to anaerobic environments. *Trends Microbiol.* 7:441-447
- Hannaert V, Brinkmann H, Nowitzki U, Lee JA, Albert MA, Sensen CW, Gaasterland T, Müller M, Michels P und 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
- Hansen J, Cherest H und Kielland-Brandt MC (1994) Two divergent MET10 genes, one from *Saccharomyces cerevisiae* and one from *Saccharomyces carlsbergensis*, encode the alpha subunit of sulfite reductase and specify potential binding sites for FAD and NADPH. *J. Bacteriol.* 176:6050-6058
- Hansmann S und Martin W (2000) Phylogeny of 33 ribosomal and six other proteins encoded in an ancient gene cluster that is conserved across prokaryotic genomes: influence of excluding poorly alignable sites from analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 4:1655-1663
- Hasegawa M und Kishino H (1994) Accuracies of the simple methods for estimating the bootstrap probability of a maximum likelihood tree. *Mol. Biol. Evol.* 11:142-145
- Häusler T, Stierhof YD, Blattner J und Clayton C (1996) Conservation of mitochondrial targeting sequence function in mitochondrial and hydrogenosomal proteins from the early-branching eukaryotes *Crithidia*, *Trypanosoma* and *Trichomonas*. *Eur. J. Cell Biol.* 73:240-251
- Hawkins CF, Borges A und Perham RN (1989) A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. *FEBS Lett.* 255:77-82
- Hein S und Steinbuchel A (1996) *Alcaligenes eutrophus* possesses a second pyruvate dehydrogenase (E1). *Eur. J. Biochem.* 237:674-684
- Hengeveld AF, Westphal AH und de Kok A (1997) Expression and characterisation of the homodimeric E1 component of the *Azotobacter vinelandii* pyruvate dehydrogenase complex. *Eur. J. Biochem.* 250:260-268

- Henikoff S (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28:351-359
- Henze K, Badr A, Wettern M, Cerff R und Martin W (1995) A nuclear gene of eubacterial origin in *Euglena gracilis* reflects cryptic endosymbioses during protist evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9122-9126
- Henze K, Schnarrenberger C und Martin W (2001) Endosymbiotic gene transfer: a special case of horizontal gene transfer germane to endosymbiosis, the origins of organelles and the origins of eukaryotes. In: *Horizontal Gene Transfer* (Syvanen, M. und Kado C, Hrsg.). Academic Press, London. S. 343-352.
- Hirt RP, Healy B, Vossbrinck CR, Canning EU und Embley TM (1997) A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr. Biol.* 7:995-998
- Hirt RP, Logsdon JM Jr, Healy B, Dorey MW, Doolittle WF und Embley TM (1999) Microsporidia are related to Fungi: Evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:580-585
- Holland HD und Beukes NJ (1990) A palaeoweathering profile from Griqualand West, South Africa: Evidence for a dramatic rise in atmospheric oxygen between 2.2 and 1.9 bybp. *Am. J. Sci.* 290-A:1-34
- Horiike T, Hamada K, Kanaya A und Shinozawa T (2001) Origin of eukaryotic cell nuclei by symbiosis of Archaea in Bacteria is revealed by homology hit analysis. *Nature Cell Biol.* 3:210-214
- Horner DS, Hirt RP, Kilvington S, Lloyd D und Embley TM (1996) Molecular data suggest an early acquisition of the mitochondrial endosymbiont. *Proc. R. Soc. Lond. B* 263:1053-1059
- Horner DS, Hirt RP und Embley TM (1999) A single eubacterial origin of eukaryotic pyruvate:ferredoxin oxidoreductase genes: implications for the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 16:1280-1291
- Horner DS, Foster PD und Embley TM (2000) Iron hydrogenase and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 17:1695-1709
- Hrdy I und Müller M (1995) Primary structure and eubacterial relationship of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *J. Mol. Evol.* 41:388-396
- Humphreys MJ, Ralphs J, Durrant L und Lloyd D (1994) Hydrogenosomes in trichomonads are calcium stores and have a transmembrane electrochemical potential. *Biochem. Soc. Trans.* 22:324
- Inui H, Miyatake K, Nakano Y und Kitaoka S (1982) Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. *FEBS Lett.* 150: 89-93
- Inui H, Miyatake K, Nakano Y und Kitaoka S (1983) Production and composition of wax esters by fermentation of *Euglena gracilis*. *Agric. Biol. Chem.* 47:2669-2671
- Inui H, Miyatake K, Nakano Y und Kitaoka S (1984a) Fatty acid synthesis in mitochondria of *Euglena gracilis*. *Eur. J. Biochem.* 142:121-126

- Inui H, Miyatake K, Nakano Y und Kitaoka S (1984b) Occurrence of oxygen-sensitive, NADP⁺-dependent pyruvate dehydrogenase in mitochondria of *Euglena gracilis*. J. Biochem. 96:931-934
- Inui H, Miyatake K, Nakano Y und Kitaoka S (1985) The physiological role of oxygen-sensitive pyruvate dehydrogenase in mitochondrial fatty acid synthesis in *Euglena gracilis*. Arch. Biochem. Biophys. 237:423-429
- Inui H, Ono K, Miyatake K, Nakano Y und Kitaoka S (1987) Purification and characterization of pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase in *Euglena gracilis*. J. Biol. Chem. 262:9130-9135
- Inui H, Miyatake K, Nakano Y und Kitaoka S (1990) Pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase from *Euglena gracilis*: mechanism of O₂-inactivation of the enzyme and its stability in the aerobe. Arch. Biochem. Biophys. 280:292-298
- Inui H, Yamaji R, Saidoh H, Miyatake K, Nakano Y und Kitaoka S (1991) Pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase from *Euglena gracilis*: Limited proteolysis of the enzyme with trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 286:270-276
- Ish-Horowitz D und Burke JF (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. Nucleic Acids Res. 12:1863
- Javaux EJ, Knoll AH und Walter MR (2001) Morphological and ecological complexity in early eukaryotic ecosystems. Nature 412:66-69
- John P und Whatley FR (1975) *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. Nature 254:495-498
- Johnson KR, Komuniecki R, Sun Y und Wheelock MJ (1992) Characterization of cDNA clones for the alpha subunit of pyruvate dehydrogenase from *Ascaris suum*. Mol. Biochem. Parasitol. 51: 37-48
- Johnson PJ, Lahti CJ und Bradley PJ (1993) Biogenesis of the hydrogenosome in the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. J. Parasitol. 79:664-670
- Jordan A, Pontis E, Aslund F, Hellman U, Gibert I und Reichard P (1996) The ribonucleotide reductase system of *Lactococcus lactis*. Characterization of an NrdEF enzyme and a new electron transport protein. J. Biol. Chem. 271:8779-8785
- Jordan A und Reichard P (1998) Ribonucleotide reductases. Annu. Rev. Biochem. 67:71-98
- Kasting JF (1993) Earth's early atmosphere. Science 259:920-926
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, et al. (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. Nature 414:450-453
- Keeling PW und Doolittle WF (1997) Evidence that eukaryotic triosephosphate isomerase is of alpha-proteobacterial origin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1270-1275
- Keeling PJ und McFadden (1998) Origins of microsporidia. Trends Microbiol. 6:19-23
- Kerscher L und Oesterhelt D (1981) Purification and properties of two 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductases from *Halobacterium halobium*. Eur. J. Biochem. 116:587-594
- Kerscher L und Oesterhelt D (1982) Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase – new findings on an ancient enzyme. Trends Biochem. Sci. 7:371-374

- Kita K (1992) Electron-transfer complexes of mitochondria in *Ascaris suum*. Parasitol. Today 8:155-159
- Kitaoka S, Nakano Y, Miyatake K und Yokota A (1989) Enzymes and their functional location. In: The Biology of *Euglena*, Vol 6, Subcellular Biochemistry and Molecular Biology (Buetow DE, Hrsg.). Acad. Press, San Diego. S. 2-135.
- Kletzin A und Adams MW (1996) Molecular and phylogenetic characterization of pyruvate and 2-ketoisovalerate ferredoxin oxidoreductases from *Pyrococcus furiosus* and pyruvate ferredoxin oxidoreductase from *Thermotoga maritima*. J. Bacteriol. 178:248-257
- Knoll AH (1994) Proterozoic and early cambrian protists: evidence for accelerating evolutionary tempo. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:6743-6750
- Kobayashi M, Matsuo Y, Takimoto A, Suzuki S, Maruo F und Shoun H (1996) Denitrification of a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. J. Biol. Chem. 271:16263-16267
- Komuniecki R und Harris BG (1995) Carbohydrate and energy metabolism in helminths. In: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites (Marr JJ und Müller M, Hrsg.). Academic Press. S. 49-77.
- Lake JA und Rivera MC (1994) Was the nucleus the first endosymbiont? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2880-2881
- Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M und Gray MW (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. Nature 387:493-497
- Lange BM, Rujan T, Martin W und Croteau R (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13172-13177
- Langer D, Hain J, Thuriaux P und Zillig W (1995) Transcription in Archaea: Similarity to that in Eukarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:5768-5772
- Lawson JE, Behal RH und Reed LJ (1991) Disruption and mutagenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* PDX1 gene encoding the protein X component of the pyruvate dehydrogenase complex. Biochemistry. 30:2834-2839
- Lill R und Kispal G (2000) Maturation of cellular Fe/S proteins: An essential function of mitochondria. Trends Biochem. Sci. 25:352-356
- Lindblad A, Jansson J, Brostedt E, Johansson M, Hellman U und Nordlund S (1996) Identification and sequence of a *nifJ*-like gene in *Rhodospirillum rubrum*: partial characterization of a mutant unaffected in nitrogen fixation. Mol. Microbiol. 20:559-568
- Lindmark DG und Müller M (1973) Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate, *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. J. Biol. Chem. 248:7724-7728
- Lloyd D, Harris JC, Maroulis S, Wadley R, Ralphs JR, Hann AC, Turner MP und Edwards MR (2002) The "primitive" microaerophile *Giardia intestinalis* (syn. *lamblia*, *duodenalis*) has specialized membranes with electron transport and membrane-potential-generating functions. Microbiol. 148:1349-1354

- Lockhart PJ, Howe CJ, Barbrook AC, Larkum AWD und Penny D (1999) Spectral analysis, systematic bias and the evolution of chloroplasts *Mol. Biol. Evol.* 16:573-376
- Logan DT, Andersson J, Sjoberg BM und Nordlund P (1999) A glycyl radical site in the crystal structure of a class III ribonucleotide reductase. *Science* 283:1499-1504
- Lohrer H und Krauth-Siegel RL (1990) Purification and characterization of lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 194:863-869
- Ludwig W, Neumaier J, Klugbauer N, et al. (1993) Phylogenetic relationship of bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthase beta-subunit genes. *Antonie Van Lueewenhoek* 64:285-305
- Luethy MH, Miernyk JA, David NR und Randall DD (1996) Plant pyruvate dehydrogenase complexes. In: *Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes* (Patel MS, Roche TE, Harris RA, Hrsg.). Basel, Birkhäuser. S. 71-92.
- Ma K, Hutchins A, Sung S-J S und Adams MWW (1997) Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*, functions as a CoA-dependent pyruvate decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9608-9613
- Mai Z, Ghosh S, Frisardi M, Rosenthal B, Rogers R und Samuelson J (1999) Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ('crypton') in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell Biol.* 19:2198-2205
- Majeau N und Coleman JR (1994) Correlation of Carbonic Anhydrase and Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase expression in pea. *Plant Physiol.* 104:1393-1399
- Margulis L (1970) *Origin of eukaryotic cells*. New Haven: Yale University Press
- Martin W (1998) Endosymbiosis and the origins of chloroplast-cytosol isoenzymes: a revision of the gene transfer corollary. In: *Horizontal Gene Transfer: Implications and Consequences* (Syvanen M und Kado C, Hrsg.). Chapman and Hall, London. S. 363-379.
- Martin W (1999a) A briefly argued case that mitochondria and plastids are descendants of endosymbionts, but that the nuclear compartment is not. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266:1387-1395
- Martin W (1999b) Mosaic bacterial chromosomes: a challenge en route to a tree of genomes. *BioEssays* 21:99-104
- Martin W und Cerff R (1986) Prokaryotic features of a nucleus-encoded enzyme. cDNA sequences for chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from mustard (*Sinapis alba*). *Eur. J. Biochem.* 159:323-331
- Martin W und Schnarrenberger C (1997) The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Curr. Genet.* 32:1-18
- Martin W und Müller M (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392:37-41
- Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hansmann S, Hasegawa M und Kowallik KV (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393:162-165

- Martin W, Hoffmeister M, Rotte C und Henze K. (2001) An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biol. Chem.* 382:1521-1539
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M und Penny D (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:12246-12251
- Menon S und Ragsdale SW (1996) Unleashing hydrogenase activity in carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase. *Biochemistry.* 35:15814-15821
- Mittenhuber G (2001) Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B6 (pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3:1-20
- Montandon PE und Stutz E (1990) Structure and expression of the *Euglena gracilis* nuclear gene coding for the translation elongation factor EF-1 alpha. *Nucleic Acids Res.* 18: 75-82
- Mooney BP, Miernyk JA und Randall DD (1999) Cloning and characterization of the dihydro-lipoamide S-acetyltransferase subunit of the plastid pyruvate dehydrogenase complex (E2) from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 120:443-451
- Mooney BP, Miernyk JA und Randall DD (2002) The complex fate of α -ketoacids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:357-375
- Moreira D und López-García (1998) Symbiosis between methanogenic archaea and δ -proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophy hypothesis. *J. Mol. Evol.* 47:517-530
- Mukai K, Wakabayashi S und Matsubara H (1989) Molecular cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding *Euglena gracilis* cytochrome c1. *J. Biochem.* 106:479-482
- Müller M (1988) Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Ann. Rev. Microbiol.* 42:465-488
- Müller M (1993) The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* 139:2879-2889
- Müller M (1996) Energy metabolism of amitochondriate protists, an evolutionary puzzle. In: Christian Gottfried Ehrenberg-Festschrift anlässlich der 14. Wissenschaftlichen Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie, 9.-11. März 1995 in Delitzsch (Sachsen) (Schlegel M und Hausmann K, Hrsg.). Leipziger Universitätsverlag, Leipzig. S. 63-76.
- Müller M (1998) Enzymes and compartmentation of core energy metabolism of anaerobic protists – a special case in eukaryotic evolution? In: *Evolutionary Relationships among Protozoa* (Coombs GH, Vickermann K, Sleigh MA und Warren A, Hrsg.). Chapman and Hall, London. S. 109-132.
- Murray N (1983) Phage Lambda and molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Nagai J, Ohta T und Saito E (1971) Incorporation of propionate into waxesters by etiolated *Euglena*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42:523-529

- Nakazawa N, Inui H, Yamaji R, Yamamoto T, Takenaka S und Miyatake K (2000) The origin of pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase in mitochondria of *Euglena gracilis*. FEBS Lett. 479:155-156
- Nowitzki U, Flechner A, Kellermann J, Hasegawa M, Schnarrenberger und Martin W (1998) Eubacterial origin of nuclear genes for chloroplast and cytosolic glucose-6-phosphate isomerase from spinach: sampling eubacterial gene diversity in eukaryotic chromosomes through symbiosis. Gene 214:205-213
- Nowitzki U (2001) Studien zum Gentransfer aus Organellen nach Endosymbiose anhand der Chloroplast-Cytosol Isoenzyme von Glucose-6-phosphat Isomerase aus *Spinacia oleracea* und der 3-Phosphoglycerat Kinase aus *Euglena gracilis*. Dissertation, Institut für Genetik, Technische Universität Braunschweig
- Ochman H, Lawrence JG und Groisman ES (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature 405:299-304
- Oliver RM und Reed LJ (1983) Multienzyme complexes. In: Electron Microscopy of Proteins (Harris R, Hrsg.), vol. II. London/New York (Academic Press). S. 1-48.
- Olsen GJ, Woese CR und Overbeek R (1994) The winds of (evolutionary) change: breathing life into microbiology. J. Bacteriol. 176:1-6
- Patel MS und Roche TE (1990) Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. FASEB J. 4:3224-3233
- Peyretailade E, Broussolle V, Peyret P, Metenier G, Gouy M und Vivares M (1998) Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin. Mol. Biol. Evol. 15:683-689
- Philippe H und Laurent J (1998) How good are deep phylogenetic trees? Curr. Opin. Genet. Dev. 8:616-623
- Pieulle L, Magro V und Hatchikian EC (1997) Isolation and analysis of the gene encoding the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase of *Desulfovibrio africanus*, production of the recombinant enzyme in *Escherichia coli*, and effect of carboxy-terminal deletions on its stability. J. Bacteriol. 179:5684-5692
- Pieulle L, Chabriere E, Hatchikian C, Fontecilla-Camps JC und Charon MH (1999) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from *Desulfovibrio africanus*. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 55:329-331
- Pons G, Raefsky-Estrin C, Carothers DJ, Pepin RA, Javed AA, Jesse BW, Ganapathi MK, Samols D und Patel MS (1988) Cloning and cDNA sequence of the dihydrolipoamide dehydrogenase component human alpha-ketoacid dehydrogenase complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:1422-1426
- Pönsgen-Schmidt E, Schneider T, Hammer U und Betz A (1988) Comparison of phosphoenolpyruvate-carboxykinase from autotrophically and heterotrophically grown *Euglena* and its role during dark anaerobiosis. Plant Physiol. 86:457-462
- Porter TD und Kasper CB (1986) NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase: flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. Biochemistry 25:1682-1687
- Portier P (1918) In: Evolution by association, (Jan Sapp, Hrsg.) Oxford University Press

- Raeburn S und Rabinowitz JC (1971) Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase II. Characteristics of the forward and reverse reactions and properties of the enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 146:21-33
- Raven P (1970) A multiple origin for plastids and mitochondria. Science 169:641-646
- Reed LJ (1974) Multienzyme complexes. Acc. Chem. Res. 7:40-46
- Reed LJ und Hackert ML (1990) Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. J. Biol. Chem. 265:8971-8974
- Reichard P (1993) From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? Science 260:1773-1777
- Reichard P (1997) The evolution of ribonucleotide reduction. Trends Biochem. Sci. 22:81-85
- Reith M und Munholland J (1995) Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. Plant Mol. Biol. Repr. 13:333-335
- Renwick A, Davison L, Spratt H, King JP und Kimmel M (2001) DNA dinucleotide evolution in humans: fitting theory to facts. Genetics 159:737-747
- Rice DW, Schulz GE und Guest JR (1984) Structural relationship between glutathione reductase and lipoamide dehydrogenase. J. Mol. Biol. 174:483-496
- Rivera MC, Jain R, Moore JE und Lake JA (1998) Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6239-6244
- Roger AJ (1999) Reconstructing early events in eukaryotic evolution, Am. Nat. 154:S146-S163
- Roger AJ, Clark CG und Doolittle WF (1996) A possible mitochondrial gene in the early-branching protist *Trichomonas vaginalis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14618-14628
- Roger AJ, Svärd SG, Tovar J, Clark CG, Smith MW, Gillin FD und Sogin ML (1998) A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: Evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:229-234
- Rosenthal B, Zhiming M, Caplivski D, Ghosh S, de la Vega H, Graf T und Samuelson J (1997) Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the amitochondriate protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. J. Bacteriol. 179:3736-3745
- Rossmann MG, Liljas A, Bränden CI und Banaszak LJ (1975) In: The Enzymes (Boyer PD, Hrsg.) vol. 11, 3rd edit. Academic Press, New York. S. 61-102.
- Rotte C, Henze K, Müller M und Martin W (2000) Origins of hydrogenosomes and mitochondria. Curr. Opin. Microbiol. 3:482-486
- Rotte C und Martin W (2001) Does endosymbiosis explain the origin of the nucleus? Nature Cell Biol. 3:E173-E174
- Rotte C, Stejskal F, Zhu G, Keithly JS und 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
- Rujan T und Martin W (2001) How many genes in *Arabidopsis* come from cyanobacteria? An estimate from 386 protein phylogenies. Trends Genet. 17:113-120

- Russel GC und Guest JR (1991) Sequence similarity within the family of dihydrolipoamide acetyltransferases and discovery of a previously unidentified fungal enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1076:225-232
- Sagan L (1976) On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* 14:225-274
- Saitou N and Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sánchez LB, Morrison HG, Sogin ML und Müller M (1999) Cloning and sequencing of an acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) gene from the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *Gene* 233:225-231
- Sánchez LB, Galperin MY und Müller M (2000) Acetyl-CoA synthetase from the amitochondriate eukaryote *Giardia lamblia* belongs to the newly recognized superfamily of acyl-CoA synthetases (nucleoside diphosphate-forming). *J. Biol. Chem.* 275:5794-5803
- Sanger J, Nicklen S und Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467
- Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283:1488-1493
- Schantz ML und Schantz R (1989) Sequence of a cDNA clone encoding beta tubulin from *Euglena gracilis*. *Nucleic Acids Res.* 17:6727
- Schatz G (1987) Signals guiding proteins to their correct locations in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 165:1-6
- Schlösser UG (1997) SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen. Catalogue of strains. *Botanica Acta* 107:113-186
- Scharrenberger C und Martin W (2002) Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants. A case study of endosymbiotic gene transfer. *Eur. J. Biochem.* 269:1-16
- Schneider T und Betz A (1985) Waxmonoester fermentation in *Euglena gracilis* T. Factors favouring the synthesis of odd-numbered fatty acids and alcohols. *Planta* 166:67-73
- Schöneck R, Billaut-Mulot O, Numrich P, Ouaisi MA und Krauth-Siegel RL (1997) Cloning, sequencing and functional expression of dihydrolipoamide dehydrogenase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 243:739-747
- Schwarz-Sommer Z, Sheperd N, Tacke E, Gierl A, Rhode W, Leclerc L, Mattes M, Berndtgen R, Petersen PA und Saedler H (1987) Influence of transposable elements on the structure and function of the A1 gene of *Zea mays*. *EMBO J.* 6:287-297
- Seeber F (2002) Biogenesis of iron-sulphur clusters in amitochondriate and apicomplexan protists. *Int. J. Parasitol.* 32:1207-1217
- Sharif AL, Smith AG und Abell C (1989) Isolation and characterisation of a cDNA clone for a chlorophyll synthesis enzyme from *Euglena gracilis*. The chloroplast enzyme hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase) is synthesised with a very long transit peptide in *Euglena*. *Eur. J. Biochem.* 184:353-359

- Shigeoka S, Nakano Y und Kitaoka S (1980) Metabolism of hydrogen peroxide in *Euglena gracilis* Z by L-ascorbic acid peroxidase. *Biochem. J.* 186: 377-380
- Short JM, Fernandez JM, Sorge JA und Huse WD (1988) Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16:7583-7600
- Stanier Y (1970) Some aspects of the biology of cells and their evolutionary significance. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 20:1-38
- Steibl HD, Siddavattam D und Klingmuller W (1995) Self-transmissible *nif* plasmid (pEA9) of *Enterobacter agglomerans* 339: molecular cloning and evidence for the existence of similar *nif* clusters on dissimilar plasmids in *Enterobacter* strains. *Plasmid* 34:223-228
- Steinbüchel A und Müller M (1986) Anaerobic pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20:57-60
- Strimmer K und von Haeseler A (1997) Likelihood-mapping: A simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6815-6819
- Sugden PH, Kerbey AL, Randle PJ, Waller CA und Reid KB (1979) Amino acid sequences around the sites of phosphorylation in the pig heart pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. J.* 181:419-426
- Takaya N, Suzuki S, Kuwazaki S, Shoun H, Maruo F, Yamaguchi M und Takeo K (1999) Cytochrome p450_{nor}, a novel class of mitochondrial cytochrome P450 involved in nitrate respiration in the fungus *Fusarium oxysporum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 372:340-346
- Takenaka A, Kizawa K, Hata T, Sato S, Misaka E, Tamura C und Sasada Y (1988) X-ray study of baker's yeast lipoamide dehydrogenase at 4.5 Å resolution by molecular replacement method. *J. Biochem.* 103:463-469
- Tessier LH, Keller M, Chan RL, Fournier R, Weil JH und Imbault P (1991) Short leader sequences may be transferred from small RNAs to premature mRNAs by trans-splicing in *Euglena*. *EMBO J.* 10:2621-2625
- Thompson JD, Higgins DG und Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22:4673-4680
- Tielens AGM (1994) Energy generation in parasitic helminths. *Parasitol. Today* 10:346-352
- Tielens AGM und Van Hellemond J (1998) The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 1365:71-78
- Tielens AGM, Rotte C, Van Hellemond J und Martin W (2002) Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.* 27:545-592
- Torrents E, Aloy P, Gilbert I und Rodriguez-Trelles F (2002) Ribonucleotide reductases: divergent evolution of an ancient enzyme. *J. Mol. Evol.* 55:138-152
- Torri AF und Englund PT (1995) A DNA polymerase beta in the mitochondrion of the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *J. Biol. Chem.* 270:3495-3497

- Tovar J, Fischer A und Clark CG (1999) The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* 32:1013-1021
- Townson SM, Hanson GR, Upcroft JA und Upcroft P (1994) A purified ferredoxin from *Giardia duodenalis*. *Eur. J. Biochem.* 220:439-446
- Tye BK (2000) Insights into DNA replication from the third domain of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:2399-2401
- Unseld M, Marienfeld JR, Brandt P und Brennicke A (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366924 nucleotides. *Nature Genetics* 15:57-61
- Van de Peer Y, Neefs JM, de Rijk P, de Vos P und de Wachter R (1994) About the order of divergence of the major bacterial taxa during evolution. *Syst. Appl. Bacteriol.* 17:32-38
- Van der Giezen M, Rechinger KB, Svendsen I, Durand R, Hirt RP, Fevre M, Embley TM und Prins RA (1997) A mitochondrial-like targeting signal on the hydrogenosomal malic enzyme from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: Support for the hypothesis that hydrogenosomes are modified mitochondria. *Mol. Microbiol.* 23:11-21
- Van der Giezen M, Slotboom DJ, Horner DS, Dyal PL, Harding M, Xue GP, Embley TM und Kunji ER (2002) Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: a common origin for both organelles. *EMBO J.* 21:572-579
- Van Hellemond JJ, Opperdoes FR und Tielens AGM (1998) Trypanosomatidae produce acetate via a mitochondrial acetate:succinate CoA transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3036-3041
- Van Hoek AH, Akhmanova AS, Huynen MA und Hackstein JH (2000) A mitochondrial ancestry of the hydrogenosomes of *Nyctotherus ovalis*. *Mol. Biol. Evol.* 17:202-206
- Vanlerberghe GC und McIntosh L (1997) Alternative oxidase: From gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:703-734
- Vellai T, Takács K und Vida G (1998) A new aspect on the origin and evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 46:499-507
- Viale AM, Arakaki AK, Soncini FC und Ferreyra RG (1994) Evolutionary relationship among eubacterial groups as inferred from *GroEL* (Chaperonin) sequence comparisons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:527-533
- Vickermann K (1990) Phylum Zoomastigina class Kinetoplastida. In: *Handbook of protozoa* (Margulis L, Corliss JO, Melkonian M, Chapman DJ, Hrsg.), Jones and Bartlett, Boston. S. 215-238.
- Völkel S und Grieshaber MK (1996) Mitochondrial sulfide oxidation in *Arenicola marina*. Evidence for alternative electron pathways. *Eur. J. Biochem.* 235:231-237
- von Heijne G (1986a) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690
- von Heijne G (1986b) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* 5:1335-1342

- Voncken F, Boxma B, Tjaden J, Akhmanova A, Huynen M, Verbeek F, Tielens AG, Haferkamp I, Neuhaus HE, Vogels G, Veenhuis M und Hackstein JH (2002) Multiple origins of hydrogenosomes: functional and phylogenetic evidence from the ADP/ATP carrier of the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. *Mol. Microbiol.* 44:1441-1454
- Vossbrinck CR, Maddox JV, Friedman S, Debrunner-Vossbrinck BA und Woese CR (1987) Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 326:411-416
- Wahl RC und Orme-Johnson WH (1987) Clostridial pyruvate oxidoreductase and the pyruvate-oxidizing enzyme specific to nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* are similar enzymes. *J. Biol. Chem.* 262:10489-10496
- Wallins IE (1927) *Symbiogenesis and the Origin of species*, Bailliere, Tindall und Cox, London
- Wang M, Roberts DL, Paschke R, Shea TM, Masters BSS und Kim JP (1997) Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 4:8411-8416
- Watanabe F, Oki Y, Nakano Y und Kitaoka S (1987) Purification and characterization of aquacobalamin reductase (NADPH) from *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.* 262:11514-11518
- Watanabe F, Yamaji R, Isegawa Y, Yamamoto T, Tamura Y und Nakano Y (1993) Characterization of aquacobalamin reductase (NADPH) from *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 305:421-427
- Wexler ID, Hemalatha SG und Patel MS (1991) Sequence conservation in the α - and β subunits of pyruvate dehydrogenase and its similarity to branched-chain α -keto acid dehydrogenase. *FEBS Lett.* 282:209-213
- Whatley JM, John P und Whatley FR (1979) From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 204:165-187
- Williams CH (1976) In: *The Enzymes* (Boyer PD, Hrsg.), vol. 13. Academic Press, New York. S. 89-173.
- Williams BA, Hirt RP, Lucocq JM und Embley TM (2002) A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* 418:865-869
- Wilson EB (1928) *The cell in development and heredity*. Garland Publishing, Inc. New York, London. S. 788
- Xu C und Ray DS (1993) Isolation of proteins associated with kinetoplast DNA networks *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1786-1789
- Yakunin AF und Hallenbeck PC (1998) Purification and characterization of pyruvate oxidoreductase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1409:39-49
- Yasuhira S und Simpson L (1997) Phylogenetic affinity of mitochondria of *Euglena gracilis* and kinetoplastids using cytochrome oxidase I and hsp 60. *J. Mol. Evol.* 44: 341-347
- Yeaman SJ, Hutcheson ET, Roche TE, Pettit FH, Brown JR, Reed LJ, Watson DC und Dixon GH (1978) Sites of phosphorylation on pyruvate dehydrogenase from bovine kidney and heart. *Biochemistry* 17:2364-2370

- Yokota A, Keisuke H und Kitaoka S (1982) Mechanism of metabolic regulation in photoassimilation of propionate in *Euglena gracilis* Z. Arch. Biochem. Biophys 213:530-537
- Yoon KS, Hille R, Hemann C und Tabita FR (1999) Rubredoxin from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* functions as an electron acceptor for pyruvate ferredoxin oxidoreductase. J. Biol. Chem. 274:29772-29778
- Zillig W, Klenk HP, Palm P, Leffers H, Pühler G, Gropp F und Garrett RA (1989) Did eukaryotes originate by a fusion event? Endocyt. Cell Res. 6:1-25
- Zufferey R, Arslan A, Thöny-Meyer L und Hennecke H (1998) How replacement of the 12 conserved histidines of subunit I affect assembly, cofactor binding, and enzymatic activity of the *Bradyrhizobium japonicum* *cbb3*-type oxidase. J. Biol. Chem. 273:6452-6459
- Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61:533-616

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und diese in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch keiner anderen Institution eingereicht habe.

Carmen Rotte

Düsseldorf, den 10. April 2003