

**Anaerober Energiestoffwechsel und Fettsäurebiosynthese
im fakultativ anaeroben Mitochondrium
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
Meike Hoffmeister
aus Oldenburg

Düsseldorf
2004

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

Referent: Prof. Dr. William Martin
Korreferent: Prof. Dr. Manfred Grieshaber
Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2004

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

Publikationen

Hoffmeister M, van der Klei A, Rotte C, van Grinsven KWA, van Hellemond JJ, Henze K, Tielens AGM, Martin W. (2004) *Euglena gracilis* rhodoquinone:ubiquinone ratio and mitochondrial proteome differ under aerobic and anaerobic conditions. J. Biol. Chem. 279: 22422-22429.

Hoffmeister M, Martin W. (2003) Interspecific evolution: microbial symbiosis, endosymbiosis and gene transfer. Environ. Microbiol. 5: 641-649

Theissen U, Hoffmeister M, Grieshaber M, Martin W. (2003) Single eubacterial origin of eukaryotic sulfide:quinone oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times. Mol. Biol. Evol. 20: 1564-1574.

Martin W, Rotte C, Hoffmeister M, Theissen U, Gelius-Dietrich G, Ahr S, Henze K. (2003) Early cell evolution, eukaryotes, anoxia, sulfide, oxygen, fungi first (?), and a tree of genomes revisited. IUBMB Life 55: 193-204

Martin W, Hoffmeister M, Rotte C, 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.

Tagungsbeiträge

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

Hoffmeister M, Martin W. ATP-synthesis of facultatively anaerobic mitochondria of *Euglena gracilis*: A comparison of aerobic and anaerobic mitochondrial proteoms. Botanikertagung, Freiburg 2002.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Das Mitochondrium von <i>Euglena gracilis</i>	1
1.2	Generelle Bedeutung von Fettsäuren	2
1.3	Prinzipien der Fettsäuresynthese am Beispiel von Pflanzen	3
1.4	Abbau von Fettsäuren	7
1.5	Fettsäuresynthese Systeme bei <i>Euglena gracilis</i>	10
1.6	Energiestoffwechsel im Mitochondrium von <i>Euglena gracilis</i>	13
1.7	Zielsetzung der Arbeit	16
2.	Material und Methoden	18
2.1	Chemikalien	18
2.2	Reagenssätze	18
2.3	Chromatographie-Material	18
2.4	Enzyme	19
2.5	<i>Euglena</i> Stamm	19
2.6	Bakterienstämme	19
2.7	Vektoren	19
2.8	Primer	19
2.9	Arbeiten mit <i>Euglena</i>	20
2.9.1.	Anzucht von <i>Euglena</i>	20
2.9.2.	Isolation von Mitochondrien	21
2.9.3.	Zellaufschluss für die Reinigung der <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase	22
2.9.4.	Fluoreszenzmarkierung von <i>Euglena</i> Mitochondrien	23
2.10.	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	23
2.10.1.	Expressionskulturen	23
2.10.2.	Aufschluss von Expressionskulturen	24
2.11.	Arbeiten mit Proteinen	24
2.11.1.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	24
2.11.2.	SDS-PAGE	24
2.11.3.	2D-PAGE	25
2.11.4.	Präparative PAGE	25
2.11.5.	Färbung von Proteingelen	25
2.11.6.	Western Blot	26
2.11.7.	Immunodetektion	26

2.11.8.	Im-Gel Proteolyse _____	27
2.11.9.	Proteinsequenzierung _____	28
2.11.10.	Entsalzen, Umpuffern und Konzentrieren von Proteinproben _____	28
2.11.11.	Bestimmung von Markerenzym Aktivitäten _____	28
2.11.12.	Enzymatischer Test zur Bestimmung der TER-Aktivität _____	29
2.11.13.	Säulenchromatographie _____	29
2.11.14.	Reinigung der <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase _____	29
2.11.14.1.	Ammoniumsulfatfällung _____	30
2.11.14.2.	Chromatographie über DEAE-Fraktogel _____	30
2.11.14.3.	Chromatographie über Phenyl Sepharose _____	30
2.11.14.4.	Chromatographie über Reaktive Red _____	31
2.11.14.5.	Chromatographie über Hydroxyapatit _____	31
2.11.14.6.	Chromatographie über Mono Q _____	31
2.11.14.7.	Präparative PAGE mit der Mini Prep Cell _____	32
2.11.14.8.	Chromatographie über Superdex 200 _____	32
2.11.15.	Aufreinigung rekombinanter Proteine _____	32
2.12.	Arbeiten mit Nukleinsäuren _____	33
2.12.1.	Ansatz und Reaktionsbedingungen zur Durchführung der PCR _____	34
2.12.2.	Klonierung von PCR-Fragmenten _____	34
2.12.3.	Isolierung von Poly(A)+ RNA aus <i>Euglena gracilis</i> _____	34
2.12.4.	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Euglena gracilis</i> _____	35
2.12.5.	Herstellung von cDNA Banken aus <i>Euglena gracilis</i> _____	36
2.12.6.	Identifizierung rekombinanter Klone _____	36
2.12.7.	Southern-Analyse _____	37
2.12.8.	Northern Analyse _____	37
2.12.9.	Herstellung von Exonuklease III-Deletionsmutanten _____	38
2.12.10.	Sequenzierung nach Sanger _____	39
2.13.	Bioinformatische Methoden _____	40
2.13.1.	Sequenzanalyse _____	40
2.13.2.	Datenbankvergleiche _____	40
2.13.3.	Voraussagen über mögliche Transitpeptide _____	40
3.	Ergebnisse _____	41
3.1.	Biochemische Charakterisierung des fakultativ anaeroben Mitochondriums von <i>Euglena gracilis</i> _____	41

3.2.	Reinigung der <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase aus <i>Euglena</i> _____	46
3.3.	Sequenzierung der <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase _____	53
3.4.	PCR-Amplifikation und Subklonierung einer TER-spezifischen DNA-Sonde _	55
3.5.	Isolierung der cDNA für die <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase aus einer <i>Euglena</i> cDNA Bank _____	57
3.6.	Sequenzierung und Charakterisierung der TER cDNA _____	58
3.7.	Genomische Southern-Hybridisierung der <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase aus <i>Euglena</i> _____	65
3.8.	Northern-Hybridisierung der <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase aus <i>Euglena</i> ____	65
3.9.	Heterologe Überexpression der <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase aus <i>Euglena</i> in <i>E. coli</i> _____	66
4.	Diskussion _____	70
4.1.	Proteomanalysen des fakultativ anaeroben Mitochondriums von <i>Euglena gracilis</i> _____	70
4.2.	Nachweis der <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase Aktivität in Mitochondrien von <i>Euglena</i> _____	74
4.3.	Reinigung, Klonierung und Überexpression der <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase _____	75
4.4.	Sequenzhomologien der <i>Euglena</i> TER _____	78
4.5.	<i>Euglena</i> TER im Vergleich zu anderen Enoyl-Thioester Reduktasen _____	81
4.6.	<i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase und die Wachsesterfermentation in <i>Euglena</i> __	85
4.7.	Ausblick _____	88
5.	Zusammenfassung _____	90
6.	Literatur _____	92

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Lichtmikroskopische Aufnahme von <i>Euglena gracilis</i> (A) und Fluoreszenzaufnahme von <i>Euglena gracilis</i> nach Anfärbung mit dem Farbstoff MitoTracker Green FM (B)	1
Abb. 1-2 Schematische Struktur der Fettsäuren Palmitinsäure (C16) und Ölsäure (C18:1).	3
Abb. 1-3 Reaktionsfolge zur Synthese von Fettsäuren.	5
Abb. 1-4 Stoffwechselweg und Enzyme der mitochondrialen und peroxisomalen β - Oxidation von Fettsäuren.	9
Abb. 1-5 Schematische Darstellung des aeroben (A) und anaeroben (B) Energistoffwechsels im Mitochondrium von <i>Euglena gracilis</i> .	14
Abb. 1-6 Reaktionsschritte des Methylmalonyl-CoA Wegs zur Synthese von Propionyl- CoA als Primer zur Synthese von ungeradzahligen Fettsäuren.	16
Abb. 2-1 Reaktionsschema zum enzymatischen Nachweis der <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase Aktivität.	29
Abb. 3-1 Diskontinuierlicher Percoll-Gradient von 50 %, 30 %, 20 % und 10 % Percoll.	41
Abb. 3-2 Silber-gefärbte 2D-Gele beladen mit je 800 μ g isolierten Mitochondrien aus aerob (A) und anaerob (B) angezogenen <i>Euglena gracilis</i> Kulturen.	43
Abb. 3-3 Elutionsprofil der 2,6 x 12 cm DEAE-Fraktogel Säule.	49
Abb. 3-4 Elutionsprofil der 2,6 x 14 cm Phenyl Sepharose Säule.	49
Abb. 3-5 Elutionsprofil der 1,6 x 9 cm Reaktive Red-Säule.	50
Abb. 3-6 Elutionsprofil der Hydroxyapatit Säule (Eco-Pac CHT II Cartridge).	50
Abb. 3-7 Elutionsprofil der Mono Q HR 5/5 Säule.	51
Abb. 3-8 12 % SDS-PAGE der Fraktionen mit TER-Aktivität nach präparativer PAGE mit der Mini Prep Cell.	51
Abb. 3-9 Elutionsprofil der Superdex 200 HR 10/30 Säule.	52
Abb. 3-10 12% SDS-PAGE verschiedener Reinigungsstufen der <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase aus <i>Euglena</i> .	53
Abb. 3-11 12 % SDS-PAGE der Fraktionen mit TER-Aktivität nach Superdex 200.	54
Abb. 3-12 Mittels PCR amplifiziertes TER-Fragment.	56
Abb. 3-13 Sequenz des mittels PCR amplifizierten TER-Fragments.	57

Abb. 3-14 Sequenz der cDNA für die <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase aus <i>Euglena gracilis</i> (pTER1.4). _____	59
Abb. 3-15 Aminosäuresequenz-Alignment von bakteriellen konservierten hypothetischen Proteinen und der <i>Euglena trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase. _____	61
Abb. 3-16 Genomische Southern-Hybridisierung der TER. _____	65
Abb. 3-17 Northern-Hybridisierung von <i>Euglena gracilis</i> Poly(A)+ RNA. _____	66
Abb. 3-18 12 % SDS-PAGE verschiedener Fraktionen des Konstrukts pET28- <i>ter2</i> exprimiert in BL21(DE3) nach Ni-NTA Aufreinigung. _____	68
Abb. 3-19 Western Blot mit Immunodetektion des His-Tags des TER2-Konstrukts in pET28 mit BL21(DE3) als Expressionsstamm. _____	68
Abb. 3-20 Western Blot mit Immunodetektion des His-Tags des TER1-Konstrukts in pET32 mit Rosetta(DE3) als Expressionsstamm. _____	69
Abb. 4-1 Möglicher Reaktionsmechanismus von Proteinen der SDR-Familie unter Beteiligung der konservierten Lysin- und Tyrosin-Reste. _____	81
Abb. 4-2 Erster Reaktionsschritt der β -Oxidation und letzter Reaktionsschritt bei Umkehr der β -Oxidation zur Synthese von Fettsäuren. _____	83
Abb. 4-3 Stoffwechselweg und Enzyme der mitochondrialen Fettsäuresynthese von <i>Euglena gracilis</i> . _____	87

Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1 Markerenzym Aktivitäten vom Rohextrakt und Mitochondrienfraktion von <i>Euglena</i> Zellen angezogen unter aeroben und anaeroben Kulturbedingungen. _____	42
Tab. 3-2 Mittels ESI-Q-TOF-MS/MS ermittelte Peptidsequenzen aerob induzierter mitochondrialer Proteine aus <i>Euglena</i> . _____	43
Tab. 3-3 Über BLASTp-Suche in GenBank identifizierte Funktionen von Peptidsequenzen von aerob induzierten mitochondrialen Proteinen aus <i>Euglena</i> . _____	45
Tab. 3-4 Über BLASTx-Suche in GenBank identifizierte Funktionen von EST-Klonen, die den Peptidsequenzen von aerob induzierten mitochondrialen Proteinen aus <i>Euglena</i> zugeordnet wurden. _____	45
Tab. 3-5 Spezifische Aktivitäten der <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase der Mitochondrienfraktionen aus aerob und anaerob angezogenen <i>Euglena</i> Zellen. _____	46
Tab. 3-6 Spezifische Aktivitäten der <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase der Banden des diskontinuierlichen Percoll-Gradienten von anaerob angezogenen <i>Euglena</i> Zellen. _____	46
Tab. 3-7 Reinigung der <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase aus 1 kg <i>Euglena gracilis</i> Zellen. _____	52

Abkürzungsverzeichnis

A (Aminosäure)	Alanin
A	Adenin
ACCCase	Acetyl-CoA Carboxylase
ACP	Acyl-Carrier-Protein
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
B	Asparagin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C (Aminosäure)	Cystein
C	Cytosin
CCR	Crotonyl-CoA Reduktase
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
CoA	Coenzym A
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromid
D	Asparaginsäure
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Cyanphosphonsäure-diethylester
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI-Q-TOF	Elektrospray-Ionisation-Quadrupol Time-of-flight
ETF	Elektronen-transportierendes Flavoprotein
ETR	Enoyl-Thioester Reduktasen
F	Phenylalanin
FAD	Flavinadeninukleotid (oxidierte Form)
FADH	Flavinadeninukleotid (reduzierte Form)
FAS	Fettsäure-Synthetase

Abkürzungsverzeichnis

FPLC	Fast-Protein-Liquid-Chromatographie
G (Aminosäure)	Glycin
G	Guanin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
Gly	Glycin
H	Histidin
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
I	Isoleucin
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropylthiogalactosid
K	Lysin
KAS	Ketoacyl-ACP Synthase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KGC	α -Ketoglutarat Decarboxylase
L	Leucin
lx	Lux
Lys	Lysin
M (Aminosäure)	Methionin
M	molar
MECR	2-Methyl verzweigte-Ketten Enoyl-CoA Reduktase
min	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N	Asparagin
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
Ni-NTA	Nickel Nitrilotriessigsäure

P	Prolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDH	Pyruvat Dehydrogenase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPCK	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
PNO	Pyruvat:NADP ⁺ Oxidoreduktase
psi	Druck pro Quadratzoll
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Q	Glutamin
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RQ	Rhodoquinon
S	Serin
s	Sekunde
SDR	kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Spliced Leader
SSDH	Succinat-Semialdehyd Dehydrogenase
T (Aminosäure)	Threonin
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TER	<i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
V	Valin
v/v	Volumen pro Volumen
W	Tryptophan
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indol- β -D-Galactopyranosid
Y	Thyrosin

1. Einleitung

1.1. Das Mitochondrium von *Euglena gracilis*

Euglena gracilis besitzt ein einzelnes Mitochondrium, das als Retikulum die gesamte Zelle durchzieht, wobei die Struktur des Retikulums in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen variiert (Buetow 1989). Das mitochondriale Retikulum von *Euglena* ist mit Hilfe des Farbstoffs MitoTracker Green FM, der spezifisch in aktiven Mitochondrien akkumuliert, in Abb. 1-1 visualisiert. Der Farbstoff fluoresziert bei einer Anregung von 490 nm grün, wobei die grüne Fluoreszenz teilweise von der roten Autofluoreszenz des Chlorophylls überlagert wird, und somit gelb erscheint.

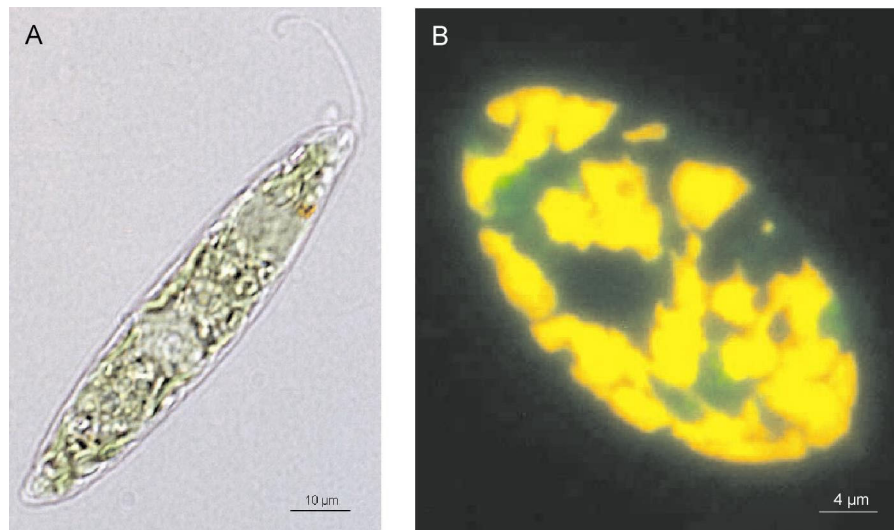


Abb. 1-1 Lichtmikroskopische Aufnahme von *Euglena gracilis* (A) und Fluoreszenzaufnahme von *Euglena gracilis* nach Anfärbung mit dem Farbstoff MitoTracker Green FM (B)

Das Mitochondrium von *Euglena gracilis* ist ein fakultativ anaerobes Organell, das sowohl unter aeroben als unter anaeroben Bedingungen ATP produziert (Buetow 1989, Kitaoka et al. 1989). Von besonderer Bedeutung für den anaeroben Energiestoffwechsels sind eine Synthese von Fettsäuren und eine Fermentation von Wachsestern (Inui et al. 1982, Inui et al. 1983, Buetow 1989). Diese biochemischen Prozesse nehmen in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle ein. Die biochemischen Besonderheiten der Fettsäurebiosynthese im Mitochondrium von *Euglena* können am Besten vor dem Hintergrund der Biochemie der Synthese und des Abbaus von Fettsäuren in Eukaryoten beleuchtet werden.

1.2. Generelle Bedeutung von Fettsäuren

Fettsäuren bestehen aus einer Kohlenwasserstoffkette und einer hydrophilen Carboxylgruppe am Ende der Kette. Aufgrund ihrer Kettenlänge können Fettsäuren in kurzkettige (< C8), mittelkettige (C8 - C12), langkettige (C14 - C18) und sehr langkettige (C20 >) Fettsäuren unterteilt werden. Ein weiteres charakterisierendes Merkmal ist die Anzahl der Doppelbindungen in der Kohlenwasserstoffkette. Fettsäuren ohne Doppelbindungen werden als gesättigte Fettsäuren bezeichnet, Fettsäuren mit einer oder mehr Doppelbindungen als ungesättigt (siehe Abb. 1-2). In der Natur kommen Fettsäuren selten als freie Fettsäuren vor, sondern als Bausteine verschiedener Lipide. Zumeist ist die Carboxylgruppe der Fettsäuren verestert oder auf andere Weise modifiziert. In Membranen sind beispielsweise fast alle Fettsäuren mit Glycerin verestert. Sind alle drei Positionen des Glycerins mit Fettsäuren verestert, spricht man von Triacylglyceriden, die die Hauptform von Speicherlipiden in Samen ausmachen. Lipide erfüllen somit essentielle Funktionen in der Zelle. Sie sind strukturelle Bestandteile von Biomembranen und intrazelluläre Speicherdepots und Speicherformen energiereicher Stoffwechselprodukte. Zudem sind Lipide auch Bestandteile von Schutzsubstanzen, beispielsweise in Form von Wachsen auf Blättern von höheren Pflanzen.

Auch wenn einige essentielle Fettsäuren vom Menschen oder anderen Säugetieren mit der Nahrung aufgenommen werden müssen, wird die Mehrheit der Fettsäuren in den meisten Organismen *de novo* synthetisiert. Fettsäuresynthese ist offensichtlich ein ubiquitäres Merkmal aller Organismen, und der Synthesemechanismus ist im wesentlichen bei allen Organismen ähnlich. Der erste Schritt der Synthese ist eine Kondensation einer von Malonyl-CoA stammenden Malonyl-Gruppe mit einem Primer unter Freisetzung von CO₂. Das entstandene Ketoacyl-Derivat wird in drei nachfolgenden Schritten in eine gesättigte Fettsäure umgewandelt, die als Ausgangssubstrat für weitere Kettenverlängerung dienen kann. Trotz der grundlegenden Ähnlichkeit des Mechanismus der Fettsäuresynthese bei verschiedenen Organismen existiert eine strukturelle Vielfalt bei den Enzymen, die diese Reaktionen katalysieren. In Pflanzen und den meisten Bakterien erfolgt die Fettsäuresynthese mit Hilfe einzelner Enzyme, die zusammen als Typ II Fettsäure-Synthetase (FAS II) bezeichnet werden. In den meisten anderen Organismen existieren verschiedenartige Typen von

multifunktionellen Polypeptiden, die als Typ I Fettsäure-Synthetase (FAS I) bezeichnet werden (McCarthy und Hardie 1984).

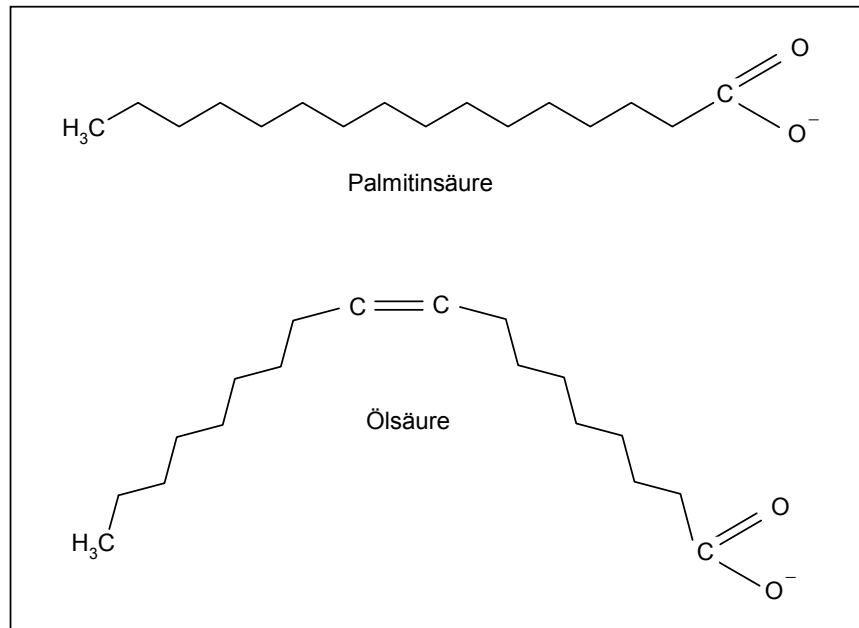


Abb. 1-2 Schematische Struktur der Fettsäuren Palmitinsäure (C16) und Ölsäure (C18:1). Die Ölsäure ist an der Kohlenstoff-Doppelbindung (Δ^9) in cis-Konfiguration gebogen, so dass die Acyl-Ketten auf der gleichen Seite der Bindung liegen. Palmitinsäure ist neben Stearinsäure (18:0) die in der Natur am häufigsten vorkommende gesättigte Fettsäure. Ölsäure ist neben Linolsäure (C18:2) die am weitesten verbreitete ungesättigte Fettsäure.

1.3. Prinzipien der Fettsäuresynthese am Beispiel von Pflanzen

Die pflanzliche Fettsäuresynthese ist in den Plastiden lokalisiert und ist abhängig von der Bildung von Malonyl-CoA. Die Bildung von Malonyl-CoA erfolgt in einer ATP-abhängigen Reaktion durch Carboxylierung von Acetyl-CoA. Die Herkunft des plastidären Acetyl-CoA ist nicht endgültig geklärt. Verschiedene alternative Wege zur Bereitstellung von Acetyl-CoA in den Plastiden werden diskutiert. Ein möglicher Weg ist die Synthese von Acetyl-CoA über die plastidäre Pyruvat Dehydrogenase (PDH) mit Pyruvat aus der Glykolyse. Chloroplasten enthalten aber auch eine Acetyl-CoA Synthetase, so dass Acetyl-CoA aus freiem Acetat synthetisiert werden kann (Kuhn et al. 1981, Zeiher und Randall 1991, Behal et al. 2002). Weiterhin wird die Möglichkeit der Produktion der Acetyl-CoA Einheit durch die mitochondriale PDH gefolgt von einem Transport von freiem Acetat oder Acetylcarnitin in die Plastide diskutiert (Ohlrogge und Browse 1995, Ohlrogge et al. 2000, Ke et al. 2000). In Samen von Ölpflanzen wurden zusätzlich cytosolisches Malat und Glukose-6-Phosphat als Vorstufen von plastidärem Acetyl-CoA vorgeschlagen (Smith et al. 1992, Kang und

Rawsthorne 1994). Da Acetyl-CoA eine zentrale Rolle in zahlreichen Stoffwechselwegen einnimmt, ist es wahrscheinlich, dass mehr als ein Weg zum plastidären Acetyl-CoA Pool beiträgt. Katalysiert wird die Bildung von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA und CO₂ durch die Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase), deren Reaktion in zwei Schritten erfolgt. Im ersten Schritt wird in einer ATP-abhängigen Reaktion CO₂ durch die Biotin-Carboxylase auf einen Lysinrest des Biotin-Carboxyl-Carrierproteins übertragen. Das auf diese Weise aktivierte CO₂ wird in einem zweiten Schritt mit Hilfe der Carboxyltransferase vom Biotin auf Acetyl-CoA übertragen. Die plastidäre ACCase ist als Multienzymkomplex von 700 kDa organisiert und enthält vermutlich neben den beschriebenen drei Komponenten noch weitere bisher nicht charakterisierte Komponenten (Alban et al. 1994). Neben dieser auch als prokaryotischer Typ bezeichneten ACCase, existiert eine weitere Form der ACCase in Pflanzen. Die sogenannte eukaryotische Form besteht hingegen aus einem großen multifunktionellen Enzym und kommt außerhalb der Plastiden, wahrscheinlich im Cytosol, vor. Die eukaryotische ACCase Form dient in Pflanzen vermutlich hauptsächlich zur Bereitstellung von Malonyl-CoA für die Elongation von Fettsäuren am endoplasmatischen Retikulum und für die Bildung von Flavonoiden.

Die weiteren Reaktionen zur Synthese von Fettsäuren erfolgen bei Pflanzen mit Hilfe einzelner Enzyme (FAS II), die im Stroma der Chloroplasten lokalisiert sind. Die Malonyl-Gruppe des von der ACCase bereitgestellten Malonyl-CoA wird zunächst auf ein Acyl-Carrier-Protein (ACP) übertragen. Durch die Kondensation von Acetyl-CoA und Malonyl-ACP entsteht unter Freisetzung des zuvor in der ACCase Reaktion hinzugefügten CO₂ ein 3-Ketoacyl-ACP, das in drei weiteren Reaktionsschritten zum Acyl-ACP mit vier Kohlenstoffatomen umgewandelt wird. Dieses Acyl-ACP wird in der nächsten Runde des Verlängerungszyklus mit einem weiteren Malonyl-ACP kondensiert. Die Kettenverlängerung in Schritten von zwei Kohlenstoffatomen resultiert in Kettenlängen von typischerweise 16 bis 18 Kohlenstoffatomen. Mindestens drei verschiedene kondensierende Enzyme (3-Ketoacyl-ACP Synthase, KAS) sind nötig, um Fettsäuren mit 18 Kohlenstoffatomen zu produzieren. Die Kondensation von Malonyl-ACP und Acetyl-CoA wird von KAS III katalysiert, während KAS I wahrscheinlich für die Synthese von Kettenlängen mit sechs bis 16 Kohlenstoffatomen verantwortlich ist. Für die Verlängerung von 16 auf 18 Kohlenstoffatome existiert ein separates Enzym KAS II. Die nachfolgenden Reaktionen nach jeder Kondensation sind in Abb. 1-3

dargestellt und umfassen zunächst eine Reduktion des 3-Ketoacyl-ACP durch die 3-Ketoacyl-ACP Reduktase unter Verwendung von NADPH als Elektronendonator. Die nächste Reaktion beinhaltet die Abspaltung von H_2O mit Hilfe einer Hydroxyacyl-ACP Dehydratase. Die entstandene Doppelbindung wird durch den letzten Reaktionsschritt der Enoyl-ACP Reduktase reduziert, und die Runde des Verlängerungszyklus wird mit der Bildung einer gesättigten Fettsäure abgeschlossen. Das Acyl-ACP kann zum einen als Donor von Acyl-Gruppen für die Synthese von Membran-Lipiden in den Plastiden dienen, oder aber die Acyl-Gruppe wird vom ACP abgespalten, um freie Fettsäuren zu bilden. Diese freien Fettsäuren werden ins Cytoplasma exportiert, mit CoA verestert und gelangen in den Acyl-CoA Pool. Die Acyl-Gruppen können dann zur Bildung von Membran- und Speicherlipiden genutzt werden.

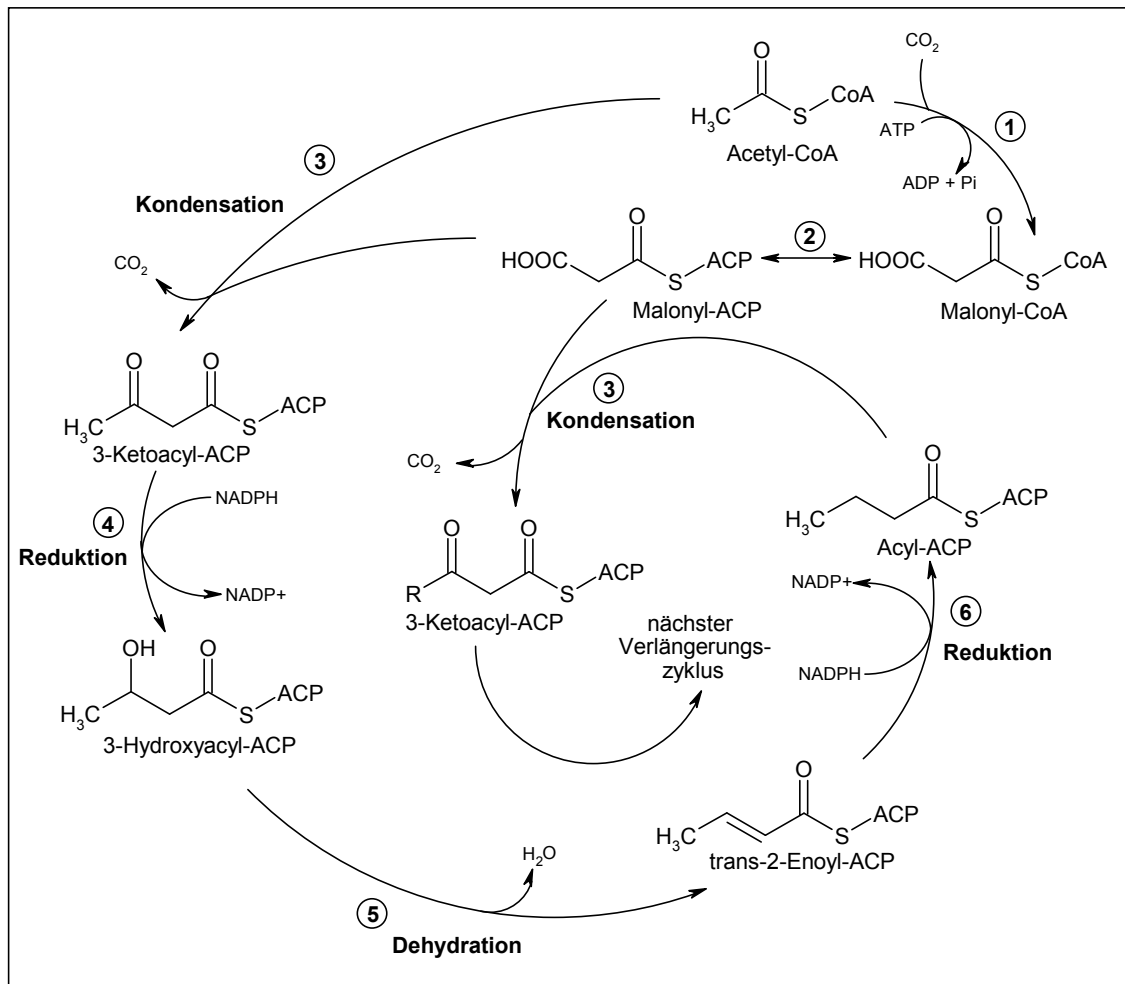


Abb. 1-3 Reaktionsfolge zur Synthese von Fettsäuren. Die einzelnen Reaktionsschritte werden durch die folgenden Enzyme katalysiert: 1, Acetyl-CoA Carboxylase; 2, Malonyl-CoA:ACP Transacylase; 3, Ketoacyl-ACP Synthase; 4, Ketoacyl-ACP Reduktase; 5, Hydroxyacyl-ACP Dehydratase; 6, Enoyl-ACP Reduktase. Verändert nach Ohlrogge und Browse (1995).

Chloroplasten sind nicht die einzigen Orte der Fettsäuresynthese in Pflanzen. Pflanzliche Mitochondrien sind ebenfalls in der Lage, Fettsäuren zu synthetisieren (Wada et al. 1997, Gueguen et al. 2000). Die Quantität dieser Fettsäuren ist jedoch gering im Vergleich zu der Menge an Fettsäuren, die in den Plastiden synthetisiert wird. Möglicherweise sind diese in Mitochondrien synthetisierten Fettsäuren ausschließlich für die Biosynthese von Liponsäure nötig oder am Reparaturprozess von membranären Phospholipiden beteiligt, wie es bereits für Hefen vorgeschlagen wurde (Schneider et al. 1997). Die Initiation des klassischen Weges der Fettsäuresynthese (FAS I und FAS II) erfolgt wie beschrieben beim Acetyl-CoA, dass zu Malonyl-CoA carboxyliert wird. Nicht alle pflanzlichen Mitochondrien können jedoch Acetyl-CoA oder Acetat als alleinige Vorstufe zur Fettsäuresynthese verwenden, weil ihnen eine ACCase fehlt (Baldet et al. 1993, Wada et al. 1997). Durch Versuche an Mitochondrien aus Erbsenblättern konnte gezeigt werden, dass diese Mitochondrien die enzymatische Ausstattung besitzen, um Malonat in Acetyl-CoA und Malonyl-ACP, die beiden nötigen Einheiten für die Fettsäuresynthese, umzuwandeln. Diese Mitochondrien besitzen eine Malonyl-CoA Synthetase und eine Malonyl-CoA:ACP Transacylase, die in der Lage sind, Malonat zu Malonyl-ACP zu aktivieren (Gueguen et al. 2000). Für diesen Weg der Fettsäuresynthese in Mitochondrien von Dikotylen muss ein Import von Malonat aus dem Cytoplasma in die Mitochondrien erfolgen. Im Gegensatz dazu kann in den Mitochondrien von Gräsern die komplette Synthese von Fettsäuren erfolgen. Neuere Arbeiten zeigen die Existenz einer eukaryotischen Form der ACCase in den Mitochondrien von Gerste, Weizen (Focke et al. 2003) und Reis (Heazlewood et al. 2003).

Neben den beschriebenen Systemen zur *de novo* Synthese von Fettsäuren existieren in Pflanzen Systeme zur Elongation und Desaturation von Fettsäuren. Die beschriebenen Mechanismen zur Neusynthese von Fettsäuren enden bei einer Kettenlänge von 16 oder 18 Kohlenstoffatomen. Zur Elongation von Fettsäuren zu sehr langkettigen Fettsäuren werden die C16/C18 Fettsäuren in das endoplasmatische Retikulum transferiert. Die dort stattfindenden Reaktionen zur weiteren Kettenverlängerung ähneln denen der Neusynthese. Malonyl-CoA ist ebenfalls Donor der hinzugefügten Kohlenstoffatome, und die Elongation erfolgt ebenfalls um C2-Einheiten, allerdings sind die Zwischenstufen nicht an ACP, sondern an Coenzym A gebunden (Fehling und Mukherjee 1991, Millar und Kunst 1997). Zudem enthalten

viele Fettsäuren Doppelbindungen. Diese ungesättigten Fettsäuren werden aus gesättigten Fettsäuren synthetisiert. Die Bildung der Doppelbindung erfolgt strikt stereospezifisch. Zumeist werden *cis*-Doppelbindungen produziert, aber es existieren auch Enzyme, die *trans*-Doppelbindungen generieren. Fettsäure-Elongationssysteme und Desaturase-Systeme fungieren gemeinsam bei der Synthese von langkettigen und sehr langkettigen Fettsäuren. Ausgehend von C16 und C18 generieren Elongations-spezifische Desaturasen einfach ungesättigte Palmitoleinsäure (C16:1, $\Delta 9$) und Ölsäure (C18:1, $\Delta 9$) (Stukey et al. 1990), die dann für die Synthese der Vielfalt von sehr langkettigen ungesättigten Fettsäuren verwendet werden (Cinti et al. 1992, Dittrich et al. 1998).

1.4. Abbau von Fettsäuren

Die Biochemie des Abbaus von Fettsäuren wurde seit der Entdeckung dieses Stoffwechselwegs 1904 durch Franz Knoop intensiv in verschiedenen Organismen erforscht. Die β -Oxidation ist der Stoffwechselweg, der zum kompletten Abbau der Fettsäuren durch die sequentielle Abspaltung von 2 Kohlenstoffeinheiten führt. Zwei generelle Typen der β -Oxidation werden unterschieden, zum einen das mitochondriale System und zum anderen das peroxisomale System. Beide Systeme kommen in Tieren vor, während in Pflanzen und Pilzen die β -Oxidation fast vollständig in Microbodies zu erfolgen scheint. Pflanzen und Pilze sind in der Lage, mit dem peroxisomalen System den kompletten Abbau der Fettsäuren zu vollziehen. Im Gegensatz dazu benötigen Tiere zusätzlich ein mitochondriales System, da hier das peroxisomale System anscheinend nur die Funktion der Kettenverkürzung erfüllt (Tolbert 1981, Gerhardt 1992, Van den Bosch et al. 1992).

Zum Abbau von Fettsäuren müssen diese zunächst aktiviert werden. Diese Aktivierung wird von Acyl-CoA Synthetasen katalysiert und erfolgt unter ATP-Verbrauch über die Bildung einer Thioesterbindung zu einem Coenzym A. Acyl-CoA Synthetasen unterscheiden sich in bezug auf ihre subzelluläre Lokalisation und ihre Spezifität für unterschiedliche Kettenlängen (Kunau et al. 1995). Der Abbau der aktivierten Fettsäuren erfolgt in vier Reaktionsschritten. Zunächst werden die Acyl-CoA Ester desaturiert und die resultierenden Enoyl-CoA Ester werden nachfolgend zu Hydroxyacyl-CoA Estern hydratisiert. Der dritte Schritt beinhaltet eine Dehydration mit gekoppelter Reduktion von NAD^+ . Bei der anschließenden thiolytischen Spaltung des

entstandenen Ketoacyl-CoA Esters erfolgt die Freisetzung einer Acetyl-CoA Einheit. Auf diese Weise werden die Fettsäuren jeweils um zwei Kohlenstoffatome verkürzt, so dass die Reaktionsfolge mehrfach durchlaufen werden muss, um eine langkettige Fettsäure vollständig abzubauen.

Der erste Schritt der Reaktionsfolge kann von zwei unterschiedlichen Enzymen, einer Acyl-CoA Oxidase (peroxisomales System) oder einer Acyl-CoA Dehydrogenase (mitochondriales System) katalysiert werden. Die Acyl-CoA Oxidase überträgt die Elektronen auf molekularen Sauerstoff, wobei H_2O_2 entsteht. Die Existenz einer Acyl-CoA Oxidase wurde für Microbodies von Pflanzen, Tieren und einigen Pilzen nachgewiesen (Kindl 1993, Kunau et al. 1985). Im Gegensatz zur Acyl-CoA Oxidase werden die Elektronen der Acyl-CoA Dehydrogenase Reaktion über ein Elektronen-transportierendes Flavoprotein (ETF), die ETF: Ubiquinon Reduktase, auf Ubiquinon und von dort auf das zweite elektronenpumpende Zentrum der Atmungskette übertragen. Acyl-CoA Dehydrogenasen weisen ebenso wie Acyl-CoA Oxidasen unterschiedliche Kettenlängenspezifitäten auf. Nachgewiesen wurden Acyl-CoA Dehydrogenase Aktivitäten in Bakterien und in Mitochondrien von Tieren und Algen (Kunau et al. 1985, Winkler et al. 2003). Mit Hilfe der Acyl-CoA Oxidase oder der Acyl-CoA Dehydrogenase wird die zuvor zum Acyl-CoA aktivierte Fettsäure in ein *trans*-2-Enoyl-CoA umgewandelt. Der zweite und der dritte Schritt der β -Oxidation wird durch die Enoyl-CoA Hydratase und die 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase katalysiert. Die Enoyl-CoA Hydratase hydratisiert *trans*-2-Enoyl-CoA in das korrespondierende 3-Hydroxyacyl-CoA, welches wiederum durch die 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase zu 3-Ketoacyl-CoA reduziert wird. Der letzte Schritt der β -Oxidation wird durch die 3-Ketoacyl-CoA Thiolase katalysiert, die 3-Ketoacyl-CoA zu Acyl-CoA und Acetyl-CoA spaltet (siehe Abb. 1-4).

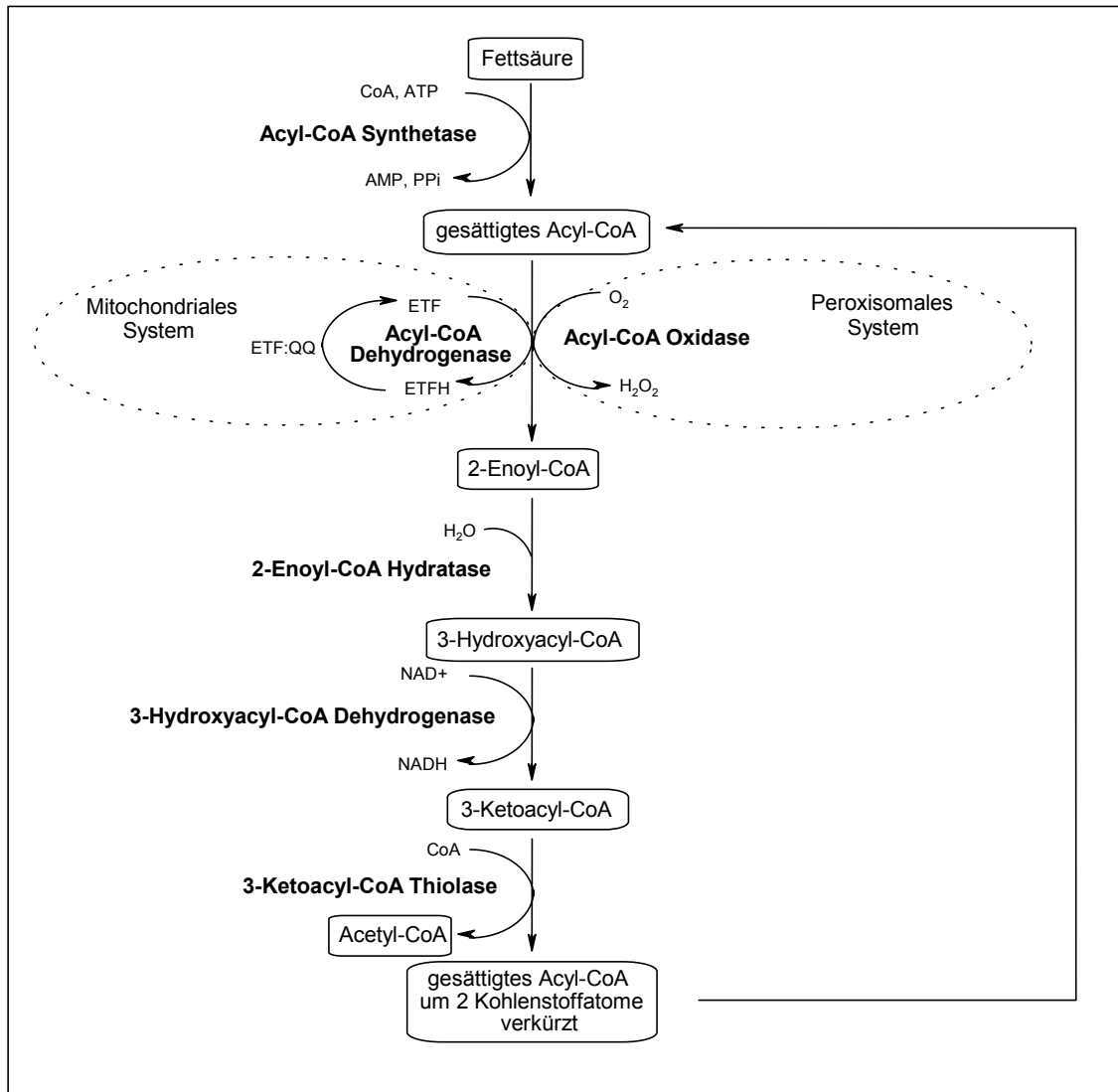


Abb. 1-4 Stoffwechselweg und Enzyme der mitochondrialen und peroxisomalen β -Oxidation von Fettsäuren. Abkürzungen: ETF, Elektronen-transportierendes Flavoprotein; ETFH, reduziertes ETF; ETF:QQ, ETF: Ubiquinon Oxidoreduktase. Zusammengefasst nach Eaton et al. (1996) und Hashimoto (1999)

Jeder Reaktionsschritt der β -Oxidation sowohl des mitochondrialen als auch des peroxisomalen Systems wird von mindestens zwei Enzymen katalysiert, die sich in ihrer Kettenlängenspezifität unterscheiden, so dass Acyl-CoA Ester mit variierenden Kettenlängen effizient abgebaut werden können (Hiltunen und Qin 2000). Im Fall von parallel existierenden mitochondrialen und peroxisomalen Systemen erfolgt die Regulation auf zellulärer Ebene vermutlich in erster Linie über die Carnitin Acyltransferase, die den Transport der Acyl-Gruppen über die Mitochondrien-Membran katalysiert. Optimale Substrate für die Carnitin Acyltransferase sind unverzweigte Acyl-Gruppen, während modifizierte Fettsäurederivate wie verzweigte Fettsäuren lediglich schlechte oder gar keine Substrate darstellen (Mannaerts und van Veldhoven 1996). Im

Gegensatz zum mitochondrialen System ist das peroxisomale System vermutlich Carnitin-unabhängig (Mannaerts et al. 1979, Hashimoto 1999).

Die bisher beschriebenen Reaktionen dienen dem Abbau von unverzweigten gesättigten Fettsäuren. Zur Oxidation von verzweigten oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden einige zusätzliche Enzyme benötigt, dabei verläuft der Metabolismus der meisten ungesättigten Fettsäuren über einen Abbauweg an dem eine 2,4-Dienoyl-CoA Reduktase beteiligt ist. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit einer *cis*-Doppelbindung an geradzahigen Positionen liefern während der β -Oxidation ein *trans*-2-*cis*-4-Dienoyl-CoA als Intermediat (Dommes und Kunau 1984). Dieses Intermediat wird durch die 2,4-Dienoyl-CoA Reduktase zu 3-Enoyl-CoA reduziert, was nachfolgend durch die Δ^3 - Δ^2 -Enoyl-CoA Isomerase in *trans*-2-Enoyl-CoA umgewandelt werden kann (Fillgrove und Anderson 2001, Zhang et al. 2002). Die entsprechenden Enzymaktivitäten wurden sowohl für Mitochondrien als auch für Peroxisomen von zahlreichen Arten nachgewiesen (für eine Zusammenfassung siehe Hiltunen und Qin 2000). Interessanterweise ist eine 2,4-Dienoyl-CoA Reduktase auch am Abbau der Mehrzahl der ungesättigten Fettsäuren mit Doppelbindung an ungeradzahigen Positionen beteiligt (Chen et al. 1994, Luthria et al. 1995), da das Enzym in der Lage ist, sowohl *trans*-2-*cis*-4- als auch *trans*-2-*trans*-4-Dienoyl-CoAs mit nahezu gleicher Effizienz zu reduzieren (Cuebas und Schulz 1982, Dommes und Kunau 1984).

1.5. Fettsäuresynthese Systeme bei *Euglena gracilis*

Fünf verschiedene Fettsäuresynthese Systeme wurden für den photosynthetischen Flagellaten *Euglena gracilis* nachgewiesen (Kitaoka et al. 1989). Zwei Acyl-Carrier-Protein abhängige Systeme (FAS II) sind in den Chloroplasten lokalisiert, wobei eines dieser beiden Systeme ein Elongationssystem darstellt (Ernst-Fonberg und Bloch 1971, Goldberg und Bloch 1972, Ernst-Fonberg 1973, Hendren und Bloch 1980). Zusätzlich ist eine multifunktionale Fettsäuresynthetase (FAS I) im Cytosol lokalisiert (Delo et al. 1971, White et al. 1971, Goldberg und Bloch 1972, Ernst-Fonberg et al. 1974, Walker et al. 1981) und ebenfalls die Mikrosomen enthalten eine Fettsäuresynthetase (Nagai und Bloch 1965, Khan und Kolattukudy 1973a, Khan und Kolattukudy 1975). Neben diesen klassischen Systemen besitzt *Euglena* ein weiteres ungewöhnliches Malonyl-CoA unabhängiges Fettsäuresynthese System in den Mitochondrien (Inui et al. 1984a).

Die Produkte des Multienzymkomplexes FAS I im Cytosol sind Acyl-Ketten mit einer Kettenlänge von im Wesentlichen 16 Kohlenstoffatomen, wobei Kettenlängen mit 14 und 18 Kohlenstoffatomen in geringerem Ausmaß als Nebenprodukte entstehen. Mehr als 90 % dieser Produkte liegen in Protein-gebundener Form vor (Delo et al. 1971, Goldberg und Bloch 1972). Das in Form von einzelnen Enzymen vorliegende ACP-abhängige FAS II in den Chloroplasten synthetisiert in erster Linie Fettsäuren mit 18 Kohlenstoffatomen und eine ebenfalls beträchtliche Menge an C16 Fettsäuren (Goldberg und Bloch 1972, Ernst-Fonberg et al. 1974). Die von FAS I und FAS II *de novo* synthetisierten Fettsäuren werden mit Hilfe eines weiteren, ebenfalls in den Chloroplasten lokalisierten Elongationssystems zu Fettsäuren mit Kettenlängen von 20 bis 24 Kohlenstoffatomen verlängert (Nagai und Bloch 1967, Goldberg und Bloch 1972). Zusätzlich zu diesen drei Systemen ist in den Mikrosomen von *Euglena* ein weiteres Fettsäuresynthese System lokalisiert. Dieses mikrosomale System scheint der Neusynthese von Wachsestern unter aeroben Bedingungen zu dienen (Khan und Kolattukudy 1973a, 1973b, 1975).

Von besonderem Interesse im Kontext der vorliegenden Arbeit ist das mitochondriale Fettsäuresynthese System von *Euglena*, da die Synthese der Fettsäuren in diesem System direkt bei Acetyl-CoA beginnt und somit weder Malonyl-CoA noch eine ACCase benötigt wird. Acetyl-CoA wird sowohl als Primer als auch als C2 Donor der Reaktion verwendet. Entdeckt wurde dieses ungewöhnliche Fettsäuresynthese System von Inui und Mitarbeitern aufgrund der Beobachtung, dass der Transfer von aerob gezogenen *Euglena* Zellen zu anaeroben Bedingungen zur Bildung von Wachsestern auf Kosten des Reservekohlenstoffs Paramylon (β -1,3-Glukan) führt und dass diese Synthese von Wachsestern mit einer Nettosynthese von ATP gekoppelt ist (Inui et al. 1982, Inui et al. 1984a). Aufgrund des Nettogewinns an ATP wird dieses biochemische Geschehen als Wachsester-Fermentation bezeichnet (Buetow 1989). Eine Fermentation mit Wachsestern als Endprodukt ist ungewöhnlich, da die gebildeten Endprodukte unlöslich sind und in kristalliner Form als Wachse im Cytosol abgelagert werden. Produkte von klassischen Fermentationen wie Alkohole und organische Säuren sind löslich und wären bei einer Akkumulation schädlich für die Zelle, so dass diese Produkte in der Regel ausgeschieden werden. Bei *Euglena* bleibt das Fermentationsprodukt und damit sowohl der organische Elektronenakzeptor als auch die Elektronen aus der Glukose-Oxidation in der Zelle erhalten. Bei der Rückkehr zu

aeroben Bedingungen können die gespeicherten Wachse wieder in Paramylon bzw. Glukose umgewandelt werden, so dass sie der oxidativen Phosphorylierung im Mitochondrium zur Verfügung stehen. Die vom mitochondrialen System in *Euglena* synthetisierten Acyl-Ketten weisen Kettenlängen von 8 bis 18 Kohlenstoffatomen auf, den Hauptanteil machen dabei die C14 Fettsäuren aus (Inui et al. 1984a). Die vom mitochondrialen System synthetisierten Fettsäuren werden mit Hilfe einer Acyl Carnitin Transferase ins Cytosol transportiert und werden dort teilweise zu Alkoholen reduziert. Die endgültige Veresterung von Fettsäuren und Alkoholen zu Wachsen erfolgt dann in den Mikrosomen (Kolattukudy 1970, Khan und Kolattukudy 1973b) (siehe auch Abb. 1-5, B). In Übereinstimmung mit den vom mitochondrialen System hauptsächlich synthetisierten C14 Fettsäuren sind Myristinsäure und Myristinalkohol die Hauptkomponenten der von *Euglena* unter anaeroben Bedingungen produzierten Wachsester (Inui et al. 1983).

Die vier klassischen oben beschriebenen Fettsäuresynthese Systeme von *Euglena* können einem Nettogewinn an ATP bei der Wachsesterfermentation nicht Rechnung tragen, da das aus der Glykolyse gewonnene ATP bei der Synthese von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA wieder verbraucht würde. Formal handelt es bei dem mitochondrialen Fettsäuresynthese System von *Euglena* um eine Umkehr der β -Oxidation mit drei reversiblen Enzymen und einer Enoyl-CoA Reduktase anstelle der Acyl-CoA Dehydrogenase (Inui et al. 1984a, Buetow 1989), wobei das Vorhandensein des β -Oxidationsweges in *Euglena*-Mitochondrien bereits früher nachgewiesen wurde (Graves und Becker 1974). Eine ähnliche Fettsäuresyntheseaktivität ist auch in Mitochondrien von Säugetieren bekannt, wobei eine Verlängerung von mittelkettigen Acyl-CoA Derivaten mit Acetyl-CoA als C2 Donor erfolgt. Dieses mitochondriale Fettsäuresynthese System der Säuger dient jedoch im Gegensatz zum mitochondrialen Fettsäuresynthese System von *Euglena* ausschließlich der Kettenverlängerung, da die Enoyl-CoA Reduktase nur eine sehr geringe Aktivität gegenüber Crotonyl-CoA (C4) aufweist (Seubert et al. 1968, Podack und Seubert 1972, Hinsch und Seubert 1975, Hinsch und Seubert 1976). Weitere auf ähnliche Weise funktionierende Elongationssysteme sind auch für pflanzliche Chloroplasten wie beispielsweise aus Spinat (Vance und Stumpf 1978) und *Mycobacterium smegmatis* (Shimakata et al. 1977, Shimakata et al. 1980) bekannt.

1.6. Energiestoffwechsel im Mitochondrium von *Euglena gracilis*

Unter aeroben Bedingungen erfolgt im Mitochondrium von *Euglena* eine typische oxidative Phosphorylierung über den Tricarbonsäurezyklus und die Atmungskette. Pyruvat aus der Glykolyse wird importiert und im Mitochondrium der oxidativen Decarboxylierung unterzogen. Typischerweise erfolgt die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat mit Hilfe eines Multienzymkomplexes, der Pyruvat Dehydrogenase (PDH), aber bei *Euglena* existiert ein ungewöhnliches sauerstoffempfindliches Enzym: die Pyruvat:NADP⁺ Oxidoreduktase (PNO) (Inui et al. 1984b, Inui et al. 1987, Nakazawa et al. 2000, Rotte et al. 2001). Das in der oxidativen Decarboxylierung produzierte Acetyl-CoA tritt in einen modifizierten Tricarbonsäurezyklus ein, der anstelle des α -Ketoglutarat Dehydrogenase Komplexes eine α -Ketoglutarat Decarboxylase enthält. Das aus dieser Reaktion resultierende Succinat-Semialdehyd wird durch eine Succinat-Semialdehyd Dehydrogenase in Succinat umgewandelt (Shigeoka et al. 1980, Buetow 1989) (siehe Abb. 1-5, A). Interessanterweise existiert beim α -Proteobakterium *Bradyrhizobium japonicum* als Alternative zum klassischen Tricarbonsäurezyklus die gleiche Modifikation des Tricarbonsäurezyklus wie bei *Euglena* (Green et al. 2000).

Unter anaeroben Bedingungen fungiert die PNO als Schlüsselenzym für die mitochondriale Wachsesterfermentation bei *Euglena*. Das Acetyl-CoA aus der oxidativen Decarboxylierung wird zur Fettsäuresynthese herangezogen. Unter aeroben Bedingungen erfolgt keine Synthese von Fettsäuren in den Mitochondrien von *Euglena* (Inui et al. 1985). Beim Wechsel zu anaeroben Kulturbedingungen werden jedoch sofort Wachsester auf Kosten des Reserve-Polysaccharids Paramylon synthetisiert (siehe Abb. 1-5, B) Die Menge an synthetisierten Wachsestern beträgt bis zu 40 μg pro 10^6 Zellen (Inui et al. 1982). Die Aktivität der mitochondrialen Fettsäuresynthese ist bei der Verwendung von Pyruvat als Substrat 30-fach erhöht im Vergleich zu der Verwendung von Acetyl-CoA als Substrat, und auch die Verwendung eines artifiziellen Acetyl-CoA regenerierenden Systems erhöht die Aktivität des mitochondrialen Fettsäuresynthese Systems (Inui et al. 1985). Das Verhältnis von Acetyl-CoA zu CoA scheint somit ein Kontrollfaktor für die Aktivität der mitochondrialen Fettsäuresynthese zu sein.

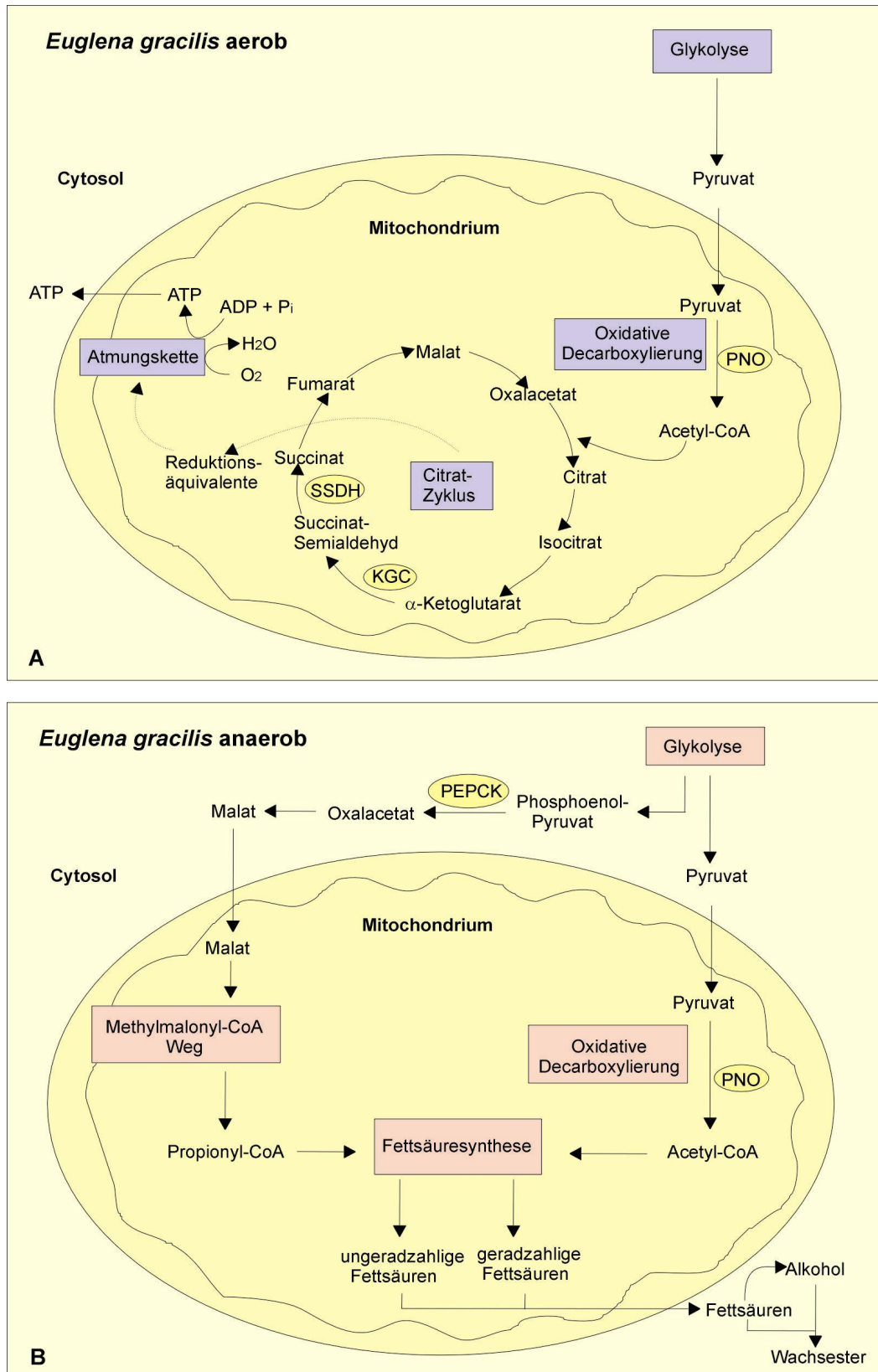


Abb. 1-5 Schematische Darstellung des aeroben (A) und anaeroben (B) Energiestoffwechsels im Mitochondrium von *Euglena gracilis*. Dargestellt sind jeweils nur die wesentlichen Merkmale unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen. Abkürzungen: KGC, α-Ketoglutarat Decarboxylase; PEPCK, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase; PNO, Pyruvat:NADP⁺ Oxidoreduktase; SSDH, Succinat-Semialdehyd Dehydrogenase.

Die Biochemie der ungewöhnlichen Wachsesterfermentation ist bisher in Grundzügen verstanden, aber nicht bis in die biochemischen Details charakterisiert. Die Fettsäuren werden in einer Umkehr der β -Oxidation synthetisiert, wobei der letzte Schritt nicht von einer Acyl-CoA Dehydrogenase, sondern von einer *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase (E.C. 1.3.1.44) katalysiert wird (Inui et al. 1984a, Buetow 1989). Es sind drei verschiedene Enoyl-CoA Reduktasen (Enoyl-CoA Reduktase I, II und III) mit unterschiedlichen Kettenlängenspezifitäten beschrieben (Inui et al. 1984a). Hervorzuheben ist die Besonderheit, dass die Enoyl-CoA Reduktase I im Gegensatz zu Enoyl-CoA Reduktasen aus Elongationssystemen hoch spezifisch ist für Crotonyl-CoA (*trans*-2-Butenoyl-CoA) und somit die Schlüsselstellung bei der mitochondrialen *de novo* Synthese von Fettsäuren in *Euglena* einnimmt. Die Enoyl-CoA Reduktase I (im folgenden als *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase, TER bezeichnet) wurde in den 80iger Jahren aus Mitochondrien von *Euglena* biochemisch gereinigt (Inui et al. 1986), aber es ist weder eine Protein- noch eine Nukleotidsequenz bekannt.

Ungefähr 30 % der unter anaeroben Bedingungen synthetisierten Wachsester sind gesättigte C28 Ester, 40 % aller Wachsester machen Ester mit ungeradzahligen Kohlenstoffketten aus, wobei ungesättigte Wachsester kaum nachweisbar sind (Inui et al. 1983, Inui et al. 1988). Eine Synthese von Fettsäuren mit ungeradzahligen Kohlenstoffatomen erfolgt ausschließlich mit Propionyl-CoA als Primer. Die Synthese von Propionyl-CoA erfolgt über den Methylmalonyl-CoA Weg (Nagai et al. 1971, Schneider und Betz 1985, Pönsen-Schmidt et al. 1988). Der Methylmalonyl-CoA Weg ist nach dem charakteristischen Zwischenprodukt benannt und verläuft über die Verlängerung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Oxalacetat mittels einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK). Das Oxalacetat wird dann schrittweise zu Succinat reduziert, dabei katalysiert die Fumaratreduktase die Reduktion von Fumarat zu Succinat. Dieses Enzym ist membrangebunden und ermöglicht durch Elektronenübertragung von Rhodoquinon eine zusätzliche Energiekonservierung (Rich 1984, Van Hellemond und Tielens 1994, Tielens und van Hellemond 1998, Tielens et al. 2002). Die Existenz von Rhodoquinon bei *Euglena* wurde bereits in einer frühen Arbeit nachgewiesen (Powls und Hemming 1966). Succinat wird anschließend zu Succinyl-CoA aktiviert und zu Methylmalonyl-CoA umgewandelt, welches schließlich zu Propionyl-CoA decarboxyliert wird (siehe Abb. 1-6).

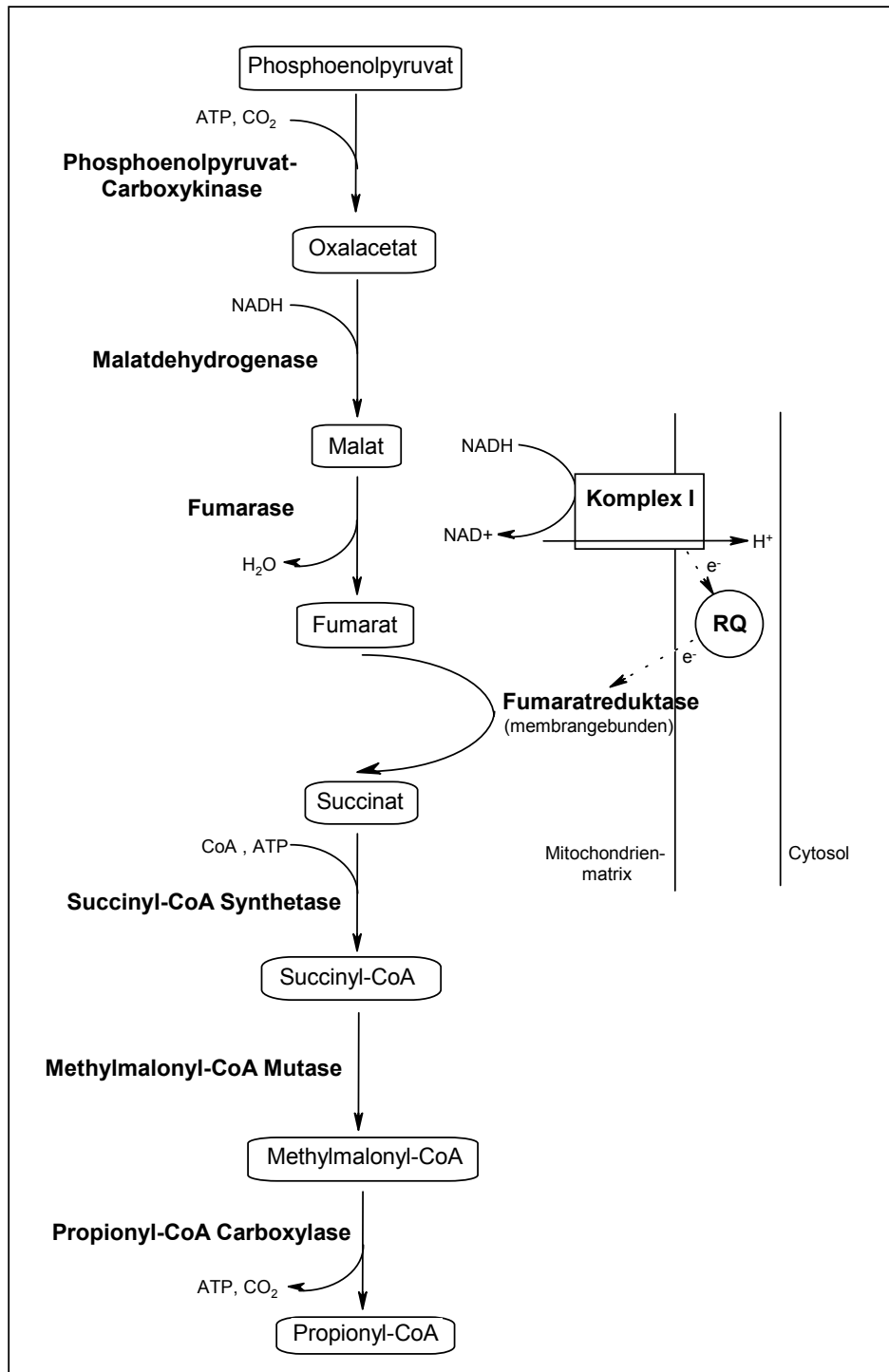


Abb. 1-6 Reaktionsschritte des Methylmalonyl-CoA Wegs zur Synthese von Propionyl-CoA als Primer zur Synthese von ungeradzahigen Fettsäuren. Abkürzungen: Komplex I, Komplex I der Atmungskette; RQ, Rholoquinon. Zusammengefasst nach Schneider und Betz (1985), Pönsen-Schmidt et al. (1988), Tielens et al. (2002).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

In der fakultativ anaeroben Biochemie der Mitochondrien von *Euglena gracilis* stellt das spezielle Fettsäuresynthese System in der Hinsicht eine Besonderheit dar, dass es als Intermediat zwischen klassischen Synthese- und Abbauwegen von Fettsäuren

existiert. β -Oxidations- und Fettsäuresynthese-Enzyme besitzen potentielle biotechnologische Anwendungen. Beispielsweise können durch die Manipulation des Kohlenstoff-Fluxes in transgenen Pflanzen neue Lipid basierte Produkte generiert werden. Hierbei könnten die Enzyme der ungewöhnlichen mitochondrialen Fettsäuresynthese aus *Euglena* von besonderem Interesse sein. Sie könnten möglicherweise genutzt werden, einen heterologen oder alternativen Fettsäurebiosyntheseweg in Pflanzen zu etablieren, der nicht den endogenen Regulationsmechanismen der pflanzlichen Lipidbiosynthese unterliegt.

Vor diesem Hintergrund ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Biochemie des fakultativ anaeroben Energiestoffwechsels der Mitochondrien von *Euglena gracilis* zu beleuchten. Zu diesem Zweck sollen Proteine der ungewöhnlichen anaeroben ATP-Synthese in den Mitochondrien von *Euglena gracilis* biochemisch und molekular charakterisiert werden. Dabei soll einerseits eine spezifische, bereits bekannte Enzymaktivität bis zur Genebene bearbeitet werden. Da die *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase den Endprodukt-freisetzenden Schritt der anaeroben mitochondrialen Fettsäuresynthese bei *Euglena* darstellt, soll ein Fokus der vorliegenden Arbeit auf der biochemischen Reinigung und Klonierung dieses Enzyms liegen. Ferner soll mit Hilfe von differentiellen Proteomanalysen von isolierten Mitochondrien aus aerob und anaerob angezogenen Zellen ein breiteres Spektrum an Proteinen charakterisiert werden, die an der Umstellung des Energiestoffwechsels im Mitochondrium von *Euglena* beim Übergang von aeroben Bedingungen zur Anaerobiose beteiligt sind.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien lagen mindestens in Analysequalität (p.a.) vor und wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen J.T. Baker, Biomol, Bio-Rad, Biozym, Calbiochem, Difco, Fluka, GibcoBRL, ICN, Merck, Riedel-de Haen, Roche, Roth, Serva, und Sigma geliefert. Die Radiochemikalien wurden von der Firma Hartmann Analytic, Braunschweig bezogen.

2.2. Reagenzsätze

ECL Western Blotting Analysis System	Amersham Biosciences
Gigapack III Gold	Stratagene
Jetstar Plasmid Maxi Kit	Genomed
mRNA Purification Kit	Amersham Biosciences
Nucleospin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Quick Ligation Kit	New England Biolabs
ThermoSequenase DYEnamic direct cycle sequencing kit	Amersham Biosciences
Time Saver cDNA Synthesis Kit	Amersham Biosciences

2.3. Chromatographie-Material

Die im Folgenden aufgeführten Materialien und Fertigsäulen wurden für die Chromatographie verwendet:

DEAE-Fraktogel EMD 650 S	Merck
Eco-Pac CHT II Cartridge	Bio-Rad
Mono Q HR 5/5 Säule	Amersham Biosciences
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Ni-NTA Spin Columns	Qiagen
PD-10 Säulen Sephadex G-25M	Amersham Biosciences
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow	Amersham Biosciences
Reaktive Red 120	Sigma
Sephacryl S-300, S-400	Amersham Biosciences
Superdex 200 HR 10/30 Säule	Amersham Biosciences

2.4. Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
DNase I	Roche
Exonuklease III	MBI Fermentas
Klenow Fragment	MBI Fermentas
Mung-Bean Nuclease	Amersham Biosciences
Platinum Pfx DNA Polymerase	Invitrogen
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, New England Biolabs
RNase A	Serva
Taq-Polymerase	Eppendorf
T4-DNA-Ligase	Amersham Biosciences
T4-Polynukleotid-Kinase	MBI Fermentas

2.5. *Euglena* Stamm

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

2.6. Bakterienstämme

Es wurden folgende *E. coli* Stämme verwendet: NM522 (Gough und Murray 1983), POP13 (Schwarz-Sommer et al. 1987), SOLR (Stratagene) und XL1-Blue MRF' (Stratagene). Zusätzlich wurden folgende *E. coli* Stämme als Expressionsstämme verwendet: BL21(DE3) (Novagen), Origami(DE3) (Novagen) und Rosetta(DE3) (Novagen).

2.7. Vektoren

Als Plasmidvektor wurde pBluescript SK+ (Stratagene) verwendet. Für die Klonierung der cDNA Bank wurde der λ ZAP II Vektor (Stratagene) verwendet. Als Expressionsvektoren wurden pET-28a (Novagen) und pET-32a (Novagen) verwendet.

2.8. Primer

Alle verwendeten Primer wurden von den Firmen Metabion oder MWG-Biotech synthetisiert.

Für die Sequenzierung von Fragmenten im pBluescript SK+ wurden folgende Fluoreszenz-markierte Primer verwendet:

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'

Für die Sequenzierung von Fragmenten im pET-28a und pET-32a wurden folgende Fluoreszenz-markierte Primer verwendet:

T7proext 5'-IRD700-CGC GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG-3'
 T7term 5'-IRD800-ATG CTA GTT ATT GCT CAG CGG-3'

Folgende degenerierte Primer wurden zur Amplifikation des TER-Fragments aus *Euglena* cDNA verwendet:

pep7for 5'-GGI TGG TAY AAY ACI GTI GC-3'
 pep9rev 5'-GTY TCR TAI CCI GCR AAR TC-3'

Zur Klonierung des *ter* Gens in die Vektoren pET-28a und pET-32a wurden die im Folgenden aufgeführten Primer verwendet. Die am 5'-Ende der Primer enthaltene Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen.

TER1Ndefor 5'-TAT ACA TAT GTC GTG CCC CGC CTC GCC GTC TG-3'
Nde I

TER1Bglfor 5'-TAT AGA TCT TAT GTC GTG CCC CGC CTC GCC GTC TG-3'
Bgl II

TER2Ndefor 5'-TAT ACA TAT GTT CAC CAC CAC AGC GAA GGT CAT CC-3'
Nde I

TER2Bglfor 5'-TAT AGA TCT TAT GTT CAC CAC CAC AGC GAA GG-3'
Bgl II

TERXhorev 5'-TAT CTC GAG CTA CTG CTG GGC AGC ACT GG-3'
Xho I

2.9. Arbeiten mit *Euglena*

2.9.1. Anzucht von *Euglena*

Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml TYS-Medium (0,1 % (w/v) Natriumacetat; 0,1 % (w/v) Fleischextrakt; 0,2 % (w/v) Trypton; 0,2 % (w/v) Hefeextrakt; 0,02 % (w/v) KNO₃; 0,001 % (w/v) MgSO₄·7H₂O; 0,002 % (w/v) (NH₄)₂HPO₄; 0,004 % (w/v) CaSO₄) in einem Licht-Klima-Schrank (Sanyo MLR-350) bei 28 °C und kontinuierlicher Beleuchtung von 5000 lx. Diese Vorkulturen wurden zum Animpfen der Großkulturen verwendet, deren Anzucht entweder in 10 l Kolben oder im Fermenter erfolgte.

Die Anzucht in den 10 l Kolben erfolgte in 5 l TYS-Medium für ca. 5 Tage unter den gleichen Bedingungen wie die Vorkulturen. Aerobe Kulturen wurden mit 2 l/min Luft begast und anaerobe Kulturen mit 2 l/min Stickstoff. Nach Erreichen der stationären Phase nach ca. 5 Tagen konnten ca. 2 g Zellen (Frischgewicht) pro Liter Kultur geerntet werden.

Für die Anzucht im Fermenter (BIOSTAT B 10L, Braun Biotech) wurde ein modifiziertes Koren-Hutner Medium (Ogbonna et al. 1998, Yamane et al. 2001) verwendet. Ein Liter Medium war zusammengesetzt aus 12 g Glukose; 0,8 g KH_2PO_4 ; 1,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g CaCO_3 ; 0,0144 g H_3BO_3 ; 2,5 mg Vitamin B_1 ; 20 μg Vitamin B_{12} ; 1 ml Spurenelementlösung; 1 ml Fe-Lösung. Die Spurenelementlösung war zusammengesetzt aus 4,4 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,16 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,3 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,32 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,38 g $\text{CoSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ pro 100 ml destilliertem Wasser, und die Fe-Lösung bestand aus 1,14 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 1 g EDTA pro 100 ml destilliertem Wasser. Der pH des Mediums wurde während der gesamten Dauer der Kultur bei 2,8 gehalten. Das Kulturvolumen betrug 7 l und die Anzucht erfolgte bei 28 °C, kontinuierlicher Beleuchtung von 5000 lx und Rühren bei 200 rpm. Aerobe Kulturen wurden mit 2 l/min Luft begast und anaerobe Kulturen mit 2 l/min Stickstoff. Die Ernte der Kulturen erfolgte 5 Tage nach dem Animpfen mit einer Startdichte von 35000 Zellen/ml. Es konnten ca. 20 g Zellen (Frischgewicht) pro Liter Kultur geerntet werden.

Die Ernte der Kulturen erfolgte bei beiden beschriebenen Anzuchtmethoden durch Zentrifugation bei 2000 g für 5 min. Die Zellen wurden entweder direkt verwendet (Isolation von Mitochondrien) oder bei -80 °C eingefroren (Isolation von mRNA und biochemische Reinigung der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase).

2.9.2. Isolation von Mitochondrien

Die Herstellung von Spheroplasten aus *Euglena gracilis* durch partiellen Trypsin-Verdau der Pellikula und vorsichtiges mechanisches Aufbrechen, gefolgt von der Isolation einer mitochondrialen Fraktion durch differentielle Zentrifugation, erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Chaudhary und Merrett (1984). Die weitere Aufreinigung der Mitochondrien erfolgte über diskontinuierliche Percoll-Gradienten nach Inui et al. (1984a). Frisch geerntete *Euglena* Zellen wurden dreimal mit

Waschpuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 mit 0,3 M Sorbitol) gewaschen. Zellen mit einem Frischgewicht von ca. 10 g wurden in 16 ml Waschpuffer mit 8 mg Trypsin (Type II-S from porcine pancreas, Sigma) aufgenommen und für eine Stunde vorsichtig auf Eis gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 32 ml Waschpuffer mit 60 mg Trypsininhibitor (Type II-O from chicken white egg, Sigma) gestoppt, und die Zellen durch Zentrifugation bei 500 g für 5 min und 4 °C sedimentiert. Die Zellen wurden in 50 ml Aufschlusspuffer (25 mM HEPES-NaOH pH 7,4 mit 0,25 M Sorbitol) aufgenommen und für 20 min auf Eis kräftig gerührt. Nicht aufgebrochene Zellen wurden durch Zentrifugation bei 150 g für 5 min und 4 °C pelletiert und verworfen. Chloroplasten wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 g und 4 °C entfernt. Der Überstand wurde für 10 min bei 9000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 10 ml Aufschlusspuffer wieder aufgenommen und für 5 min bei 150 g und 4 °C zentrifugiert, gefolgt von einer Zentrifugation des Überstandes bei 3500 g für 10 min und 4 °C. Die resultierende grobe mitochondriale Fraktion wurde in 1 ml Resuspensionspuffer (10 mM MOPS-KOH pH 7,5 mit 0,25 M Saccharose) aufgenommen und über diskontinuierliche Percoll-Gradienten weiter aufgereinigt. Zur Erstellung der Percoll-Gradienten wurden jeweils 1,5 ml 50 %, 30 %, 20 % und 10 % (v/v) Percoll in Gradientenpuffer (25 mM Glycylglycine-KOH pH 7,4; 0,25 M Saccharose; 3 % (w/v) Ficoll) vorsichtig in einem Zentrifugenröhrchen übereinandergeschichtet. Pro Gradient wurden 0,5 ml grobe mitochondriale Fraktion geladen und für 30 min bei 7500 g und 4 °C in einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Die gereinigten Mitochondrien konnten aus der Interphase zwischen 50 % und 30 % Percoll abgenommen werden. Die Mitochondrien wurden 20-fach mit Resuspensionspuffer verdünnt und für 10 min bei 10000 g und 4 °C pelletiert.

2.9.3. Zellaufschluss für die Reinigung der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase

Jeweils 100 g gefrorene *Euglena* Zellen wurden mit 250 ml Aufschlusspuffer (25 mM HEPES-NaOH pH 7,4; 0,25 M Sorbitol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 µM FAD) versetzt und aufgetaut. Der Aufschluss erfolgt in einer French Press bei einem Druck von 1200 psi über jeweils zwei Durchgänge. Es folgte eine Zentrifugation bei 1500 g für 15 min und 4 °C. Der Überstand wurde für die weitere biochemische Reinigung der *trans*-2-Enoyl CoA Reduktase eingesetzt.

2.9.4. Fluoreszenzmarkierung von *Euglena* Mitochondrien

Zur Anfärbung von Mitochondrien in *Euglena* Zellen wurde der Farbstoff MitoTracker Green FM (Molecular Probes) verwendet. Zu einer 50 ml *Euglena* Kultur (siehe 2.9.1) wurde der in DMSO gelöste Farbstoff in einer Endkonzentration von 100 nM gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 28 °C im Lichtschrank wurden die Zellen für 3 min bei 1700 g pelletiert und in 50 ml frischem TYS-Medium (siehe 2.9.1) resuspendiert. Die Visualisierung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm im Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss) mit angeschlossener Digitalkamera (DP 50, Olympus) und Bildanalyse-Software (analySIS, Soft Imaging System).

2.10. Arbeiten mit *E. coli*

Die im Folgenden aufgeführten Arbeiten mit *E. coli* Stämmen wurden nach Standardprotokollen nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt:

- Herstellung der Kulturmedien: CY, LB und NZ
- Anzucht von Bakterienstämmen auf Fest- und Flüssigmedien
- Herstellung und Transformation von CaCl₂-kompeteten *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA
- Transfektion von *E. coli* Zellen mit λ -Phagen und die Vermehrung der λ -Phagen
- *E. coli* Zellen nach erfolgter Transformation mit rekombinanter pBluescript-Plasmid-DNA wurden 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.

2.10.1. Expressionskulturen

Um *E. coli* Klone auf ihre Expression zu testen, wurden Expressionskulturen in einem Volumen von 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Einzelkolonie angeimpft. Zur Aufreinigung und Aktivitätsmessung der exprimierten Proteine wurde eine Expressionskultur in einem Volumen von 50 oder 100 ml LB angeimpft. Die Kulturen wurden unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-1 angezogen. Die Induktion der Expression erfolgte entweder für 2-3 h bei 37 °C oder über Nacht bei 16 °C durch die Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,4 mM.

2.10.2. Aufschluss von Expressionskulturen

Die *E. coli* Kulturen aus 2.10.1 wurden für 10 min bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet wurde in Lysis-Puffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) aufgenommen. Nach der Zugabe von Lysozym (1 mg/ml) wurden die Proben für 30 min bei 4 °C inkubiert. Der Aufschluss erfolgte auf Eis durch Ultraschall in 6 Intervallen von je 10 s und je 10 s Pause bei 80 W. Danach wurden die Proben mit RNase A (10 µg/ml) und DNase I (5 µg/ml) versetzt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer für 30 min bei 10000 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand beinhaltet die löslichen Zellbestandteile und wurde zur Aktivitätsmessung (siehe 2.11.12) oder Aufreinigung der rekombinanten Proteine (siehe 2.11.15) eingesetzt.

2.11. Arbeiten mit Proteinen

2.11.1. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Es wurden jeweils 5-20 µl der jeweiligen Probe mit 1 ml Bradfordreagenz (Biorad Protein Assay) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die Extinktion bei 595 nm gegen einen Nullwert bestimmt. Die Erstellung einer Eichgerade erfolgte mit Rinderserumalbumin als Standard.

2.11.2. SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Die Herstellung der Lösungen, das Gießen der Gele sowie die elektrophoretische Trennung erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Die SDS-PAGE erfolgte mit 12 % Trenngelen in PerfectBlue Twin S oder Twin M Systemen (Peqlab) oder in einer Hoefer SE 600 Elektrophorese Einheit (Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/5 Volumen Probenpuffer (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 5 mM EDTA; 5 % (w/v) SDS; 25 % (v/v) Mercaptoethanol; 50 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei 98 °C denaturiert.

2.11.3. 2D-PAGE

Die Auftrennung von mitochondrialen Proteinen aus *E. gracilis* erfolgte nach Görg et al. (1985, 1988). Die isoelektrische Fokussierung wurde mit Hilfe eines IPGphor Isoelektrischen Fokussierung Systems (Amersham Biosciences) durchgeführt. Bis zu 1 mg Protein wurde im Rehydrationspuffer (7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 4 % (w/v) CHAPS; 0,5 % (v/v) IPG-puffer; Bromphenolblau) aufgenommen. In dieser Lösung erfolgte die Quellung des IPG-Strips (18 cm; pH 3-10; Amersham Biosciences) für 12 h bei 20 °C. Die Fokussierung erfolgte für 0,5 h bei 100 V; 1 h bei 500 V; 1 h bei 1000 V und 9 h bei 8000 V. Anschließend wurden die IPG-Strips für 30 min in Equilibrierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,8; 6 M Harnstoff; 30 % (v/v) Glycerin; 2 % (w/v) SDS; Bromphenolblau) mit 1 % (w/v) DTT equilibriert und dann nochmals für 30 min in Equilibrierungspuffer mit 3 % (w/v) Iodoacetamid. Die IPG-Strips wurden auf eine 12 % SDS-PAGE geladen und mit Agarose Sealing Lösung (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; 0,5 % (w/v) Agarose; Bromphenolblau) bedeckt. Die SDS-PAGE erfolgte in einer Hoefer SE 600 Elektrophorese Einheit (Amersham Biosciences) bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel.

2.11.4. Präparative PAGE

Die präparative PAGE erfolgte in einer Mini Prep Cell (Bio-Rad). Die Elektrophorese erfolgte in einem zylindrischen Gel und die über das Gel aufgetrennten Proteine konnten am Ende des Gels über eine vom Hersteller gelieferte Kammer mit einem kontinuierlichen Pufferfluss fraktioniert aufgefangen werden. Die Durchführung der präparativen PAGE erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.11.5. Färbung von Proteingelen

Die Coomassiefärbung von Proteingelen erfolgte nach Neuhoff et al. (1988) unter Verwendung der kolloidalen Eigenschaften des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G-250 oder nach einem modifizierten Protokoll von Heukeshofen und Dernick (1988). Bei dieser Methode wurde eine Tablette Phast Gel Blue R-350 (Amersham Biosciences) in 80 ml Wasser unter Rühren gelöst. Nach Zugabe von 120 ml Methanol wurde die Lösung filtriert und konnte bei 4 °C gelagert werden. Zur Färbung der Gele wurde eine 1:10 Verdünnung der Lösung in 10 % (v/v) Essigsäure hergestellt und auf 90 °C erhitzt. Die Gele wurden für 10 min bis 60 min in der Färbelösung belassen und anschließend wurde der Hintergrund mit 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt.

Die Silberfärbung von Proteingelen erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Blum et al. (1987). Zunächst wurden die Gele für 1 h fixiert (30 % (v/v) Methanol; 12 % (v/v) Essigsäure) und dann für dreimal 20 min in 30 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die Vorinkubation erfolgte für 1 min mit 0,02 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, gefolgt von dreimaligem Waschen für jeweils 20 s in Wasser. Anschließend wurden die Gele für 30 min imprägniert (0,2 % (w/v) AgNO_3 ; 0,075 % (v/v) Formaldehyd) und für zweimal 2 min in Wasser gewaschen. Nach der Entwicklung (6 % (w/v) Na_2CO_3 ; 0,0004 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 0,05 % (v/v) Formaldehyd) bis zur gewünschten Färbung wurden die Gele abschließend für mindestens 10 min in Stopplösung (50 % (v/v) Methanol; 12 % (v/v) Essigsäure) inkubiert.

2.11.6. Western Blot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden die Proteine aus der SDS-PAGE mittels elektrophoretischen Transfers auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (nach Gershoni und Palade 1983). Der Transfer wurde in einem Semi-Dry Blot System (Nova Blot Multiphor II; Amersham Biosciences) durchgeführt. Die Nitrocellulose-Membran (Hybond C Extra, Amersham Biosciences) wurde vor der Verwendung 5 min in H_2O equilibriert. Auf die mit H_2O befeuchtete Anode des Semi-Dry Blot Systems wurden 3 Lagen Whatman-Papier geschichtet, die zuvor in Transferpuffer (39 mM Glycin; 48 mM Tris; 0,037 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Methanol) getränkt wurden. Auf das Whatman-Papier wurde luftblasenfrei die Nitrocellulose-Membran gelegt und darauf das in H_2O gewaschene Trenngel aus der SDS-PAGE. Den Abschluss bildeten 3 Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier. Bei 1 mA/cm^2 für 1 h wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulose-Membran übertragen. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurden die Proteine direkt auf der Membran reversibel gefärbt. Dazu wurde die Membran für 1 min in Ponceau-Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S; 3 % (v/v) Essigsäure) geschwenkt und der Hintergrund durch Waschen in H_2O entfernt.

2.11.7. Immunodetektion

Zum Nachweis von rekombinanten Proteinen mit His-Tag diente ein monoklonaler Maus IgG His-Tag Antikörper (Novagen). Die Ponceau-gefärbte Nitrocellulose-Membran (siehe 2.11.6) wurde für 2×10 min in TBS (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) entfärbt und dann für 1 h in Blocking-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5;

150 mM NaCl; 3 % (w/v) BSA) inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 2 x 10 min in TBST (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween 20; 0,2 % (v/v) Triton-X-100) und 1 x 10 min in TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (0,1 µg/ml in Blocking-Puffer) erfolgte für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde wiederum 2 x 10 min in TBST und 1 x 10 min in TBS gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Maus aus Ziege (Amersham Biosciences) in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS mit 5 % (w/v) Magermilchpulver verwendet. Nach erneutem Waschen für 3 x 10 min in TBST erfolgte die Nachweisreaktion der Meerrettich-Peroxidase. Der Nachweis wurde mit Hilfe des ECL Western Blotting Analysis Systems (Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben durchgeführt. In Abhängigkeit von der Signalstärke wurde die Membran für 1-5 min auf XAR-Filmen (Kodak) exponiert.

2.11.8. Im-Gel Proteolyse

Zur Sequenzierung ausgewählte Proteinspots aus 2D Gelen oder Banden aus SDS-PAGE Gelen wurden aus den entsprechenden Gelen herausgestochen oder geschnitten und mit Hilfe von Trypsin im Gel verdaut. Der Behandlung der Proben erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Jensen et al. (1998). Die Gelstücke wurden zunächst zweimal für 15 min mit 50 % (v/v) Acetonitril gewaschen und dann sukzessiv mit 100 % Acetonitril und 100 mM NH₄HCO₃ für jeweils 5 min inkubiert. Nach einer Behandlung mit 100 mM NH₄HCO₃/Acetonitril 1:1 für 15 min wurden die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf) eingetrocknet. Zu den trockenen Gelstücken wurde in 10 µl Portionen 10 ng/µl Trypsin (Promega) in 50 mM NH₄HCO₃ gegeben, bis die Gelstücke vollständig gequollen waren. Die überschüssige Trypsinlösung wurde entfernt, und die gequollenen Gelstücke wurden mit 25 mM NH₄HCO₃ bedeckt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Extraktion der Peptide erfolgte für 2 min in einem Ultraschallbad. Die Flüssigkeit wurde gesammelt und die verbliebenen Gelstücke wurden zunächst für 20 min mit 25 mM NH₄HCO₃ und dann für 15 min mit 25 mM NH₄HCO₃/Acetonitril 1:1 inkubiert. Nach erneuter Extraktion im Ultraschallbad für 2 min wurde die Flüssigkeit in demselben Gefäß wie oben gesammelt. Die verbliebenen Gelstücke wurden zweimal 15 min mit 5 % (v/v) Ameisensäure/Acetonitril 1:1 inkubiert und die Flüssigkeiten wieder gesammelt. Die

vereinigten Überstände wurden in der Vakuumzentrifuge bei 60 °C auf 10–15 µl eingeeengt.

2.11.9. Proteinsequenzierung

Vor der Proteinsequenzierung wurden die Proben über C18 ZipTips (Millipore) entsalzt. Die Sequenzierung der Proben aus den 2D Gelen wurde am BMFZ Düsseldorf unter Verwendung eines ESI-Q-TOF-MS/MS (Applied Biosystems QSTAR XL) von Dr. Sabine Metzger durchgeführt. Die Peptide aus der chromatographischen Reinigung der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase wurden von Dr. Markus Piotrowski, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Ruhr-Universität Bochum, mittels ESI-Q-TOF-MS/MS (Micromass Q-TOF2) sequenziert.

2.11.10. Entsalzen, Umpuffern und Konzentrieren von Proteinproben

Im Verlauf der Reinigung der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase wurden Proteinproben mit Hilfe von Amicon Ultra (Millipore) oder Ultrafree 4 und Ultrafree 15 (Millipore) Ultrafiltrationseinheiten mit dem entsprechenden Molekulargewichtsausschluss konzentriert. Für kleine Volumina wurden Microcon Mikrokonzentratoren (Amicon) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den jeweiligen Herstellerangaben. Zum Umpuffern und Entsalzen wurden Sephadex-G25 Fertigsäulen, sogenannte PD 10 Säulen (Amersham Biosciences), nach Herstellerangaben verwendet. Größere Probenvolumen wurden unter der Verwendung von Dialysierschläuchen (Roth) gegen den entsprechenden Puffer dialysiert.

2.11.11. Bestimmung von Markerenzym Aktivitäten

Die Bestimmung der Aktivität der Succinatsemialdehyd Dehydrogenase (E.C. 1.2.1.16) als Marker für *Euglena* Mitochondrien erfolgte nach Tokunaga et al. (1976). Als Marker für Chloroplasten wurde Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (NADP⁺) (E.C. 1.2.1.13) verwendet und die Durchführung des enzymatischen Tests erfolgte wie bei Theiss-Seuberling (1984) beschrieben. Die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.27) als Marker für die cytosolische Fraktion wurde nach Tokunaga et al. (1979) bestimmt.

2.11.12. Enzymatischer Test zur Bestimmung der TER-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase (TER) erfolgte nach modifizierten Protokollen von Inui et al. (1984a) und Seubert et al. (1968). Der Reaktionsansatz beinhaltete 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,2; 0,75 mM Crotonyl-CoA (Sigma); 0,4 mM NADH, 2 μ M FAD und Enzym. Es erfolgte eine Vorinkubation des Reaktionsansatzes ohne Substrat für 10 min bei 30 °C. Die eigentliche Aktivitätsmessung erfolgte ebenfalls bei 30 °C und wurde durch die Zugabe des Substrats gestartet. Die Aktivität wurde über die Abnahme der Extinktion bei 340 nm bestimmt. Das Endvolumen der Reaktion betrug 1 ml (Ultrospec 2000 Spectrophotometer, Amersham Biosciences) oder 200 μ l (GENios microplate reader, Tecan Instruments).

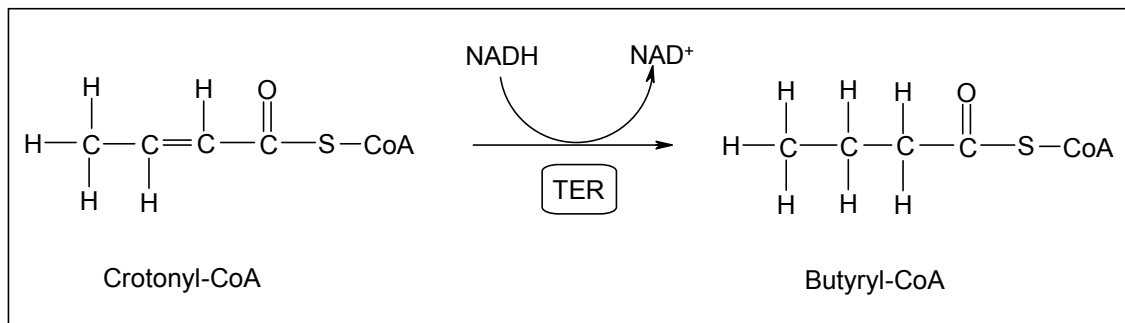


Abb. 2-1 Reaktionsschema zum enzymatischen Nachweis der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase Aktivität.

2.11.13. Säulenchromatographie

Die Durchführung der säulenchromatographischen Reinigungsschritte erfolgte mit Hilfe von Drucksäulen in Verbindung mit einem FPLC System (Amersham Biosciences). Die Säulen wurden nach Herstellerangaben gepackt, oder es wurden Fertigsäulen verwendet. Die angegebenen Dimensionen beziehen sich auf das Säulenbett. Alle bei der chromatographischen Reinigung verwendeten Puffer wurden durch eine 0,45 μ m Nitrocellulose Membran (Sartorius) filtriert und entgast.

2.11.14. Reinigung der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase

Die Reinigung der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase erfolgte aus insgesamt 1 kg aerob angezogenen *Euglena gracilis* Zellen. Alle Arbeiten erfolgten bei 4 °C mit Ausnahme der FPLC Läufe, die bei RT durchgeführt wurden.

2.11.14.1. Ammoniumsulfatfällung

Der Überstand von jeweils 100 g *Euglena* Zellen aus dem unter 2.9.3 beschriebenen French Press Aufschluss wurde einer 30 % Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Dem Überstand wurde schrittweise unter Rühren Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 30 % zugegeben. Dabei wurde der pH Wert der Lösung ständig kontrolliert und durch die Zugabe von 1 M NaOH bei 7,0 gehalten. Nach der Zugabe des Ammoniumsulfats wurde die Probe für 30 min gerührt. Es folgte eine Zentrifugation für 60 min bei 20000 g. Der Überstand wurde über Nacht gegen 10 l Puffer A (25 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 µM FAD) mit ein- bis zweimaligem Wechsel des Puffers dialysiert, bis eine Leitfähigkeit der Probe von unter 5 mS/cm erreicht wurde. Das Dialysat wurde für 20 min bei 20000 g zentrifugiert.

2.11.14.2. Chromatographie über DEAE-Fraktogel

Eine 2,6 x 12 cm DEAE-Fraktogel EMD 650 S Säule (Merck) wurde mit 180 ml Puffer A (25 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 µM FAD) equilibriert und mit dem Überstand des Dialysats aus 2.11.14.1 beladen. Die Säule wurde mit 120 ml Puffer A gewaschen. Die Proteine wurden mit einem 100 ml Gradienten von 0-1 M KCl in Puffer A bei einer Flussrate von 3 ml/min eluiert. Fraktionen von 2 ml wurden gesammelt und auf TER-Aktivität getestet (siehe 2.11.12). Um das gesamte Dialysat aus dem French Press Aufschluss mit nachfolgender Ammoniumsulfatfällung von insgesamt 1 kg *Euglena* Zellen über DEAE-Fraktogel zu reinigen, wurden 10 Läufe über diese Säule durchgeführt. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen Puffer B (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 M NH₄(SO₄)₂; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 µM FAD) dialysiert.

2.11.14.3. Chromatographie über Phenyl Sepharose

Es wurden vier Läufe über eine 2,6 x 14 cm Phenyl Sepharose 6 Fast Flow Säule (Amersham Biosciences) durchgeführt. Die Säule wurde mit 210 ml Puffer B (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 M NH₄(SO₄)₂; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 µM FAD) equilibriert und anschließend mit dem Dialysat aus 2.11.14.2 beladen. Nach dem Waschen der Säule mit 140 ml Puffer B, wurden die Proteine mit einem 140 ml Gradienten von 1-0 M NH₄(SO₄)₂ in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 1 mM EDTA, 1 mM DTT und 1 µM FAD eluiert (Flussrate von 5 ml/min). Es wurden Fraktionen von 2,5 ml gesammelt und auf TER-Aktivität getestet. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen

Puffer A (25 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 μ M FAD) dialysiert.

2.11.14.4. Chromatographie über Reaktive Red

Eine mit 120 ml Puffer A (25 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 μ M FAD) equilibrierte Reaktive Red 120 Säule (1,6 x 9 cm) wurde in 5 Läufen mit dem Dialysat aus 2.11.14.3 beladen und mit 100 ml Puffer A gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem 200 ml Gradienten von 0-1 M KCl in Puffer A bei einer Flussrate von 3 ml/min, dabei wurden Fraktionen von je 3 ml gesammelt und auf TER-Aktivität getestet. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen Puffer C (10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8; 1 mM DTT; 1 μ M FAD) dialysiert.

2.11.14.5. Chromatographie über Hydroxyapatit

Mit dem Dialysat aus 2.11.14.4 wurden 8 Läufe über eine Eco-Pac CHT II Cartridge (Bio-Rad) durchgeführt. Die Säule wurde mit 15 ml Puffer C (10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8; 1 mM DTT; 1 μ M FAD) equilibriert und nach dem Laden der Probe mit 60 ml Puffer C gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem 25 ml Gradienten von Puffer C nach Puffer D (500 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8; 1 mM DTT; 1 μ M FAD) mit einer Flussrate von 1,5 ml/min, wobei Fraktionen von jeweils 1 ml gesammelt wurden. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen Puffer E (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 μ M FAD) dialysiert.

2.11.14.6. Chromatographie über Mono Q

Eine Mono Q HR 5/5 Säule (Amersham Biosciences) wurde mit 30 ml Puffer E (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 μ M FAD) equilibriert und in 3 Läufen mit dem Dialysat aus 2.11.14.5 beladen. Die Säule wurde mit 15 ml Puffer E gewaschen, und die Elution der Proteine erfolgte mit einem 20 ml Gradienten von 0-1 M KCl in Puffer E mit einer Flussrate von 1 ml/min. Es wurden Fraktionen von je 280 μ l gesammelt und auf TER-Aktivität getestet. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und über PD 10 Säulen (Amersham Biosciences) auf Puffer F (50 mM Tris-25 mM Borsäure pH 8,7; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 μ M FAD) umgepuffert.

2.11.14.7. Präparative PAGE mit der Mini Prep Cell

Es wurden 6 Läufe über kontinuierliche, native Gele in der Mini Prep Cell (Bio-Rad) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Probe aus 2.11.14.6 wurde wie unter 2.11.10 beschrieben konzentriert, so dass pro Lauf ein Volumen von je 30 µl aufgetragen wurde. Vor dem Auftragen wurde die Probe mit 1 Volumen Ladepuffer (5 mM Tris-2,5 mM Borsäure pH 8,7; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM DTT; 0,1 µM FAD; 20 % (w/v) Glycerin; Bromphenolblau) versetzt. Es wurde ein 6 cm langes Polyacrylamidgel (6 %ig in Puffer F) verwendet und die Elektrophorese wurde bei 250 V durchgeführt. Die Elution der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 0,1 ml/min in Puffer F (50 mM Tris-25 mM Borsäure pH 8,7; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 µM FAD). Es wurden Fraktionen von 0,2 ml aufgefangen und auf TER-Aktivität getestet. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und gegen Puffer G (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 µM FAD) umgepuffert und konzentriert.

2.11.14.8. Chromatographie über Superdex 200

Eine Superdex 200 HR 10/30 Säule (Amersham Biosciences) wurde mit 100 ml Puffer G (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 µM FAD) equilibriert und in 3 Läufen mit der Probe aus 2.11.14.7 beladen. Die Elution der Proteine erfolgte mit 25 ml Puffer G (Flussrate 0,25 ml/min) und es wurden Fraktionen von 230 µl gesammelt. Fraktionen mit TER-Aktivität wurden mittels SDS-PAGE (siehe 2.11.2) auf ihre Reinheit überprüft. Banden reiner Fraktionen wurden aus dem Gel ausgeschnitten, einem Im-Gel Verdau unterzogen (siehe 2.11.8) und zur Proteinsequenzierung eingesetzt (siehe 2.11.9)

2.11.15. Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die Aufreinigung von 6 x Histidin markierten Proteinen erfolgte über Immobilisierte Metall Affinitätschromatographie (IMAC) nach Porath et al. (1975). Als chromatographisches Material wurde Ni-NTA Agarose (Qiagen) eingesetzt. Nach dem Zellaufschluss (siehe 2.10.2) wurden 4 ml lösliche Fraktion mit 1 ml 50 % Ni-NTA Matrix versetzt und für 1 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in eine Polypropylene Säule (Qiagen) gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Es folgten zwei Waschstritte mit je 4 ml Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol). Danach wurde viermal mit 0,5 ml Elutionspuffer (50 mM

NaH₂PO₄ pH 8,0; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol) eluiert. Alternativ erfolgte die Aufreinigung über Ni-NTA spin columns (Qiagen) nach Herstellerangaben.

2.12. Arbeiten mit Nukleinsäuren

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

Präparation, Reinigung und Analyse von Nukleinsäuren:

- Mini- und Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* nach Herstellerangaben des Nucleospin- (Macherey-Nagel) oder Jetstar-Systems (Genomed)
- Phenolextraktion und Konzentrierung von Lösungen aus wässrigen Lösungen durch Ethanol- oder Isopropanolextraktion
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Trennung von Nukleinsäuren bzw. DNA-Fragmenten und deren Größenbestimmung durch Agarosegelelektrophorese

Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren:

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

Weitere molekularbiologische Techniken:

- Herstellung von cDNA (nach Herstellerprotokoll)
- Verpacken von cDNA mit Gigapack Gold Verpackungsextrakten (nach Herstellerprotokoll)
- Ausplattierung von cDNA Banken
- Identifizierung rekombinanter Phagen durch Plaque-Hybridisierung

2.12.1. 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 Magnesiumacetat; 0,2 mM je dNTP; 1 µM je Primer und 1 U Taq-Polymerase (Eppendorf). Es wurden 10-20 ng Plasmid-DNA bzw. cDNA als Template eingesetzt. Die Zugabe der Taq-Polymerase erfolgte erst nach einer anfänglichen Denaturierung für 10 min bei 98 °C. In einem Thermocycler wurden 30 Zyklen von 30 s 94 °C (Denaturierung); 30 s 50 °C (Hybridisierung); 90 s 72 °C (Synthese) gefahren. Bei PCR mit degenerierten Primern wurde ein Gradient von verschiedenen Hybridisierungstemperaturen gefahren und die beste Temperatur zur Hybridisierung des entsprechenden Primerpaares ermittelt. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden 5 µl der Ansätze zur Kontrolle auf einem Agarosegel analysiert.

2.12.2. Klonierung von PCR-Fragmenten

Für die Klonierung eines PCR-Fragments mit glatten Enden wurde der komplette Reaktionsansatz aus 2.12.1 auf einem Agarosegel aufgetrennt und die entsprechende Bande dann aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution des DNA-Fragments aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die Phosphorylierung mit 20 U T4-DNA Kinase und 0,01 M ATP erfolgte für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurden die Enden des DNA-Fragments durch Zugabe von 3 U Klenow-Fragment und 50 µM je dNTP geglättet. Nach Inkubation für 30 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,05 M EDTA pH 8,0 gestoppt und anschließend phenolisiert, gefällt und das Pellet in TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA) wieder aufgenommen. Nach Abtrennung der dNTPs über das QIAquick Gel Extraction Kit erfolgte die Ligation der DNA-Fragmente in die HincII-Schnittstelle des HincII geschnittenen, dephosphorylierten Vektors pBluescript SK+ (Stratagene). Die Ligation erfolgte mit T4-DNA-Ligase über Nacht bei 12 °C oder für 15 min bei RT mit Hilfe des Quick Ligation Kit (New England Biolabs). Zur Transformation wurde der komplette Ligationsansatz eingesetzt.

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

Zunächst wurde Gesamt-RNA aus *Euglena* isoliert. Dazu wurden 5 g gefrorene *Euglena* Zellen unter flüssigem Stickstoff fein gemörsert und mit 20 ml Resuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 30 mM 2-Mercaptoethanol; 2 %

(w/v) SDS; 4 M Guanidiniumthiocyanat; 5 % (w/v) Polyklar) versetzt. Das Homogenat wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und durch Schütteln mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Zur Phasentrennung erfolgte eine Zentrifugation für 5 min und 5000 g bei RT. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 6,5 und Inkubation für 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit anschließender Zentrifugation für 20 min bei 6000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und für 5 min bei 6000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Nach Aufnahme des Pellets in 5 ml TE mit 50 μg Proteinase K und 30 mM 2-Mercaptoethanol wurden zur Fällung der RNA 1,25 ml 10 M LiCl zugegeben. Die Fällung erfolgte über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die RNA wurde bei 10000 g für 10 min und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert, mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und für 10 min bei 10000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Die in 5 ml DEPC behandeltem Wasser aufgenommene RNA wurde mit 2 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 6,5 für 2 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 10000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 10000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Die Aufnahme der pelletierten Gesamt-RNA erfolgte in 2 ml TE. Die Aufreinigung der Poly(A)⁺ RNA aus der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des mRNA Purification Kits (Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben. Nach photometrischer Bestimmung der Konzentration wurde die Poly(A)⁺ RNA in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in TE aufgenommen und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.12.4. Isolierung von genomischer DNA aus *Euglena gracilis*

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *Euglena* wurde der Überstand der LiCl-Fällung aus 2.12.3 verwendet. Die DNA wurde mit 2 Volumen Ethanol gefällt und für 10 min bei 10000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert. Das Präzipitat wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 10 min bei 10000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 18 ml H_2O gelöst und durch Zugabe von 360 μl EDTA pH 8,0; 2,25 ml 5M NaCl; 2,7 ml TE; 2,7 ml 2 % (w/v) CTAB erneut gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 12000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit anschließendem Waschen des Pellets mit 70 % (v/v) Ethanol und erneuter Zentrifugation für 10 min bei 12000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das getrocknete Pellet wurde in 2 ml TE aufgenommen und die Konzentration der genomischen DNA photometrisch bestimmt.

2.12.5. Herstellung von cDNA Banken aus *Euglena gracilis*

Die Synthese der cDNA unter Verwendung der RNase H Methode erfolgte aus zweifach Poly(A)⁺ aufgereinigter RNA (siehe 2.12.3) unter Verwendung des Time Saver cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben. Zur Erststrangsynthese wurden Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer und eine Reverse Transkriptase aus Moloney Murine Leukemia Virus verwendet. An die in der Zweitstrangsynthese mit Hilfe von RNase H und DNA Polymerase I synthetisierte cDNA wurden nach Phenol-Chloroform Extraktion und Aufreinigung über Sepharose CL-4B EcoR I/Not I Adaptoren ligiert. Die Adaptoren bestehen aus zwei Oligonukleotiden, die eine Heteroduplex bilden, so dass ein phosphoryliertes glattes Ende, ein nicht phosphorylierter EcoR I Überhang und eine interne Not I Schnittstelle entstehen. Nach Phosphorylierung der EcoR I Enden und Entfernung der überschüssigen und dimerisierten Adaptoren wurde die cDNA in den dephosphorylierten EcoR I geschnittenen Vektor ligiert. Verwendet wurde der Lambda ZAP II Vektor (Stratagene). Nach der Ligation in den Vektor erfolgte die Verpackung mit Hilfe des Gigapack III Gold Verpackungsextrakts (Stratagene). Aus der so erhaltenen Phagen Bank konnten mittels In-Vivo-Exzision unter Verwendung des ExAssist Helferphagen pBluescript Phagemide zur Analyse der Insertionen im Plasmid-System ausgeschleust werden.

2.12.6. Identifizierung rekombinanter Klone

Die Herstellung von Replikafiltern und die Plaquehybridisierung zur Identifizierung rekombinanter Klone erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook et al. 1989). Etwa 250000 Klone der cDNA Bank (siehe 2.12.5) wurden mit *E. coli* POP13 auf 40 Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden von diesen Platten Replikafilter (Nitrocelluloserundfilter, Durchmesser 82 mm) abgezogen. Die Filter wurden mindestens 1 h bei 68 °C in 6 x SSPE (900 mM NaCl; 60 mM NaH₂PO₄; 7,5 mM EDTA pH 8,0) mit 0,1 % (w/v) SDS; 0,02 % (w/v) PVP; 0,02 % Ficoll 400 und 5 µg/ml Poly A vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 °C in 3 x SSPE mit 0,1 % (w/v) SDS; 0,02 % (w/v) PVP; 0,02 % Ficoll 400; 5 µg/ml Poly A und 10 ng/ml Hybridisierungssonde. Nach der Hybridisierung wurden die Filter für dreimal 20 min bei 68 °C in 2 x SSPE mit 0,1 % (w/v) SDS gewaschen, getrocknet und auf XAR-Filmen (Kodak) über Nacht bei -80 °C mit Verstärkerfolie exponiert. Plaques, die ein positives Signal aufwiesen, wurden mit dem stumpfen Ende einer Pasteurpipette gestochen und für mindestens eine 1 h bei RT in SM Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5;

100 mM NaCl; 8 mM MgSO₄; 0,01 % (w/v) Gelatine) inkubiert. Zur Vereinzelnung wurde eine geeignete Verdünnung dieser Phagensuspension ausplattiert. Nach der Herstellung von Replikafilern wurde mit der gleichen Sonde wie zuvor hybridisiert. Einzelne Plaques, die eindeutig einem Signal auf den Röntgenfilmen zuzuordnen waren, wurden gepickt und für die Subklonierung verwendet.

2.12.7. Southern-Analyse

Je 20 µg genomische DNA aus *Euglena* (siehe 2.12.4) wurden mit 25 U eines Restriktionsenzym geschnitten und auf einem 1 % Agarosegel über Nacht bei 2 V/cm aufgetrennt. Das Gel wurde fotografiert und bei RT unter Schütteln mit den folgenden Lösungen inkubiert: 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 8,0). Danach wurde die DNA mit 20 x SSPE im Trockenblotverfahren nach Sambrook et al. (1989) auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham Biosciences) übertragen. Die Membran wurde 2 x 5 min in 6 x SSPE gewaschen, getrocknet und zur Fixierung der DNA für 3 min mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt. Die Vorhybridisierung der Membran erfolgte für mindestens 1 h bei 68 °C in 6 x SSPE mit 0,1 % (w/v) SDS; 0,02 % (w/v) PVP; 0,02 % Ficoll 400 und 5 µg/ml Poly A. Danach wurde die Membran über Nacht bei 68 °C in 3 x SSPE mit 0,1 % (w/v) SDS; 0,02 % (w/v) PVP; 0,02 % Ficoll 400; 5 µg/ml Poly A und 10 ng/ml Hybridisierungssonde hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran für dreimal 20 min bei 68 °C in 2 x SSPE mit 0,1 % (w/v) SDS gewaschen, getrocknet und auf XAR-Filmen (Kodak) über Nacht bei -80 °C mit Verstärkerfolie exponiert.

2.12.8. Northern Analyse

Die Auftrennung der RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem 1 % Agarosegel, das in 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 verwendeten Materialien wurden mit Hypochlorit behandelt, und alle Lösungen bzw. Puffer wurden zum Schutz vor RNasen mit 10 µg/ml Proteinase K versetzt. Pro Spur wurden 5 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 pH 8,0; 8 % (v/v) Formaldehyd; 1,4 % (w/v) Ficoll 400; 0,09 mg/ml Bromphenolblau) und 0,5 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) versetzt. Je 5 µg

Größenstandard (Promega) wurden in 5 µl TE gelöst und mit 9 µl Northern Ladepuffer und 0,5 µl Ethidiumbromid versetzt. Der Größenstandard und die RNA-Proben wurden für 15 min bei 60 °C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Nach einem Vorlauf des Agarosegels für 5 min bei 5 V/cm wurden die Proben aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte für ca. 3 h bei 4 V/cm in 1 x MOPS-Puffer mit einmaligem Wechsel des Puffers. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 3 x 20 min in H₂O gewaschen und für 5 min in 20 x SSC Puffer (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0) equilibriert. Der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham Biosciences) erfolgte über Kapillartransfer in 20 x SSC Puffer nach Standardprotokollen (Sambrook et al. 1989). Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran für 2 x 5 min in 2 x SSC gewaschen, getrocknet und zur Fixierung der RNA für 3 min mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt. Die Hybridisierung erfolgte wie bei der Southern-Analyse beschrieben (siehe 2.12.7).

2.12.9. Herstellung von Exonuklease III-Deletionsmutanten

Die Herstellung von Exonuklease III-Deletionsmutanten im pBluescript SK+ Vektor erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Henikoff (1984). Etwa 100 µg DNA (mindestens 5 µg DNA pro Exonuklease III Inkubationszeitpunkt) wurden in einem Volumen von 500 µl mit einem ersten Restriktionsenzym geschnitten, das einen 5'-Überhang erzeugt. Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz phenolisiert und mit Ethanol gefällt. Die pelletierte DNA wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 60 µl H₂O aufgenommen. Zum Schutz vor einem Abbau durch die Exonuklease III wurden die 5'-Überhänge durch αS-dNTPs aufgefüllt. Die Auffüllreaktion erfolgte für 30 min bei 37 °C in einem Reaktionsansatz von 400 µl, der das linearisierte Plasmid, 40 µl 10 x Klenowpuffer (500 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM MgCl₂), 2,5 mM DTT, je 20 µM αS-dNTPs und 10 U Klenow-Fragment enthielt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt und der Ansatz wurde phenolisiert, mit Ethanol gefällt und mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 100 µl H₂O wieder aufgenommen und die überschüssigen αS-dNTPs wurden über das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) abgetrennt. Der zweite Schnitt mit einem ebenfalls 5'-Überhang erzeugenden Restriktionsenzym erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 500 µl. Nach Abschluss der Spaltung wurde der Ansatz phenolisiert, mit Ethanol gefällt, mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und das Pellet in einer Konzentration von 1 µg/µl in TE gelöst. Für eine Reaktion mit beispielsweise 10 Entnahmezeitpunkten

wurden 25 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 250 µl in Exonukleasepuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM MgCl₂) mit 10 mM 2-Mercaptoethanol und 150 U Exonuklease III bei 37 °C inkubiert. Ab dem Startpunkt t₀ (Zugabe der Exonuklease III) wurden dem Ansatz im Abstand von 1 min 25 µl entnommen und auf Eis mit 175 µl Exonuklease-Stop-Lösung (20 µl 10 x Mung-Bean-Puffer (300 mM Natriumacetat pH 5,2; 500 mM NaCl; 10 mM ZnCl₂; 50 % (v/v) Glycerin) und 155 µl H₂O) gemischt. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 68 °C inkubiert und nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden pro Ansatz 15 U Mung-Bean-Nuklease zugegeben. Die Mung-Bean-Nuklease Reaktion erfolgte für 30 min bei 30 °C und wurde durch Zugabe von 20 µl Mung-Bean-Stop-Lösung (500 mM Tris-HCl pH 9,5; 0,25 M EDTA pH 8,0; 10 µg Proteinase K) und Inkubation für 15 min bei 37 °C gestoppt. Die Ansätze wurden phenolisiert, mit Ethanol gefällt, mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, und das Pellet wurde in je 20 µl TE wieder aufgenommen. Die DNA wurde in den pBluescript SK+ ligiert und zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue MRF' eingesetzt. Pro Zeitpunkt der Exonuklease III Reaktion wurden 5 Kolonien in LB angeimpft und DNA-Minipräparationen durchgeführt. Klone mit abnehmender Insertionslänge wurden ausgewählt und zur Sequenzierung eingesetzt (siehe 2.12.10).

2.12.10. Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode nach Sanger et al. (1977) und wurde als Laserfluoreszenz-Sequenzierung mit Hilfe eines DNA Sequencer Long Readir 4200 (Licor) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden 2-3 µg Plasmid DNA in einem Volumen von 20 µl H₂O eingesetzt. Die Sequenzierreaktionen wurden mit Hilfe des ThermoSequenase DYEnamic direct cycle sequencing Kits (Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Sequenzreaktionen wurden in einem automatisierten Verfahren durch einen RoboAmp 4200 (MWG Biotech) pipettiert. Dabei wurden 16 µl der vorgelegten 20 µl Plasmid DNA mit je 2 µl der mit Fluorescein (IRD-700, IRD-800) markierten Sequenzierprimer (je 1 µM) vermischt. Aus diesem Ansatz wurden dann je 3 µl auf 4 neue Reaktionsansätze verteilt und zu jedem Ansatz wurden 3 µl des entsprechenden Terminationsmixes (1:3 mit H₂O verdünnt) pipettiert. Die PCR-Reaktion erfolgte im Thermocycler des Roboamp 4200. Nach einmaliger Denaturierung bei 98 °C für 2,5 min wurden 25 Zyklen mit 1 min bei 98 °C (Denaturierung), 35 s bei 68,5 °C (Hybridisierung) und 2 min 71 °C (Synthese) gefahren. Nach Abschluss der PCR wurden die Proben mit 7 µl Formamid-Ladepuffer

(200 µl 0,5 M EDTA pH 8,0; 100 ml Paraosanilin (100 mg/ml); 9,5 ml Formamid) versetzt und für 3 min bei 70 °C denaturiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und jeweils 1,5 µl jeder Reaktion wurden auf ein Sequenzgel aufgetragen. Das Gießen und der Aufbau des Gels sowie die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.13. Bioinformatische Methoden

2.13.1. Sequenzanalyse

Zur Eingabe, Analyse und weiteren Bearbeitung der Sequenzen wurde das GCG Programmpaket (Version 10.3) der Genetics Computer Group, University of Wisconsin, verwendet (Devereux et al. 1984).

2.13.2. Datenbankvergleiche

Für die Suche nach homologen Sequenzen in GenBank wurden die Programme BLASTn, BLASTx und BLASTp des BLAST (basic local alignment tool)-Pakets am NCBI verwendet (Altschul et al. 1990).

2.13.3. Voraussagen über mögliche Transitpeptide

Mögliche Signalpeptide von Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe des MitoProtII-Programms (<http://www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/proj/medgen/mitofilter>) (Claros und Vincens 1996) und des iPSORT Programms (<http://psort.nibb.ac.jp/>) (Bannai et al. 2001, Bannai et al. 2002) untersucht.

3. Ergebnisse

3.1. Biochemische Charakterisierung des fakultativ anaeroben Mitochondriums von *Euglena gracilis*

Ziel der Proteomanalysen des Mitochondriums von *Euglena* war es, die biochemischen Veränderungen im Mitochondrium beim Übergang von aeroben zu anaeroben Bedingungen zu untersuchen und insbesondere die Enzyme der ungewöhnlichen ATP-unabhängigen Fettsäuresynthese zu charakterisieren. *Euglena gracilis* Zellen wurden unter aeroben und anaeroben Kulturbedingungen angezogen und Mitochondrien wurden aus Zellen beider Kulturbedingungen isoliert und aufgereinigt. Die Aufreinigung der Mitochondrien erfolgte über diskontinuierliche Percoll-Gradienten. Die gereinigten Mitochondrien konnten aus der Interphase zwischen 50 % und 30 % Percoll abgenommen werden (Abb. 3-1).

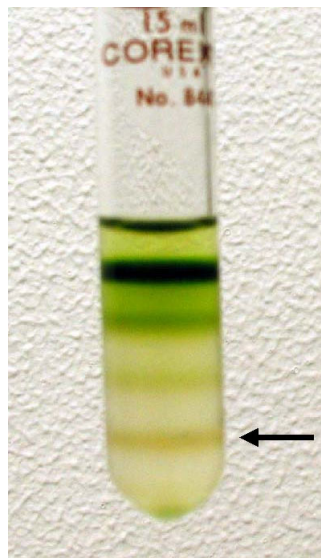


Abb. 3-1 Diskontinuierlicher Percoll-Gradient von 50 %, 30 %, 20 % und 10 % Percoll. Der Pfeil kennzeichnet die aufgereinigte Mitochondrien-Bande.

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Mitochondrien wurden Markerenzyme verwendet, deren Aktivitäten in Tabelle 3-1 zusammengefasst sind. Die Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase wurde als spezifischer Marker für *Euglena* Mitochondrien verwendet und weist sowohl bei Mitochondrien isoliert aus aeroben als auch aus anaeroben Zellen eine hohe spezifische Aktivität im Vergleich zum Rohextrakt auf. Eine Aktivität der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (NADP⁺) als Marker für Chloroplasten konnte in den mitochondrialen Fraktionen nicht nachgewiesen werden. Auch die als cytosolischer Marker verwendete Laktat-Dehydrogenase wies in

den isolierten Mitochondrien nur eine geringe spezifische Aktivität auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass die isolierten Mitochondrien weitestgehend frei von Kreuz-Kontaminationen mit anderen Zellkompartimenten waren.

Tab. 3-1 Markerenzym Aktivitäten vom Rohextrakt und Mitochondrienfraktion von *Euglena* Zellen angezogen unter aeroben und anaeroben Kulturbedingungen \pm Standardabweichung.

Enzym	Rohextrakt	Mitochondrien-Fraktion	
	aerob (n=8) [nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]	aerob (n=8) [nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]	anaerob (n=6) [nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]
Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase	18,75 \pm 5,75	173,28 \pm 22,52	152,85 \pm 13,24
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (NADP ⁺)	431,38 \pm 15,59	0	0
Laktat-Dehydrogenase	17950 \pm 1570	2 \pm 0,8	6 \pm 0,7

Zur Proteomanalyse wurden die isolierten Mitochondrienfraktionen aus aerob und anaerob angezogenen Zellen mit Hilfe von 2D Gelen aufgetrennt. Die Muster nach Trennung der mitochondrialen Proteine in pH-Gradienten von 3-10 in der ersten Dimension mit nachfolgender Auftrennung über SDS-PAGE in der zweiten Dimension wurden verglichen. Es wurde keine Neuakkumulation von mitochondrialen Proteinen während des Wechsels von aeroben zu anaeroben Kulturbedingungen beobachtet (Abb. 3-2). Vielmehr fehlten unter anaeroben Bedingungen zahlreiche Proteinspots, die unter aeroben Bedingungen vorhanden waren. Dreizehn der Proteinspots, die nur unter aeroben Anzuchtbedingungen vorhanden waren, wurden aus Coomassie-gefärbten Gelen ausgestochen und Im-Gel mit Trypsin verdaut. Die Sequenzierung der Peptide mittels ESI-Q-TOF-MS/MS erfolgte am BMFZ Düsseldorf von Dr. Sabine Metzger. Die bei der Sequenzierung der einzelnen Spots ermittelten Peptidsequenzen sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

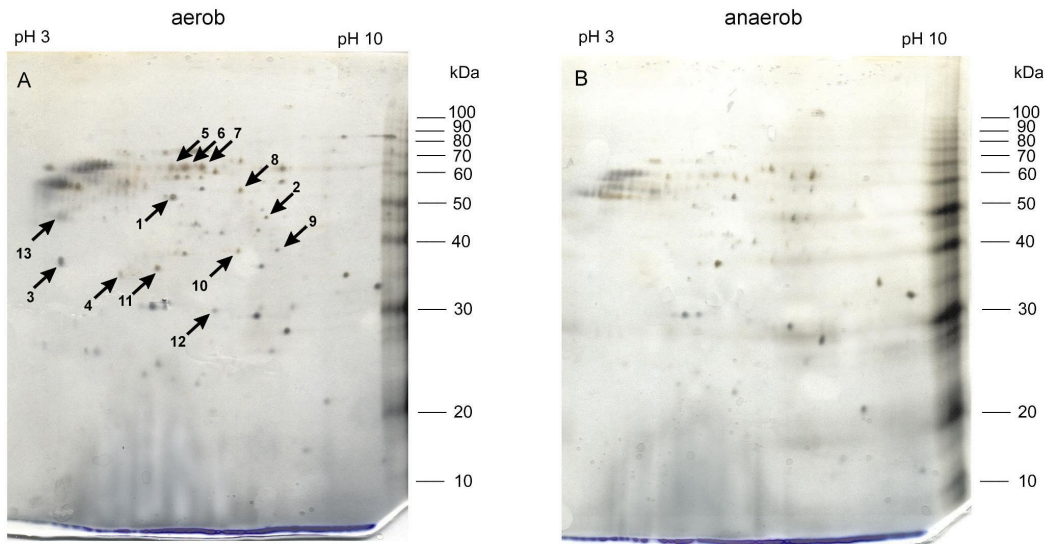


Abb. 3-2 Silber-gefärbte 2D-Gele beladen mit je 800 µg isolierten Mitochondrien aus aerob (A) und anaerob (B) angezogenen *Euglena gracilis* Kulturen. Aerob induzierte Proteine, die zur Sequenzierung ausgewählt wurden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Tab. 3-2 Mittels ESI-Q-TOF-MS/MS ermittelte Peptidsequenzen aerob induzierter mitochondrialer Proteine aus *Euglena*. Die Nummern der Spots korrespondieren mit der Nummerierung in Abb. 3-2.

Spot	Sequenzierte Peptide
1	VLEQLLGSSYS FDGTTNLADDLGR VPLASFFEQLDALSR ADLWVGT.....TLR VQEVEDVEAR
2	SAIAFTVEGFR DGLTSSEYITK GSPLGHTSFVPAYNLGYIDSNK SAALLTAYGNVESWR AKEFDDQFTDVYSTYTAYAFK ATQATLIDSFNTTGQPLSPLEIVSAIK
3	DLQQVAAFS QTLTEYALLEGQNQLVQR VNDVDSNPVYL ANLCALAT TALACLNA.....NDVDALR
4	QNEAAGLSA SGGQLQ SPWNAED
5,6,7	FVVDetaFGK LDSNVDSLLR (DL/LD)LFDYTR
8	LVEADVEAFLK DVAVEK
9	FFTDDLNLNSYDK

10	LMLDEVTESYK QDVQALSDDDELK LANQFLLLPWR LPAATSQLLTNVSK NPFLVLAWQTG YSPEDDL
11	APVSLQTDAAK ADLEFLDAVK PFVAW(LT/DV)VSR (YL/LY)LAEPLSAAATWLANK
12	GPGYACLEPATG
13	VLDLQAGVGK APATAADVK VLDLLLPY LFNVFATALDQR

Von den 13 sequenzierten Proteinspots konnten drei Spots direkt über Datenbankvergleiche der ermittelten Peptidsequenzen Funktionen zugeordnet werden (Tab. 3-3). Über BLASTp-Suche mit Suchoptionen für „short, nearly exact matches“ konnten Spot 1 und 2 als Ubiquinol-Cytochrom *c* Reduktase Komplex Kernprotein I und II identifiziert werden, und Spot 4 wurde als Pyruvat Dehydrogenase E1 β -Untereinheit identifiziert (Tab. 3-3). Die ermittelten Peptidsequenzen der weiteren Spots lieferten bei der direkten Datenbanksuche keine eindeutigen Treffer. Diese Peptidsequenzen wurden mit den Sequenzen der *Euglena* EST-Datenbank der Arbeitsgruppe verglichen, und die Peptide der Spots 3, 5, 6, 7, 10, 11 und 13 konnten jeweils eindeutig einem Klon in der EST-Datenbank zugeordnet werden. Da diese EST-Klone in der Datenbank jedoch keine Funktionszuordnung aufwiesen, wurden die entsprechenden Klone retransformiert und erneut sequenziert, um größere Leseweiten zu erzielen. Die ermittelten Nukleotidsequenzen wurden mittels BLASTx einem Datenbankvergleich mit GenBank unterzogen, und den Spots 3, 5, 6, 7, 11, 13 konnte auf diese Weise eine eindeutige Funktion zugeordnet werden (Tab. 3-4). Spot 3 wurde als Cytochrom *c* Oxidase Untereinheit IV identifiziert. Den Spots 5, 6 und 7 wurde eine Glutamin Synthetase Funktion zugeordnet und Spot 11 und 13 wurden als Glutamat Racemase bzw. als O-Methyltransferase III identifiziert. Den Spots 8, 9, 10 und 13 konnte weder über direkten Datenbankvergleich noch über den Vergleich mit der *Euglena* EST-Datenbank eine eindeutige Funktion zugeordnet werden.

Tab. 3-3 Über BLASTp-Suche in GenBank identifizierte Funktionen von Peptidsequenzen von aerob induzierten mitochondrialen Proteinen aus *Euglena*.

Spot	Sequenz-ähnlichkeit %	Zugangsnummer	bester BLAST-Treffer	Organismus
1	90	P43264	Ubiquinol-Cytochrom c Reduktase Komplex Kernprotein I	<i>Euglena</i>
2	100	P43265	Ubiquinol-Cytochrom c Reduktase Komplex Kernprotein II	<i>Euglena</i>
4	85	AAC60044	Pyruvat Dehydrogenase E1 β -Untereinheit	<i>Xenopus</i>

Tab. 3-4 Über BLASTx-Suche in GenBank identifizierte Funktionen von EST-Klonen, die den Peptidsequenzen von aerob induzierten mitochondrialen Proteinen aus *Euglena* zugeordnet wurden.

Spot	Sequenz-ähnlichkeit %	Zugangsnummer	bester BLAST-Treffer	Organismus
3	48	AAF13293	Cytochrom c Oxidase Untereinheit IV	<i>Leishmania</i>
5,6,7	71	ZP_00144701	Glutamin Synthetase	<i>Fusobacterium</i>
11	55	CAC81005	Glutamat Racemase	<i>Pseudanabaena</i>
13	66	CAD57141	O-Methyltransferase III	<i>Streptomyces</i>

Beim Wechsel von aeroben zu anaeroben Kulturbedingungen ist somit im Mitochondrium von *Euglena* der Abbau einiger Komponenten der Atmungskette festzustellen. Drei der sequenzierten Spots, die unter anaeroben Bedingungen fehlen, konnten einzelnen Komponenten des Elektronentransfers der Atmungskette zugeordnet werden. Zwei Komponenten von Komplex III (siehe Tab. 3-3) und eine Komponente von Komplex IV (siehe Tab. 3-4) der Atmungskette wurden identifiziert, die unter anaeroben Bedingungen herunterreguliert werden.

Da keine Neuakkumulation von Proteinen im Mitochondrium von *Euglena* unter anaeroben Bedingungen beobachtet wurde, aber insbesondere die ungewöhnliche ATP-unabhängige Fettsäuresynthese im Mitochondrium von *Euglena* näher untersucht werden sollte, wurde die Aktivität der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase, eines Schlüsselenzyms dieses Stoffwechselweges, vergleichend an isolierten Mitochondrien aus aerob und anaerob angezogenen *Euglena* Zellen gemessen. Die Bestimmung der

Aktivität erfolgte sowohl mit NADH als auch mit NADPH als Cofaktor. Die gemessenen Aktivitäten sind in Tab. 3-5 zusammengefasst. Es wurde weder mit NADH noch mit NADPH als Cofaktor ein signifikanter Unterschied der spezifischen Aktivität der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase zwischen den Mitochondrienfraktionen aus aerob und anaerob angezogenen Zellen festgestellt. Die mit NADPH als Cofaktor bestimmten Aktivitäten waren geringfügig höher als die Aktivitäten, die mit NADH als Cofaktor bestimmt wurden. Zur Absicherung der Lokalisation der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase Aktivität in den Mitochondrien wurden zusätzlich die weiteren Banden (von oben nach unten nummeriert) des diskontinuierlichen Percoll-Gradienten (siehe Abb. 3-1) auf Aktivität untersucht. In der Fraktion der zerbrochenen Mitochondrien konnte ein Anteil an *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase Aktivität bestimmt werden, während in den Chloroplastenfraktionen keine *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase Aktivität nachgewiesen werden konnte (Tab. 3-6).

Tab. 3-5 Spezifische Aktivitäten der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase der Mitochondrien-Fractionen aus aerob und anaerob angezogenen *Euglena* Zellen mit NADH und NADPH als Cofaktor \pm Standardabweichung.

	Mitochondrien-Fraktion aerob [nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]	Mitochondrien-Fraktion anaerob [nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]
NADH (n=10)	63,45 \pm 11,95	66,31 \pm 11,86
NADPH (n=4)	86,41 \pm 13,26	77,57 \pm 28,33

Tab. 3-6 Spezifische Aktivitäten \pm Standardabweichung der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase der Banden des diskontinuierlichen Percoll-Gradienten von anaerob angezogenen *Euglena* Zellen (n=6).

	NADH-abhängige <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA Reduktase Aktivität [nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]
Bande 1 (zerbrochene Chloroplasten)	nicht nachweisbar
Bande 2 (intakte Chloroplasten)	nicht nachweisbar
Bande 3 (zerbrochene Mitochondrien)	12,16 \pm 1,20

3.2. Reinigung der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase aus *Euglena*

Zur Charakterisierung der ungewöhnlichen ATP-unabhängigen Fettsäuresynthese im Mitochondrium von *Euglena* sollte das Schlüsselenzym dieses Stoffwechselweges, die

trans-2-Enoyl-CoA Reduktase (TER), gereinigt werden. Ziel der Reinigung war es, ausreichende Mengen des reinen Proteins für eine anschließende Proteinsequenzierung zu erhalten. Hierzu wurde ein Protokoll zur Reinigung des Enzyms entwickelt. Die Reinigung der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase erfolgte aus insgesamt 1 kg *Euglena* Zellen und die einzelnen chromatographischen Reinigungsschritte wurden jeweils in mehreren Durchläufen ausgeführt, nach denen die jeweiligen Fraktionen wieder vereinigt wurden (siehe 2.11.13). Die im Folgenden dargestellten Elutionsprofile repräsentieren jeweils einen typischen Durchlauf des jeweiligen Reinigungsschritts.

Nach Aufschluss der Zellen mittels French Press (siehe 2.9.3) und 30 % Ammoniumsulfatfällung mit nachfolgender Dialyse (siehe 2.11.14.1) enthielt der Gesamtextrakt eine TER-Gesamtaktivität von 57277 nmol mit einer spezifischen Aktivität von 2,3 nmol·mg⁻¹·min⁻¹. Im Anschluss erfolgte die Chromatographie über DEAE-Fraktogel, wie unter 2.11.14.2 beschrieben, bei der die gesamte TER-Aktivität an das Säulenmaterial gebunden werden konnte. Die TER-Aktivität eluierte in einem relativ weiten Bereich bei einer KCl-Konzentration von ca. 150 mM (Abb. 3-3). Bei diesem Reinigungsschritt konnten einige Fremdproteine entfernt werden und die spezifische Aktivität stieg auf 7,6 nmol·mg⁻¹·min⁻¹. Mit der anschließenden Chromatographie über Phenyl Sepharose (siehe 2.11.14.3) wurde eine Steigerung der spezifischen Aktivität auf 12,6 nmol·mg⁻¹·min⁻¹ erzielt, wobei die aktiven Fraktionen bei einer KCl-Konzentration von ca. 300 mM eluierten (Abb. 3-4). Durch die nachfolgende Affinitätschromatographie über Reaktive Red (siehe 2.11.14.4) konnte die spezifische TER-Aktivität auf 80,1 nmol·mg⁻¹·min⁻¹ gesteigert werden. Die aktiven Fraktionen eluierten von dieser Farbstoffsäule in einem Bereich von 300-500 mM KCl (Abb. 3-5). Die anschließend durchgeführte Reinigung über Hydroxyapatit (siehe 2.11.14.5) führte zu einer Steigerung der spezifischen Aktivität von 230,6 nmol·mg⁻¹·min⁻¹, wobei die aktiven Fraktionen bei ca. 200 mM Kaliumphosphat eluierten (Abb. 3-6). Der folgende Reinigungsschritt beinhaltete eine Anionenaustausch-Chromatographie über eine Mono Q-Säule (siehe 2.11.14.6) und die aktiven Fraktionen eluierten bei einer KCl-Konzentration von ca. 300 mM (Abb. 3-7). Die spezifische TER-Aktivität wurde auf 333,5 nmol·mg⁻¹·min⁻¹ gesteigert. Als nächster Reinigungsschritt wurde eine präparative Gelelektrophorese (siehe 2.11.14.7) durchgeführt und die aktiven Fraktionen wurden zur Visualisierung des Reinigungseffekts einzeln über eine SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3-8). Anhand der

Bandenmuster wurden die Fraktionen 1-8 ausgewählt, vereinigt und für den weiteren Reinigungsgang eingesetzt. Die spezifische TER-Aktivität der vereinigten Fraktionen nach der präparativen Gelelektrophorese betrug $1778,7 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Eine Gelfiltration über eine Superdex-Säule (siehe 2.11.14.8) wurde als abschließender Reinigungsschritt durchgeführt. Die *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase eluierte in einem einzelnen scharfen Peak (Abb. 3-9) und wies eine spezifische Aktivität von $3879,2 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ auf. Mit Hilfe von Größenstandards bei der Gelfiltration wurde ein Molekulargewicht der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase von 44 kDa bestimmt (Abb. 3-9). Der gesamte Reinigungsgang ist in Tabelle 3-7 zusammengefasst, dabei wurde insgesamt eine 1687-fache Aufreinigung der TER im Vergleich zum Gesamtextrakt erzielt. Die Bandenmuster der einzelnen Reinigungsschritte sind in Abb. 3-10 dokumentiert. Das mit Hilfe der Gelfiltration ermittelte Molekulargewicht der TER von 44 kDa stimmte mit der Größe der Bande in der SDS-PAGE überein (Abb. 3-10, Spur 9).

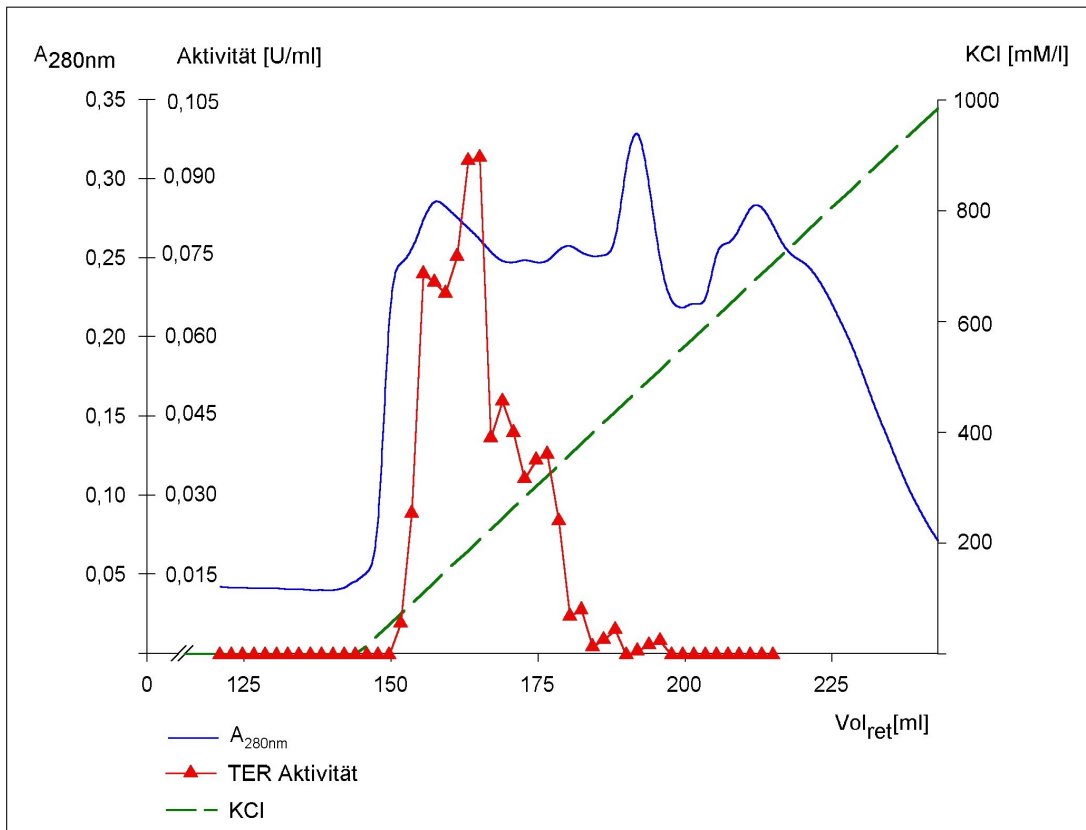


Abb. 3-3 Elutionsprofil der 2,6 x 12 cm DEAE-Fraktogel Säule. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0-1000 mM KCl. Es wurden Fraktionen von je 2 ml gesammelt.

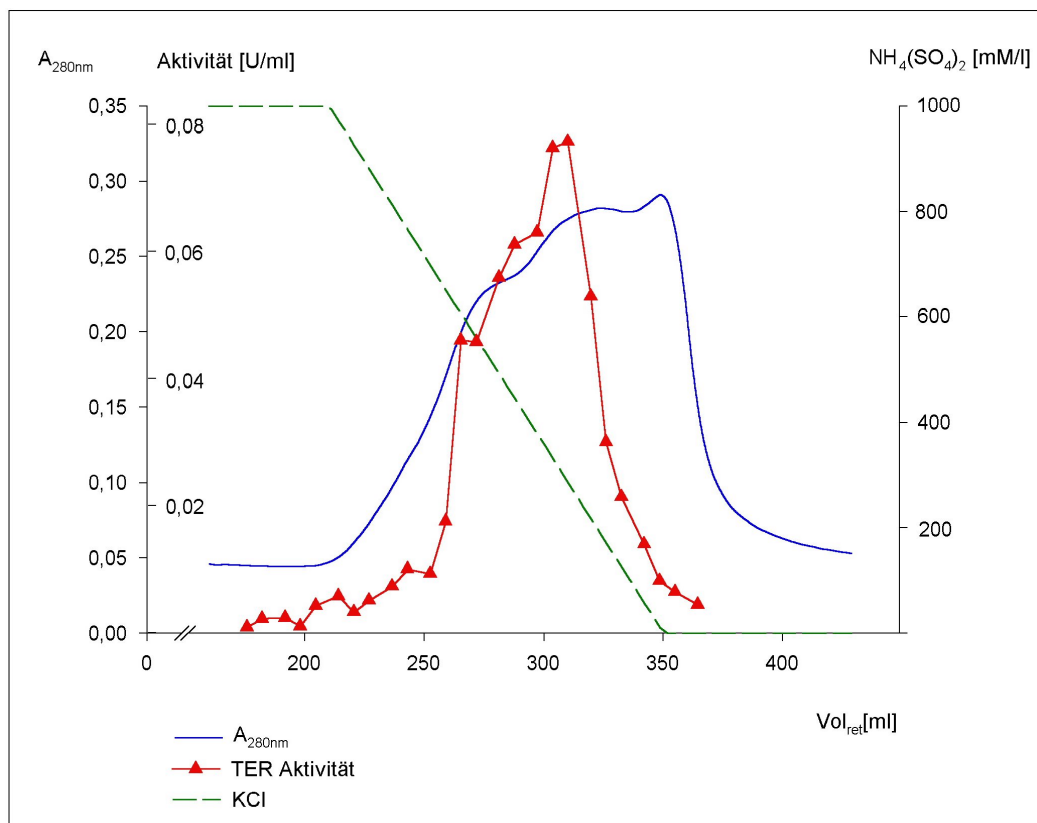


Abb. 3-4 Elutionsprofil der 2,6 x 14 cm Phenyl Sepharose Säule. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 1000-0 mM $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$. Es wurden Fraktionen von je 2,5 ml gesammelt.

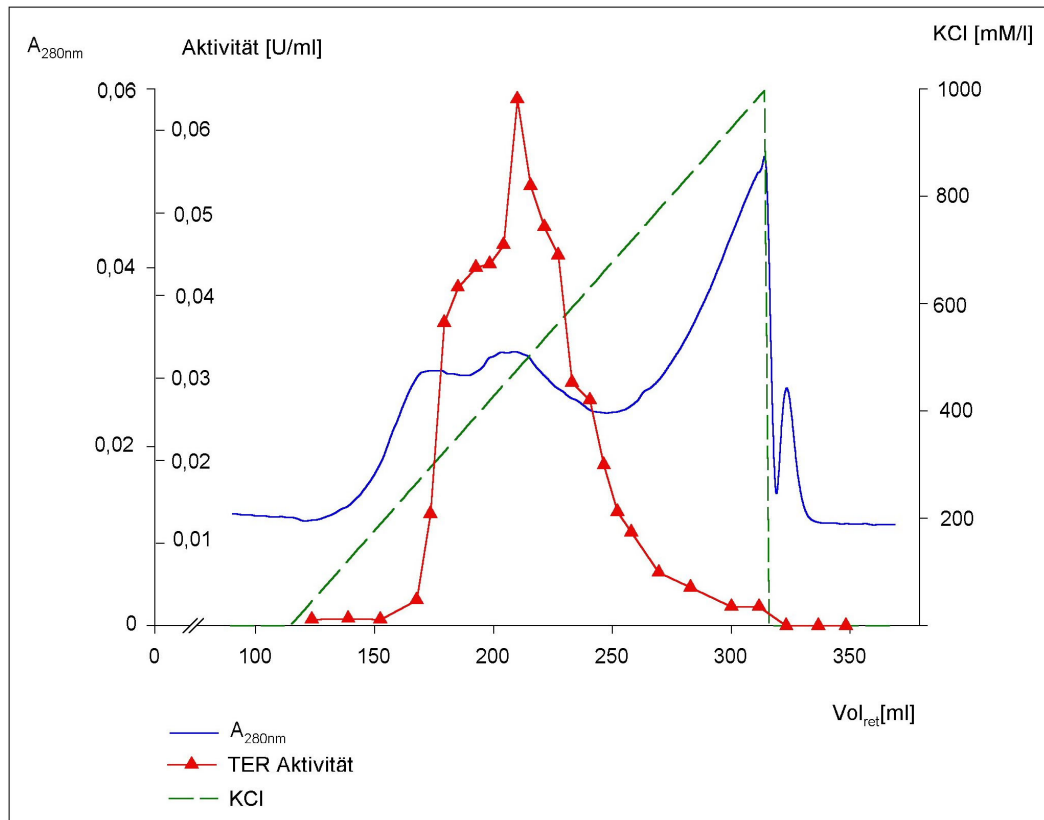


Abb. 3-5 Elutionsprofil der 1,6 x 9 cm Reaktive Red-Säule. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0-1000 mM KCl. Die Fraktionsgröße betrug 3 ml.

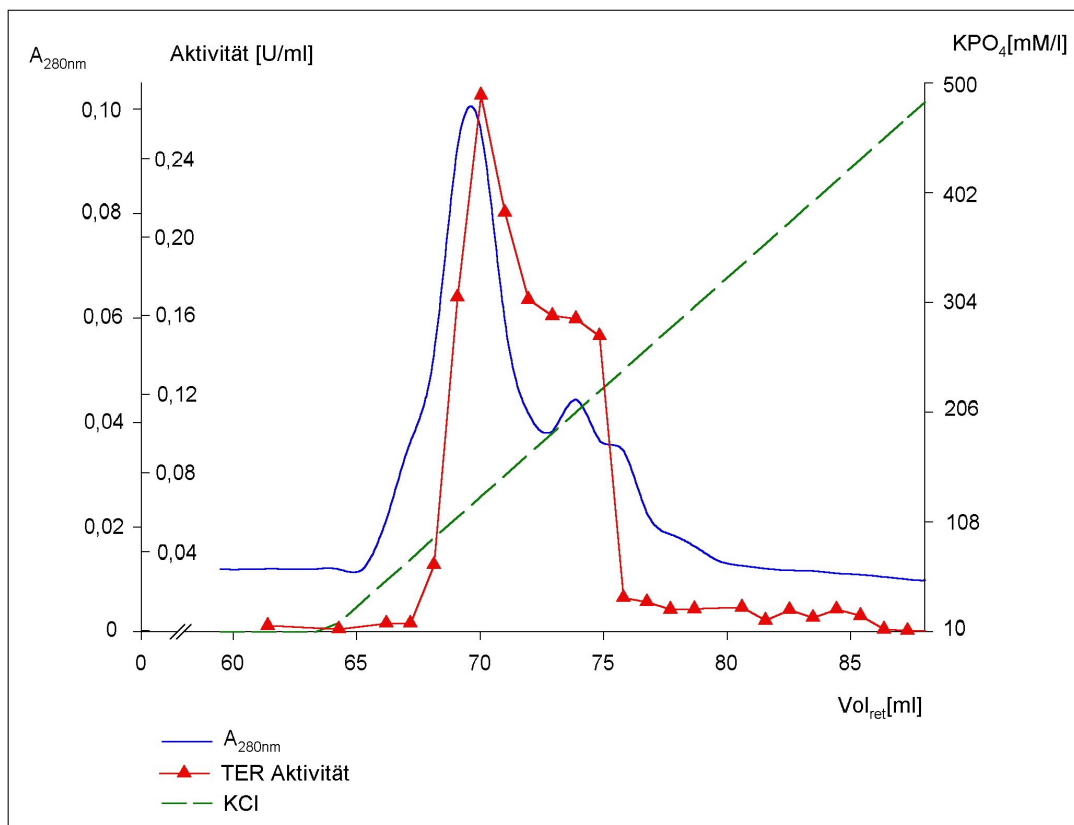


Abb. 3-6 Elutionsprofil der Hydroxyapatit Säule (Eco-Pac CHT II Cartridge). Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 10-500 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8. Es wurden Fraktionen von jeweils 1 ml gesammelt.

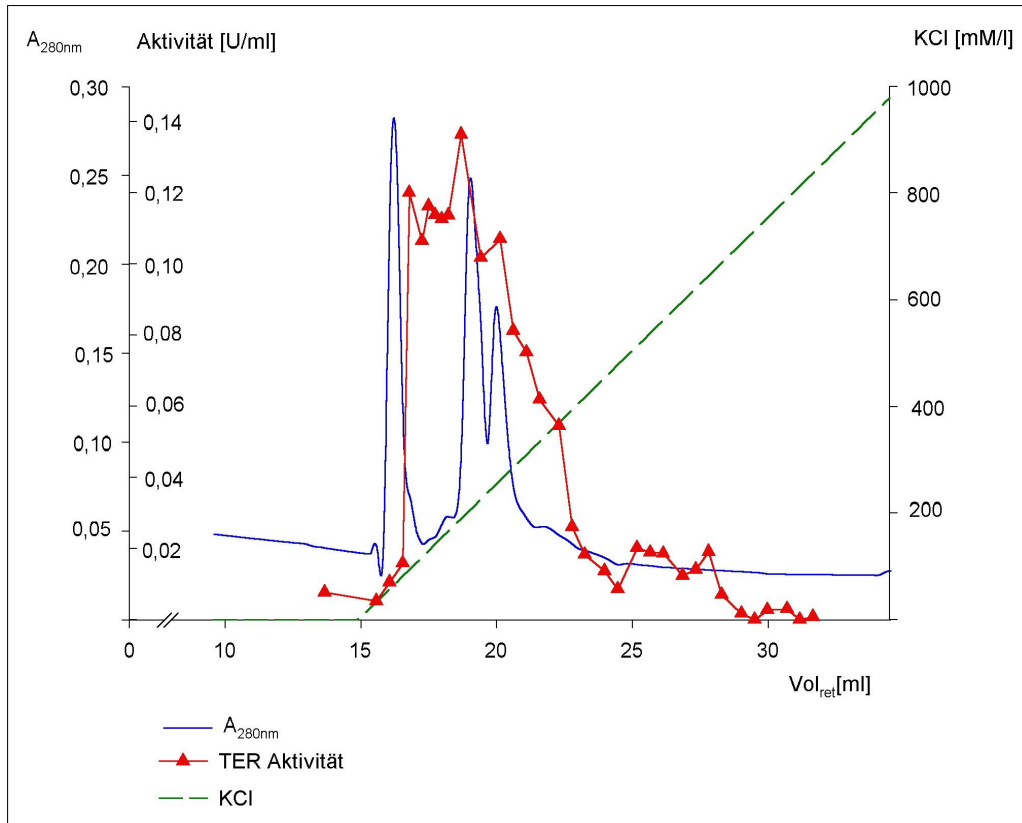


Abb. 3-7 Elutionsprofil der Mono Q HR 5/5 Säule. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0-1000 mM KCl. Es wurden Fraktionen von je 280 µl gesammelt.

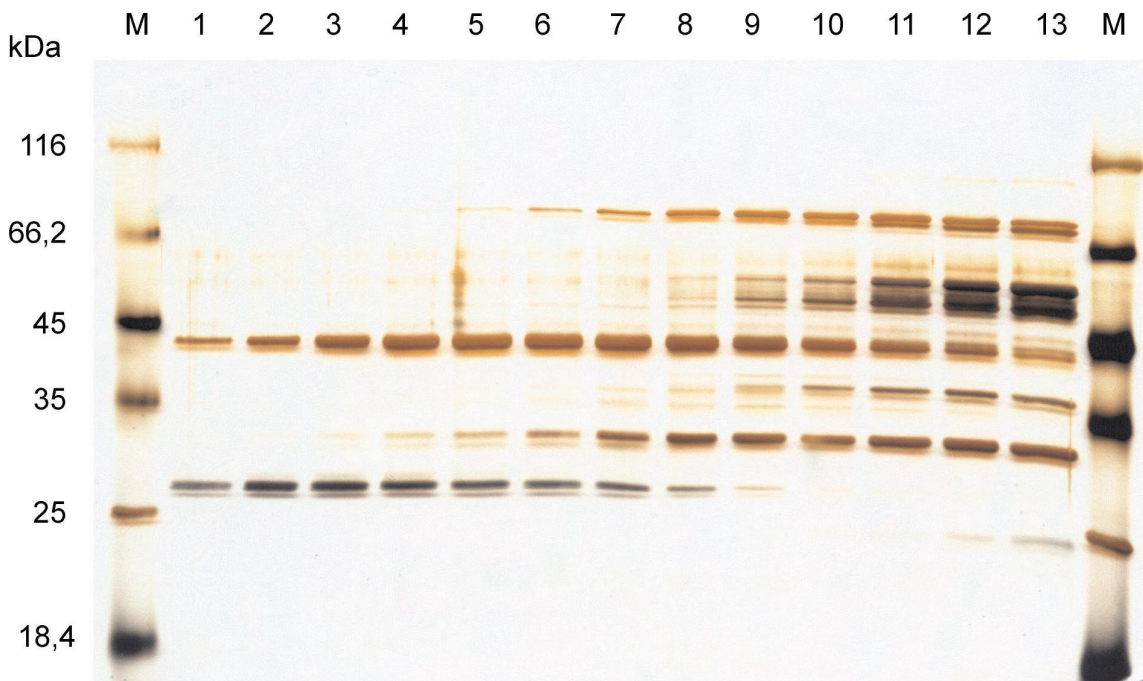


Abb. 3-8 12 % SDS-PAGE der Fraktionen mit TER-Aktivität (1-13) nach präparativer PAGE mit der Mini Prep Cell. Es wurden je 20 µl der 200 µl Fraktionen aufgetragen. M: Größenstandard.

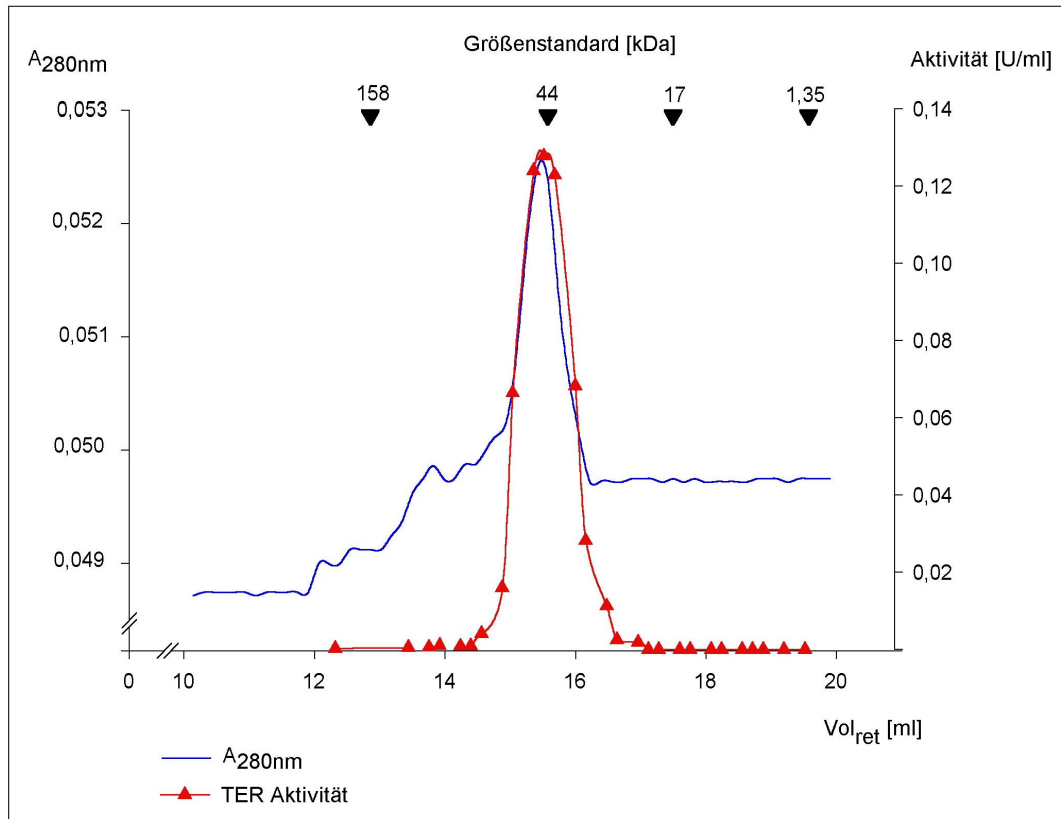


Abb. 3-9 Elutionsprofil der Superdex 200 HR 10/30 Säule. Die Elution erfolgte mit 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 1 μ M FAD. Die Fraktionsgröße betrug 230 μ l.

Tab. 3-7 Reinigung der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase aus 1 kg *Euglena gracilis* Zellen.

Reinigungsschritt	Gesamtaktivität (nmol)	Gesamtprotein (mg)	spezifische Aktivität $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	Reinigungsfaktor (fach)	Ausbeute (%)
Gesamtextrakt	233569	40977	5,7		
Gesamtextrakt nach Fällung und Dialyse	57277	24903	2,3		60,8
DEAE-Fraktogel	34473	4536	7,6	3	11,1
Phenyl Sepharose	14666	1164	12,6	6	2,8
Reaktive Red	14258	178	80,1	35	0,43
Hydroxyapatit	13375	58	230,6	100	0,14
Mono Q	2801	8,4	333,5	145	0,02
präparatives Gel	587	0,33	1778,7	773	0,0008
Superdex	559	0,144	3879,2	1687	0,0004

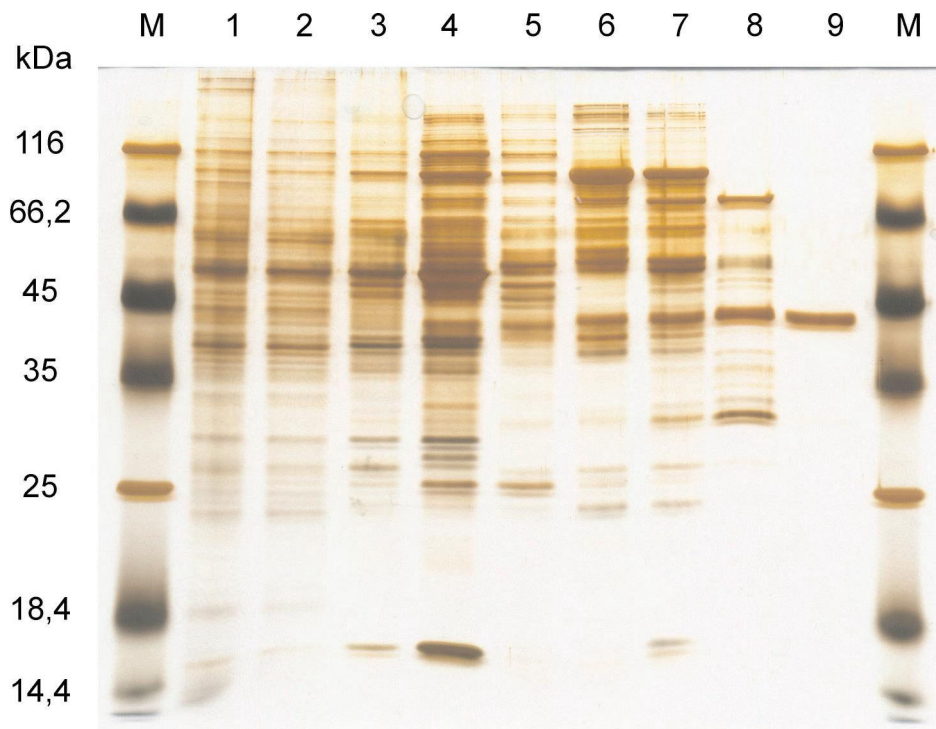


Abb. 3-10 12% SDS-PAGE verschiedener Reinigungsstufen der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase aus *Euglena*. Spur 1: Gesamtextrakt, Spur 2: Gesamtextrakt nach Ammoniumsulfatfällung, Spur 3: Eluat der DEAE-Fraktogel Säule, Spur 4: Eluat der Phenyl Sepharose Säule, Spur 5: Eluat der Reaktive Red-Säule, Spur 6: Eluat der Hydroxyapatit Säule, Spur 7: Eluat der Mono Q Säule, Spur 8: Eluat der präparativen Gelelektrophorese, Spur 9: Eluat der Superdex Säule, M: Größenstandard.

3.3. Sequenzierung der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase

Nach der chromatographischen Reinigung der TER lag das Enzym nach Trennung in der SDS-PAGE als Doppelbande vor (siehe Abb. 3-10, Spur 9). Auch nach Alkylierung zur Gewährleistung der vollständigen Reduktion der Probe erschien diese Bande in der SDS-PAGE als Doppelbande. In Abb. 3-11 sind die einzelnen Fraktionen nach der Superdex Säule (Abb. 3-9) nach Auftrennung in der SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung mit den jeweils gemessenen Aktivitäten dargestellt. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Banden wurden zur Proteinsequenzierung ausgewählt. Zur Absicherung der Peptidsequenzen für die anschließende Klonierung wurde die Doppelbande getrennt voneinander aus dem Gel ausgeschnitten und nach tryptischen Verdau und Extraktion der Peptide zur Sequenzierung mittels ESI-Q-TOF eingesetzt.

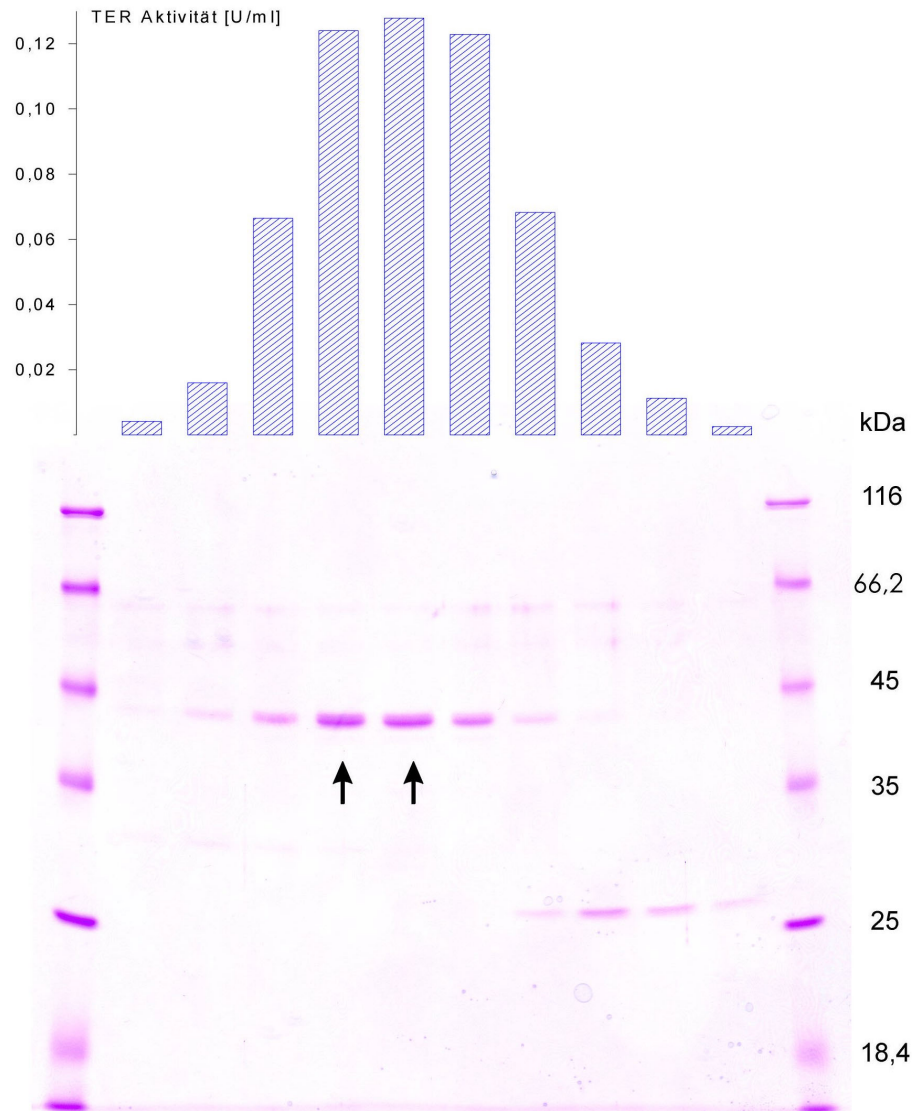


Abb. 3-11 12 % SDS-PAGE der Fraktionen mit TER-Aktivität nach Superdex 200. Es wurden jeweils 65 μ l der 280 μ l Fraktionen aufgetragen. Die TER-Aktivitäten der jeweiligen Fraktionen wurden als Balkendiagramm über der entsprechenden Spur der SDS-PAGE aufgetragen. Pfeile kennzeichnen die Banden, die zur Sequenzierung mittels ESI-Q-TOF ausgeschnitten wurden.

Die Sequenzierung der durch tryptischen Verdau erhaltenen Peptide (siehe 2.11.8) wurde am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum unter Verwendung eines Micromass Q-TOF2 von Dr. Markus Piotrowski durchgeführt. Die beiden Banden der Doppelbande wurden dabei getrennt voneinander sequenziert. Die Aufnahme des MS-Spektrums ergab für beide Banden den gleichen Fingerprint und auch bei der nachfolgenden Sequenzierung der Peptide im MS/MS-Modus wurden für beide Banden die gleichen Peptidsequenzen ermittelt. Es wurden die im Folgenden aufgeführten internen Peptidsequenzen der TER aus *Euglena* ermittelt:

Peptid 1	ACLKPLGATYTNR
Peptid 2	AALEAGLYAR
Peptid 3	VLVLGCSTGYGLSTR
Peptid 4	TDPAT
Peptid 5	SLDGDAFDSTTK
Peptid 6	DLWSQVNTANLK
Peptid 7	AGWYNTVAFEK
Peptid 8	RVQEELAYAR
Peptid 9	DLSDFAGYQTEFLR
Peptid 10	LYPGDGSPLVDEAGR
Peptid 11	LTQQYGCPAYPVVAK
Peptid 12	VDDWEMAEDVQQAVK
Peptid 13	STGYG(AMVR/LSEK)
Peptid 14	AHPPTSPGPK
Peptid 15	ALSEAGVLAEQK
Peptid 16	((GT)/(AS))HEGCLEQMVR
Peptid 17	LYPENGAPLVDEQR

3.4. PCR-Amplifikation und Subklonierung einer TER-spezifischen DNA-Sonde

Da keine TER-Sequenzen aus anderen Organismen bekannt sind, konnten keine Rückschlüsse auf die Lage der internen Peptide innerhalb der Gesamtsequenz gezogen werden. Es wurden daher anhand der Peptide 5, 6, 7, 9, 11 und 12 degenerierte Primer jeweils in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung entworfen. Mit den sich daraus ergebenden möglichen Primerkombinationen wurden PCR-Reaktionen mit *Euglena* cDNA als Template durchgeführt (siehe 2.12.1). Mit der Primerkombination pep7for und pep9rev (siehe 2.8) wurde ein 839 bp umfassendes PCR-Produkt amplifiziert (Abb. 3-12). Das Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert und in den Hinc II-geschnittenen Vektor pBluescript SK+ kloniert (siehe 2.12.2). Die Klone pcrTER1 bis pcrTER5 enthielten die erwartete Insertionsgröße von 839 bp und wurden sequenziert. Alle fünf Klone waren identisch. Die Nukleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz des PCR-Fragments der TER ist in Abb. 3-13 dargestellt. Da die abgeleitete

Aminosäuresequenz neben den als Vorlage für die Primer verwendeten Peptiden 7 und 9 acht weitere Peptide aus der Proteinsequenzierung des aufgereinigten Enzyms enthielt, konnte das 839 bp PCR-Fragment eindeutig als *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase spezifisch identifiziert werden (Abb. 3-13). Von Klon pcrTER3 wurde eine Plasmid-Großkultur hergestellt und die Insertion nach Restriktionsspaltung mit XhoI/ClaI durch Gelelektrophorese mit anschließender Elution über das QIAquick Gel Extraction Kit isoliert. Das Fragment wurde nachfolgend radioaktiv markiert und als Sonde verwendet.

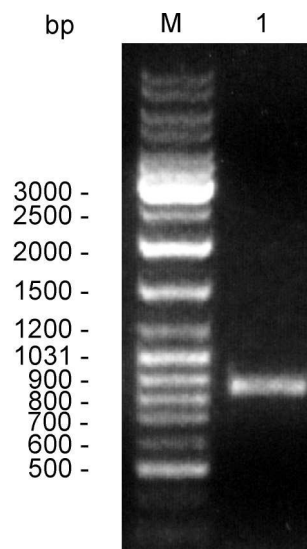


Abb. 3-12 Mittels PCR amplifiziertes TER-Fragment. Spur 1: PCR Ansatz, Substrat: *Euglena* cDNA. M : Größenstandard.

GGGTGGTATAATACGGTGGCGTTCGAGAAGGCCGCCCTGGAGGCCGGGCTGTACGCCCGG	60
<u>G W Y N T V A F E K A A L E A G L Y A R</u>	
Peptid 7	Peptid 2
AGCCTTAATGGCGACGCATTTCGACTCTACAACGAAGGCGCGGACGGTTGAGGCGATCAAG	120
<u>S L N G D A F D S T T K A R T V E A I K</u>	
Peptid 5	
CGGGATCTCGGCACGGTGGACCTCGTGGTGTACAGCATCGCCGCCCCGAAACGGACGGAC	180
R D L G T V D L V V Y S I A A P K R <u>T D</u>	
Peptid 4	
CCTGCCACCGGCGTTCGTCACAAAGGCTGCCTGAAGCCCATCGGCGCCACCTACACCAAC	240
<u>P A T G V V H K A C L K P I G A T Y T N</u>	
Peptid 1	
CGCACTGTGAACACCGACAAGGCGGAGGTGACCGATGTCAGCATCGAGCCGGCCTCCCC	300
<u>R T V N T D K A E V T D V S I E P A S P</u>	
GAGGAGATCGCCGACACGGTGAAGGTGATGGGCGGGGAGGACTGGGAGCTTTGGATCCAG	360
E E I A D T V K V M G G E D W E L W I Q	
GCACGTGTCGGAGGCCGGCGTCTGGCGGAGGGGGCCAAGACGGTGGCATACTCCTACATC	420
A L S E A G V L A E G A K T V A Y S Y I	
GGCCCCGAGATGACGTGGCCCGTGTACTGGTCCGGCACCATTGGGGAGGCCAAGAAGGAC	480
G P E M T W P V Y W S G T I G E A K K D	
GTGGAGAAGGCCGCTAAGCGCATCACACAGCAGTACGGCTGCCAGCATAACCCGGTGGTG	540
V E K A A K R I <u>T Q Q Y G C P A Y P V V</u>	
Peptid 11	
GCCAAGGCCCTTGGTCACCCAGGCCAGCTCTGCCATCCCGGTGGTGGCGCTCTACATCTGC	600
<u>A K A L V T Q A S S A I P V V P L Y I C</u>	
CTGCTGTACCGCGTTATGAAGGAGAAGGGCACCCACGAGGGCTGCATCGAGCAGATGGTG	660
L L Y R V M K E K G T H E G C I E Q M V	
CGGCTGCTCACCACGAAGCTGTACCCCGGGAACGGTTCCTCCATTGTCGATGAGGCCGGG	720
R L L T T K <u>L Y P G N G S P I V D E A G</u>	
Peptid 10	
CGGGTGCGGGTGGATGACTGGGAGATGGCGGAGGATGTGCAGCAGGCTGTGAAGGACCTC	780
<u>R V R V D D W E M A E D V Q Q A V K D L</u>	
Peptid 12	
TGGAGCCAGGTGAACACTGCCAACCTCAAGGACATTTCCGATTTTGCCGGCTATGAAAC	839
<u>W S Q V N T A N L K D I S D F A G Y E</u>	
Peptid 6	Peptid 9

Abb. 3-13 Sequenz des mittels PCR amplifizierten TER-Fragments. Unterhalb der Nukleotidsequenz ist die abgeleitete Aminosäuresequenz dargestellt. Peptide des aufgereinigten Proteins sind unterstrichen.

3.5. Isolierung der cDNA für die *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase aus einer *Euglena* cDNA Bank

Durch homologe Hybridisierung des radioaktiv markierten pcrTER3-Fragments mit 250.000 rekombinanten Phagen einer *Euglena* cDNA Bank (siehe 2.12.5 und 2.12.6) wurden sechs unabhängige Klone identifiziert. Diese Klone wurden nach Herstellerprotokoll in vivo exzisiert. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Nucleospin Plasmid Kits isoliert und die Insertionen wurden mit Not I herausgespalten. Die Länge der cDNA Insertionen betrug zwischen 1600 und 1900 bp. Alle sechs Klone wurden

terminal von beiden Enden ansequenziert. Es zeigte sich, dass alle Klone das gleiche Transkript repräsentierten und sich nur in der Länge unterschieden. Der längste Klon wurde zur kompletten Sequenzierung ausgewählt.

3.6. Sequenzierung und Charakterisierung der TER cDNA

Der cDNA Klon pTER1.4 wurde über Exonuklease III-Deletion vollständig doppelsträngig sequenziert (siehe 2.12.9). Deletionsmutanten wurden von beiden Enden der Insertion erzeugt. Für die Erstellung der Vorwärts-Deletionsmutanten wurde Xho I als erstes Restriktionsenzym und Cla I als zweites Restriktionsenzym gewählt. Rückwärts-Deletionsmutanten wurden mittels Xba I als erstem und Sma I als zweitem Restriktionsenzym erzeugt. Keines dieser Restriktionsenzyme schnitt in der Insertion. Die Deletionsmutanten wurden in *E. coli* XL1-Blue MRF' transformiert und die Plasmid-DNA wurde isoliert. Für die anschließende Sequenzierung (siehe 2.12.10) wurden Klone mit abnehmender Insertionslänge ausgewählt. Bei einer durchschnittlichen Leseweite von ~ 800 bp wurde durch Sequenzierung sich überlappende Klone der Klon pTER1.4 vollständig doppelsträngig sequenziert. Abb. 3-14 zeigt die Nukleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz. Der cDNA Klon hat eine Länge von 1912 bp und kodiert für ein offenes Leseraster von 539 Aminosäuren. Der 5'-Bereich beginnt mit einer für *Euglena* typischen Spliced Leader Sequenz von 19 bp und der 3'-nichtkodierende Bereich ist 276 bp lang. Spliced Leader gehören zu einer Familie kurzer RNAs, die posttranskriptional mittels Trans-Spleißens auf die prä-mRNA übertragen werden. Gemeinsames Sequenzmotiv dieser nah verwandten Sequenzen in *Euglena* ist T(n)CG (Tessier et al. 1991).

ttttgccccgtgcaccacgATGTCGTGCCCCGCTCGCCGTCTGCTGCCGTGGTGTCTGC 60
M S C P A S P S A A V V S A

CGGCGCCCTCTGCCTGTGCGTGGCAACGGTATTGTTGGCGACTGGATCCAACCCACCGC 120
G A L C L C V A T V L L A T G S N P T A

CCTGTCCACTGCTTCCACTCGCTCTCCGACCTCACTGGTCCGTGGGGTGGACAGGGGCTT 180
L S T A S T R S P T S L V R G V D R G L

GATGAGGCCAACCACTGCAGCGGCTCTGACGACAATGAGAGAGGTGCCCCAGATGGCTGA 240
M R P T T A A A L T T M R E V P Q M A E

GGGATTTTCAGGCGAAGCCACGTCTGCATGGGCCGCCGCGGGGCCGAGTGGGCGGCGCC 300
G F S G E A T S A W A A A G P Q W A A P

GCTCGTGGCCGCGGCCTCCTCCGCACTGGCGCTGTGGTGGTGGGCCGCCGCGCAGCGT 360
L V A A A S S A L A L W W W A A R R S V

GCGGCGGCCGCTGGCAGCGCTGGCGGAGCTGCCACCGCGGTACCCACCTGGCCCCCCC 420
R R P L A A L A E L P T A V T H L A P P

GATGGCGATGTTACCAACACAGCGAAGGTCATCCAGCCCAAGATTTCGTGGCTTCATCTG 480
M A M F T T T A K V I Q P K I R G F I C

CACGACCACCCACCGATCGGCTGTGAGAAGCGGGTCCAGGAGGAGATCGCGTACGCCCG 540
T T T H P I G C E K R V Q E E I A Y A R

TGCCACCCGCCACCCAGCCCTGGCCCCGAAGAGGGTGCTGGTCATCGGCTGCAGTACCGG 600
A H P P T S P G P K R V L V I G C S T G

CTACGGGCTCTCCACCCGCATCACCGCTGCCTTCGGCTACCAGGCCGCCACGCTGGGCGT 660
Y G L S T R I T A A F G Y Q A A T L G V

GTTCTGGCGGGCCCCCGACGAAGGGCCGCCCGCCGCGGGGCTGGTACAACACCGT 720
F L A G P P T K G R P A A A G W Y N T V

GGCGTTCGAGAAGGCCGCCCTGGAGGCCGGGCTGTACGCCCGGAGCCTTAATGGCGACGC 780
A F E K A A L E A G L Y A R S L N G D A

CTTCGACTCCACAACGAAGGCGCGGACGGTTCGAGGCGATCAAGCGGGACCTCGGCACGGT 840
F D S T T K A R T V E A I K R D L G T V

GGACCTCGTGGTGTACAGCATCGCCGCCCCGAAGCGGACGGACCCTGCCACCGGCGTCTT 900
D L V V Y S I A A P K R T D P A T G V L

CCACAAGGCCTGCCTGAAGCCCATCGGCGCCACGTACACCAACCGCACTGTGAACACCGA 960
H K A C L K P I G A T Y T N R T V N T D

CAAGGCGGAGGTGACCGACGTCAGCATTGAGCCGGCCTCCCCGAAGAGATCGCGGACAC 1020
K A E V T D V S I E P A S P E E I A D T

GGTGAAGGTGATGGGCGGGGAGGACTGGGAGCTCTGGATCCAGGCGCTGTTCGGAGGCCGG 1080
V K V M G G E D W E L W I Q A L S E A G

CGTGCTGGCGGAGGGGGCCAAGACGGTGGCGTACTCCTACATCGGCCCGGAGATGACGTG 1140
V L A E G A K T V A Y S Y I G P E M T W

GCCTGTCTACTGGTCCGGCACCATCGGGGAGGCCAAGAAGGACGTGGAGAAGGCTGCCAA 1200
P V Y W S G T I G E A K K D V E K A A K

GCGCATCACGCAGCAGTACGGCTGCCCGGCGTACCCGGTGGTGGCCAAGGCCTTGGTAC 1260
R I T Q Q Y G C P A Y P V V A K A L V T

<u>CCAGGCCAGCTCCGCCATCCCGGTGGTGCCGCTCTACATCTGCCTGCTGTACCGCGTTAT</u>	1320
Q A S S A I P V V P L Y I C L L Y R V M	
<u>GAAGGAGAAGGGCACCCACGAGGGCTGCATCGAGCAGATGGTGCGGCTGCTCACCACGAA</u>	1380
K E K G T H E G C I E Q M V R L L T T K	
<u>GCTGTACCCCGAGAACGGGGCCCCCATCGTCGATGAGGCCGGACGTGTGCGGGTGGATGA</u>	1440
L Y P E N G A P I V D E A G R V R V D D	
<u>CTGGGAGATGGCGGAGGATGTGCAGCAGGCTGTTAAGGACCTCTGGAGCCAGGTGAGCAC</u>	1500
W E M A E D V Q Q A V K D L W S Q V S T	
<u>TGCCAACCTCAAGGACATCTCCGACTTCGCTGGGTATCAAACCTGAGTTCCTGCGGCTGTT</u>	1560
A N L K D I S D F A G Y Q T E F L R L F	
CGGGTTCGGCATTGACGGCGTGGACTACGACCAGCCCCTGGACGTGGAGGCGGACCTCCC	1620
G F G I D G V D Y D Q P V D V E A D L P	
CAGTGCTGCCCAGCAGTAGgtgctggacgccgcctctctccggggggtctgccaaaatgg	1680
S A A Q Q *	
tcgctcccccaacccaacccccctgccaccatcggggtcccgcgggtgaatgcgcccc	1740
acccaaaggcaaaggtcaaggccggggccccaccgccaaagggtaacacatatgtatccg	1800
tcgggggctgatccgcgtgacacgggccataattgtgccccacgggatgtccatgccc	1860
ctaagacaactgccccggccgagagtgctaccgccttgagttccccaggca	1912

Abb. 3-14 Sequenz der cDNA für die *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase aus *Euglena gracilis* (pTER1.4). Nichtkodierende Nukleotide sind durch Kleinbuchstaben dargestellt. Die Spliced Leader Sequenz ist kursiv gedruckt. Unterhalb der Nukleotidsequenz ist die abgeleitete Aminosäuresequenz aufgeführt. Die Lage des als Sonde verwendeten PCR-Fragments ist durch Unterstreichung gekennzeichnet.

Datenbankvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz der *Euglena trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase zeigten Sequenzhomologien zu konservierten hypothetischen Proteinen aus Bakterien. Das Aminosäuresequenz-Alignment der TER mit Proteinen, die über 50 % Sequenzähnlichkeit aufweisen, ist in Abb. 3-15 dargestellt. Es wird deutlich, dass die N-terminalen 120 AS der TER keine Homologien zu bekannten Sequenzen aus Pro- oder Eukaryoten aufweisen, während die anderen Bereiche sehr stark konserviert sind. Es könnte sich bei der N-terminalen Domäne um ein Signalpeptid oder um eine Transmembrandomäne handeln. Das Programm MitoProtII (Claros und Vincens 1996) sagt mit 76 % Wahrscheinlichkeit ein mitochondriales Transitpeptid voraus und gibt als Spaltstelle die Aminosäure 69 an. Die Analyse des N-terminalen Bereiches der *Euglena* TER mit dem Programm iPSORT (Bannai et al. 2001, Bannai et al. 2002) führte ebenfalls zur Voraussage eines Transitpeptids.

ter_euglena	I G C E K R V Q E E	I A Y A R A H P P T	S P G P K R V L V I	G X X X G X G	G C S T G Y G L S T
burkholderia_f	T G C E A N V R E Q	I E Y V K A R G P I	A N G P K K V L V I		G A S T G Y G L A A
clostridium_a	Y G C R R E V L N Q	I D Y C K . K A I G	F R G P K K V L V I		G A S S G F G L A T
clostridium_p	I G C K K N V E N Q	I E Y V K . E N G K	I E G A K R V L V I		G A S T G Y G L A S
coxiella_b	E G C A R H V G E W	T G Y A K Q E P S L	T G G P Q K V L I I		G A S T G F G L A S
cytophaga_h	T G C E Q N V I N Q	I N Y V K S K . G V	I N G P K K V L V I		G A S T G F G L A S
microbulbifer_d	E G C A A N V R E Q	I D F V K S Q G E I	A D G P K K V L V I		G A S T G Y G L A S
pseudomonas_a	A G C E A N V K Q Q	I D Y V E A K G P V	V N G P K K V L V I		G S S T G Y G L A A
pseudomonas_p	K G C E L N V R D Q	I E A T R K L G V R	E D G P K K V L V I		G A S S G Y G L A A
shewanella_o	V G C E A N V Q E Q	I A L T K A K G K T	A N G P K K V L V V		G S S S G Y G L S A
streptomyces_a	V G C F R S V E L M	R A E V P V P E K P	P A R R R P T A L V I		G S S S G Y G L A S
vibrio_c_2	Y G C E Q A V L Q Q	I O Y V K Q A N P I	K S G P K R V L I L		G A S S G F G L A S
vibrio_p_1	V G C E A N V K E Q	I A Y T K A Q G P I	K N A P K R V L V V		G A S S G Y G L S S
vibrio_p_2	Y G C H A S I K E Q	I E Y V K K A P K I	K S G P K R V L I I		G A S S G F G L A A
vibrio_v	F G C E A A I K K Q	I A F V K N A P Q I	S Q G P K R V L I L		G A S S G F G L A A
vibrio_v_1	V G C E A N V K E Q	I A Y T K A Q G P I	K N A P K R V L V V		G A S S G Y G L S S
xanthomonas_a	L G C E R N V L E Q	I A A T R A R G V R	T D G P K K V L V I		G A S S G Y G L A S
xanthomonas_c	L G C E R N V L E Q	I A A T R A R G V R	N D G P K K V L V I		G A S S G Y G L A S
xylella_f_1	V G C E Y N V L E Q	I Q S T R A R G V R	S N G P K K V L V I		G A S S G Y G L A T
xylella_f_2	V G C E Y N V L E Q	I Q S T R A R G V R	S N G P K K V L V I		G A S S G Y G L A T
yersinia_p	T G C E A N V K K Q	I D Y V T T E G P I	A N G P K R V L V I		G A S T G Y G L A A
ter_euglena	R I T A A F G Y . Q	A A T L G V F L A G	P P T K G R P A A A	Y X X X X X X K	G W Y N T V A F E K
burkholderia_f	R I S A A F G S . D	A A T L G V F F E R	A G S E T K A C T A		G W Y N T A A F E K
clostridium_a	R I S V A F G G P E	A A H T I G V S Y E T	G A T D R R I G T A		G W Y N N I F F K K
clostridium_p	A I V A S E A C . D	A E V L G V S F E R	E A K G K R T A S A		G W Y N I E S L K K
coxiella_b	R I V A A F G A . G	A K T I G V F F E R	P A S G K R T A S P		G W Y N T A A F E K
cytophaga_h	R I T S A F G S . N	A A A T I G V F F E K	P A O E G K P G S P		G W Y N T V A F Q N
microbulbifer_d	R I T A A F G C . G	A A T L G V F F E K	P G T E R K T G S A		G F Y N S V G F H A
pseudomonas_a	R I T A A F G S . G	A D T L G V F F E R	P G S E S K P G T A		G W Y N S A A F E K
pseudomonas_p	R I T A A F G F . K	A D T L G V F F E K	P G T E T K A G T A		G W Y N A A A F D K
shewanella_o	R I A A A F G S . D	A A T I G V F F E K	P G T E A K P G T A		G W Y N S A A F D K
streptomyces_a	T I . A G L V R Y G	I D G V G I G L E R	P A G H . R S A T A		G W Y R T V A T D A
vibrio_c_2	R I A L T F G G A Q	A D T I G V S F E R	A P S E T O T G S A		G Y Y N N L F F K Q
vibrio_p_1	R I A A A F G G . G	A S T I G V F F E K	E G T E K K P G T A		G F Y N A A A F E K
vibrio_p_2	R I A L T F G G A E	A D T I G V S F E R	G P S E K G V G S A		G W Y N N I F F K Q
vibrio_v	R I A L T F G G A Q	A D T I G V S F E R	G P S E K G T G S A		G W Y N N V F F K R
vibrio_v_1	R I A A A F G G . G	A A T I G V F F E K	E G S E K K P G T A		G F Y N A A A F E K
xanthomonas_a	R I T A A F G F . G	A D T L G V F F E K	P G T A S K A C T A		G W Y N S A A F D K
xanthomonas_c	R I T A A F G F . G	A D T L G V F F E K	P G S D K K A G T A		G W Y N S A A F D T
xylella_f_1	R I S A A F G F . G	A D T L G V F F E K	P G T E K K P G T A		G W Y N A A A F D K
xylella_f_2	R I S A A F G F . G	A D T L G V F F E K	P G T E K K P G T A		G W Y N A A A F D K
yersinia_p	R I T A A F G C . G	A D T L G V F F E R	P G E E G K P G T S		G W Y N S A A F H K
ter_euglena	A A L E A G L Y A R	S L N G D A F S D T	T K A R T V E A I K	R D L .	G T V D L V
burkholderia_f	F A T E Q G L Y A T	S I N G D A F S D A	V K Q R T I E V I K	R D L .	G Q V D L V
clostridium_a	F A K K K G L V A K	N F I E D A F S N E	T K D K V I K Y I K	D E F .	G K I D L F
clostridium_p	F V E G E G K K F I	S V N G D A F S N E	V K S E V I D L I K	E N . M	G K V D L V
coxiella_b	T A L A A G L Y A K	S I N G D A F S D E	I K Q Q T I D L I Q	K D W Q	G V D L V
cytophaga_h	E A K K A G I Y A K	S I N G D A F S T E	V K Q K T I D L I K	A D . L	G Q V D L V
microbulbifer_d	E A E K A G L Y A K	S I N G D A F S D E	I K A K A I D V I K	R D L .	G K V D L V
pseudomonas_a	F A H E K G L Y A R	S I N G D A F S D E	V K R L T I E T I K	R D L .	G K V D L V
pseudomonas_p	F A K A E G L Y S K	S I N G D A F S D E	A R A K V I E I I K	N E M G	G K V D L V
shewanella_o	F A K A E G L Y S K	S I N C D A F S H E	A K Q K V I E I I K	E D L .	G Q V D M V
streptomyces_a	I A R E L G A D F S	F R N A D A F A D T	T K T E T L D L L A	Q E R F G G .	V D Y L
vibrio_c_2	H A E Q A G R I A V	N L E G D V F S V D	M R E Q V I E A I E	T Y F E	G E V D L I
vibrio_p_1	L A R E E G L Y A K	S L N G D A F S N E	A K Q K T I D L I K	E D L .	G Q V D M V
vibrio_p_2	E A T H A G R T A I	N I V G D A F S D S	V R N E V I E A I E	T Y F E	G E V D L V
vibrio_v	E A E K E G R I A I	N I V G D A F A S E	T R T Q V I E A I E	T Y F E	G E V D L V
vibrio_v_1	L A R E E G L Y A K	S L N G D A F S N E	A K Q K T I D L I K	E D L .	G Q V D M V
xanthomonas_a	H A K A A G L Y S K	S I N G D A F S D A	A R E K V I E I I K	T E M G	G Q V D L M
xanthomonas_c	H A K A A G L Y S K	S I N G D A F S D E	A R A K V I E I I K	T E M G	G Q V D L V
xylella_f_1	S A K N A G L Y S R	S I N G D A F S D E	M R A K V I E I I K	S E M G	G H V D L V
xylella_f_2	S A K N A G L Y S R	S I N G D A F S D E	M R A K V I E I I K	S E M G	G H V D L V
yersinia_p	F A Q Q K G L Y A K	S I N G D A F S D E	I K Q L T I D A I K	Q D L .	G Q V D Q V
ter_euglena	Y X X X X X K	K	D P A T G V	L H K A C L K P I G	A T Y T N R T V N T
burkholderia_f	V Y S L A A P K R T	H P K S G E	V F S S T L K P V G	V F S S T L K P V G	Q A V N L R G I D T
clostridium_a	V Y S L A A P R R K	D Y K T G N	V Y T S R I K T I L	V Y T S R I K T I L	G D F E G P T I D V
clostridium_p	I Y S L A A P K R K	D P V S G E	V Y S S C L K T V G	V Y S S C L K T V G	A P F T S K T I D F
coxiella_b	I Y S T A S P R R V	H P R T G E	I F N S V L K P I G	I F N S V L K P I G	Q T Y H N K T V D V
cytophaga_h	I Y S L A S P V R T	N P V T G V	T H R S V L K P I G	T H R S V L K P I G	G A F S N K T V D F
microbulbifer_d	V Y S L A S P R R T	D P K T G E	L Y S S V L K P I G	L Y S S V L K P I G	Q S Y T A K N L N T
pseudomonas_a	V Y S L A A P R R T	H P K S G E	V F S S T L K P I G	V F S S T L K P I G	K S V S F R G L D T
pseudomonas_p	I Y S L A S P V R K	L P Q T G E	V I R S A L K P I G	V I R S A L K P I G	Q P Y K S T A I D T
shewanella_o	V Y S L A S P V R K	L P D S G E	L V R S A L K P I G	L V R S A L K P I G	E T Y T A T A V D T
streptomyces_a	I Y S V A A P R R T	D P R S G T	T Y Q S V L K P I G	T Y Q S V L K P I G	A P H T T R N L E F
vibrio_c_2	I Y S I A S G M R R	K P P R S E K A D P E	F W R S A I K P I G	F W R S A I K P I G	E A V S G A T L L L
vibrio_p_1	V Y S L A S P V R K	M P E T G E	L I R S A L K P I G	L I R S A L K P I G	E T Y T S T A V D T
vibrio_p_2	I Y S L A A G V R .	. P . K P H S D . T	F W R S V I K P I G	F W R S V I K P I G	E S V T G A S I L L
vibrio_v	I Y S L A T G M R .	. P I S N Q P G . E	F W R S V I K P I G	F W R S V I K P I G	Q T V T G A S F D L
vibrio_v_1	V Y S L A S P V R K	L P E T G E	L I R S A L K P I G	L I R S A L K P I G	Q T Y T S T A V D T
xanthomonas_a	V Y S L A S P V R K	L P G S G E	V K R S A L K P I G	V K R S A L K P I G	Q T Y T A T A I D T
xanthomonas_c	V Y S L A S P V R K	L P S T G E	V K R S A L K P I G	V K R S A L K P I G	N T Y T A T A I D T
xylella_f_1	V Y S L A S P L R K	M P S T G E	I K R S V L K P I G	I K R S V L K P I G	V A H T S N A I D T
xylella_f_2	V Y S L A S P L R K	M P S T G E	I K R S V L K P I G	I K R S V L K P I G	V A H I S N A I D T
yersinia_p	I Y S L A S P R R T	H P K T G E	V F N S A L K P I G	V F N S A L K P I G	N A V N L R G L D T

ter_euglena	DKA...EVT D	VSTIEPASP E	IADTVKVMGG	EDWELWI QAL
burkholderia_f	DKE...VIR E	TVLEPAST D E	IDHTVAVMGG	EDWQMWIDAL
clostridium_a	ERD...EIT L	KKVSSAS I E	IEETTRKVMGG	EDWQWCEEL
clostridium_p	HTG...EIQ N	ITINPATEE E	IEGTRKVMGG	EDWMLWIEAL
coxiella_b	MTG...EVS P	VSIIEPATEK E	IRDTEAVMGG	DDWALWINAL
cytophaga_h	HTG...NVST	VTEIEPANE E D	VTNTVAVMGG	EDWGMWMDAM
microbulbifer_d	DTL...KIAD	MTIEAANE E E	IANTVAVMGG	EDWELWVEAL
pseudomonas_a	DKE...VIK D	VVLEPAA S D Q E	VADTVAVMGG	EDWQMWIDAL
pseudomonas_p	NKD...TIE E	ASIEPATEQ E	IADTVAVMGG	QDQWLWIDAL
shewanella_o	NKD...CIE E	ATVEPATEQ E	IADTVAVMGG	QDQWELWINAL
streptomyces_a	ADDGAAQVR E	VTVAPATEA E E	AAAATVGMGG	EDWSRWITDAL
vibrio_c_2	END...TWIE	TTLQPA S E E E	IEGTLRVMGG	DDWQWINDTL
vibrio_p_1	NKD...VIE E	ASVEPATEE E E	IKD TVVMGG	EDWELWINAL
vibrio_p_2	END...QWVE	TTLLEPATEE E E	AEATTKVMGG	EDWESWIDTL
vibrio_v	EHD...RWTD	TTLLESATEE E E	ALHTTKVMGG	EDWESWIDTL
vibrio_v_1	NKD...IIE I	ASVEPATEQ E	IQD TVVMGG	EDWELWINAL
xanthomonas_a	NKD...TII Q	ASIEPASAQ E	IEDTVVMGG	QDQWELWIDAL
xanthomonas_c	NKD...TII Q	ASIEPATEQ E	IEDTVVMGG	QDQWELWIDAL
xylella_f_1	NKD...QII Q	ATVEPATEQ E	IADTVAVMGG	QDQWELWINAL
xylella_f_2	NKD...QII Q	ATVEPATEQ E	IADTVAVMGG	QDQWELWINAL
yersinia_p	DKE...VIK E	SVLQPA T Q S E	IDS TVAVMGG	EDWQMWIDAL

ter_euglena	SEAGVLAEGA	KTVAYSYIGP	EMTWPVYWSG	TIGEA AKKDVE
burkholderia_f	LEAGVLA DGA	KTVAFTYLG	KRTHDIYRNG	SIGEA AKKDLD
clostridium_a	LYEDCFSDKA	TITAYSYIGS	PRTYKIYRNG	TIGEA AKKDLE
clostridium_p	KEANVLENGV	KTIAYSYIGP	EVTYPIYRNG	TIGEA AKKDLE
coxiella_b	FKYNC LAEGV	KTVAFTYIGP	ELTHAVYRNG	TIGEA AKKHLLE
cytophaga_h	LEAGVLAEGA	TTVAYSYIGP	ALTEAVYRKG	TIGEA AKKHLLE
microbulbifer_d	KEADVLAENGA	KTVAFTYIGD	KLTTWPIYWGKA	TIGEA AKKDLDD
pseudomonas_a	LEADVLA DGA	KTVAFTYIG	KRTHDIYRNG	SIGEA AKKDLD
pseudomonas_p	AGANVLAEGA	RTVAFSYIGS	DITWPIYWHG	ALGQA AKQDLD
shewanella_o	AEAGVLS DNC	KTVAYSYIGT	ELTWPIYWHG	ALGKA AKMDLD
streptomyces_a	AERGLLRSGF	RTVALTYIGS	PLTSAIYRGG	TIGEA AKHLE
vibrio_c_2	INAESLAEGC	KTIAFSYMG	DVTHPIYLDG	TIGEA AKIDLH
vibrio_p_1	SDAGVLAEGC	KTVAYSYIGT	ELTWPIYWDG	ALGKA AKMDLD
vibrio_p_2	INTESVAQGC	KTIAFSYMG	EVTHPIYLDG	TLGRA AKIDLH
vibrio_v	INAESI AQGC	QTIAFSYVGP	EITHP IYLDG	TLGRA AKIDLH
vibrio_v_1	AEAGVLA DGC	KTVAYSYIGT	ELTWPIYWDG	ALGKA AKMDLD
xanthomonas_a	EGAGVLA DGA	RSVAFSYIGT	EITWPIYWHG	ALGKA AKV DLD
xanthomonas_c	DSAGVLA KGA	RSVAFSYIGT	EITWPIYWHG	ALGKA AKV DLD
xylella_f_1	AQADVLA PQT	RTVAFSYIGT	EITWPIYWHG	ALGKA AKV DLD
xylella_f_2	TQADVLA PQT	RTVAFSYIGT	EITWPIYWHG	ALGKA AKV DLD
yersinia_p	LDAAGVLAEGA	QTTAFTYLG	KRTHDIYRNG	SIGEA AKKDLD

ter_euglena	KAAKRITQQ.	. . . YGCPA YP	VVAKALV TQA	SSAIPV PLY
burkholderia_f	QKVLGIR EKL	AAK. GGDA RV	SVLKA VV TQA	SSAIPM PLY
clostridium_a	DKAKL INEKL	NRVIGGRA FV	SVNKA LV TKA	SSAIPV PLY
clostridium_p	KTARELDTQL	KS. LNGEG YI	SVNKA LV TQA	SSAIPV PLY
coxiella_b	ASAATITDKL	ESALS GQALI	SVNKA LV TQA	SSAIPV PLY
cytophaga_h	RAATAINQKL	KS. VKGKA YV	SVNKA LV TQA	SSAIPV PLY
microbulbifer_d	RAATAINQKL	ADL. GGSANV	AVLKA LV TQS	SSAIPV PLY
pseudomonas_a	QKVLGIRDKL	APL. GGDA RV	SVLKA VV TQA	SSAIPM PLY
pseudomonas_p	ETALRLNQKL	AGEVKG GANV	AVLKS VV TQA	SSAIPV PLY
shewanella_o	RAAKALNDKL	SVT. GGSANV	AVLKS VV TQA	SSAIPV PLY
streptomyces_a	STARAL TERL	AA. VDGRA FT	SVNGALV TQA	LTAIPG T PLY
vibrio_c_2	QTS HALNLKL	. ANFDGGA YA	VVCKALV TKA	SVEIPGLSPY
vibrio_p_1	RAAKALNEKL	GAT. GGSANV	AVLKS VV TQA	SSAIPV PLY
vibrio_p_2	QTS HALNLKL	. ANFDGGA YA	TVCKALV TKA	SVEIPALSPY
vibrio_v	QTS HSLNLKL	. ANFDGGA YA	TVCKALV TKA	SVEIPALSPY
vibrio_v_1	RAASALNDKL	SAT. GGSANV	AVLKS VV TQA	SSAIPV PLY
xanthomonas_a	HTAQRLNARL	ARR. GGSANV	AVLKS VV TQA	SSAIPV PLY
xanthomonas_c	HTAQRLDARL	QAS. GGSANV	AVLKS VV TQA	SSAIPV PLY
xylella_f_1	ATSRRLDARL	QF. LGGANV	AVLKS VV TQA	SSAIPAL PLY
xylella_f_2	ATSRRLDARL	QA. LGGANV	AVLKS VV TQA	SSAIPAL PLY
yersinia_p	QKVLAIRESL	AAHG GDA RV	SVLKA VV TQA	SSAIPM PLY

ter_euglena	ICLLYRVMKE	KGTHEGCI EQ	MVRLLT T KLY	PENGA P I V D
burkholderia_f	LSL LFKVMKE	KGTHEGCI EQ	VYGLYKDS L Y	. . . GAAPHL D
clostridium_a	AAI LLYKVMKE	KNIHE NCIMQ	IERM FSEKI Y	. . . SNEKIQFD
clostridium_p	ISL LLYKVMKE	KGTHEGCI EQ	IYRM FKE L Y	. . . EG. NNL D
coxiella_b	ISL LLYKIMKE	KNIHEGCI EQ	MWR LFKER L Y	. . . SNQNIPT D
cytophaga_h	ISL LLYKVMKE	EGIHEGCI EQ	IQR LLYADRL Y	. . . TGDATPT D
microbulbifer_d	ISL LLYKVMKE	EGTHEGCI EQ	LYR LFTEGV Y	. . . TKTAPRL D
pseudomonas_a	LSL LFKVMKE	QGTHEGCI EQ	VDGLYRES L Y	. . . GAEPRL D
pseudomonas_p	LSMVFKIMQE	KGVHEGTC D Q	LDRMYRDR M Y	RTDGA PAEVD
shewanella_o	IAMVFKKMRQ	EGLHEGCM EQ	IYRM FSERL Y	RADGAKPET D
streptomyces_a	VSL LRLRGV LGD	R. . FSPVA Q	SLDLW. . . H	QLTARRP D V D
vibrio_c_2	L LALYQVMKN	KGTHEGCI EQ	MQR LFS D KLY	GHS. . R A P L D
vibrio_p_1	IAMVFKKMR E	EGVHEGCM EQ	IYRM FSQRL Y	KEDGSA A EVD
vibrio_p_2	L LALYRVMKE	KGTHE RCIE Q	MQR LFT T KLY	DQP. . KVPV D
vibrio_v	L LALYRVMKD	EKCHEGCI EQ	MQR LFA T KLY	GQD. . H I SV D
vibrio_v_1	IAMVFKKMR E	EGVHEGCM EQ	IYRM FSQRL Y	KEDGSA A EVD
xanthomonas_a	ISMVYKIMKE	KGLHEGTIE Q	LDRLFRER L Y	REDGQPA QVD
xanthomonas_c	ISMVYKIMKE	KGLHEGTIE Q	LDRLFRER L Y	REDGQPA EVD
xylella_f_1	I AIVFKVMKE	KGLHEGTIE Q	ADRLLRER L Y	REDGQPA A I D
xylella_f_2	I AIVFKVMKE	KGLHEGTIE Q	ADRLLRER L Y	REDGQPA A V D
yersinia_p	LSL LFKVMKE	KGTHEGCI EQ	VYS L YKDS L C	. . . GDS P H M D

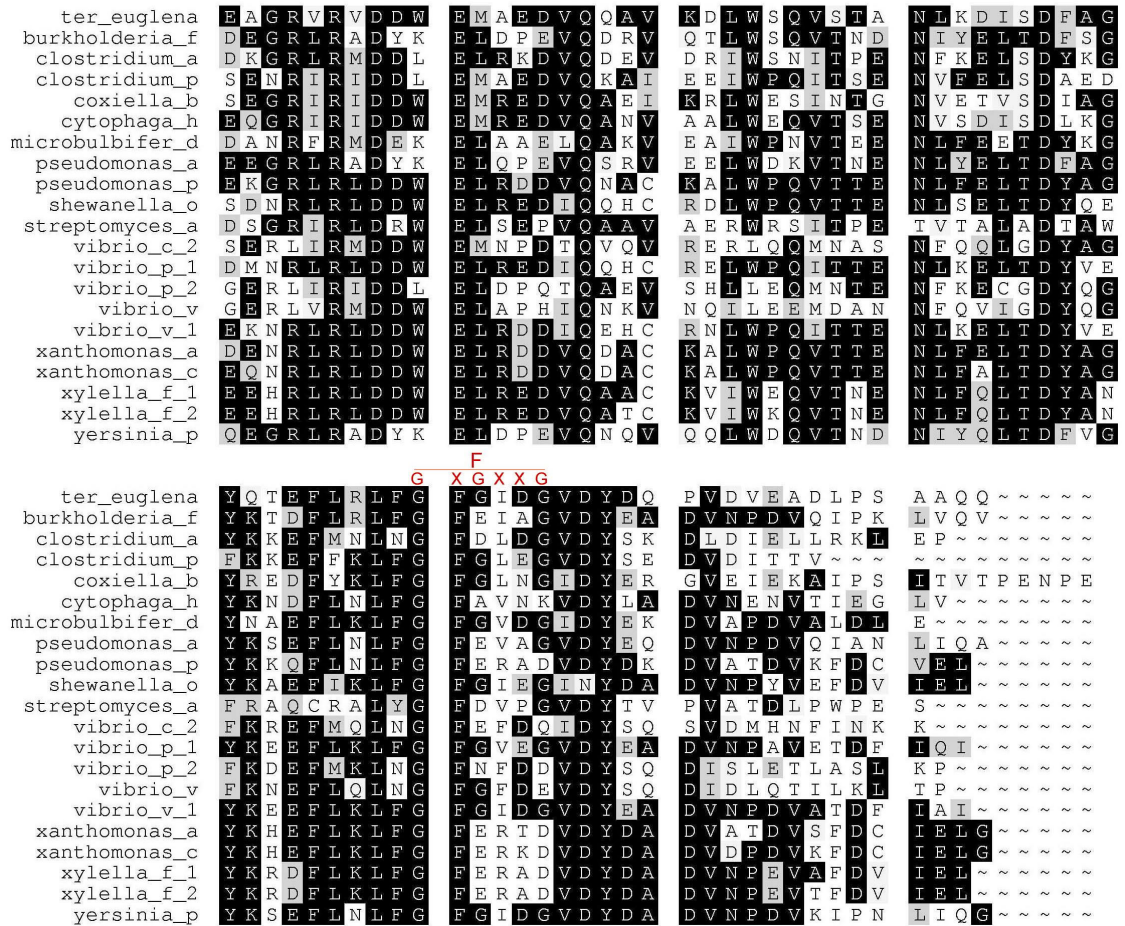


Abb. 3-15 Aminosäuresequenz-Alignment von bakteriellen konservierten hypothetischen Proteinen und der *Euglena trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase. Bereiche hoher Konservierung sind schwarz hervorgehoben. Potentielle funktionelle Sequenzmotive sind durch durchgezogene Linien über der Sequenz wie folgt markiert: F, FAD-Bindestelle (Chang und Hammes 1989, Hanukoglu und Gutfinger 1989); K, katalytisches Zentrum (Das et al. 2000); N, NADH-Bindestelle (Jörnvall et al. 1995). Die Abkürzungen der Organismennamen und Zugangsnummern sind wie folgt: ter_euglena, *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase *Euglena gracilis*; burkholderia_f, *Burkholderia fungorum* (ZP_00033810); clostridium_a, *Clostridium acetobutylicum* (NP_347102); clostridium_p, *Clostridium perfringens* (BAB81780); coxiella_b, *Coxiella burnetii* (AA089828); cytophaga_h, *Cytophaga hutchinsonii* (ZP_00116993); microbulbifer_d, *Microbulbifer degradans* (ZP_00064975); pseudomonas_a, *Pseudomonas aeruginosa* (NP_251640); pseudomonas_p, *Pseudomonas putida* (AAN70208); shewanella_o, *Shewanella oneidensis* (AAN54852); streptomyces_a, *Streptomyces avermitilis* (BAC70078); vibrio_c_2, *Vibrio cholerae* (NP_233170); vibrio_p_1, *Vibrio parahaemolyticus* (BAC59494); vibrio_p_2, *Vibrio parahaemolyticus* (BAC62213); vibrio_v, *Vibrio vulnificus* (AAO11166); vibrio_v_1, *Vibrio vulnificus* (AAO07231); xanthomonas_a, *Xanthomonas axonopodis* (AAM35033); xanthomonas_c, *Xanthomonas campestris* (AAM39434); xylella_f_1, *Xylella fastidiosa* (AAO28892); xylella_f_2, *Xylella fastidiosa* (NP_299121); yersinia_p, *Yersinia pestis* (NP_407525).

3.7. Genomische Southern-Hybridisierung der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase aus *Euglena*

Um festzustellen, ob die TER im Genom von *Euglena gracilis* als einzelnes Gen oder als Genfamilie vorliegt, wurde eine Southern-Analyse durchgeführt (siehe 2.12.7). Dazu wurden jeweils 20 µg genomische DNA aus *Euglena* mit den Restriktionsenzymen EcoR I, Hind III und Kpn I gespalten. Die gesplattene DNA wurde auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit der 1912 bp großen pTER1.4 als Sonde. Abb. 3-16 zeigt das Ergebnis der Southern-Hybridisierung nach 2 Tagen Exposition bei -80 °C. Es sind jeweils drei bis sechs Banden zu beobachten. Damit lässt die Southern-Analyse darauf schließen, dass die *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase im Genom von *Euglena* nicht als Einzelgen, sondern in bis zu sechs Kopien vorliegt, oder mehrere Introns enthält.

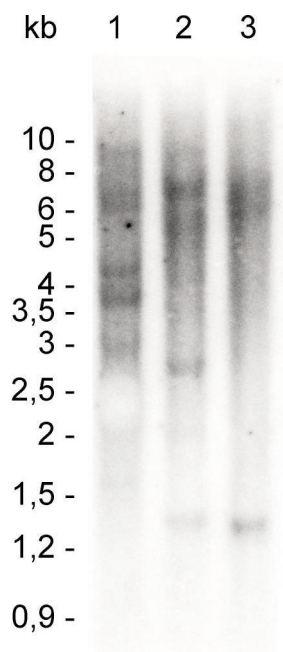


Abb. 3-16 Genomische Southern-Hybridisierung der TER. Pro Spur wurden 20 µg genomische DNA aus *Euglena gracilis* aufgetragen. Als Sonde diente der TER cDNA-Klon (pTER1.4). Spur1: EcoR I, Spur 2: Hind III, Spur: 3 Kpn I. Der Größenstandard ist angegeben.

3.8. Northern-Hybridisierung der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase aus *Euglena*

Die Northern-Hybridisierung wurde wie unter 2.12.8 beschrieben mit isolierter Poly(A)⁺ RNA aus *Euglena* Kulturen durchgeführt, die unter aeroben und anaeroben Bedingungen angezogen waren. Die Auftrennung der Poly(A)⁺ RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem 1 % Agarosegel. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung mit der 1912 bp großen pTER1.4 als Sonde.

In Abb. 3-17 ist das Ergebnis der Northern-Analyse nach 3 Tagen Exposition bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ dargestellt. Es ist eine einzelne Bande zu beobachten, die auf eine Transkriptgröße von 1,9 kb weist. Die Northern-Hybridisierung bestätigt, dass die TER sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen exprimiert ist. Die Quantifizierung der Signalstärke erfolgte mit dem Programm Scion Image Version 4.0.2. Der mRNA Expressionslevel der TER ist in aerob angezogenen Zellen um den Faktor 1,4 höher als in anaerob angezogenen Zellen.

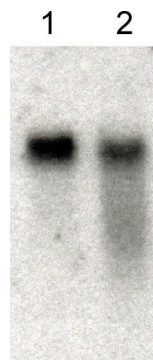


Abb. 3-17 Northern-Hybridisierung von *Euglena gracilis* Poly(A)+ RNA. Pro Spur wurden 5 μg Poly(A)+ RNA aufgetragen. Spur 1: Poly(A)+ RNA aus aerob angezogenen Zellen, Spur 2: Poly(A)+ RNA aus anaerob angezogenen Zellen. Die Transkriptgröße beträgt 1,9 kb.

3.9. Heterologe Überexpression der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase aus *Euglena* in *E. coli*

Zur Überexpression der TER in *E. coli* wurden zwei verschiedene Bereiche des cDNA Klon pTER1.4 ausgewählt. Zum einen wurde das gesamte offene Leseraster von 1612 bp (*ter1*) zur Klonierung in Expressionsvektoren ausgewählt. Zusätzlich wurde der Bereich ab AS 135 bis zum Stopkodon (*ter2*) ausgewählt, weil in diesem Bereich im Alignment die Einrasterung mit den konservierten hypothetischen Proteinen aus Bakterien beginnt (siehe Abb. 3-15). Die Länge von *ter2* mit 1215 bp entspricht zudem mit einem errechneten Molekulargewicht von 45 kDa dem Molekulargewicht des aufreinigten Proteins. *ter1* und *ter2* wurden mit den unter Abschnitt 2.8 aufgeführten Primern in einer PCR-Reaktion amplifiziert und in die Expressionsvektoren pET-28a und pET-32a kloniert. Sowohl der pET-28 Vektor als auch der pET-32 Vektor erlaubt die heterologe Expression der klonierten Sequenzen als His-Tag-Fusionsprotein, wobei der pET-32 Vektor zusätzlich einen Thioredoxin-Tag zur Verfügung stellt. Als Expressionsstamm wurde zunächst *E. coli* BL21(DE3) eingesetzt. Als negative Kontrolle wurden Bakterien mit den unmodifizierten pET-Vektoren transformiert. Die

Expressionskulturen wurden wie unter 2.10.2 und 2.11.15 beschrieben aufgearbeitet. In Abb. 3-18 ist die Coomassie-gefärbte SDS-PAGE verschiedener Fraktionen des Konstrukts pET28-*ter2* dargestellt. In der löslichen Fraktion ist nach Induktion mit IPTG eine starke Bande auf der erwarteten Höhe von 45 kDa im Gegensatz zur Kontrolle zu beobachten (Abb. 3-18, Spur 1 und 2). Die Eluate der Ni-NTA Aufreinigung weisen eine starke Anreicherung des überexprimierten Proteins auf (Abb. 3-18, Spuren 6-9). Zum spezifischen Nachweis des überexprimierten Proteins wurde ein Western Blot mit anschließender Immunodetektion des His-Tag durchgeführt (siehe 2.11.6 und 2.11.7). Abb. 3-19 zeigt den Western Blot des pET28-*ter2* Konstrukts. Sowohl in der löslichen Fraktion als auch in den Eluaten nach Ni-NTA Aufreinigung konnte ein starkes spezifisches Signal für den His-Tag des überexprimierten Proteins detektiert werden. Aktivitätsmessungen ergaben für die Eluate der Ni-NTA Aufreinigung des pET28-*ter2* Konstrukts eine spezifische Aktivität der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase von $1510 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Dies entspricht ca. einem Drittel der Aktivität der aus *Euglena* aufgereinigten *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase (siehe Tab. 3-7).

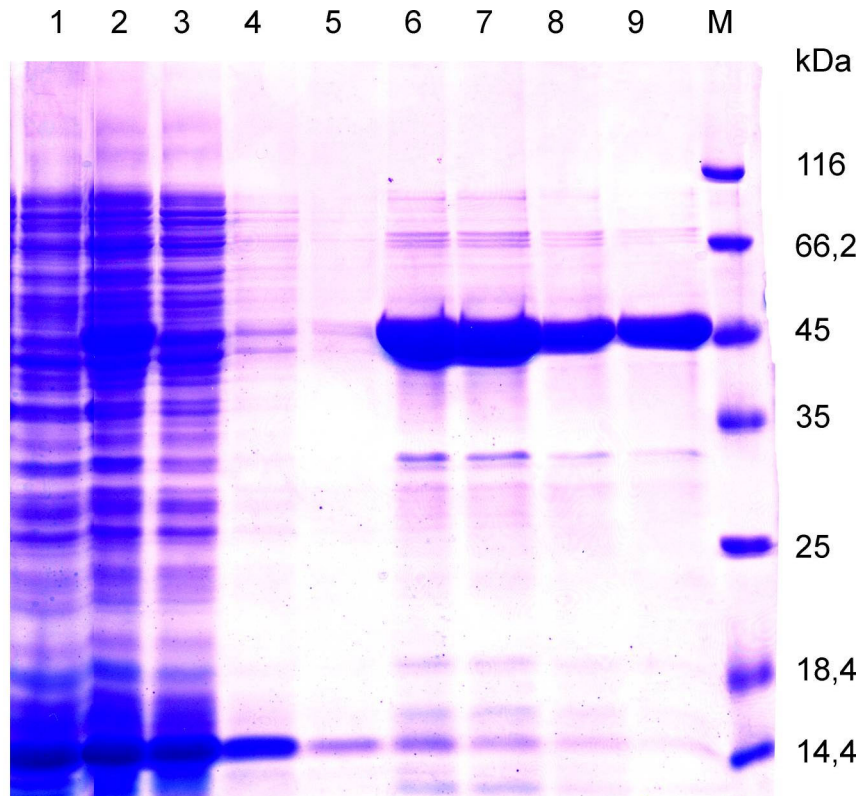


Abb. 3-18 12 % SDS-PAGE verschiedener Fraktionen des Konstrukts pET28-*ter2* exprimiert in BL21(DE3) nach Ni-NTA Aufreinigung. Spur 1: Kontrolle, lösliche Fraktion des leeren pET28 Vektors. Spur 2: lösliche Fraktion, Spur 3: Durchfluss, Spur 4:1. Waschenfraktion; Spur 5:2. Waschfraktion, Spur 6: 1. Eluat, Spur 7: 2. Eluat, Spur 8: 3. Eluat , Spur 9: 4. Eluat, M: Größenstandard.

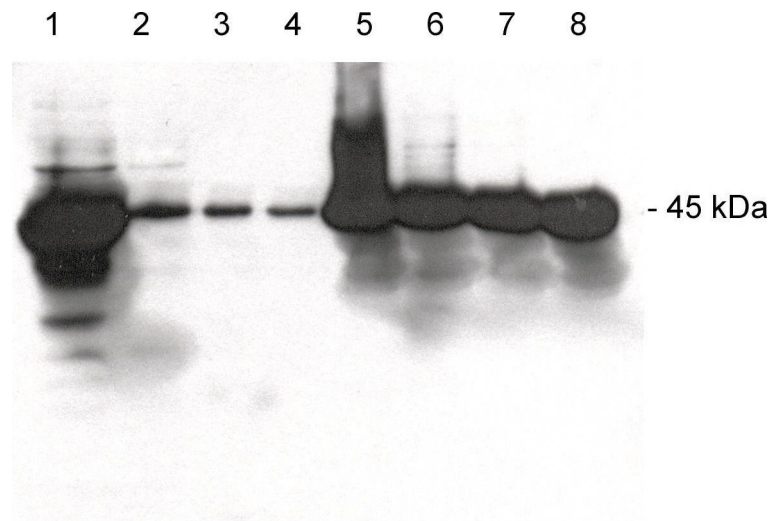


Abb. 3-19 Western Blot mit Immunodetektion des His-Tags des TER2-Konstrukts in pET28 mit BL21(DE3) als Expressionsstamm. Spur 1: lösliche Fraktion, Spur 2: Durchfluss, Spur 3:1. Waschfraktion; Spur 4:2. Waschfraktion, Spur 5: 1. Eluat, Spur 6: 2. Eluat, Spur 7: 3. Eluat, Spur 8: 4. Eluat.

Da für die Konstrukte pET28-*ter1* und pET32-*ter1* in *E. coli* BL21(DE3) keine Expression nachgewiesen werden konnte, wurden zusätzlich die Expressionsstämme *E. coli* Origami(DE3) und *E. coli* Rosetta(DE3) getestet. In der SDS-PAGE konnte für keines der *ter1* Konstrukte eine eindeutige spezifische Bande im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für das Konstrukt pET32-*ter1* in *E. coli* Rosetta(DE3) wurde jedoch im Western Blot eine spezifische Bande bei der erwarteten Größe des Proteins TER1 inklusive Thioredoxin-Tag von 78 kDa nachgewiesen (Abb. 3-20). Bei den unterhalb der Bande von TER1 detektierten Banden handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte von TER1. Eine TER-spezifische Aktivität konnte für das exprimierte Protein des Konstrukts pET32-*ter1* nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

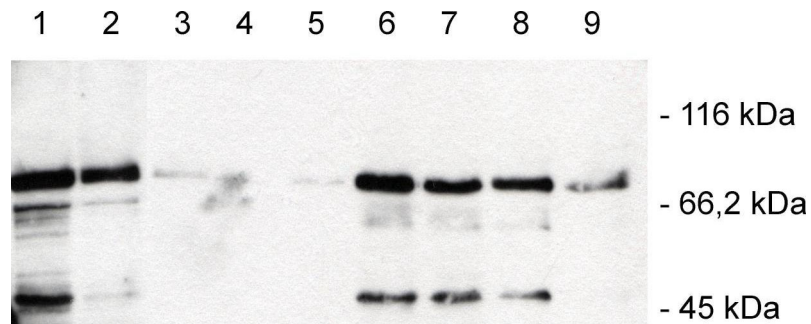


Abb. 3-20 Western Blot mit Immunodetektion des His-Tags des TER1-Konstrukts in pET32 mit Rosetta(DE3) als Expressionsstamm. Spur 1: lösliche Fraktion, Spur 2: Durchfluss, Spur 3: 1. Waschfraktion; Spur 4: 2. Waschfraktion, Spur 5: 3. Waschfraktion, Spur 6: 1. Eluat, Spur 7: 2. Eluat, Spur 8: 3. Eluat, Spur 9: 4. Eluat.

4. Diskussion

Die fakultativ anaerobe Biochemie der Mitochondrien des photosynthetischen Flagellaten *Euglena gracilis* erlaubt die schnelle Adaptation an wechselnde Sauerstoffverfügbarkeit der Umgebung. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von Proteinen, die an der Umstellung des mitochondrialen Energiestoffwechsels beim Übergang von aeroben zu anaeroben Kulturbedingungen beteiligt sind. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der ungewöhnlichen mitochondrialen Fettsäuresynthese, die das Kernstück der anaeroben ATP-Synthese durch die Wachsesterfermentation bei *Euglena* darstellt.

4.1. Proteomanalysen des fakultativ anaeroben Mitochondriums von *Euglena gracilis*

Im Mitochondrium von *Euglena* wird α -Ketoglutarat mittels einer α -Ketoglutarat-Decarboxylase zu Succinatsemialdehyd umgewandelt, das nachfolgend zu Succinat oxidiert wird (siehe Abb. 1-5, Buetow 1989). Katalysiert wird diese Reaktion durch die Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase, dem Markerenzym für *Euglena* Mitochondrien. Neben dem mitochondrialen Markerenzym wurden Markerenzymaktivitäten für das Cytosol und die Chloroplasten bestimmt. Aufgrund der Ergebnisse der Aktivitätsmessungen der Markerenzyme sind die isolierten Mitochondrien frei von Kontaminationen durch andere Zellkompartimente (siehe Tab. 3-1) und wurden somit zur weiteren Analyse der mitochondrialen Proteine in der 2D-PAGE verwendet. Der Vergleich der Proteinmuster von isolierten Mitochondrien aus aerob und anaerob angezogenen *Euglena* Zellen ergab, dass keine anaerob-spezifischen Spots nachweisbar sind. Demgegenüber konnten zahlreiche Spots identifiziert werden, die in Mitochondrien aerob angezogener Zellen vorhanden waren, aber in Mitochondrienpräparationen anaerob kultivierter Zellen fehlten (Abb. 3-2). Die Beobachtung, dass beim Wechsel von aeroben zu anaeroben Kulturbedingungen keine *de novo* Akkumulation von Proteinen in den Mitochondrien von *Euglena* erfolgt, legt die Vermutung nahe, dass die für die anaerobe ATP-Synthese benötigten Enzyme bereits unter aeroben Bedingungen vorhanden sind. Anscheinend werden diese bereits vorhandenen Enzyme physiologisch relevant, wenn Sauerstoff als Elektronenakzeptor nicht mehr verfügbar ist. Diese Art der metabolischen Vorbereitung des mitochondrialen Energiestoffwechsels ist auch von einigen parasitischen Würmern bekannt. Beispielsweise verwendet *Fasciola hepatica* unter anaeroben Bedingungen

Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor (Boyunaga et al. 2001) und die hierfür benötigte Fumaratreduktase und das als Elektronendonator dienende Rhodoquinon sind auch in den aeroben Stadien des Lebenszyklus von *Fasciola hepatica* vorhanden, werden aber in der Gegenwart von Sauerstoff nicht verwendet (Tielens und Van Hellemond 1998, Tielens et al. 2002). Die Mitochondrien von *Fasciola hepatica* sind also auf Anaerobiose vorbereitet, bevor die veränderte Sauerstoffverfügbarkeit eintritt (Tielens 1994, Boyunaga et al. 2001). Eine ähnliche Strategie als Vorbereitung auf eine veränderte Verfügbarkeit von Sauerstoff scheint auch bei *Euglena* vorzuliegen, da keine mitochondrialen Proteine nachgewiesen werden konnten, die spezifisch für anaerobe Anzuchtbedingungen sind.

Dreizehn für aerobe Anzuchtbedingungen spezifische Proteinspots wurden zur Sequenzierung mittels ESI-Q-TOF-MS/MS ausgewählt. Über Datenbankvergleiche der ermittelten Peptidsequenzen (Tab. 3-2) mit GenBank und der *Euglena* EST-Datenbank konnte neun aerob induzierten Proteinen eine eindeutige Funktion zugeordnet werden (Tab. 3-3 und Tab. 3-4). Dabei wurden drei Komponenten der mitochondrialen Atmungskette identifiziert, die unter anaeroben Bedingungen herunterreguliert werden. Zwei der Komponenten gehören zum Komplex III und eine Komponente zu Komplex IV der Atmungskette. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen von Carre et al. (1988), dass bei *Euglena* bei längerer Kultur unter anaeroben Bedingungen eine Cytochrom Oxidase und Cytochrom c558 nicht mehr nachweisbar sind. Die Proteomanalysen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass unter anaeroben Bedingungen die Ubiquinol-Cytochrom *c* Reduktase Komplex Kernproteine I und II und die Cytochrom *c* Oxidase Untereinheit IV abgebaut werden (Tab. 3-3, Tab. 3-4). *Euglena* scheint bei Rückkehr zu aeroben Bedingungen somit zunächst von einer Cyanid-resistenten Elektronentransportkette abzuhängen. Eine alternative Cyanid-resistente Atmungskette ist für alle Pflanzen, viele Algen und Pilze und einige Protozoen nachgewiesen und stellt eine Abzweigung von der standardmäßigen mitochondrialen Elektronentransportkette (auch Cytochrom Weg genannt) auf der Ebene des Ubiquinon-Pools dar (Rhoads et al. 1998, Atteia et al. 2004). Bei diesem alternativen Weg wird eine Alternative Oxidase verwendet, die sich im Gegensatz zur normalen Cytochrom *c* Oxidase durch ihre Insensitivität gegenüber Cyanid, Azid und Kohlenmonoxid auszeichnet (Siedow und Umbach 1995). In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Komponenten der Komplexe III und IV der

mitochondrialen Atmungskette identifiziert, die unter anaeroben Bedingungen herunterreguliert werden. Weder für Komponenten des Komplex I noch des Komplex II wurde eine verminderte Expression unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen. Im Zusammenhang mit weiteren Befunden sprechen diese Ergebnisse der Proteomanalysen der Mitochondrien von *Euglena* dafür, dass bereits unter aeroben Bedingungen im Mitochondrium alle nötigen Enzyme für ein anaerobes Redoxgleichgewicht und die anaerobe ATP Synthese vorhanden sind.

Zusätzlich zu den Komponenten von Komplex III und IV der Atmungskette wurde die E1 β Untereinheit des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes mittels der 2D Gele im Mitochondrium von *Euglena* identifiziert (Abb. 3-2, Tab. 3-3). Die anderen drei Untereinheiten der PDH wurden in einer früheren Arbeit in der *Euglena* EST-Datenbank nachgewiesen und durch Screenen einer cDNA Bank wurden Vollängenklone für diese drei PDH Untereinheiten aus *Euglena* isoliert (Rotte 2003). Bisher wurde beschrieben, dass eine mitochondriale PDH Aktivität in *Euglena* fehlt, und die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat stattdessen ausschließlich durch die Sauerstoff sensitive PNO erfolgt (Inui et al. 1984b, Inui et al. 1987, Inui et al. 1990). Es wurde jedoch auch in einer einzelnen, bisher isolierten Arbeit eine PDH Aktivität für *Euglena* Mitochondrien gemessen (Yokota et al. 1982). Zusammen mit diesen Daten belegt der Nachweis der PDH E1 β Untereinheit auf Proteinebene in der vorliegenden Arbeit und der Nachweis der anderen drei PDH Untereinheiten auf mRNA Ebene (Rotte 2003), dass PDH und PNO im Mitochondrium von *Euglena* koexistieren. Northern Blot Analysen zeigten, dass PDH und PNO sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen exprimiert werden, jedoch bei einer Hochregulierung der mRNA für die PDH der mRNA Expressionslevel für die PNO vermindert ist und umgekehrt (Rotte et al. 2001, Rotte 2003). Die Proteomanalysen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass auf Proteinebene die E1 β Untereinheit der PDH nur unter aeroben Bedingungen vorhanden ist (siehe Spot 4 Abb. 3-2). Der Nachweis der PDH E1 β Untereinheit auf Proteinebene ausschließlich unter aeroben Bedingungen steht nicht unbedingt im Widerspruch dazu, dass die anderen drei PDH Untereinheiten auf mRNA-Ebene sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen exprimiert sind. Ein Nachweis der PDH E1 β Untereinheit auf mRNA-Ebene in *Euglena* ist bisher nicht erfolgt und das Fehlen der PDH E1 β auf Proteinebene unter anaeroben Anzuchtbedingungen könnte auf einen

möglichen Regulationsmechanismus der PDH Aktivität in Koordination mit der Aktivität der PNO hindeuten.

Des Weiteren wurden zwei Enzyme des Stickstoffwechsels, Glutamin Synthetase und Glutamat Racemase, und zudem eine O-Methyltransferase als aerob-spezifische Proteine mit Hilfe der Proteomanalysen identifiziert. Bei diesen Proteinen scheint es sich um eine eher generellere Antwort auf eine geringere Verfügbarkeit von ATP unter anaeroben Bedingungen zu handeln. Die Glutamin Synthetase katalysiert die ATP-abhängige Synthese von Glutamin aus Glutamat. Das für diese Reaktion benötigte ATP stammt neben anderen Quellen aus der Glykolyse und der oxidativen Phosphorylierung (Rees 2003), so dass Kohlenstoff- und Stickstoffwechsel in engem Zusammenhang stehen. Methyltransferasen besitzen sehr hohe Substratspezifitäten (Wu et al. 2000), so dass aus den durch die Proteomanalyse gewonnenen Daten keine eindeutige Funktionszuordnung des Proteins in bezug auf eine Anpassung an Anaerobiose möglich ist.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Proteomanalysen, dass *Euglena* bereits unter aeroben Bedingungen auf einen Wechsel zu anaeroben Bedingungen vorbereitet ist, wurde Rhodoquinon in aerob und anaerob angezogenen *Euglena* Zellen nachgewiesen (Hoffmeister et al. 2004). Bei der Wachsesterfermentation beginnt die Synthese von Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen bei Propionyl-CoA, das über den Methylmalonyl-CoA Weg synthetisiert wird (Nagai et al. 1971, Schneider und Betz 1985, Pönsen-Schmidt et al. 1998, siehe auch Abb. 1-5 und Abb. 1-6). Der Syntheseweg zur Bildung von Propionyl-CoA beinhaltet eine Fumaratreduktase, die die umgekehrte Reaktion der Succinat-Dehydrogenase des Komplex II der Atmungskette katalysiert. Allerdings benötigt die Fumaratreduktase Rhodoquinon anstelle von Ubiquinon, um die Reaktion in Richtung der Synthese von Succinat zu katalysieren (Rich 1984, Van Hellemond und Tielens 1994, Van Hellemond et al. 1995, Tielens und van Hellemond 1998, Tielens et al. 2002, siehe auch Abb. 1-6). Aerob angezogene *Euglena* Zellen enthalten einen Anteil von 28 % Rhodoquinon an der Gesamtmenge an Quinonen in der Zelle. Demgegenüber ist der Rhodoquinon-Anteil in anaerob angezogenen Zellen auf 43 % erhöht (Hoffmeister et al. 2004), was in Einklang steht mit einem erhöhten Umsatz der Fumaratreduktase bei der Synthese von ungeradzahligen Fettsäuren bei der Wachsesterfermentation.

4.2. Nachweis der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase Aktivität in Mitochondrien von *Euglena*

Die Ergebnisse der Proteomanalysen haben gezeigt, dass die Enzyme der anaeroben ATP-Synthese bereits unter aeroben Bedingungen vorhanden sind. Zur weiteren Charakterisierung der mitochondrialen Fettsäuresynthese wurde die Aktivität des Schlüsselenzyms dieses Stoffwechselweges vergleichend an isolierten Mitochondrien von aerob und anaerob angezogenen Zellen bestimmt (Tab. 3-5). Die spezifischen Aktivitäten der TER weisen keinen signifikanten Unterschied zwischen Zellen aus aerober und anaerober Anzucht auf, was in Übereinstimmung steht mit den Ergebnissen der Proteomanalysen. Die Aktivität des Schlüsselenzyms der mitochondrialen Fettsäuresynthese ist sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen vorhanden. Ein Regulationsmechanismus zwischen aerobem und anaerobem mitochondrialen Energiestoffwechsel muss demnach an anderer Stelle greifen als über die Expression oder das Vorliegen der TER in aktiver Form. Die spezifischen TER Aktivitäten betragen 63 bzw. 66 nmol·mg⁻¹·min⁻¹ für Mitochondrien aus aeroben bzw. anaeroben *Euglena* Zellen. Diese Aktivitäten liegen im gleichen Bereich wie die von Inui und Mitarbeitern (1984a) bestimmte Aktivität von 40,1 nmol·mg⁻¹·min⁻¹ für die TER aus isolierten Mitochondrien von einer Chloroplasten-freien Mutante von *Euglena gracilis*, wobei bei diesen Untersuchungen die TER vor der Aktivitätsbestimmung zusätzlich über eine DEAE-Biogel A Säule angereichert wurde. Ein Vergleich aerob und anaerob angezogener Zellen wurde in der Arbeit von Inui et al. (1984a) nicht vorgenommen. Die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Aktivitäten der TER mit NADPH als Elektronendonator waren geringfügig höher als die mit NADH als Cofaktor bestimmten Aktivitäten (Tab 3-5). Die Reduktion von Crotonyl-CoA mittels der TER erfolgt an isolierten Mitochondrien also sowohl mit NADH als auch mit NADPH. Die TER wurde zuvor als spezifisch für NADH als Elektronendonator beschrieben (Inui et al. 1984a, Inui et al. 1986). Allerdings erfolgte in diesem Fall die Aktivitätsbestimmung an einer angereicherten TER Fraktion und nicht wie in der vorliegenden Arbeit an intakten Mitochondrien. Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Elektronendonorspezifität können somit auf einer Umwandlung von NADPH in NADH durch eine Transhydrogenase Aktivität in intakten Mitochondrien beruhen. Das Vorkommen einer starken Transhydrogenase Aktivität in der löslichen Fraktion von *Euglena* Mitochondrien wurde bei anderen Untersuchungen nachgewiesen (Inui et al. 1985).

4.3. Reinigung, Klonierung und Überexpression der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase

Die Aktivität der TER konnte an den isolierten Mitochondrienfraktionen und auch am Extrakt gesamter Zellen (Tab. 3-5, Tab. 3-7) eindeutig nachgewiesen werden, so dass die biochemische Reinigung erfolgen konnte. Die TER konnte aus einem Gesamtextrakt von 1 kg *Euglena* Zellen bis zur Homogenität gereinigt werden (Abb. 3-10). Die TER lag als Monomer vor und wies nach Größenbestimmung mittels SDS-PAGE und Gelfiltration ein Molekulargewicht von 44 kDa auf. Im Gegensatz dazu waren in einer früheren Arbeit zwei Untereinheiten der TER von 15 und 25 kDa beschrieben worden (Inui et al. 1986). In der vorliegenden Arbeit konnte die Aktivität der TER eindeutig der 44 kDa Bande in der SDS-PAGE zugeordnet werden (Abb. 3-11). Das reine Enzym wies eine spezifische Aktivität von $3879,2 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ auf. Die spezifische Aktivität liegt damit um den Faktor zwei höher als bei Inui et al. (1986) beschrieben. Das Wesen der von Inui et al. (1986) beschriebenen 15 und 25 kDa Proteine und ihre Beziehung zur hier gemessenen und gereinigten TER konnte nicht weiter geklärt werden. Die Mikrosequenzierung des reinen TER Proteins lieferte 17 interne Peptide, anhand derer degenerierte Primer entworfen wurden (siehe Abschnitt 3.3). Mit Hilfe dieser Primer konnte ein 839 bp PCR-Produkt amplifiziert werden, das als Sonde zur Isolierung einer vollständigen cDNA der TER eingesetzt wurde (siehe Abschnitt 3.4 und 3.5). Der Klon pTER1.4 hatte eine Länge von 1912 bp und konnte als vollständiger cDNA Klon identifiziert werden, da er am 5'-Ende eine Spliced Leader Sequenz aufweist (Abb. 3-14).

Die überwiegende Mehrheit der kernkodierten mRNAs in *Euglena* trägt nah verwandte Spliced Leader (SL) Sequenzen am 5'-Ende. Diese SL Sequenzen fehlen den entsprechenden Kerngenen und gehören zu einer Familie von kleinen mRNAs, die mittels Trans-Spleißens auf die prä-mRNA übertragen werden (Tessier et al. 1991). Bei der Übertragung der SL Sequenzen handelt es sich um eine Spliceosom vermittelte Reaktion zwischen der prä-mRNA und einer snRNA (Franz et al. 2000). Die Funktion des Trans-Spleißens von Spliced Leadern ist nicht endgültig geklärt und kann von Fall zu Fall variieren. Es werden verschiedene mögliche Funktionen diskutiert, wie die Vermittlung von Stabilität oder Translatierbarkeit der mRNA (Maroney et al. 1995), die Auflösung von polycistronischen prä-mRNAs (Agabian 1990, Blumenthal 1995) und die Bildung von funktionalen mRNAs aus RNA Polymerase I Transkripten (Lee und

Van der Ploeg 1997). Das Trans-Spleißen von SL Sequenzen erfolgt parallel zum konventionellen Spleißen, das Introns aus prä-RNAs entfernt (Vandenberghe et al. 2001). Die Existenz von Spliced Leadern ist bisher für Trypanosomen, Nematoden, Ascidien, Cnidarien und Euglenoiden bekannt (Bonen 1993, Blumenthal 1995, Franz et al. 2000, Stover und Steele 2001). Aufgrund des Nachweises der SL Sequenz am 5'-Ende des cDNA Klons pTER1.4 konnte der Klon eindeutig als vollständiges Transkript identifiziert werden.

Der Klon pTER1.4 kodiert für ein offenes Leseraster von 539 Aminosäuren und hat damit ein errechnetes Molekulargewicht von 59 kDa. Das errechnete Molekulargewicht unterscheidet sich somit vom Molekulargewicht des aufgereinigten Proteins von 44 kDa. Vorhersageprogramme für Transitpeptide wie MitoProtII (Claros und Vincens 1996) oder iPSORT (Bannai et al. 2001, Bannai et al. 2002) sagen mit bis 76 % Wahrscheinlichkeit die Existenz eines Transitpeptids voraus. Ausgehend von den 44 kDa des gereinigten Proteins würde ein mögliches Transitpeptid die Länge von bekannten mitochondrialen Transitpeptiden aus *Euglena* deutlich überschreiten. Die Länge bekannter mitochondrialer Importsequenzen variiert zwischen 30 und 40 Aminosäuren (Cui et al. 1994, Rotte et al. 2001). Es könnte sich beim N-terminalen Bereich von pTER1.4 auch um eine zusätzliche Transmembrandomäne handeln, die beispielsweise für die Aktivität gegenüber länger-kettigen Substraten als Crotonyl-CoA von Bedeutung sein könnte und bei der biochemischen Reinigung des Proteins verloren gegangen ist. Das Ergebnis der Southern Hybridisierung lässt auf bis zu sechs Kopien des TER Gens im Genom von *Euglena* schließen (Abb. 3-16). Die Northern-Hybridisierung bestätigt die Ergebnisse der Proteomanalysen und der Bestimmung der TER-Aktivität an isolierten Mitochondrien, dass die *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase bei *Euglena* sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen exprimiert ist (Abb. 3-17).

Die heterologe Überexpression der TER aus *Euglena* erfolgte mit zwei verschiedenen Konstrukten, zum einen dem gesamten offenen Leseraster des cDNA Klons und zum anderen mit einem Konstrukt ohne den 5'-Bereich des cDNA Klons, der das mögliche Transitpeptid und/oder die mögliche Transmembrandomäne darstellt (siehe 3.9). Das längere Konstrukt liefert somit ein Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 59 kDa. Das vom kürzeren Konstrukt kodierte Protein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 45 kDa, was der Größe der aufgereinigten TER aus

Euglena entspricht. Die Proteine beider Konstrukte konnten erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden und mit Hilfe von Antikörpern gegen den bei der Expression angehängten His-Tag spezifisch im Immuno-Blot nachgewiesen werden (Abb. 3-19 und Abb. 3-20). Die Größen der exprimierten Proteine entsprachen den oben beschriebenen Erwartungen von 45 kDa bzw. 59 kDa, wobei das größere Konstrukt nur mit Hilfe eines zusätzlichen Thioredoxin Tags von 19 kDa exprimiert werden konnte, so dass die endgültige Größe des Proteins 78 kDa betrug. Eine TER spezifische Aktivität konnte nur für das vom kleinen Konstrukt kodierte Protein nachgewiesen werden. Die spezifische Aktivität dieses in *E. coli* heterolog exprimierten Proteins betrug $1510 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, was etwa einem Drittel der spezifischen Aktivität der aus *Euglena* gereinigten *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase entspricht. Dass lediglich das kleinere Konstrukt TER spezifische Aktivität aufwies, kann als Indiz dafür gewertet werden, dass es sich bei der N-terminalen Domäne des TER cDNA Klons eher um ein Transitpeptid als um eine Transmembrandomäne handelt.

Datenbankvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz der *Euglena* TER zeigten Sequenzhomologien zu konservierten hypothetischen Proteinen aus Bakterien (Abb. 3-15). Die Einrasterung der *Euglena* TER im Alignment mit konservierten hypothetischen Proteinen erfolgt erst ab Aminosäure 120 der TER. Die N-terminalen 120 Aminosäuren der *Euglena* TER weisen keine Homologien zu Sequenzen aus Datenbanken auf, während die anderen Bereiche stark konserviert sind. Dieses Ergebnis in Verbindung mit den Ergebnissen zur Aktivität der beiden heterolog überexprimierten TER Konstrukte unterstreicht, dass es sich beim 5'-Bereich des cDNA Klons um ein mitochondriales Transitpeptid handeln könnte.

Die Länge von pflanzlichen mitochondrialen Transitpeptiden variiert in der Regel zwischen 20 und 60 Aminosäuren, wobei das längste bekannte pflanzliche Transitpeptid für Mitochondrien eine Länge von 85 Aminosäuren aufweist (Whelan und Glaser 1997). Auch die spaltbaren Transitpeptide von pflanzlichen Chloroplasten-Proteinen sind in der Regel nicht länger als 80 Aminosäuren (Von Heijne et al. 1989). Als Erklärung wurde vorgeschlagen, dass es ein oberes Größenlimit für Präsequenzen gibt, da die mitochondriale Peptidase (mitochondrial processing peptidase, MPP) und die stromale Peptidase vermutlich zur gleichen Familie von Peptidasen gehören, die Peptide kleiner als 7 kDa an diskreten Stellen spalten (Braun und Schmitz 1995, VanderVere et al. 1995). Die Länge bekannter mitochondrialer Transitpeptide aus

Euglena beträgt 30 bis 40 Aminosäuren (Cui et al. 1994, Rotte et al. 2001). Allerdings sind bisher nur sehr wenige mitochondriale Transitpeptide aus *Euglena* bekannt. Neben den Transitpeptiden für die Untereinheiten I, II und IX des mitochondrialen Komplex III (Cui et al. 1994) ist nur das Transitpeptid für die mitochondriale PNO aus *Euglena* bekannt (Inui et al. 1991, Nakazawa et al. 2000, Rotte et al. 2001, Nakazawa et al. 2003). Es ist also gut möglich, dass auch längere mitochondriale Transitpeptide in *Euglena* vorkommen, diese aber bisher nicht nachgewiesen wurden.

Eine endgültige Klärung der Bedeutung der N-terminalen Domäne und möglicher Prozessierungsstellen eines möglichen Transitpeptids des cDNA Klons der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase aus *Euglena* ist mit Hilfe der vorliegenden Daten nicht möglich. Weitere Hinweise würde die Sequenz des N-Terminus des gereinigten Proteins liefern. Versuche zur Sequenzierung des N-Terminus der aus *Euglena* gereinigten TER mittels Edmann-Abbau wurden im Rahmen dieser Arbeit unternommen, schlugen jedoch möglicherweise aufgrund einer N-terminalen Blockierung fehl. Eine Funktion des N-terminalen Bereiches des cDNA Klons als chloroplastidäres Transitpeptid kann jedoch ausgeschlossen werden, da in den Chloroplasten aus *Euglena* keine *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase Aktivität nachgewiesen werden konnte (Tab. 3-6) und die TER Aktivität eindeutig den Mitochondrien zugewiesen werden konnte (Tab. 3-1, Tab. 3-5). Der Vergleich des Molekulargewichts des gereinigten Proteins und des errechneten Molekulargewichts anhand des cDNA Klons und die Ergebnisse der heterologen Überexpression sprechen für eine Funktion der N-terminalen Domäne des cDNA Klons als mitochondriales Signalpeptid. Nicht ausgeschlossen werden kann aber die Möglichkeit, dass es sich bei der N-terminalen Domäne um eine Transmembrandomäne handelt, die bei der Reinigung des Proteins verloren gegangen ist und möglicherweise nur eine Bedeutung für länger-kettige Substrate hat. Bei der heterologen Überexpression in *E. coli* stört diese Domäne möglicherweise aufgrund inkorrektcr Faltung oder fehlender Verankerung in der Membran bei der Aktivitätsmessung mit dem C4-Substrat.

4.4. Sequenzhomologien der *Euglena* TER

Die in der vorliegenden Arbeit aus *Euglena* gereinigte und klonierte *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase weist mit über 50 % Sequenzähnlichkeit Homologien zu bakteriellen konservierten hypothetischen Proteinen auf (Abb. 3-15). Die Tatsache, dass die *Euglena*

TER ausschließlich Sequenzhomologien zu Proteinen aus Eubakterien aufweist, legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der TER um eine Akquisition vom mitochondrialen Endosymbionten handeln könnte. Als allgemein anerkannte Meinung gilt, dass Mitochondrien von Proteobakterien abstammen, die in einem frühen evolutionären Stadium in einer Wirtszelle etabliert wurden (Martin und Müller 1998, Gray et al. 1999, Andersson und Kurland 1999, Martin et al. 2001).

Einige bekannte Sequenzmotive konnten in der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *Euglena* TER cDNA Klons identifiziert werden. Zwei der Sequenzen, die über 50 % Sequenzähnlichkeit mit der *Euglena* TER aufweisen, konnten der Familie der kurzkettigen Alkoholdehydrogenasen zugeordnet werden. Es handelt sich dabei zum einen um die Sequenz (NP347102) aus *Clostridium acetobutylicum* (Nölling et al. 2001) und zum anderen um eine Sequenz (BAC62213) aus *Vibrio parahaemolyticus* (Makino et al. 2003) (siehe Abb. 3-15). Ein für kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR) typisches NADH oder NADPH Bindemuster (Jörnvall et al. 1995) von GlyXXXGlyXGly (X kann jede Aminosäure sein) wurde im N-terminalen Bereich der *Euglena* TER identifiziert. Dieses Motiv ist auch in allen bakteriellen Sequenzen mit über 50 % Sequenzähnlichkeit zur *Euglena* TER konserviert (siehe N, Abb. 3-15). Das Glycin-Muster ist in der beschriebenen Form und in leichten Abwandlungen bei den Abständen der Glycinreste auch in vielen anderen Nukleotidbindenden Dehydrogenasen und Kinasen neben der SDR Familie vorhanden (Jörnvall et al. 1984, Wierenga et al. 1985, Scrutton et al. 1990, Bocanegra et al. 1993). In diesem Zusammenhang konnte eine weitere mögliche Nukleotid-Bindungsstelle am C-terminalen Ende der *Euglena* TER identifiziert werden (siehe F, Abb. 3-15). Die Aminosäurekonsensus-Sequenz von GlyXGlyXXGly stellt typischerweise eine FAD-Bindestelle dar (Chang und Hammes 1989, Hanukoglu und Gutfinger 1989). Eine mögliche Assoziation der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase mit FAD wurde bereits von Inui et al. (1986) aufgrund der Beobachtung vorgeschlagen, dass die Zugabe von FAD die Aktivität der TER um den Faktor 2,3 steigerte. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte während der biochemischen Reinigung ein Zusammenhang zwischen FAD und TER-Aktivität hergestellt werden. Mit zunehmenden Reinigungsgrad der TER wurde im Rahmen dieser Arbeit wiederholt festgestellt, dass ein Fehlen von FAD in den verwendeten Puffern zu einem kompletten Verlust der Aktivität des Enzyms führte. Gebundenes FAD stabilisiert offenbar die TER aus *Euglena* und dieser Cofaktor geht

anscheinend bei der chromatographischen Reinigung verloren, was vermutlich zu einer Konformationsänderung des Enzyms führt. Die Identifikation einer potentiellen FAD-Bindestelle in der abgeleiteten Aminosäuresequenz des TER cDNA Klons unterstreicht die Bedeutung von FAD für die Aktivität der TER.

Neben den beschriebenen Nukleotid-Bindestellen wurden in der abgeleiteten Aminosäuresequenz des cDNA Klons der *Euglena* TER zwei mögliche katalytische Zentren von kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen identifiziert (siehe K, Abb. 3-15). Die Mehrzahl der zur SDR Familie gehörenden Proteine besitzt ein katalytisches Zentrum mit dem Sequenz-Motiv TyrXXXLys (Jörnvall et al. 1981, Jörnvall et al. 1995, Breitling et al. 2001), wobei bei einigen Enzymen das Motiv in einer erweiterten Form von TyrX₃₋₇Lys vorliegt (Persson et al. 1991, Das et al. 2000). Die Aminosäuresequenz der *Euglena* TER weist die Motive TyrX₅Lys und TyrX₆Lys auf (siehe K, Abb. 3-15), die somit zwei potentielle katalytische Zentren bei der Funktion als kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase darstellen. Ein möglicher katalytischer Mechanismus mit einem nukleophilen Angriff auf das Substrat durch den Tyrosinrest in ionisierter Form, welcher durch die Seitenkette des Lysinrestes stabilisiert wird, wurde für diesen Typ von katalytischen Zentren vorgeschlagen und ist in Abb. 4-1 dargestellt (McKinley-McKee et al. 1991, Jörnvall et al. 1995). Der Tyr/Lys-Mechanismus liefert eine Erklärungsmöglichkeit für die Konservierung der katalytischen Zentren in der SDR-Proteinfamilie. Es handelt sich jedoch bei dieser Proteinfamilie um eine der größten und diversesten Proteinfamilien überhaupt (Jörnvall 1999). Die Proteine dieser Familie besitzen verschiedenste Funktionen, beispielsweise katalysieren die Reduktasen der SDR-Familie sowohl die Reduktion von CO- als auch von CC-Doppelbindungen, so dass ein allgemein gültiger Katalysemechanismus mit konservierten katalytischem Zentrums für das gesamte Spektrum der Proteine der SDR-Familie nicht postuliert werden kann (Jörnvall et al. 1995). Auch wenn die Zuordnung eines katalytischen Zentrums in der Sequenz der *Euglena* TER hypothetisch bleibt, kann das Protein aufgrund des stark konservierten NAD(P)H-Bindemusters im N-terminalen Bereich mit der Familie der SDR Proteine assoziiert werden.

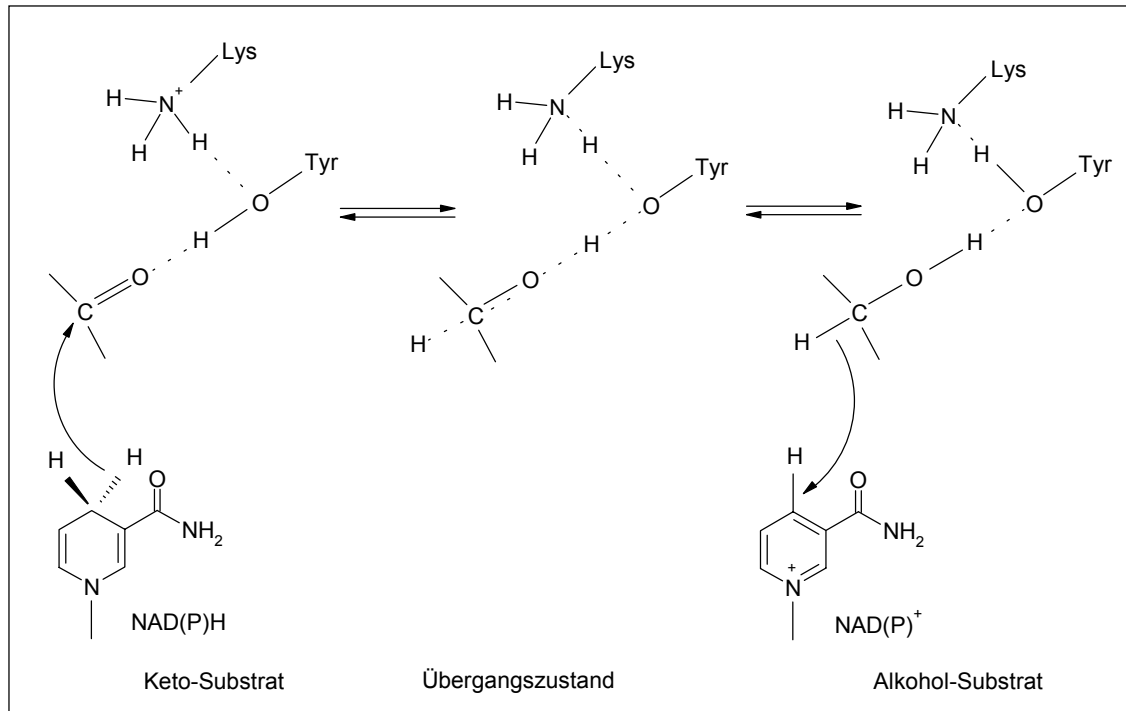


Abb. 4-1 Möglicher Reaktionsmechanismus von Proteinen der SDR-Familie unter Beteiligung der konservierten Lysin- und Tyrosin-Reste. Der hier dargestellte nucleophile Angriff auf die CO-Doppelbindung soll in gleicher Weise auch für eine CC-Doppelbindung erfolgen. (Verändert nach Jörnvall et al. 1995).

4.5. *Euglena* TER im Vergleich zu anderen Enoyl-Thioester Reduktasen

Enoyl-Thioester Reduktasen (ETR) können in zwei Klassen eingeteilt werden. Zum einen gibt es Enoyl-ACP Reduktasen, die an der Biosynthese von Fettsäuren beteiligt sind und zum anderen Enoyl-CoA Reduktasen, die typischerweise bei der Elongation von Fettsäuren mitwirken. Diese 2-Enoyl-ACP/CoA Reduktasen, die sowohl an der Synthese als auch an der Elongation von Fettsäuren beteiligt sind, stellen bezüglich ihrer Aminosäuresequenz eine heterologe Gruppe dar (Airenne et al. 2003). Aber fast alle bisher bekannten ETR gehören zur Familie der SDR-Proteine, was die oben beschriebene Zuordnung der *Euglena* TER zur SDR-Familie aufgrund der identifizierten konservierten Sequenzmotive unterstreicht. Es wurden kürzlich aber auch zwei Enoyl-Thioester Reduktasen aus *Candida tropicalis* (Etr1p) und *Saccharomyces cerevisiae* (Mrf1p) identifiziert, die zur Familie der mittelkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (MDR) gehören (Miinalainen et al. 2003, Torkko et al. 2003).

Die Besonderheit der *Euglena trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase liegt in der Fähigkeit, kurzkettige, insbesondere C4 Substrate, zu reduzieren. Die Fähigkeit der

TER, *trans*-2-Butenoyl-CoA in Butyryl-CoA umzuwandeln, ermöglicht die Verwendung des Stoffwechselweges der β -Oxidation in umgekehrter Richtung als System zur Neusynthese von Fettsäuren in den Mitochondrien von *Euglena*. Eine Umkehr der β -Oxidation zur Neusynthese oder Elongation von Fettsäuren erfordert neben drei reversiblen Enzymen eine Enoyl-CoA Reduktase im letzten Reaktionsschritt. Die anfängliche Oxidation von Acyl-CoA zu 2-Enoyl-CoA bei der β -Oxidation stellt eine unter physiologischen Bedingungen irreversible Reaktion katalysiert durch eine Acyl-CoA Dehydrogenase (mitochondriales System) oder eine Acyl-CoA Oxidase (peroxisomales System) dar (siehe Abb. 4-2). Aus diesem Grund ist bei der Rückreaktion eine spezifische 2-Enoyl-CoA Reduktase im letzten Schritt der Synthese oder Elongation zur Reduktion der Doppelbindung am zweiten Kohlenstoffatom notwendig. Bei klassischen Wegen zur Synthese von Fettsäuren (FAS I und FAS II) sind die Intermediate der wachsenden Acyl-Kette an ACP gebunden, so dass der letzte Reduktionsschritt jedes Verlängerungszyklus durch eine Enoyl-ACP Reduktase katalysiert wird (siehe Abb. 1-3). Mindestens drei verschiedene Arten von Enoyl-ACP Reduktasen (FabI, FabK, FabL) existieren bei Prokaryoten (Heath und Rock 2000), und auch aus Pflanzen wurden Enoyl-ACP Reduktasen gereinigt (Shikimata und Stumpf 1982, Caughey und Keckwick 1982, Slabas et al. 1986). Im Gegensatz zur klassischen Fettsäuresynthese ist zur Verwendung der direkten Umkehr der β -Oxidation eine Enoyl-CoA Reduktase notwendig, da die Intermediate der β -Oxidation an Coenzym A gebunden sind.

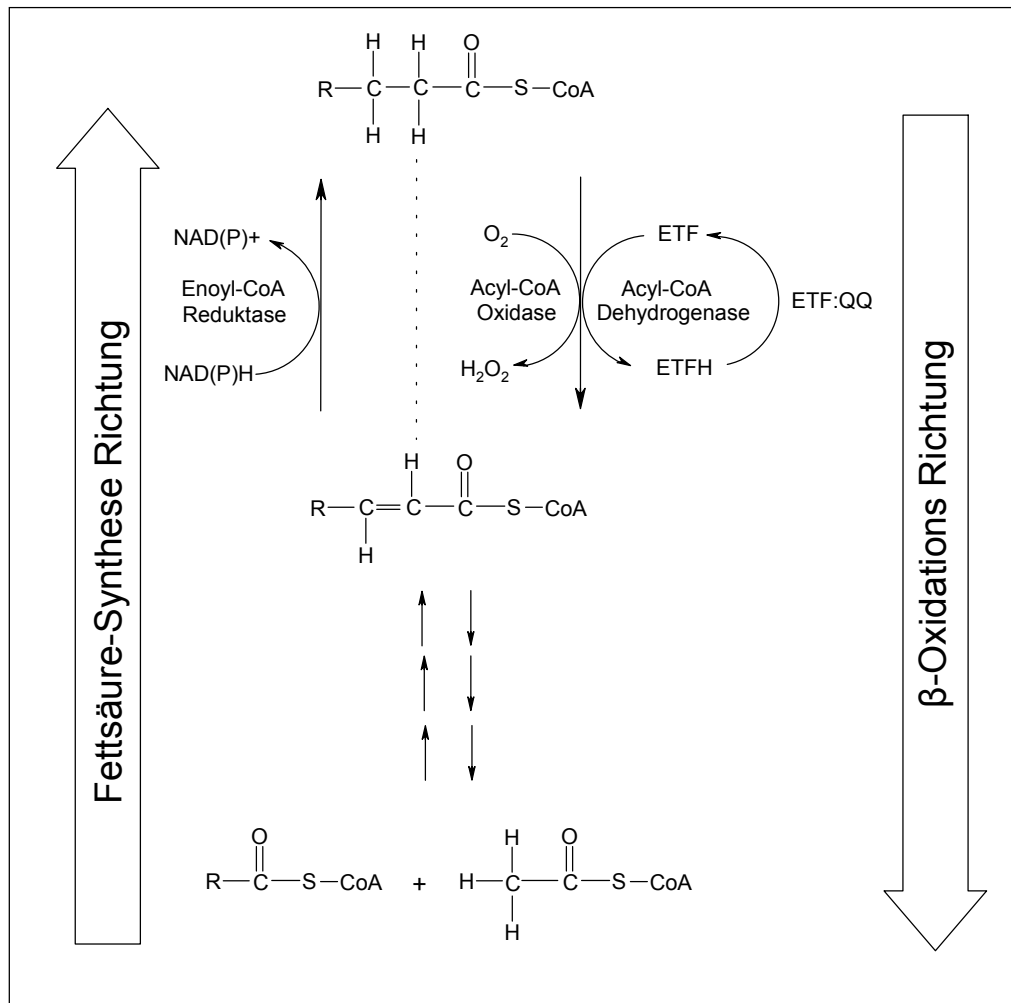


Abb. 4-2 Erster Reaktionsschritt der β -Oxidation und letzter Reaktionsschritt bei Umkehr der β -Oxidation zur Synthese von Fettsäuren. Die Katalyse des Reaktionsschritts in Richtung der β -Oxidation erfolgt alternativ durch die Acyl-CoA Dehydrogenase im mitochondrialen System oder durch die Acyl-CoA Oxidase im peroxisomalen System. Abkürzungen: ETF, Elektronentransportierendes Flavoprotein; ETFH, reduziertes ETF; ETF:QQ, ETF: Ubiquinon Oxidoreduktase. Verändert nach Bloch und Vance (1977).

Bei Pflanzen und Hefen erfolgt die Elongation von langkettigen Fettsäuren zu sehr langkettigen Fettsäuren im endoplasmatischen Retikulum, und die an der Elongation beteiligten Enzyme sind vermutlich als Komplex organisiert (Domergue et al. 2000, Han et al. 2001). Über die Enoyl-CoA Reduktasen dieser Elongationssysteme ist bisher relativ wenig bekannt. Das Gen *TSC13* aus *Saccharomyces* kodiert vermutlich für eine an der Elongation beteiligte Enoyl-CoA Reduktase (Kohlwein et al. 2001) und besitzt, kodiert durch *Atg55360*, ein Homolog in *Arabidopsis* (Gable et al. 2004).

Demgegenüber sind an der Elongation von Fettsäuren in Säugetieren beteiligte Enoyl-CoA Reduktasen gut untersucht. Bereits Anfang der 70iger Jahre wurden Enoyl-CoA Reduktasen in verschiedenen Geweben von Ratten beschrieben (Podack und

Seubert 1972, Hinsch und Seubert 1975, Hinsch et al. 1976). Charakterisiert wurden dabei zwei verschiedene Enoyl-CoA Reduktasen, die beide hauptsächlich mittelkettige Substrate verwenden. Ein Enzym wurde in den Mitochondrien lokalisiert (*trans*-2-Decenoyl-CoA Reduktase) und die zweite Enoyl-CoA Reduktase (*trans*-2-Hexenoyl-CoA Reduktase) wurde im endoplasmatischen Retikulum (ER) nachgewiesen. Später wurde eine weitere Enoyl-CoA Reduktase, die auch kurzkettige Substrate reduziert, dem ER zugeordnet. (Cinti et al. 1982, Nagi et al. 1983, Prasad et al. 1983, Prasad et al. 1985). Bei Säugetieren existieren somit Elongationssysteme für Fettsäuren im ER und in den Mitochondrien (Cinti et al. 1992). Die eigentliche Verlängerung von Fettsäuren erfolgt im ER, wobei Malonyl-CoA als Primer dient. Im Gegensatz dazu wird vom mitochondrialen Elongationssystem in Säugetieren Acetyl-CoA für die Kondensationsreaktion verwendet, wobei die physiologische Funktion dieses Systems nicht geklärt ist (Cvetanovic et al. 1985). Die Enoyl-CoA Reduktase des mitochondrialen Elongationssystems von Säugetieren wurde aus Rinderleber gereinigt und verwendet NADPH als Coenzym (Cvetanovic et al. 1985). Zudem wurde ein zusätzliches Elongationssystem für Fettsäuren in den Peroxisomen von Säugetieren nachgewiesen und eine NADPH-spezifische *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase wurde aus den Peroxisomen der Leber von Meerschweinchen isoliert und kloniert (Das et al. 2000). Sowohl die physiologische Bedeutung des peroxisomalen Elongationssystems als auch die Regulationsmechanismen der Elongationssysteme in drei verschiedenen Zellkompartimenten von Säugetieren sind bisher nicht geklärt.

Für Bakterien wurden ebenfalls Enoyl-CoA Reduktasen beschrieben. Eine NADH-abhängige Enoyl-CoA Reduktase wurde aus *Mycobacterium smegmatis* (Shimakata et al. 1980, Shimakata und Kusaka 1981) charakterisiert. Das Enzym aus *Mycobacterium* zeigt hohe Aktivitäten gegenüber mittel- und langkettigen Substraten (C10-C16), die Aktivität gegenüber kurzkettigen Substraten ist nur sehr gering (Shimakata et al. 1980). Aus *E. coli* wurde eine NADPH-abhängige *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase gereinigt (Mizugaki et al. 1982, Nishimaki et al. 1984), die die höchsten Aktivitäten gegenüber *trans*-2-Hexenoyl-CoA und *trans*-2-Octenoyl-CoA aufweist. Aus *Streptomyces collinus* wurde eine NADPH-spezifische Crotonyl-CoA Reduktase (CCR) gereinigt und kloniert (Wallace et al. 1995), die wie die *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase aus *Euglena* der Synthese von Butyryl-CoA aus Crotonyl-CoA dient. Sequenzhomologien zwischen der CCR aus *Streptomyces* und der *Euglena* TER

bestehen jedoch nicht. Die Funktion der CCR aus *Streptomyces* liegt in der Bereitstellung von Butyryl-CoA Einheiten für die Bildung von sekundären Metaboliten. Im Gegensatz zur *Euglena* TER zeigt die *Streptomyces* CCR keine Aktivität mit NADH als Cofaktor und benötigt kein FAD (Reynolds et al. 1992, Wallace et al. 1995). Auch ist die CCR nicht in der Lage, andere Substrate als Crotonyl-CoA (C4) zu reduzieren. Eine Bestimmung von Aktivitäten der TER aus *Euglena* mit längerkettigen Substraten als Crotonyl-CoA wurde in der vorliegenden Arbeit nicht vorgenommen. Aber Inui und Mitarbeiter (1984a, 1986) haben in früheren Arbeiten bereits gezeigt, dass die TER neben C4 Substraten auch C6 und C8 Substrate reduzieren kann. Zudem existieren im Mitochondrium von *Euglena* zwei weitere Enoyl-CoA Reduktasen, die Substrate mit Kettenlängen bis zu 14 Kohlenstoffatomen reduzieren können (Inui et al. 1984a). Die TER und die beiden weiteren Enoyl-CoA Reduktasen ermöglichen in *Euglena* die mitochondriale Fettsäuresynthese zur anaeroben Wachsesterfermentation. Demgegenüber wird das von der CCR aus *Streptomyces* bereitgestellte Butyryl-CoA in erster Linie zur Polyketid Biosynthese verwendet (Liu und Reynolds 1999). Polyketide stellen eine diverse Gruppe von Naturstoffen dar, die als Antibiotika, Anti-Tumor Komponenten und Immunsuppressiva fungieren (Schwecke et al. 1995). Eine CCR kommt in den meisten Streptomyceten vor und hat eine bedeutende Funktion bei der Bereitstellung von Butyryl-CoA Einheiten für die Biosynthese von Monensin A (Liu und Reynolds 2001). Zur Synthese von Polyketid-Antibiotika wie Monensin A oder Tylosin wird Ethylmalonyl-CoA als Baustein verwendet, das durch die Carboxylierung von Butyryl-CoA entsteht, welches durch die CCR bereitgestellt wird (Liu und Reynolds 1999, Vrijbloed et al. 1999, Cropp et al. 2001). Interessanterweise wurden Homologien der CCR aus *Streptomyces collinus* zu einer Domäne der Propionyl-CoA Synthase aus *Chloroflexus aurantiacus*, einem photosynthetischen grünen Nichtschwefel-Bakterium, nachgewiesen. Die Propionyl-CoA Synthase ist ein natürliches Fusionsprotein, das eine CoA-Ligase, eine Enoyl-CoA Hydratase und eine Enoyl-CoA Reduktase enthält und ist an einem speziellen Zyklus zur autotrophen CO₂ Fixierung (3-Hydroxypropionat Zyklus) beteiligt (Alber und Fuchs 2002).

4.6. *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase und die Wachsesterfermentation in *Euglena*

Die in der vorliegenden Arbeit gereinigte und klonierte *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase ist das Schlüsselenzym der mitochondrialen Fettsäuresynthese von *Euglena*, da es den

letzten Schritt des Zyklus katalysiert und somit das Endprodukt erzeugt (siehe Abb. 4-3). Die mitochondriale Fettsäuresynthese trägt im anaeroben Energiestoffwechsel des fakultativ anaeroben Flagellaten zur Fermentation von Wachsestern bei. Durch die Synthese von Wachsestern aus dem Reserve-Polysaccharid Paramylon gewinnt *Euglena* unter anaeroben Bedingungen ATP. Dieser Gewinn an ATP beruht darauf, dass während keines Schrittes der Wachsesterfermentation ATP verbraucht wird und auf diese Weise das in der Glykolyse gebildete ATP der Zelle als Nettogewinn zur Verfügung steht (Buetow 1989). Der wesentliche energieverbrauchende Schritt der ACCase bei der Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA wird bei der mitochondrialen Fettsäuresynthese von *Euglena* umgangen. Die Synthese von Fettsäuren im Mitochondrium von *Euglena* ist unabhängig von Malonyl-CoA und erfordert somit keine ACCase Reaktion. Neben dem letzten, von der TER katalysierten Schritt der Reaktionsfolge, ist somit die Kondensationsreaktion im ersten Schritt interessant. Nicht geklärt ist bisher, ob im Mitochondrium von *Euglena* ein spezifisches Acetyl-CoA kondensierendes Enzym existiert. Möglicherweise kommen im Mitochondrium von *Euglena* in Analogie zur klassischen Fettsäuresynthese (KAS I, KAS II, KAS III) verschiedene kondensierende Enzyme mit unterschiedlichen Kettenlängenspezifitäten vor. Die Existenz von verschiedenen Kettenlängenspezifischen Enzymen ist wahrscheinlich, da auch in der β -Oxidation dieser Reaktionsschritt in der umgekehrten Richtung typischerweise von Kettenlängenspezifischen 3-Keto-CoA Thiolasen katalysiert wird (Hiltunen und Qin 2000, Graham und Eastmond 2002). Kürzlich wurde zudem für die Mitochondrien von *Euglena* die Existenz eines multifunktionalen β -Oxidationskomplexes nachgewiesen, der eine Thiolase-, eine Enoyl-CoA Hydratase- und zwei verschiedene Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase-Untereinheiten enthält (Winkler et al. 2003). Entweder wird die Kondensation von zwei Acetyl-CoA Molekülen bei der mitochondrialen Fettsäuresynthese von *Euglena* durch eine Thiolase der β -Oxidation als Umkehrreaktion katalysiert, oder es existiert ein für die mitochondriale Fettsäuresynthese spezifisches Enzym.

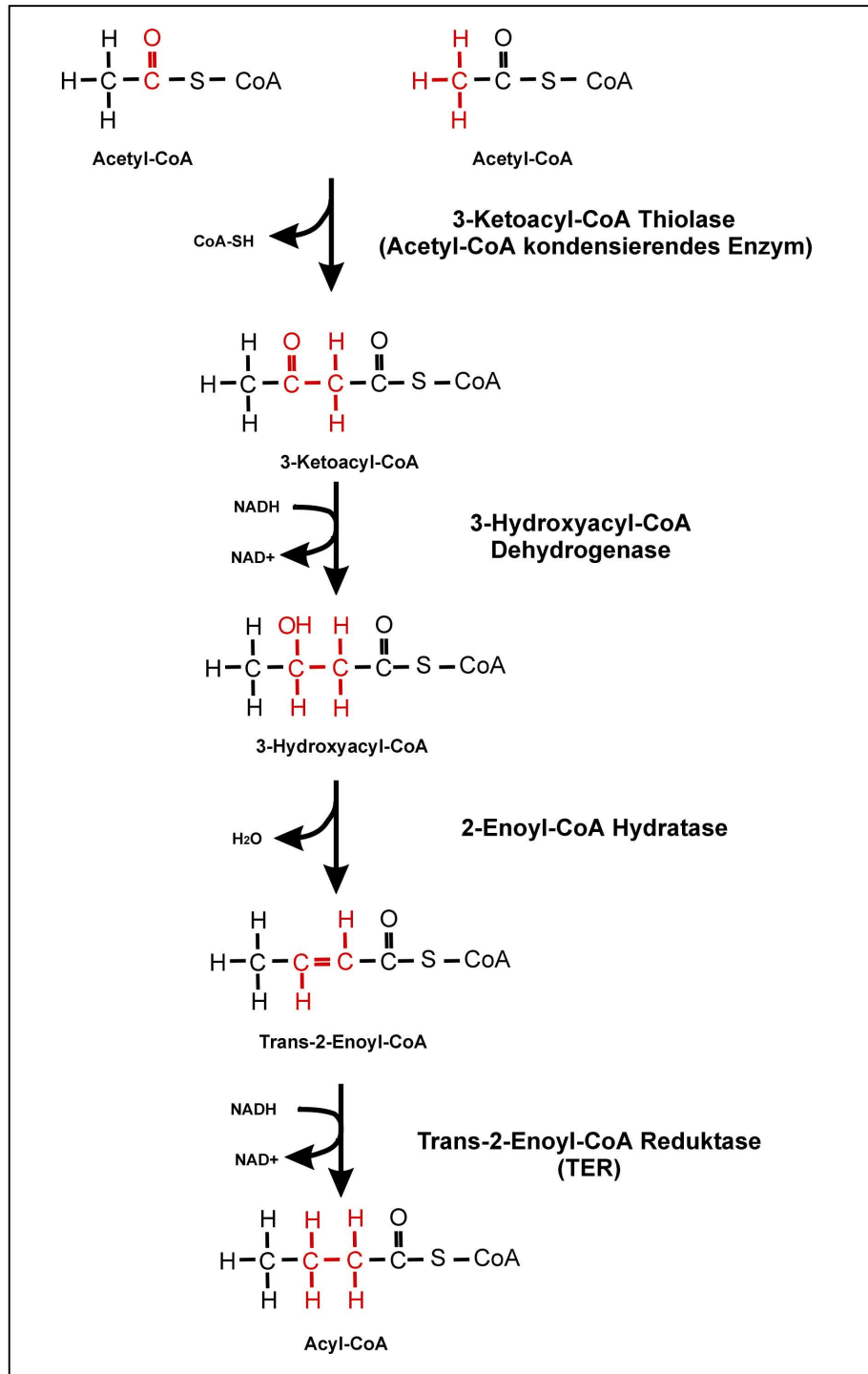


Abb. 4-3 Stoffwechselweg und Enzyme der mitochondrialen Fettsäuresynthese von *Euglena gracilis*.

Eine ähnliche Anpassung an anaerobe Bedingungen wie im Mitochondrium von *Euglena* erfolgt auch während des Lebenszyklus des parasitischen Nematoden *Ascaris suum*. Die frühen Larvenstadien von *Ascaris* sind aerob und die Mitochondrien besitzen einen funktionalen Tricarbonsäurezyklus und Cytochrom Oxidase Aktivität (Komuniecki und Vanover 1987, Takamiya et al. 1993). Im Gegensatz dazu verwenden

die Mitochondrien der adulten Tiere organische Säuren anstelle von Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor und besitzen nur einen unvollständigen TCA-Zyklus. Außerdem fehlt ihnen eine Cytochrom Oxidase Aktivität (Komuniecki et al. 1981, Mei et al. 1997). Die wesentlichen Endprodukte des anaeroben Energiestoffwechsels von *Ascaris* sind die methylverzweigten Fettsäuren 2-Methylbutyrat und 2-Methylvalerate (Komuniecki et al. 1987). Ebenso wie in den anaeroben Mitochondrien von anderen parasitischen Würmern wie z. B. *Fasciola hepatica* (für eine Zusammenfassung siehe Tielens et al. 2002) wird bei *Ascaris* Phosphoenolpyruvat aus der Glykolyse nicht zu Pyruvat umgewandelt, sondern durch die PEPCK zu Oxalacetat umgeformt (siehe auch Abb. 1-5). Das Oxalacetat wird dann zu Malat reduziert und in die Mitochondrien importiert. Zur Erhaltung des Redoxgleichgewichtes wird ein Teil des Malats zurück zu Pyruvat oxidiert und ein Teil wird zu Succinat reduziert (Malat Dismutation). Bei *Ascaris* wird das Pyruvat und Succinat dann über eine Serie von Reaktionsschritten in methylverzweigte Fettsäuren umgewandelt (Komuniecki et al. 1981). Zur Bildung der methylverzweigten Fettsäuren werden zunächst Acetyl-CoA und Propionyl-CoA oder zwei Propionyl-CoA kondensiert und dann wie bei der mitochondrialen Fettsäuresynthese von *Euglena* über eine Reaktionsfolge, die einer Umkehr der β -Oxidation entspricht, reduziert (Komuniecki et al. 1987). Im Gegensatz zur TER, die bei *Euglena* den letzten Schritt des Stoffwechselweges katalysiert, besitzt *Ascaris* für die Katalyse des letzten Reduktionsschritts eine 2-Methyl verzweigte-Ketten Enoyl-CoA Reduktase (MECR). Die MECR reagiert nicht wie die *Euglena* TER direkt mit NADH, sondern akzeptiert Reduktionsäquivalente vom Elektronen-transportierenden Flavoprotein (Komuniecki et al. 1985). Die MECR liegt als Tetramer mit vier identischen Untereinheiten vor und reduziert 2-Methylbutyryl-CoA und 2-Methylvaleryl-CoA (Komuniecki et al. 1985), während die *Euglena* TER als Monomer vorliegt und unverzweigte Enoyl-CoA Substrate reduziert. Für die MECR wurden hohe Sequenzähnlichkeiten zu Acyl-CoA Dehydrogenasen nachgewiesen obwohl das Enzym als Reduktase und nicht als Dehydrogenase fungiert (Duran et al. 1993, Duran et al. 1998).

4.7. Ausblick

Mit Hilfe von gentechnischen Veränderungen konnten Nutzpflanzen mit Fettsäurezusammensetzungen erhalten werden, die alleine durch Pflanzenzüchtung nicht möglich gewesen wären. Die Kombination von klassischen Züchtungsmethoden

mit molekularen Techniken eröffnet neue Wege für die Entwicklung von Fetten und Ölen sowohl für Nahrungsmittel als auch für andere Anwendungen wie Kosmetika, Pharmazeutika, Weichmacher, Schmierstoffe, Seifen, Reinigungsmittel usw. (Töpfer et al. 1995).

Aus *Euglena gracilis* wurden bereits $\Delta 4$ - und $\Delta 8$ -Desaturasen kloniert, die bei der Biosynthese von langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren von Bedeutung sind. Diese Fettsäuren spielen eine wesentliche Rolle bei der menschlichen Ernährung und die Gene aus *Euglena* stellen mögliche Kandidaten für die Produktion von spezifischen langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren in transgenen Pflanzen dar (Wallis und Browse 1999, Meyer et al. 2003). In diesem Kontext könnte die in der vorliegenden Arbeit klonierte TER aus *Euglena* über eine Vertiefung unserer Kenntnisse des anaeroben Energiestoffwechsels in einem photosynthetischen Protisten hinaus, mögliche Wege zur Erhöhung der Gesamtmenge der synthetisierten Fettsäuren in Pflanzen aufzeigen.

5. Zusammenfassung

Die fakultativ anaeroben Mitochondrien von *Euglena gracilis* sind in der Lage sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Sauerstoff ATP zu produzieren. Unter aeroben Bedingungen erfolgt in den Mitochondrien von *Euglena* eine typische oxidative Phosphorylierung, während unter anaeroben Bedingungen eine ungewöhnliche Fermentation von Wachsestern erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurden einige der Proteine identifiziert, die an der Umstellung des Energiestoffwechsels der Mitochondrien beim Wechsel von aeroben zu anaeroben Kulturbedingungen beteiligt sind. Anhand der Ergebnisse der Proteomanalysen wurde deutlich, dass unter anaeroben Bedingungen keine *de novo* Synthese von mitochondrialen Proteinen erfolgt. *Euglena* Mitochondrien sind somit bereits unter aeroben Bedingungen auf eine anaerobe Funktion vorbereitet und ermöglichen diesem Organismus eine schnelle Anpassung an veränderte Sauerstoffkonzentrationen der Umgebung.

Es wurden einige aerob-spezifische Proteine identifiziert, die unter anaeroben Bedingungen nicht mehr exprimiert werden. Diese Proteine wurden mit Hilfe von Massenspektrometrie teilsequenziert und es konnte nachgewiesen werden, dass unter anaeroben Bedingungen im Mitochondrium von *Euglena* Komponenten der Komplexe III und IV der Atmungskette herunterreguliert werden.

Zudem wurde mit Hilfe der Proteomanalysen die Existenz der Pyruvat Dehydrogenase E1 β -Untereinheit in den Mitochondrien von *Euglena* nachgewiesen. Mit dem Nachweis der bisher nicht nachgewiesenen E1 β -Untereinheit, konnte bestätigt werden, dass eine funktionale Pyruvat Dehydrogenase in den Mitochondrien von *Euglena* mit einer sauerstoffempfindlichen Pyruvat:NADP⁺ Oxidoreduktase koexistiert.

Die anaerobe Fermentation von Wachsestern bei *Euglena* beruht auf einer Malonyl-CoA unabhängigen Synthese von Fettsäuren in den Mitochondrien. Diese mitochondriale Fettsäuresynthese ist formal eine Umkehr der β -Oxidation und verwendet Acetyl-CoA sowohl als Primer als auch als C2-Donor. Das Schlüsselenzym der mitochondrialen Fettsäuresynthese von *Euglena*, die *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase wurde in der vorliegenden Arbeit bis zur Homogenität gereinigt. Nach tryptischer

Spaltung wurden durch ESI-Q-TOF-MS/MS Peptidsequenzen der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase ermittelt. Ein mit Hilfe von degenerierten Primern amplifiziertes PCR-Fragment wurde als Sonde zum Screenen einer *Euglena* cDNA-Bank verwendet. Ein vollständiger cDNA-Klon der *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase wurde isoliert und sequenziert. Die *trans*-2-Enoyl-CoA Reduktase wurde erfolgreich in *E. coli* heterolog überexprimiert.

6. Literatur

- Agabian N. (1990) Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61: 1157-1160.
- Airenne TT, Torkko JM, Van den Plas S, Sormunen RT, Kastaniotis AJ, Wierenga RK, Hiltunen JK. (2003) Structure-function analysis of enoyl thioester reductase involved in mitochondrial maintenance. *J. Mol. Biol.* 327: 47-59.
- Alban C, Baldet P, Douce R. (1994) Localization and characterization of two structurally different forms of acetyl-CoA carboxylase in young pea leaves, of which one is sensitive to aryloxyphenoxypropionate herbicides. *Biochem. J.* 300: 557-565.
- Alber BE, Fuchs G. (2002) Propionyl-coenzyme A synthase from *Chloroflexus aurantiacus*, a key enzyme of the 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic CO₂ fixation. *J. Biol. Chem.* 227: 12137-12134.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Andersson SG, Kurland CG. (1999) Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 535-541.
- Atteia A, van Lis R, van Hellemond JJ, Tielens AGM, Martin W, Henze K. (2004) The alternative oxidases of mitochondria (AOX) and chloroplasts (PTOX) seem to be acquisitions through endosymbiotic gene transfer. *Gene* in press.
- Baldet P, Alban C, Axiotis S, Douce R. (1993) Localization of free and bound biotin in cells from green pea leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 303: 67-73.
- Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, 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, Miyano S. (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18: 298-305.
- Behal RH, Lin M, Back S, Oliver DJ. (2002) Role of acetyl-coenzyme A synthetase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Arch. Biochem. Biophys.* 402: 259-267.

- Bloch K, Vance D. (1977) Control mechanisms in the synthesis of saturated fatty acids. *Annu. Rev. Biochem.* 46: 263-298.
- Blum H, Beier H, Gross HJ. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Blumenthal T. (1995) *Trans*-splicing and polycistronic transcription in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Genet.* 11: 132-136.
- Bocanegra JA, Scrutton NS, Perham RN. (1993) Creation of an NADP-dependent pyruvate-dehydrogenase multienzyme complex by protein engineering. *Biochem.* 32: 2737-2740.
- Bonen L. (1993) *Trans*-splicing of pre-mRNAs in plants, animals, and protists. *FASEB J.* 7: 40-46.
- Boyunaga H, Schmitz MG, Brouwers JF, Van Hellemond JJ, Tielens AGM. (2001) *Fasciola hepatica* miracidia are dependent on respiration and endogenous glycogen degradation for their energy metabolism. *Parasitol.* 122: 169-173.
- Bradford MM. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Braun HP, Schmitz UK. (1995) Are the 'core' proteins of the mitochondrial bc1 complex evolutionary relics of a processing protease? *Trends Biochem. Sci.* 20: 171-175.
- Breitling R, Laubner D, Adamski J. (2001) Structure-based phylogenetic analysis of short-chain alcohol dehydrogenases and reclassification of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase family. *Mol. Biol. Evol.* 18: 2154-2161.
- 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.
- Carre I, Bomsel JL, Calvayarc 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.

- Chang SI, Hammes GG. (1989) Homology analysis of the protein sequences of fatty acid synthases from chicken liver, rat mammary gland, and yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8373-8376.
- Chaudhary MF, Merrett MJ. (1984) Glycolate-pathway enzymes in mitochondria from phototrophic, organotrophic and mixotrophic cells of *Euglena*. *Planta* 162: 518-523.
- Chaughey I, Kekwick RG. (1982) The characteristics of some components of the fatty acid synthetase system in the plastids from mesocarp of avocado (*Persea americana*) fruit. *Eur. J. Biochem.* 123: 553-561.
- Chen LS, Jin SJ, Tserng KY. (1994) Purification and mechanism of Δ^3, Δ^5 -t-2,t-4-dienoyl-CoA isomerase from rat-liver. *Biochem.* 33: 10527-10534.
- Cinti DL, Cook L, Nagi MN, Suneja SK. (1992) The fatty acid elongation system of mammalian endoplasmatic reticulum. *Prog. Lipid Res.* 31: 1-51.
- Cinti DL, Nagi MN, Cook L, White RE. (1982) Evidence for a second microsomal *trans*-2-enoyl-coenzyme A reductase in rat liver: NADPH-specific short chain reductase. *J. Biol. Chem.* 257: 14333-14340.
- Claros MG, Vincens P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* 241: 779-786.
- Cropp A, Chen S, Liu H, Zhang W, Reynolds KA. (2001) Genetic approaches for controlling ratios of related polyketide products in fermentation processes. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 27: 368-377.
- Cuebas D, Schulz H. (1982) Evidence for a modified pathway of linoleate degradation – metabolism of 2,4-decadienoyl coenzyme A. *J. Biol. Chem.* 257: 4140-4144.
- Cui JY, Mukai K, Saeki K, 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.
- Cvetanovic M, Moreno de la Garza M, Dommes V, Kunau WH. (1985) Purification and characterization of 2-enoyl-CoA reductase from bovine liver. *Biochem. J.* 227: 49-56.

- Das AK, Uhler MD, Hajra AK. (2000) Molecular cloning and expression of mammalian peroxisomal trans-2-enoyl-coenzyme A reductase cDNAs. *J. Biol. Chem.* 275: 24333-24340.
- Delo J, Ernst-Fonberg ML, Bloch K. (1971) Fatty acid synthetases from *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 143: 384-391.
- Devereux J, Haeberli P, Smithies O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programmes for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 2: 387-395.
- Dittrich F, Zajonc D, Hühne K, Hoja U, Greiner E, Klien H, Hofman J, Bessoule JJ, Sperling P, Schweizer E. (1998) Fatty acid elongation in yeast. Biochemical characteristics of the enzyme system and isolation of elongation-defective mutants. *Eur. J. Biochem.* 252: 477-485.
- Domergue F, Chevalier S, Creach A, Cassagne C, Lessire R. (2000) Purification of the acyl-CoA elongase complex from developing rapeseed and characterization of the 3-ketoacyl-CoA synthase and the 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase. *Lipids* 35: 487-494.
- Dommes V, Kunau WH. (1984) 2,4-Dienoyl coenzyme A reductases from bovine liver and *Escherichia coli* – Comparison of properties. *J. Biol. Chem.* 259: 1781-1788.
- Duran E, Komuniecki RW, Komuniecki PR, Wheelock MJ, Klingbeil MM, Ma YC, Johnson KR. (1993) Characterization of cDNA clones for the 2-methyl branched-chain enoyl-CoA reductase. An enzyme involved in branched-chain fatty acid synthesis in anaerobic mitochondria of the parasitic nematode *Ascaris suum*. *J. Biol. Chem.* 30: 22391-22396.
- Duran E, Walker DJ, Johnson KR, Komuniecki PR, Komuniecki RW. (1998) Developmental and tissue-specific expression of 2-methyl branched-chain enoyl-CoA reductase isoforms in the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91: 307-318.
- Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M. (1996) Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem. J.* 320: 345-357.

- Ernst-Fonberg ML. (1973) Fatty acid synthetase activity in *Euglena gracilis* variety bacillaris. Characterization of an acyl carrier protein dependent system. *Biochem.* 12: 2449-2455.
- Ernst-Fonberg ML, Bloch K. (1971) A chloroplast-associated fatty acid synthetase system in *Euglena*. *Arch. Biochem. Biophys.* 143: 392-400.
- Ernst-Fonberg ML, Dubinskas F, Jonak ZL. (1974) Comparison of two fatty acid synthetases from *Euglena gracilis* variety bacillaris. *Arch. Biochem. Biophys.* 165: 646-655.
- Fehling E, Mukherjee KD. (1991) Acyl-CoA elongase from a higher plant (*Lunaria annua*): metabolic intermediates of very-long-chain acyl-CoA products and substrate specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 1082: 239-246.
- Fillgrove KL, Anderson VE. (2001) The mechanism of dienoyl-CoA reduction by 2,4-dienoyl-CoA reductase is stepwise: observation of a dienolate intermediate. *Biochem.* 40: 12412-12421.
- Focke M, Gieringer E, Schwan S, Jänsch L, Binder S, Braun HP. (2003) Fatty acid biosynthesis in mitochondria of grasses: Malonyl-coenzyme A is generated by a mitochondrial-localized acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiol.* 133: 875-884.
- Franz C, Ebel C, Paulus F, Imbault P. (2000) Characterization of *trans*-splicing in Euglenoids. *Curr. Genet.* 37: 349-355.
- Gable K, Garton S, Napier JA, Dunn TM. (2004) Functional characterization of the *Arabidopsis thaliana* orthologue of Tsc13p, the enoyl reductase of the yeast microsomal fatty acid elongating system. *J. Exp. Bot.* 55: 543-545.
- Gerhardt B. (1992) Fatty-acid degradation in plants. *Prog. Lip. Res.* 31: 417-446.
- Gershoni JM, Palade GE. (1983) Protein blotting: principles and application. *Anal. Biochem.* 131: 1-15.
- Goldberg I, Bloch K. (1972) Fatty acid synthesis in *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.* 247: 7349-7357.

- Görg A, Postel W, Günther S. (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9: 531-546.
- Görg A, Postel W, Günther S, Weser J. (1985) Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and layering-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis* 6: 599-604.
- Gough J, Murray N. (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J. Mol. Biol.* 166: 1-19.
- Graham IA, Eastmond PJ. (2002) Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Prog. Lipid Res.* 41: 156-181.
- Graves LB, Becker WM. (1974) Beta-oxidation in glyoxysomes from *Euglena*. *J. Protozool.* 21: 771-774.
- Gray MW, Burger G, Lang F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476-1481.
- Green LS, Li Y, Emerich DW, Bergersen FJ, Day DA. (2000) Catabolism of alpha-ketoglutarate by sucA mutant of *Bradyrhizobium japonicum*: evidence for an alternative tricarboxylic acid cycle. *J. Bacteriol.* 182: 2238-2844.
- Gueguen V, Macherel D, Jaquinod M, Douce R, Bourguignon J. (2000) Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* 275: 5016-5025.
- Han J, Lühs W, Sonntag K, Zähringer U, Borchardt DS, Wolter FP, Heinz E, Frentzen M. (2001) Functional characterization of β -ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. *Plant Mol. Biol.* 46: 229-239.
- Hanukoglu I, Gutfinger T. (1989) cDNA sequence of adrenodoxin reductase: Identification of NADP-binding sites in oxidoreductases. *Eur. J. Biochem.* 180: 479-484.
- Hashimoto T. (1999) Peroxisomal β -oxidation enzymes. *Neurochem. Res.* 24: 551-563.
- Heath RJ, Rock CO. (2000) A triclosan-resistant bacterial enzyme. *Nature* 406: 145-146.

- Heazlewood JL, Howell KA, Whelan J, Millar AH. (2003) Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome. *Plant Physiol.* 132: 230-242.
- Hendren RW, Bloch K. (1980) Fatty acid synthetases from *Euglena gracilis*. Separation of component activities of the ACP-dependent fatty acid synthetase and partial purification of the beta-ketoacyl-ACP synthetase. *J. Biol. Chem.* 255: 1504-1508.
- Henikoff S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28: 351-359.
- Heukeshoven J, Dernick R. (1988) Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem Development Unit. *Electrophoresis* 9: 60-61.
- Hiltunen KJ, Qin YM. (2000) β -Oxidation – Strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. *Biochim. Biophys. Acta* 1484: 117-128.
- Hinsch W, Klages C, Seubert W. (1976) On the mechanism of malonyl-CoA-independent fatty-acid synthesis: Different properties of the mitochondrial chain elongation and enoyl-CoA reductase in various tissues. *Eur. J. Biochem.* 64: 45-55.
- Hinsch W, Seubert W. (1975) On the mechanism of malonyl-CoA-independent fatty-acid synthesis: Characterization of the mitochondrial chain-elongating system of rat liver and pig-kidney cortex. *Eur. J. Biochem.* 53: 437-447.
- Hoffmeister M, van der Klei A, Rotte C, van Grinsven KWA, van Hellemond JJ, Henze K, Tielens AGM, Martin W. (2004) *Euglena gracilis* rhodoquinone:ubiquinone ratio and mitochondrial proteome differ under aerobic and anaerobic conditions. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M400913200.
- Inui H, Miyatake K, Nakano Y, Kitaoka S. (1982) Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. *FEBS Lett.* 150: 89-93.
- Inui H, Miyatake K, Nakano Y, 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, Kitaoka S. (1984a) Fatty acid synthesis in mitochondria of *Euglena gracilis*. Eur. J. Biochem. 142: 121-126.
- Inui H, Miyatake K, Nakano Y, 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, 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, Miyatake K, Nakano Y, Kitaoka S. (1986) Purification and some properties of short chain-length specific trans-2-enoyl-CoA reductase in mitochondria of *Euglena gracilis*. J. Biochem. 100: 995-1000.
- Inui H, Miyatake K, Nakano Y, 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, Ochi H, Nogami K, Miyatake K, Nakano Y, Kitaoka S. (1988) Effect of thiamin deficiency on wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. Agric. Biol. Chem. 52: 49-54.
- Inui H, Ono K, Miyatake K, Nakano Y, Kitaoka S. (1987) Purification and characterization of pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase in *Euglena gracilis*. J. Biol. Chem. 262: 9130-9135.
- Inui H, Yamaji R, Saidoh H, Miyatake K, Nakano Y, Kitaoka S. (1991) Pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase from *Euglena gracilis*: limited proteolysis of the enzyme with trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 286: 270-276.
- Jensen ON, Wilm M, Schevchenko A, Mann M. (1998) Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2D gels. In: Methods in Molecular Biology, Vol 112: Proteome analysis protocols, S. 513-530, Link AJ Hrsg., Humana Press, Totowa, New York.
- Jörnvall H. (1999) Multiplicity and complexity of SDR and MDR enzymes. Adv. Exp. Med. Biol. 463: 359-364.

- Jörnvall H, Bahr-Lindström H, Jany KD, Ulmer W. (1984) Extended superfamily of short alcohol-polyol-sugar dehydrogenases – structural similarities between glucose and ribitol dehydrogenases. FEBS Lett. 165: 190-196.
- Jörnvall H, Persson B, Jeffery J. (1981) Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4226-4230.
- Jörnvall H, Persson B, Krook M, Atrian S, González-Duarte R, Jeffery J, Ghosh D. (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). Biochem. 34: 6003-6013.
- Kahn AA, Kolattukudy PE. (1973a) A microsomal fatty acid synthetase coupled to acyl-CoA reductase in *Euglena gracilis*. Arch. Biochem. Biophys. 158: 411-420.
- Kahn AA, Kolattukudy PE. (1973b) Control of synthesis and distribution of acyl moieties in etiolated *Euglena gracilis*. Biochem. 12: 1939-1948.
- Kahn AA, Kolattukudy PE. (1975) Solubilization of fatty acid synthetase, acyl-CoA reductase, and fatty acyl-CoA alcohol transacylase from the microsomes of *Euglena gracilis*. Arch. Biochem. Biophys. 170: 400-408.
- Kang F, Rawstorne S. (1994) Starch and fatty acid synthesis in plastids from developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.) Plant J. 6: 795-805.
- Ke J, Behal RH, Back SL, Nikolau BJ, Wurtele ES, Oliver DJ. (2000) The role of pyruvate dehydrogenase and acetyl-coenzyme A synthetase in fatty acid synthesis in developing *Arabidopsis* seeds. Plant Physiol. 123: 497-508.
- Kindl H. (1993) Fatty-acid degradation in plant peroxisomes – function and biosynthesis of the enzymes involved. Biochimie 75: 225-230.
- Kitaoka S, Nakano Y, Miyatake K, Yokota A. (1989) Enzymes and their functional location. In: The Biology of *Euglena*, Vol. 4. Subcellular biochemistry and molecular biology (Buetow DE Hrsg.). Academic press, San Diego, S. 2-135.
- Knoop F. (1904) Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper. Beitr. Chem. Physiol. Pathol. 6: 150-162.

- Kohlwein SD, Eder S, Oh CS, Martin CE, Gable K, Bacikova D, Dunn T. (2001) Tsc13p is required for fatty acid elongation and localizes to a novel structure at the nuclear-vacuolar interface in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 21: 109-125.
- Kolattukudy PE. (1970) Reduction of fatty acids to alcohols by cell-free preparations of *Euglena gracilis*. *Biochem.* 9: 1095-1102.
- Komuniecki PR, Vanover L. (1987) Biochemical changes during the aerobic-anaerobic transition in *Ascaris suum* larvae. *Mol. Biochem. Parasitol.* 22: 241-248.
- Komuniecki R, Campbell T, Rubin N. (1987) Anaerobic metabolism in *Ascaris suum*: acyl CoA intermediates in isolated mitochondria synthesizing 2-methyl branched-chain fatty acids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24: 147-154.
- Komuniecki R, Fekke S, Thissen-Parra J. (1985) Purification and characterization of the 2-methyl branched-chain acyl-CoA dehydrogenase, an enzyme involved in NADH-dependent enoyl-CoA reduction in anaerobic mitochondria of the nematode, *Ascaris suum*. *J. Biol. Chem.* 260: 4770-4777.
- Komuniecki R, Komuniecki PR, Saz HJ. (1981) Relationships between pyruvate decarboxylation and branched chain volatile acid synthesis in *Ascaris* mitochondria. *J. Parasitol.* 67: 601-608.
- Kuhn DN, Knauf M, Stumpf PK. (1981) Subcellular-localization of acetyl-CoA synthetase in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Arch. Biochem. Biophys.* 209: 441-450.
- Kunau WH, Dommès V, Schulz H. (1995) β -oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: A century of continued progress. *Prog. Lipid Res.* 34: 264-342.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee MG, Van der Ploeg LHT. (1997) Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 463-489.

- Liu H, Reynolds KA. (1999) Role of crotonyl coenzyme A reductase in determining the ratio of polyketides monensin A and monensin B produced by *Streptomyces cinnamonensis*. J. Bacteriol. 181: 6806-6813.
- Liu H, Reynolds KA. (2001) Precursor supply for polyketide biosynthesis: the role of crotonyl-CoA reductase. Metabol. Eng. 3: 40-48.
- Luthria DL, Baykousheva SP, Sprecher H. (1995) Double-bond removal from odd-numbered carbons during beta-oxidation of arachidonic-acid requires both 2,4-dienoyl-CoA reductase and delta(3,5),delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase. J. Biol. Chem. 270: 13771-13776.
- Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokomaya K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nanano M, Yamashita A, Kubota Y, Kimura S, Yasunaga T, Honda T, Shinagawa H, Hattori M, Iida T. (2003) Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae*. Lancet. 361: 743-749.
- Mannaerts GP, Debeer LJ, Thomas J, De Schepper PJ. (1979) Mitochondrial and peroxisomal fatty-acid oxidation in liver homogenates and isolated hepatocytes from control and clofibrate-treated rats. J. Biol. Chem. 254: 4585-4595.
- Mannaerts GP, Van Veldhoven PP. (1996) Functions and organization of peroxisomal beta-oxidation. Ann. NY Acad. Sci. 804: 99-128.
- Maroney PA, Denker JA, Darzynkiewicz E, Laneve R, Nilsen TW. (1995) Most mRNAs in the nematode *Ascaris lumbricoides* are trans-spliced: a role for spliced leader addition in translational efficiency. RNA 1: 714-723.
- Martin W, Hoffmeister M, Rotte C, 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, Müller M. (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. Nature 392: 37-41.

- McCarthy AD, Hardie G. (1984) Fatty acid synthase – an example of protein evolution by gene fusion. *Trends Biochem. Sci.* 9: 60-63.
- McKinley-McKee JS, Winberg JO, Pettersson G. (1991) Mechanism of action of *Drosophila melanogaster* alcohol dehydrogenase. *Biochem. Int.* 25: 879-885.
- Mei B, Komuniecki R, Komuniecki PR. (1997) Localization of cytochrome oxidase and the 2-methyl branched-chain enoyl CoA reductase in muscle and hypodermis of *Ascaris suum* larvae and adults. *J. Parasitol.* 83: 760-763.
- Meyer A, Cirpus P, Ott C, Schlecker R, Zähringer U, Heinz E. (2003) Biosynthesis of docosahexaenoic acid in *Euglena gracilis*: Biochemical and molecular evidence for the involvement of a Δ^4 -fatty acyl group desaturase. *Biochem.* 42: 9779-9788.
- Miinalainen IJ, Chen ZJ, Torkko JM, Pirilä PL, Sormunen RT, Bergmann U, Qin YM, Hiltunen JK. (2003) Characterization of 2-enoyl thioester reductase from mammals. *J. Biol. Chem.* 278: 20154-20161.
- Millar AA, Kunst L. (1997) Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *Plant J.* 12: 121-131.
- Mizugaki M, Nishimaki T, Shiraishi T, Kawaguchi A, Okuda S, Yamanaka H. (1982) Studies on the metabolism of unsaturated fatty acids. IX. Stereochemical studies of the reaction catalyzed by *trans*-2-enoyl-coenzyme A reductase of *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 92: 1649-1654.
- Nagai J, Bloch K. (1965) Synthesis of oleic acid by *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.* 240: 3702-3703.
- Nagai J, Bloch K. (1967) Elongation of acyl carrier protein derivatives by bacterial and plant extracts. *J. Biol. Chem.* 242: 357-362.
- Nagai J, Otha T, Saito E. (1971) Incorporation of propionate into waxesters by ethiolated *Euglena*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 42: 523-529.

- Nagi MN, Prasad MR, Cook L, Cinti DL. (1983) Biochemical properties of short- and long-chain rat liver microsomal *trans*-2-enoyl coenzyme A reductase. Arch. Biochem. Biophys. 266: 50-64.
- Nakazawa M, Inui H, Yamaji R, Yamamoto T, Takenaka S, Ueda M, Nakano Y, Miyatake K. (2000) The origin of pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase in mitochondria of *Euglena gracilis*. FEBS Lett. 479: 155-157.
- Nakazawa M, Takenaka S, Ueda M, Inui H, Nakano Y, Miyatake, K. (2003) Pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase is stabilized by its cofactor, thiamin pyrophosphate, in mitochondria of *Euglena gracilis*. Arch. Biochem. Biophys. 411: 183-188.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-205 and R-250. Electrophoresis 9: 255-262.
- Nishimaki T, Yamanaka H, Mizugaki. (1984) Studies on the mechanism of unsaturated fatty acids. XIV. Purification and properties of NADPH-dependent *trans*-2-enoyl-CoA reductase of *Escherichia coli* K-12. J. Biochem. 95: 1315-1321.
- Nölling J, Breton G, Omelchenko MV, Makarova KS, Zeng Q, Gibson R, Lee HM, Dubois J, Qui S, Hitti J, Wolf YI, Tatusov RL, Sabathe F, Doucette-Stamm L, Soucaille P, Daly MJ, Bennett GN, Koonin EV, Smith DR. (2001) Genome Sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. J. Bacteriol. 183: 4823-4838.
- Ogbonna JC, Tomiyama S, Tanaka H. (1998) Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* Z for efficient production of α -tocopherol. J. Appl. Phycol. 10: 67-74.
- Ohlrogge J, Browse J. (1995) Lipid biosynthesis. Plant Cell 7: 957-970.
- Ohlrogge J, Pollard M, Bao X, Focke M, Girke T, Ruuska S, Mekhedov S, Benning C. (2000) Fatty acid synthesis: From CO₂ to functional genomics. Biochem. Soc. Trans. 28: 567-573.

- Persson B, Jeffery J, Jörnvall H. (1991) Different segment similarities in long-chain dehydrogenases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 177: 218-223.
- Podack ER, Seubert W. (1972) On the mechanism of malonyl-CoA-independent fatty-acid synthesis: Isolation, properties and subcellular location of trans-2,3-hexenoyl-CoA and trans-2,3-decenoyl-CoA reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 280: 235-247.
- Pönsngen-Schmidt E, Schneider T, Hammer U, Betz A. (1988) Comparison of phosphoenolpyruvate-carboxykinase from autotrophically and heterotrophically grown *Euglena* and its role during dark anaerobiosis. *Plant Physiol.* 86: 456-462.
- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258: 598-599.
- Powls R, Hemming FW. (1966) The properties and significance of rhodoquinone-9 in autotrophic and etiolated cultures of *Euglena gracilis* var. *bacillaris*. *Phytochem.* 5: 1235-1247.
- Prasad MR, Chiang CF, Cook L, Cinti DL. (1985) Solubilization and purification of hepatic microsomal trans-2-enoyl-CoA reductase: Evidence for the existence of a second long-chain enoyl-CoA reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 237: 535-544.
- Prasad MR, Nagi MN, Cook L, Cinti DL. (1983) Kinetic evidence for two separate *trans*-2-enoyl-CoA reductases in rat hepatic microsomes: NADPH-specific short chain- and NAD(P)H-dependent long chain-reductase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 113: 659-665.
- Rees TAV. (2003) Mitochondrial oxidative phosphorylation is required for ammonium assimilation in light in a marine diatom. *Physiol. Plant.* 117: 558-563.
- Reynolds KA, Wang P, Fox KM, Speedie MK, Lam Y, Floss HG. (1992) Purification and characterization of a novel coenzyme A reductase from *Streptomyces collinus*. *J. Bacteriol.* 174: 3850-3854.

- Rhoads DM, Umbach AL, Sweet CR, Lennon AM, Rauch GS, Siedow JS. (1998) Regulation of the cyanide resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273: 30750-30756.
- Rich PR. (1984) Electron and proton transfers through quinones and cytochrome *bc* complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 768: 53-79.
- Rotte C. (2003) Molekulare Biochemie ausgewählter Enzyme des anaeroben Energiestoffwechsels in den fakultativ anaeroben Mitochondrien von *Euglena gracilis*. Dissertation, Institut für Botanik III, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Rotte C, Stejskal F, Zhu G, Keithly JS, Martin W. (2001) Pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase from the mitochondrion of *Euglena gracilis* and from the Apicomplexan *Cryptosporidium parvum*: a biochemical relic linking pyruvate metabolism in mitochondriate and amitochondriate protists. *Mol. Biol. Evol.* 18(5): 710-720.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger J, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Schneider R, Brors B, Massow M, Weiss H. (1997) Mitochondrial fatty acid synthesis: A relic of endosymbiotic origin and a specialized means for respiration. *FEBS Lett.* 407: 249-252.
- Schneider T, Betz A. (1985) Waxmonoester fermentation in *Euglena gracilis* T. Factors favouring the synthesis of odd-numbered fatty acids and alcohols. *Planta* 166: 67-73.
- Schwarz-Sommer Z, Sheperd N, Tacke E, Gierl A, Rhode W, Leclerc L, Mattes M, Berndtgen R, Petersen PA, Saedler H. (1987) Influence of transposable elements on the structure and function of the A1 gene of *Zea mays*. *EMBO J.* 6: 287-297.

- Schwecke T, Aparico JF, Molinár I, König A, Khaw LE, Haydock SF, Oliynyk M, Caffrey P, Cortés J, Lester JB, Böhm GA, Staunton J, Leadley PF. (1995) The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7839-7843.
- Scrutton NS, Berry A, Perham RN. (1990) Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* 343: 38-43.
- Seubert W, Lamberts I, Kramer R, Ohly B. (1968) On the mechanism of malonyl-CoA independent fatty acid synthesis: The mechanism of elongation of long-chain fatty acids by acetyl-CoA. *Biochem. Biophys. Acta* 164: 498-517.
- Shigeoka S, Nakano Y, Kitaoka S. (1980) Metabolism of hydrogen peroxide in *Euglena gracilis* Z by L-ascorbic acid peroxidase. *Biochem. J.* 186: 377-380.
- Shimakata T, Fujita Y, Kusaka T. (1977) Acetyl-CoA-dependent elongation of fatty acids in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biochem.* 82: 725-732.
- Shimakata T, Fujita Y, Kusaka T. (1980) Involvement of one of two enoyl-CoA hydratases and enoyl-CoA reductases in the acetyl-CoA dependent elongation of medium chain fatty acids by *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biochem.* 88: 1051-1058.
- Shimakata T, Kusaka T. (1981) Purification and characterization of 2-enoyl-CoA reductase of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biochem.* 89: 1075-1080.
- Shimakata T, Stumpf PK. (1982) Purification and characterizations of beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase, beta-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydrase, and enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase from *Spinacia oleracea* leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 218: 77-91.
- Siedow JN, Umbach AL. (1995) Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell* 7: 821-831.
- Slabas AR, Sidebottom C, Kessell R, Hellyer A, Tombs MP. (1986) Oilseed rape NADH enoyl acyl-carrier protein reductase. *Biochem. Soc. Trans.* 14: 581-582.

- Smith RG, Gauthier DA, Dennis DT, Turpin DH. (1992) Malate- and pyruvate-dependent fatty acid synthesis in leucoplasts from developing castor endosperm. *Plant Physiol.* 98: 1233-1238.
- Stover NA, Steele RE. (2001) Trans-spliced leader addition to mRNAs in a cnidarian. *Proceed. Natl. Acad. Sci. USA:* 98: 5693-5698.
- Stukey JE, McDonough VM, Martin CE. (1990) The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. *J. Biol. Chem.* 265: 20144-20149.
- Takamiya S, Kita K, Wang PP, Weinstein A, Hiraishi H, Oya H, Aoki T. (1993) Developmental changes in the respiratory chain of *Ascaris* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1141: 65-74.
- Tessier LH, Keller M, Chan RL, Fournier R, Weil JH, Imbault P. (1991) Short leader sequences may be transferred from small RNAs to pre-mature mRNAs by *trans*-splicing in *Euglena*. *EMBO J.* 10: 2621-2625.
- Theiss-Seuberling HG. (1984) Purification and immunochemical characterization of NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Euglena gracilis*. *Plant Cell Physiol.* 25: 601-609.
- Tielens AGM. (1994) Energy metabolism in parasitic helminths. *Parasitol. Today* 10: 346-352.
- Tielens AGM, Rotte C, Van Hellemond J, Martin W. (2002) Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.* 27: 545-592.
- Tielens AGM, Van Hellemond JJ. (1998) The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 1365: 71-78.
- Tokunaga M, Nakano Y, Kitaoka S. (1976) Separation and properties of NAD-linked and NADP-linked isoenzymes of succinic semialdehyde dehydrogenase in *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 429: 55-62
- Tokunaga M, Nakano Y, Kitaoka S. (1979) Subcellular localization of the GABA-shunt enzymes in *Euglena gracilis* strain Z. *J. Protozool.* 26: 471-473.

- Tolbert NE. (1981) Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 133-157.
- Töpfer R, Martini N, Schell J. (1995) Modification of plant lipid synthesis. *Science* 268: 681-686.
- Torkko JM, Koivrinta KT, Kastaniotis AJ, Arienne TT, Glumoff T, Ilves M, Hartig A, Gurvitz A, Hiltunen JK. (2003) *Candida tropicalis* expresses two mitochondrial 2-enoyl thioester reductases that are able to form both homodimers and heterodimers. *J. Biol. Chem.* 278: 41213-41220.
- Vance WA, Stumpf PK. (1978) Fat metabolism in higher plants. The Elongation of saturated and unsaturated acyl-CoAs by a stromal system from isolated spinach-chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 190: 210-220.
- Vandenberghae AE, Meedel TH, Hastings KEM. (2001) mRNA 5'-leader *trans*-splicing in the chordates. *Genes Devel.* 15: 294-303.
- Van den Bosch H, Schutgens RB, Wanders RJ, Tager JM. (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 157-197.
- VanderVere PS, Bennett TM, Oblong JE, Lamppa GK. (1995) A chloroplast processing enzyme involved in precursor maturation shares a zinc-binding motif with recently recognized family of metalloendopeptidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7177-7181.
- Van Hellemond JJ, Klockiewicz M, Gaasenbeek CPH, Roos MH, Tielens AGM. (1995) Rhodoquinone and complex II of the electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 270: 31065-31070.
- Van Hellemond JJ, Tielens AGM. (1994) Expression and functional properties of fumarate reductase. *Biochem. J.* 304: 321-331.
- Von Heijne G, Stepphuhn J, Herrmann RG. (1989) Domain structure of mitochondrial- and chloroplast-targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* 180: 535-545.

- Vrijbloed JW, Zerbe-Burkhardt K, Ratnatilleke A, Grubelnik-Leiser A, Robinson JA. (1999) Insertional inactivation of methylmalonyl coenzyme A (CoA) mutase and isobutyryl-CoA mutase genes in *Streptomyces cinnamonensis*: influence on polyketide antibiotic biosynthesis. *J. Bacteriol.* 181: 5600-5605.
- Wada H, Shintani D, Ohlrogge J. (1997) Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1591-1596.
- Walker TA, Jonak ZL, Worsham LM, Ernst-Fonberg ML. (1981) Kinetic studies of the fatty acid synthetase multienzyme complex from *Euglena gracilis* variety bacillaris. *Biochem. J.* 199: 383-392.
- Wallace KK, Bao ZY, Dai H, Digate R, Schuler G, Speedie MK, Reynolds KA. (1995) Purification of crotonyl-CoA reductase from *Streptomyces collinus* and cloning, sequencing and expression of the corresponding gene in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 233: 954-962.
- Wallis JG, Browse J. (1999) The Δ^8 -desaturase of *Euglena gracilis*: An alternative pathway for synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 365: 307-316.
- Whelan J, Glaser E. (1997) Protein import into plant mitochondria. *Plant Mol. Biol.* 33: 771-789.
- White HB, Mitsuhashi O, Bloch K. (1971) Pyridine nukleotide requirements of fatty acid synthetases. *J. Biol. Chem.* 246: 4751-4754.
- Wierenga RK, Maeyer MC, Hol WG. (1985) Interaction of pyrophosphate moieties with alpha-helices in dinucleotide binding-proteins. *Biochem.* 24: 1346-1357.
- Winkler U, Säftel W, Stabenau H. (2003) A new type of multifunctional β -oxidation enzyme in *Euglena*. *Plant Physiol.* 131: 753-762.
- Wu K, Chung L, Revill WP, Katz L, Reeves CD. (2000) The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene* 251: 81-90.

- Yamane Y, Utsunomiya T, Watanabe M, Sasaki K. (2001) Biomass production in mixotrophic culture of *Euglena gracilis* under acidic condition and its growth energetics. *Biotech. Lett.* 23: 1223-1228.
- Yokota A, Keisuke H, Kitaoka S. (1982) Mechanism of metabolic regulation in photoassimilation of propionate in *Euglena gracilis* Z. *Arch. Biochem. Biophys.* 213: 530-537.
- Zeiger CA, Randall DD. (1991) Spinach leaf acetyl-coenzyme-A synthetase – Purification and characterization. *Plant Physiol.* 96: 382-389.
- Zhang D, Yu W, Geisbrecht BV, Gould SJ, Sprecher H, Schulz H. (2002) Functional characterisation of Δ^3, Δ^2 -enoyl-CoA isomerase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 277: 9127-9132.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. William Martin für die Überlassung dieses spannenden Themas, die optimalen Arbeitsbedingungen im Institut und seine ausgezeichnete fachliche und immerwährende Unterstützung. Seine Erfahrung, Begeisterung und Motivation haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Manfred Grieshaber danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Dr. Oliver Oswald und Dr. Petra Cirpus von der BASF Plant Science möchte ich mich für die jeder Zeit gute Zusammenarbeit und die fachlichen Diskussionen bedanken.

Dr. Sabine Metzger vom BMFZ Düsseldorf und Dr. Markus Piotrowski vom Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum danke ich für die Sequenzierung der Proteine.

Bedanken möchte ich mich bei den verschiedenen Generationen der AG Martin für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein ganz herzlicher Dank gilt Dr. Carmen Rotte für die tolle Zusammenarbeit während unserer gemeinsamen Zeit an der Bench und im Büro und die allzeit freundschaftliche Unterstützung. Dr. Ulrich Nowitzki danke ich für die Einführung in die Proteinreinigung und die geduldige Beantwortung von Computerfragen. Bei Dr. Sandra Trenkamp bedanke ich mich für die fachlichen Diskussionen und alle geteilten Freuden und Leiden eines Doktorandenlebens. Eva Walla und Margarete Stracke sei für die großartige technische Unterstützung bei den Sequenzierarbeiten und so vieler anderer Angelegenheiten des Laboralltags gedankt. Marianne Limpert danke ich für die fürsorgliche Erledigung aller bürokratischen Vorgänge.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Eltern danken, die mein Studium und meine Promotion stets mit Interesse begleitet haben und mir durch ihr Vertrauen und ihre finanzielle Unterstützung eine sorgenfreie Zeit ermöglicht haben.