



**BERGISCHE  
UNIVERSITÄT  
WUPPERTAL**

**Isolierung und Charakterisierung des Paramylon-Synthase-Komplexes  
aus unterschiedlichen Euglenida und Transkriptomanalyse**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät der Mathematik und Naturwissenschaften

der Bergischen Universität Wuppertal

angefertigt am

Lehrstuhl für Biologie und ihre Didaktik - Zoologie

vorgelegt von

Onur Baltaci

Wuppertal, im Juli 2023

***Für Kenan und Şükran Baltacı***

Erstgutachterin: Prof. Dr. Angelika Preisfeld  
Zweitgutachter: Vertr. Prof. Dr. Gregor Christa

|   |    |
|---|----|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b> .....   | I  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....  | VI |
| <b>Zusammenfassung</b> .....  | IX |
| <b>1. Einleitung</b> .....  | 1  |
| 1.1. <i>Euglena gracilis</i> - Der Modellorganismus .....                             | 1  |
| 1.2. Phylogenetische Position der Euglenida.....                                      | 2  |
| 1.3. Systematische Gliederung der Euglenida.....                                      | 4  |
| 1.4. Charakteristische Merkmale der Euglenida .....                                   | 6  |
| 1.5. Die Speicherkohlenhydrate der Eukaryoten und Prokaryoten .....                   | 12 |
| 1.5.1. Das besondere Reservepolysaccharid: Paramylon .....                            | 16 |
| 1.5.2. Nutzen und Anwendungsmöglichkeiten des Paramylons .....                        | 20 |
| 1.5.3. Synthese des Paramylons: Der Paramylon-Synthase-Komplex .....                  | 22 |
| 1.6. Überblick der weiteren untersuchten Organismen.....                              | 24 |
| 1.6.1. <i>Distigma proteus</i> .....  | 24 |
| 1.6.2. <i>Khawkinea quartana</i> .....  | 25 |
| 1.6.3. <i>Peranema sp.</i> .....  | 26 |
| 1.7. Ziele der Arbeit .....   | 27 |
| <b>2. Material &amp; Methoden</b> .....   | 28 |
| 2.1. Material.....  | 28 |
| 2.1.1. Geräte.....  | 28 |
| 2.1.2. Verbrauchsmaterialien .....  | 30 |
| 2.1.3. Chemikalien .....  | 31 |
| 2.1.4. Kits.....  | 33 |
| 2.1.5. Enzyme.....  | 33 |
| 2.1.6. Längenstandards .....  | 34 |
| 2.1.7. Oligonukleotid-Primer .....  | 34 |
| 2.1.8. Software & Internetdatenbanken .....   | 41 |
| 2.1.9. Puffer & Lösungen .....  | 42 |
| 2.2. Methoden.....  | 45 |
| 2.2.1. Biochemische Methoden.....   | 45 |
| 2.2.1.1. Herkunft der Organismen.....   | 45 |
| 2.2.1.2. Kultivierung von <i>Euglena gracilis</i> .....                               | 45 |
| 2.2.1.3. Kultivierung von <i>Distigma proteus</i> und <i>Khawkinea quartana</i> ..... | 46 |
| 2.2.1.4. Kultivierung von <i>Peranema sp.</i> .....                                   | 48 |

|  |    |
|--|----|
| 2.2.1.5. Bestimmung der Zellanzahl .....   | 50 |
| 2.2.1.6. Isolierung des Paramylon-Synthase-Komplexes.....                              | 52 |
| 2.2.1.6.1. Solubilisierung und Aufkonzentrieren des Paramylon-Synthase-Komplexes ..... | 53 |
| 2.2.1.6.2. Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation.....                             | 53 |
| 2.2.2. Proteinbestimmung .....   | 54 |
| 2.2.2.1. Proteinbestimmung nach Lowry et al.1951 .....                                 | 54 |
| 2.2.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford 1976.....                                     | 56 |
| 2.2.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....                                    | 58 |
| 2.2.3.1. Native-PAGE.....  | 58 |
| 2.2.3.2. SDS-PAGE .....  | 59 |
| 2.2.3.3. Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteine .....                          | 61 |
| 2.2.4. Gelfärbung .....  | 62 |
| 2.2.4.1. Silberfärbung.....  | 62 |
| 2.2.4.2. Kollodiale Coomassie-Färbung.....   | 64 |
| 2.2.5. Gelrocknung .....   | 65 |
| 2.2.6. UDP-Glo™-Glucosyltransferase-Test .....   | 65 |
| 2.2.6.1. Erstellung der Standardkurve für UDP .....                                    | 66 |
| 2.2.6.2. Aktivitätsmessung des Paramylon-Synthase-Komplexes .....                      | 68 |
| 2.2.6.3. Einfluss der Ionen auf die Enzymaktivität .....                               | 69 |
| 2.2.7. Aufreinigung des Paramylons .....   | 69 |
| 2.2.8. Identifizierung des Enzymproduktes .....  | 70 |
| 2.2.8.1. Enzymatische Produktanalyse .....   | 70 |
| 2.2.8.2. Alkalihydrolyse.....  | 71 |
| 2.2.8.3. Säureanalyse.....   | 71 |
| 2.2.9. Dünnschichtchromatographie (DC).....  | 71 |
| 2.2.10. Molekularbiologische Methoden .....  | 72 |
| 2.2.10.1. Isolierung von Nukleinsäuren.....  | 72 |
| 2.2.10.1.1. Isolierung der Gesamt-DNA (gDNA) .....                                     | 72 |
| 2.2.10.1.2. Isolierung der RNA.....  | 72 |
| 2.2.10.2. PCR-Primerdesign .....   | 73 |
| 2.2.10.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....   | 73 |
| 2.2.10.4. Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....                | 74 |
| 2.2.10.5. Gradienten-PCR .....   | 74 |
| 2.2.10.6. Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) .....                                       | 74 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.10.6.1. Die Bestimmung der cDNA-Menge .....   | 76        |
| 2.2.10.6.2. Primer-Titration .....  | 77        |
| 2.2.10.6.3. Die Standardkurve .....   | 78        |
| 2.2.10.7. Agarose-Gelelektrophorese .....   | 78        |
| 2.2.10.8. Aufreinigung der PCR-Produkte.....  | 80        |
| 2.2.10.9. Sequenzierung & Überprüfung der PCR-Produkte .....  | 80        |
| 2.2.10.10. Transkriptomanalyse.....   | 81        |
| 2.2.10.10.1. RNA-Isolierung von <i>Euglena gracilis</i> .....   | 81        |
| 2.2.10.10.2. RNA-Isolierung von <i>Distigma proteus</i> .....   | 81        |
| <b>3. Ergebnisse</b> .....  | <b>82</b> |
| 3.1. Bestimmung der Anzuchtbedingungen von <i>Distigma proteus</i> .....  | 82        |
| 3.2. Isolierung & Charakterisierung des Paramylon-Synthase-Komplexes aus<br><i>Distigma proteus</i> .....                                 | 85        |
| 3.2.1. UDP-Glo <sup>TM</sup> -Glucosyltransferase-Test für <i>Distigma proteus</i> .....  | 86        |
| 3.2.2. Einfluss der Ionen auf die Enzymaktivität bei <i>Distigma proteus</i> .....  | 87        |
| 3.2.3. Native-PAGE der Fraktionen von <i>Distigma proteus</i> .....   | 88        |
| 3.2.4. SDS-PAGE der Fraktionen von <i>Distigma proteus</i> .....  | 90        |
| 3.2.5. Aufreinigung des Paramylons von <i>Distigma proteus</i> .....  | 92        |
| 3.3. Identifizierung & Charakterisierung des Enzymproduktes von <i>Distigma proteus</i><br>mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie ..... | 93        |
| 3.3.1. Enzymatische Produktanalyse mit Paramylon aus <i>Distigma proteus</i> .....  | 93        |
| 3.3.2. Alkali- & Säureanalyse mit Paramylon aus <i>Distigma proteus</i> .....   | 94        |
| 3.4. Bestimmung der Anzuchtbedingungen von <i>Peranema sp.</i> .....  | 96        |
| 3.5. Isolierung & Charakterisierung des Paramylon-Synthase-Komplexes aus<br><i>Peranema sp.</i> .....                                     | 98        |
| 3.5.1. UDP-Glo <sup>TM</sup> -Glucosyltransferase-Test für <i>Peranema sp.</i> .....  | 99        |
| 3.5.2. Einfluss der Ionen auf die Enzymaktivität bei <i>Peranema sp.</i> .....  | 100       |
| 3.5.3. Native-PAGE der Fraktionen von <i>Peranema sp.</i> .....   | 101       |
| 3.5.4. SDS-PAGE der Fraktionen von <i>Peranema sp.</i> .....  | 103       |
| 3.5.5. Aufreinigung des Paramylons von <i>Peranema sp.</i> .....  | 103       |
| 3.6. Identifizierung & Charakterisierung des Enzymproduktes von <i>Peranema sp.</i><br>mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie .....     | 105       |
| 3.6.1. Enzymatische Produktanalyse mit Paramylon aus <i>Peranema sp.</i> .....  | 105       |
| 3.6.2. Alkali- & Säureanalyse mit Paramylon aus <i>Peranema sp.</i> .....   | 106       |

|  |     |
|--|-----|
| 3.7. DNA-Sequenzinformationen für den Paramylon-Synthase-Komplex aus bestimmten Arten der Euglenida .....                                    | 108 |
| 3.7.1. PCR-Ergebnisse .....  | 108 |
| 3.7.2. Identifizierung der Gensequenzen .....  | 108 |
| 3.7.2.1. Vergleich mit Gensequenz 1 (GSL1) aus <i>Euglena gracilis</i> Z .....   | 108 |
| 3.7.2.2. Untersuchung der Bereiche der Gensequenz 1 (GSL1) .....   | 110 |
| 3.7.2.3. Alignieren der DNA-Sequenzen mit der GSL1 .....   | 112 |
| 3.7.2.4. Untersuchung der Alignments für die einzelnen Bereiche in GSL1 .....  | 112 |
| 3.7.2.5. Vergleich mit Gensequenz 2 (GSL2) aus <i>Euglena gracilis</i> Z .....   | 120 |
| 3.7.2.6. Untersuchung der Bereiche der Gensequenz 2 (GSL2) .....   | 122 |
| 3.7.2.7. Alignieren der DNA-Sequenzen mit der GSL2 .....   | 124 |
| 3.7.2.8. Untersuchung der Alignments für die einzelnen Bereiche in GSL2 .....  | 124 |
| 3.8. Transkriptomanalyse von <i>Euglena gracilis</i> & <i>Distigma proteus</i> .....   | 131 |
| 3.8.1. Die annotierten Proteine & exprimierten Gene von <i>Euglena gracilis</i> .....  | 133 |
| 3.8.2. Die annotierten Proteine & exprimierten Gene von <i>Distigma proteus</i> .....  | 134 |
| 3.8.3. Untersuchung der annotierten Proteine .....   | 136 |
| 3.8.3.1. Signalpeptid .....  | 136 |
| 3.8.3.2. Transmembran-Helix (TMH) .....  | 136 |
| 3.8.3.3. Membrantopologie .....  | 139 |
| 3.8.3.4. Lokalisierung .....   | 139 |
| 3.8.3.5. Molekulargewicht der Proteine .....   | 140 |
| 3.8.3.6. Untersuchung der Motive .....   | 141 |
| 3.9. Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) .....  | 141 |
| 3.9.1. Etablierung der qPCR .....  | 141 |
| 3.9.2. Tägliche Veränderung der Paramylon-Synthase-Komplex-kodierenden Gene (GSL1(ParsD4) & GSL2 (Pars_2.1888)) .....                        | 146 |
| 3.9.2.1. Einfluss von Licht auf die GSL1-Expression in <i>Euglena gracilis</i> .....   | 146 |
| 3.9.2.2. Einfluss von Licht auf die GSL2-Expression in <i>Euglena gracilis</i> .....   | 147 |
| 3.10. Übersicht aller Ergebnisse .....   | 149 |
| <b>4. Diskussion</b> .....   | 151 |
| 4.1. Isolierung des Paramylon-Synthase-Komplexes .....   | 151 |
| 4.2. Die Paramylon-Synthase-Komplexe von <i>Distigma proteus</i> und <i>Peranema sp.</i> im Vergleich mit anderen Glucosyltransferasen ..... | 156 |
| 4.3. Nukleinsäure-Analyse der untersuchten Euglenida .....   | 160 |
| 4.4. Transkriptomanalysen und qPCR des Paramylon-Synthase-Komplexes .....  | 162 |

|                                      |     |
|--------------------------------------|-----|
| <b>5. Literaturverzeichnis</b> ..... | 167 |
| <b>6. Anhang</b> .....               | 217 |
| <b>Danksagung</b> .....              | 235 |
| <b>Erklärung</b> .....               | 236 |

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

|                    |   |
|--------------------|---|
| APS                | Ammoniumperoxodisulfat  |
| Abb.               | Abbildung   |
| bp                 | Basenpaare  |
| BSA                | Bovine Serum Albumin (engl.): Rinderserumalbumin  |
| Blast              | Basic Local Alignment Search Tool   |
| °C                 | Grad Celsius  |
| CHAPS              | 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate)                                       |
| DTT                | Dithiothreitol  |
| ddH <sub>2</sub> O | bidestilliertes Wasser  |
| DNA                | desoxyribonucleic acid (engl.): Desoxyribonukleinsäure  |
| EDTA               | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| For                | Forward (engl.): vorwärts   |
| GTs                | Glucosyltransferasen  |
| GSL                | Glucan synthase-like (engl.)  |
| h                  | Stunde  |
| HMW                | high molecular weight (engl.): Hochmolekulargewicht   |
| HIV                | Human immunodeficiency virus  |
| i. d. R.           | in der Regel  |
| kDa                | Kilodalton  |
| min                | Minute(n)   |
| ml                 | Milliliter  |
| mM                 | Millimolar (mmol/L)   |
| μM                 | Mikromolar (μmol/L)   |
| μl                 | Mikroliter  |
| MES                | 2-( <i>N</i> -Morpholino) Ethansulfonsäure  |
| MTR                | Mikrotubuli verstärkte Tasche   |
| NCBI               | National Center for Biotechnology Information (engl.): Nationales Zentrum für Biologieinformation |

|             |   |
|-------------|---|
| ng          | Nanogramm   |
| nm          | Nanometer   |
| nM          | Nanomolar (nmol/L)  |
| No          | Number (engl.): Nummer  |
| nt          | Nukleotid   |
| NATIVE-PAGE | Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese                        |
| PCR         | Polymerase chain reaction (engl.): Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PFB         | Paraflagellar body (engl.): Paraflagellarkörper               |
| PAR         | Paraxonemal rod (engl.): Paraxonemale (paraxiale) Stäbchen    |
| psi         | Pound-force per square inch (engl.): Maßeinheit für den Druck |
| qPCR        | Quantitative Real-Time-PCR (engl.): Quantitative Echtzeit-PCR |
| rRNA        | Ribosomale RNA  |
| RNA         | Ribonucleic acid (engl.): Ribonukleinsäure                    |
| rpm         | Rounds per minute (engl.): Umdrehungen pro Minute             |
| RT          | Raumtemperatur bzw. Reverse Transkriptase                     |
| RLU         | Relative Light Units (engl.): Relative Licht-Einheiten        |
| Rev         | Reverse (engl.): rückwärts                                    |
| SDS         | Sodium dodecyl sulfate (engl.): Natriumdodecylsulfat          |
| SDS-PAGE    | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese          |
| s = sek     | Sekunde(n)  |
| s.          | siehe   |
| TNCB        | 2,4,6-Trinitrochlorbenzol                                     |
| TA          | Annealing temperature (engl.): Anlagerungstemperatur          |
| Tab.        | Tabelle   |
| TAE         | Tris-Acetat-EDTA  |
| Taq         | <i>Thermus aquaticus</i>                                      |
| Tm          | Melting temperature (engl.): Schmelztemperatur                |
| Tris        | Tris(hydroxymethyl) aminomethan                               |
| TEMED       | Tetramethylethylendiamin                                      |

|         |                          |
|---------|--------------------------|
| UDP-Glc | Uridindiphosphat-Glucose |
| V       | Volt                     |
| VE      | Vollentsalztes Wasser    |
| VF      | Verdünnungsfaktor        |
| z. B.   | zum Beispiel             |

## ZUSAMMENFASSUNG

Paramylon ist ein  $\beta$ -1,3-Glucan und wird bei den meisten Euglenida als Reservekohlenhydrat gebildet. Dieses Speicherkohlenhydrat hat eine große Bedeutung angesichts der besonderen Eigenschaften und der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten in der Industrie und Medizin, dennoch ist die Biosynthese noch nicht geklärt.

Der Paramylon-Synthase-Komplex ist ein enzymatisch aktives Protein, das in der Membran der Paramylon-Granula lokalisiert und für die Synthese des Paramylons verantwortlich ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Paramylon-Synthase-Komplex aus *Distigma proteus* und *Peranema sp.* durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert und mittels Native-PAGE, SDS-PAGE und des UDP-Glc<sup>TM</sup>-Glucosyltransferase-Tests charakterisiert. Der Paramylon-Synthase-Komplex der beiden Spezies ist demnach unter nativen Bedingungen ein 669 kDa großer Proteinkomplex. Bei *Distigma proteus* wurden mittels SDS-PAGE drei Untereinheiten im Bereich 60 kDa und zwischen 34 und 43 kDa identifiziert. Bei *Peranema sp.* konnte nur eine einzige Untereinheit im Bereich zwischen 50 und 70 kDa detektiert werden. Anhand von enzymatischen und chemischen Analysen wurde bestätigt, dass bei den untersuchten Spezies das Enzymprodukt Paramylon ausschließlich aus Glucose-Molekülen aufgebaut ist. Die Sequenzdaten aus *Euglena gracilis*, *Distigma proteus*, *Khawkinea quartana* und *Peranema sp.* entsprachen den Sequenzen der Paramylon-Synthase-Komplex kodierenden Gene GSL1 und GSL2 aus *Euglena gracilis* Z. Im Weiteren wurde die Transkriptomanalyse zur Feststellung der differentiellen Genexpression bei *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* in der Licht- und Dunkelphase durchgeführt. Dafür wurde einmalig jeweils nach der Licht- bzw. Dunkelphase (12:12 h) eine Probe entnommen. Zwar wurden in dieser Analyse keine signifikanten Veränderungen der Transkriptionslevels zwischen den beiden Wachstumsbedingungen beobachtet, aber die mRNA-Sequenzen und Proteinsequenzen für GSL1 und GSL2 wurden für beide Organismen vollständig ermittelt. Bei *Euglena gracilis* kodieren die Gene GSL1 und GSL2 mit ihren 10.829 und 7.958 Nukleotiden jeweils für Proteine mit 2.274 und 2.270 Aminosäuren. Die Gensequenzen GSL1 und GSL2 bei *Distigma proteus* weisen hingegen 4.842 und 7.664 Nukleotide auf. Diese kodierten jeweils für Proteine mit 1.518 und 2.298 Aminosäuren. Angesichts der Proteinsequenzen wurden die Genprodukte von GSL1 und GSL2 in die Glucosyltransferase-Familie 48 (GT48) eingeordnet und weisen 9 bis 11 Transmembran-Helices (TMHs), DXD-, RXTG- sowie QXXRW-Motive auf.

Im Gegensatz zu der Transkriptomanalyse nach 12:12 h Wechsel zeigten die anschließenden qPCR-Analysen, dass die Gene für die Paramylon-Synthase (GSL 1 und GSL 2) bei *Euglena gracilis* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (Dauerbelichtung, Dauerdunkel und Tag-Nacht-Rhythmus 12:12 h) und über einen längeren Zeitraum (alle 48 h über 12 Tage) herunter- oder heraufreguliert werden.

## 1. EINLEITUNG

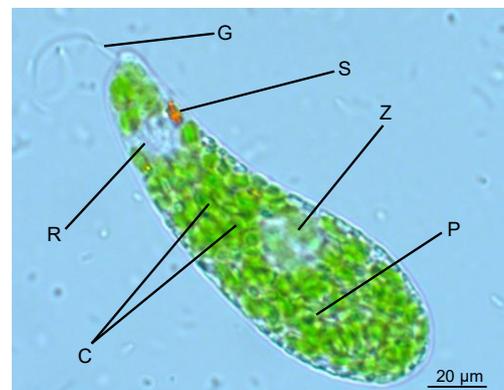
### Verläuft die Paramylon-Synthese auch in heterotrophen Euglenida ähnlich wie bei phototrophen Vertretern?

Das Speicherkohlenhydrat Paramylon ( $\beta$ -1,3-Glucan) wird von den meisten Vertretern der Euglenida gebildet. In den letzten Jahren wurden mehrere Versuche unternommen, das Enzym, das für die Synthese von Paramylon verantwortlich ist, aus *Euglena gracilis* zu isolieren. Bislang ist es einigen Arbeitsgruppen gelungen, das Enzym in Ansätzen zu charakterisieren (Marechal & Goldemberg 1964, Tomos & Northcote 1978, Bäumer et al. 2001, Brommund 2004). Über die Eigenschaften dieses Enzymkomplexes bei den anderen Vertretern der Euglenida ist bisher allerdings nichts bekannt.

In den folgenden Kapiteln wird zuerst *Euglena gracilis* als Modellorganismus, dann die Phylogenie und anschließend die Merkmale der Euglenida dargestellt. Daran anknüpfend werden die verschiedenen Speicherpolysaccharide sowie die Eigenschaften und die Synthese des Paramylons beschrieben. Ein weiteres Kapitel setzt sich mit den Merkmalen der untersuchten Arten *Euglena gracilis*, *Distigma proteus*, *Khawkinea quartana* und *Peranema sp.* auseinander.

### 1.1. EUGLENA GRACILIS - DER MODELLORGANISMUS

Aufgrund von sowohl pflanzen- als auch tierähnlichen Merkmalen gehören die Euglenida zu den ambiregnalen Taxa; sie werden also unter dem International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (ICN 2012) und unter dem International Zoological Code of Nomenclature (ICZN 2012) geführt. *Euglena gracilis* wird innerhalb der Euglenida Bütschli 1884 (Simpson 1997) als phototropher Organismus zu den botanisch eingeordneten Euglenophyceae (Schoenichen 1925 emend. Marin & Melkonian in Marin et al. 2003, Euglenea Bütschli 1884, emend. Busse & Preisfeld 2002) und darin unter Euglenales Leedale 1967 geführt.



**Abbildung 1:** Lichtmikroskopische Aufnahme einer Zelle von *Euglena gracilis* (photoautotroph).  
**C:** Chloroplast, **G:** Geißel,  
**P:** Paramylon, **S:** Stigma,  
**R:** Reservoir, **Z:** Zellkern  
 (© Onur Baltaci)

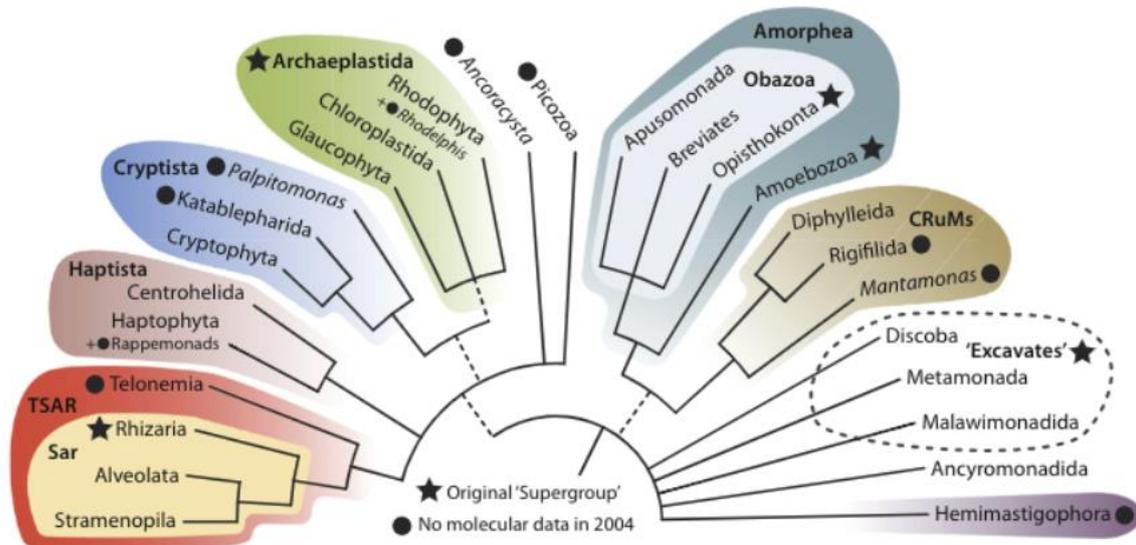
Die Vertreter der Euglenophyceae tragen zumindest primär alle Chloroplasten (s. Abb. 1). Die Zellen sind mit einer Länge von 40 - 68 µm und einer Breite von 6 - 12 µm länglich und fast zylindrisch (Pringsheim 1948, Leedale 1967, Kusel-Fetzmann 2002).

*Euglena gracilis* besitzt ein Stigma und eine emergente Geißel, die fast genauso lang ist wie der ausgestreckte Körper (Pringsheim 1948). Obwohl *Euglena gracilis* phototroph ist, können die Zellen sowohl heterotroph als auch mixotroph (photoheterotroph) angezogen werden. Aufgrund der leichten Kultivierung gehört *Euglena gracilis* zu einem der am besten untersuchten Modellorganismen (O'Neill et al. 2015). *Euglena* speichert wie alle Vertreter der Euglenophyceae und viele der Euglenida ein besonderes Polysaccharid, das Paramylon ( $\beta$ -1,3-Glucan), als Energie- und Kohlenstoffquelle (Wang et al. 2018, Bicudo & Menezes 2016, Ogbonna et al. 2002, Yamane et al. 2001). Zu dem Lebensraum von *Euglena gracilis* gehören kleine Gewässer, Torfmoore, Pfützen, Seen, Quellen, Feld- und Fischteiche (Wolowski 1998).

## 1.2. PHYLOGENETISCHE POSITION DER EUGLENIDA

Eukaryoten werden aktuell in 9 Supergruppen eingeteilt (s. Abb. 2): **TSAR**, **Haptista**, **Cryptista**, **Archaeplastida**, **Amorphea**, **CRuMs**, **Metamonada**, **Hemimastigophora** und **Discoba**. Die Abkürzung **TSAR** steht für die Mitglieder dieser Supergruppe: Telonemia, Stramenopila, Alveolata, Rhizaria. Die letzten drei Gruppen bilden die Klade SAR. Schätzungen zufolge enthält SAR bis zur Hälfte der gesamten Diversität der Eukaryoten. Telonemia wurde durch derzeitige phylogenetische Analysen als neue Schwestergruppe für SAR identifiziert. TSAR umfassen viele Hauptgruppen von Mikroalgen (z. B. Kieselalgen, Dinoflagellaten) und freilebende Protozoen (z. B. Ciliaten, Radiolarien). **Haptista** enthalten die Haptophyten (z. B. Coccolithophoriden). **Cryptista** umfassen heterotrophe Flagellaten (z. B. Katablephariden und Palpitomonas). Die drei Taxa Chloroplastida (Grünalgen und Landpflanzen), Rhodophyta (Rotalgen) und Glaucophyta bilden die Supergruppe **Archaeplastida**. **Amorphea** schließen die Opisthokonten (Tiere und Pilze), Amöbozoen (Amöben und Schleimpilze) und heterotrophe Flagellaten (Breviaten und Apusomonaden) ein. **CRuMs** ist wie TSAR eine neu vorgeschlagene Supergruppe und wird nach den drei freilebenden Protozoen-Taxa dieser Gruppe benannt: Collodictyonida, Rigifilida und Mantamonadida. **Metomonada** enthalten anaerobe Protisten und viele Parasiten (z. B. Giardia, Trichomonas), **Hemimastigophora** werden von freilebenden Protozoen mit zwei Geißeln gebildet. Zu der Supergruppe **Discoba** gehören Euglenozoa, Heterolobosea, Jakobida und Tsukubamonas. Diese Gruppe schließt die Euglenophyten, aber auch Trypanosomatida und somit zahlreiche freilebende oder parasitische heterotrophe

Flagellaten ein, die in vielen Ökosystemen vorkommen (Burki et al. 2019). Das ursprüngliche Taxon Euglenozoa umfasst nur die eukaryotischen Untergruppen Euglenida und Kinetoplastida. Anhand morphologischer und molekularer Forschungsergebnisse wurden neue Untergruppen (Diplonemida und Postgaardi) mit einem einzigen Organismus (*Postgaardi mariagerensis*) zu Euglenozoa hinzugefügt (Cavalier-Smith 1981, Simpson 1997, Simpson et al. 1997).



**Abbildung 2:** Die neue schematische Darstellung der Supergruppen der Eukaryoten (Burki et al. 2019)

Ebenso wurde **Symbiontida** nach der Identifizierung von zwei neuen Arten, die mit Bakterien in Symbiose leben (*Bihospites bacati* und *Calkinsia aureus*) als weitere Untergruppe der Euglenozoa ergänzt. Wenngleich Symbiontida mit Euglenida, Kinetoplastida und Diplonemida zusammen die monophyletische Gruppe Euglenozoa bilden, sind die Beziehungen unter diesen eukaryotischen Gruppen nicht vollständig verstanden. Einerseits weisen einige Studien darauf hin, dass Euglenida und Kinetoplastida aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten wie Flagellenapparat, Paraxonemalstab und die Struktur des Mitochondriums eng verwandt sind (Yubuki et al. 2009, Kivic & Walne 1984, Breglia et al. 2010, Bicudo & Menezes 2016, Triemer & Farmer 1991).

Andererseits deuten andere Studien durch die zusätzlichen phylogenetischen Daten zu den morphologischen Gemeinsamkeiten darauf hin, dass Kinetoplastida und Diplonemida Schwestergruppen sind (Breglia et al. 2007, Bicudo & Menezes 2016, Yamaguchi et al. 2012, Busse & Preisfeld 2002a). In einer weiteren Studie wurde die Euglenozoa in drei Unterstämme Euglenoida, Postgaardia und Glycomonada unterteilt. Dabei umfasste Glycomonada Kinetoplastida und Diplonemida (Cavalier-Smith 2016).

### 1.3. SYSTEMATISCHE GLIEDERUNG DER EUGLENIDA

Euglenida bilden eine vielfältig vorkommende Organismen-Gruppe. Die Typusart *Euglena* wurde im Jahr 1967 von **Antonie van Leeuwenhoek** dokumentiert. Im 18. Jahrhundert beschrieb Otto Fischer Müller einige Arten, aber er ordnete sie nicht den Euglenida zu.

**Ehrenberg (1830)** klassifizierte erstmals die photosynthetischen Euglenida, als er die Gattung *Euglena* beschrieb. Darüber hinaus begründete er (1831-1833) drei neue Gattungen: *Cryptoglena*, *Colacium*, *Trachelomonas*. Bis Mitte des 20. Jahrhunderts wurden weitere neue Süßwasser-Gattungen (*Phacus* Dujardin 1841, *Lepocinclis* Perty 1849, *Monomorphina* Mereschkowski 1877 sowie *Strombomonas* Deflandre 1930) und zwei marine Gattungen (*Eutreptia* Perty 1852 sowie *Eutreptiella* Da Cunha 1913) von unterschiedlichen Autoren eingeführt.

**Stein (1878)** teilte die Euglenida aufgrund der Anwesenheit und der Abwesenheit von Chloroplasten und der Ernährungsweise in vier Hauptgruppen. Die Euglenida wurden erstmals 1884 von Otto Bütschli als eine einzige, eigenständige Gruppe anerkannt, die anderen Protisten-Gruppen gleichgestellt ist. Andere Forscher kategorisierten die grünen und die farblosen Euglenida bei ihren taxonomischen Forschungen (Klebs 1883, Blochmann 1895, Senn 1900, Lemmermann 1913).

**Hollande (1942)** entwickelte ein taxonomisches System für Euglenida nach den Strukturmerkmalen (z. B. Körperform, Ernährungsmodus, Flagellenstruktur und Metabolisierungsgrad).

**Huber-Pestalozzi (1955)** bildete 40 Gattungen mit 842 Arten. **Pringsheim (1956)** unterteilte die Gattung *Euglena* in sechs Untergattungen, die sich durch die Morphologie und Verteilung der Chloroplasten und Pyrenoide abgrenzen.

**Leedale (1967)** erweiterte das Klassifizierungssystem von **Hollande (1942)**. Bei seiner Klassifikation fokussierte er sich auf die Anzahl und die Länge der Geißeln sowie die Ernährungsweise. Leedale teilte Euglenida in 6 Ordnungen ein: **Euglenales**, **Eutreptiales**, **Rhodomadales**, **Sphenomonadales**, **Heteronematales** und **Euglenamorphales**. Die Ordnungen **Euglenales** und **Eutreptiales** enthalten hauptsächlich phototrophe und osmotrophe Gattungen mit Ausnahme einer phagotrophen Gattung „*Euglenopsis*“. Diese beiden Ordnungen fallen besonders durch das Vorhandensein von Chloroplasten auf, obwohl auch farblose Gattungen (z. B. *Khawkinea* und *Distigma*) vorhanden sind. Die Ordnungen **Rhodomadales**, **Sphenomonadales** und **Heteronematales** besitzen weder Stigma noch Geißelanschwellung. Außerdem ist bei den Ordnungen **Sphenomonadales** und **Heteronematales** der Ingestionsapparat eine

Besonderheit. **Rhabdomonadales** und **Heteronematales** zeigen nur eine heterotrophe Ernährungsweise (osmotroph oder phagotroph).

**Zakryś (1986)** unterschied drei Untergattungen (*Euglena*, *Calliglena* und *Discoglena*) unter Berücksichtigung der Anzahl, Morphologie und Position der Chloroplasten in den Zellen, der Anzahl und Morphologie der Paramylonkörner und des Vorhandenseins oder Fehlens von Pyrenoiden.

**Farmer (1988)** kritisierte die systematische Gliederung von Leedale, weil sie hauptsächlich auf lichtmikroskopischen Beobachtungen basierte. Außerdem vereinigte er die Ordnungen Euglenales und Eutreptiales aufgrund seiner Untersuchungen.

**Dawson & Walne (1994)** versuchten, einige Gattungen aufgrund der Geißelstruktur, Ernährungsstrategien und der Ausprägung des Paraxonemalstabes (PAR) zu gliedern. Im Vergleich mit Leedale haben sie sich auf die Geißelorganisation konzentriert. Die Klassifikation von Dawson & Walne enthielt einige Verbesserungen. Nach dieser Darstellung waren die ersten Vertreter der Euglenophyta auf phagotrophe Vorfahren zurückzuführen. Im Laufe der Entwicklung entstanden zwei Linien der Euglenophyta, in denen die Reduktion der ventralen Geißeln (F2) stattfand. Eine der beiden Linien führte durch die Etablierung von PAR, Stigma und die Aufnahme von Chloroplasten zu phototrophen Arten. Aus der anderen Linie entwickelten sich primär osmotrophe Arten durch den Verlust von PAR, Stigma und Chloroplasten. Endozoische Formen und sekundär osmotrophe Arten entstanden unabhängig davon.

In den nächsten Jahren wurden weitere neue marine bzw. Süßwasser-Arten und Gattungen sowie Taxa aus unterschiedlichen Regionen Europas und Asiens beschrieben (Duangjan & Wołowski 2013, Kosmala et al. 2009, Schroeckh et al. 2003, Bennett et al. 2014, Lee & Patterson 2000, Duangjan et al. 2017, Lee et al. 1999, 2000, 2003, 2005, Lee 2002). Bis gegen Ende des letzten Jahrhunderts wurden lichtmikroskopische und transmissionselektronenmikroskopische Daten verwendet, um ein taxonomisches System der Euglenida zu erstellen. Seitdem molekulare Merkmale wie Gene der SSUrRNA (die nukleare rDNA für die kleine ribosomale Untereinheit) genutzt werden, wurden 100 Taxa identifiziert. Darüber hinaus wurde in zahlreichen Studien versucht, ein neues taxonomisches System für die phototrophen, heterotrophen und phagotrophen Euglenida durch Verwandtschaftsanalysen zu bilden. Diese Untersuchungen zeigen, dass die systematische Gliederung der Euglenida sich aufgrund der neu identifizierten Arten, Taxa und Gattungen sowie der Methoden und verwendeten Merkmale zur Stammbaumanalyse im Wandel befindet (Marin et al. 2003, Kim et al. 2010, Paerschke et al. 2017, Bicudo & Menezes 2016).

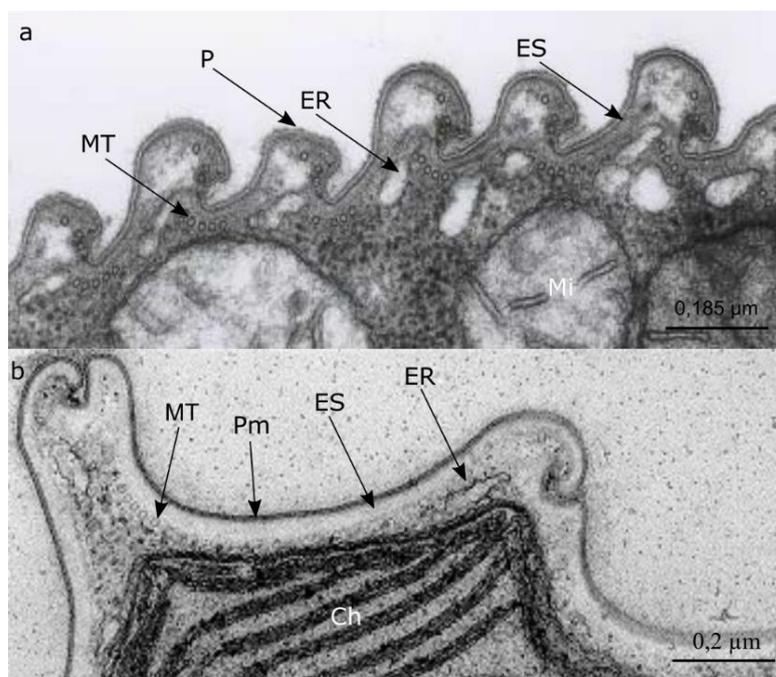
#### 1.4. CHARAKTERISTISCHE MERKMALE DER EUGLENIDA

Die Euglenida bilden eine morphologisch vielfältige Gruppe einzelliger begeißelter Protisten (Pombert et al. 2012, Leander et al. 2017). Sie sind weit verbreitet und treten in den verschiedensten und auch extremen Lebensräumen auf; Süßwasser, Salzwasser, Brackwasser, feuchte Böden, Schlamm und Schnee (Ekelhund & Patterson 1997, Linton et al. 2010, Duval et al. 1999, Hoham & Blinn 1979, Jahn 1946, Arguelles et al. 2014). Die meisten Arten der Euglenida sind freilebend (Leander et al. 2001a). Sehr wenige Vertreter der Euglenida sind sessil und lassen sich in außergewöhnlichen Lebensräumen finden; wie auf Algen (*Volvox*) und kleinen Krebstieren. Auch zeigen einige Vertreter der Euglenida eine endozoische, endophytische (z. B. *Euglena gracilis*) oder eine saprophytische (z. B. *Euglena longa*) Lebensweise; z. B. in Fadenwürmern (Nematoden), Fröschen (Amphibien), Eiern von Nacktschnecken (Mollusken) und Moosfarnen (*Selaginella* sp.) (Satpati et al. 2011, Jiangxin et al. 2004, Ponce Gordo et al. 2002, Jahn 1946).

Innerhalb der Euglenida gibt es als Ernährungsweisen die Heterotrophie (Osmotrophie und Phagotrophie), Phototrophie und Mixotrophie (Milanowski et al. 2016, Pombert et al. 2012, Breglia et al. 2010, Yamaguchi et al. 2012, Lax & Simpson 2013). Die heterotrophen Euglenida sind farblos und können keine Photosynthese betreiben (Sun et al. 2008, Hrdá et al. 2012). Sie sind auf die Aufnahme unterschiedlicher organischer Kohlenstoffquellen angewiesen (Ogbonna et al. 1998). Sie lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Phagotrophie (Bakteriotrophie und Eukaryotrophie) und Osmotrophie. Die bakteriotrophen Euglenida ernähren sich durch die Aufnahme von Bakterien (z. B. *Petalomonas* und *Entosiphon*). Eukaryotrophe Arten fressen eukaryotische Zellen wie Hefe, Diatomeen, grüne Algen sowie andere kleine Eukaryoten (z. B. *Dinema*, *Peranema*) (Leander et al. 2001 & 2007, Leander & Farmer 2001, Triemer 1997). Die osmotrophen Arten lassen sich wiederum in zwei Gruppen einteilen: Primär osmotrophe und sekundär osmotrophe Arten. Primäre Osmotrophen sind aus Phagotrophen durch Reduktion, bzw. Verlust des Ingestionsapparates entstanden. Sie ernähren sich nur über die Aufnahme gelöster Substanzen aus dem Umgebungsmedium (Pinocytose). Im Gegensatz zu den primär Osmotrophen haben sekundär Osmotrophe oftmals inaktive Reste der Plastiden und in der Regel ein Stigma. Primär und sekundär Osmotrophe können keine Photosynthese betreiben (Leander et al. 2007, Yamaguchi & Anderson 1994, Yamaguchi et al. 2012, Leander et al. 2001, Hrdá et al. 2012). Phototrophe Euglenida sind grün und in der Lage, über Photosynthese Kohlenstoffgerüste aufzubauen. Sie benutzen Licht als Energiequelle und stellen durch das Reduzieren von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und Wasser (H<sub>2</sub>O) das organische Produkt Glucose und Sauerstoff (O<sub>2</sub>) her (Richter et al. 2014, Robyt 2001,

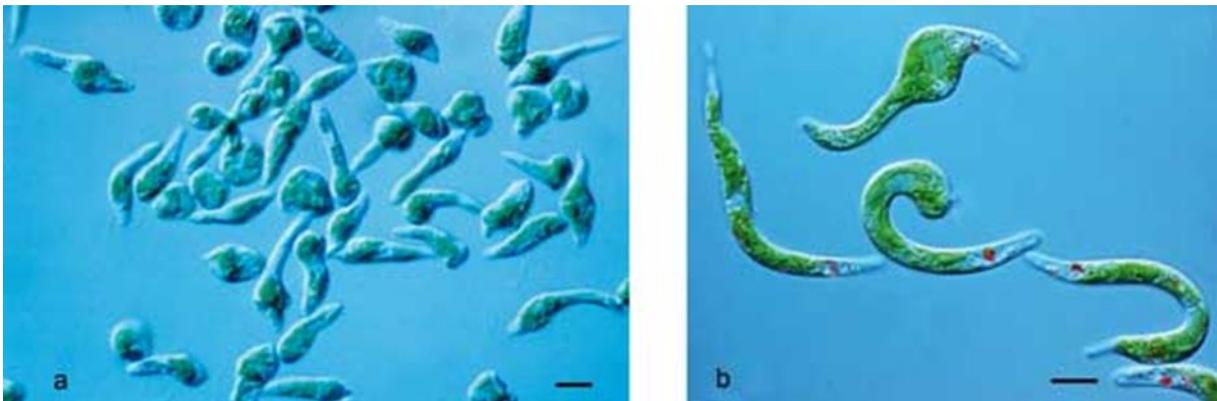
Leander et al. 2001). Mixotrophe Euglenida können sich sowohl phototroph als auch osmotroph ernähren (z. B. *Euglena gracilis*) (Dahoumane et al. 2016, Purwoto et al. 2003).

Die Euglenida besitzen keine Zellwand und keine feste Hülle außerhalb der Plasmamembran. Stattdessen werden sie von einer einzigartigen komplexen Zellbedeckung, der **Pellikula**, als Teil des Cytoskelettes umgeben, welche aus vier Hauptbestandteilen besteht: (i) Plasmamembran, (ii) sich leicht lateral überlappenden wiederholenden Einheiten aus Proteinstreifen (epiplasmatische Schicht), (iii) Mikrotubuli und (iv) tubuläre Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (Metting 1996, Leedale 1964, Strother et al. 2020, Leander et al. 2001, Leander & Farmer 2000, Zakryś et al. 2017, Arroyo et al. 2012, Yubuki & Leander 2011, Conforti et al. 2017). Diese Proteinstreifen erstrecken sich über die gesamte Länge der Zelle und besitzen zwei Articulinproteine, die über ein Intramembranprotein mit der Plasmamembran verbunden sind (Zakryś et al. 2017, Farmer 2009, Leander & Farmer 2000).



**Abbildung 3:** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der Pellikula von a) *Khawkinea quartana*, flexibel (© Angelika Preisfeld) b) *Lepocinclis ovata*, starr (© Angelika Preisfeld), Ch: Chloroplast, Mi: Mitochondrium, MT: Mikrotubuli, P: Pellikula, ER: Endoplasmatisches Retikulum, ES: Epiplasmatische Schicht, Pm: Plasmamembran

Die Pellikula kann starr oder flexibel, helikal oder longitudinal angeordnet sein. Die starre Pellikula hat wenige spiralförmig verschmolzene, meist dicke Streifen, so dass die Zelle eine feste Form hat (z. B. *Phacus* und *Lepocinclis*, s. Abb. 3a). Die flexible Pellikula besitzt eine große Anzahl helixförmiger Gelenkstreifen (einige Zehn), so dass die Zelle sich in der Form verändern kann, wie *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* (s. Abb. 3b) (Jahn 1946, Arroyo et al. 2012). Durch eine flexible Pellikula kommt die typische euglenoide Bewegung (Euglenoid Metaboly) zustande (s. Abb. 4a und 4b), wenn die Streifen relativ zueinander entlang der Artikulationszone gleiten, dort wo zwei Streifen überlappen (Leander et al. 2017).

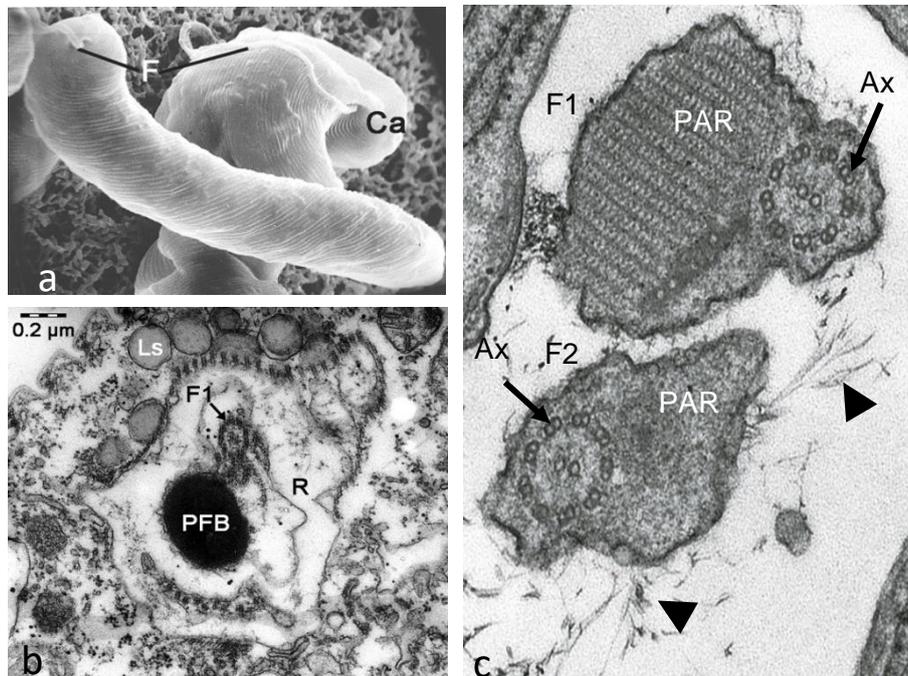


**Abbildung 4:** Lichtmikroskopische Aufnahme der euglenoiden Bewegung a) *Euglena gracilis* und b) *Euglena mutabilis* (1 cm = 10  $\mu$ m) (© Angelika Preisfeld)

Bei den Euglenida sind die **Flagella (Geißeln)** für die Fortbewegung und den Nahrungstransport zuständig (Rossi et al. 2017, Ward & Willey 1981, Breglia et al. 2013, Leander et al. 2017). Sie entspringen an der Basis des Reservoirs aus i.d.R. zwei Basalkörpern. Eine gestreifte Bindefaser verbindet die beiden Basalkörper miteinander (Farmer & Triemer 1988, Farmer 2009, Zakryś et al. 2017). Die Basalkörper bilden das mikrotubuläre organisatorische System für den Flagellenapparat. Drei asymmetrische mikrotubuläre Wurzeln erstrecken sich von den Basalkörpern: eine Rückenwurzel, eine ventrale Wurzel und eine Zwischenwurzel (Leander et al. 2017). Die Euglenida besitzen innerhalb der emergenten Flagella paraxonemale (paraxiale) Stäbchen (PAR), die parallel neben dem Axonem verlaufen, das über die Mikrotubuli und Motorproteine für die Bewegung der Geißeln zuständig ist (Talke & Preisfeld 2002). Der PAR besteht aus zwei Hauptproteinen und erscheint in der anterioren Geißel gitterartig im Längsschnitt, während die ventrale, posteriore Geißel einen plattenartig strukturierten PAR aufweist (s. Abb. 5), wenn sie emergent ist (Walne & Dawson 1993).

Die Funktion des PAR ist unklar, aber es wird angenommen, dass es dem Flagellum Steifheit verleiht. In jedem Fall sind die Geißeln der Euglenida deutlich dicker als die der anderen Eukaryoten (s. Abb. 5).

Das Axonem weist eine charakteristische 9 + 2-Anordnung von Mikrotubuli auf, in der ein zentrales Paar Mikrotubuli von äußeren Dublett-Mikrotubuli umgeben ist.

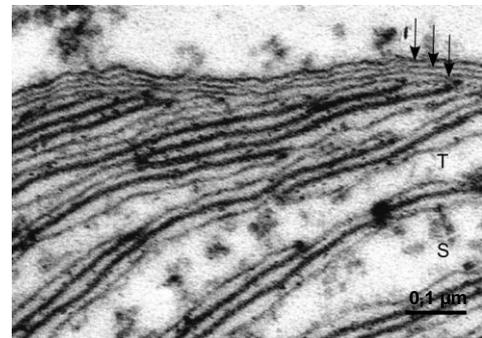


**Abbildung 5:** a) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Euglena gracilis*. Sichtbar sind das jeweilige Flagellum (F) und der Kanal (Ca). Die Streifung entsteht durch die Pellikula. b) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme durch das Reservoir (R) von *Euglena gracilis*. Sichtbar sind das emergente Flagellum, der Paraflagellarkörper (PFB) im Reservoir und die Lipidglobuli des Stigmas (Ls) c) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme durch die Geißeln von *Entosiphon sulcatum* mit den beiden emergenten Geißeln (F1, F2), den Axonemata (Ax) und den Paraxonemalstäben (PAR) (© Angelika Preisfeld)

Viele Euglenida haben zwei heterodynamische Flagellen, die mit haarähnlichen Strukturen, den Mastigonemata, ausgekleidet sind (Pfeilspitze in Abb. 5c). Die meisten phototrophen Arten besitzen ein emergentes und ein im Reservoir verbleibendes Flagellum (Farmer 2009, Leander et al. 2017). Einige marine Arten der Euglenida haben zwei oder auch vier ungleiche emergente Flagella (z. B. *Eutreptiella braarudii*, *Eutreptiella pomquetensis*) (Farmer 2009, Farmer & Triemer 1988, Stonik 2007). Bei der phagotrophen Art *Petalomonas cantuscyni* fehlt ein Flagellum vollständig (Triemer & Farmer 1991). Alle phototrophen und einige sekundär osmotrophe Euglenida besitzen ein **Stigma (Augenfleck)**, das aus orangefarbenen und roten Carotinoiden ( $\beta$ -carotin, Diatoxanthin, Diadinoxanthin) besteht und von einer Membran umgeben einen Teil des

photosensorischen Apparates darstellt (Leander et al. 2007, Leander et al. 2017, Kato et al. 2020, Heelis et al. 1979). Das Stigma liegt frei im Cytoplasma und nicht wie bei Grünalgen in Chloroplasten und ist eng an der Reservoiremembran gelegen (Kato et al. 2020, Farmer 2009, Leander et al. 2017). Gegenüber dem Stigma befindet sich der Paraflagellarkörper (PFB), der den eigentlichen Photorezeptor darstellt und als eine kleine Schwellung der emergenten Geißel erscheint (s. Abb. 5b) (Leander et al. 2017, Zakryś et al. 2017). Der PFB besteht aus einem parakristallinen Material, das Flavine, Pterine und Rhodopsin enthält. Das Stigma bildet mit dem Paraflagellarkörper zusammen den photosensorischen Apparat. Während die Zelle sich durch das Wasser dreht, wird der PFB regelmäßig vom Stigma beschattet. Dies signalisiert der Zelle, ob sie sich zur Lichtquelle hin oder von dieser weg bewegt (Farmer 2009, Leander et al. 2017, Kato et al. 2020).

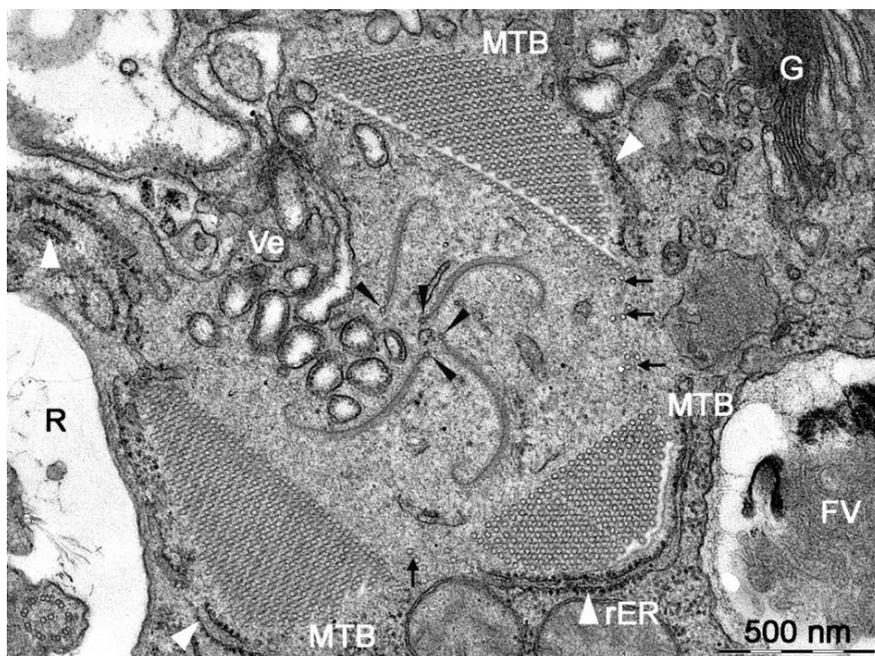
Die **Chloroplasten** der phototrophen Euglenida sind grün und enthalten Chlorophyll a und b. Sie sind über die Zelle verteilt und unterscheiden sich in Form (sternförmig, gelappt, kugelförmig, schildförmig oder scheibenförmig), Größe, Anzahl (von eins bis zahlreich) und Lage (parietal, teilweise parietal oder axial) sowie durch ihre Struktur. Bei den meisten phototrophen Arten besitzen die Chloroplasten Thylakoide in Dreierstapeln und typischerweise Pyrenoide, in denen sich das Enzym „Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco)“ zur photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Assimilation



**Abbildung 6:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch einen Chloroplasten von *Euglena gracilis* mit drei Hüllmembranen (Pfeile). S: Stroma, T: Thylakoidmembranen. (© Dr. Uwe Kahmann)

befindet (Dabbagh & Preisfeld 2017, 2018, Dabbagh et al. 2017, Houtz & Portis 2003, Leander et al. 2017, Arguelles & Martinez-Goss 2019, Bicudo & Menezes 2016, Jahn 1946). Die Chloroplasten der Euglenida zeigen große Ähnlichkeit mit den Chloroplasten der Grünalgen auf. Der Unterschied liegt darin, dass die Chloroplasten der Euglenida von drei (s. Abb. 6), die Chloroplasten der Grünalgen nur von zwei Membranen umgeben sind. Nach der Theorie der sekundären Endosymbiose wurde eine eukaryotische Grünalge von einem phagotrophen Euglenid durch Endozytose aufgenommen. Bei dieser Symbiose sind die ursprünglichen Chloroplasten der eukaryotischen Zelle mit zwei Membranen und die Phagosomenmembran der Wirtszelle mit drei Membranen übriggeblieben (Archibald & Keeling 2002, van Dooren et al. 2001, Keeling 2013, Krajčovič et al. 2015). Bei den Euglenida befindet sich eine **kontraktile Vakuole** im Bereich des Reservoirs. Diese entleert ihren Inhalt in das Reservoir und ist für die Osmoregulation verantwortlich (Storch & Welsch

2009, Harding et al. 2010, Arguelles & Martinez-Goss 2019). Die meisten phagotrophen Euglenida haben einen charakteristischen **Ingestionsapparat** oder ein **Zytosom** zum Einfangen und Aufnehmen von Beutezellen (Leander et al. 2007, Yamaguchi et al. 2012). Dieser Ingestionsapparat befindet sich auf der ventralen Seite der Zelle unterhalb des Kanals (Leander 2004). Bei einigen Euglenida, z. B. *Petalomonas* ist der Ingestionsapparat eine einfache mit Mikrotubuli verstärkte Tasche (MTR) und enthält keine Stäbe und Vanes (Flügel). Die anderen besitzen komplexe und hoch entwickelte Ingestionssysteme mit mehreren Cytoskelett-Elementen, die im Querschnitt wie ein Windrad angeordnet sind. In einer Reihe von bakteriotrophen (z. B. *Entosiphon sulcatum*, s. Abb. 7) und eukaryotrophen Euglenida (z. B. *Dinema*) finden sich zwei robuste, mit Mikrotubuli verstärkte Stäbe, die in eine amorphe Matrix eingebettet sind. Zwischen den beiden Stäben befinden sich je nach Art vier bis fünf Vanes. Während eine Beutezelle aufgenommen wird, ragen die Stäbe des Ingestionsapparates aus dem vorderen Ende der Zelle heraus, und die Flügel drehen sich wie Windradschaufeln. Wenn sich der Ingestionsapparat zurückzieht, drehen sich die Flügel in ihre ursprüngliche Position zurück und nehmen dabei die Beute auf (Yamaguchi et al. 2012, Leander 2008, Farmer 2009, Leander et al. 1990, Leander et al. 2001).



**Abbildung 7:** Elektronenmikroskopische Aufnahme des Ingestionsapparates von *Entosiphon sulcatum*. R: Reservoir, rER: Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums, MTB: Mikrotubuli Bündel, G: Golgi Apparat, Ve: Vesikel, FV: Nahrungsvakuole (© Almut Vollmer)

Das Reservekohlenhydrat **Paramylon** stellt eine einzigartige Besonderheit im Organismenreich dar (Conforti et al. 2017). Daher wird es gemeinsam mit Reservekohlenhydraten anderer Organismen beschrieben.

### 1.5. DIE SPEICHERKOHLENHYDRATE DER EUKARYOTEN UND PROKARYOTEN

Polysaccharide sind große Kohlenhydratpolymere, die bei Tieren, Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen (Algen und Bakterien) natürlich gebildet werden (Delattre et al. 2011, Mohammed et al. 2021). Diese Makromoleküle bestehen aus einer großen Anzahl von sich wiederholenden Monosacchariden (Hundertern und Tausenden), die über glykosidische Bindungen verbunden sind (Nechita & Roman (Iana-Roman) 2020). Es ist bekannt, dass Polysaccharide in biologischen Systemen aufgrund der Vielfalt und Struktur verschiedene Funktionen und Eigenschaften aufweisen (Wang et al. 2013, Delattre et al. 2011). Sie sind ein wichtiger Bestandteil der Zellwand bei Pflanzen und Mikroorganismen und eine strukturelle Komponente der Exoskelette von Insekten und anderen Arthropoden. Die Polysaccharide schützen auf diese Weise Organismen vor der Austrocknung und vor Umweltveränderungen wie z. B. Änderungen der Temperatur, des pH-Wertes oder der Sauerstoffkonzentration. Mit Hilfe der Polysaccharide werden die Zellen vor dem Eindringen anderer Organismen und Viren geschützt. Außerdem sind sie an Prozessen, wie der Zellerkennung bei Infektionen sowie der Rezeptorbindung und der Immunantwort beteiligt (Robyt 1998). Manche Polysaccharide dienen als Energiespeicher (Wang et al. 2013, Delattre et al. 2011). Diese Reservepolysaccharide werden in den entsprechenden pflanzlichen Organen wie Samen, Früchten und Wurzeln entweder intrazellulär (Stärke, Fructosane) oder auch in der Zellwand (z. B. Mannane, Xyloglucane, Galactomannane) eingelagert (Burchard 1985). In Tabelle 1 werden die Reservekohlenhydrate dargestellt, die in unterschiedlichen Organismen vorkommen (Aikawa et al. 2015, Burchard 1985, Lovegrove et al. 2015, Buckeridge 2010, Hoch 2007, De Sousa et al. 2017, Pauly et al. 2013, Buckeridge et al. 2000 & 2000a, 1992, McCleary et al. 1976, Schultink et al. 2014, Mohamed & Rayas-Duarte 1995, Mucalo et al. 2002, Lucyszyn et al. 2011, Farkas et al. 1991, Causey et al. 2000, Robyt 1998 & 2001, Permatasari et al. 2018, Graiff et al. 2015, Kadam et al. 2015, Becker et al. 2017 & 2020, Al Abdallah et al. 2016, Podterob 2008, Chanda et al. 1957, Honegger & Haisch 2001, Olafsdottir & Ingólfssdottir 2001, Markou et al. 2012, Gentry et al. 2010, Villarruel-López et al. 2017, Barsanti & Gualtieri 2006, Lee 2008, Kiss et al. 1987, Wilson et al. 2010, Viola et al. 2001, Park 2015, Brust et al. 2020, Hall 2016, Nakamura et al. 2005, Chikwana et al. 2013, Goh & Klaenhammer 2014).

**Tabelle 1:** Übersicht einiger Reservopolysaccharide und deren Merkmale

| Kohlenhydrate          | Polymer                         | Struktur  | Wasserlöslichkeit | Vorkommen   |
|------------------------|---------------------------------|---|-------------------|---|
| <b>Stärke</b>          | Amylose<br>Amylopektin          | $\alpha$ -1,4-D-Glucose<br>$\alpha$ -1,4-D-Glucose<br>$\alpha$ -1,6-D-Glucose | unlöslich         | Pflanzenknollen<br>(z. B. Kartoffeln)   |
| <b>Hemicellulose</b>   | Xyloglucane<br>(Amyloide)       | $\beta$ -1,4-D-Glucose<br>$\beta$ -1,6-D-Xylose<br>$\beta$ -1,2-Galactose     | löslich           | Samen<br>(Tamarinde,<br>Kapuzinerkresse)  |
|                        | Mannane                         | $\beta$ -1,4-D-Mannose  | unlöslich         | Samen (Palmen,<br>Kaffee, Sesam)  |
|                        | Glucomannane                    | $\beta$ -1,4-D-Mannose<br>$\beta$ -1,4-D-Glucose                              | löslich           | Samen (Salat, Tomate)<br>und unterirdische<br>Organe (Lilie)  |
|                        | Galactomannane                  | $\beta$ -1,4-D-Mannose<br>$\alpha$ -1,6-D-Galactose                           | löslich           | Samen (Leguminosae)   |
|                        | Galactoglucomannane             | $\beta$ -1,4-D-Mannose<br>$\beta$ -1,4-D-Glucose<br>$\alpha$ -1,6-D-Galactose | löslich           | Samen<br>(Iridaceae, Liliaceae)   |
|                        | Galactane<br>(Arabinogalactane) | $\beta$ -1,4-D-Galactose<br>$\alpha$ -1,5-D-Arabinose                         | löslich           | Samen (Gemüse,<br>Kaffee, Lupine)   |
| <b>Fructane</b>        | Inulin                          | $\beta$ -2,1-D-Fructose   | löslich           | Pflanzen<br>(z. B. Hyazinthen,<br>Lilienknollen,<br>Tulpen), Algen<br>(z. B. <i>Acetabularia<br/>mediterranea</i> ) |
|                        | Levane                          | $\beta$ -2,6-D-Fructose<br>$\beta$ -2,1-D-Fructose                            | löslich           | Gräser  |
| <b>Laminarin</b>       |                                 | $\beta$ -1,3-D-Glucose<br>$\beta$ -1,6-D-Glucose                              | löslich/unlöslich | Phaeophyceae (braune<br>Algen), z. B. Laminaria<br>Arten  |
| <b>Lichenin</b>        |                                 | $\beta$ -1,3-D-Glucose<br>$\beta$ -1,4-D-Glucose                              | löslich           | Flechten und Moose  |
| <b>Florideenstärke</b> | Amylopektin                     | $\alpha$ -1,4-D-Glucose   | unlöslich         | Rhodophyta<br>(rote Algen)  |
| <b>Paramylon</b>       |                                 | $\beta$ -1,3-D-Glucose  | unlöslich         | Euglenida,  |
| <b>Glykogen</b>        |                                 | $\alpha$ -1,4-D-Glucose<br>$\alpha$ -1,6-D-Glucose                            | löslich           | Tiere, Pilze, Hefen,<br>Cyanobacteria   |

**Glykogen** ist ein wichtiges Reservopolymer aus  $\alpha$ -1,4-verknüpften Glucose-Untereinheiten mit  $\alpha$ -1,6-verknüpfter Glucose an den Verzweigungspunkten (Wilson et al. 2010, Zeitz et al. 2019, Park 2015). Es stellt aufgrund der besonderen Eigenschaften, wie z. B. starker Verzweigung, eine flexible und wirksame Energiequelle dar (Goh & Klaenhammer 2014). Glykogen wird in Tieren, Pilzen, Protozoa, Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), Bakterien (*Escherichia coli*), Cyanobakterien und Rhodophyta gebildet (Aikawa et al. 2015, Hall 2016, François & Parrou 2001, Park 2015, Cook et al. 1968, Goh & Klaenhammer 2014, Wang et al. 2019, Paulillo et al. 2003, Viola et al. 2001, Robyt 2001).

**Stärke** ist das häufigste Polysaccharid und eines der wichtigsten Speicherkohlenhydrate in Pflanzen, das in Form von Stärkekörnern in den Chloroplasten vorliegt (Burchard 1985, Burrell 2003, Hostettler et al. 2011, Kasperbauer & Hamilton 1984, Viola et al. 2001). Es tritt hauptsächlich in den Chloroplasten von Grünalgen und in Blättern, Stielen, Wurzeln, Samen (Sojabohne und Erdnuss), Früchten (Banane, Mango und

Papaya), Knollen (Maniok, Kartoffel), Zwiebeln und Pollen der meisten Pflanzen auf. Je nach Herkunft variieren die Form und die Größe der Stärkekörner (z. B. Kugeln, Ellipsoide, Polygone und unregelmäßige Tubuli). Stärke ist eine Mischung von zwei Glucosepolymeren Amylose und Amylopektin. Diese beiden Hauptkomponenten unterscheiden sich in Struktur und Eigenschaften. Amylose ist ein unverzweigtes (lineares) Molekül, bei dem ca. 200 bis 1000 Glucoseeinheiten durch  $\alpha$ -1,4-glycosidische Verbindungen miteinander verknüpft sind. Dieses Molekül liegt wie eine Helix vor und enthält sowohl  $\alpha$ -1,4-glycosidische als auch  $\alpha$ -1,6-glycosidische Verbindungen. Im Gegensatz zu Amylose ist Amylopektin ein hochverzweigtes Molekül, das aus 2.000 bis 20.000 Glucoseeinheiten besteht (Segura-Campos et al. 2015, Di Donato et al. 2014, Robyt 2001).

**Hemicellulosen** bilden eine weitere Gruppe der Reservekohlenhydrate, die in den Pflanzenzellwänden vorkommen. Hemicellulosen weisen  $\beta$ -1,4-glycosidische Verbindungen auf und umfassen **Xyloglucane**, **Mannane**,  **$\beta$ -Glucane** und **Galactane**. Die Struktur der Hemicellulosen und ihre Häufigkeit variieren stark zwischen verschiedenen Arten und Zelltypen (Scheller & Ulvskov 2010, Sethya et al. 2015, Hoch 2007).

**Xyloglucan (XyG)** ist eine wichtige und häufig vorkommende Hemicellulose, die in vielen Landpflanzen mit Ausnahme von Gräsern gebildet wird (Cocuron et al. 2007, Scheller & Ulvskov 2010, Farkas et al. 1991). Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften wie Stärke wird dieses Polysaccharid auch Amyloid genannt (Lucyszyn et al. 2011). **XyG** besteht aus  $\beta$ -1,4-verknüpften Glucoseketten mit regelmäßiger Verzweigung von  $\beta$ -1,6-verknüpften Xylosylresten. Manchmal können diese Ketten mit  $\beta$ -1,2-verknüpften Galactosylresten weiter verzweigt werden (Buckeridge 2010). Neben der Strukturfunktion dienen **XyGs** auch als Energiereserve in der primären Zellwand der Samen bei einigen Pflanzenarten (z. B. Tamarinde (*Tamarindus indica*), Jatoba (*Hymenaea courbaril*), Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus*)). Diese Reservepolysaccharide werden während der Samenentwicklung und -reifung in großen Mengen gespeichert und bei der Keimung plötzlich und schnell abgebaut, um Energie für den entstehenden Keimling bereitzustellen (Farkas et al. 1991, Yamatoya et al. 1997, Cocuron et al. 2007, Pauly et al. 2013, Schultink et al. 2014).

**Mannane** sind Hemicellulosen, die sowohl als Strukturpolymere in Pflanzenzellwänden als auch als Speicherkohlenhydrate in Pflanzensamen fungieren. Aufgrund der Grundgerüstzusammensetzung und der Seitenkettensubstitution kann die Mannan-Familie in zwei Klassen eingeteilt werden: Homomannane (Mannane) und Heteromannane (Glucomannane, Galactomannane und Galactoglucomannane) (Wang et al. 2013, Hoch 2007). Alle Mannane haben eine Grundstruktur von  $\beta$ -1,4-D-Mannose-

Hauptketten. Diese Hauptketten werden bei den Glucosemannanen mit  $\beta$ -1,4-D-Glucose und bei Galactomannanen mit  $\alpha$ -1,6-D-Galactose verbunden. Im Gegensatz zu den anderen Heteromannanen enthalten Galactoglucomannane sowohl  $\beta$ -1,4-D-Glucose als auch  $\alpha$ -(1,6)-D-Galactose in der Seitenkette (Hoch 2007, De Sousa et al. 2017).

**Galactane** sind Zellwandspeicherpolysaccharide, die hauptsächlich in den Samen einiger Pflanzen vorkommen. Diese Polymere wurden zum ersten Mal 1947 aus den Samen der weißen Lupine (*Lupinus albus*) isoliert (Pierre et al. 2014). Ursprünglich wurde angenommen, dass das Polysaccharid der weißen Lupine aus unverzweigten  $\beta$ -1,4-D-Galactose-Einheiten besteht. Neue Forschungsergebnisse zeigen jedoch, dass das Polysaccharid aus den Keimblättern der Lupine (*Lupine angustifolius*)  $\beta$ -1,4-D-Galactose-Einheiten mit Zweigen von  $\beta$ -1,5-Arabinose enthält. Galactose und Arabinose werden in der Zellwand nach der Keimung allerdings abgebaut (Mohamed & Rayas-Duarte 1995, Buckerigde et al. 2000a, Buckerigde 2010).

**Fructane** sind Fructosepolymere, die bei einigen höheren Pflanzen als Reservopolysaccharide dienen. Diese Polymere sind auch bei Bakterien und Pilzen verbreitet. Aufgrund der Bindungsunterschiede lassen sich Fructane in zwei Gruppen unterteilen: Inulin und Levane (Bansal et al. 2019, Valluru & Van den Ende 2008, Burchard 1985).

**Inuline** sind unverzweigte Speicherpolysaccharide, die aus einer langen Kette aus  $\beta$ -2,1-verknüpften D-Fructose-Einheiten besteht. Das letzte Fructose-Molekül in der Kette ist durch  $\alpha$ -1,2-Bindung mit einem Glucosemolekül verbunden. Manche Algen (z. B. *Acetabularia mediterranea* und *A. crenulata*), einige Vertreter von Compositae (z. B. Löwenzahn (*Taraxacum officinale*), Chicoree (*Cichorium intybus*), Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.)) und viele Vertreter von Liliaceae (z. B. Zwiebeln, Hyazinthen, Tulpen, Lilienknollen) speichern Inuline (Öztürk & Serdaroglu 2016, Robyt 1998 & 2001, Rubel et al. 2018, Van Laere & Van Den Ende 2002, Bourne et al. 1972, Legros et al. 1975, Shoaib et al. 2016, López-Molina et al. 2005, Li et al. 2014 & 2015, Crespo et al. 2020).

**Levane** sind Polysaccharide, die aus  $\beta$ -2,6-verknüpften D-Fructose-Einheiten mit einem Glucosylrest am Ende der Kette bestehen. Viele bakterielle Levane weisen durch zusätzliche  $\beta$ -2,1-Bindungen eine verzweigte Struktur auf. Sie werden in Pflanzen, Pilzen und Bakterien gebildet. Levane schützen diese Organismen vor kaltem und trockenem Klima. Levane werden im Stamm und im Blatt mancher Gräser (z. B. *Agropyron cristatum*, *Dactylis glomerata* und *Poa secunda*) als Speicherkohlenhydrate produziert und werden in den letzten Stadien der Vegetationsperiode abgebaut (Gupta et al. 2011, Permatasari et al. 2018, Tomulescu et al. 2016).

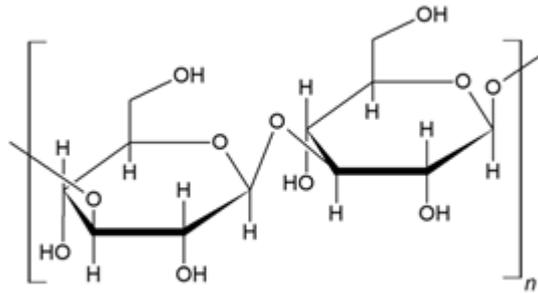
**Laminarin (Laminaran oder Leucosin)** ist das Energiereservepolysaccharid, das bei den braunen Algen (Phaeophyceae (z. B. *Ascophyllum nodosum* und Laminariaceae (z. B. *Laminaria japonica*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*)) vorkommt (Kadam et al. 2015 & 2015 a, Tian et al. 2020, Castanheira et al. 2020, Al Abdallah et al. 2016, Robyt 2001, Graiff et al. 2015, Venugopal 2019). Es wird im Frühling und Sommer in Vakuolen der braunen Algen gespeichert und im Winter abgebaut. Laminarin enthält unverzweigte Ketten aus  $\beta$ -1,3-verknüpften Glucoseeinheiten. Außerdem weist es wenige  $\beta$ -1,6-verknüpfte Seitenketten aus einer oder mehreren Glucoseeinheiten auf (Sterner & Gröndahl 2021, Graiff et al. 2015, Kadam et al. 2015).

**Lichenin** wird auch **Moosstärke** oder **Flechtenstärke** genannt und wird entsprechend in vielen Flechten (z. B. *Letharia vulpina*, *Parmelia sulcata*) und Moosen (z. B. *Cetraria islandica*, *Cetraria cucullata*) als Reservekohlenhydrat gebildet (Aagnes et al. 1995, Podterob 2008, Brown 1898, Olafsdottir & Ingolfsdottir 2001). Chemisch gesehen ist Lichenin ein gemischtes  $\beta$ -Glucan aus Glucoseeinheiten, die  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,4-glycosidisch miteinander verbunden sind (Chanda et al. 1957, Iakiviak et al. 2011).

**Florideenstärke (Rhodophytenstärke)** ist eine Reservesubstanz, die von einigen Rotalgen (Rhodophyta (z. B. *Furcellaria fastigiata*)) gebildet wird (Meeuse & Kreger 1954). Florideenstärke ist ein  $\alpha$ -1,4-Glucan mit  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verzweigungen aus Glucoseeinheiten. Obwohl dieses Speicherprodukt Ähnlichkeiten mit der Stärke aus höheren Pflanzen aufweist, liegt der Unterschied darin, dass ihm Amylose fehlt. Das Amylopektin-ähnliche Polymer „Florideenstärke“ kommt als Granula im Zytoplasma außerhalb der Chloroplasten vor und färbt sich mit Jod rotviolett (Lee 2008, Ben Hlima et al. 2019, Viola et al. 2001).

### 1.5.1. DAS BESONDERE RESERVEPOLYSACCHARID: PARAMYLON

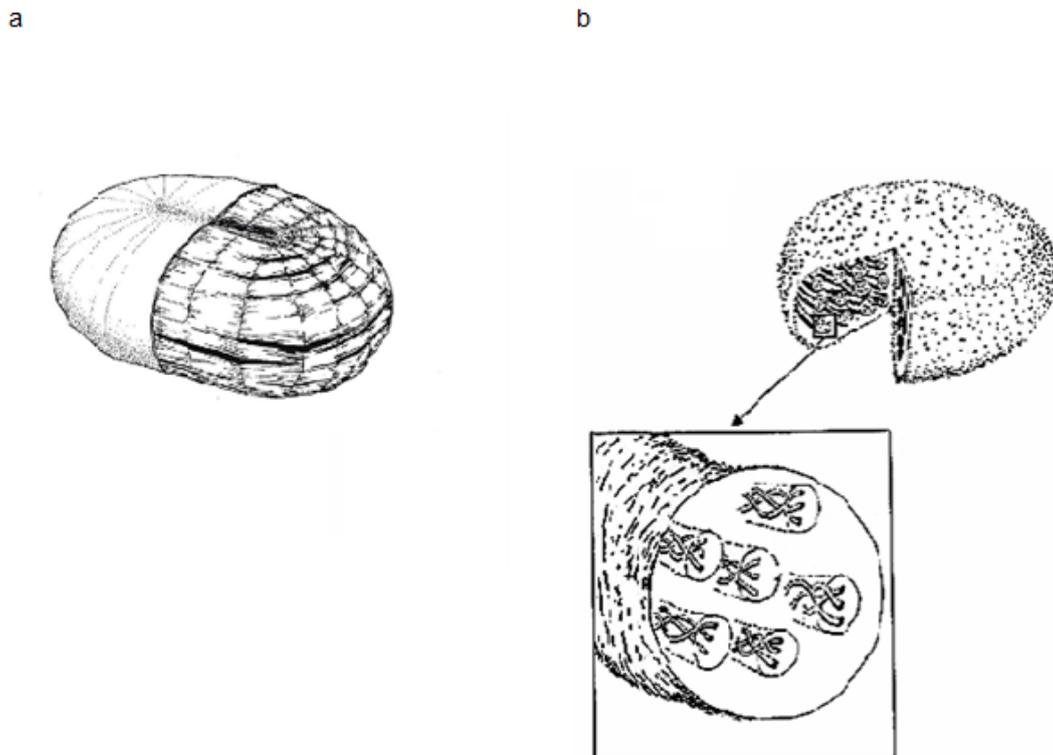
1850 wurde zum ersten Mal von Gottlieb eine Stärke-ähnliche Substanz aus *Euglena viridis*-Zellen isoliert. Obwohl der Stärkenachweis mittels Iod-Reaktion nicht funktionierte, wurde diese Substanz aufgrund der äußerlichen Ähnlichkeiten mit den Stärkekörnern **Paramylon** genannt. Paramylon fungiert als Energiereserve und Kohlenstoffquelle (Wang et al. 2018, Gottlieb 1850). Chemisch gesehen ist das Paramylon ein unverzweigtes und wasserunlösliches  $\beta$ -1,3-Glucan, das nur aus Glucose-Einheiten besteht (Guo et al. 2020, Jeon et al. 2020, Kiss et al. 1987 & 1988). In Abbildung 8 ist die chemische Strukturformel des Paramylons dargestellt:



**Abbildung 8:** Chemische Struktur von Paramylon ( $\beta$ -1,3-Glucan), (verändert nach Iwasaki et al. 2019)

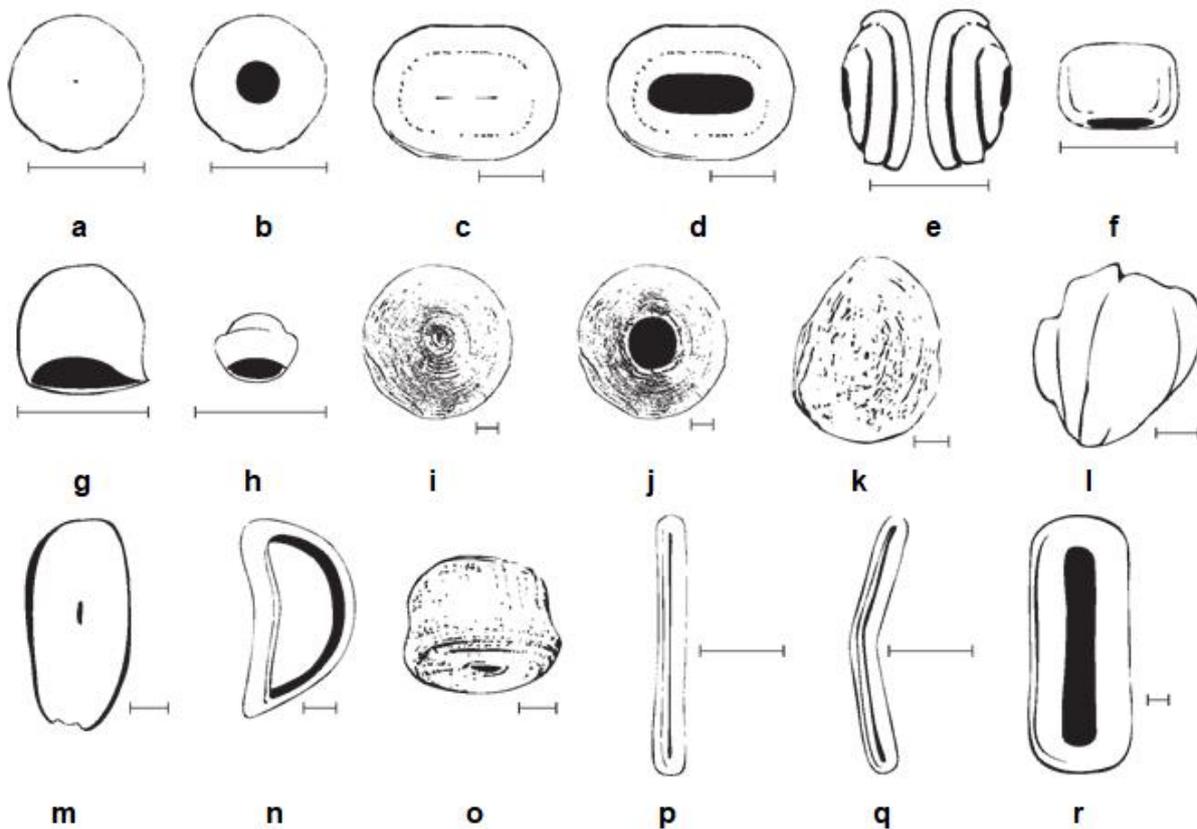
Paramylon-Granula befinden sich immer von einer Membran umgeben frei im Zytoplasma. Zum Teil liegen sie nahe an den Pyrenoiden - einseitig als Haplopyrenoide oder beidseitig als Diplopyrenoide -, aber immer außerhalb der Chloroplasten, wenn welche vorhanden sind (Linton et al. 2010, Zakryś et al. 2017). Bei *Euglena gracilis* wurde die Struktur der Paramylon-Granula gut aufgeklärt. Sie sind von einer 6 nm dicken Membran umgeben und bestehen aus Segmenten, Fasern und Mikrofibrillen (4 nm), die mehrere Schichten bilden. Zwei Arten von Segmenten treten auf: dreieckige und rechteckige Segmente. Diese Segmente unterscheiden sich in der Größe. Außerdem sind die Ränder der Segmente nicht gerade. Die dreieckigen Segmente sind dreidimensional keilförmig und befinden sich an den distalen Enden des Granulums. Im mittleren Bereich des Granulums kommen die rechteckigen Segmente vor. In jedem Granulum sind insgesamt sechs bis acht dreieckige und vier bis sechs rechteckige Segmente enthalten. Üblicherweise treffen sich die beiden Segmentarten im Zentrum des Paramylons. Die Fasern sind die kleinsten sichtbaren Einheiten des Granulums, die aus einem Bündel von Mikrofibrillen bestehen. Mikrofibrillen sind 4 nm dick und werden von einzelnen oder einer Ansammlung von Ketten gebildet (Kiss et al. 1987).

In Abbildung 9 sind die Struktur der Segmente und der Aufbau von Mikrofibrillen und Fasern in Form von Modellen dargestellt:



**Abbildung 9:** Modelle des Paramylon-Granulums **a)** Darstellung der Membran und der Segmente (Kiss et al. 1987) **b)** Aufbau und Struktur von Mikrofibrillen und Fasern (Marchessault & Deslandes 1979)

Das Paramylon wird nicht nur von phototrophen, sondern auch von manchen heterotrophen Arten der Euglenida gebildet (Leedale 1967, Triemer & Zakryś 2015). Die Anzahl und die Menge sowie die Form der Paramylon-Granula variieren innerhalb der verschiedenen Arten der Euglenida (Conforti et al. 2017). Die meisten Vertreter der Euglenida (alle phototrophen sowie viele heterotrophe und osmotrophe Euglenida) speichern kleine Granula. Das Vorhandensein kleiner Granula wird „monomorph“ genannt. Zusätzlich zu den kleinen Granula produzieren viele phototrophe Arten zusätzlich große Granula. Die Speicherung von zwei unterschiedlichen Größen von Paramylon-Granula wird als "dimorph" bezeichnet. Beispielsweise zeigt die Gattung *Lepocinclis* verschiedene Formen von Paramylon-Granula auf (z. B. lange stabförmige Paramylon-Granula in *Lepocinclis acus* und gebogene ringförmige Paramylon-Granula in *Lepocinclis ovum*). Manche Arten der Euglenida besitzen zwei unterschiedliche Formen der Paramylon-Granula in der Zelle (verdickte scheibenförmige und abgeflachte Paramylonplatten in *Phacus orbicularis*) (Triemer & Zakryś 2015, Zakryś et al. 2017, Monfils et al. 2011). In Abbildung 10 ist die Vielfalt des Paramylons dargestellt:

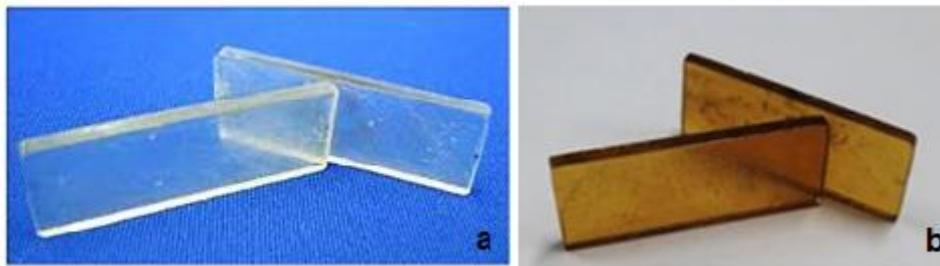


**Abbildung 10:** Vielfalt des Paramylons in den phototrophen Euglenida a) kleines scheibenförmiges Paramylon-Granulum, b) kleines ringförmiges Paramylon-Granulum, c) ellipsenförmiges Paramylon-Granulum, d) kleines gliedförmiges Paramylon-Granulum, e) flache gebogene Diplopyrenoidkappe, f) C-förmige Pyrenoidkappe, g) randlose U-förmige Pyrenoidkappe, h) U-förmige Pyrenoidkappe mit Rand, i) verdickte scheibenförmige Paramylonplatte, j) große ringförmige Paramylonplatte, k) abgeflachte Paramylonplatte, l) gebogene Paramylonplatte, m) wannenförmige Paramylonplatte, n) gebogene ringförmige Paramylonplatte, o) spulenförmiges Paramylon-Granulum, p) langes gerades stabförmiges Paramylon-Granulum, q) lang gebogenes stabförmiges Paramylon-Granulum, r) längliches gliedförmiges Paramylon-Granulum (Maßstab = 2  $\mu\text{m}$ ) (Monfils et al. 2011)

Die Menge und die Position der Paramylon-Granula hängen von den Wachstumsbedingungen ab. Beispielsweise speichern heterotroph angezogene *Euglena gracilis*-Kulturen unter dunklen Bedingungen eine bis zu 6-fach höhere Menge von Paramylon als phototrophe Kulturen, wenn sie mit Kohlenstoffquellen versorgt werden (Bäumer et al. 2001). Unter phototrophen Zuchtbedingungen befindet sich das Paramylon größtenteils in der Nähe der Pyrenoidregion außerhalb der Chloroplasten, während die Paramylon-Granula in heterotrophen Zellen überall in dem gesamten Zytoplasma vorkommen (Kiss et al. 1986, Bäumer et al. 2001). Das Paramylon ist weder in Wasser noch in verdünnten Säuren oder Salzlösungen löslich. In verdünnter Natronlauge (z. B. 0,5 N NaOH) lösen sich die Paramylon-Granula in Mikrofibrillen auf und verlieren ihre höhere Kristallinität (ca. 90 %) (Gottlieb 1850, Marechal & Goldemberg 1964, Kiss et al. 1988).

### 1.5.2. NUTZEN UND ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN DES PARAMYLONS

Paramylon ist der Ausgangsstoff für Biomaterialien und Biokraftstoffe (z. B. Bioethanol) (Gissibl et al. 2019, Kottuparambil et al. 2019). In den letzten Jahren haben die umweltfreundlichen Produkte an Wichtigkeit gewonnen (Khoshnava et al. 2020, Islam & Bhat 2019). Durch Paramylon ist es möglich, biologisch abbaubare Folien herzustellen. Außerdem ist Biokunststoff ein interessantes Produkt, das aus Paramylonester-Mischungen (Paramylon-Acetate-Myristat) hergestellt wird (Shibakami et al. 2014). Dieses Produkt ist ein Thermoplast und gilt als Alternative für Kunststoffe auf Erdölbasis. Eine andere Variante von Biokunststoff wurde aus Paramylon und einer langkettigen Fettsäure entwickelt, die entweder aus Wachsester aus *Euglena gracilis* oder dem Öl (Cardanol) aus Cashewnuss-Schalen gewonnen wird. Im Gegensatz zu den anderen Biokunststoffen (z. B. Polymilchsäure und Nylon 11) zeigt dieser Biokunststoff eine höhere Wärmeresistenz (AIST 2013). In Abbildung 11 sind die hergestellten Biokunststoffe aus Paramylon dargestellt:



**Abbildung 11:** Biokunststoffe aus Paramylon a) Thermoplast aus Paramylonestern (Paramylon-Acetate-Myristat) (Shibakami et al. 2014) b) Bioplastik basierend auf Paramylon und Cardanol aus Cashewnuss-Schalen oder Wachsester aus *Euglena gracilis* (AIST 2013)

Das Paramylon-Monoester Paramylon-Myristat gilt als natürlicher Klebstoff (Shibakami & Sohma 2018, Gissibl et al. 2019). In der Kosmetikindustrie wird Paramylon aufgrund seiner feinen Struktur als Füllmaterial genutzt (Suzuki et al. 2013). Neben der industriellen Nutzung hat Paramylon ein großes Potenzial, in der Medizin und Tiermedizin eingesetzt zu werden. Die  $\beta$ -1,3-Glucan-Nanofasern aus Paramylon fungieren als Arzneimittel-Abgabe-Systeme (Gissibl et al. 2019, Shibakami et al. 2013b). Paramylon hat einen cholesterinsenkenden Effekt und reduziert den Anstieg des Blutzucker- und Insulin-Spiegels nach dem Essen (Kottuparambil et al. 2019). In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass die regelmäßige Einnahme von Paramylon einen positiven Einfluss auf die Spermienqualität (z. B. Motilität, Vitalität und Akrosomenintegrität) bei männlichen Ratten hat (AK Sonat et al. 2018). Es wurde erforscht, dass Paramylon bei Mäusen antimikrobielle

Aktivität zeigt und diese Aktivität durch chemische Modifizierung mit positiv geladenen Gruppen (z. B. N, N-Dimethylaminoethyl, N, N-Diethylaminoethyl und 2-Hydroxy-3-trimethylammonioethyl) erhöht werden kann. In einer weiteren Studie wurde herausgefunden, dass die sulfatisierten Derivate von Paramylon Anti-HIV-Aktivität zeigen, indem sie die Bindung zwischen HIV und Zellen vollständig verhindern. Außerdem wirken Paramylonsulfate antithrombinaktiv, das heißt gerinnungshemmend (Sakagami et al. 1989, Barsanti et al. 2001, Koizumi et al. 1993). Paramylon gehört zu den unlöslichen Ballaststoffen, entfernt schädliche Substanzen aus dem Darm und wirkt so Darmkrebs entgegen (Watanabe et al. 2013, Okouchi et al. 2019). In Studien wurde nachgewiesen, dass die Aufnahme von Paramylon zusammen mit *Euglena gracilis* und Gemüse als Diät bei Mäusen entzündungshemmende Effekte zeigt und Fettleibigkeit (Adipositas) entgegenwirkt. Eine weitere Studie kam zu dem Ergebnis, dass Paramylon Diabetes Mellitus Typ II bei Ratten verhindert (Okouchi et al. 2019, Harada et al. 2020). Darüber hinaus dient transparenter Dünnsfilm aus Paramylon als Wundversorgungsmaterial. Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein solcher Paramylon-Filmverband die Wundheilung beschleunigt (Yasuda et al. 2018). Aufgrund seiner antioxidativen Wirkung hemmt Paramylon bei Ratten die Leberschädigung, die durch Tetrachlorkohlenstoff (CCl<sub>4</sub>) verursacht wird (Sugiyama et al. 2009). Außerdem lindert die orale Aufnahme des Paramylons die Entwicklung von Läsionen bei einer atopischen Dermatitis (Neurodermatitis oder Ekzem), die durch 2,4,6-Trinitrochlorbenzol (TNCB) hervorgerufen wird (Sugiyama et al. 2010, Lee et al. 2016). Paramylon und Mehl aus *Euglena gracilis* werden als Nahrungsergänzungsmittel aktuell in Japan und in den USA von unterschiedlichen Unternehmen hergestellt und verkauft (Barsanti & Gualtieri 2018). Durch weitere Studien mit Nutztieren (Hühner; Broiler) und Fischen (Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)), Nilbuntbarsch (*Oreochromis niloticus*) oder Roter Trommler (*Sciaenops ocellatus* L.) wurde nachgewiesen, dass Paramylon das Immunsystem anregt und vor Parasiten (z. B. *Yersinia ruckeri*) schützt (Sonck et al. 2010, Skov et al. 2012, Levine et al. 2018, Yamamoto et al. 2018 a & b).

### 1.5.3. SYNTHESE DES PARAMYLONS: PARAMYLON-SYNTHESE-KOMPLEX

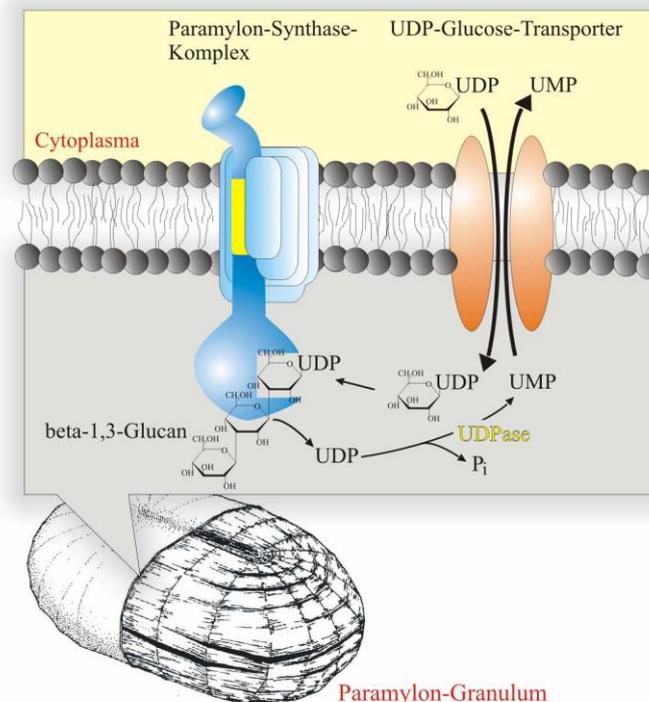
Glycosyltransferasen (GTs, EC 2.4.x.y) gehören zu einer großen Enzymgruppe, die für die Synthese von Oligosacchariden, Polysacchariden und anderen Glycanen zuständig ist (Breton et al. 2005). Diese Enzyme übertragen spezifische Zuckereinheiten oder -reste von Donormolekülen auf Akzeptormoleküle, wobei sie die Bildung einer glykosidischen Bindung katalysieren. Zu den Akzeptormolekülen gehören Proteine, Lipide und Glykogen. Glycosyltransferasen können durch unterschiedliche Eigenschaften klassifiziert werden: 1. den Nukleotidzucker-Spender (z. B. Uridindiphosphat (UDP), Guanosindiphosphat (GDP) und Cytidinmono-phosphat (CMP)), 2. die dreidimensionale Proteinstruktur, 3. die Abhängigkeit von Metallen, 4. die Präferenz in der Stereochemie (z. B. Retention oder Intervention) (Hansen et al. 2012, Ovchinnikova et al. 2016, Caoa et al. 2008, Mestrom et al. 2019, Nagare et al. 2020). Glycosyltransferasen kommen sowohl in Prokaryoten (Bakterien) als auch in Eukaryoten (Pflanzen und Tieren) vor (Breton et al. 2005, Zhou et al. 2020, Fan et al. 2017, Sánchez-Rodríguez et al. 2014). Basierend auf den Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen lassen sich Glycosyltransferasen in der Datenbank für kohlenhydrataktive Enzyme (CAZy) in 106 Familien unterteilen (Mestrom et al. 2019).

Die **Paramylon-Synthase (EC 2.4.1.34,  $\beta$ -1,3-Glycosyltransferase, UDP-Glucose:  $\beta$ -1,3-Glucan  $\beta$ -3-Glucosyltransferase)** gehört zu den Glycosyltransferasen und ist für die Herstellung des Paramylons zuständig (Marechal & Goldemberg 1964, Inwongwan et al. 2019, Bäumer et al. 2001). Dieses Enzym ist ein membrangebundener Komplex und befindet sich in der Paramylon-Membran. Der Paramylon-Synthase-Komplex ist 670 kDa groß und wird in die GT2-Familie kategorisiert. Der Komplex besteht aus 7 Proteinen, davon sind zwei (37 kDa und 54 kDa) für die Substratbindung (UDP-Glucose) zuständig (O'Neill et al. 2015, Tanaka et al. 2017). Obwohl einige Schritte der Paramylon-Synthese vollständig entschlüsselt sind, werden in der Literatur je nach Forschungsstand zwei unterschiedliche Betrachtungsweisen beschrieben. Nach dem ersten Forschungsansatz befindet sich das aktive Zentrum des Paramylon-Synthase-Komplexes direkt auf der Innenseite des Paramylons. Außerdem liegt ein UDP-Glucose-Transporter in der Paramylon-Membran, der UDP-Glucose ins Innere des Paramylons transportiert. Der Paramylon-Synthase-Komplex überträgt Glucose auf eine  $\beta$ -1,3-Glucankette.



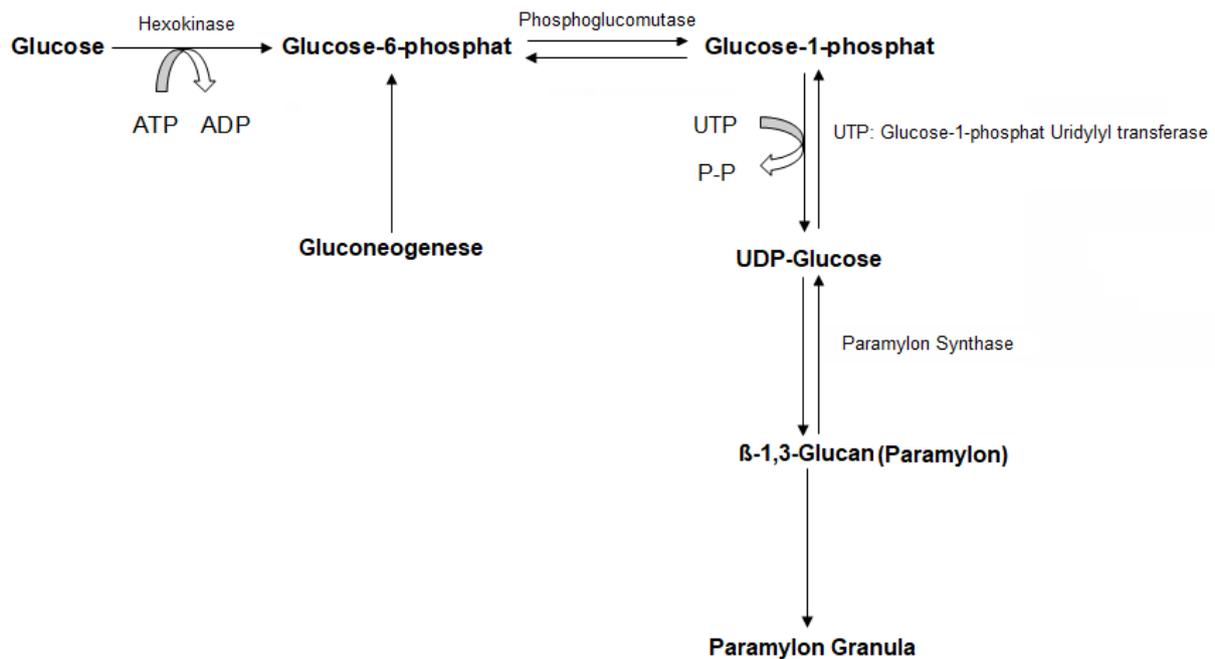
**Abbildung 12:** Paramylon-Granula aus *Euglena gracilis*; PS:mögliche Paramylon-Synthase-Komplexe (© Angelika Preisfeld)

Das freigesetzte UDP-Molekül wird durch UDPase zu UMP und Pi umgesetzt. Das UMP-Molekül wird durch den UDP-Glucose-Transporter ins Cytoplasma transportiert (Brommund 2004). In Abbildung 13 werden ein Modell des Paramylon-Synthase-Komplexes und die Paramylon-Synthese dargestellt:



**Abbildung 13:** Modell des Paramylon-Synthase-Komplexes und der Paramylon-Synthese (Brommund 2004)

Nach dem zweiten Forschungsansatz werden zuerst die exogenen Glucose-Moleküle aufgenommen. Der erste Schritt der Paramylon-Synthese ist die Phosphorylierung von Glucose unter ATP-Verbrauch durch die Hexokinase. Dabei entsteht Glucose-6-Phosphat, das auch in der Gluconeogenese synthetisiert wird. Anschließend wird durch die Phosphoglucomutase aus Glucose-6-Phosphat Glucose-1-Phosphat gebildet. Durch das Enzym UTP-Glucose-1-Phosphat-Uridyltransferase wird das Glucose-1-Phosphat unter Abspaltung von zwei Phosphaten in UDP-Glucose umgewandelt (Barras & Stone 1965). In Abbildung 14 werden die Reaktionsschritte der Paramylon Synthese dargestellt:



**Abbildung 14:** Modell der Synthese des Paramylons (veränderte Darstellung) (Barras & Stone 1965)

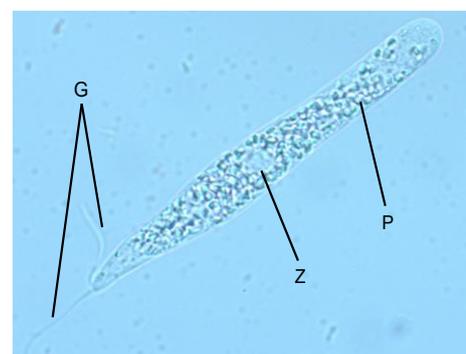
Diese Reaktionsschritte zeigen Ähnlichkeiten mit der Glycogen-Synthese. Abschließend wird durch die Wirkung der Paramylon-Synthase das unlösliche  $\beta$ -1,3-Glucan (Paramylon) aus  $\alpha$ -UDP-Glucose gebildet. Aus den Paramylon-Molekülen werden Paramylon-Granula synthetisiert.

## 1.6. ÜBERBLICK DER WEITEREN UNTERSUCHTEN ORGANISMEN

Um die Paramylon-Synthese auch phylogenetisch betrachten zu können, wird nachfolgend zusätzlich auf weitere Organismen aus unterschiedlichen Clades der Euglenida eingegangen.

### 1.6.1. *DISTIGMA PROTEUS*

Die Gattung *Distigma* von Ehrenberg 1838 wurde innerhalb der Euglenida in die Ordnung Eutreptiales hinzugefügt (Leedale 1967). Die Bezeichnung „Di-stigma (zwei Augenflecke)“ kam durch eine Verwechslung zustande. Bei seinen mikroskopischen Untersuchungen hat Ehrenberg zwei Flecken in der Nähe der Geißeln fälschlicherweise als Stigmata identifiziert, obwohl *Distigma* in Wirklichkeit keine Augenflecken besitzt



**Abbildung 15:** Lichtmikroskopische Aufnahme einer Zelle von *Distigma proteus*. **G:** Geißel, **P:** Paramylon, **Z:** Zellkern (© Onur Baltaci)

(Busse & Preisfeld 2003). In Abbildung 15 ist die mikroskopische Aufnahme von *Distigma proteus*, einem typischen Vertreter dieser Gattung dargestellt. *Distigma proteus* ist farblos und besitzt keine Plastiden (Yamaguchi & Anderson 1994, Busse & Preisfeld 2003). Die Zellkörper sind länglich und spindelförmig bis zylindrisch. Dabei ist der vordere Teil der Zelle verbreitert und der hintere schmal. *Distigma proteus* weist eine Körperlänge von 40 - 120  $\mu\text{m}$  und eine Körperbreite von 5 - 20  $\mu\text{m}$  auf. Die Zellen besitzen zwei Geißeln, wobei eine Geißel weniger als die Hälfte der Länge der anderen Geißel hat. Die längere Geißel wird als Hauptgeißel bezeichnet und ist halb so lang wie der Zellkörper. *Distigma proteus* ist primär osmotroph und besitzt oval-förmige Paramylon-Granula (Pringsheim 1942, Prokina 2019, Yamaguchi & Anderson 1994, Busse & Preisfeld 2003, Preisfeld et al. 2000 & 2001, Dawson & Walne 1994). Der typische Lebensraum von *Distigma proteus* sind Sümpfe, Torfmoore, bewachsene Teiche und Gräben. Außerdem kommt *Distigma proteus* auch in extremen Habitaten wie industriellem Abwasser oder Absetzbecken für radioaktive Abfälle vor (Wolowski 1998, Rehman et al. 2007).

### 1.6.2. KHAWKINEA QUARTANA

*Khawkinea quartana* (Jahn & McKibben 1937) besitzt ein orangefarbiges Stigma und oval-förmige Paramylon-Granula. Die Zellen weisen durch den Verlust der Chloroplasten eine sekundär osmotrophische Ernährungsweise auf (Preisfeld et al. 2000, Dawson & Walne 1994). Die Zellen sind eiförmig, manchmal zylindrisch. Das hintere Ende der Zelle ist schmaler als das vordere. Das vordere Ende der Zelle ist abgerundet, konisch. Die Geißel ist etwas länger als die Zelle (s. Abb. 16). Der Zellkörper weist eine Länge von 62 - 70  $\mu\text{m}$  und eine Breite von ca. 17  $\mu\text{m}$  auf. Die typischen Lebensräume von *Khawkinea quartana* sind stehendes Wasser, Sümpfe, kleine Quellen, Reisfelder, Kläranlagen (Wolowski 1998, Kumawat et al. 2019).



**Abbildung 16:** Lichtmikroskopische Aufnahme einer Zelle von *Khawkinea quartana*. **G:** Geißel, **P:** Paramylon, **S:** Stigma (© Onur Baltaci)

### 1.6.3. *PERANEMA SP.*

Die Gattung *Peranema* wurde von Félix Dujardin 1842 begründet. Dujardin identifizierte die Vertreter dieser Gattung als Flagellaten und nannte sie wegen des birnenförmigen Körpers *Pyronema*. Da dieser Name längst für eine Pilzgattung angewendet wurde, bildete er *Peranema* aus dem Griechischen πέρα (Lederbörse oder Sack) und νήμα (Faden). *Peranema* gehört innerhalb der Ordnung der Euglenida zu den Heteronematales. Die Vertreter der Gattung *Peranema* sind farblos und besitzen kein Stigma sowie einen Ingestionsapparat. Die Zellen haben zwei Geißeln, welche unterschiedlich lang sind. Die kürzere Geißel ist nur selten unter dem Lichtmikroskop sichtbar (s. Abb 17). Die typischen Lebensräume sind Teiche, Gräben und Sümpfe (Triemer 1997, Leedale 1967, Dujardin 1841).



**Abbildung 17:** Lichtmikroskopische Aufnahme einer Zelle von *Peranema sp.*  
**G:** Geißel, **P:** Paramylon, **Z:** Zellkern  
 (© Onur Baltaci)

## 1.7. ZIELE DER ARBEIT

Paramylon ( $\beta$ -1,3-Glucan) ist ein Reservekohlenhydrat, das bei den meisten Vertretern der Euglenida synthetisiert wird (Leedale 1967). Seit einigen Jahren erregt Paramylon aufgrund seiner besonderen und umweltfreundlichen Eigenschaften in der Industrie und dem medizinisch-pharmazeutischen Bereich Aufmerksamkeit.

Der Paramylon-Synthase-Komplex ist für die Herstellung des Paramylons zuständig. In den letzten Jahren ist es mehreren Forschern gelungen, diesen Enzymkomplex aus heterotroph angezogenen *Euglena gracilis*-Zellen zu isolieren und teilweise zu charakterisieren (Bäumer et al. 2001, Brommund 2004). Obwohl die Eigenschaften und die Lokalisation des Komplexes identifiziert wurden, ist immer noch ungeklärt, wie die Entwicklung der Paramylon-Synthese innerhalb der Euglenida abgelaufen ist, wie der Enzymkomplex aus den Glucose-Molekülen Paramylon herstellt und wie die Untereinheiten in dem Enzymkomplex positioniert sind. Diese fehlenden Erkenntnisse führen zu den folgenden Zielen:

- Etablierung der Anzuchtbedingungen der unterschiedlichen Euglenida im großen Maßstab
- Isolierung und Aufreinigung des Paramylon-Synthase-Komplexes aus den untersuchten Arten der Euglenida
- Charakterisierung des Enzymkomplexes im Hinblick auf das Molekulargewicht und die Aktivität durch die Messung der UDP-Glucosyltransferase-Aktivität
- Untersuchung des Enzymprodukts Paramylon durch chromatographische Methoden
- Identifizierung und Vergleich der Gensequenz des Paramylon-Synthase-Komplexes in den untersuchten Euglenida
- Vergleich der Genexpressionsniveaus der Paramylon-Synthase aus *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* mittels Transkriptomanalyse
- Quantifizierung der Transkripte in *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* mittels qPCR

## 2. MATERIAL & METHODEN

### 2.1. MATERIAL

#### 2.1.1. GERÄTE

In Tabelle 2 sind die für die Experimente verwendeten Geräte aufgelistet.

**Tabelle 2:** Verwendete Geräte

| <b>MIKROSKOPE</b>                                     | <b>HERSTELLER</b>        |
|---|--------------------------|
| Klinik- und Labormikroskop (ECLIPSE Ci)               | NIKON                    |
| Mikroskop Axio Imager.A2                              | ZEISS                    |
| <b>PCR-GERÄTE</b>                                     |                          |
| Mastercycler® Nexus Gradient                          | EPPENDORF                |
| Mastercycler® personal                                |                          |
| <b>GEL-DOKUMENTATIONS-ANLAGE</b>                      |                          |
| INTAS® Duo-Store Gel-Dokumentationsanlage             | INTAS                    |
| Digital Monochrome Printer Model P 930DW              | MITSUBISHI ELECTRIC SDN. |
| UPP-110HA Superior Density Printing Paper             | SONY                     |
| <b>NETZGERÄTE</b>                                     |                          |
| Electrophoresis Power Supply EV231                    | CONSORT BVBA             |
| <b>POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE SYSTEME</b>        |                          |
| Mini Protein II Elektrophoresekammer mit Gelgießstand | BIORAD                   |
| Multigel-Long Elektrophoresekammer mit Zubehör        | BIOMETRA                 |
| <b>AGAROSE-GELELEKTROPHORESE-SYSTEME</b>              |                          |
| BlueMarine™ 100 Gelkammer; Maße ca. 7×10 cm           | SERVA                    |
| Gelschlitten; Maße ca. 7×10 cm                        |                          |
| Gelkämme 1,5 mm, 12 Auftragstaschen                   |                          |
| Gelkämme 2 mm, 8 Auftragstaschen                      |                          |
| <b>ZENTRIFUGEN</b>                                    |                          |
| Centrifuge 5424 (Rotor F45-24-11)                     | EPPENDORF                |
| Centrifuge 5804 (Swing-bucket-rotor A-4-44)           |                          |
| Centrifuge 5804 R (Rotor F45-30-11)                   |                          |
| Centrifuge 5415 D (Rotor F45-24-11)                   |                          |
| Concentrator 5301 (Speedvac)                          |                          |
| Mini centrifuge MCF-2360                              | LMS                      |
| Mini Plate Spinner MPS1000                            |                          |
| Highspeed Zentrifuge 3 - 30 KS (Winkelrotor 12150)    | SIGMA                    |

| <b>WAAGEN</b>   |                                |
|---|--------------------------------|
| Analysenwaage CP124S                                    | SARTORIUS                      |
| Präzisionswaage Vicon                                   |                                |
| Laborwaage 440-49N                                      | KERN & SOHN GmbH               |
| <b>SONSTIGES</b>  |                                |
| Autoklav Systec VX-120                                  | SYSTEC GmbH                    |
| Thermomixer TS1   | ANALYTIK JENA AG               |
| Thermoblock TB2   |                                |
| MINI-Se-Geltrocknungsrahmen                             | CARL ROTH GmbH                 |
| Thermoshaker  | BIOMETRA                       |
| Vortex-Schüttler VV3                                    | VWR                            |
| HI 223 Calibration Check pH Meter                       | HANNA                          |
| Rührwerk (RZR 0/4 w 50/10)                              | HEIDOLPH                       |
| Innova <sup>®</sup> 44 Incubator Shaker Series          | NEW BRUNSWICK<br>SCIENTIFIC    |
| Sicherheitswerkbank MSC-ADVANTAGE                       | FISHER SCIENTIFIC GmbH         |
| Trockenschrank UNB500                                   | MEMMERT GmbH                   |
| Pierce <sup>™</sup> Proteinkonzentrator                 | THERMO SCIENTIFIC              |
| Trockenschrank FD 115                                   | BINDER                         |
| Sterilisator Ofen T 5042                                | HERAEUS                        |
| Magnetrührer MR Hei-Standard                            | HEIDOLP INSTRUMENTS            |
| Magnetrührer bioMIX1                                    | 2MAG AG                        |
| French Pressure Cell Press                              | AMERICAN INSTRUMENT<br>COMPANY |
| Mikropipetten (0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl) | SOCOREX ISBA S.A               |
| Mikropipette (1 - 5 ml)                                 | VWR                            |
| Simultan-Trennkammer (Synchronkammer)                   | NEUBERT- GLAS                  |
| Macro-Pipettierhelfer                                   | BRAND GmbH                     |
| Multi-Zerkleinerer                                      | TECTRO                         |
| Kochplatten   | SEVERIN                        |
| Kochtöpfe   | GSW                            |
| Nalgene <sup>™</sup> Färbekammern                       | THERMO FISCHER                 |
| Mikroplatten-Reader Infinite Plex                       | TECAN                          |
| Underwater Chlorophyll Fluorometer (DIVING-PAM)         | WALZ                           |
| Handzähler  | EDI-TRONIC                     |

## 2.1.2. VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 3 listet die Verbrauchsmaterialien auf, die in den Experimenten verwendet wurden.

**Tabelle 3:** Verbrauchsmaterialien

| <b>NAME</b>                                | <b>HERSTELLER</b>    |
|--|----------------------|
| Fuchs-Rosenthal-Zählkammer                 | ASSISTENT            |
| Deckgläser                                 | PAUL MARIENFELD GmbH |
| Objektträger                               | CARL-ROTH GmbH       |
| Serologische Pipetten, 10 ml, 25 ml, 50 ml | SARSTEDT             |
| Einmal-Pasteurpipetten                     | SARSTEDT             |
| Küvetten (ZH und PS)                       | SARSTEDT             |
| Pipettenspitzen                            | SARSTEDT             |
| Falcon-Tubes, 15 + 50 ml                   | SARSTEDT             |
| Mikroreaktionsgefäße (0,2, 0,5, 1,5, 2 ml) | EPPENDORF / SARSTEDT |
| Parafilm® M                                | SIGMA-ALDRICH        |
| DC-Platten                                 | MERCK                |
| Cellophanfolien (24x24 cm)                 | CARL-ROTH GmbH       |
| Kapillarpipetten                           | HIRSCHMANN           |
| Pumpzerstäuber                             | ROTERT               |
| 96-Well Mikroplatten (3912)                | CORNIN®              |
| Cellophanfolien                            | ROTH                 |
| Autoklavierbare Beutel                     | ROTH                 |
| Alufolie                                   | ROTH                 |
| Gefäße für qPCR (100 µl)                   | SARSTEDT             |

### 2.1.3. CHEMIKALIEN

In Tabelle 4 sind die in den verschiedenen Experimenten verwendeten Chemikalien angegeben.

**Tabelle 4:** Verwendete Chemikalien

| CHEMIEKALIE                          | HERSTELLER        |
|--------------------------------------|-------------------|
| Ammoniummolybdat Tetrahydrat         | ROTH              |
| Ammoniumeisen (II)-Sulfat-Hexahydrat | ROTH              |
| Ammoniumperoxodisulfat               | ROTH              |
| ATP-freies Wasser                    | BIO-THEMA         |
| Aceton                               | ROTH              |
| Acrylamid (29:1)                     | SERVA             |
| Anilinphthalat                       | ROTH              |
| Agarose (0,05 - 50 kbp)              | BIO-BUDGET        |
| $\alpha$ -D(+)-Glucose Monohydrat    | ROTH              |
| 5x Bradford Reagenz                  | SERVA             |
| Borsäure                             | ROTH              |
| Bromphenol Blue                      | MERCK             |
| Beta( $\beta$ )-Mercaptoethanol      | ROTH              |
| Calciumchlorid Monohydrat            | ROTH              |
| Cobalt(II)-Nitrat Hexahydrat         | MERCK             |
| Calciumcarbonat                      | ROTH              |
| CHAPS                                | ROTH              |
| Diammoniumhydrogenphosphat           | ROTH              |
| D, L-Äpfelsäure                      | ROTH              |
| D, L-Asparaginsäure                  | ROTH              |
| D(+)-Saccharose                      | ROTH              |
| Dithiothreitol                       | ROTH              |
| DNA <i>Stain Clear G</i>             | SERVA             |
| DTT                                  | ROTH              |
| DNA Green Puffer                     | BIOTECHRABBIT     |
| 6x DNA Loading Dye                   | THERMO SCIENTIFIC |
| 6x RNA Loading Dye                   | THERMO SCIENTIFIC |
| EDTA Dinatriumsalz Dihydrat          | MERCK             |
| EDTA Eisen(III)-Mononatriumsalz      | MERCK             |
| EDTA                                 | MERCK             |

|                                |               |
|--------------------------------|---------------|
| Ethanol                        | ROTH          |
| Essigsäure                     | ROTH          |
| Folin-Ciocalteus Phenolreagenz | SIGMA-ALDRICH |
| Formaldehyd                    | ROTH          |
| Glycin                         | ROTH          |
| Glycerin                       | ROTH          |
| Harnstoff                      | ROTH          |
| Kupfersulfat Pentahydrat       | ROTH          |
| Kupfer(II)-Sulfat Pentahydrat  | ROTH          |
| Kobalt (II)-Sulfat Heptahydrat | ROTH          |
| Kaliumdihydrogenphosphat       | ROTH          |
| Kaliumnatriumtartrat           | ROTH          |
| Kaliumchlorid                  | ROTH          |
| L-Glutaminsäure                | ROTH          |
| Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat | ROTH          |
| Manganchlorid Tetrahydrat      | ROTH          |
| Magnesiumcarbonat              | ROTH          |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat    | ROTH          |
| Mangan(II)-Sulfat Monohydrat   | ROTH          |
| Methanol                       | ROTH          |
| MES                            | ROTH          |
| Natriumcitrat Dihydrat         | ROTH          |
| Natriummolybdat Dihydrat       | ROTH          |
| Natriumsuccinat Hexahydrat     | ROTH          |
| Natriumnitrat Tetrahydrat      | ROTH          |
| Natriumcarbonat                | ROTH          |
| Natriumhydroxid                | ROTH          |
| Natrium-Thiosulfat             | ROTH          |
| Orcinol                        | SIGMA-ALDRICH |
| Pefabloc® SC                   | ROTH          |
| Rinderserumalbumin             | BIOMOL        |
| Natriumdodecylsulfat           | ROTH          |
| Silbernitrat                   | ROTH          |
| Salzsäure                      | ROTH          |
| Tris                           | ROTH          |
| Tetramethylethylendiamin       | ROTH          |

|                         |            |
|-------------------------|------------|
| Tris-HCl                | ROTH       |
| UltraPure™ Agarose      | INVITROGEN |
| UDP                     | PROMEGA    |
| UDP-Glucose             | PROMEGA    |
| Vitamin B <sub>12</sub> | ROTH       |
| Vitamin B <sub>1</sub>  | ROTH       |
| Zinksulfat-Heptahydrat  | ROTH       |

#### 2.1.4. KITS

In Tabelle 5 sind die in den verschiedenen Experimenten verwendeten Kits angegeben.

**Tabelle 5:** Verwendete Kits

| REAGENZIENTKIT                     | HERSTELLER              |
|------------------------------------|-------------------------|
| My-Budget Plant DNA Kit            | BIO-BUDGET TECHNOLOGIES |
| My-Budget Plant RNA Kit            |                         |
| Monarch® PCR&DNA Cleanup Kit       | NEW ENGLAND BIOLABS     |
| Monarch® DNA Gel Extraction Kit    |                         |
| LunaScript™ RT Super Mix Kit       |                         |
| UDP-Glo™ Glucosyltransferase Assay | PROMEGA                 |

#### 2.1.5. ENZYME

Die verwendeten Enzyme sind in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 6:** Verwendete Enzyme

| ENZYM                  | HERKUNFT                             | HERSTELLER |
|------------------------|--------------------------------------|------------|
| α-Amylase              | <i>Aspergillus oryzae</i>            | SIGMA      |
| β-Amylase              | <i>Hordeum vulgare</i>               |            |
| β-1,3-D-Glucanase      | <i>Helix pomatia</i>                 |            |
| endo-1,4-β-D-Glucanase | <i>Acidothermus cellululolyticus</i> |            |

### 2.1.6. LÄNGENSTANDARDS

In Tabelle 7 sind die in den Experimenten verwendeten Längenstandards angegeben.

**Tabelle 7:** Verwendete Längenstandards

| STANDARD   | VERWENDUNG   | HERSTELLER                |
|--|--------------|---------------------------|
| HMW-Marker (66 - 669 kDa)                        | Native PAGE  | GE HEALTHCARE             |
| Prestained Protein Standard (10 - 250 kDa)       | SDS PAGE     | NEW ENGLAND BIOLABS       |
| Dual Color Protein Standard III (7 - 240 kDa)    | SDS-PAGE     | SERVA                     |
| GeneRuler™ DNA Ladder Mix<br>(10 - 10.000 bp)    | Agarose-Gele | THERMO FISHER SCIENTIFIC™ |
| GeneRuler™ Low Range DNA Ladder<br>(25 - 700 bp) | Agarose-Gele | THERMO FISHER SCIENTIFIC™ |

### 2.1.7. OLINUKLEOTID-PRIMER

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer werden in Tabelle 8 aufgelistet.

**Tabelle 8:** Verwendete Primer

| BEZEICHNUNG         | NT | T <sub>M</sub> [°C] | SEQUENZ [5' → 3']          |
|---------------------|----|---------------------|----------------------------|
| PYint5For           | 23 | 60,6                | GGCTGAAAAAAGACATGCAACGG    |
| PYint3Rev           | 23 | 66,0                | GTGCACACTTCCGAACGTCCCGA    |
| PYint5.1For         | 26 | 64,8                | CTGGCTGAAAAAAGACATGCAACGGC |
| PYint3Rev           | 23 | 66,0                | GTGCACACTTCCGAACGTCCCGA    |
| EggracilisGLS2for   | 20 | 59,0                | CATTCAGGTCAGCAAGGACG       |
| EggracilisGLS2rev   | 19 | 59,0                | GCCATTGGTCCGAGCATGA        |
| EggracilisGLS2.1for | 20 | 59,0                | GACATCTACACCACGTACGC       |
| EggracilisGLS2.1rev | 21 | 58,0                | AGTGGCACATACAGCTTCATG      |
| ParsA1.1For         | 22 | 59,9                | ATCTGGCAGTACCTCTCCTCTG     |
| ParsA1.1Rev         | 22 | 59,9                | CGCGAAGTTGATACTGTTCTTG     |
| ParsA1.5For         | 22 | 60,2                | GTACTACTCCGAGGGCATGAAG     |
| ParsA1.5Rev         | 22 | 60,6                | CGGTACGTAAAGATGTGCTCCT     |
| ParsA2.1For         | 22 | 60,0                | CAACTCCAAACCTGACATTTGA     |
| ParsA2.1Rev         | 22 | 60,0                | TTGATGGTGCCTGAATACTGTC     |
| ParsA2.3For         | 22 | 60,0                | GACAGTATTCAGGCACCATCAA     |
| ParsA2.3Rev         | 22 | 60,1                | AGGGTGACCTTCTGTGCTATGT     |
| MISS1for            | 20 | 59,4                | TCAGCAGCTCACTGGTATCC       |
| MISS1rev            | 19 | 58,8                | GAGGTGTAGGCGGTGTTCA        |

|                 |    |      |                         |
|-----------------|----|------|-------------------------|
| MISS2for        | 18 | 60,6 | CGCTCGACCAGCTACCAC      |
| MISS2rev        | 19 | 59,7 | GAGGTGTAGGCGGTGTTCA     |
| Bst for         | 20 | 60,6 | CTGCCCTCCTTCACCTACT     |
| Bst rev         | 20 | 59,9 | CAGAGCGATCACTGGGTACA    |
| Pars1400For     | 20 | 61   | CAACTACGCTGCGCACGATG    |
| Pars1400Rev     | 22 | 60   | AGTTGTTGGCGTCGATGTGCGAA |
| ParsD1400For    | 20 | 59   | ATGTGGGCCATCTCCAACGA    |
| ParsD1400Rev    | 21 | 60   | ACCGAACAACTCCTCGTTGAG   |
| ParsD2For       | 20 | 61,4 | GCGGACGTGGACGACATCTT    |
| ParsD2Rev       | 22 | 60,3 | GTAGGTCTTCTCGTAGATGGAC  |
| ParsD3For       | 22 | 60,3 | GAACAGTATCAACTTCGCGGAC  |
| ParsD3Rev       | 22 | 60,3 | TAGGTCTTCTCGTAGATGGACG  |
| ParsD4For       | 20 | 61,4 | GAGGAGCACTCTGACCTGGT    |
| ParsD4Rev       | 20 | 61,4 | CAGCCACGCCAGGATGTCAT    |
| ParsD5For       | 20 | 61,4 | CAAGGTGCTGGAGGAGCACT    |
| ParsD5Rev       | 21 | 59,8 | CAGGATGTCATCGTAGGTGCT   |
| Pars2500For     | 21 | 60   | GCACCAGTACAAGGACGTCTT   |
| Pars2500Rev     | 21 | 60   | ATGTAGCACTGCGCGATGAAC   |
| Pars_2.361For   | 22 | 58,4 | TGGAACAACAACCTCTCAACCAC |
| Pars_2.361Rev   | 23 | 58,9 | ACATCAATCATCAAGTTGGCGAG |
| Pars_2.3541For  | 21 | 59,8 | TCCTGCAGATCAAGCTGCAGT   |
| Pars_2.3541Rev  | 21 | 59,8 | GGAGTACTTGATGCCGTTCTC   |
| Pars_2.4801For  | 20 | 61,4 | CACGCCGACTCCGTCATCAA    |
| Pars_2.4801Rev  | 20 | 61,4 | ATATGGCTGGCGTGGGACAG    |
| Pars_2.6109For  | 22 | 60,2 | AATCCATCCTTGGGTTCTCTGTC |
| Pars_2.6109Rev  | 22 | 58,4 | AGTGGCACATACAGCTTCATGA  |
| Pars_2.1218 For | 22 | 58,4 | ATCCAACCGAAACTGGCCTATT  |
| Pars_2.1218 Rev | 22 | 60,2 | GAACTTGCTTCTTTCCCGTCAC  |
| Pars_2.2271For  | 22 | 60,2 | TTCACCTGGATTGATCCCAAGG  |
| Pars_2.2271Rev  | 22 | 60,2 | TCTGGCTTCTTCTCCTCCACTA  |
| ParsD2200For    | 19 | 61   | AGTGCCAGGTGCGGTTCTT     |
| ParsD2200Rev    | 21 | 62   | TTGACTCCTTGGGCTCTGCTG   |
| Pars3770For     | 21 | 60   | AGACGCTGCGCATCATTTGGA   |
| Pars3770Rev     | 20 | 59   | TTGCACTTGCAGAGCTCCGT    |
| Pars5821For     | 23 | 60,7 | TGGTCAACATCCTGGACATGAAC |
| Pars5821Rev     | 20 | 61,4 | CACCGAGTGCCGGTACGTAA    |

|                |    |      |                        |
|----------------|----|------|------------------------|
| Pars5881For    | 21 | 59,8 | CATGAAGCTGCAGCTCATCCT  |
| Pars5881Rev    | 20 | 61,4 | CACCGAGTGCCGGTACGTAA   |
| Pars6121For    | 20 | 59,4 | ACCACATCCGCATGCACTAC   |
| Pars6121Rev    | 20 | 61,4 | AACACGGACGCGGGCGTTGAA  |
| Pars6121.1For  | 20 | 59,4 | ACCACATCCGCATGCACTAC   |
| Pars6121.1Rev  | 22 | 60,3 | CGTAGAAGAACGACTCGCTGAA |
| Pars6421For    | 20 | 61,4 | TGTGCGACCTGTACCTGACG   |
| Pars6421Rev    | 20 | 61,4 | ATGCCTCGCTCCAGCAGCAT   |
| ParsD3200For   | 21 | 60   | TCCACGGACATGTGCTGATGT  |
| ParsD3200Rev   | 19 | 61   | AGCACCTGCTCCGAGACGA    |
| Pars2_3060For  | 21 | 60   | CAGCTCGTTCTTCTGTTGGCA  |
| Pars2_3060Rev  | 22 | 60   | CCAGTTGTGCATCAGGAAGTTC |
| Pars2_2720For  | 19 | 61   | TGCCACTGGCGGCTGTTCA    |
| Pars2_2720Rev  | 19 | 61   | TTCACGTAGCCGACGCGGT    |
| Pars2_1888For  | 22 | 58   | GACAGTATTCAGGCACCATCAA |
| Pars2_1888Rev  | 22 | 57   | TAGCAGAAAATCACTCGGAACA |
| Pars2_598For   | 22 | 55   | CATTTGGACCTCAAATGAATGA |
| Pars2_598Rev   | 22 | 57   | TATGTTTGGAAAGCCCAGAAGT |
| Pars5821qFor   | 21 | 59,8 | ATGAAGCTGCAGCTCATCCTG  |
| Pars5821qRev   | 20 | 59,4 | TGCTCCTTGAAGCCCAGGAT   |
| Pars5821qFor   | 21 | 59,8 | ATGAAGCTGCAGCTCATCCTG  |
| Pars5821.1qRev | 20 | 61,4 | GTGCTCCTTGAAGCCCAGGA   |
| Pars5872For    | 22 | 62   | GTACTACTCCGAGGGCATGAAG |
| Pars5872Rev    | 22 | 60   | CGGTACGTAAAGATGTGCTCCT |
| Pars6481For    | 20 | 61,4 | CATCCTGTACGTCAGCGACC   |
| Pars6481Rev    | 20 | 59,4 | AAGACGATGTCCGTGACGGA   |
| Pars6481.1For  | 22 | 60,3 | TGCTGCTGCTCGTCATCATCTA |
| Pars6481.1Rev  | 22 | 60,3 | ATGATGCGGTAGTCTTCCACGT |
| Pars6721For    | 20 | 61,4 | CTCGCGCTGCAGACCAAGAA   |
| Pars6721Rev    | 22 | 60,3 | TGATGTACGAGATGGCAGCGAT |
| Pars7021For    | 20 | 61,4 | CTGCAGACGTACCTCGTGAC   |
| Pars7021Rev    | 20 | 59,4 | GTGCAGTACTTCGCCAGGAA   |
| Pars7081For    | 20 | 59,4 | AAGATCTTCCGGCAGGCGAA   |
| Pars7081Rev    | 20 | 59,4 | CGTCCACCTGCTCATAATCC   |
| Pars7501For    | 20 | 59,4 | ACTACAAGTGGGACATCCGC   |
| Pars7501Rev    | 21 | 59,8 | AGCATCAGCCGGTAGAACAGT  |

|               |    |       |                         |
|---------------|----|-------|-------------------------|
| Pars7561For   | 20 | 61,4  | CGCGGTGGTGTACCTGTTCT    |
| Pars7561Rev   | 22 | 60,2  | TCGAACAGCACCATGAGGAACA  |
| Pars7801For   | 21 | 59,8  | GTACGTCATCGTCTTCCTCCT   |
| Pars7801Rev   | 20 | 61,4  | CAAGGTGCAGCAAGAGCAGC    |
| Pars7921For   | 21 | 59,8  | ACGCTTCATCAACCGCTCGTT   |
| Pars7921Rev   | 20 | 59,4  | TGCCTGGCAGATGGGTTACT    |
| Pars8041For   | 20 | 59,4  | TTCCTGGTCTCCTTGCACAC    |
| Pars8041Rev   | 21 | 58,4  | AATGGACAGAATGGTGCGTGTA  |
| Pars8042For   | 20 | 59,4  | TACGTGTCTTCTGTGGTCGC    |
| Pars8042Rev   | 21 | 59,8  | AGCAAACAAACGCAGTTCGGC   |
| Pars8161For   | 21 | 59,8  | CTGCGTAGCTTCAAATGCCG    |
| Pars8161Rev   | 20 | 59,4  | TTGCTTCCACCAGGTTGGCA    |
| Pars8161For   | 21 | 59,8  | CTGCGTAGCTTCAAATGCCG    |
| Pars8161Rev1  | 21 | 59,8  | AGACGACAGGCAACAACGTAG   |
| Pars8341For   | 21 | 59,8  | CTACGTTGTTGCCTGTCGTCT   |
| Pars8341Rev   | 23 | 58,9  | GGAGATATGCGGTGAACATACAA |
| Pars8341For   | 21 | 59,8  | CTACGTTGTTGCCTGTCGTCT   |
| Pars8341Rev1  | 23 | 60,6  | AAAGCAAACAAACGCAGTTCGGC |
| Pars8461For   | 20 | 59,4  | AAGCGGTTCCAAGGTGTGCT    |
| Pars8461Rev   | 20 | 61,4  | GCGAAGCAGTGCGATGGGTT    |
| Pars8462For   | 22 | 58,4  | CAGAGTTGGCATCGAGTTTCAA  |
| Pars8462Rev   | 20 | 61,4  | GCGAAGCAGTGCGATGGGTT    |
| Pars8761For   | 20 | 61,4  | GCAGCGCCGGAAAAGGAAGT    |
| Pars8761Rev   | 20 | 61,4  | CTGCGTCAGGAATGGCCTGA    |
| Pars8761For   | 20 | 61,4  | GCAGCGCCGGAAAAGGAAGT    |
| Pars8761.1Rev | 22 | 60,2  | CATGGGTTCCGGATGGAAAGACA |
| ParaDVD1For   | 20 | 59,35 | CAGTACCTCTCCTCTGCGTT    |
| ParaDVD1Rev   | 22 | 58,39 | CCGCGAAGTTGATACTGTTCTT  |
| ParaDVD1.2For | 20 | 59,35 | ATCTGGCAGTACCTCTCCTC    |
| ParaDVD1Rev   | 22 | 58,39 | CCGCGAAGTTGATACTGTTCTT  |
| ParaDVD2For   | 21 | 59,82 | CATCTTCGCTTCCGGTACTTC   |
| ParaDVD2Rev   | 20 | 59,35 | ATCTCCATCAGCCCGTACAC    |
| ParsGSL1For   | 20 | 61,4  | GACGCTGCAGATCCACCTGA    |
| ParsGSL1Rev   | 20 | 59,4  | CAGGAACAGCACCGTGTACA    |
| ParsGSL1.1For | 20 | 61,4  | CAACACCAAGTCCGTGGTGG    |
| ParsGSL1.1Rev | 20 | 59,4  | ACCGTGTACACCACGTAGGT    |

|                 |    |       |                          |
|-----------------|----|-------|--------------------------|
| ParsGSL1.2For   | 20 | 59,4  | CCTTCCTGCACCAGTACAAG     |
| ParsGSL1.2Rev   | 21 | 59,8  | GCCAGATGCGCTTCTTGAAGT    |
| ParsGSL2For     | 20 | 61,4  | CTGGGCAAGCTGTTCCCTCAC    |
| ParsGSL2Rev     | 20 | 61,4  | GTCGCTGACCAGGTCAGAGT     |
| ParsGSL2.1For   | 22 | 60,2  | CGACTACAAGATGCATCTTCGC   |
| ParsGSL2.1Rev   | 20 | 59,4  | ATCTCCATCAGCCCGTACAC     |
| ParsGSL2.2For   | 20 | 59,4  | ACAACCTGAAGGCGGACAAC     |
| ParsGSL2.2.1For | 20 | 61,4  | AACACGCTGGACCACCTCAC     |
| ParsGSL2.2For   | 20 | 59,4  | ACAACCTGAAGGCGGACAAC     |
| ParsGSL2.2Rev   | 20 | 61,4  | TTCAGCTCCAGGAACGCCAG     |
| DVD1.1For       | 18 | 60,52 | GGCGATTCCCACGCCTGT       |
| DVD2.1Rev       | 21 | 58,39 | AAGAACAGTATCAACTTCGCGC   |
| DVD1.2For       | 18 | 58,24 | GTGTTCCGGCGATTCCCA       |
| DVD2.2Rev       | 23 | 58,37 | CAAGAACAGTATCAACTTCGCAG  |
| DVD1.3For       | 18 | 60,52 | GGTTCCGGCGATTCCCAC       |
| DVD2.3Rev       | 20 | 59,35 | CTGACGCTGGTGGACAAGAA     |
| DVD1.4For       | 18 | 60,52 | GCGATTCCCACGCCTGGT       |
| DVD2.1Rev       | 21 | 58,39 | AAGAACAGTATCAACTTCGCGC   |
| MissEgFor       | 20 | 59,35 | GGATACCAGTGAGCTGCTGA     |
| MissEgRev       | 19 | 58,82 | TGAACACCGCCTACACCTC      |
| DVDDisfor       | 24 | 61,01 | TGCACCAGTACAAGGACGTCTTAA |
| DVDDisrev       | 22 | 58,39 | AGTTGATTACGCTGCTTCGTCT   |
| GSEg1For        | 18 | 60,52 | CTGAGGCTCCAAGGCCGA       |
| GSEg5Rev        | 19 | 60,99 | AGGAACCGCACCTGGCACT      |
| GSHEgFor        | 21 | 59,82 | GAAGACCATGACAACCGCGAA    |
| GSHEg5Rev       | 21 | 59,82 | GTTGCTGGTGTAGTCCGTGAA    |
| GSHEgFor        | 21 | 59,80 | TTCGCGGTTGTCATGGTCTTC    |
| GSHEgRev        | 22 | 60,3  | GAGTAGTCGCTGCTGAAGTACT   |
| GSHEg1For       | 21 | 61,8  | AGGATCAGGACGATCCGTCCA    |
| GSHEg1Rev       | 20 | 61,4  | GCGGCTGAAGAAGGAGGACT     |
| GSHEg2For       | 20 | 59,4  | TCGTGTTGCGGTTGTCATG      |
| GSHEg2Rev       | 22 | 60,3  | TGAAGAAGGAGGACTCCGAGTA   |
| GSHEg3For       | 20 | 59,4  | AAGCAACTCTACGTGGACGG     |
| GSHEg3Rev       | 23 | 60,7  | ATGGTGTGAACTCTTGCTGAG    |
| GSHEg4For       | 19 | 61    | CTTCCTCGACCTGTGCCAC      |
| GSHEg4Rev       | 21 | 59,8  | CGCTCGATGATCTGGAAGAAG    |

|             |    |      |                          |
|-------------|----|------|--------------------------|
| GSHEg5For   | 20 | 59,4 | AAGGACACCATCGCCGATGT     |
| GSHEg5Rev   | 20 | 59,4 | TCCTCGTCGTTCCGAATCTG     |
| GSHEg6For   | 20 | 61,4 | ATGTGGAGACCGACTTCCGC     |
| GSHEg6Rev   | 20 | 61,4 | ATCTGCTGCAGCAGGTCCGT     |
| GSHEg7For   | 21 | 59,8 | CTTCTTCCAGATCATCGAGCG    |
| GSHEg7Rev   | 21 | 59,8 | GTTGCTGGTGTAGTCCGTGAA    |
| GSEg1For    | 21 | 59,8 | AACGAGGAGTTGTTCCGGTCTG   |
| GSEg1Rev    | 21 | 59,8 | TCTTCGAAGCTGGTGAAGGTG    |
| GSEg2For    | 20 | 61,4 | AGCCTCAGATGCGGCCAACA     |
| GSEg2Rev    | 20 | 61,4 | TCGTGCCTCCGTTCTTGCGA     |
| GSEg3For    | 20 | 61,4 | TCGGCCTTGGAGCCTCAGAT     |
| GSEg3Rev    | 19 | 61   | GTGCCTCCGTTCTTGCGAG      |
| GSEg4For    | 20 | 61,4 | AGCCGTACCAGGCCATCTTC     |
| GSEg4Rev    | 20 | 61,4 | TCGTGCCTCCGTTCTTGCGA     |
| GSEg5For    | 22 | 60,3 | GCTACTACCTGTGGATCTGCAT   |
| GSEg5Rev    | 21 | 59,8 | AGATCCAGTAGAACTGCGCCA    |
| GADPHFor    | 21 | 59,8 | GGTCTGATGACCACCATCCAT    |
| GADPHRev    | 21 | 59,8 | TGAGGGTCCATCGACAGTCTT    |
| GADPH2For   | 20 | 57,3 | GGTGCCAAGAAGGTCATCAT     |
| GADPH2Rev   | 20 | 57,3 | CACGTGAACAAGAGGAGCAA     |
| GADPH_E1For | 22 | 58,4 | GTGAAGATTGGCATCAACGGAT   |
| GADPH_E1Rev | 23 | 58,9 | GTGTGCTTGAACCTTCCATGAAC  |
| GADPH_E2For | 22 | 58,4 | CCACTGATGCAGATTACTTTGC   |
| GADPH_E2Rev | 21 | 59,8 | CCCAGTTGACTCGACAACGTA    |
| GADPH_E3For | 22 | 60,2 | CCTGGCGGAAGCTGATATCATT   |
| GADPH_E3Rev | 22 | 60,2 | CACACCCATCACAATGGTCTTC   |
| GADPH_E4For | 21 | 59,8 | GGAGTACGTTGTGCGAGTCAAC   |
| GADPH_E4Rev | 21 | 59,8 | GATGGTGGTCATCAGACCCTT    |
| GADPH_DFFor | 23 | 58,9 | GCTGATATCTTGGTTGTTAACGG  |
| GADPH_DRRev | 24 | 59,3 | GGTTATTGACTCCCATAACAATGG |
| GADPH_D1For | 21 | 59,8 | ATTCACTGTGTGATGGCCACC    |
| GADPH_D1Rev | 22 | 58,4 | CAAGAGGCGTTGGAAACAATGT   |
| GADPH_D2For | 22 | 58,4 | TGAAGTATGACTCCGTTTCATGG  |
| GADPH_D2Rev | 23 | 58,9 | CCAGTGGATTCAACAACGTATTC  |
| GADPH3DFFor | 20 | 61,4 | GACACATCAGGGGTTGGGAC     |
| GADPH3DRRev | 20 | 59,4 | CGCCACCCAAAAGACTGTTG     |

|                  |    |      |                        |
|------------------|----|------|------------------------|
| GADPH4DFor       | 20 | 59,4 | CCTCTTGCACGACCAACTGT   |
| GADPH4DRev       | 20 | 59,4 | CGGCCTCCTCTCCAATCTTT   |
| 18srRNAFor       | 20 | 59,4 | CTTAGATCGCTGCCAGATCC   |
| 18srRNARev       | 20 | 57,3 | GGCTGTGGATTTCTCGTTGT   |
| 18SrRNA_E1For    | 22 | 60,2 | TCGCAAGAGCTTCTGACCTATC |
| 18SrRNA_E1Rev    | 20 | 61,4 | ATTACCGCAGCTGCTGGCAC   |
| 18SrRNA_E2For    | 20 | 61,4 | GGTTCGATTCCGGAGAGGGA   |
| 18SrRNA_E2Rev    | 22 | 58,4 | AGCAGCAATGTTAGTATACGCC |
| 18SrRNA_E3For    | 21 | 59,8 | GGTAACGGAGAATCAGGGTTC  |
| 18SrRNA_E3Rev    | 20 | 59,4 | CTTGAGCTGGAATTACCGC    |
| 18S rRNA_D For   | 22 | 58,4 | GAGTTTCTGTCCTATCAGCCAT |
| 18S rRNA_D Rev   | 22 | 60,2 | TACTCTTCTTCGCTGCCTCACT |
| 18S rRNA_D For   | 22 | 58,4 | GAGTTTCTGTCCTATCAGCCAT |
| 18S rRNA_D Rev1  | 22 | 60,2 | CTTGCCCTCCAGTTGATACTCA |
| 18S rRNA_D1 For  | 22 | 60,2 | GGGTTTGATTCCGGAGAAGAAG |
| 18S rRNA_D1 Rev  | 22 | 60,2 | CTTGCCCTCCAGTTGATACTCA |
| 18S rRNA_D1 For  | 22 | 60,2 | GGGTTTGATTCCGGAGAAGAAG |
| 18S rRNA_D1.1Rev | 20 | 61,4 | AGCTGGAATTACCGCGGCTG   |
| 18srRNAD7For     | 20 | 57,3 | TGATGGACAGGCTGCGATTT   |
| 18srRNAD7Rev     | 20 | 61,4 | GGATTCCTCCGTCACGCTAG   |
| 18srRNAD8For     | 20 | 59,4 | CTGCCGTGAAAGCCTAGTGA   |
| 18srRNAD8Rev     | 20 | 61,4 | CGAAGGGAGGTAGCCGAATC   |
| EF1alphaFor      | 21 | 61,8 | ACAGATTGGGAACGGGTACGC  |
| EF1alphaRev      | 21 | 57,9 | TTCATCAGGACAATCGCAGCA  |
| EF2alphaFor      | 20 | 59,4 | CGAAGAACGACCCTGCAAAG   |
| EF2alphaRev      | 22 | 60,2 | CTGTCCAGGATGGTTCAGAATG |

## 2.1.8. SOFTWARE & INTERNETDATENBANKEN

Alle verwendeten Programme, Software und Webserver werden in Tabelle 9 aufgelistet.

**Tabelle 9:** Verwendete Programme und Internetportale

|                                 | <b>VERWENDUNG</b>                                | <b>INTERNETADRESSE</b>  |
|---------------------------------|--|---|
| <b>BLAST</b>                    | Basic Local Alignment Search Tool                | <a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>   |
| <b>NCBI</b>                     | National Center for Biotechnology Information    | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov">https://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>   |
| <b>UNIPROT</b>                  | Universal Protein Database                       | <a href="https://www.uniprot.org">https://www.uniprot.org</a>   |
| <b>Primer3 Input</b>            | Primer Design Program                            | <a href="https://primer3.ut.ee">https://primer3.ut.ee</a>   |
| <b>Primer3Plus</b>              | Primer Design Program                            | <a href="https://dev.primer3plus.com/index.html">https://dev.primer3plus.com/index.html</a>   |
| <b>TrEMBL</b>                   | Protein Sequence Database                        | <a href="https://www.uniprot.org/downloads">https://www.uniprot.org/downloads</a>   |
| <b>Genious Prime</b>            | Sequence Analyse Tool                            | <a href="https://www.geneious.com">https://www.geneious.com</a>   |
| <b>GeneDoc</b>                  | Multiple Sequence Alignment Editor               | <a href="https://genedoc.software.informer.com/download/">https://genedoc.software.informer.com/download/</a>   |
| <b>SMART</b>                    | Simple Modular Architecture Research Tool        | <a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a>   |
| <b>PrediSi</b>                  | Prediction of Signalpeptides                     | <a href="http://www.predisi.de/predisi">www.predisi.de/predisi</a>  |
| <b>SignalP- 4.1</b>             | Signalpeptide Prediction Tool                    | <a href="https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1">https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1</a>   |
| <b>PSORTII</b>                  | Protein Subcellular Localization Prediction Tool | <a href="https://psort.hgc.jp">https://psort.hgc.jp</a>   |
| <b>PRED-TMR</b>                 | Prediction of Transmembrane in Proteins          | <a href="http://athina.biol.uoa.gr/PRED-TMR/">http://athina.biol.uoa.gr/PRED-TMR/</a>   |
| <b>InterPro</b>                 | Prediction of Proteinfamilies                    | <a href="http://www.ebi.ac.uk/interpro">http://www.ebi.ac.uk/interpro</a>   |
| <b>Science Gateway</b>          | Protein Molecular Weight Calculator              | <a href="http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm">www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm</a>  |
| <b>Altogen Labs</b>             | Protein Molecular Weight Calculator              | <a href="https://altogenlabs.com/resources/protein-molecular-weight-calculator">https://altogenlabs.com/resources/protein-molecular-weight-calculator</a>                   |
| <b>ATT Bioquest</b>             | Protein Molecular Weight Calculator              | <a href="https://www.aatbio.com/tools/calculate-peptide-and-protein-molecular-weight-mw">https://www.aatbio.com/tools/calculate-peptide-and-protein-molecular-weight-mw</a> |
| <b>Bioinformatics</b>           | Protein Molecular Weight Calculator              | <a href="https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html">https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html</a>   |
| <b>AriaMx_Software</b>          | qPCR-Auswertung                                  | <a href="http://www.agilent.com/en/ariamx-software-download">http://www.agilent.com/en/ariamx-software-download</a>   |
| <b>DeSeq2v1.32.0 in Trinity</b> | Method for Differential Analysis of Count Data   | <a href="http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html">http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html</a>                         |

## 2.1.9. PUFFER & LÖSUNGEN

In Tabelle 10 werden die verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt.

**Tabelle 10:** Verwendete Puffer und Lösungen

| <b>PUFFER A</b>                  | <b>ZUSAMMENSETZUNG</b> |  |
|----------------------------------|------------------------|--|
|                                  | 50 mM                  | Tris-HCl, pH = 7,4                     |
|                                  | 250 mM                 | Saccharose                             |
|                                  | 3 mM                   | Na <sub>2</sub> -EDTA                  |
|                                  | 0,1 mM                 | Pefabloc ® SC                          |
|                                  | 0,04 % (v/v)           | β-Mercaptoethanol                      |
| <b>PUFFER B</b>                  |                        |  |
|                                  | 25 mM                  | Tris-HCl, pH = 7,4                     |
|                                  | 20 % (w/v)             | Saccharose                             |
|                                  | 0,1 mM                 | Pefabloc ® SC                          |
|                                  | 1 mM                   | β-Mercaptoethanol                      |
| <b>CHAPS-LÖSUNG</b>              |                        |  |
|                                  | 15 % (v/v)             | Glycerin                               |
|                                  | 15 % (v/v)             | CHAPS                                  |
|                                  | 100 ml                 | Puffer B                               |
| <b>LOWRY-REAGENZ</b>             |                        |  |
| 100 VOL LOWRY A                  | 4 g/l & 20 g/l         | NaOH & Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> |
| 1 VOL LOWRY B                    | 1 % (w/v)              | CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O |
| 1 VOL LOWRY C                    | 2 % (w/v)              | NaK-Tartrat                            |
| <b>NATIVER PROBENPUFFER</b>      |                        |  |
|                                  | 62,5 mM                | Tris-HCl pH = 6,8                      |
|                                  | 25 %                   | Glycerol                               |
|                                  | 0,01 %                 | Bromphenol Blue                        |
| <b>NATIVER LAUFPUFFER</b>        |                        |  |
| pH muss nicht eingestellt werden | 25 mM                  | Tris-HCl                               |
|                                  | 192 mM                 | Glycine                                |
| <b>SDS-PROBENPUFFER</b>          |                        |  |
|                                  | 62,5 mM                | Tris-HCl pH = 6,8                      |
|                                  | 25 %                   | Glycerol                               |
|                                  | 0,01 %                 | Bromphenol Blue                        |
|                                  | 2 %                    | SDS                                    |
|                                  | 10 mM                  | DTT                                    |

|  |               |                    |
|--|---------------|--------------------|
| <b>10x SDS-LAUFPUFFER</b>                  |               |                    |
|  | 0,25 mM       | Tris-HCl pH = 8,45 |
|  | 1,92 M        | Glycin             |
|  | 2 % (w/v)     | SDS                |
| <b>STAMMLÖSUNGEN FÜR SILBER-FÄRBUNG</b>    |               |                    |
|  | 37 %          | Formaldehyd        |
|  | 50 % (v/v)    | Ethanol (tech.)    |
|  | 40 g/l        | Natriumthiosulfat  |
|  | 20 % (w/v)    | Silbernitrat       |
| <b>FIXIER- UND STOPPLÖSUNG</b>             |               |                    |
|  | 50 % (v/v)    | Methanol           |
|  | 12 % (v/v)    | Essigsäure         |
| <b>CARBONATLÖSUNG</b>                      |               |                    |
|  | 60 g/l        | Natriumcarbonat    |
| <b>LAGERUNGLÖSUNG</b>                      |               |                    |
|  | 30 % (v/v)    | Methanol           |
|  | 3 % (v/v)     | Glycerin           |
| <b>STAMMLÖSUNGEN FÜR COOMASSIE-FÄRBUNG</b> |               |                    |
| <b>FIXIERLÖSUNG</b>                        |               |                    |
|  | 79 ml         | VE-Wasser          |
|  | 20 ml         | Methanol           |
|  | 1 ml, 85 %    | o-Phosphorsäure    |
| <b>ROTI®-BLUE FÄRBELOESUNG</b>             |               |                    |
|  | 60 ml         | VE-Wasser          |
|  | 20 ml         | Methanol           |
|  | 20 ml         | Roti®-Blue (5X)    |
| <b>WASCHLÖSUNG</b>                         |               |                    |
|  | 75 ml         | VE-Wasser          |
|  | 25 ml, 99,8 % | Methanol           |
| <b>STABILISIERUNGSLÖSUNG</b>               |               |                    |
|  | 20 % (w/v)    | Ammoniumsulfat     |
| <b>TROCKNERLÖSUNG</b>                      |               |                    |
|  | 70 ml         | VE-Wasser          |
|  | 20 ml         | Ethanol            |
|  | 10 ml, 99,5 % | Glycerin           |

|   |               |                            |
|---|---------------|----------------------------|
| <b>4x GT PUFFER</b>   |               |                            |
|   | 200 mM        | Tris pH = 7,5              |
|   | 20 mM         | MnCl <sub>2</sub>          |
| <b>1x GT PUFFER</b>   |               |                            |
|   | 50 mM         | Tris pH = 7,5              |
|   | 5 mM          | MnCl <sub>2</sub>          |
| <b>TRIS-MES PUFFER (pH = 5)</b>                               |               |                            |
|   | 10 mM         | Tris pH = 5                |
|   | 10 mM         | MES                        |
| <b>TRIS-MES PUFFER mit KCl (pH = 5)</b>                       |               |                            |
|   | 10 mM         | Tris pH = 5                |
|   | 10 mM         | MES                        |
|   | 5 mM          | KCl                        |
| <b>TRIS-MES PUFFER mit KCl (pH = 7)</b>                       |               |                            |
|   | 10 mM         | Tris                       |
|   | 10 mM         | MES                        |
|   | 5 mM          | KCl                        |
| <b>50x TAE PUFFER (pH= 8,3 - 8,5) für 1l</b>                  |               |                            |
|   | 242 g         | Tris                       |
|   | 57 ml         | Eisessig                   |
|   | 0,5 M, 100 ml | EDTA                       |
| <b>LÖSUNGEN FÜR UDP-Glo™-<br/>GLUCOSYLTRANSFERASE-TEST</b>    |               |                            |
|   | 1 mM          | Glucose                    |
|   | 100 mM        | UDP-Glucose                |
|   | 10 mM         | UDP                        |
|   | 40 µl         | UDP-Glo™-Enzym             |
|   | 5 ml          | Nukleotid Detektionspuffer |
|   | 1 Fläschchen  | ATP-Detektion Substrat     |
|   | 1,5 ml        | Enzyme Dilutionspuffer     |
| <b>4x GLUCOSYLTRANSFERASE-<br/>REAKTIONSPUFFER (pH = 7,5)</b> |               |                            |
|   | 200 mM        | Tris                       |
|   | 20 mM         | MnCl <sub>2</sub>          |
| <b>1x GLUCOSYLTRANSFERASE-<br/>REAKTIONSPUFFER (pH = 7,5)</b> |               |                            |
|   | 50 mM         | Tris                       |
|   | 5 mM          | MnCl <sub>2</sub>          |

## 2.2. METHODEN

### 2.2.1. BIOCHEMISCHE METHODEN

#### 2.2.1.1. HERKUNFT DER ORGANISMEN

Die Stammkulturen der untersuchten Organismen wurden von der „Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG)“ und der Firma „Carolina Biological Supply“ bezogen. In Tabelle 11 sind die für die vorliegende Arbeit angezogenen Protisten, ihre Stammmummern und das verwendete Medium für die Anzucht aufgeführt.

**Tabelle 11:** Verwendete Organismen

| PROTIST                   | STAMM         | MEDIUM                                |
|---------------------------|---------------|---------------------------------------|
| <i>Euglena gracilis</i>   | SAG 1224-5/25 | Mineralisches oder organisches Medium |
| <i>Distigma proteus</i>   | SAG 1204-26a  | Erde-Sand-Medium mit Erbsen           |
| <i>Khawkinea quartana</i> | SAG 1204-9    | Erde-Sand-Medium mit Erbsen           |
| <i>Peranema sp.</i>       | 131838        | WEES-Medium mit Weizenkörnern         |

#### 2.2.1.2. KULTIVIERUNG VON *EUGLENA GRACILIS*

*Euglena gracilis* wurde phototroph angezogen. Die Stammkulturen wurden alle 2 Tage in eine frische Nährlösung überimpft. Vor der Verwendung wurden die Reagenzgläser und das Nährmedium in mit Deckel verschlossenen 250 ml, 500 ml und 2000 ml Schottflaschen und 1800 ml Kulturkolben 15 min bei 121°C autoklaviert. Das Nährmedium wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Die phototrophen Zellen von *Euglena gracilis* wurden in einem mineralischen Nährmedium nach Cramer & Myers 1952 und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 h bei 24°C unter einer Lichtbank kultiviert. Die Beleuchtung erfolgte mit zwei 36 W Lichtröhren und die Beleuchtungsstärke betrug 20  $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Zunächst wurden die Stammkulturen und die Aufarbeitungskulturen in Reagenzgläsern gehalten und alle zwei Tage in frische Nährlösung überimpft. Im Anschluss daran wurden die Aufarbeitungskulturen in die Kulturkolben oder die Schottflaschen überführt. Vor jedem Animpfen wurde die Vitalität der Zellen mittels Mikroskopie kontrolliert. In Tabelle 12 ist die chemische Zusammensetzung des mineralischen Mediums dargestellt:

Tabelle 12: Zusammensetzung und Stammlösungen des mineralischen Nährmediums

| Mineralisches Nährmedium                               | Konzentration | Stammlösung             | Einzusetzende Menge für Stammlösung |
|--|---------------|-------------------------|-------------------------------------|
| <b>FESTSTOFFE</b>                                      |               | <b>Menge für 200 ml</b> | <b>pro 1 L Medium</b>               |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                        | 1 M           | 27,218 g                | 10 ml                               |
| MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O                 | 1 M           | 49,296 g                | 1 ml                                |
| Na-Citrat × 2 H <sub>2</sub> O                         | 300 mM        | 17,646 g                | 10 ml                               |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 1 M           | 26,412 g                | 10 ml                               |
| CaCl <sub>2</sub> × H <sub>2</sub> O                   | 100 mM        | 2,9404 g                | 1 ml                                |
| <b>SPURENELEMENTE-STAMMLÖSUNG</b>                      |               | <b>Menge für 500 ml</b> |                                     |
| MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O                 | 1,80 g/l      | 0,9 g                   | 1 ml                                |
| ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O                 | 0,40 g/l      | 0,2 g                   |                                     |
| CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O                 | 0,02 g/l      | 0,01 g                  |                                     |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O  | 0,20 g/l      | 0,1 g                   |                                     |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O | 1,30 g/l      | 0,65 g                  |                                     |
| <b>WEITERE LÖSUNG</b>                                  |               | <b>Menge für 500 ml</b> |                                     |
| EDTA-FeNa  | 50 mM         | 10,5275 g               | 22 ml                               |
| <b>VITAMIN-LÖSUNGEN<br/>(eingefroren bei -20°C)</b>    |               | <b>Menge für 10 ml</b>  |                                     |
| Vitamin B <sub>1</sub>                                 | 0,1 g/l       | 1 mg                    | 1 ml                                |
| Vitamin B <sub>12</sub>                                | 0,1 g/l       | 1 mg                    | 0,5 ml                              |

Alle Stammlösungen, Vitaminlösungen und das Nährmedium wurden mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt. Die Vitaminlösungen wurden nicht autoklaviert, sondern sterilfiltriert.

### 2.2.1.3. KULTIVIERUNG VON *DISTIGMA PROTEUS* UND *KHAWKINEA QUARTANA*

Die Kultivierung von *Distigma proteus* und *Khawkinea quartana* erfolgte in einem Erde-Sand-Medium mit Erbsen nach PRINGSHEIM 1946. Bei diesem biphasischen Medium handelt es sich um die Nachahmung eines natürlichen Gewässers. Die feste Phase besteht aus Erde, Sand und Erbse. Erde und Sand übernehmen die Speicherfunktion. Einerseits liefern Erde und Sand Mineralstoffe, andererseits beinhalten sie Bakterien, welche durch einen langsamen Abbauprozess der Erbse die Nährstoffe für das Wachstum der Zellen von *Distigma proteus* und *Khawkinea quartana* zur Verfügung stellen. Die wässrige Phase ist eine Mischung von vollentsalztem Wasser und Leitungswasser.

Die Kultivierung erfolgte bei 24°C entweder mit einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 h oder mit einem Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 h unter einer Lichtbank mit zwei 36 W Lichtröhren. Die Anzucht der Zellen begann in Reagenzgläsern, welche 1 g Erde, 2,5 g Sand und  $\frac{1}{8}$  Erbse enthielten. Die Erbsen wurden über Nacht bei 4°C eingeweicht und anschließend geschält. Jeweils wurde  $\frac{1}{8}$  Erbse als organische Nährstoffquelle auf den Boden der Reagenzgläser gegeben und dann nacheinander mit Erde und Sand bedeckt. Anschließend wurden die Reagenzgläser mit 10 ml Wasser einer Mischung aus den gleichen Mengen Leitungswassers und vollentsalzten Wassers (VE) vorsichtig befüllt. Die Reagenzgläser wurden mit Aluminiumpapier verschlossen. Im Anschluss daran wurden die Reagenzgläser drei Tage hintereinander für jeweils eine Stunde gekocht und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Durch das Kochen des Mediums gehen zum einen Mineralstoffe und Erdkolloide in die wässrige Phase über, welche für das Wachstum der Zellen notwendig sind, zum anderen werden enthaltene Algen, Pilze und Tiere abgetötet. Einige Bodenbakterien überleben diesen Sterilisierungsprozess jedoch.

Das Medium in den Reagenzgläsern wurde unter einer Sterilbank mit 1 ml der Stammkultur beimpft. Die Stammkulturen waren bei der Lieferung nicht axenisch, d. h. sie enthielten Bakterien. Nach ca. 3 - 4 Wochen wurde die Vitalität der Zellen mittels Mikroskopie kontrolliert und 2 - 4 Reagenzgläser wurden in eine 500 ml Flasche umgeimpft. Nach einer weiteren 3 - 4-wöchigen Wachstumszeit wurden 100 ml, 200 ml bzw. 500 ml der Zellsuspension in 1000, 2000 und 5000 ml Flaschen überimpft. Alle 3 - 4 Wochen wurden die Zellen durch Zentrifugation 5 min bei 4.500 rpm geerntet. Anschließend wurden sie zuerst mit kaltem Wasser und schließlich mit Puffer A gewaschen. Im Anschluss daran wurden sie bei -80°C aufbewahrt. Zur Dauerkultivierung wurden sterile Reagenzgläser mit 10 ml Erde-Sand-Medium und Erbsen verwendet. Nach Zugabe von 1 ml Stammkultur wurden die Reagenzgläser bei Raumtemperatur inkubiert. Das Umimpfen der Dauerkulturen erfolgte alle 4 Wochen.

### 2.2.1.4. KULTIVIERUNG VON *PERANEMA SP.*

*Peranema sp.* wurden in dem modifizierten WEES-Medium (s. Tab. 13) mit Weizen nach KIES 1967 angezogen.

**Tabelle 13:** Zusammensetzung und Stammlösungen des WEES-Mediums

| <b>WEES-Medium</b>                                | <b>Konzentration</b> | <b>Stammlösung</b>       | <b>Einzusetzende Menge für Stammlösung</b> |
|---|----------------------|--------------------------|--|
| <b>FESTSTOFFE</b>                                 |                      | <b>Menge für 100 ml</b>  | <b>pro 1 L Medium</b>                      |
| CaCO <sub>3</sub> + NaNO <sub>3</sub>             | 10 %                 | 2,0 g + 8,0 g            | 1 ml                                       |
| MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O            | -                    | 5,0 g                    | 1 ml                                       |
| (NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub>                | 2 %                  | 26,412 g                 | 1 ml                                       |
| CaSO <sub>4</sub>                                 | 4 %                  | 4 g                      | 1 ml                                       |
| Erdabkochung                                      | -                    |                          | 100 ml                                     |
| Na-Citrat × 2 H <sub>2</sub> O                    | 300 mM               | 17,646 g                 | 10 ml                                      |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  | 1 M                  | 26,412 g                 | 10 ml                                      |
| CaCl <sub>2</sub> × H <sub>2</sub> O              | 100 mM               | 2,9404 g                 | 1 ml                                       |
| <b>Fe-EDTA-Lösung</b>                             |                      | <b>Menge für 100 ml</b>  |  |
| EDTA  | -                    | 0,52 g                   | 1 ml                                       |
| FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O            | -                    | 0,5 g                    |  |
| KOH   | 1 N                  | 5,4 ml                   |  |
| <b>SPURENELEMENTE-STAMMLÖSUNG</b>                 |                      | <b>Menge für 100 ml</b>  |  |
| EDTA  | -                    | 0,3 g                    | 1 ml                                       |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                    | -                    | 0,114 g                  |  |
| MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O            | -                    | 0,0144 g                 |  |
| ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O            | -                    | 0,0021 g                 |  |
| CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O            | -                    | 0,0004 g                 |  |
| <b>VITAMIN-LÖSUNG<br/>(eingefroren bei -20°C)</b> |                      | <b>Menge für 1000 ml</b> |  |
| Vitamin B <sub>12</sub>                           | 0,0002 g/l           | 0,2 mg                   | 1 ml                                       |
| Vitamin B <sub>1</sub>                            | 0,001 g/l            | 1 mg                     |  |

Die Stammkulturen waren bei der Lieferung nicht axenisch und enthielten Organismen wie z. B. Bakterien und Glockentierchen (*Vorticella*).

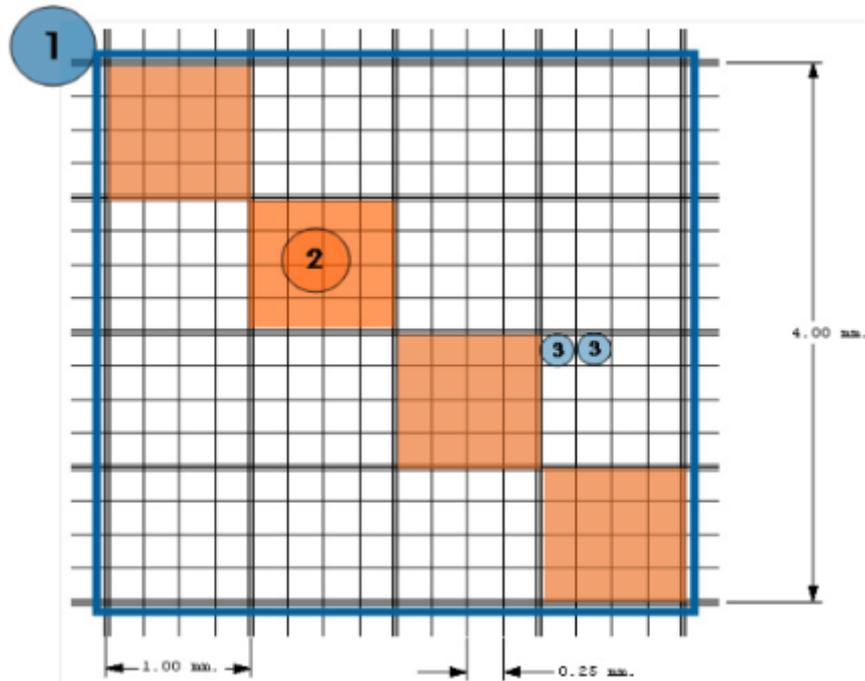
Die für die Kultivierung genutzten, mit Deckeln bzw. Aluminiumfolie verschlossenen Reagenzgläser und Erlenmeyerkolben (250 ml) sowie die Weizenkörner als organische Substanz wurden bei 121°C 15 min autoklaviert, damit die Weizenkörner nicht im Medium keimen. Die Kultivierung erfolgte bei 24°C mit einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 h. Die Anzucht der Zellen erfolgte zunächst in Reagenzgläsern, welche 5 ml WEES-Medium und 2 Weizenkörner enthielten. Das Medium in den Reagenzgläsern wurde unter einer Sterilbank mit 5 ml der Aufarbeitungskultur beimpft.

Nach ca. 2 Wochen wurde die Vitalität der Zellen mittels Mikroskopie kontrolliert und 2 Reagenzgläser wurden in einen Erlenmeyerkolben überimpft. Nach einer weiteren 3 - 4-wöchigen Wachstumszeit wurden die Zellen und die Weizenkörner durch ein Sieb getrennt. Anschließend wurden die gewachsenen Zellen mittels Zentrifugation 5 min bei 4.500 rpm geerntet. Die Zellen wurden mit kaltem Wasser und schließlich mit Puffer A gewaschen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sie bei -80°C aufbewahrt.

Zur Dauerkultivierung wurden sterile Reagenzgläser mit 10 ml WEES-Medium und 2 Weizenkörnern verwendet. Nach Zugabe von 5 ml Stammkultur wurden die Reagenzgläser bei Raumtemperatur inkubiert. Das Überimpfen der Dauerkulturen erfolgte alle 4 Wochen.

### 2.2.1.5. BESTIMMUNG DER ZELLANZAHL

Zur Bestimmung der Zellanzahl wurde eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,2 mm verwendet.



**Abbildung 18:** Die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer

Es wurde 1 ml Zellsuspension aus den beimpften Reagenzgläsern entnommen und mit bidestilliertem Wasser (1:1) verdünnt. Diese Mischung wurde durch langsames Vortexen gemischt. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 2 Tropfen Salzsäure unbeweglich gemacht.

Es wurden je nach Zellgröße acht Quadrate (1 mm x 1 mm) (s. Abb. 18) mithilfe eines mechanischen Zellzählers unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und die Zellzahl pro ml mithilfe der Formeln (Quadrat 2 und 3) berechnet, die nachfolgend dargestellt sind (<https://pdf4pro.com/view/fuchs-rosenthal-chamber-formulae-celeromics-6069.html>, download 17.01.2023).

**Quadrat 1:**

Ausgezählte Fläche: 4 mm x 4 mm

Kammertiefe: 0,200 mm

Volumen: 16 mm<sup>2</sup> x 0,200 mm = 3,2 mm<sup>3</sup>

Verdünnungsfaktor (VF): 1 oder 2

$$\begin{aligned}
 \text{Zellen pro ml} &= \frac{\text{Ausgezählte Zellen}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \times \frac{1000}{\text{Ausgezählte Fläche [mm}^2\text{]} \times \text{Kammertiefe [mm]}} \times \text{VF} \\
 &= \frac{\text{Ausgezählte Zellen}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \times \frac{1000}{16 \text{ [mm}^2\text{]} \times 0,200 \text{ [mm]}} \times \text{VF} \\
 &= \frac{\text{Ausgezählte Zellen}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \times 312,5 \times \text{VF}
 \end{aligned}$$

**Quadrat 2:**

Ausgezählte Fläche: 1 mm x 1 mm

Kammertiefe: 0,200 mm

Volumen: 1 mm<sup>2</sup> x 0,200 mm = 0,2 mm<sup>3</sup>

$$\begin{aligned}
 \text{Zellen pro ml} &= \frac{\text{Ausgezählte Zellen}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \times \frac{1000}{\text{Ausgezählte Fläche [mm}^2\text{]} \times \text{Kammertiefe [mm]}} \times \text{VF} \\
 &= \frac{\text{Ausgezählte Zellen}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \times \frac{1000}{1 \text{ [mm}^2\text{]} \times 0,200 \text{ [mm]}} \times \text{VF} \\
 &= \frac{\text{Ausgezählte Zellen}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \times 5000 \times \text{VF}
 \end{aligned}$$

**Quadrat 3:**

Ausgezählte Fläche: 0,25 mm x 0,25 mm

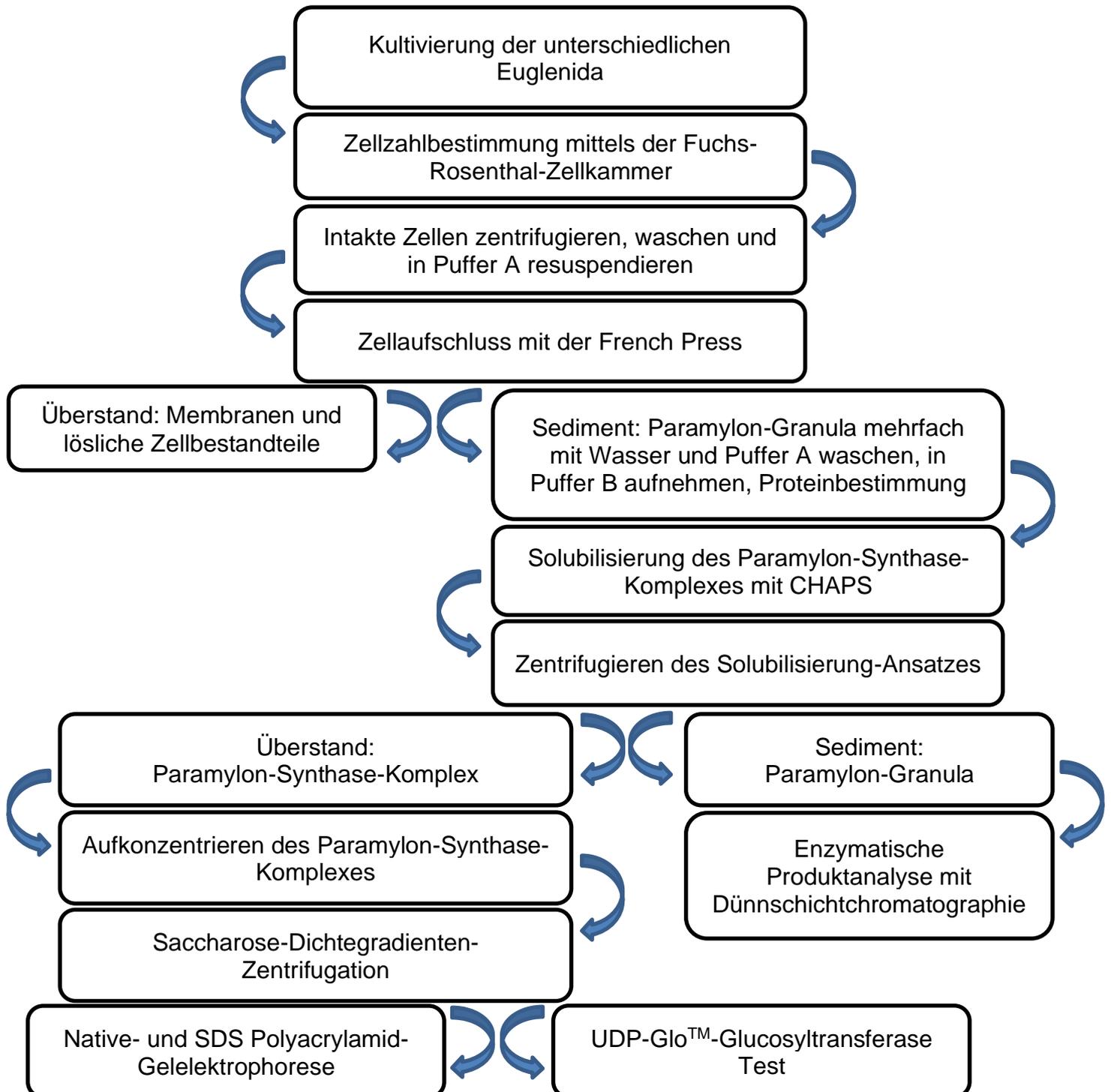
Kammertiefe: 0,200 mm

Volumen: 0,625 mm<sup>2</sup> x 0,200 mm = 0,125 mm<sup>3</sup>

$$\begin{aligned}
 \text{Zellen pro ml} &= \frac{\text{Ausgezählte Zellen}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \times \frac{1000}{\text{Ausgezählte Fläche [mm}^2\text{]} \times \text{Kammertiefe [mm]}} \times \text{VF} \\
 &= \frac{\text{Ausgezählte Zellen}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \times \frac{1000}{0,625 \text{ [mm}^2\text{]} \times 0,200 \text{ [mm]}} \times \text{VF} \\
 &= \frac{\text{Ausgezählte Zellen}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \times 8000 \times \text{VF}
 \end{aligned}$$

### 2.2.1.6. ISOLIERUNG DES PARAMYLON-SYNTNASE-KOMPLEXES

Zur Isolierung des Paramylon-Synthase-Komplexes wurden die Zellen der verschiedenen Euglenida unter heterotrophen Bedingungen angezogen. Alle beschriebenen Arbeitsschritte wurden mit vorgekühlten Geräten und Lösungen sowie auf Eis durchgeführt. In dem folgenden Fließschema wird die Enzymisolierung dargestellt.



**Abbildung 19:** Arbeitsschritte für die Isolierung und Identifizierung des Paramylon-Synthase-Komplexes

Für den Zellaufschluss wurden die Zellen 5 min lang bei 5.000 x g zentrifugiert. Das entstandene Zellsediment wurde mit VE-Wasser dreimal gewaschen. Die Zellanzahl wurde mit Puffer A auf  $1 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt. Mittels einer French Press wurden die Zellen bei 3.800 psi (260 bar) und 4°C aufgebrochen. Mittels 10-minütiger Zentrifugation bei 4.000 x g wurden die Membranen und die löslichen Bestandteile der Zellen (Überstand) von den Paramylon-Granula sowie Zelltrümmer (Sediment) abgetrennt. Das Sediment wurde zunächst einmal mit VE-Wasser und anschließend 4 bis 5-mal mit Puffer A gewaschen, wobei jeweils 2.000 x g zentrifugiert wurde. Im Anschluss wurde das Sediment in möglichst wenig Puffer B resuspendiert, sodass eine pipettierbare Lösung entstand.

Der Proteingehalt der Paramylon-Suspension wurde anhand der Methoden nach Bradford und Lowry bestimmt.

#### **2.2.1.6.1. SOLUBILISIERUNG UND AUFKONZENTRIEREN DES PARAMYLON-SYNTASE-KOMPLEXES**

Zur Solubilisierung des Paramylon-Synthase-Komplexes wurde die Proteinkonzentration der Paramylon-Suspension mit einer Lösung aus 15 % Glycerin und 0,15 % CHAPS in Puffer B auf 5 mg/ml eingestellt. Die Lösung wurde bei 4°C über Nacht mithilfe eines Magnetrührers langsam gerührt und ca. 5 min mittels eines Rührwerkes bei 400 U/min gepottert.

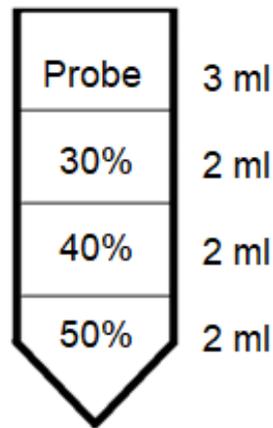
Im Anschluss wurde die Suspension 10 min bei 4.000 x g zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde aufgereinigt und für die weiteren Untersuchungen bei -80°C aufbewahrt.

Zum Ankonzentrieren des Paramylon-Synthase-Komplexes wurde der Überstand 20 h bei 41.415 x g zentrifugiert und das Sediment in möglichst wenig Puffer B resuspendiert. Für die weiteren Untersuchungen wurde das Sediment bei 4°C aufbewahrt.

#### **2.2.1.6.2. SACCHAROSE-DICHTEGRADIENTEN-ZENTRIFUGATION**

Zur weiteren Aufreinigung des Paramylon-Synthase-Komplexes wurde eine diskontinuierliche Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation für 20 h bei 41.415 x g durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die unterschiedlichen Saccharose-Lösungen in 0,15 % CHAPS in Puffer B angesetzt und Gradienten aus folgenden Lösungen gegossen: 50 % (2 ml), 40 % (2 ml) und 30 % (2 ml). Hierzu wurden 3 ml aus der ankonzentrierten Proteinlösung gegeben (s. Abb. 20).

Nach der Zentrifugation wurden von oben nach unten jeweils 1 ml Fraktionen abgezogen.



**Abbildung 20:** Darstellung des Saccharose-Dichtegradienten zur Aufreinigung des Paramylon-Synthase-Komplexes

Zuerst wurde die Proteinkonzentration der Fraktionen bestimmt. Anschließend wurde der Proteininhalt der Fraktionen anhand der Methoden Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (NATIVE-PAGE) und Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) sichtbar gemacht.

## 2.2.2. PROTEINBESTIMMUNG

### 2.2.2.1. PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY ET AL. 1951

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Lowry et al. 1951 basiert auf zwei Reaktionen: der Biuret-Reaktion und der Folin-Ciocalteu-Reaktion. Bei der Biuret-Reaktion reagieren die Peptidbindungen mit den Kupfer-(II)-Ionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) aus dem Kupfersulfat Pentahydrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) unter alkalischen Bedingungen zu Kupfer-(I)-Ionen ( $\text{Cu}^+$ ). Bei der Folin-Ciocalteu-Reaktion reagiert  $\text{Cu(I)}$  mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz. Dabei wird Phosphomolybdotungsreagenz zu Heteropolmolybdänblau reduziert. Diese Blaufärbung wird photometrisch bei 578 nm gemessen. Zur Durchführung der Proteinbestimmung nach Lowry wurde zuerst eine Rinderserumalbumin (BSA)-Stocklösung (1 mg/ml) angesetzt. Aus dieser Stocklösung wurden die Referenzlösungen mit den verschiedenen Proteinkonzentrationen für die Erstellung einer Kalibrierkurve angesetzt. Das Pipettierschema zur Herstellung der Referenzlösungen wird in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 14:** Herstellung der Referenzlösungen für die Kalibrierungskurve nach Lowry

| Konzentration<br>Referenzprotein<br>(z. B. BSA (µg/ml)) | Volumen<br>Stocklösung (1mg/ml)<br>[µl] | Volumen<br>Diluent<br>[µl] |
|---|---|----------------------------|
| 0   | 0                                       | 1000                       |
| 25  | 25                                      | 975                        |
| 50  | 50                                      | 950                        |
| 75  | 75                                      | 925                        |
| 100   | 100                                     | 900                        |
| 125   | 125                                     | 875                        |
| 150   | 150                                     | 850                        |
| 175   | 175                                     | 825                        |
| 200   | 200                                     | 800                        |

Für die Proteinbestimmung wurden sowohl von den Referenzlösungen als auch von den Proteinproben 100 µl entnommen und mit 2.000 µl Lowry-Reagenz versetzt, gevortext und im Dunkeln 10 min bei RT inkubiert. Dazu wurden 100 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz gegeben, gevortext und erneut im Dunkeln 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 578 nm gemessen. In Tabelle 15 werden das Pipettierschema und die Arbeitsschritte detailliert dargestellt.

**Tabelle 15:** Pipettierschema und Arbeitsschritte für die Lowry-Methode

| Probe   | Blindwert | Ansatz   |
|---|-----------|----------|
| <b>Proteinprobe</b>   | -         | 100 µl   |
| <b>Lowry-Reagenz</b>  | 2.000 µl  | 2.000 µl |
| <b>Wasser</b>   | 100 µl    |          |
| Durchmischen und 10 min im Dunkeln bei RT inkubieren  |           |          |
| <b>Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz</b><br>(1:2 mit Wasser verdünnt)                              | 100 µl    | 100 µl   |
| Gründlich durchmischen und 30 min bei RT im Dunkeln inkubieren                                  |           |          |
| Überführung der Lösung in Küvette<br>Messung der Absorption bei 578 nm ( $A_{578 \text{ nm}}$ ) |           |          |

Anhand der Auftragung der Absorption gegen die Proteinkonzentration der Referenzlösungen wurde eine Geradengleichung erstellt. Nachfolgend wird die Geradengleichung dargestellt (Cseke et al. 2011):

$$y = mx + b$$

y = Absorption bei 578 nm

x = Proteinkonzentration

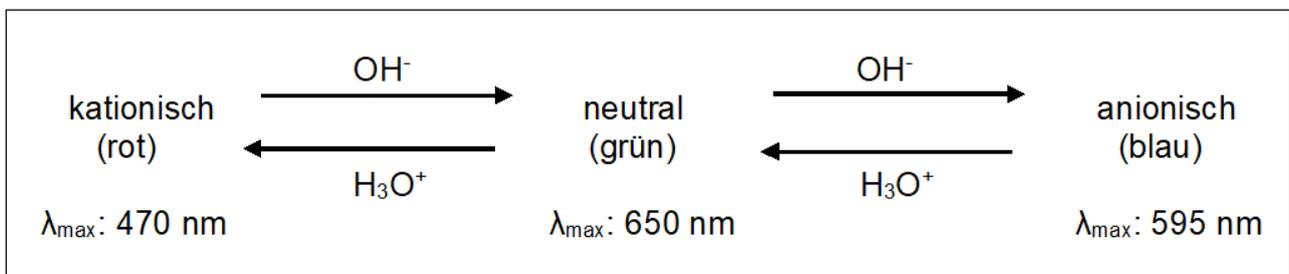
m = Steigung der Kalibrierungskurve

b = y-Achsenabschnitt

Die Proteinkonzentration wurde anhand der erstellten Kalibrierungskurve ermittelt.

### 2.2.2.2. PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD 1976

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf der Bindung des Farbstoffs „Coomassie® Brilliant Blue G 250“ an Proteinen (Bradford 1976). Der Farbstoff existiert in drei Formen: kationisch (rot), neutral (grün) und anionisch (blau).



**Abbildung 21:** pH-abhängige Absorptionsmaxima des Coomassie® Brilliant Blue G 250 (Compton & Jones 1985, [https://www.serva.de/www\\_root/documents/39222\\_d\\_1.pdf](https://www.serva.de/www_root/documents/39222_d_1.pdf), download 17.01.2023)

Im sauren Milieu befindet sich der Farbstoff überwiegend in der doppelt protonierten kationischen Form (rot,  $\lambda_{\max}$ : 470 nm). Wenn der Farbstoff an basische (Histidin, Lysin) und aromatische (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan) Aminosäuren des Proteins bindet, entsteht die blaue Form (s. Abb. 21) (Reisner et al. 1975, De St. Groth et al. 1963, Sedmak & Grossberg 1977). Diese wird bei 595 nm gemessen. Zur Durchführung der Proteinbestimmung nach Bradford wurde zuerst eine BSA-Stocklösung (1 mg/ml) angesetzt. Aus dieser Stocklösung wurden die Referenzlösungen hergestellt. Das Pipettierschema wird in Tabelle 16 dargestellt.

**Tabelle 16:** Herstellung der Referenzlösungen für die Kalibrierungskurve nach Bradford

| Konzentration<br>Referenzprotein<br>(z. B. BSA [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]) | Volumen<br>Stocklösung (1mg/ml)<br>[ $\mu\text{l}$ ] | Volumen<br>Diluent<br>[ml] |
|---|--|----------------------------|
| 0   | 0  | 10                         |
| 1   | 10   | 9,990                      |
| 5   | 50   | 9,950                      |
| 10  | 100  | 9,900                      |
| 15  | 150  | 9,850                      |
| 20  | 200  | 9,800                      |
| 25  | 250  | 9,750                      |

Für die Proteinbestimmung wurden sowohl von den Referenzlösungen als auch von den Proteinproben 800  $\mu\text{l}$  entnommen und mit 200  $\mu\text{l}$  5x Bradford-Reagenz versetzt, gevortext und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm innerhalb von 30 min gemessen. In Tabelle 17 werden das Pipettierschema und die Arbeitsschritte detailliert dargestellt.

**Tabelle 17:** Pipettierschema und Arbeitsschritte für die Bradford-Methode

| Probe   | Blindwert         | Ansatz            |
|---|-------------------|-------------------|
| Proteinprobe  | -                 | 800 $\mu\text{l}$ |
| 5x Bradford-Reagenz   | 200 $\mu\text{l}$ | 200 $\mu\text{l}$ |
| VE-Wasser   | 800 $\mu\text{l}$ | -                 |
| auf Vortex mischen  |                   |                   |
| 5 min bei RT inkubieren   |                   |                   |
| Überführung der Lösung in Küvette<br>Messung der Absorption bei 595 nm ( $A_{595 \text{ nm}}$ )<br>innerhalb von 30 min |                   |                   |

Anhand der Auftragung der Absorption gegen die Proteinkonzentration der Referenzlösungen wurde eine Geradengleichung erstellt. In der folgenden Abbildung wird die Geradengleichung dargestellt (Cseke et al. 2011):

$$y = mx + b$$

y = Absorption bei 578 nm

x = Proteinkonzentration

m = Steigung der Kalibrierungskurve

b = y-Achsenabschnitt

Die Proteinkonzentration wurde anhand der erstellten Kalibrierungskurve mit BSA berechnet (Compton & Jones 1985).

### 2.2.3. POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (PAGE)

#### 2.2.3.1. NATIVE-PAGE

Zur weiteren Analyse des aufgereinigten Proteinkomplexes wurde eine NATIVE-PAGE mittels des vertikalen Gelelektrophorese-Systems (BIOMETRA, Multigel-Long) durchgeführt. Zuerst wurden die Glasplatten mit 50 % Ethanol abgewischt, damit keine Verunreinigungen die Polymerisierung des Gels stören. Zum Gießen der Gele wurden die Glasplatten mit dem geraden Schliff auf den Arbeitsplatz gelegt. Dann wurde die Silikonabdichtung an den Rand jeder Glasplatte platziert. Anschließend wurden die Glasplatten mit den fixierten Spacern auf die Glasplatte mit dem geraden Schliff gelegt und die beiden Glasplatten mittels Klammern fixiert. Dann wurden die Komponenten für das Trenngel in einem Becherglas gemischt und mittels einer Pasteurpipette zwischen die Glasplatten gegossen. In Tabelle 18 wird die Zusammensetzung des Trenngels dargestellt.

**Tabelle 18:** Zusammensetzung des Trenngels für NATIVE-PAGE

| <b>Trenngel (6 %)</b>                                   |                  |                  |
|---|------------------|------------------|
|   | <b>Für 10 ml</b> | <b>Für 20 ml</b> |
| <b>Acrylamide/Bis-acrylamide<br/>(30 % / 0,8 % w/v)</b> | 2 ml             | 4 ml             |
| <b>0,375 M Tris-HCl, pH = 8,8</b>                       | 7,89 ml          | 15,78 ml         |
| <b>10 % APS (w/v)</b>                                   | 100 µl           | 200 µl           |
| <b>TEMED</b>  | 10 µl            | 20 µl            |

Um die Polymerisation des Gels zu beschleunigen und zur Glättung der Oberfläche wurde das Gel mit etwas Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisationszeit von ca. 45 min wurden Pufferreste und Isopropanol mittels Filterpapiers entfernt.

Die Komponenten des Sammelgels wurden gemischt und zwischen die Glasplatten gegossen. In Tabelle 19 wird die Zusammensetzung des Sammelgels dargestellt.

**Tabelle 19:** Zusammensetzung des Sammelgels für NATIVE-PAGE

| <b>Sammelgel (4 %)</b>                                  |                 |                  |
|---|-----------------|------------------|
|   | <b>Für 5 ml</b> | <b>Für 10 ml</b> |
| <b>0,375 M Tris-HCl, pH = 8,8</b>                       | 4,275 ml        | 8,550 ml         |
| <b>Acrylamide/Bis-acrylamide<br/>(30 % / 0,8 % w/v)</b> | 0,67 ml         | 1,34 ml          |
| <b>10 % APS</b>   | 0,05 ml         | 0,100 ml         |
| <b>TEMED</b>  | 5 µl            | 10 µl            |

Abschließend wurde der Gelkamm zwischen die Glasplatten geschoben. Dabei wurde darauf geachtet, dass es keine Gasbläschen zwischen dem Gelkamm und dem Sammelgel gibt. Nach der Polymerisationszeit von ca. 45 min wurden die Glasplatten mit dem Gel in den Gelapparat gestellt, und die Gelkammer wurde mit dem nativen Laufpuffer gefüllt. Der Gelkamm wurde vorsichtig entfernt. Mögliche Acrylamidreste wurden durch mehrmaliges Waschen mit nativem Laufpuffer aus den entstandenen Geltaschen beseitigt. Die Protein-Proben wurden 1:1 mit dem Probenpuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die NATIVE-PAGE erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Spannung von 90 V für 1 h im Sammelgel und von 110 V für 4 h im Trenngel. Sobald die Bromphenolblaubande das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde die Stromquelle ausgeschaltet. Im Anschluss daran wurden die Glasplatten vom Gel abgenommen und das Gel mit Silber oder mit Coomassie Brillant Blue R250 gefärbt.

### 2.2.3.2. SDS-PAGE

Zur Bestimmung der Untereinheiten des Proteinkomplexes wurde eine Natriumdodesilsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Laemmli 1970). Zunächst wurden die Glasplatten wie bei der Methode der NATIVE-PAGE vorbereitet und mittels Klammern fixiert. Dann wurden die Komponenten des Trenngels in einer Falcon Tube gemischt und mittels einer Pasteurpipette zwischen die Glasplatten pipettiert. In Tabelle 20 werden die Bestandteile des Trenngels dargestellt.

**Tabelle 20:** Zusammensetzung des Trenngels für SDS-PAGE

| <b>Trenngel</b>   |                 |                  |                 |                  |
|---|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
|   | <b>7 %</b>      |                  | <b>10 %</b>     |                  |
|   | <b>Für 5 ml</b> | <b>Für 10 ml</b> | <b>Für 5 ml</b> | <b>Für 10 ml</b> |
| <b>ddH<sub>2</sub>O (VE-Wasser)</b>                           | 4 ml            | 8 ml             | 3,2 ml          | 6,4 ml           |
| <b>1,5 M Tris-HCl, pH = 8,8</b>                               | 2 ml            | 4 ml             | 2 ml            | 4 ml             |
| <b>Acrylamide /<br/>Bis-acrylamide<br/>(30 % / 0,8 % w/v)</b> | 1,87 ml         | 3,74             | 2,67 ml         | 5,34 ml          |
| <b>10 % SDS (w/v)</b>   | 0,08 ml         | 0,16 ml          | 0,08 ml         | 0,16 ml          |
| <b>10 % APS (w/v)</b>   | 0,08 ml         | 0,16 ml          | 0,08 ml         | 0,16 ml          |
| <b>TEMED</b>  | 0,008 ml        | 0,016 ml         | 0,008 ml        | 0,016 ml         |

Die Oberfläche des Trenngels wurde mit einer kleinen Schicht Isopropanol bedeckt, um die Polymerisation zu beschleunigen. Nach der ca. 45-minütigen Polymerisation wurden die Pufferreste und Isopropanol mit einem Stück Papier entfernt. Dann wurden die Bestandteile des Sammelgels gemischt und mit Hilfe einer Pasteurpipette auf das Trenngel gegossen. Der Gelkamm wurde zwischen die Gelplatten geschoben. Die Komponenten des Sammelgels werden in Tabelle 21 dargestellt:

**Tabelle 21:** Zusammensetzung des Sammelgels für SDS-PAGE

| <b>Sammelgel (4 %)</b>  |                 |                  |
|---|-----------------|------------------|
|   | <b>Für 5 ml</b> | <b>Für 10 ml</b> |
| <b>ddH<sub>2</sub>O (VE-Wasser)</b>                           | 3 ml            | 6 ml             |
| <b>0,5 M Tris-HCl, pH = 6,8</b>                               | 1,25 ml         | 2,5 ml           |
| <b>Acrylamide /<br/>Bis-acrylamide<br/>(30 % / 0,8 % w/v)</b> | 0,67 ml         | 1,34 ml          |
| <b>10 % SDS (w/v)</b>   | 0,05 ml         | 0,10 ml          |
| <b>10 % APS (w/v)</b>   | 0,05 ml         | 0,10 ml          |
| <b>TEMED</b>  | 0,005 ml        | 0,010 ml         |

Während der Polymerisation des Sammelgels wurden die Protein-Proben vorbereitet. Dafür wurden die Protein-Proben 1:2 mit SDS-Probenpuffer gemischt und zweimal hintereinander für 5 min bei 95°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und in die Geltaschen pipettiert. Die SDS-PAGE erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Spannung von 90 V für 1 h im Sammelgel und von 110 V für 4 h

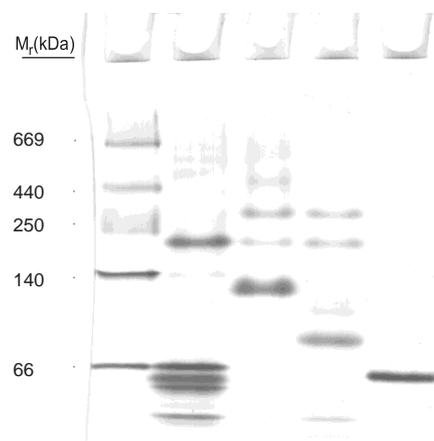
im Trenngel. Sobald die Bromphenolblaubande das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde die Stromquelle abgeschaltet. Schließlich wurde das Gel mit Silber oder mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt.

### 2.2.3.3. BESTIMMUNG DES MOLEKULARGEWICHTES DER PROTEINE

Als Proteinstandard für die NATIVE-PAGE wurde ein HMW-Marker (s. Abb. 22) verwendet, der die in Tabelle 22 aufgelisteten Proteine enthielt.

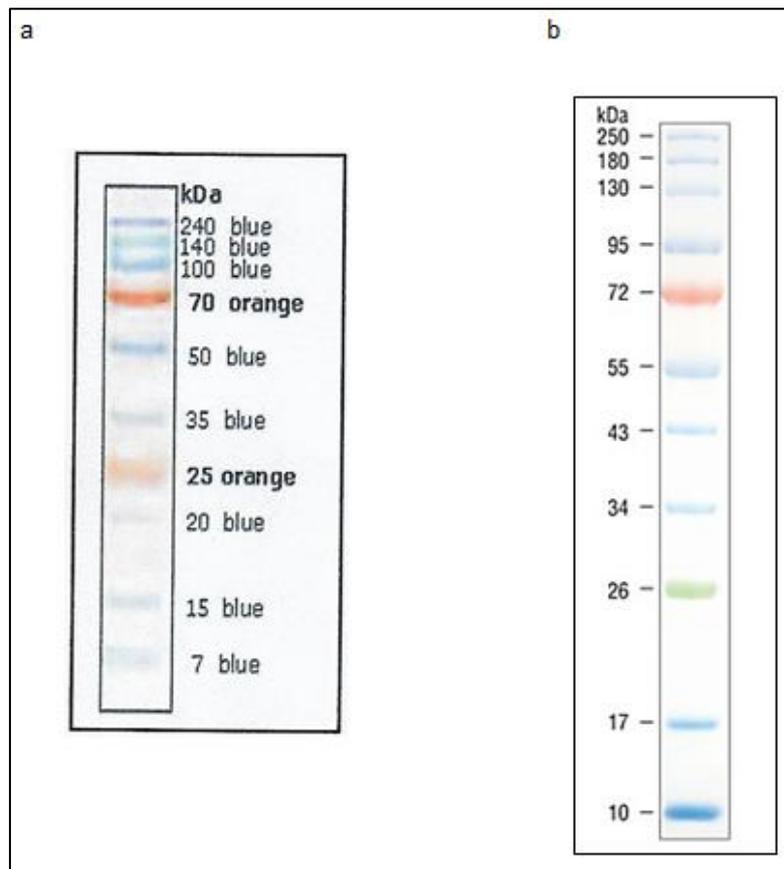
**Tabelle 22:** Längenstandard (66-669 kDa) für NATIVE-GELE

| Proteine            | Organ / Organismus    | Menge ( $\mu\text{g}$ ) | $M_r$ (kDa) |
|---------------------|-----------------------|-------------------------|-------------|
| THYROGLOBULIN       | Schilddrüse / Schwein | 76                      | 669         |
| FERRITIN            | Milz / Pferd          | 50                      | 440         |
| KATALASE            | Leber / Rind          | 36                      | 232         |
| LACTATDEHYDROGENASE | Herz / Rind           | 48                      | 140         |
| ALBUMIN             | Serum / Rind          | 40                      | 66          |



**Abbildung 22:** HMW-Marker im 5 - 12,5 % Polyacrylamid Gradient Gel

Als Längenstandard für die SDS-PAGE wurde der Prestained-Protein-Standard und Dual Color Proteinstandard III verwendet. In Abbildung 23 werden die Molekulargewichte der enthaltenen Proteine dargestellt.



**Abbildung 23:** a) Dual Color Proteinstandard III (7-240 kDa) b) Prestained-Protein-Standard für SDS-PAGE (10-250 kDa)

## 2.2.4. GELFÄRBUNG

Um die Proteine des Proteinkomplexes sichtbar zu machen, wurden die Gele unterschiedlich gefärbt: Silberfärbung und Coomassie Brilliant Blue R250

### 2.2.4.1. SILBERFÄRBUNG

Die Gele wurden nach NATIVE-PAGE und SDS-PAGE mit Silber nach Blum et al. 1987 gefärbt. Zunächst wurden die Stammlösungen, wie in Tabelle 23 angegeben, angesetzt.

**Tabelle 23:** Zusammensetzung der Stammlösungen für die Silberfärbung

| <b>Stammlösung</b>      | <b>Konzentration</b>           |
|-------------------------|--------------------------------|
| Formaldehyd             | 37 %                           |
| Ethanol                 | 50 %                           |
| Fixier- und Stopplösung | 50 % Methanol, 12 % Essigsäure |
| Carbonatlösung          | 60 g/l Natriumcarbonat         |
| Lagerlösung             | 30 % Methanol, 3 % Glycerin    |
| Natriumthiosulfatlösung | 40 g/l Natriumthiosulfat       |
| Silbernitratlösung      | 200 g/l Silbernitrat           |

Anschließend wurden die Färbe-Lösungen anhand der Stammlösungen in 50 ml Falcon-Röhrchen frisch angesetzt (s. Tab. 24).

**Tabelle 24:** Zusammensetzung der Färbe-Lösungen für die Silberfärbung

| <b>Färbe-Lösung</b> | <b>Ansetzen der Färbe-Lösungen mithilfe der Stammlösungen</b> |
|---------------------|---|
| 1                   | 25 µl Formaldehyd in Fixier- und Stopplösung                  |
| 2                   | 250 µl Thiosulfatlösung in VE-Wasser                          |
| 3                   | 500 µl Silbernitratlösung, 37,5 µl Formaldehyd in VE-Wasser   |
| 4                   | 25 µl Formaldehyd, 5 µl Thiosulfatlösung in Carbonatlösung    |

Das Sammelgel wurde mithilfe eines Schabers vom Trenngel entfernt. Anschließend wurde das Trenngel in der Färbekammer mit der Färbe-Lösung 1 über Nacht geschüttelt. Dann wurde es dreimal hintereinander 20 min mit 50 % Ethanol gewaschen. Daraufhin wurde es in der Färbe-Lösung 2 imprägniert. Nach dem Imprägnieren wurde es dreimal hintereinander 20 s mit VE-Wasser gewaschen. Das Gel wurde 20 min mit der Färbe-Lösung 3 inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde das überschüssige Silber durch zweimaliges Waschen mit VE-Wasser für 20 s entfernt. Nach diesem Schritt wurde das Gel in eine frische Färbekammer gelegt und mittels der Färbe-Lösung 4 entwickelt, bis die Proteinbanden sichtbar waren. Danach wurde es kurz mit VE-Wasser gewaschen. Die Reaktion wurde mittels der Fixier- und Stopplösung beendet. Abschließend wurde es in der Lagerlösung bei 4°C aufbewahrt. In Tabelle 25 werden die Arbeitsschritte und Inkubationsdauern der Silberfärbung aufgelistet.

**Tabelle 25:** Arbeitsschritte und Inkubationsprotokoll für die Silberfärbung

|           | <b>Arbeitsschritt</b> | <b>Inkubationsdauer</b> | <b>Färbe-/Stammlösung</b> |
|-----------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|
| <b>1</b>  | Fixieren              | > 1 h                   | 1                         |
| <b>2</b>  | Waschen (3x)          | 20 min                  | 50 % Ethanol              |
| <b>3</b>  | Imprägnieren          | 1 min                   | 2                         |
| <b>4</b>  | Waschen (3x)          | 20 s                    | VE-Wasser                 |
| <b>5</b>  | Silberfärben          | 20 min                  | 3                         |
| <b>6</b>  | Waschen (2x)          | 20 s                    | VE-Wasser                 |
| <b>7</b>  | Entwickeln            | bis Banden sichtbar     | 4                         |
| <b>8</b>  | Waschen               | 10 s                    | VE-Wasser                 |
| <b>9</b>  | Stoppen               | 10 min                  | Fixier- und Stopplösung   |
| <b>10</b> | Waschen / Lagern      | ≥ 20 min                | Lagerlösung               |

#### 2.2.4.2. KOLLOIDALE COOMASSIE-FÄRBUNG

Die NATIVE- und SDS-Gele wurden nach dem ROTI®Blue Färbungsprotokoll gefärbt. Zuerst wurden die Färbe-Lösungen angesetzt. Tabelle 26 zeigt die Arbeitsschritte, Inkubationsdauern und Färbe-Lösungen:

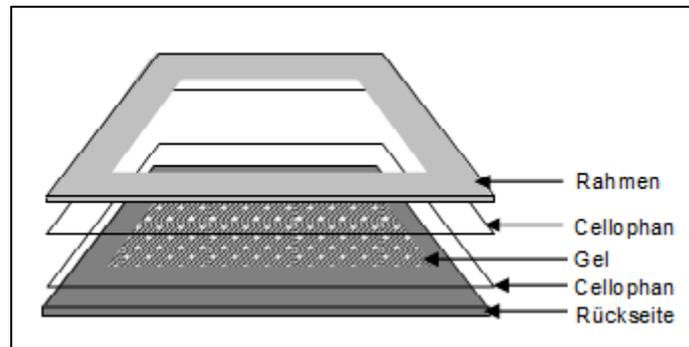
**Tabelle 26:** Protokoll für Kolloidale Coomassie Färbung

|          | <b>Arbeitsschritt</b> | <b>Inkubationsdauer</b> | <b>Färbe-Lösung</b>        |
|----------|-----------------------|-------------------------|----------------------------|
| <b>1</b> | Fixieren              | 60 min                  | Fixierlösung               |
| <b>2</b> | Färben                | 2 - 15 h                | 1x Roti®- Blue-Färbelösung |
| <b>3</b> | Waschen               | 5 min                   | Waschlösung                |
| <b>4</b> | Aufbewahren           | -                       | Stabilisierungslösung      |

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel vom Trenngel getrennt und das Trenngel für 60 min in Fixierlösung unter Schütteln inkubiert. Dann wurde das Gel in 1x Roti®-Blue-Färbelösung für 2 - 15 h gefärbt. Anschließend wurde es in eine saubere Färbeschale überführt und in der Waschlösung für 5 min unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurde das Gel in der Stabilisierungslösung über einen längeren Zeitraum aufbewahrt.

### 2.2.5. GELTROCKNUNG

Nach der Färbung wurden die Gele mithilfe eines Gelrocknungsrahmens getrocknet (s. Abb. 24).

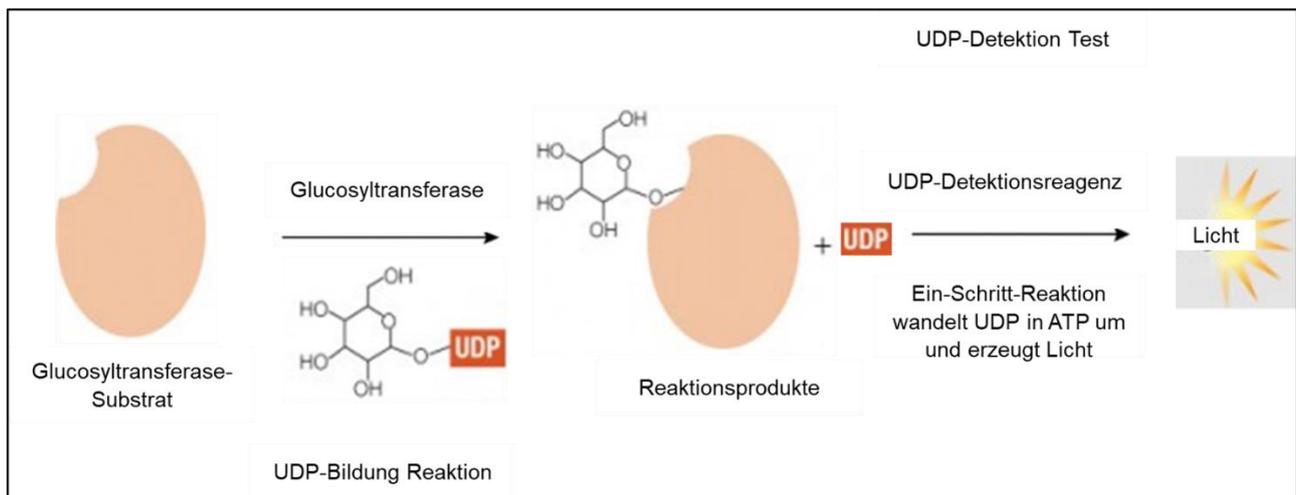


**Abbildung 24:** Darstellung des Aufbaues der Gelrocknung

Dazu wurde das Gel für 30 min in Trocknerlösung inkubiert. Dann wurden 2 Blatt Cellophan für 15 min in destilliertem Wasser eingeweicht. Daraufhin wurde ein Blatt Cellophan auf die Rückseite des Gelrocknungsrahmens glatt (luftblasenfrei) aufgelegt. Anschließend wurde 0,5 ml Trocknerlösung auf das Cellophanblatt pipettiert. Dann wurde das Gel luftblasenfrei auf das Cellophanblatt aufgelegt. Nachdem das zweite Cellophanblatt auf das Gel aufgelegt worden ist, wurde der Rahmen eingesetzt und mit 4 Klammern fixiert. Abschließend wurde der Gelrocknungsrahmen unter den Abzug gelegt. Nach 2 Tagen wurde das Gel aus dem Gelrocknungsrahmen genommen und aufbewahrt.

### 2.2.6. UDP-GLO<sup>TM</sup>-GLUCOSYLTRANSFERASE-TEST

Um die Aktivität des isolierten Paramylon-Synthase-Komplexes zu messen, wurde der UDP-Glo<sup>TM</sup>-Glucosyltransferase-Test verwendet. Im ersten Schritt wird UDP-Glucose durch den Paramylon-Synthase-Komplex zu Glucose und UDP umgesetzt. Im nächsten Schritt wird UDP in ATP umgewandelt, wobei gleichzeitig Licht in einer Luciferase-Reaktion erzeugt wird. Das erzeugte Licht wird mit einem Lumineszenz-Mikroplatten-Reader gemessen. Der allgemeine Reaktionsverlauf für die verschiedenen Glucosyltransferasen wird in Abbildung 25 dargestellt.

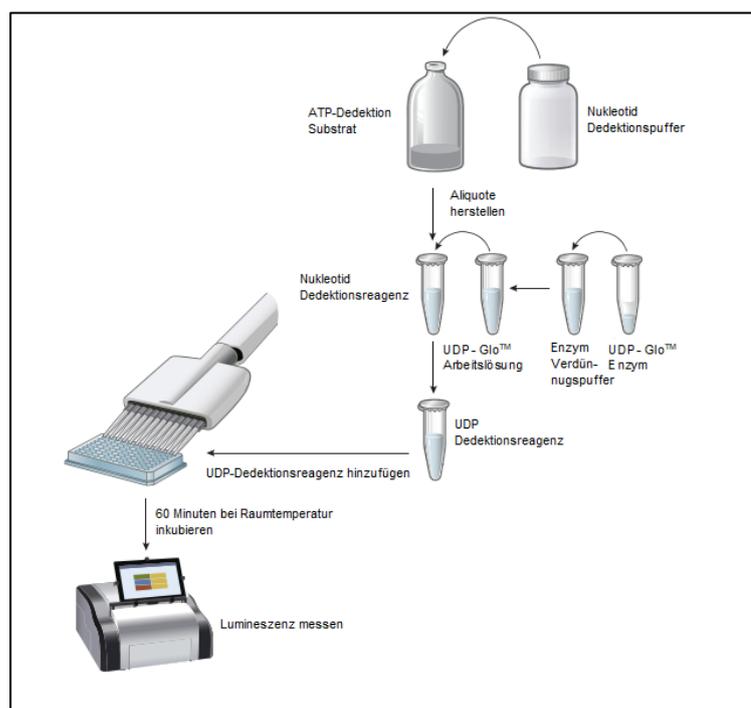


**Abbildung 25:** Das Prinzip der Glucosyltransferase-Reaktion

Die Lumineszenz-Werte korrelieren dabei mit der UDP-Konzentration, die durch die Verwendung einer UDP-Standardkurve berechnet werden kann.

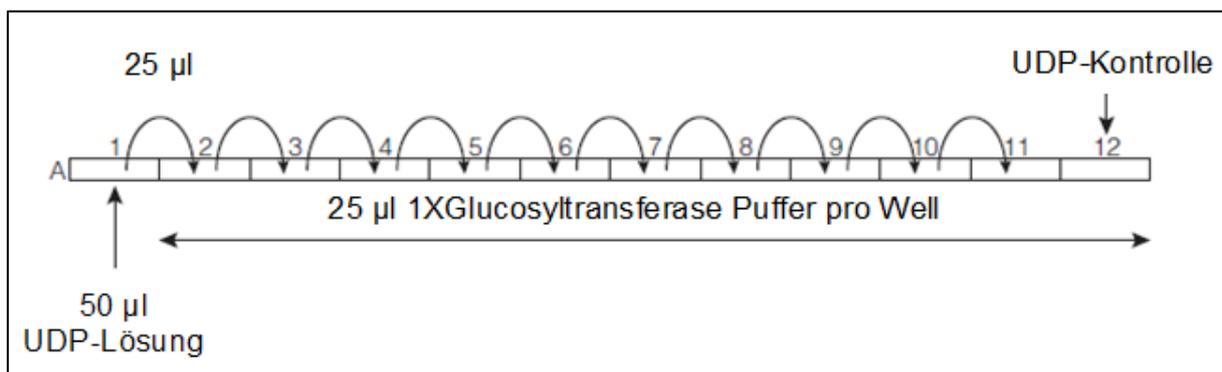
### 2.2.6.1. ERSTELLUNG DER STANDARDKURVE FÜR UDP

Zur Erstellung der Standardkurve wurden die Reagenzien und Puffer des Tests vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht. Die UDP-Standards wurden in einer 96-Well Mikrotiter-Platte vorbereitet. Abbildung 26 stellt die Schritte zur Erstellung der Standardkurve und die Aktivitätsmessung des Paramylon-Synthase-Komplexes schematisch dar.



**Abbildung 26:** Schematische Darstellung des UDP-Glo™-Glucosyltransferase-Tests

Zuerst wurde die Nukleotid-Detektionsreagenz durch Mischen von Nukleotid-Detektionspuffer und ATP-Detektions-Substrat angesetzt, in 2 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert, und die Aliquote wurden bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Als Nächstes wurden  $300\ \mu\text{l}$  UDP-Glo<sup>TM</sup>-Arbeitslösung aus  $4\ \mu\text{l}$  UDP-Glo<sup>TM</sup>-Enzym und  $296\ \mu\text{l}$  Enzym-Dilutionspuffer angesetzt. Anschließend wurde die UDP-Detektionsreagenz durch Mischen von  $10\ \mu\text{l}$  UDP-Glo<sup>TM</sup>-Arbeitslösung und  $1\ \text{ml}$  Nukleotid-Detektionsreagenz unmittelbar vor dem Gebrauch angefertigt. Für drei Messungen wurden insgesamt  $150\ \text{ml}$   $25\ \mu\text{M}$  UDP-Lösung hergestellt. In das Well A1 wurden  $50\ \mu\text{l}$   $25\ \mu\text{M}$  UDP-Lösung pipettiert. In die Wells A2 bis A12 wurden jeweils  $25\ \mu\text{l}$   $1\times$  Glucosyltransferase Reaktionspuffer hinzugefügt. Von Well A1 zu Well A2 wurde eine zweifache Verdünnung durch die Übertragung von  $25\ \mu\text{l}$  UDP-Lösung hergestellt.  $25\ \mu\text{l}$  UDP-Lösung wurde von Well A2 zu Well A3 übertragen. Ebenso wurde von Well A4 bis Well A11 verfahren. Die UDP-Lösung aus Well A11 wurde verworfen. Well A12 enthält keine UDP-Lösung und dient als Kontrolle (s. Abb. 27).



**Abbildung 27:** Verdünnungsreihe zur Erstellung einer UDP-Standardkurve

Die UDP-Konzentrationen und die entsprechenden Wellnummern werden in Tabelle 27 gezeigt.

**Tabelle 27:** Verwendete UDP-Konzentrationen mit der Wellnummer

| UDP ( $\mu\text{M}$ ) | Wellnummer |
|-----------------------|------------|
| 25                    | A1         |
| 12,5                  | A2         |
| 6,25                  | A3         |
| 3,13                  | A4         |
| 1,56                  | A5         |
| 0,78                  | A6         |
| 0,39                  | A7         |
| 0,20                  | A8         |
| 0,10                  | A9         |
| 0,05                  | A10        |
| 0,02                  | A11        |
| 0                     | A12        |

Das UDP-Detektionsreagenz wurde angesetzt und 25  $\mu\text{l}$  in jedes Well hinzugefügt. Die in der Mikrotiter-Platte enthaltenen Proben wurden mittels eines Mikroplattenshakers für 30 s gemixt. Nach einer 60-minütigen Inkubationszeit wurde die Lumineszenz mittels eines Mikroplatten-Readers gemessen.

#### 2.2.6.2. AKTIVITÄTSMESSUNG DES PARAMYLON-SYNTASE-KOMPLEXES

Nach der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die Fraktionen entnommen und die Aktivität mittels des UDP-Glo<sup>TM</sup>-Glucosyltransferase-Tests gemessen. Dafür wurden als erstes 400  $\mu\text{l}$  UDP-Glucose / Glucose-Substratmix in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß vorbereitet. Die Zusammensetzung kann Tabelle 28 entnommen werden. Das Reaktionsgefäß wurde auf Eis gelagert und pro Well wurden 10  $\mu\text{l}$  Substrat eingesetzt.

**Tabelle 28:** Puffer und Lösungen für die Vorbereitung des Substratmixes

| Komponente                             | Volumen ( $\mu\text{l}$ ) |
|--|---------------------------|
| 4x Glucosyltransferase Reaktionspuffer | 100                       |
| 100 mM UDP-Glc                         | 1                         |
| 1mM Glc                                | 50                        |
| ATP freies Wasser                      | 249                       |

Im Anschluss wurden 100 µl Paramylon-Synthase-Enzymlösung durch Mischen von 4x Glucosyltransferase-Reaktionspuffer, Paramylon-Synthase-Komplex und ATP-freiem Wasser angefertigt und das Reaktionsgefäß auf Eis gelegt. Pro Well wurde 15 µl Paramylon-Synthase-Enzymlösung eingesetzt. Tabelle 29 zeigt die Substanzen und eingesetzten Volumenen.

**Tabelle 29:** Puffer und Lösungen für die Vorbereitung der Enzymlösung

| Komponente                             | Volumen (µl) |
|--|--------------|
| 4x Glucosyltransferase Reaktionspuffer | 25           |
| Paramylon-Synthase (4 ng / µl)         | 66,6         |
| ATP freies Wasser                      | 8,4          |

15 µl Paramylon-Synthase-Enzymlösung wurde in ein Well übertragen und dazu 10 µl UDP-Glucose / Glucose-Substratmix gegeben. Anschließend wurde in jedes Well 25 µl UDP-Detektionsreagenz pipettiert. Die Proben in der Mikrotiterplatte wurde für 30 s gemischt und bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde die Lumineszenz im Mikroplatten-Reader gemessen.

### 2.2.6.3. EINFLUSS DER IONEN AUF DIE ENZYMAKTIVITÄT

Der Einfluss von Magnesium und Calcium neben Mangan auf die Enzymaktivität wurde untersucht. In den Arbeiten von Dietrich Bäumer wurde eine 1 mM Calcium-Konzentration als aktivitätssteigernd ermittelt, wohingegen Magnesium oder auch die Kombination aus beiden Erdalkalimetallen zu einer gleichbleibenden oder sinkenden Aktivität führte (Bäumer et al. 2001, Bäumer 1998). Im Rahmen dieses Assays wurde Mangan zum Glucosyltransferase-Puffer hinzugegeben. Dem Glucosyltransferase-Puffer wurde eine 2,5 mM Konzentration an Calcium und / oder Magnesium hinzugefügt. Anschließend wurde die Aktivität gemessen.

### 2.2.7. AUFREINIGUNG DES PARAMYLONS

Die Zellen aus *Distigma proteus* und *Peranema sp.* wurden mittels Zentrifugation vom Medium getrennt. Anschließend wurde das Enzym, wie in Abbildung 19 ausführlich beschrieben, isoliert. Das synthetisierte Paramylon wurde dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und in einer 1 % SDS-Lösung für 1 h am Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurde das Paramylon fünfmal mit 100 ml VE-Wasser gewaschen und 5 min bei 5.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Paramylon mehrfach hintereinander mit

Aceton gewaschen, bis der Acetonüberstand keine Färbung mehr aufwies. Im Anschluss daran wurde das aufgereinigte Paramylon für 12 h im Trockenschrank bei 50°C getrocknet. Das getrocknete Paramylon wurde abgewogen und für die weiteren Untersuchungen in einem geschlossenen Gefäß aufbewahrt.

## 2.2.8. IDENTIFIZIERUNG DES ENZYMPRODUKTES

Um festzustellen, ob es sich bei dem Enzymprodukt um Paramylon ( $\beta$ -1,3-Glucan) handelt, wurden unterschiedliche Glucanasen (Glucanhydrolasen) verwendet. Es wurde auch kontrolliert, wie spezifisch die  $\beta$ -1,3-glycosidische Bindungen der Paramylon Granula von Glucanasen gespalten wurden. Außerdem wurden eine Alkali- und Säurehydrolyse durchgeführt, um die Stabilität und das Verhalten des Paramylons unter den verschiedenen Reaktionsbedingungen zu testen. Das Endprodukt wurde durch die Methode „Dünnschichtchromatographie“ aufgetrennt und identifiziert.

### 2.2.8.1. ENZYMATISCHE PRODUKTANALYSE

Das Enzymprodukt Paramylon wurde nach Ingold & Seitz 1986 getestet. Für die Produktanalyse wurden in vier 2 ml Gefäßen jeweils 0,8 g getrocknetes und aufgereinigtes Paramylon abgewogen. Dazu wurden jeweils 1 ml von dem entsprechenden Puffer und eine Spatelspitze von den Hydrolasen oder Glucanasen gegeben (s. Tab. 30). Diese Ansätze wurden gevortext und anschließend bei den in Tabelle 30 angegebenen Temperaturen für 72 h im Wärmeschrank inkubiert.

**Tabelle 30:** Verwendete Hydrolasen und Glucanasen

| Enzym                  | Temperatur | Puffer                                    |
|------------------------|------------|---|
| $\alpha$ -Amylase      | 21°C       | 10 mM Tris-MES-Puffer, 5 mM KCl, pH = 7,0 |
| $\beta$ -Amylase       | 21°C       | 10 mM Tris-MES-Puffer, 5 mM KCl, pH = 7,0 |
| $\beta$ -1,3-Glucanase | 35°C       | 10 mM Tris-MES-Puffer, pH = 5,0           |
| $\beta$ -1,4-Glucanase | 40°C       | 10 mM Tris-MES-Puffer, 5 mM KCl, pH = 5,0 |

Zur Beendigung der Reaktion wurden die Ansätze für 2 min bei 100°C gekocht. Nach dem Abkühlen wurden sie bei 13.000 x g für 5 min zentrifugiert, um die unlöslichen Membranbestandteile und Substanzen (z. B. Erde, Sand) zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Gefäß überführt und bei 4°C aufbewahrt.

### 2.2.8.2. ALKALIHYDROLYSE

Aus dem aufgereinigten Enzymprodukt wurde 0,8 g in einem 2 ml Reaktionsgefäß abgewogen. Dazu wurde 1 ml 0,1 N NaOH Lösung gegeben und das Reaktionsgefäß wurde für 72 h bei 40°C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurde der Ansatz mit 1 ml 0,1 N HCl gemischt. Anschließend wurde die Mischung für eine Minute bei 13.000 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein sauberes Gefäß überführt und bei 4°C für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

### 2.2.8.3. SÄUREHYDROLYSE

Das Paramylon (0,8 g) wurde mit 1 ml 1 N HCl versetzt und für 72 h bei 40°C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurde die Probe mit 1 N NaOH neutralisiert. Anschließend wurde sie bei 13.000 x g für 1 min zentrifugiert. Für die weiteren Experimente wurde der Überstand im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

### 2.2.9. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE (DC)

Um die Reaktionsprodukte aus der Enzymanalyse, der Alkali- und Säurehydrolyse zu identifizieren, wurde eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Zur Durchführung wurden Laufmittel aus Isopropanol / Eisessig / Wasser (29 : 4 : 9) und eine Standardlösung (2 mg/ml Glucose in 10 % Isopropanol) angesetzt. Als Nächstes wurden die DC-Platten (10x10 cm) geschnitten und für die Proben mit einem weichen Bleistift markiert. 100 µl des klaren Überstandes sowie 10 µl eines Glucosestandards wurden auf die vorbereitete DC-Platte mit Mikrokapillaren aufgetragen. Nach dem Trocknen der Proben wurden die Platten ca. 1 h in einer DC-Kammer mit dem Laufmittel entwickelt, bis die Laufmittelfront bei etwa 1 cm unter dem oberen Ende der DC-Platte angelangt ist. Die DC-Platten wurden der DC-Kammer entnommen und die Laufmittelfront wurde sofort mit einem Bleistift markiert. Diese Platten wurden unter getrocknet, mit Orcin-Lösung besprüht und bei 110°C im Trockenschrank 5 min entwickelt, bis die Spots erkennbar waren. Die Auswertung der Platten erfolgte durch Berechnung der  $R_f$ -Werte (Retentionsfaktor) nach folgender Formel (Bele & Khale 2011, Kumar et al. 2013, Namir et al. 2019):

$$R_f = \frac{a}{b} = \frac{\text{Laufstrecke der Substanz ab Startlinie [cm]}}{\text{Laufstrecke des Laufmittels ab Startlinie [cm]}}$$

## **2.2.10. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN**

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wurden für die verschiedenen Euglenida jeweils der Genbereich, der für den Paramylon-Synthase-Komplex codiert und die entsprechenden Sequenzeigenschaften identifiziert und bestimmt.

### **2.2.10.1. ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN**

Je nach Zelldichte wurden aus den unterschiedlichen Euglenida-Kulturen 1 bis 3 ml in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (14.600 rpm) für 2 min wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Pellet-Mikropistill zermahlen. Anschließend wurde DNA oder RNA isoliert.

#### **2.2.10.1.1. ISOLIERUNG DER GESAMT DNA (gDNA)**

Die Isolierung der gesamten DNA aus den unterschiedlichen Euglenida erfolgte mit Hilfe des my-budget Plant DNA Kits nach Herstellerangaben. Im letzten Schritt wurden für eine maximale Ausbeute an DNA zwei Elutionschritte mit gleichen Volumina (50 µl) Elutionspuffer durchgeführt. Die Konzentration und die Reinheit der gesamten DNA wurde im NanoDrop 2000 Spektrophotometer gemessen. Zur Visualisierung der DNA wurden 6 µl von der DNA-Probe mit 1µl 6x DNA Loading Dye gemischt, auf ein Agarosegel (1 %) aufgetragen und analysiert. Anschließend wurde die extrahierte DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

#### **2.2.10.1.2. ISOLIERUNG DER RNA**

Die Isolierung der RNA aus den unterschiedlichen Euglenida erfolgte mit Hilfe des my-budget Plant RNA Kits nach Herstellerangaben. Im letzten Schritt wurden für eine maximale Ausbeute an RNA zwei Elutionschritte mit gleichen Volumina (30 µl) Elutionspuffer durchgeführt. Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurde im NanoDrop 2000 Spektrophotometer gemessen. Zur Visualisierung der RNA wurden 5 µl von der RNA-Probe mit 5 µl 2x RNA Loading Dye gemischt, bei 70°C für 10 min erhitzt, auf Eis gelegt und kurz zentrifugiert. Die RNA-Probe wurde auf ein Agarosegel (1 %) aufgetragen und analysiert. Anschließend wurde die extrahierte RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.10.2. PCR-PRIMERDESIGN

Um die für den Paramylon-Synthase-Komplex codierende Gensequenz bei den unterschiedlichen Euglenida zu identifizieren, wurden degenerierte Primer verwendet. Anhand der vorliegenden cDNA- / DNA-Sequenz-Daten wurden Primer für PCR / qPCR (s. Tab. 8) mittels der Programme Primer3Plus bzw. Primer3 Input designt und bei der Firma Eurofins Genomics bestellt. Die degenerierten Primer wurden nach den Angaben des Herstellers in autoklaviertem nukleasefreiem Wasser gelöst und als Stammlösung mit einer Konzentration von 100 pmol/µl bei -20°C gelagert. Mit diesen Primern (10 pmol/µl) wurden PCR und qPCR durchgeführt.

### 2.2.10.3. POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler durchgeführt. Nachfolgend sind die Reagenzien eines PCR-Ansatzes (s. Tab. 31) und das PCR-Programm (s. Tab. 32) aufgeführt.

**Tabelle 31:** Pipettierschema für den Standard PCR-Ansatz

| Komponente                | Volumen (µl)   |
|---------------------------|----------------|
| Dream-Taq-Green-Puffer    | 12,5           |
| VE-Wasser                 | 3,5            |
| Primer for (10 pmol/µl)   | 2,0            |
| Primer rev (10 pmol/µl)   | 2,0            |
| Template (gDNA oder cDNA) | 1,0 (10 ng/µl) |

**Tabelle 32:** PCR-Programm

| Zyklusschritt           | Wiederholung | Temperatur         | Zeit  |
|-------------------------|--------------|--------------------|-------|
| 1. Initialdenaturierung |              | 95°C               | 2 min |
| 2. Denaturierung        |              | 95°C               | 30 s  |
| 3. Annealing            |              | 50-65°C (variabel) | 30 s  |
| 4. Elongation           |              | 72°C               | 1 min |
| Go to 2                 | 34x          | -                  | -     |
| 5. Abschluss Elongation |              | 72°C               | 5 min |
| 6. Hold                 |              | 4°C                | ∞     |

#### 2.2.10.4. REVERSE-TRANSKRIPTION-POLYMERASE-KETTENREAKTION (RT-PCR)

Zur Herstellung der cDNA aus RNA wurde das LunaScript™ RT SuperMix Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Komponenten für RT-PCR wurden gemischt und kurz zentrifugiert. Nachfolgend sind die Reagenzien eines PCR-Ansatzes (s. Tab. 33) und das PCR-Programm (s. Tab. 34) aufgeführt.

**Tabelle 33:** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die cDNA-Synthese

| Komponente                   | Einsatz [µl] |
|------------------------------|--------------|
| LunaScript™ RT SuperMix (5x) | 4            |
| Template (RNA)               | 2            |
| Nukleasefreies Wasser        | 14           |

**Tabelle 34:** RT-PCR Programm

| Zyklusschritt      | Temperatur | Zeit   |
|--------------------|------------|--------|
| Primer Annealing   | 25°C       | 2 min  |
| cDNA-Synthese      | 55°C       | 10 min |
| Hitzeinaktivierung | 95°C       | 1 min  |

#### 2.2.10.5. GRADIENTEN-PCR

Zur Optimierung der Annealing-Temperatur und damit zur Vermeidung von Nebenprodukten wurden die degenerierten Primer mittels Gradienten-PCR getestet. Das Gradienten-PCR- Programm und die Ansätze werden in Tabelle 31 und 32 dargestellt. Der Gradient wurde auf  $60,0^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  eingestellt und folgende sechs Temperaturen wurden genutzt ( $58,1^{\circ}\text{C}$ ,  $59,1^{\circ}\text{C}$ ,  $60,0^{\circ}\text{C}$ ,  $61,0^{\circ}\text{C}$ ,  $61,9^{\circ}\text{C}$  und  $62,9^{\circ}\text{C}$ ). Die Sauberkeit und die Größe der PCR-Produkte wurden durch die Agarose- Gelelektrophorese kontrolliert.

#### 2.2.10.6. QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR (qPCR)

Die Methode qPCR dient zur Quantifizierung, Vervielfältigung und Identifizierung der Nukleinsäuren (DNA oder cDNA) (Mao et al. 2007). Diese Technik ermöglicht es, mittels kleiner Menge von RNA oder mRNA die Veränderungen der Genexpressionsniveaus zu analysieren, indem das Zielgen (Gene of Interest / GOI) mit dem Referenzgen (Housekeeping Gene / HKG) verglichen wird. In dieser Analyse sind die Zielgene diejenigen Gene, deren Expression unter verschiedenen Bedingungen gemessen werden. Die Housekeeping Gene sind die Gene, die in jeder Zelle eines Organismus unabhängig von Gewebetyp oder Entwicklungsstadium unter Normalbedingungen exprimiert werden.

Diese Gene werden zur Normalisierung der Expression der Zielgene in der qPCR oder anderen Analysemethoden eingesetzt, weil davon ausgegangen wird, dass die Expression des HKGs durch die verschiedenen experimentellen Bedingungen nicht beeinflusst wird. In der Literatur werden unterschiedliche Referenzgene benannt, die in Tabelle 35 aufgelistet werden.

**Tabelle 35:** Darstellung der Referenzgene

| <b>Symbol</b> | <b>Gename</b>                                   | <b>Literatur</b>        |
|---------------|---|-------------------------|
| ACTB          | $\beta$ -actin                                  | Piovan et al. 2021      |
| ALB           | Albumin   | Xing et al. 2009        |
| B2M           | $\beta$ -2-mikroglobulin                        | Silver et al. 2006      |
| EF1 $\alpha$  | Elongation factor 1-alpha                       | Gu et al. 2011          |
| GAPDH         | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase        | Thellin et al.1999      |
| HMBS          | Hydroxymethylbilane synthase                    | Zhang et al. 2017       |
| HPRT1         | Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase | Valente et al. 2009     |
| TUBA          | $\alpha$ -Tubulin                               | Liu et al. 2014         |
| TATA          | TATA-box-binding protein                        | Yüzbaşıoğlu et al. 2010 |
| UBC           | Ubiquitin C                                     | Turabelidze et al. 2010 |
| 18S rRNA      | 18S ribosomal RNA                               | Kuchipudi et al. 2012   |
| 28S rRNA      | 28S ribosomal RNA                               | Xue at al. 2010         |

Bei dem qPCR-Verfahren werden fluoreszierende Farbstoffe (z. B. SYBR Green, EVA Green) verwendet, die an doppelsträngige DNA binden können. Der Farbstoff-DNA-Komplex emittiert ein starkes Fluoreszenzsignal, das nach jeder Elongationsphase gemessen wird (Wittwer et al. 2013). Wenn dieses Fluoreszenzsignal gegen die Zyklenzahl aufgetragen wird, kann aus der entstehenden Kurve der  $C_t$ -Wert bestimmt werden.  $C_t$  (Schwellenzyklus-Threshold Cycle) entspricht der Anzahl an Zyklen, bei der das Fluoreszenzsignal über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. In diesem Fall dient der  $C_t$ -Wert zur Quantifizierung der DNA-Menge (Valente et al. 2009, Bustin et al. 2005, Bonacorsi et al. 2021).

### 2.2.10.6.1. DIE BESTIMMUNG DER cDNA-MENGE

Zur Feststellung der geeigneten cDNA-Menge wurde die qPCR mit drei unterschiedlichen cDNA-Konzentrationen (5 ng /  $\mu$ l, 7,5 ng /  $\mu$ l und 10 ng /  $\mu$ l) durchgeführt. In den Tabellen 36 und 37 werden das angewendete qPCR-Programm und das Pipettier-Protokoll des Versuchsansatzes einer Standard-qPCR aufgelistet:

**Tabelle 36:** Zusammensetzung eines Standard-qPCR-Ansatzes

| Komponente                          | Volumen      | Endkonzentration                        |
|-------------------------------------|--------------|---|
| My-Budget 5x EvaGreen®QPCR-Mix Plus | 4 $\mu$ l    | 1x                                      |
| Primer 1 (10 pmol/ $\mu$ l)         | 0,4 $\mu$ l  | 200 nM                                  |
| Primer 2 (10 pmol/ $\mu$ l)         | 0,4 $\mu$ l  | 200 nM                                  |
| Template-DNA                        | 1 $\mu$ l    | cDNA: 0,1pg / $\mu$ l - 10 ng / $\mu$ l |
| VE-Wasser                           | 14,2 $\mu$ l |   |

Die einzelnen Komponenten wurden nach den Angaben des qPCR-Protokolls von My-Budget 5x EvaGreen®QPCR-Mix Plus in oben dargestellter Reihenfolge pipettiert. Anschließend wurde die qPCR durchgeführt.

**Tabelle 37:** Standard qPCR-Programm

| Schritt                 | Wiederholung | Temperatur         | Zeit   |
|-------------------------|--------------|--------------------|--------|
| 1. Initialdenaturierung | 1x           | 95°C               | 12 min |
| 2. Denaturierung        |              | 95°C               | 15 s   |
| 3. Annealing            |              | 60-65°C (variabel) | 30 s   |
| 4. Elongation           |              | 72°C               | 30 s   |
| Go to 2                 | 40x          | -                  | -      |
| 5. Dissoziation         |              | 95°C               | 60 s   |
|                         | 1x           | 60°C               | 30 s   |
|                         |              | 95°C               | 30 s   |

### 2.2.10.6.2. PRIMER-TITRATION

Zur Optimierung der Primer Konzentrationen wurde eine Primermatrix erstellt (s. Tab. 38).

**Tabelle 38:** Primermatrix für die qPCR

|         |        | Reverse       |               |               |
|---------|--------|---------------|---------------|---------------|
|         |        | 100 nM        | 150 nM        | 200 nM        |
| Forward | 100 nM | 100 F / 100 R | 150 F / 100 R | 200 F / 100 R |
|         | 150 nM | 100 F / 150 R | 150 F / 150 R | 200 F / 150 R |
|         | 200 nM | 100 F / 200 R | 150 F / 200 R | 200 F / 200 R |

Mit den verschiedenen Primerkombinationen wurde die qPCR durchgeführt. Anhand der  $C_T$ -Werte und der Fluoreszenzsignale wurden die geeigneten Primerkonzentrationen bestimmt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass der  $C_T$ -Wert möglichst niedrig und das Fluoreszenzsignal hoch ist. In Tabelle 39 wird die Zusammensetzung für die Primer-Titration detailliert dargestellt.

**Tabelle 39:** Zusammensetzung für die Primer-Titration

|        |         | Komponente   | Reverse |         |         |
|--------|---------|--------------|---------|---------|---------|
|        |         |              | 100 nM  | 150 nM  | 200 nM  |
| 100 nM | Forward | 5x EvaGreen® | 4 µl    | 4 µl    | 4 µl    |
|        |         | F-Primer     | 0,2 µl  | 0,2 µl  | 0,2 µl  |
|        |         | R-Primer     | 0,2 µl  | 0,3 µl  | 0,4 µl  |
|        |         | cDNA         | 1 µl    | 1 µl    | 1 µl    |
|        |         | VE-Wasser    | 14,6 µl | 14,5 µl | 14,4 µl |
| 150 nM | Forward | 5x EvaGreen® | 4 µl    | 4 µl    | 4 µl    |
|        |         | F-Primer     | 0,3 µl  | 0,3 µl  | 0,3 µl  |
|        |         | R-Primer     | 0,2 µl  | 0,3 µl  | 0,4 µl  |
|        |         | cDNA         | 1 µl    | 1 µl    | 1 µl    |
|        |         | VE-Wasser    | 14,5 µl | 14,4 µl | 14,3 µl |
| 200 nM | Forward | 5x EvaGreen® | 4 µl    | 4 µl    | 4 µl    |
|        |         | F-Primer     | 0,4 µl  | 0,4 µl  | 0,4 µl  |
|        |         | R-Primer     | 0,2 µl  | 0,3 µl  | 0,4 µl  |
|        |         | cDNA         | 1 µl    | 1 µl    | 1 µl    |
|        |         | VE-Wasser    | 14,4 µl | 14,3 µl | 14,2 µl |

### 2.2.10.6.3. DIE STANDARDKURVE

Zur Ermittlung der Effizienz wurde eine Standardkurve erstellt. Dafür wurden die optimale Primerkonzentration, das Pipettier-Protokoll aus der Primer-Titration und fünf unterschiedliche cDNA-Konzentrationen verwendet. In Tabelle 40 werden die cDNA-Konzentrationen und Standardmenge aufgelistet:

**Tabelle 40:** cDNA-Konzentrationen für die Standardkurve

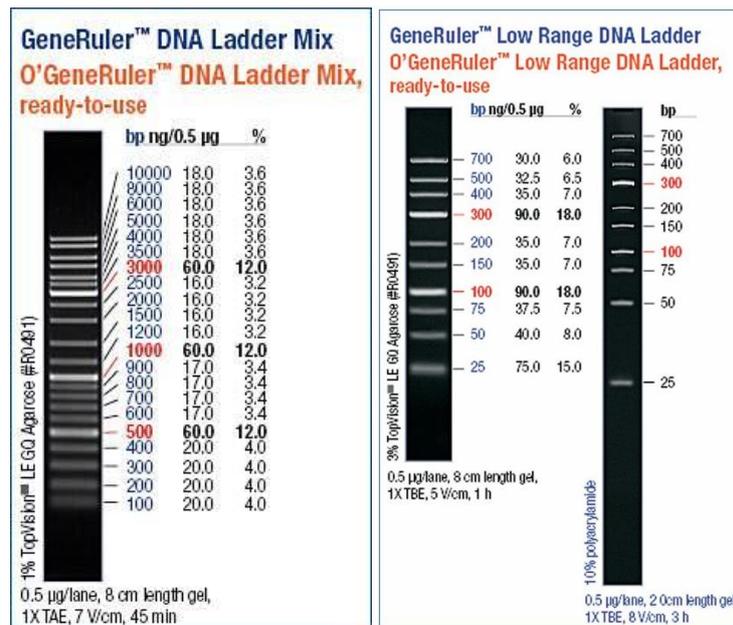
| cDNA-Konzentrationen | Standardmenge |
|----------------------|---------------|
| 10 ng / $\mu$ l      | 1.000e + 1    |
| 5 ng / $\mu$ l       | 5.000e + 0    |
| 2,5 ng / $\mu$ l     | 2.500e + 0    |
| 1,25 ng / $\mu$ l    | 1.250e + 0    |
| 0,625 ng / $\mu$ l   | 6.250e - 1    |
| 0,3125 ng / $\mu$ l  | 3.125e - 1    |

### 2.2.10.7. AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur Visualisierung, Identifizierung und Auftrennung von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) nach ihrer Größe von 100 bp bis zu 25 kb (Lee et al. 2012, Chutia et al. 2019, Anderson et al. 2013). Agarose ist ein Polysaccharid, das aus roten Meeresalgen wie *Gelidium*-, *Gelidiella*- und *Gracilaria*-Arten gewonnen wird (Westermeier 2005, Narayanan et al. 2006, Rao et al. 2018). Sie ist aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose-Einheiten aufgebaut (Zucca et al. 2016). Agarose wird in kochendem Wasser aufgelöst. Dadurch entsteht ein festes Gel beim Abkühlen. Das feste Agarosegel enthält eine netzähnliche Struktur mit großen Hohlräumen (Molekularsieb). Je höher die Agarosekonzentration ist, desto kleinere Hohlräume entstehen im Gel (Campbell & Reece 2009). Größere Moleküle werden durch die kleineren Hohlräume abgebremst und wandern dementsprechend langsamer als kleinere Moleküle (Chutia et al. 2019).

Aufgrund der Phosphatgruppen weisen DNA und RNA eine negative Ladung auf, daher wandern sie in einem elektrischen Feld von der Kathode (-) zur Anode (+). Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA hängt von der Größe der DNA-Moleküle, der Konzentration des Agarose-Gels, der Konformation der DNA, der elektrischen Spannung, der Präsenz der eingesetzten Farbstoffe, der Agarosesorte und dem Elektrophorese-Puffer ab (Lee et al. 2012).

Für die Kontrolle der PCR-Produkte wurden 2 % Agarose-Gele verwendet. Zur Erstellung des 2 % Agarose-Gels wurden 4 g Agarosepulver mit 200 ml 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer pH 8,5 in eine Glasflasche mit Verschluss gegeben und in der Mikrowelle bei 75 Watt mit aufgelegtem, gelockertem Deckel 4 - 6 min erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst vorlag. Nach leichtem Abkühlen der Agarose wurde ein Rührfisch hinzugegeben und bei 250 rpm gerührt. Anschließend wurde Stain G-Clear (3 - 5 µl pro 100 ml Agarose) hinzugegeben.



**Abbildung 28:** Verwendete Referenzleiter (GeneRuler™ DNA Ladder Mix / GeneRuler™ Low Range DNA Ladder)

Bis zum Verbrauch wurde das Gel im Schrank bei 70°C aufbewahrt. Das Gel wurde in den Gelschlitten gegossen und der Gelkamm im Gelschlitten positioniert. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde der Gelschlitten in die Gelkammer gelegt. Die Gelkammer wurde mit dem 1x TAE-Puffer aufgefüllt. Der GeneRuler™ DNA Ladder Mix und die GeneRuler™ Low Range DNA Ladder wurden, wie in Tabelle 41 beschrieben, angesetzt.

**Tabelle 41:** Zusammensetzung der DNA-Marker

|                                 | <b>GeneRuler™ DNA Ladder Mix</b> | <b>GeneRuler™ Low Range DNA Ladder</b> |
|---------------------------------|----------------------------------|--|
| <b>DNA Ladder</b>               | 100 µl                           | 100 µl                                 |
| <b>6x DNA Loading Dye</b>       | 100 µl                           | -                                      |
| <b>TriTrack DNA Loading Dye</b> | -                                | 200 µl                                 |
| <b>VE-Wasser</b>                | 400 µl                           | 900 µl                                 |

Der Gelkamm wurde aus dem Gel entfernt. 5 µl von jedem PCR-Produkt und 5 µl GeneRuler™ DNA Ladder Mix / GeneRuler™ Low Range DNA Ladder (s. Abb. 28) wurden auf das Gel aufgetragen. Die PCR-Produkte wurden unter 45-minütiger Spannung von 90 V getrennt. Anschließend wurde das Ergebnis mit der Gel-Dokumentationsanlage kontrolliert.

#### **2.2.10.8. AUFREINIGUNG DER PCR-PRODUKTE**

Die Reinigung amplifizierter DNA-Fragmente erfolgte unter Verwendung des Monarch® PCR & DNA Cleanup Kits oder des Monarch® DNA Gel Extraction Kits nach Angaben des Herstellers. Die PCR-Produkte wurden in 30 - 50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert. Die Konzentration und die Reinheit der aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit dem NanoDrop 2000 Spektrophotometer gemessen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **2.2.10.9. SEQUENZIERUNG & ÜBERPRÜFUNG DER PCR-PRODUKTE**

Zur Sequenzierung wurden von jedem aufgereinigten PCR-Produkt 15 µl (5 ng/ µl) genommen und mit 2 µl (10 pmol/ µl) des dazugehörigen Primers gemischt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden von der Firma „Eurofins Genomics (Ebersberg)“ zweimal hintereinander sequenziert. Der Sequenzvergleich erfolgte mit dem Programm „BLASTx“ (Altschul et al. 1990). Anschließend wurden die Sequenzen mit dem Programm „Geneious Prime“ aligniert.

## **2.2.10.10. TRANSKRIPTOMANALYSE**

### **2.2.10.10.1. RNA-ISOLIERUNG VON *EUGLENA GRACILIS***

Zur Probengewinnung für die RNA-Expressionsanalysen wurde *Euglena gracilis* in einem mineralischen Nährmedium nach Cramer & Myers 1952 kultiviert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde jeweils eine 1 ml Probe von drei Schottflaschen (500 ml) sowohl in der Belichtungs- als auch in der Dunkelphase entnommen und bei 14.680 rpm für 3 min zentrifugiert. Je 1 ml Euglena-Suspension wurde die RNA nach dem Protokoll des my-budget Plant RNA Kits isoliert. Die Konzentration und die Sauberkeit der RNA wurde mittels Qubit und Nano Drop gemessen. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

Für die Transkriptomanalyse wurden die hergestellten RNA-Lösungen (800 ng/µl) lyophilisiert und anschließend zur Firma Novogene geschickt.

### **2.2.10.10.2. RNA-ISOLIERUNG VON *DISTIGMA PROTEUS***

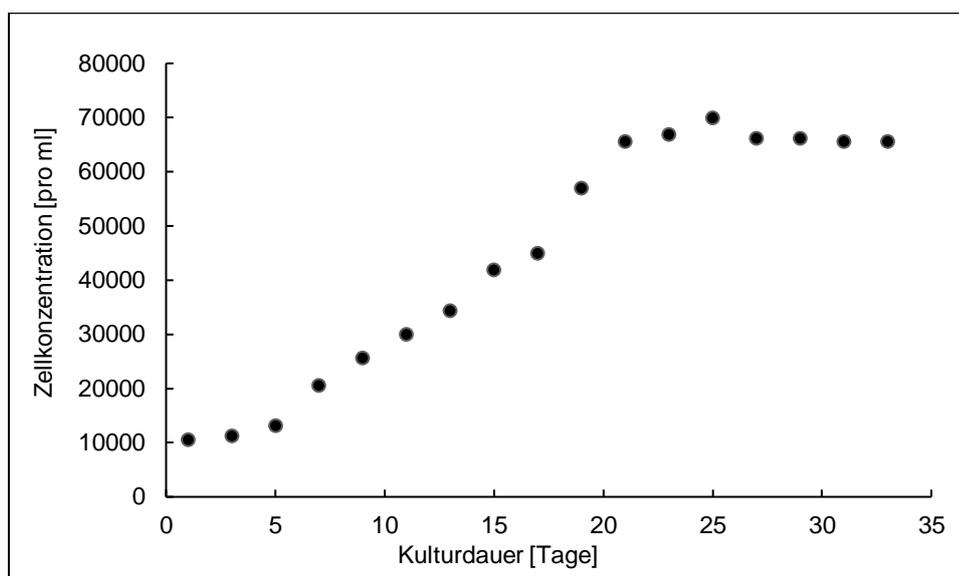
In der logarithmischen Wachstumsphase wurde jeweils eine 1 ml Probe von drei Zellkulturflaschen (500 ml) sowohl in der Belichtungs- als auch in der Dunkelphase entnommen und bei 14.680 rpm für 3 min zentrifugiert. Die RNA-Isolierung erfolgte mittels des my-budget Plant RNA Kits nach Herstellerangaben. Die Konzentration und die Sauberkeit der RNA wurde mittels Qubit und Nano Drop bestimmt. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert. Für die Transkriptomanalyse wurden die RNA-Konzentrationen auf 800 ng/µl eingestellt und lyophilisiert. Im Anschluss daran wurden die RNA-Proben zur Firma Novogene geschickt.

### 3. ERGEBNISSE

Zur Identifizierung des Paramylon-Synthase-Komplexes und der cDNA-Sequenz für den Gen-kodierenden Bereich wurden biochemische und molekularbiologische Daten verwendet. Zunächst wurden die geeigneten Kulturbedingungen für die untersuchten Arten bestimmt. Die partielle Isolierung des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *Distigma proteus* und *Peranema sp.* wurde aufbauend auf den Arbeiten von Bäumer 1998, Bäumer et al. 2001, Brommund 2004 durchgeführt. Anhand der NATIVE-PAGE und SDS-PAGE wurden die molekulare Größe und die vorhandenen Untereinheiten des Paramylon-Synthase-Komplexes bestimmt. Die Aktivitätsmessung des Enzyms erfolgte mittels eines Glucosyltransferase-Aktivitäts-Tests. Der Hauptbestandteil des Enzym-Produktes Paramylon wurde anhand der Dünnschichtchromatographie nachgewiesen. Anschließend wurde die cDNA-Sequenz des Gen-kodierenden Bereiches des Enzyms für alle untersuchten Arten (*Euglena gracilis*, *Distigma proteus*, *Khawkinea quartana* und *Perenema sp.*) basierend auf der Sequenzdaten teilweise identifiziert. Des Weiteren wurden mittels einer Analyse des Transkriptoms von *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* das Genexpressionsmuster und Unterschiede in der Genexpression für das Enzym bestimmt. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse detailliert beschrieben.

#### 3.1. BESTIMMUNG DER ANZUCHTBEDINGUNGEN VON *DISTIGMA PROTEUS*

Zur Isolierung des Paramylon-Synthase-Komplexes musste zunächst eine große Menge von Zellen bereitgestellt werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst geeignete Kulturbedingungen und der optimale Zeitpunkt für das Umimpfen der Zellkulturen bestimmt. Anhand der Ergebnisse wurde eine Wachstumskurve ermittelt (s. Abb. 29).



**Abbildung 29:** Wachstumskurve von *Distigma proteus* über 33 Tage

Der Wachstumskurve ist zu entnehmen, dass die Zellen sich 3 Tage in der Latenz-Phase befanden. Die exponentielle Wachstumsphase setzte nach etwa 5 Tagen ein. Innerhalb von 7 Tagen verdoppelte sich die Zellzahl. Basierend auf der Wachstumskurve ist der beste Zeitpunkt zum Umimpfen der Zellen zwischen dem 10 und 20 Tag der Kultivierung, in diesem Zeitraum weisen die Zellen maximale Wachstumsrate auf. Nach 25-Tagen ging das Zellwachstum leicht zurück, und die Zellen gelangten aufgrund des Nährstoffmangels offensichtlich in die stationäre Phase. Zu dieser Zeit lag die Zelldichte bei  $7 \times 10^4$  Zellen/ml.

Zusätzlich wurde die Eignung verschiedener Flaschen zur Anzucht wurde getestet. Dafür wurde das Erde-Sand-Medium mit Erbsen in unterschiedlichen Größen von Schott-Duran-Flaschen angesetzt. Anschließend wurden bestimmte Volumen von Aufarbeitungskulturen in die Flaschen überimpft (s. Tab. 42).

**Tabelle 42:** Ansätze und Animpfvolumen für unterschiedliche Kultivierungsflaschen

| Flaschenvolumen [ml] | Erbsenanzahl | Lehm [g] | Sand [g] | Animpfvolumen [ml] |
|----------------------|--------------|----------|----------|--------------------|
| 250                  | 8            | 25       | 62,5     | 20                 |
| 500                  | 10           | 50       | 125      | 50                 |
| 1000                 | 15           | 100      | 250      | 100                |
| 2000                 | 30           | 200      | 500      | 200                |

Anschließend wurden die Zellen schrittweise aus den Reagenzgläsern in größere Schott-Duran-Flaschen überimpft. In Abbildung 30 sind beispielhaft die Anzuchtflaschen für *Distigma proteus* dargestellt.



**Abbildung 30:** Anzucht von *Distigma proteus* in Flaschen (250, 500 und 1000 ml) und im Reagenzglas

Zur Aufbewahrung der Stammkulturen wurden 250 ml und 500 ml Schott-Duran-Flaschen verwendet. Zuerst wurde die Aufarbeitungskultur in 1 L Schott-Duran-Flaschen angezogen. Anschließend wurde das Medium in 2 L Schott-Duran-Flaschen nach den beschriebenen Angaben vorbereitet und 500 ml Aufarbeitungskultur in die Flaschen überführt. Abbildung 31 zeigt eine Sammlung von Anzuchtflaschen;



**Abbildung 31:** Anzucht von *Distigma proteus* in mehreren Kulturflaschen mit unterschiedlichen Volumina (250 ml und 2000 ml)

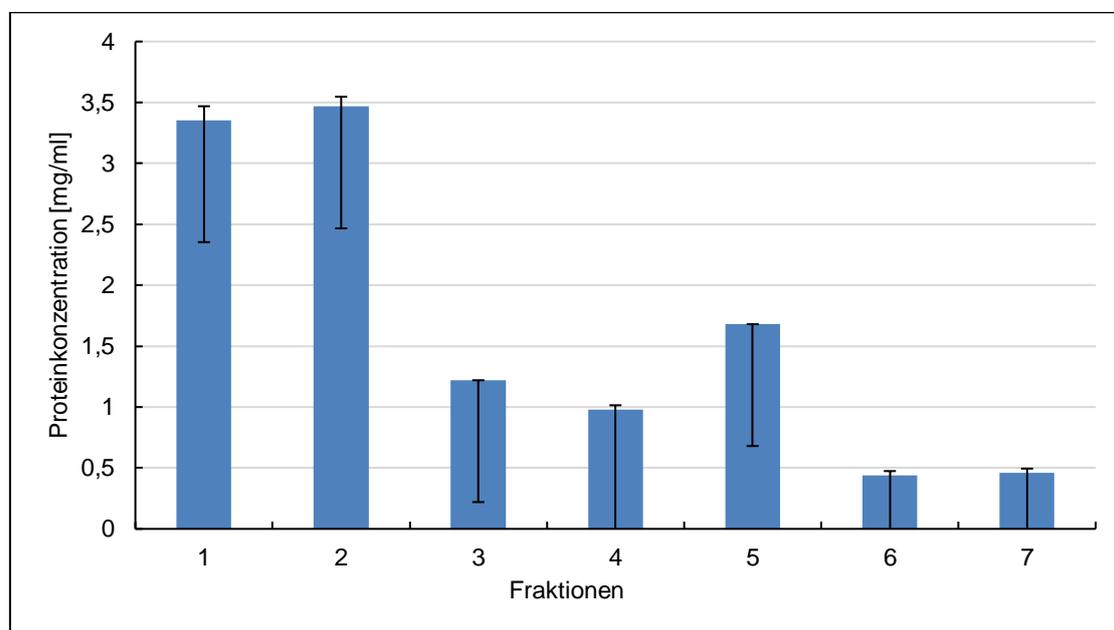
Nach 25 Tagen wurden die Zellen geerntet. Anschließend wurde das Pellet bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Zusätzlich wurde versucht, *Distigma proteus* in einem synthetischen Medium „WEES“ mit Weizenkörnern zu kultivieren. Basierend auf den mikroskopischen Beobachtungen stellte sich heraus, dass die Anzucht nur teilweise erfolgreich war. Zwar wuchsen die Zellen sowohl in den Reagenzgläsern als auch in den kleinen 50 ml Kulturflaschen, aber sie starben innerhalb von drei Tagen ab.

### 3.2. ISOLIERUNG & CHARAKTERISIERUNG DES PARAMYLON-SYNTHESE-KOMPLEXES AUS *DISTIGMA PROTEUS*

Mit Ausnahme der neuen Aktivitätsmessungsmethode dienten die Arbeiten von Brommund 2004 und Bäumer et al. 2001 als Grundlage für die Isolierung und Charakterisierung des Paramylon-Synthase-Komplexes ( $\beta$ -1,3-Glucosyltransferase).

Zur Isolierung des Paramylon-Synthase-Komplexes wurde das eingefrorene Pellet von 191 L Medium verwendet. Nach der Isolation wurde die Proteinkonzentration der Fraktionen mittels der Methode Lowry bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 32 graphisch dargestellt.



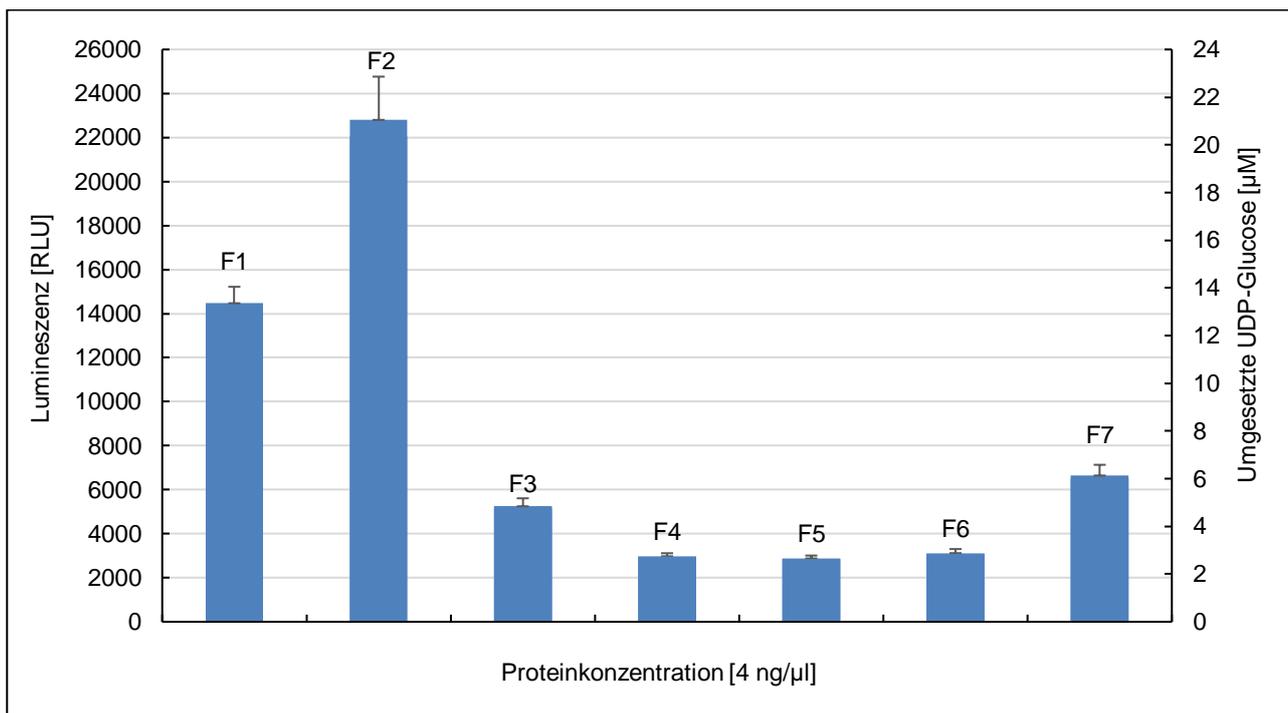
**Abbildung 32:** Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen nach der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Wie Abbildung 32 zu entnehmen ist, gingen mit steigenden Saccharose Konzentrationen (30 - 50 %) schwankende Proteinkonzentration einher.

Die Fraktionen 1 (3,4 mg/μl) und 2 (3,5 mg/ml) wiesen die höchsten Proteinkonzentrationen auf. Diese fanden sich zwischen 30 - 40 % Saccharose-Konzentrationen. Im Gegensatz zu Fraktion 1 ist die Proteinkonzentration der Fraktion 3 um die Hälfte gefallen. Im Vergleich mit den anderen Fraktionen zeigten die Fraktionen 6 (0,44 mg/μl) und 7 (0,46 mg/μl) die niedrigsten Proteinkonzentrationen.

### 3.2.1. UDP-GLO™-GLUCOSYLTRANSFERASE-TEST FÜR *DISTIGMA PROTEUS*

Zur detaillierten Erfassung und Charakterisierung des Paramylon-Synthase-Komplexes wurde die Aktivität der gesammelten Fraktionen mittels des UDP-Glo™-Glucosyltransferase-Tests gemessen. In Abbildung 33 werden Lumineszenz-Messungen (RLU) der Fraktionen auf der linken y-Achse gegen die Proteinkonzentration auf der x-Achse in einem Diagramm zusammengefasst. Auf der rechten y-Achse sind die umgesetzten UDP-Glucose-Konzentrationen [μM] dargestellt, welche anhand der Kalibrierungskurve errechnet wurden.

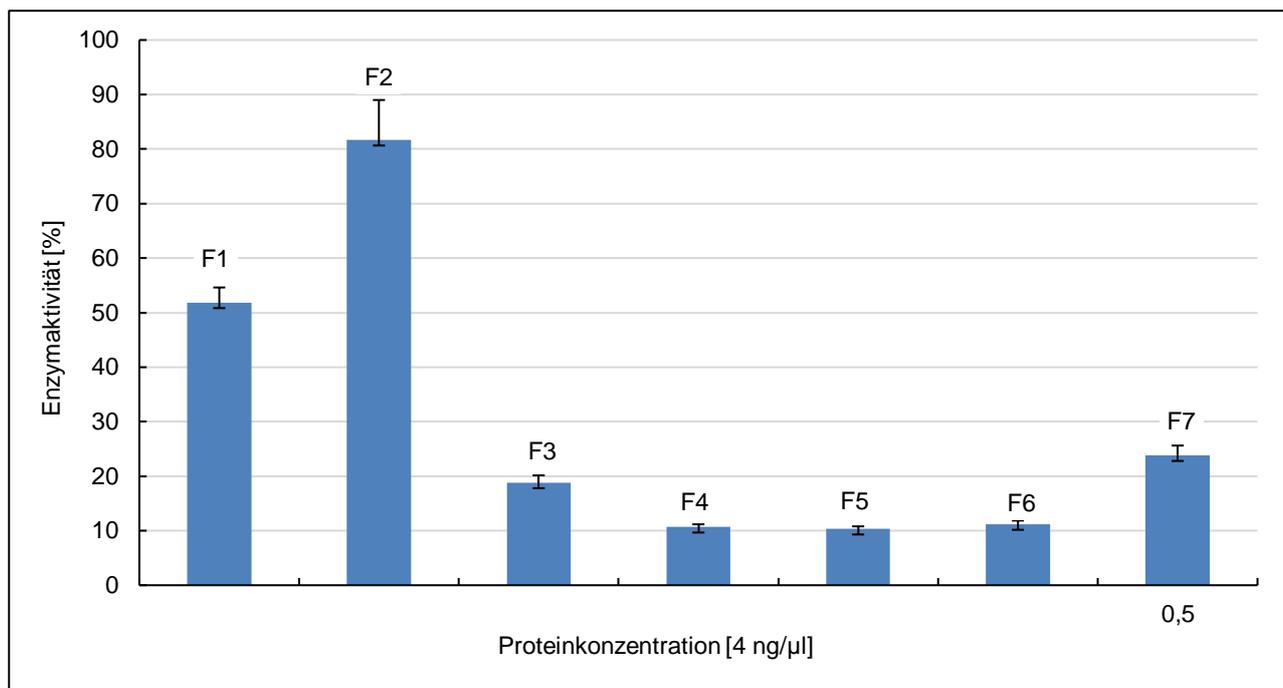


**Abbildung 33:** Lumineszenzwerte der verschiedenen Fraktionen der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation zur Aufreinigung des Paramylon-Synthase-Komplexes von *Distigma proteus*

Auffällig ist, dass alle Fraktionen unterschiedliche Lumineszenzwerte aufwiesen. Im Vergleich zu den anderen Fraktionen zeigten Fraktionen 1 und 2 die höchsten Lumineszenzwerte (14.473 und 22.801 RLU) und umgesetzten UDP-Glucose Konzentrationen (13 und 21 μM). Der Lumineszenzwert von Fraktion 3 (5.248 RLU) betrug

dagegen nur ein Viertel von der Fraktion 2 (22.801 RLU). Die Fraktion 5 wies wiederum Lumineszenzwert (2.878 RLU) auf.

Basierend auf der Kalibrierungskurve (s. Abb. 84) wurde die prozentuale Enzymaktivität der Fraktionen berechnet. In der folgenden Abbildung 34 wird jeweils die relative Enzymaktivität in % im Vergleich zur höchsten gemessenen Aktivität aus der Kalibrierungskurve (= 100 %) angegeben.



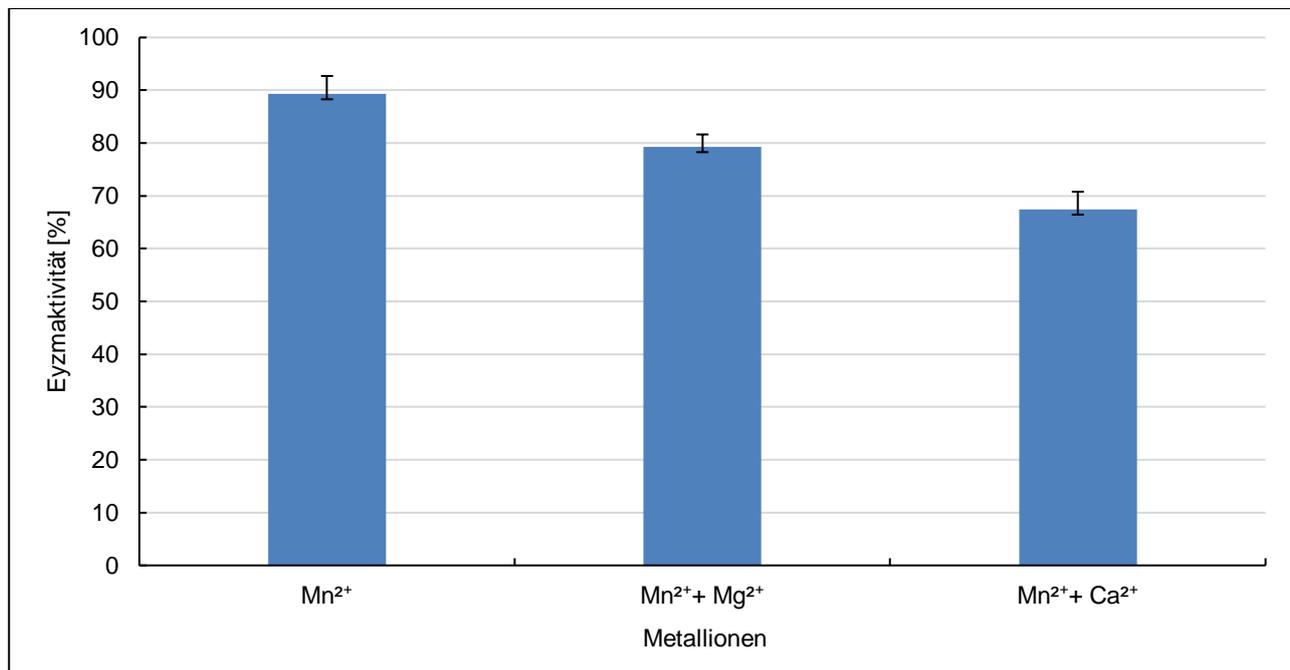
**Abbildung 34:** Relative Enzymaktivität in % des Paramylon-Synthase-Komplexes in den Fraktionen von *Distigma proteus*

Wie aus der Abbildung hervorgeht, war die Enzymaktivität von Fraktion 2 (81,7 %) deutlich größer als Fraktion 1 (51,9 %). Von Fraktion 2 bis Fraktion 5 nahm die Enzymaktivität dagegen stetig ab. Von Fraktion 6 (11,2 %) zu Fraktion 7 (23,8 %) hat sich die Enzymaktivität hingegen wieder mehr als verdoppelt.

### 3.2.2. EINFLUSS DER IONEN AUF DIE ENZYMAKTIVITÄT BEI *DISTIGMA PROTEUS*

Der Einfluss von Metallsalzen auf die Aktivität des aufgereinigten Paramylon-Synthase-Komplexes wurde anhand der Chloridsalze verschiedener Metalle ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) untersucht. Im Rahmen des Tests wurde 5 mM  $Mn^{2+}$  mit dem 1x Glucosyltransferase-Puffer gemischt. Die anderen Metallionen wurden mit einer Konzentration von 2,5 mM zum Testansatz zugegeben. Abbildung 35 zeigt die relativen Enzymaktivitäten des isolierten Paramylon-Synthase-Komplexes in Anwesenheit der unterschiedlichen Metallsalze. Dabei dient die Enzymaktivität der Kalibrierungskurve als 100 %-Referenz für die anderen

Aktivitäten. Das Diagramm zeigt, dass alle untersuchten Metallsalzlösungen einen Einfluss auf die Enzymaktivität des Paramylon-Synthase-Komplexes aufwiesen.

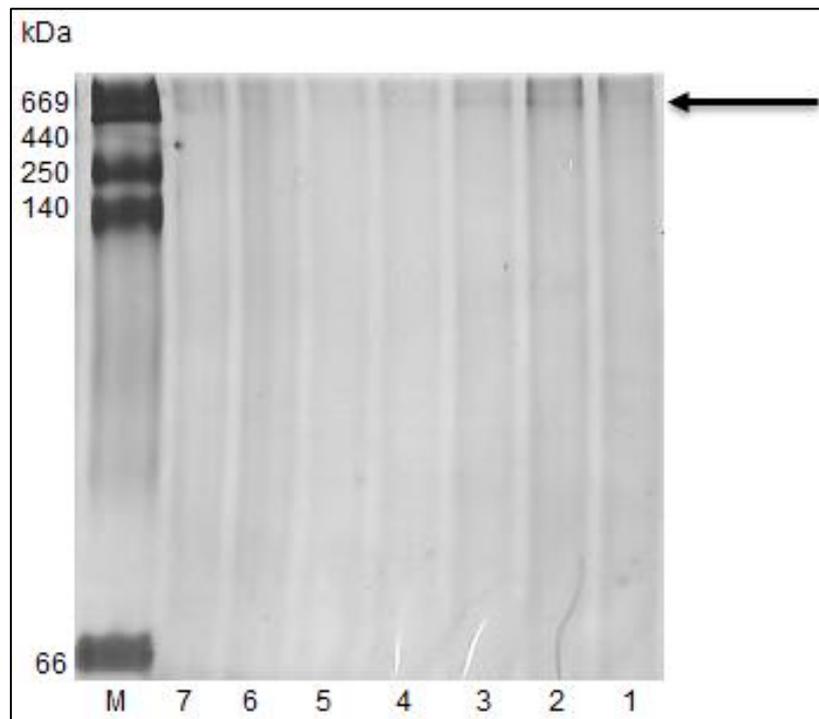


**Abbildung 35:** Einfluss unterschiedlicher Metallionen auf die Enzymaktivität des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *Distigma proteus*

Der Paramylon-Synthase-Komplex wies bei Zugabe von Manganionen eine Enzymaktivität von 89,3 % auf. Die zusätzliche Anwesenheit von Magnesiumionen wirkte hemmend auf die Enzymaktivität (79,3 %). Die Kombination aus Mangan- und Kalziumionen führte zu einer noch stärkeren Verringerung der Enzymaktivität (64,7 %).

### 3.2.3. NATIVE-PAGE DER FRAKTIONEN VON *DISTIGMA PROTEUS*

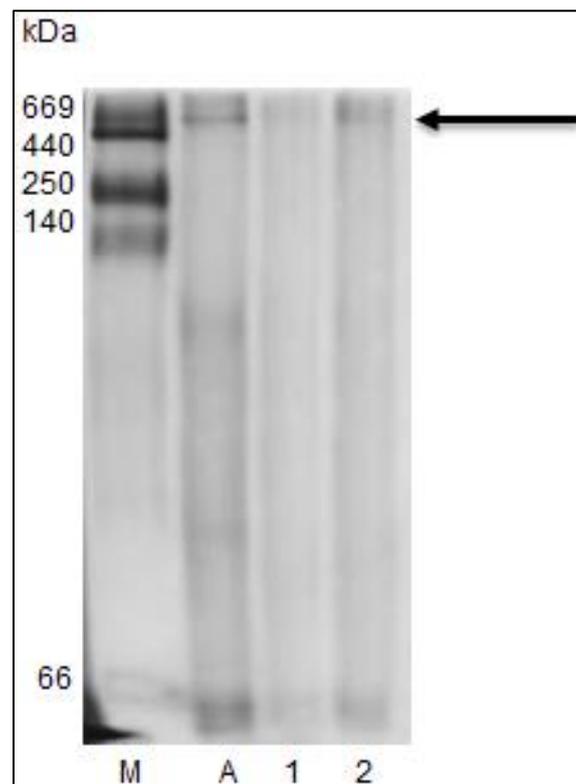
Die Aktivitätsergebnisse sprechen dafür, dass alle gesammelten Proteinfractionen unterschiedliche Konzentrationen des Paramylon-Synthase-Komplexes enthielten. Allerdings könnte es sein, dass sich durch die Solubilisierung mit CHAPS neben dem Paramylon-Synthase-Komplex zusätzliche Proteine oder Proteinkomplexe lösten, welche mit der Paramylon-Membran assoziiert waren. Um die Sauberkeit des Paramylon-Synthase-Komplexes und das Molekulargewicht des Komplexes herauszufinden, wurden die Fractionen auf ein natives Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mittels der Silberfärbung visualisiert. In Abbildung 36 ist das NATIVE-Gel dargestellt.



**Abbildung 36:** Native-PAGE der Saccharose-Dichtegradienten-Fractionen, HMW-Markerproteine in kDa (M), Fraktionsnummer (1 - 7), Pfeil (669 kDa Paramylon-Synthase-Komplex aus *Distigma proteus*)

Aus dem Gelbild geht hervor, dass bei allen Fraktionen eine Proteinbande des Paramylon-Synthase-Komplexes detektiert wurde, die einer Größe von 669 kDa entsprach. Zudem waren keine zusätzlichen Proteinbanden oder Verunreinigungen vorhanden. Die Proteinbanden der verschiedenen Fraktionen unterschieden sich jedoch hinsichtlich ihrer Intensitäten. Die Fraktion 2 zeigte im Vergleich zu den anderen Fraktionen die höchste Intensität. Darüber hinaus wiesen die Fraktionen 4 und 5 die geringste Intensität auf.

Die Fraktionen 1 und 2, welche die höchsten Aktivitätswerte zeigten, wurden gepoolt. Dabei wurde der Puffer B (ohne Saccharose) für das Aufkonzentrieren verwendet. Die gemischte Probe wurde mit dem Pierce™ Proteinkonzentrator 7,5-fach (1,5 ml Probe auf 200 µl) aufkonzentriert. Abbildung 37 zeigt die Vergleichsergebnisse der Fraktionen 1 und 2 und der aufkonzentrierten Probe.

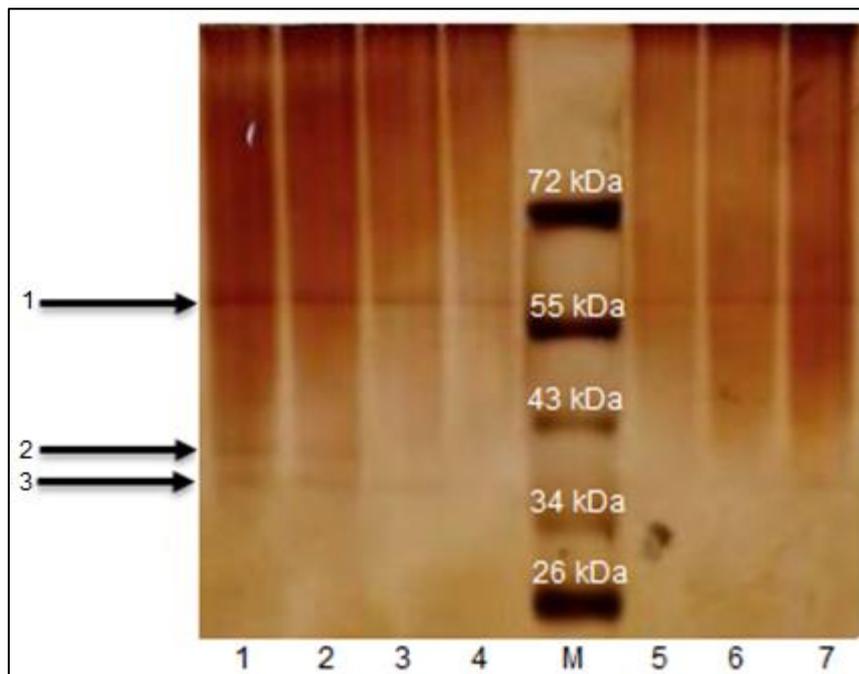


**Abbildung 37:** Native-PAGE der Saccharose-Dichtegradienten-Fractionen, HMW-Markerproteine in kDa (M), Aufkonzentrierte Probe (A) Fraktionsnummer (1-2), Pfeil (669 kDa Paramylon-Synthase-Komplex aus *Distigma proteus*)

Dem Gelbild ist zu entnehmen, dass die Proteinbande der konzentrierten Probe (A) im Vergleich zu den Fraktionen 1 und 2 intensiver ausgeprägt ist. Das Konzentrieren der Probe wies wiederum nach, dass nur die beiden Fraktionen eine saubere Proteinbande enthielten.

#### 3.2.4. SDS-PAGE DER FRAKTIONEN VON *DISTIGMA PROTEUS*

Des Weiteren wurden die Fraktionen mittels der SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen untersucht. In Abbildung 38 ist das Ergebnis des 12,5 %-igen SDS-PAGE-Gels nach Silberfärbung dargestellt. An dem gleichen Proteilmuster der einzelnen Fraktionen ist zu erkennen, dass die Auftrennung der Untereinheiten erfolgreich war. Die SDS-PAGE Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Paramylon-Synthase-Komplex aus drei Proteinen besteht.



**Abbildung 38:** SDS-PAGE der Saccharose- Dichtegradienten-Fractionen, Markerproteine in kDa (M), Fraktionsnummer (1 - 7), Pfeil 1,2,3 (die Untereinheiten des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *Distigma proteus*)

Die erste Untereinheit (s. Pfeil1, s. Abb. 38), die bei allen Fraktionen vorhanden war, wies eine Größe zwischen 55 und 72 kDa auf. Zudem sind bei den Fraktionen 1 und 2 zwei zusätzliche Banden (s. Pfeil 2 und 3, s. Abb. 38) zu erkennen. Die Größe dieser Banden lag zwischen 34 und 43 kDa.

### 3.2.5. AUFREINIGUNG DES PARAMYLONS VON *DISTIGMA PROTEUS*

Zur Aufreinigung des Paramylons wurde das gefrorene Zellpellet von 191 l Zellkultur verwendet. Nach der Isolation des Paramylon-Synthese-Komplexes wurde das freigesetzte Paramylon (s. Abb. 39) zuerst in einer 1 % SDS-Lösung für 1 Stunde am Rückfluss gekocht.



**Abbildung 39:** Paramylon von 191 l Zellkultur

Dann wurde das Paramylon mehrmals mit destilliertem Wasser und Aceton gewaschen. Anschließend wurde das Paramylon für 12 h bei 50°C getrocknet. Abbildung 40 zeigt das getrocknete Paramylon:



**Abbildung 40:** Das Paramylon aus *Distigma proteus*

In Abbildung 40 ist zu erkennen, dass das Paramylon eine dunkelbraune Färbung aufwies.

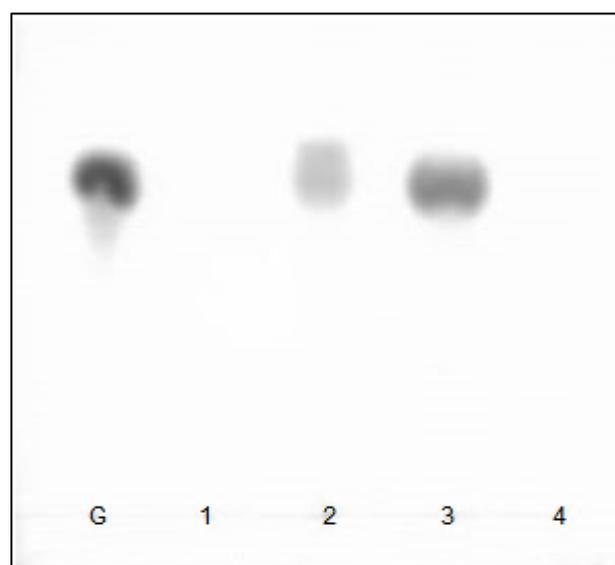
In der Arbeit von Dieter Bäumer wurde beschrieben, dass Paramylon aus *Euglena gracilis* eine strahlend weiße Farbe aufweist (Bäumer 1998). Dieser Farbunterschied lässt sich auf die Erde im Medium zurückführen. Darüber hinaus konnten laut Bäumer durch Fermentieren 1,4 kg Paramylon aus 100 Litern *Euglena gracilis*-Zellkultur gewonnen werden. Im Gegensatz dazu blieb die Ausbeute bei der Kultivierung von *Distigma proteus* in kleinen Mengen, sie betrug nur 4 g.

### 3.3. IDENTIFIZIERUNG & CHARAKTERISIERUNG DES ENZYMPRODUKTS VON *DISTIGMA PROTEUS* MIT HILFE DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Zur Überprüfung der Frage, ob es sich bei dem Enzymprodukt um ein  $\beta$ -1,3-Glucan handelte, wurde das Enzymprodukt einer enzymatischen Analyse unterzogen. Des Weiteren wurde die Stabilität des Produkts in Säure und Alkali untersucht. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Produktidentifizierung und -charakterisierung dargestellt.

#### 3.3.1. ENZYMATISCHE PRODUKTANALYSE MIT PARAMYLON AUS *DISTIGMA PROTEUS*

Zur Identifizierung des Enzymprodukts wurde das isolierte Paramylon einer enzymatischen und dünnschichtchromatographischen Analyse unterzogen. Dabei wurde das Paramylon mit unterschiedlichen Hydrolasen ( $\alpha$ -Amylase,  $\beta$ -Amylase) und Glucanasen ( $\beta$ -1,3-Glucanase,  $\beta$ -1,4-Glucanase) behandelt. Nach der Reaktionszeit wurden die Proben für 2 min bei 100°C erhitzt und anschließend dünnschichtchromatographisch aufgetrennt sowie mit Orcin-Lösung gefärbt. Abbildung 41 zeigt die Abbau-Produkte des Paramylons.



**Abbildung 41:** Dünnschichtchromatogramm nach dem Abbau des Enzymprodukts (Paramylon) aus *Distigma proteus* mit verschiedenen Hydrolasen und Glucanasen, Glucose (G),  $\alpha$ -Amylase (1),  $\beta$ -Amylase (2),  $\beta$ -1,3-Glucanase (3),  $\beta$ -1,4-Glucanase (4)

Aus dem Dünnschichtchromatogramm ist ersichtlich, dass nach der enzymatischen Spaltung mittels  $\beta$ -Amylase (Spur 2) und  $\beta$ -1,3-Glucanase (Spur 3) Spots auftraten. Hierbei war der Spot in der Spur 3 intensiver ausgeprägt als der Spot in der Spur 2. In beiden Fällen waren die Spots auf derselben Höhe wie der Referenzspot von Glucose detektierbar. Für die Inkubation mit  $\beta$ -1,4-Glucanase (Spur 4) wurde kein sichtbares Spaltprodukt identifiziert. Um festzustellen, ob es sich bei den Spaltprodukten um Glucose handelte, wurden die Retentionswerte ( $R_f$ ) berechnet und in Tabelle 43 dargestellt.

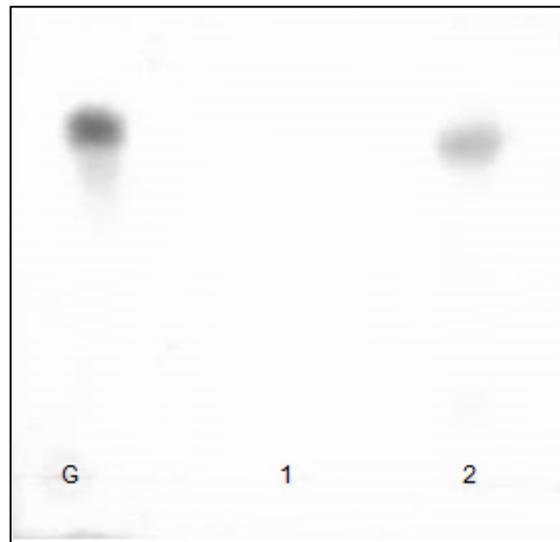
**Tabelle 43:** Retentionswerte der Spaltprodukte

| <b>DC-Ergebnisse (<i>Distigma proteus</i>)</b> |                        |  |
|--|------------------------|--|
| <b>Probe</b>                                   | <b>Substanz</b>        | <b>Retentionsfaktor (<math>R_f</math>)</b> |
| G  | Glucose-Standard       | 0,63                                       |
| 1  | $\alpha$ -Amylase      | -  |
| 2  | $\beta$ -Amylase       | 0,63                                       |
| 3  | $\beta$ -1,3-Glucanase | 0,63                                       |
| 4  | $\beta$ -1,4-Glucanase | -  |

Anhand der berechneten  $R_f$ -Werte wird ersichtlich, dass es sich bei den Spaltprodukten aus den Spuren 2 und 3 um Glucose handelte. Außerdem wurde nachgewiesen, dass Paramylon aus *Distigma proteus* ausschließlich aus Glucose-Molekülen besteht.

### **3.3.2. ALKALI- UND SÄUREHYDROLYSE MIT PARAMYLON AUS *DISTIGMA PROTEUS***

Zur Stabilitätsprüfung des Paramylons gegenüber Säuren und Basen wurde Paramylon mit bestimmten Säure- und Basenlösungen (s. Tab. 30) inkubiert. Dann wurden diese Ansätze mit geeigneten Lösungen neutralisiert und das Paramylon wurde durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurden die Überstände dünnschichtchromatographisch getrennt. Abbildung 42 zeigt das Dünnschichtchromatogramm mit den Hydrolyse-Produkten.



**Abbildung 42:** Dünnschichtchromatogramm nach der Hydrolyse des Enzymprodukts (Paramylon) aus *Distigma proteus* mit Säure und Alkali, Glucose (G), Säurehydrolyse (1), Alkalihydrolyse (2)

Auf dem Chromatogramm ist erkennbar, dass nur in der Spur 2, also nach der Basenbehandlung ein Spot detektierbar ist. Dieser Spot befindet sich auf der Höhe des Referenzspots von Glucose. Allerdings wies der Spot in der Spur 2 eine geringere Intensität als der Referenzspot auf. Die Säurehydrolyse erbrachte keine Spaltprodukte. In Tabelle 44 werden zur Identifizierung des Spaltproduktes die berechneten  $R_f$ -Werte dargestellt.

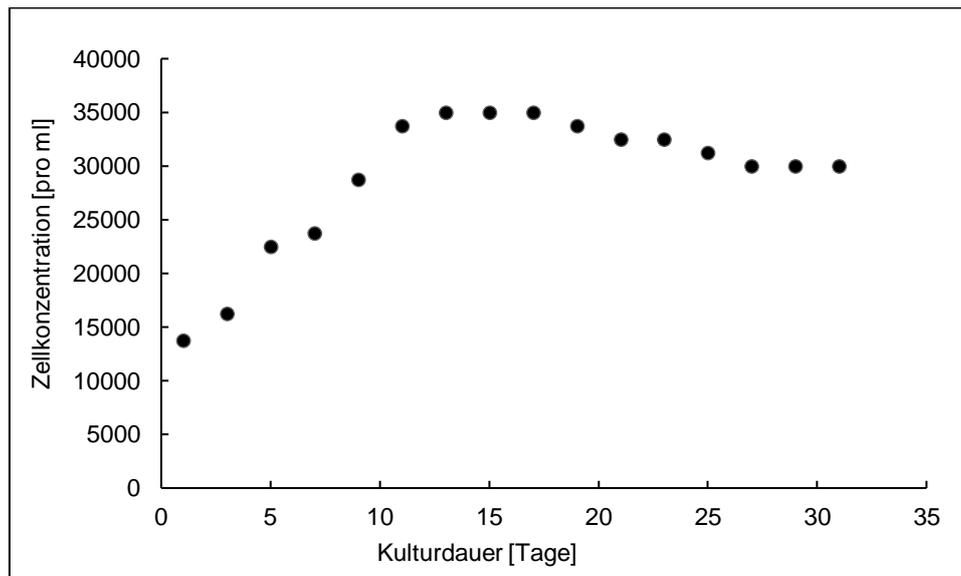
**Tabelle 44:** Retentionswerte der Spaltprodukte

| DC-Ergebnisse ( <i>Distigma proteus</i> ) |                  |                            |
|---|------------------|----------------------------|
| Probe                                     | Substanz         | Retentionsfaktor ( $R_f$ ) |
| G   | Glucose-Standard | 0,64                       |
| 1   | Säurehydrolyse   | -                          |
| 2   | Alkalihydrolyse  | 0,64                       |

Im Hinblick auf diese Ergebnisse wurde festgestellt, dass Paramylon nur durch Alkalilösungen hydrolysiert werden kann. Außerdem wiesen die berechneten  $R_f$ -Werte nach, dass das Spaltprodukt in der Spur 2 Glucose war.

### 3.4. BESTIMMUNG DER ANZUCHTBEDINGUNGEN VON *PERANEMA SP.*

Zunächst wurde eine Wachstumsanalyse zur Optimierung der Kulturbedingungen und der Bestimmung des optimalen Zeitpunktes für die Zellernte durchgeführt. Dabei wurde *Peranema sp.* in mehreren Reagenzgläsern in einem WEES-Medium mit Weizenkörnern bei Raumtemperatur angezogen. Innerhalb der Kultivierungsperiode von 31 Tagen wurde die Zellanzahl alle zwei Tage bestimmt. In Abbildung 43 ist die aufgezeichnete Wachstumskurve von *Peranema sp.* dargestellt:



**Abbildung 43:** Wachstumskurve von *Peranema sp.* über 31 Tage

Aus Abbildung 43 ist zu entnehmen, dass sich die Zellanzahl innerhalb einer Woche mehr als verdoppelt hat. Zum Umimpfen eignete sich der Zeitpunkt nach etwa 7 bis 11 Tagen, weil die Zellen sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden und im Kultivierungsmedium eine hohe Zelldichte erreichten. Nach 15 Tagen stagnierte die Zellzahl bei  $3,5 \times 10^4$ , sodass kein Wachstum mehr stattfand.

Bei dem Anzuchtversuch in großem Maßstab diente die Arbeit von Suetomo et al. 2006 als Grundlage. Zuerst wurden mehrere Aufarbeitungskulturen in Reagenzgläsern angesetzt. Nach 13 Tagen wurden 20 ml Aufarbeitungskulturen aus zwei Reagenzgläsern in den Erlenmeyerkolben überführt. In Abbildung 44 werden die Kultivierungsschritte dargestellt.



**Abbildung 44:** Anzucht in Erlenmeyerkolben (250 ml) und im Reagenzglas

Zur Kultivierung einer großen Menge an Zellen wurden für jede Anzuchtperiode 70 Erlenmeyerkolben befüllt (s. Abb. 45).

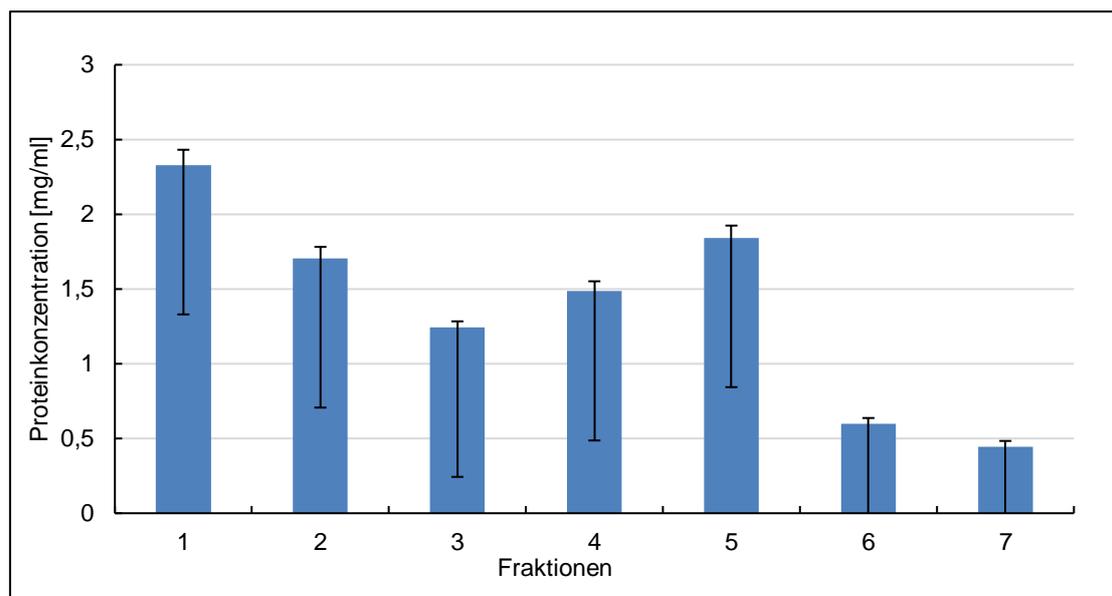


**Abbildung 45:** Anzucht von *Peranema sp.* in mehreren Erlenmeyerkolben

Zudem wurde versucht, *Peranema sp.* in größerem Volumen des Mediums (z. B. 500 ml) anzuziehen. Mikroskopische Untersuchungen wiesen nach, dass diese Kultivierung nicht umsetzbar war. Die Zellen waren binnen einer Woche abgestorben, obwohl die Anzuchtbedingungen variiert wurden.

### 3.5. ISOLIERUNG & CHARAKTERISIERUNG DES PARAMYLON-SYNTHESE-KOMPLEXES AUS *PERANEMA SP.*

Zur Isolierung des Paramylon-Synthase-Komplexes wurde nach denselben Protokollschritten wie bei *Distigma proteus* verfahren. Im ersten Arbeitsschritt wurde das Pellet von 224 l Medium in den Kühlschrank gestellt und gewartet bis das Pellet aufgetaut war. Zu diesem Zeitpunkt lag die Zellanzahl bei  $8,1 \times 10^5$  Zellen pro ml. Nach dem Aufbruch der Zellen mit der French Press wurden durch Zentrifugation Paramylon-Granula als Sediment erhalten. Das Sediment wurde nach den Waschschritten in 33 ml Puffer B resuspendiert und der Proteingehalt wurde mittels der Methode von Lowry und Bradford bestimmt (Lowry et al. 1951, Bradford 1976). Mit dieser Suspension wurde die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Die Fraktionen wurden vorsichtig in 1 ml Volumen gesammelt. Die Proteinkonzentration der Fraktionen wurde mittels der Methode Lowry bestimmt und anhand der Protein-Kalibrierungskurve berechnet (s. Abb. 82). Abbildung 46 zeigt die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen.

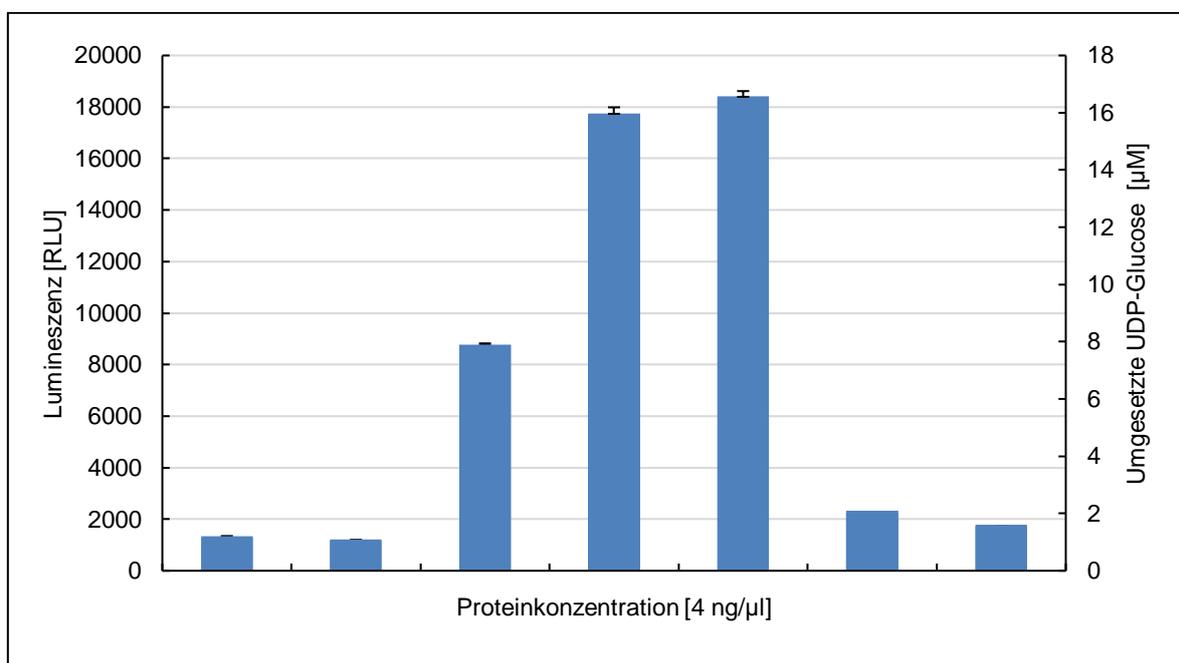


**Abbildung 46:** Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen nach der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation von *Peranema sp.*

Aus dem Diagramm geht hervor, dass die höchste Proteinkonzentration in der Fraktion 1 (2,3 mg/ml) gemessen wurde. Mit steigender Saccharose-Konzentration war die Proteinkonzentration zunächst rückläufig, bevor sie in den Fraktionen 4 (1,5 mg/ml) und 5 (1,8 mg/ml) wieder leicht zunahm. In den Fraktionen 6 (0,6 mg/ml) und 7 (0,4 mg/ml) nahm der Proteingehalt dann wiederum deutlich ab. Der Vergleich mit der Darstellung des Saccharose-Dichtegradienten zeigt, dass die Fraktionen, bei denen der Proteingehalt nachgewiesen wurde, sich im Saccharose-Konzentrationsbereich zwischen 30 und 40 % befanden.

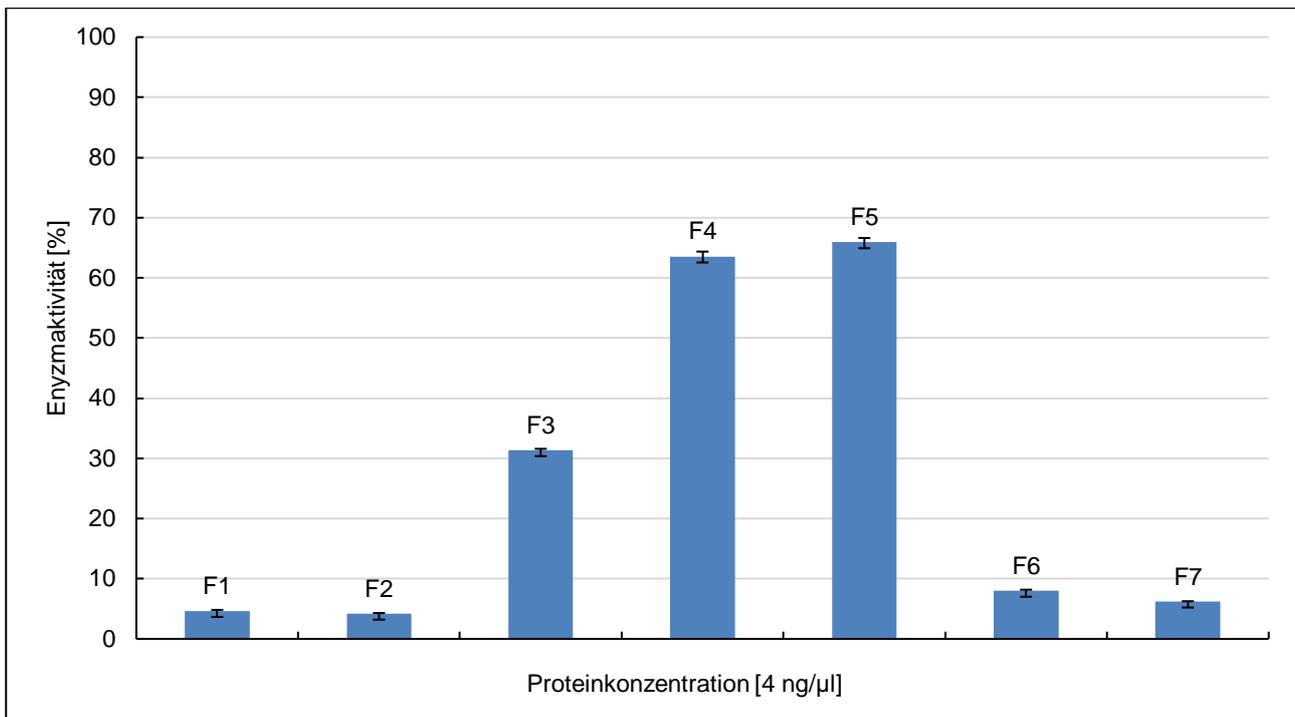
### 3.5.1. UDP-GLO<sup>TM</sup>-GLUCOSYLTRANSFERASE-TEST FÜR *PERANEMA SP.*

Um die Frage zu beantworten, ob die gesammelten Fraktionen den Paramylon-Synthase-Komplex enthielten, wurde die Aktivität mittels des UDP-Glo<sup>TM</sup>-Glucosyltransferase-Tests gemessen. Im Rahmen der Messung wurden von jeder Fraktion 33  $\mu$ l entnommen und auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurden sie mit den anderen Test-Ansätzen gemischt (s. Tab. 29). In Abbildung 47 werden die Lumineszenz-Messungen (RLU) auf der linken y-Achse, die Proteinkonzentration auf der x-Achse und die umgesetzte UDP-Glucose-Konzentration [ $\mu$ M] der Fraktionen auf der rechten y-Achse für die Aufreinigung des Paramylon-Synthase-Komplexes angegeben.



**Abbildung 47:** Enzymaktivitäten der Fraktionen einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation zur Aufreinigung des Paramylon-Synthase-Komplexes von *Peranema sp.*

Es fällt auf, dass sich der Lumineszenzwert von Fraktion 2 (1.171 RLU) zu Fraktion 4 (17.747 RLU) sprunghaft erhöht hat. Dabei zeigen die Fraktionen 4 und 5 (18.407 RLU) die höchsten Messwerte und Fraktion 3 (8.758 RLU) einen mittleren Messwert. Bei den anderen Fraktionen wurden sehr geringe Lumineszenzwerte beobachtet. Die Konzentration der umgesetzten UDP-Glucose korrelierte mit den gemessenen Lumineszenzwerten. Unter allen Fraktionen setzten die Fraktionen 4 (15,9  $\mu\text{M}$ ) und 5 (16,5  $\mu\text{M}$ ) die meiste UDP-Glucose um. Anhand der Kalibrierungskurve wurde die prozentuale Enzymaktivität der Fraktionen berechnet. In Abbildung 48 wird jeweils die relative Enzymaktivität in % im Vergleich zur höchsten gemessenen Aktivität aus der Kalibrierungskurve (= 100 %) angegeben.

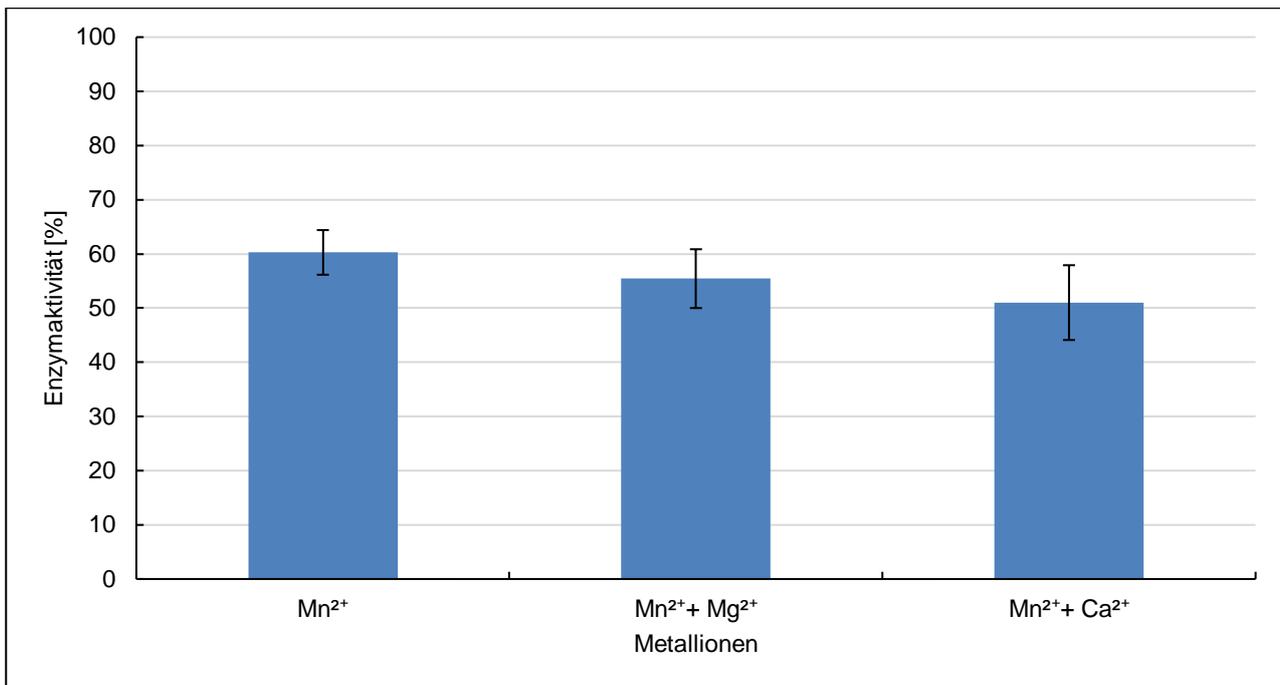


**Abbildung 48:** Relative Enzymaktivität in % des Paramylon-Synthase-Komplexes in den Fraktionen von *Peranema sp.*

Abbildung 48 zeigt, dass bei den Fraktionen 4 (63,5 %) und 5 (65,9 %) die höchsten Enzymaktivitäten gemessen wurden. Anscheinend wurde der Paramylon-Synthase-Komplex hauptsächlich in den Fraktionen 4 und 5 gesammelt. Vergleichsweise wies Fraktion 3 (31,4 %) eine mittlere Aktivität auf. Bei den anderen Fraktionen wurden sehr niedrige Enzymaktivitäten beobachtet.

### 3.5.2. EINFLUSS DER IONEN AUF DIE ENZYMAKTIVITÄT BEI *PERANEMA SP.*

Zur Feststellung und Untersuchung der Ionenabhängigkeit des Paramylon-Synthase-Komplexes wurden dem UDP-Glo™-Glucosyltransferase-Test Effektoren zugesetzt. Bei den Effektoren handelte es sich um Metallionen ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ). Abbildung 49 zeigt die relativen Enzymaktivitäten der isolierten Paramylon-Synthase bei unterschiedlichen Metallsalzen. Dabei diente die Enzymaktivität der Kalibrierungskurve als 100 %-Referenz für die anderen Aktivitäten. Aus dem Diagramm geht hervor, dass alle untersuchten Metall-Salzlösungen einen Einfluss auf die Enzymaktivitäten des Paramylon-Synthase-Komplexes aufwiesen.

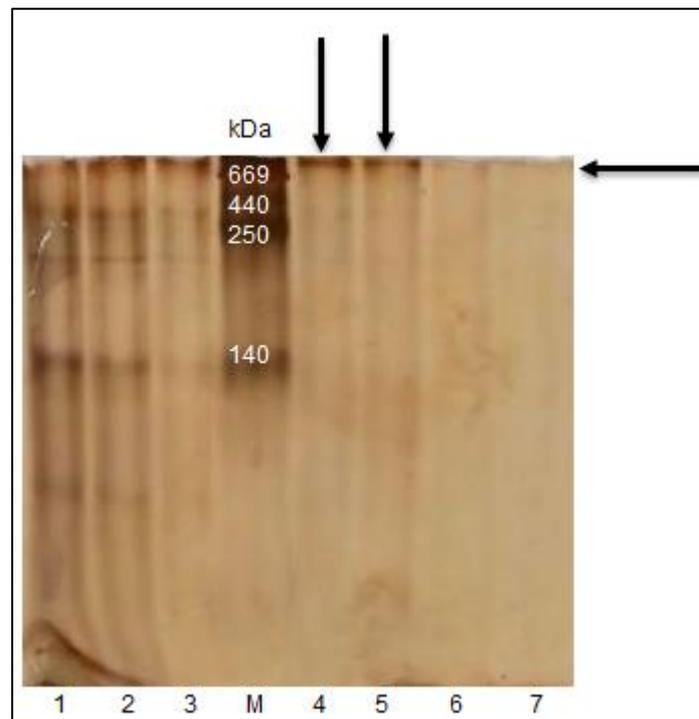


**Abbildung 49:** Einfluss unterschiedlicher Metallionen auf die Enzymaktivität des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *Peranema sp.*

Es ist zu beobachten, dass die Zugabe von Manganionen zu einer hohen Enzymaktivität (60,3 %) führte. Die Zugabe von 2,5 mM Magnesium zum Testansatz bewirkte offensichtlich eine Verringerung der Enzymaktivität (55,4 %). Dieser leicht hemmende Effekt wurde verstärkt, wenn der Testansatz zusätzlich Kalziumionen enthielt (51 %).

### 3.5.3. NATIVE-PAGE DER FRAKTIONEN VON *PERANEMA SP.*

Angesichts der Aktivitätsmesswerte wurde festgestellt, welche Fraktionen Paramylon Synthase enthielten. Zwar ist die Methode für die Aktivitätsmessung empfindlich, aber sie gab keine Auskunft darüber, ob neben dem Paramylon-Synthase-Komplex zusätzliche Proteine bzw. Proteinkomplexe in den Fraktionen vorhanden waren. Zur Visualisierung der Proteine und Feststellung der Sauberkeit der Fraktionen wurde eine NATIVE-PAGE durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit Silber-Lösung gefärbt. In Abbildung 50 ist das NATIVE-Gel dargestellt.



**Abbildung 50:** Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Saccharose-Dichtegradienten-Fraktionen, HMW-Markerproteine (669, 440, 250 und 140 kDa) (M), Fraktionsnummer (1 - 7), drei Pfeile (669 kDa Paramylon-Synthase-Komplex aus *Peranema sp.*)

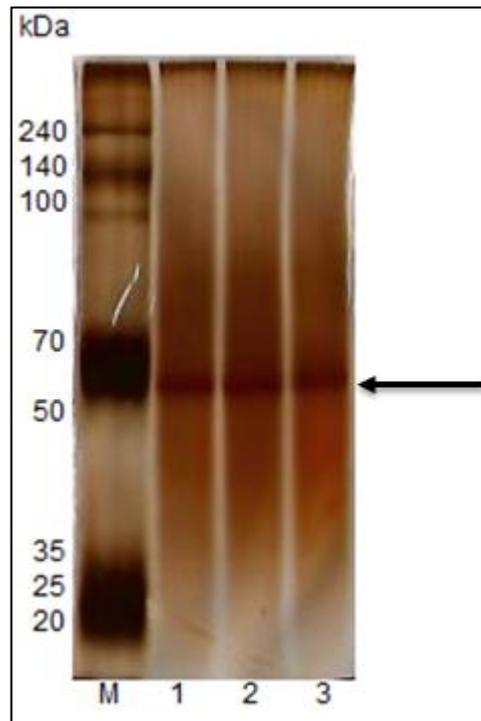
Dem Gelbild ist zu entnehmen, dass die Fraktionen 1 - 3 mehrere Proteinbanden enthielten. Auffällig war, dass bei den Fraktionen 1 und 2 die stärksten Proteinbanden auf Höhe von 440 kDa und 140 kDa der Markerproteinbanden lagen. Außerdem gab es eine weitere Proteinbande, die etwas unterhalb des 250 kDa-Bereiches lag. Mit zunehmender Fraktionsnummer verringerte sich die Intensität dieser Proteinbanden. Ab der Fraktion 3 war eine zusätzliche Proteinbande zu sehen, die ca. 669 kDa groß war. Diese ist bei den Fraktionen 4 und 5 noch intensiver, jedoch bei den weiteren Fraktionen 6 und 7 deutlich schwächer ausgeprägt. Diese Ergebnisse zeigten, dass nur die Fraktionen 3, 4 und 5 den Paramylon-Synthase-Komplex enthielten.

Hinsichtlich der bisher gewonnenen Daten wurde festgestellt, dass die gemessenen Enzymaktivitäten und Proteinkonzentrationen mit dem NATIVE-Gel-Ergebnis korrelierten.

Für die weiteren Untersuchungen wurden die sauberen Fraktionen 4 und 5, die die höchsten Aktivitätswerte zeigten, gepoolt. Die gemischte Probe wurde mit dem Puffer B (ohne Saccharose) mittels des Pierce<sup>TM</sup>-Proteinkonzentrators 6-fach (1,2 ml Probe auf 200 µl) konzentriert.

### 3.5.4. SDS-PAGE DER FRAKTIONEN VON *PERANEMA SP.*

Zudem wurden die gepoolten und die konzentrierten Fraktionen einer SDS-PAGE unterzogen. In Abbildung 51 ist das Ergebnis des 12,5 %-igen SDS-PAGE-Gels nach anschließender Silberfärbung dargestellt.



**Abbildung 51:** Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Gel der Saccharose-Dichtegradienten-Fractionen, Markerproteine in kDa (M), konzentrierte Fraktionen (1 - 3), Pfeil (die Untereinheit des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *Peranema sp.*)

Das Ergebnis der SDS-PAGE zeigte, dass in den Fraktionen 4 und 5 nur eine deutliche Proteinbande enthalten war. Mittels der Markerproteine wurde festgestellt, dass dieses Protein zwischen ca. 50 und 70 kDa groß war.

### 3.5.5. AUFREINIGUNG DES PARAMYLONS VON *PERANEMA SP.*

Zunächst wurden die Zellen aus 224 l mittels der French Press aufgeschlossen. Nach der Isolation des Paramylon-Synthase-Komplexes wurde das Sediment zur Aufreinigung in einer 1 % SDS-Lösung für 1 h am Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurde das Sediment mehrmals mit destilliertem Wasser und Aceton gewaschen. In Abbildung 52 ist Paramylon aus *Peranema sp.* dargestellt.



**Abbildung 52:** Paramylon von 224 l Zellkultur

Anschließend wurde das Paramylon für 12 h bei 50°C getrocknet. Abbildung 53 zeigt das Paramylon.



**Abbildung 53:** Das Paramylon aus *Peranema sp.*

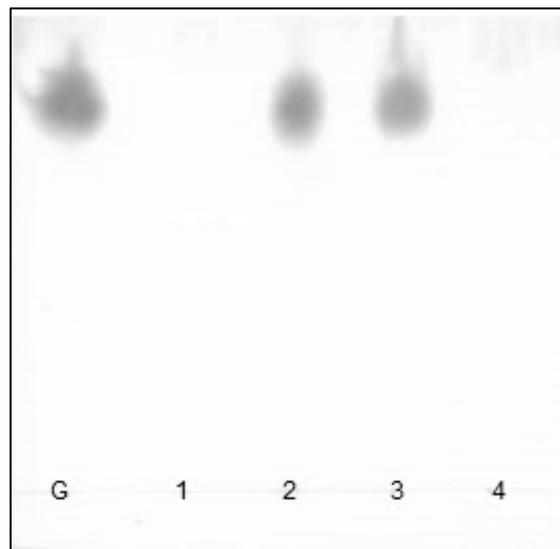
Nach dem Trocknen zeigte das Paramylon aus *Peranema sp.* eine hellbraune Färbung. Die Ausbeute aus 224 l Zellkultur betrug ca. 3,5 g. Die Färbung des Paramylonpulvers lässt sich auf die Erdabkochung aus dem WEES-Medium zurückführen.

### 3.6. IDENTIFIZIERUNG & CHARAKTERISIERUNG DES ENZYMPRODUKTS VON *PERANEMA SP.* MIT HILFE DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Zur Überprüfung der Frage, ob es sich bei dem Enzymprodukt um ein  $\beta$ -1,3-Glucan handelte, wurde das Enzymprodukt einer enzymatischen Analyse unterzogen. Des Weiteren wurde die Stabilität des Produktes in Säure und Alkali untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Produktidentifizierung und -charakterisierung dargestellt.

#### 3.6.1. ENZYMATISCHE PRODUKTANALYSE MIT PARAMYLON AUS *PERANEMA SP.*

Zur Identifizierung des Enzymproduktes wurde das isolierte Paramylon einer enzymatischen und dünnschichtchromatographischen Analyse unterzogen. Dabei wurde das Paramylon mit unterschiedlichen Hydrolasen und Glucanasen behandelt. Nach der Reaktionszeit wurden die Proben für 2 min bei 100°C gekocht, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und mit Orcin-Lösung gefärbt. Abbildung 54 zeigt die Abbau-Produkte des Paramylons:



**Abbildung 54:** Dünnschichtchromatogramm nach dem Abbau des Enzymproduktes (Paramylon) aus *Peranema sp.* mit verschiedenen Hydrolasen und Glucanasen, Glucose (G),  $\alpha$ -Amylase (1),  $\beta$ -Amylase (2),  $\beta$ -1,3-Glucanase (3),  $\beta$ -1,4-Glucanase (4)

Aus dem Dünnschichtchromatogramm ist ersichtlich, dass zwei Spots nach der enzymatischen Spaltung nur mittels  $\beta$ -Amylase (Spur 2) und  $\beta$ -1,3-Glucanase (Spur 3) auftraten. Hierbei war der Spot in der Spur 3 deutlicher als der Spot in der Spur 2, beide lagen auf der Höhe des Referenzspots von Glucose. Der Spot in der Spur 3 sprach ersichtlich für  $\beta$ -1,3-Glucan als Enzymprodukt. Als Letztes wurde durch die Inkubation mit  $\beta$ -1,4-Glucanase kein sichtbares Spaltprodukt identifiziert. Um festzustellen, ob es sich bei den Spaltprodukten um Glucose handelte, wurden die Retentionswerte ( $R_f$ ) berechnet und in Tabelle 45 dargestellt:

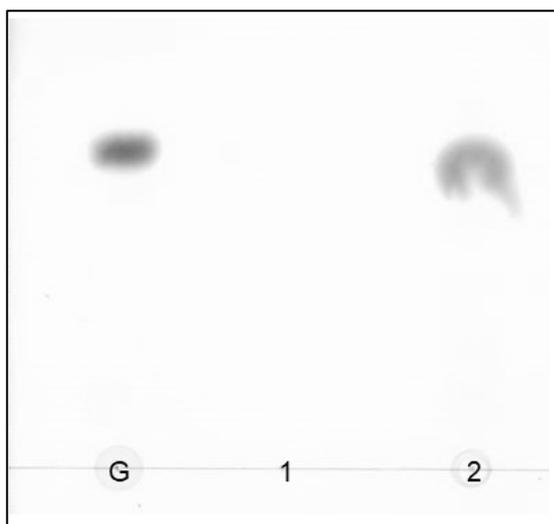
**Tabelle 45:** Retentionswerte der Spaltprodukte

| DC-Ergebnisse ( <i>Peranema sp.</i> ) |                        |                            |
|---------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Probe                                 | Substanz               | Retentionsfaktor ( $R_f$ ) |
| G                                     | Glucose-Standard       | 0,81                       |
| 1                                     | $\alpha$ -Amylase      | -                          |
| 2                                     | $\beta$ -Amylase       | 0,81                       |
| 3                                     | $\beta$ -1,3-Glucanase | 0,81                       |
| 4                                     | $\beta$ -1,4-Glucanase | -                          |

Aus den berechneten  $R_f$ -Werten lässt sich ersehen, dass es sich bei den Spaltprodukten aus den Spuren 2 und 3 um Glucose handelte. Außerdem wurde nachgewiesen, dass Paramylon aus *Peranema sp.* nur aus Glucose-Molekülen besteht.

### 3.6.2. ALKALI- & SÄUREHYDROLYSE MIT PARAMYLON AUS *PERANEMA SP.*

Zur Stabilitätsprüfung des Paramylons gegenüber Säuren und Basen wurde Paramylon mit bestimmten Säure- und Basenlösungen in kleinen Eppendorf-Gefäßen gemischt und für 72 h bei 40°C inkubiert. Dann wurden diese Ansätze mit den geeigneten Lösungen neutralisiert, und das Paramylon wurde durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurden die Überstände dünnschichtchromatographisch getrennt. Abbildung 55 zeigt das Dünnschichtchromatogramm mit den Hydrolyse-Produkten.



**Abbildung 55:** Dünnschichtchromatogramm nach der Hydrolyse des Enzymprodukts (Paramylon) aus *Peranema sp.* mit Säure und Alkali, Glucose (G), Säurehydrolyse (1), Alkalihydrolyse (2)

Aus dem Chromatogramm ist erkennbar, dass nur ein Spot in der Spur 2 zu sehen ist, welcher auf der Höhe des Glucosereferenz-Spots (G) lag. Im Vergleich zu G zeigte der Spot in der Spur 2 eine niedrigere Intensität. Der Abbau mittels Säurehydrolyse erbrachte keine Spaltprodukte. In Tabelle 46 wurden zur Identifizierung des Spaltproduktes die  $R_f$ -Werte berechnet und dargestellt:

**Tabelle 46:** Retentionswerte der Spaltprodukte

| DC-Ergebnisse ( <i>Peranema sp.</i> ) |                  |                            |
|---------------------------------------|------------------|----------------------------|
| Probe                                 | Substanz         | Retentionsfaktor ( $R_f$ ) |
| G                                     | Glucose-Standard | 0,64                       |
| 1                                     | Säurehydrolyse   | -                          |
| 2                                     | Alkalihydrolyse  | 0,64                       |

Im Hinblick auf diese Ergebnisse wurde festgestellt, dass Paramylon nur durch die Alkalilösungen hydrolysiert werden konnte. Außerdem wiesen die berechneten  $R_f$ -Werte nach, dass das Spaltprodukt in der Spur A Glucose war.

### 3.7. DNA-SEQUENZINFORMATIONEN FÜR DEN PARAMYLON-SYNTASE-KOMPLEX AUS BESTIMMTEN ARTEN DER EUGLENIDA

#### 3.7.1. PCR-ERGEBNISSE

#### 3.7.2. IDENTIFIZIERUNG DER GEN-SEQUENZEN

##### 3.7.2.1. VERGLEICH MIT GENSEQUENZ 1 (GSL1) AUS *EUGLENA GRACILIS* Z

Das Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die Paramylon-Synthase-Komplex kodierenden Gen-Sequenzen aus bestimmten Arten der Euglenida (*Euglena gracilis*, *Distigma proteus*, *Khawkinea quartana*, *Peranema sp.*) zu identifizieren. Die Generierung spezifischer Primer zur Amplifikation der Gen-Sequenz wurden anhand der Programme Primer3Plus oder GeneDoc durchgeführt. Dafür wurden Nukleotidsequenzen für die Paramylon-Synthase codierende Gensequenz 1 (LC225614.1, GSL1) angewendet, die für die Art *Euglena gracilis* Z bereits in der vorhandenen Datenbank (NCBI) veröffentlicht wurden. Im Rahmen dieser Analyse wurden cDNAs aus den untersuchten Organismen nach der Bestimmung der Konzentration mittels Nanodrop Lite für die Amplifizierung verwendet. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese veranschaulicht. Anschließend wurden sie aufgereinigt und zur Sequenzierung geschickt. Nach der Sequenzierung wurde die BLASTx-Suche zur Identifizierung der ermittelten Sequenzen eingesetzt.

Die ersten Sequenzierungsergebnisse für den Paramylon-Synthase-Komplex aus den verschiedenen Euglenida werden in Tabelle 47 gezeigt. Darin werden 6 verschiedene Eigenschaften der Sequenz aufgelistet: Organismen, Bester Treffer Gen Nummer, Homologie, Erwartungswert (E) und prozentueller Identitätswert (I) sowie die Primer-Paare (P1 - P8) für jeden Sequenz-Bereich. Die Blastx-Analyse ergab, dass insgesamt 23 Sequenzen signifikante Übereinstimmungen zu dem schon bekannten Protein „Paramylon-Synthase“ aus *Euglena gracilis* Z zeigten. Für jede Blastx-Suche gab es nur einen Treffer. Aus den PCR-Ergebnissen geht hervor, dass die degenerierten Primer-Paare (P1 - P8) sich nicht an jeder cDNA der untersuchten Organismen anlagern konnten.

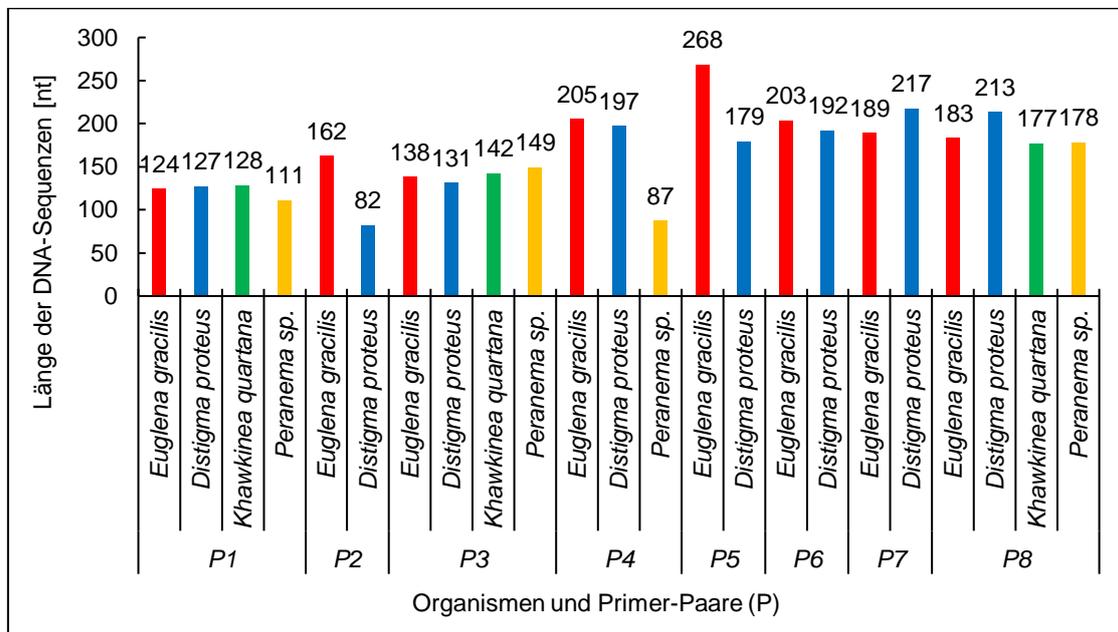
Während die PCR mit P1, P3 und P8 gute Ergebnisse erzielten, waren P2, P4, P5, P6 und P7 nur teilweise erfolgreich. Die prozentuelle Identität der ermittelten Sequenzen schwankt zwischen 75 und 100 % je nach dem Organismus und dem eingesetzten Primer-Paar. Die Sequenz von *Khawkinea quartana* zeigte die höchste prozentuelle Identität von 99,39 %, wohingegen bei *Peranema sp.* nur 75,86 % nachgewiesen werden konnten. Als Nächstes wurden die Sequenzen weiteren Analysen unterzogen.

**Tabelle 47:** BLASTx-Ergebnisse in der NCBI-Datenbank für Paramylon-Synthase-Komplex ( $\beta$ -1,3-glucan synthase) (E = Erwartungswert, I = Prozentueller Identitätswert, Primer-Paare = P1 - P8)

| Organismen                | Bester Treffer Gen Nummer (Accession No.) | Homologie   | E                 | Primer-Paare                          |
|---------------------------|---|---|-------------------|---------------------------------------|
|                           |   |   | I                 |                                       |
| <i>Euglena gracilis</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 2e-39<br>93,22%   | ParsA1.1For /<br>ParsA1.1Rev (P1)     |
| <i>Distigma proteus</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 2e-39<br>93,22 %  |                                       |
| <i>Khawkinea quartana</i> | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 1e-37<br>92,44 %  |                                       |
| <i>Peranema sp.</i>       | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 4e-12<br>96,88 %  |                                       |
| <i>Euglena gracilis</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 5e-27<br>83,89 %  | ParsA1.5For /<br>ParsA1.5Rev (P2)     |
| <i>Distigma proteus</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 1e-18<br>91,03 %  |                                       |
| <i>Euglena gracilis</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 1e-41<br>92,25 %  | ParaDVD1.2For /<br>ParaDVD2Rev (P3)   |
| <i>Distigma proteus</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 6e-40<br>92,13 %  |                                       |
| <i>Khawkinea quartana</i> | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 8e-34<br>91,30 %  |                                       |
| <i>Peranema sp.</i>       | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 0,001<br>85,71%   |                                       |
| <i>Euglena gracilis</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 1e-49<br>86,14 %  | Pars5821For /<br>Pars5821Rev (P4)     |
| <i>Distigma proteus</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 1e-48<br>86,67 %  |                                       |
| <i>Peranema sp.</i>       | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 0,006<br>75,86 %  |                                       |
| <i>Euglena gracilis</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 8e-122<br>98,06 % | Pars6481.1For /<br>Pars6481.1Rev (P5) |
| <i>Distigma proteus</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 4e-73<br>98,19 %  |                                       |
| <i>Euglena gracilis</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 2e-91<br>98,01 %  | Pars7081For /<br>Pars7081Rev (P6)     |
| <i>Distigma proteus</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 2e-80<br>96,34 %  |                                       |
| <i>Euglena gracilis</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 2e-76<br>96,15 %  | Pars7561For /<br>Pars7561Rev (P7)     |
| <i>Distigma proteus</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 8e-81<br>97,80 %  |                                       |
| <i>Euglena gracilis</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 3e-74<br>98,78 %  | GSHEg2For /<br>GSHEg2Rev (P8)         |
| <i>Distigma proteus</i>   | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 2e-77<br>97,73 %  |                                       |
| <i>Khawkinea quartana</i> | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 6e-76<br>99,39 %  |                                       |
| <i>Peranema sp.</i>       | LC225614.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL1 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 5e-77<br>98,26 %  |                                       |

### 3.7.2.2. UNTERSUCHUNG DER BEREICHE DER GENSEQUENZ 1 (GSL1)

Zunächst wurden die untersuchten DNA-Sequenzen in Bezug auf ihre Länge und ihre Basen-Zusammensetzung mittels des Programmes Geneious Pro miteinander verglichen (s. Tab. 48). In Abbildung 56 werden die Ergebnisse veranschaulicht:



**Abbildung 56:** Graphische Darstellung der Längen der DNA-Sequenzen der untersuchten Organismen (*Euglena gracilis* (rot), *Distigma proteus* (blau), *Khawkinia quartana* (grün) und *Peranema sp.* (orange)) und unter der Anwendung der entsprechenden Primer-Paare (P1 - P8)

Betrachtet man Abbildung 56, so wird deutlich, dass die Längendivergenz nicht nur innerhalb der unterschiedlichen Euglenida sondern auch bei den gleichen vervielfältigten Sequenz-Bereichen variiert. Dabei ist die Sequenz von *Distigma proteus* mit 82 Nukleotiden Länge die kürzeste. *Euglena gracilis* verfügt innerhalb der Euglenida mit bis zu 268 Nukleotiden über die längste Sequenz. Des Weiteren wurden die Sequenzen einer Analyse für die Nukleotidzusammensetzung unterzogen. In Tabelle 48 werden die einzelnen Organismen, die Länge der Nukleotide, die prozentuelle Menge der Nukleotide (A, C, G, T (%)), der GC-Gehalt (%), die Primer-Paare (P1 - P8) und die identifizierten Sequenzbereiche (1A - 8A) aufgelistet.

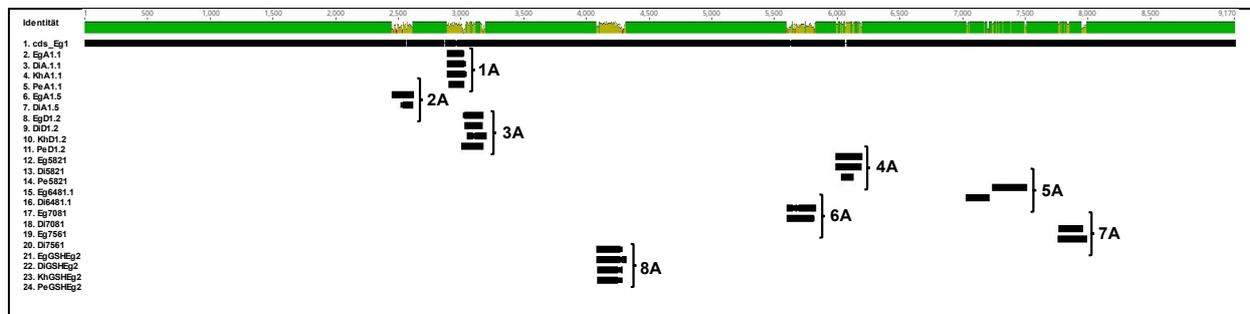
**Tabelle 48:** Länge (nt), Nukleotidzusammensetzung der untersuchten DNA-Sequenzen (Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T), Guanin-Cytosin (G-C)), Primer-Paare (P1 - P8), die identifizierten Sequenzbereiche (1A - 8A)

| Organismen                | Länge [nt] | A (%) | C (%) | G (%) | T (%) | GC (%) | Primer-Paare | Bereich |
|---------------------------|------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------------|---------|
| <i>Euglena gracilis</i>   | 124        | 16,1  | 36,3  | 33,1  | 14,5  | 69,4   | P1           | 1A      |
| <i>Distigma proteus</i>   | 127        | 17,3  | 35,4  | 33,1  | 14,2  | 68,5   |              |         |
| <i>Khawkinea quartana</i> | 128        | 18,8  | 35,9  | 30,5  | 14,8  | 66,4   |              |         |
| <i>Peranema sp.</i>       | 111        | 18,0  | 31,5  | 31,5  | 18,9  | 63,1   |              |         |
| <i>Euglena gracilis</i>   | 162        | 13,0  | 38,3  | 29,6  | 19,1  | 67,9   | P2           | 2A      |
| <i>Distigma proteus</i>   | 82         | 19,5  | 34,1  | 29,3  | 17,1  | 63,4   |              |         |
| <i>Euglena gracilis</i>   | 138        | 21,0  | 27,5  | 34,8  | 16,7  | 62,3   | P3           | 3A      |
| <i>Distigma proteus</i>   | 131        | 22,1  | 28,2  | 36,6  | 13,0  | 64,9   |              |         |
| <i>Khawkinea quartana</i> | 142        | 23,9  | 26,1  | 33,1  | 16,9  | 59,2   |              |         |
| <i>Peranema sp.</i>       | 149        | 20,8  | 27,5  | 36,2  | 15,4  | 64,4   |              |         |
| <i>Euglena gracilis</i>   | 205        | 20,5  | 28,3  | 36,6  | 14,6  | 64,9   | P4           | 4A      |
| <i>Distigma proteus</i>   | 197        | 20,3  | 28,9  | 36,5  | 14,2  | 65,5   |              |         |
| <i>Peranema sp.</i>       | 87         | 19,5  | 28,7  | 46,0  | 5,7   | 74,7   |              |         |
| <i>Euglena gracilis</i>   | 268        | 20,5  | 24,6  | 36,2  | 18,7  | 60,8   | P5           | 5A      |
| <i>Distigma proteus</i>   | 179        | 19,0  | 35,2  | 25,7  | 20,1  | 60,9   |              |         |
| <i>Euglena gracilis</i>   | 203        | 17,7  | 36,5  | 25,6  | 20,2  | 62,1   | P6           | 6A      |
| <i>Distigma proteus</i>   | 192        | 19,3  | 37,0  | 23,4  | 20,3  | 60,4   |              |         |
| <i>Euglena gracilis</i>   | 189        | 13,2  | 37,0  | 27,0  | 22,8  | 64,0   | P7           | 7A      |
| <i>Distigma proteus</i>   | 217        | 12,4  | 35,9  | 26,7  | 24,9  | 62,7   |              |         |
| <i>Euglena gracilis</i>   | 183        | 20,2  | 29,0  | 31,7  | 19,1  | 60,7   | P8           | 8A      |
| <i>Distigma proteus</i>   | 213        | 19,2  | 28,6  | 32,9  | 19,2  | 61,5   |              |         |
| <i>Khawkinea quartana</i> | 177        | 21,5  | 28,2  | 32,2  | 18,1  | 60,5   |              |         |
| <i>Peranema sp.</i>       | 178        | 20,2  | 29,8  | 30,9  | 19,1  | 60,7   |              |         |

Die Nukleotidzusammensetzung der Sequenzen ist innerhalb der untersuchten Spezies weitgehend heterogen. Der GC-Gehalt schwankt von 59,2 % bei *Khawkinea quartana* bis zu 74,7 % bei *Peranema sp.* und korreliert nicht mit der Länge der Sequenzen. So zeigt sich beispielsweise bei *Euglena gracilis* ein niedriger GC-Gehalt von 60,8 % bei der längsten DNA-Sequenz von 268 nt.

### 3.7.2.3. ALIGNIEREN DER DNA-SEQUENZEN MIT DER GSL1

Zur Bestimmung der Position wurden die ermittelten Sequenzen mittels des Computerprogramms Geneious Pro mit der vorhandenen GSL1-Sequenz aligniert. In Abbildung 57 werden die identifizierten Positionen der entsprechenden Organismen auf der GSL1-Sequenz dargestellt:



**Abbildung 57:** Graphische Darstellung der Sequenzen für die Bereiche (1A - 8A), *Euglena gracilis* Z (cds\_Eg1, LC225614.1), *Euglena gracilis* (Eg), *Distigma proteus* (Di), *Khawkinea quartana* (Kh), *Peranema sp.* (Pe)

Der Abbildung 57 ist zu entnehmen, dass insgesamt 8 unterschiedliche Gensequenz-Bereiche aus 23 Sequenzen auf der GSL1 festgestellt wurden. Die Bereiche 1A, 3A, 8A sind bei allen untersuchten Organismen vorhanden. Die übrigen Bereiche konnten nicht bei allen Euglenida identifiziert werden. Vergleicht man diese Regionen, fällt auf, dass die Regionen 1A, 2A und 3A nebeneinander liegen. Die anderen Bereiche positionieren sich diffus. In dem folgenden Abschnitt werden die Alignments von jeder GSL1-Region untersucht.

### 3.7.2.4. UNTERSUCHUNG DER ALIGNMENTS FÜR DIE EINZELNEN BEREICHE IN GSL1

Die im ersten Abschnitt identifizierten Regionen werden innerhalb der untersuchten Organismen miteinander verglichen. Ziel ist es, festzustellen, an welchen Positionen zusätzliche oder ähnliche Nukleotide der Gensequenzen der Euglenida liegen. Dafür wurden mit den vorhandenen Daten Multiple Sequenz-Alignments durchgeführt. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 58 - 65 detailliert dargestellt:

| BEREICH 1A     |  |                                  |
|----------------|--|----------------------------------|
|                |  | *   **   * * * * *   *   * * * * |
| <b>cds_Eg1</b> | CGTGGTGTACACGGTGTCTGTTCCCTGGCGGTG-----CAGCAGTACGCGGAGAACCTGCGC | <b>2890</b>                      |
| <b>EgA1.1</b>  | -----GGACGCGCGCCTGCTGGCAGTG-CTCCCCGAAGTCCGCCCAC-GCCTCCGG       | <b>49</b>                        |
| <b>DiA1.1</b>  | -----GGACGCGCGCCTGCTGGCAGTG-CTCCCCGAAGTCCGCCCAC-GCCTCCGG       | <b>49</b>                        |
| <b>KhA1.1</b>  | -----ACGCGCGCCTGCTGGCAGTAGCTCCCCGAAGTCCGCCCAC-GCCTCCGG         | <b>48</b>                        |
| <b>PeA1.1</b>  | -----GCATGTGCTTCCCCGAAATCCGCCCAC-GCCTCCGG                      | <b>35</b>                        |
|                | *   * * * *   * * * *   * * * *   *   * * * *   *              |                                  |
| <b>cds_Eg1</b> | ----CAGGCG--GCCCACT-----TCAAGAAGCGCA---TCTGGCAGTACCTCTCTCT     | <b>2935</b>                      |
| <b>EgA1.1</b>  | GTGCTCTGGCGAGTCCCACGCCTGGTCTAGCGGGTTCGAACTCCGGCAACGCAGAGGAGAG  | <b>109</b>                       |
| <b>DiA1.1</b>  | GTGTTCCGGCGAGTCCCACGCCTGGTCCAGCGGGTCAAACCTCCGGCAACGCAGAGGAGAG  | <b>109</b>                       |
| <b>KhA1.1</b>  | GTGCTCCGGCGAGTCCCACGCCTGGTCCAGTGGGTCAAACCTCCGGCAACGCAGAGGAGAG  | <b>108</b>                       |
| <b>PeA1.1</b>  | GTGTTCTGGCGAGTCCCACGCCTGGTCTAGTGGGTCAAACCTCCGGCAACGCAGAGGAGAG  | <b>95</b>                        |
|                | *   * * * * *  |                                  |
| <b>cds_Eg1</b> | GCGTTGCCAGAATTCGAC-----CCGCTGGACCAGGCGTGGGACTCGCCGGAGC-        | <b>2984</b>                      |
| <b>EgA1.1</b>  | GTACTGCCAGA--TCAC-----   | <b>167</b>                       |
| <b>KhA1.1</b>  | GTACTGCCAGA--TAAAC-----TGTC-----                               | <b>154</b>                       |
| <b>DiA1.1</b>  | GTACTGCCAGA--TAGAC-----GT-----                                 | <b>155</b>                       |
| <b>PeA1.1</b>  | GTACTGCCAGT--GTGAG-----  | <b>153</b>                       |

**Abbildung 58:** Aligierte DNA-Sequenzen der amplifizierten Bereiche des Paramylon-Synthase-Komplexes aus GSL1 von *Euglena gracilis* Z (cds\_Eg1, LC225614.1), *Euglena gracilis* (EgA1.1, 1224/5-25), *Distigma proteus* (DiA1.1), *Khawkinea quartana* (KhA1.1), *Peranema sp.* (PeA1.1), (P1 - s. Tab. 47) (Sterne und gold markierte Bereiche zeigen die identischen Nukleotide)

Abbildung 58 zeigt das Alignment von DNA-Sequenzen aus den untersuchten Organismen und die GSL1-Sequenz von *Euglena gracilis* Z (LC225614.1). Diese Sequenzen liegen in den GSL1-Bereichen von 2.890 bp bis 2.984 bp. Vergleicht man die Gensequenzen der identifizierten Bereiche, so fällt auf, dass einige Nukleotide bei *Euglena gracilis*, *Distigma proteus*, *Khawkinea quartana* und *Peranema sp.* ähnlich sind, während die Sequenz von *Euglena gracilis* Z abweicht. An einigen Positionen sind konservierte Bereiche zu sehen. Die Anzahl der identischen Regionen bzw. der Paarweise-Identität liegt bei 39,3 % bzw. 72,2 %. In diesem Bereich wurde ein DXD-Motiv identifiziert, das bei fast allen Glucosyltransferasen als wichtiges charakteristisches Merkmal gilt. Bei dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis*, *Distigma proteus*, *Khawkinea quartana* und *Peranema sp.* handelt es sich um eine Aminosäuren-Kombination von Aspartat (D) und Valin (V), so dass sich ein DVD-Motiv ergibt.

| BEREICH 2A     |  |             |
|----------------|--|-------------|
| <b>cds_Eg1</b> | GGGAGTGGCAGGGCCAGCGCGAGGGGCCACCCCGCTCCCCACCTCGCGGAGCGCCTGG   | <b>2438</b> |
| <b>EgA1.5</b>  | -----GCATGGTCCCGCC   | <b>13</b>   |
| <b>DiA1.5</b>  | -----  |             |
| <b>cds_Eg1</b> | AGTGGGACACCCGCTTCGCGGACCGCGTCGGCCCCCTCTCCGCCTTCCTGCACCAGTACA | <b>2498</b> |
| <b>EgA1.5</b>  | GATCACGCGTCCGCCGCGCCTTTCGGCGCTTGCCACCTTGGCCTGCTTGTCCCGGCTGT  | <b>73</b>   |
| <b>DiA1.5</b>  | -----T   | <b>1</b>    |
|                | *** **** * *** ** * ** * *** * * **** ** *                   |             |
| <b>cds_Eg1</b> | AGGACGTCCTTAACGCTGGACACGGAGACGCTGCAGATCCAC-----CTGAAGGAGGA-C | <b>2551</b> |
| <b>EgA1.5</b>  | AGG-CGTC-----CCCGACCCGTACACTGTCCCAGTCCCCGAAGCGGGGCAGGATGAGC  | <b>126</b>  |
| <b>DiA1.5</b>  | AGG-CGTC-----CCCGACCCGTACACTGTCCCAGTCCCCGAAGCGGGGCAGGATGAGC  | <b>54</b>   |
|                | ** * ** * ** ** * * **                                       |             |
| <b>cds_Eg1</b> | GCCAACACCAAGTCCGTGGTGGACGGCACC--GGGCGCAGTTCATCGCGCAGTGCTACA  | <b>2609</b> |
| <b>EgA1.5</b>  | TGCAGCTTCATGCCCTCGGAGTAGTACACCTCAGGG-----                    | <b>186</b>  |
| <b>DiA1.5</b>  | TGCAGCTTCATGCCCTCGGAGTAGTACA-----                            | <b>114</b>  |

**Abbildung 59:** Aligierte DNA-Sequenzen der amplifizierten Bereiche des Paramylon-Synthase-Komplexes aus GSL1 von *Euglena gracilis* Z (cds\_Eg1, LC225614.1), *Euglena gracilis* (EgA1.5, 1224/5-25), *Distigma proteus* (DiA1.5), (P2 - s. Tab. 47) (Sterne und gold markierte Bereiche zeigen die identischen Nukleotide)

Die Identifizierung des Bereiches 2A erwies sich als teilweise erfolgreich, denn im Gegensatz zu den anderen untersuchten Euglenida zeigen nur *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* diese Gensequenz. Dem Alignment ist zu entnehmen, dass einige Sequenzen Homologien zwischen *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* zeigen. Diese Sequenz befindet sich in den GSL1-Bereichen von 2.438 bp bis 2.609 bp. Die Anzahl der identischen Regionen bzw. der Paarweise-Identität liegt bei 39,3 % bzw. 60,9 %.

| BEREICH 3A     |  |            |             |
|----------------|--|------------|-------------|
| <b>cds_Eg1</b> | GCGTTGCCAGAATTCGAC-----CCGCTGGACCAGGCGTGGGAC                 | ***** ** * | <b>2984</b> |
| <b>EgD1.2</b>  | -----GC-----CCTAGGA--CAGGCGTGGGAC                            |            | <b>31</b>   |
| <b>DiD1.2</b>  | -----GGAACCAGGCGTGGGAATCGCCGGAAC-                            |            | <b>27</b>   |
| <b>KhD1.2</b>  | -----ATCGCCGGAACA  |            | <b>12</b>   |
| <b>PeD1.2</b>  | -----AGGGCTGATGAC-----CCTAGGAA-CAGGCGTGGGAC                  |            | <b>42</b>   |
|                | *** ** ** ***** ***** ** * * ** ***** *****                  |            |             |
| <b>cds_Eg1</b> | ACCCGGGGGCGTGGGCGGACTTCGGGGAGCATTGTC--AGCAGG-CACGCGGCCTGCTGA |            | <b>3041</b> |
| <b>EgD1.2</b>  | ACCCGGAGGCGTGGGCGGACTTCGGGGAGCACTGCCA-A-CAGGT-GCGCGTCTTGCTGA |            | <b>88</b>   |
| <b>DiD1.2</b>  | CCCGGGAGGCGTGGGCGGACTTCCGGGAGCACTGCCA-AGCAAGGCGCGCGGCCTGCTGA |            | <b>86</b>   |
| <b>KhD1.2</b>  | ACCCGGAGGTGTGGGCGGATTCGGGGAGCACTGCC--AGCAGG-CGCGCGTCTTGCTGA  |            | <b>69</b>   |
| <b>PeD1.2</b>  | -CCCGGAGGCGTGGGCGGACTTCGGGGAGCACTGCCA-AGCAGGTGCGCGTCTTGCTGA  |            | <b>100</b>  |
|                | ***** ***** ** *   |            |             |
| <b>cds_Eg1</b> | AGTACCTGCTGACGCTGGTGGACAAGAACAGTATCAACTT-CGCGGACGTGGACGACATC |            | <b>3100</b> |
| <b>EgD1.2</b>  | AGTACCTGCTGACGCTGGTGGACAAGAACAGTATCAACT-TCGCGGATGTT-----     |            | <b>147</b>  |
| <b>DiD1.2</b>  | AGTACCTGCTGACGCTGGTGGACAAGAACAGTATCAACT-TCGCAG-----          |            | <b>145</b>  |
| <b>KhD1.2</b>  | AGTACCTGCTGACGCTGGTGGACAAGAACAGTATCAACTTTCGCGGAAGAACAGTATCAA |            | <b>129</b>  |
| <b>PeD1.2</b>  | AGTACCTGCTGACGCTGGTGGACAAGAACAGTATCAACT-TCGCGGTCAA-----      |            | <b>159</b>  |
| <b>cds_Eg1</b> | TTCCGCAACACCCGCGTCCCCAGCCCCGCCGGCGCCCCCAGCGCATCCCCATGTACACG  |            | <b>3160</b> |
| <b>EgD1.2</b>  | -----  |            | <b>207</b>  |
| <b>DiD1.2</b>  | -----  |            | <b>205</b>  |
| <b>KhD1.2</b>  | CTTCGCGGAACGG-----   |            | <b>189</b>  |
| <b>PeD1.2</b>  | -----  |            | <b>219</b>  |

**Abbildung 60:** Alignierte DNA-Sequenzen der amplifizierten Bereiche des Paramylon-Synthase-Komplexes aus GSL1 von *Euglena gracilis* Z (cds\_Eg1, LC225614.1), *Euglena gracilis* (EgD1.2, 1224/5-25), *Distigma proteus* (DiD1.2), *Khawkinea quartana* (KhD1.2), *Peranema sp.* (PeD1.2), (P3 - s. Tab. 47) (Sterne und gold markierte Bereiche zeigen die identischen Nukleotide)

Aus dem Alignment wird ersichtlich, dass die ermittelten Gensequenzen sich in den GSL1-Bereichen von 2.984 bp bis 3.160 bp befinden. Alle untersuchten Organismen weisen zahlreiche Sequenzhomologien auf. Die Anzahl der identischen Regionen bzw. der Paarweise-Identität liegt bei 68,2 % bzw. 87,7 %.

| BEREICH 4A     |   |                                    |             |
|----------------|---|------------------------------------|-------------|
| <b>cds_Eg1</b> | GTTGGGGGAGGTGGTCAACATCCTGGACATGAACCAGGACGCGTACTACTCCGA--GGGC  |                                    | <b>5887</b> |
| <b>Eg5821</b>  | -----ACTCCGAAGGG--  |                                    | <b>11</b>   |
| <b>Di5821</b>  | -----ACTCCGAAGGGGC  |                                    | <b>13</b>   |
| <b>Pe5821</b>  | -----   |                                    |             |
|                |   | **      *****    **    *****       |             |
| <b>cds_Eg1</b> | ATGAAGCTGCAGCTCATCCTGCCGCGGTTCGGGGATGCGGACAGCCTGCGGGTCGGGGAC  |                                    | <b>5947</b> |
| <b>Eg5821</b>  | ATGAAGCTGCAGCTCATCCTGCCCCGCTTCGGGGACTGGGACAGTCTACGGGTCGGGGAC  |                                    | <b>71</b>   |
| <b>Di5821</b>  | ATGAAGCTGCAGCTCATCCTGCCCCGCTTCGGGGACTGGGACAGTCTACGGGTCGGGGAC  |                                    | <b>73</b>   |
| <b>Pe5821</b>  | -----GACTGGGACAGCCTGCGGGTCGGGGAC                              |                                    | <b>27</b>   |
|                |   | ***** * **** ***** ***** *** ***** |             |
| <b>cds_Eg1</b> | G-----GCCGGCAGAAGCGGGCGAAGGAGGGCAAGCACCGGAAGGCGCGGCGGGACGCC   |                                    | <b>6001</b> |
| <b>Eg5821</b>  | GCCTACAGCCGGGACAAGCAGGCCAAGGTGGGCAAGCGCCGAAAGGCGCGGCGGGACGCG  |                                    | <b>131</b>  |
| <b>Di5821</b>  | GCCTACAGCCGGGACAAGCAGGCCAAGGAGGGCAAGCGCCGAAAGGCGCGGCGGGACGCG  |                                    | <b>133</b>  |
| <b>Pe5821</b>  | GCCTACGCGCCGGGACAAGCAGGCCAAGGTGGGCAAGCGCCGAAAGGCGCGGCGGGACGCG |                                    | <b>87</b>   |
| <b>cds_Eg1</b> | CTTATCGGCGGGGATCAGTGCGCCATCCTGGGCTTCAAGGAGCAC-ATCTTTACGTACC-  |                                    | <b>6059</b> |
| <b>Eg5821</b>  | TTGATTGGCGGGGACCAGTGCGCCATCCTGGGCTTCAAGGAGCAC-ATCTTTACGTACCG  |                                    | <b>190</b>  |
| <b>Di5821</b>  | TTGATTGGCGGGGACCAGTGCGCCATCCTGGGCTTCAAGGAGCACTATCTTTACGTACCG  |                                    | <b>193</b>  |
| <b>Pe5821</b>  | -----   |                                    | <b>147</b>  |
| <b>cds_Eg1</b> | GGCACTCGGTGGTGGGGCGGTACATGGCGCTGGCGGAGCACGCGTTCGGCACCATCGTGC  |                                    | <b>6119</b> |
| <b>Eg5821</b>  | GGCAGTCGGTGAAAC-----  |                                    | <b>250</b>  |
| <b>Di5821</b>  | GGCA-----   |                                    | <b>253</b>  |
| <b>Pe5821</b>  | -----   |                                    | <b>207</b>  |

**Abbildung 61:** Alignierte DNA-Sequenzen der amplifizierten Bereiche des Paramylon-Synthase-Komplexes aus GSL1 von *Euglena gracilis* Z (cds\_Eg1, LC225614.1), *Euglena gracilis* (Eg5821, 1224/5-25), *Distigma proteus* (Di5821), *Peranema sp.* (Pe5821), (P4 - s. Tab. 47) (Sterne und gold markierte Bereiche zeigen die identischen Nukleotide)

Dieser ermittelte Sequenzbereich befindet sich in den GSL1-Regionen von 5.887 bp bis 6.119 bp und umfasst eine Position der Glucan-Synthase ( $\beta$ -1,3-Glucan-Synthase-Komponente). Bei dieser identifizierten Position liegen die Anzahl der identischen Regionen bzw. der Paarweise-Identität bei 82,7 % bzw. 89,4 %.

| BEREICH 5A      |  |             |
|-----------------|--|-------------|
| <b>cds_Eg1</b>  | GCGGTAACATCCTTTACCTGTTGTGGCCACTCATCGCTGCCATCTCGTACATCATCGCCC   | <b>6959</b> |
| <b>Eg6481.1</b> | -----  |             |
| <b>Di6481.1</b> | -----ATACCTTTACTGTTGTGGCC-CTCATCGCTGCCATCTCGTACATCATCGCCC      | <b>51</b>   |
| <b>cds_Eg1</b>  | CCGTGCTGTACAACCCAAAGCCCACCTGGCGCTCCCTCCTGATCGCCCCGAGGATCTCT    | <b>7019</b> |
| <b>Eg6481.1</b> | -----  |             |
| <b>Di6481.1</b> | CCGTGCTGTACAACCCAAAGCCCACCTGGCGCTCCCTCCTGATCGCCCCGAGGATCTCT    | <b>111</b>  |
| <b>cds_Eg1</b>  | GGGACTGGCTGACGGCCCAGGACGACACGTTCGA-CGTGGAAGACTACCGCATCATTGCC   | <b>7078</b> |
| <b>Eg6481.1</b> | -----  |             |
| <b>Di6481.1</b> | GGGACTGGCTGACGGCCCAGGACGACACGTTCGACCGTGGAAGACTACCGCATCATAAGA   | <b>171</b>  |
| <b>cds_Eg1</b>  | GACAGCTTCCTTCCCCTTGACGCGGGCGGTGAAGGAGAAGATCTTCCGGCAGGCCGAACCTC | <b>7138</b> |
| <b>Eg6481.1</b> | -----ACGTACTTCCGGCAGGCCGAACCTC                                 | <b>24</b>   |
| <b>Di6481.1</b> | GGGGGGGT-----  | <b>231</b>  |
| <b>cds_Eg1</b>  | GGGGAGGTGGACGAGCGGCAGAAAGTTTCGTGCAGGAGTGGGAGAAGCGCGCAAGGGTGGC  | <b>7198</b> |
| <b>Eg6481.1</b> | GGGGAGGTGGATGAGCGGCAGAAAGTTTGTGCAGGAGTGGGAGAAGCGCGCAAGGGCGGC   | <b>84</b>   |
| <b>Di6481.1</b> | -----  | <b>291</b>  |
| <b>cds_Eg1</b>  | GGCCAGCAGCGCAGCCTGCAGACGTACCTCGTGACGCAGTGGTGGCTGTTCCCTGTGCGAC  | <b>7258</b> |
| <b>Eg6481.1</b> | GGCCAGCAGCGCAGCCTGCAGACGTACCTCGTGACGCAGTGGTGGCTGTTCCCTGTGCGAC  | <b>144</b>  |
| <b>Di6481.1</b> | -----  | <b>351</b>  |
| <b>cds_Eg1</b>  | CTCGATGACGCGTACAACGACCATGCCACCGACGAGGTTTTCAAGTCGTTCCCTGTGGGAC  | <b>7318</b> |
| <b>Eg6481.1</b> | CTCCATGACGCGTACAACGACCATGCCACCGACGAGGTTTTCAAGTCGTTCCCTGTGGGAC  | <b>204</b>  |
| <b>Di6481.1</b> | -----  | <b>411</b>  |
| <b>cds_Eg1</b>  | TGGCTGATGAGCTCCCCCGCTATGGTTTGGATTATGAGCAGGTGGACGCGGCGTGGAAG    | <b>7378</b> |
| <b>Eg6481.1</b> | TGGCTGATGAGCTCCCCCGCTATGGTTTGGATTATGAGCAGGTGGACGCGACGTGGAAA    | <b>264</b>  |
| <b>Di6481.1</b> | -----  | <b>471</b>  |
| <b>cds_Eg1</b>  | CTCCGCGGCTACGCGGTGGCGTACGGGCCGCTGCGGGAGTTCCTGGCGAAGTACTGCACG   | <b>7438</b> |
| <b>Eg6481.1</b> | AATA-----  | <b>324</b>  |
| <b>Di6481.1</b> | -----  | <b>531</b>  |

**Abbildung 62:** Aligierte DNA-Sequenzen der amplifizierten Bereiche des Paramylon-Synthase-Komplexes aus GSL1 von *Euglena gracilis* Z (cds\_Eg1, LC225614.1), *Euglena gracilis* (Eg6481.1, 1224/5-25), *Distigma proteus* (Di6481.1), (P5 - s. Tab. 47)

Das Alignment erweist sich als nicht erfolgreich, denn die beiden Sequenzen zeigen keine Homologien. Zwar kodieren die beiden Sequenzen innerhalb des Paramylon-Synthase-Komplexes, aber die Sequenzen überschneiden sich nicht innerhalb des GSL1-Bereiches von 6.959 bp bis 7.438 bp (s. Abb. 62).

| BEREICH 6A     |  |           |             |
|----------------|--|-----------|-------------|
|                |  | * * * * * |             |
| <b>cds_Eg1</b> | CAAGTTCCAGGTGCTGGTTCGGCGCGCAGGTGTACGA-----GCAGCAGAA--GGCGAC    |           | <b>5538</b> |
| <b>Eg7081</b>  | -----TCCACAGGACGACTTGAAAACCTCGTCGGTGGCATGGTCGTT                |           | <b>42</b>   |
| <b>Di7081</b>  | -----TACAGGAAACGACTTAGAAAACCTCATCGGTGGCATGGTCGTT               |           | <b>43</b>   |
|                | ***** **   |           |             |
| <b>cds_Eg1</b> | GTACGCGGAGATCAATGAGTGCCTGTCGCTGTGGAAGCTGCGGCACCTGCAGTTCATGAC   |           | <b>5598</b> |
| <b>Eg7081</b>  | GTACGCG----TCATCGAG----GTCGCACAGG--AACAGC--CAC---CACTGCGTCAC   |           | <b>87</b>   |
| <b>Di7081</b>  | GTACGCG----TCATCGAG----GTCGCACAGGTAACAGC--CAC---CACTGCGTCAC    |           | <b>89</b>   |
|                | * * * ** ***** ** ** * * * * * * * * * * * * *                 |           |             |
| <b>cds_Eg1</b> | CGCCAAGGACGACAAGCTGCG--GCCCGCCAGCTACTGGCTGCGCCGCCG--CGACGTGTT  |           | <b>5655</b> |
| <b>Eg7081</b>  | GAGGTACGTCTGCAGGCTGCGCTGCTGGCC--GCCAC--CCTTCGCCGCCCTTCTCCCACTC |           | <b>144</b>  |
| <b>Di7081</b>  | GAGGTACGTCTGCAGGCTGCGCTGCTGGCC--GCCAC--CCTTCGCCGCCCTTCTCCCACTC |           | <b>146</b>  |
|                | * **             |           |             |
| <b>cds_Eg1</b> | CGGCAGCCACAAGCTCCACTC--CCACCACTTC----TTCAAGCCCAGGGCGGGGTCTA    |           | <b>5709</b> |
| <b>Eg7081</b>  | CTGCACAAACTTCTGCCGCTCATCCACCTCCCCGAGGTTTCGC-CTGCGGGAAGATCTTAG  |           | <b>203</b>  |
| <b>Di7081</b>  | CTGCACAAACTTCTGCCGCTCATCCACCTCCCCGAGGTTTCAC-CTGC-----          |           | <b>205</b>  |

**Abbildung 63:** Aligierte DNA-Sequenzen der amplifizierten Bereiche des Paramylon-Synthase-Komplexes aus GSL1 von *Euglena gracilis* Z (cds\_Eg1, LC225614.1), *Euglena gracilis* (Eg7081, 1224/5-25), *Distigma proteus* (Di7081), (P6 - s. Tab. 47) (Sterne und gold markierte Bereiche zeigen die identischen Nukleotide)

Der Vergleich der Sequenzen (s. Abb. 63) zeigt erneut zahlreiche Gemeinsamkeiten und Homologien. Die ermittelte Sequenzregion umfasst Bereiche zwischen 5.538 und 5.709 Nukleotiden. Dieses Multiple Sequenz Alignment (MSA) zeigt sowohl eine niedrigere Anzahl der identischen Regionen (46,2 %) als auch der Paarweise-Identität (61,6 %).

| BEREICH 7A     |   |             |             |
|----------------|---|-------------|-------------|
|                |   | ***** ***** |             |
| <b>cds_Eg1</b> | CCGACCTACGTGCTGCTGCAGCGCGACACCGTCTCCCCCTACAACCTACACCCACTCCATC |             | <b>7678</b> |
| <b>Eg7561</b>  | -----GACACCGTCTCCCCCTACAACCTACACCCACTCCATC                    |             | <b>36</b>   |
| <b>Di7561</b>  | -----TTACACCATCTCCCCCTACGACTACACCCACTCCATC                    |             | <b>37</b>   |
|                | ***** *****   |             |             |
| <b>cds_Eg1</b> | CCCCCTCAGCGCTGGTGATCGTGGCGTTCGCAC--TGTTCCTACCGGCTGATGCTGCTGCT |             | <b>7737</b> |
| <b>Eg7561</b>  | CCCCCTCAGCGCTGGTGATCGTGGCGTTCGG--GGTTCCTACAAACTGATGCTGCTGCT   |             | <b>95</b>   |
| <b>Di7561</b>  | CCCCCTCAGCGCTGGTGATCGTGGCGTTCGCACGTGTTCTACCAGCTGATGCTGCTGCT   |             | <b>97</b>   |
|                | ***** *****   |             |             |
| <b>cds_Eg1</b> | CATCCCGGCCAACCCACTGGCCGCCGTGGCGGTGCGCTGCACGGCGCTGCTGGCGTTCGC  |             | <b>7797</b> |
| <b>Eg7561</b>  | CATCCCGGCCAACCCACTGGCCGCCGTGGCGGTGCGCTGCACGGCGCTGCTGGCGTTCGC  |             | <b>155</b>  |
| <b>Di7561</b>  | CATCCCGGCCAACCCACTGGCCGCCGTGGCGGTGCGCTGCACGGCGCTGCTGGCGTTCGC  |             | <b>157</b>  |
|                | ***** *****   |             |             |
| <b>cds_Eg1</b> | GGTGCTGTTTCTCATGGTGTGTTTCGACCCCTCGCGTGGGCGTACGTCATGCTTCTCT    |             | <b>7857</b> |
| <b>Eg7561</b>  | GGTGCTGTTTCTCATGGTGTGTTTCGA--AACCTCA-----                     |             | <b>214</b>  |
| <b>Di7561</b>  | GGTGCTGTTTCTCATGGTGTGTTTCGAAA---TGGCCGGCATGTTCTCATGGTGTGTT    |             | <b>214</b>  |
|                | ***** *****   |             |             |
| <b>cds_Eg1</b> | CCTCATCTGGCCCTCATCGTGGCGTACCTCGTGGAGGTTCTGGATCTACGTCAACAATA   |             | <b>7917</b> |
| <b>Eg7561</b>  | -----   |             | <b>274</b>  |
| <b>Di7561</b>  | CGA-----  |             | <b>274</b>  |

**Abbildung 64:** Aligierte DNA-Sequenzen der amplifizierten Bereiche des Paramylon-Synthase-Komplexes aus GSL1 von *Euglena gracilis* Z (cds\_Eg1, LC225614.1), *Euglena gracilis* (Eg7561, 1224/5-25), *Distigma proteus* (Di7561), (P7 - s. Tab. 47) (Sterne und gold markierte Bereiche zeigen die identischen Nukleotide)

Der Abbildung 64 ist zu entnehmen, dass der identifizierte Bereich (7.678 - 7.917 Nukleotide) in Bezug auf die Nukleotide sehr ähnlich erscheint. Die hochkonservierten Bereiche sind mit wenigen Ausnahmen fast durchgehend. Damit liegt die Anzahl der identischen Regionen bzw. der Paarweise-Identität bei 85 % bzw. 91,2 %.

| BEREICH 8A      |   |             |
|-----------------|---|-------------|
|                 | ***** ** * ** ** * * * * * * *                                |             |
| <b>cds_Eg1</b>  | GGCCTGTTCC---GCGGGGTGGGCAAGTCCGTCGGGGTGG----TGAGGCAGTGGCCGCA  | <b>4053</b> |
| <b>EgGSHEg2</b> | --ATGCTTCCCATAACGGGTGGGCA-GTCGGCCGTCGTGGCCCTTAAAGATGGGGTTGTA  | <b>57</b>   |
| <b>DiGSHEg2</b> | GGCAACTCCCAATAC--GGTGGGCA-GTCGGCCGTCGTGGCCCTTAAAGATGGGGTTGTA  | <b>57</b>   |
| <b>KhGSHEg2</b> | -----GGAAATAAC-GGTGGGCA-GTCGGCCGTCGTGGCCCTTAAAGATGGGGTTGTA    | <b>51</b>   |
| <b>PeGSHEg2</b> | -----TCCCATAAC-GGTGGGCA-GTCGGCCGTCGTGGCCCTTAAAGATGGGGTTGTA    | <b>52</b>   |
|                 | * ** *** * ***** * **** ** * ** * * * ** * * ** ** *          |             |
| <b>cds_Eg1</b>  | GGTGCAGCC---CGCGATGGACACGCTGCACGGCGACATGGTGATG-TACTGCCCGACCT  | <b>4109</b> |
| <b>EgGSHEg2</b> | GTTGACGCCCGCACGATGTAC-GGCTGGCCGTCCACGTAGAGTTGCTTCCCCCGGAGCT   | <b>116</b>  |
| <b>DiGSHEg2</b> | GTTGACGCCCGCACGATGTAC-GGCTGGCCGTCCACGTAGAGTTGCTTCCCCCGGAGCT   | <b>116</b>  |
| <b>KhGSHEg2</b> | GTTGACGCCCGCACGATGTAC-GGCTGGCCGTCCACGTAGAGTTGCTTCCCCCGGAGCT   | <b>110</b>  |
| <b>PeGSHEg2</b> | GTTGACGCCCGCACGATGTAC-GGCTGGCCGTCCACGTAGAGTTGCTTCCCCCGGAGCT   | <b>111</b>  |
|                 | * *** * * *** ** * ** ***** ** *** ** * * * * *               |             |
| <b>cds_Eg1</b>  | C--CCTGCACCAGGTTCGGCCAGGACCAGGAGGTGCTGGGGCAGAACATGGGGCTGCTGGC | <b>4167</b> |
| <b>EgGSHEg2</b> | CCACCTTGGACGGATCGTCCTGATCCTGGAGG--GTGACGAAGACCAT--GACAACCGGC  | <b>172</b>  |
| <b>DiGSHEg2</b> | CCACCTTGGACGGATCGTCCTGATCCTGGAGG--GTGACGAAGACCAT--GACAACCGGC  | <b>172</b>  |
| <b>KhGSHEg2</b> | CCACCTTGGACGGATCGTCCTGATCCTGGAGG--GTGACGAAGACCAT--GACAACCG-C  | <b>165</b>  |
| <b>PeGSHEg2</b> | CCACCTTGGACGGATCGTCCTGATCCTGGAGG--GTGACGAAGACCAT--GACAACCG-C  | <b>166</b>  |
|                 | * * *** *   |             |
| <b>cds_Eg1</b>  | GCTGCAGCACTGGGTGCACCTCTGGCGCCGGACCTCGTCTCGGAGCAGGTGCTGCAGGA   | <b>4227</b> |
| <b>EgGSHEg2</b> | G----AACAC---GAAGA-----                                       | <b>225</b>  |
| <b>DiGSHEg2</b> | G----AACAC---GAA-ACTTACCCGCCGGCGTTGGGGTTGGGGAGATT-----        | <b>224</b>  |
| <b>KhGSHEg2</b> | G----AACAC---GAAGAC-----                                      | <b>218</b>  |
| <b>PeGSHEg2</b> | G----AACAC---GAA-ACG-----                                     | <b>218</b>  |

**Abbildung 65:** Aligierte DNA-Sequenzen der amplifizierten Bereiche des Paramylon-Synthase-Komplexes aus GSL1 von *Euglena gracilis* Z (*cds\_Eg1*, LC225614.1), *Euglena gracilis* (*EgGSHEg2*, 1224/5-25), *Distigma proteus* (*DiGSHEg2*), *Khawkinea quartana* (*KhGSHEg2*), *Peranema* sp. (*PeGSHEg2*), (P8 - s. Tab. 47) (Sterne und gold markierte Bereiche zeigen die identischen Nukleotide)

Aus der Abbildung 65 ist zu ersehen, dass die Sequenzunterschiede bei allen untersuchten Organismen für diesen Genabschnitt sehr gering sind. Dieser Sequenz-Bereich befindet sich auf der GSL1 zwischen 4.053 und 4.227 Nukleotiden und wird als LacZ ( $\beta$ -galactosidase/ $\beta$ -glucuronidase)-Region identifiziert. Bei diesem Multiple Sequenz Alignment liegt die Anzahl der identischen Regionen bzw. der Paarweise-Identität bei 50,7 % bzw. 78,4 %.

### 3.7.2.5. VERGLEICH MIT GENSEQUENZ 2 (GSL2) AUS *EUGLENA GRACILIS* Z

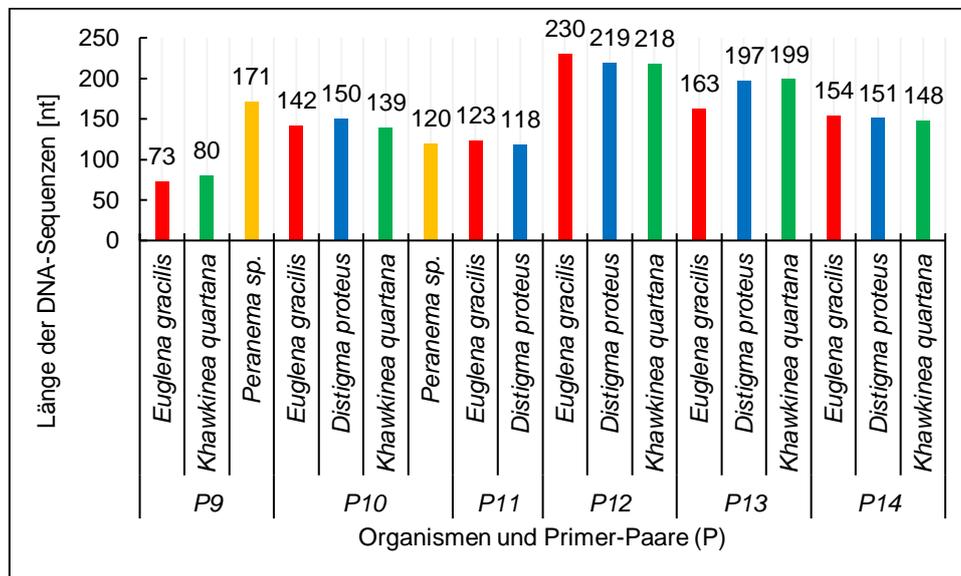
Da nur 8 Primer-Paare zur Identifizierung der Gensequenz 1 (GSL1) aus den untersuchten Organismen erfolgreich waren, wurden neue spezifische Primer aus der Gensequenz 2 (LC225615.1, GSL2) degeneriert und anschließend PCRs durchgeführt. Diejenigen PCR-Produkte, die auf dem Agarosegel eine einzelne Bande zeigten, wurden isoliert und bei der Firma Eurofins MWG sequenziert. Anhand der BLASTx-Suche wurden 18 Sequenzen als Teilsequenz des Paramylon-Synthase-Komplexes identifiziert. Während mit dem Primer-Paar P10 bei allen untersuchten Organismen eine hohe Identität erzielt werden konnte, erwiesen sich die PCRs mit den anderen Primer-Paaren als teilweise erfolgreich. Je nach der Art und dem vorgegebenen Primer Paar variierten die Identitätswerte zwischen 90 % und 100 %. *Khawkinea quartana* und *Peranema sp.* zeigten die höchste prozentuelle Identität von 100 %. Im Gegensatz dazu lag bei *Euglena gracilis* die niedrigste prozentuelle Identität bei 91,89 %. Die Ergebnisse wurden in 6 Kategorien zusammengefasst (s. Tab. 49). Im Anschluss werden die Analysen der ermittelten Sequenzen in den Abbildungen 66 - 73 dargestellt.

**Tabelle 49:** BLASTx-Ergebnisse in der NCBI-Datenbank für Paramylon-Synthase-Komplex ( $\beta$ -1,3-glucan synthase) (E = Erwartungswert, I = Prozentueller Identitätswert, Primer-Paare = P9 - P14)

| Organismen                | Bester Treffer Gen Nummer (Accession No.) | Homologie   | E                 | Primer-Paare                             |
|---------------------------|---|---|-------------------|--|
|                           |   |   | I                 |  |
| <i>Euglena gracilis</i>   | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 5e-17<br>91,89 %  | ParsA2.1For /<br>ParsA2.1Rev (P9)        |
| <i>Khawkinea quartana</i> | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 6e-32<br>100 %    |  |
| <i>Peranema sp.</i>       | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 2e-76<br>98,24 %  |  |
| <i>Euglena gracilis</i>   | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 1e-61<br>99,28 %  | ParsA2.3For /<br>ParsA2.3Rev (P10)       |
| <i>Distigma proteus</i>   | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 9e-59<br>97,86 %  |  |
| <i>Khawkinea quartana</i> | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 3e-58<br>98,52 %  |  |
| <i>Peranema sp.</i>       | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 1e-46<br>100 %    |  |
| <i>Euglena gracilis</i>   | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 9e-53<br>99,18 %  | Pars2_1888For /<br>Pars2_1888Rev (P11)   |
| <i>Distigma proteus</i>   | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 4e-46<br>99,09 %  |  |
| <i>Euglena gracilis</i>   | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 1e-104<br>98,65 % | Pars_2.361For /<br>Pars_2.361Rev (P12)   |
| <i>Distigma proteus</i>   | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 3e-100<br>99,52 % |  |
| <i>Khawkinea quartana</i> | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 5e-103<br>100 %   |  |
| <i>Euglena gracilis</i>   | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 1e-67<br>98,05 %  | Pars_2.3541For /<br>Pars_2.3541Rev (P13) |
| <i>Distigma proteus</i>   | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 2e-81<br>96,83 %  |  |
| <i>Khawkinea quartana</i> | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 2e-82<br>98,88 %  |  |
| <i>Euglena gracilis</i>   | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 5e-66<br>99,31 %  | Pars_2.6109For /<br>Pars_2.6109Rev (P14) |
| <i>Distigma proteus</i>   | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 9e-64<br>99,29 %  |  |
| <i>Khawkinea quartana</i> | LC225615.1                                | <i>Euglena gracilis</i> GSL2 mRNA for $\beta$ -1,3-glucan synthase, complete cds. | 9e-64<br>98,62 %  |  |

### 3.7.2.6. UNTERSUCHUNG DER BEREICHE DER GENSEQUENZ 2 (GSL2)

Mit dem Programm Geneious Pro wurden die ermittelten Sequenzen hinsichtlich der Länge untersucht. In Abbildung 66 werden die untersuchten Organismen, die Länge der Sequenzen und die verwendeten Primer-Paare dargestellt:



**Abbildung 66:** Graphische Darstellung der Längen der DNA-Sequenzen der untersuchten Organismen (*Euglena gracilis* (rot), *Distigma proteus* (blau), *Khawkinia quartana* (grün) und *Peranema sp.* (orange)) und unter der Anwendung der entsprechenden Primer-Paare (P9 - P14)

Aus der Abbildung ergibt sich, dass die Länge der Sequenzen zwischen 73 und 230 Nukleotiden schwankt. Die Längendivergenz ist bei einigen Organismen innerhalb der gleichen Primer-Paare (P12 und P13) sehr gering. Zwei Sequenzen bestehen aus weniger als 100 Nukleotiden, die anderen sind 118 bis 230 Nukleotide lang. Im Anschluss wurde die Basen-Zusammensetzung aller Sequenzen analysiert. Die Ergebnisse werden in Tabelle 50 detailliert dargestellt.

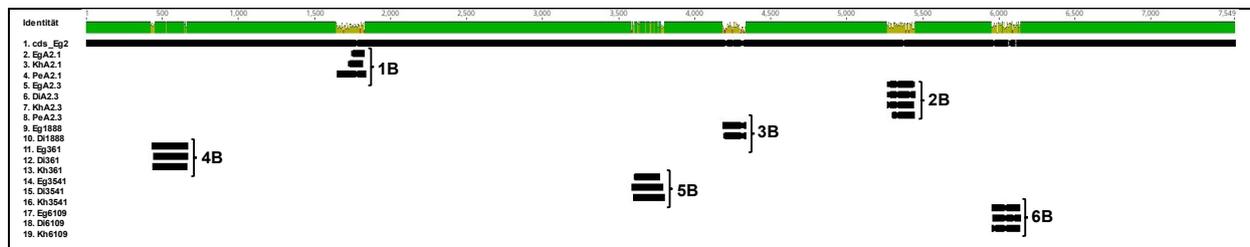
**Tabelle 50:** Länge (nt), Nukleotidzusammensetzung der untersuchten DNA-Sequenzen; Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T), Guanin-Cytosin (G-C), Primer-Paare (P9 - P14), die identifizierten Sequenzbereiche (1B - 6B)

| Organismen                | Länge [nt] | A (%) | C (%) | G (%) | T (%) | GC (%) | Primer-Paare | Bereich |
|---------------------------|------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------------|---------|
| <i>Euglena gracilis</i>   | 73         | 19,2  | 21,9  | 39,7  | 19,2  | 61,6   | P9           | 1B      |
| <i>Khawkinea quartana</i> | 80         | 22,5  | 37,5  | 20,0  | 20,0  | 57,5   |              |         |
| <i>Peranema sp.</i>       | 171        | 19,9  | 31,6  | 26,9  | 21,6  | 58,5   |              |         |
| <i>Euglena gracilis</i>   | 142        | 25,4  | 26,8  | 23,2  | 24,6  | 50     | P10          | 2B      |
| <i>Distigma proteus</i>   | 150        | 25,3  | 25,3  | 22,7  | 26,7  | 48     |              |         |
| <i>Khawkinea quartana</i> | 139        | 27,3  | 25,2  | 23,0  | 24,5  | 48,2   |              |         |
| <i>Peranema sp</i>        | 120        | 24,2  | 23,3  | 27,5  | 25,0  | 50,8   |              |         |
| <i>Euglena gracilis</i>   | 123        | 22,8  | 24,4  | 25,2  | 27,6  | 49,6   | P11          | 3B      |
| <i>Distigma proteus</i>   | 118        | 26,3  | 22,9  | 25,4  | 25,4  | 48,3   |              |         |
| <i>Euglena gracilis</i>   | 230        | 20,9  | 25,2  | 26,5  | 27,4  | 51,7   | P12          | 4B      |
| <i>Distigma proteus</i>   | 219        | 22,8  | 24,7  | 26,5  | 26,0  | 51,1   |              |         |
| <i>Khawkinea quartana</i> | 218        | 22,9  | 24,3  | 27,1  | 25,7  | 51,4   |              |         |
| <i>Euglena gracilis</i>   | 163        | 26,4  | 23,3  | 31,9  | 18,4  | 55,2   | P13          | 5B      |
| <i>Distigma proteus</i>   | 197        | 25,4  | 26,4  | 29,4  | 18,8  | 55,8   |              |         |
| <i>Khawkinea quartana</i> | 199        | 24,6  | 25,6  | 30,7  | 19,1  | 56,3   |              |         |
| <i>Euglena gracilis</i>   | 154        | 29,9  | 26,0  | 36,4  | 7,8   | 62,3   | P14          | 6B      |
| <i>Distigma proteus</i>   | 151        | 31,8  | 25,8  | 35,1  | 7,3   | 60,9   |              |         |
| <i>Khawkinea quartana</i> | 148        | 30,4  | 27,0  | 35,8  | 6,8   | 62,8   |              |         |

Tabelle 50 zeigt die einzelnen Organismen, die Länge der Nukleotide, die prozentuelle Menge der Nukleotide (A, C, G, T (%)), den GC-Gehalt (%), die Primer-Paare (P9 - P14) und die identifizierten Sequenzbereiche (1B - 6B). Anhand des Vergleiches wird festgestellt, dass die prozentuelle Nukleotidzusammensetzung bei allen Organismen nicht einheitlich ist. Außerdem schwankt der GC-Gehalt zwischen 48 % und 62,8 %. Der GC-Gehalt weist keinen Zusammenhang mit der Längendivergenz auf, obwohl der GC-Gehalt sich innerhalb des gleichen Sequenzbereiches bei den untersuchten Organismen ähnelt.

### 3.7.2.7. ALIGNIEREN DER DNA-SEQUENZEN MIT DER GSL2

Mit den Sequenzen aus den untersuchten Euglenida und der Gensequenz 2 (LC225615.1, GSL2) wurden mittels des Computerprogramms Geneious Pro die Multiple Sequenz Alignments durchgeführt. In Abbildung 67 werden die identifizierten Sequenzbereiche dargestellt:



**Abbildung 67:** Graphische Darstellung der Sequenzen für die Bereiche (1B - 6B), *Euglena gracilis* Z (cds\_Eg2, GSL2, LC225615.1), *Euglena gracilis* (Eg), *Distigma proteus* (Di), *Khawkinea quartana* (Kh), *Peranema* sp. (Pe)

Aus der Abbildung 67 geht hervor, dass 6 Sequenzbereiche auf der GSL2 identifiziert wurden. Im Gegensatz zu den anderen Regionen wurde nur der Bereich 2B bei allen Organismen festgestellt. Die Identifizierung der restlichen Bereiche waren nicht bei allen Euglenida erfolgreich. Des Weiteren werden die Alignments von jeder GSL2 Region in dem folgenden Abschnitt betrachtet.

### 3.7.2.8. UNTERSUCHUNG DER ALIGNMENTS FÜR DIE EINZELNEN BEREICHE IN GSL2

Die Sequenzen aus den jeweiligen Bereichen werden durch Alignieren untersucht und verglichen. Mittels dieser Analyse werden die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Gensequenzen gegenübergestellt. In den Abbildungen 68 - 73 werden die Multiple Sequenz Alignments dargestellt.

| BEREICH 1B     |  |             |
|----------------|--|-------------|
| <b>cds_Eg2</b> | AGCACTGACATTTACCAGTTCTGCATCAAGCGAATCACAACCTGCCGTGTGGGACAATTTG  | <b>1676</b> |
| <b>EgA2.1</b>  | -----  |             |
| <b>KhA2.1</b>  | -----  |             |
| <b>PeA2.1</b>  | -----CAGCATGTGATCACCGCTGGATGGTTCAGGATG                         | <b>33</b>   |
| <b>cds_Eg2</b> | ACCTCATAACAACCCAACCTCCAAACCTGACATTTGAGGAGGTTGTGGACCGATGCATCC-G | <b>1735</b> |
| <b>EgA2.1</b>  | -----  |             |
| <b>KhA2.1</b>  | -----CTTG-C---TGCCGCCAG  | <b>14</b>   |
| <b>PeA2.1</b>  | ACC-GATGCCAGGGGCCACCACCCCATCCTTTTGGGGCGTGCCTTG-C---TGCCGCCAG   | <b>88</b>   |
|                | **   ***      * *   ***      **  **  *  **  ***  *   **        |             |
| <b>cds_Eg2</b> | -CGTG--GTGTACCTGAAGCTGATGGAGGGCT-AC-TACGTCT-GGCGGCAGCAAGGCA-   | <b>1788</b> |
| <b>EgA2.1</b>  | ----G-GGTGT-CCTGAGCTTGATGGAGGGCTTACTTACGTCTGGGCGGCAGCAAGGCAC   | <b>54</b>   |
| <b>KhA2.1</b>  | ACGT--AGTAGCCCTCCATCAGCTTCAGG---TAC--ACCACGCGGATGCATCGGTCCAC   | <b>67</b>   |
| <b>PeA2.1</b>  | ACGT--AGTAGCCCTCCATCAGCTTCAGG---TAC--ACCACGCGGATGCATCGGTCCAC   | <b>141</b>  |
|                | ***  ****  |             |
| <b>cds_Eg2</b> | ---CGCCCCAAAAGGATGGGGTGGTGGCCCCCTGGCATCGGCCATCCTGAACCATCCAGCG  | <b>1845</b> |
| <b>EgA2.1</b>  | ----GCCCCAAAAGGATGGGGTG-----                                   | <b>110</b>  |
| <b>KhA2.1</b>  | AACCTCCTCAAAT-----   | <b>127</b>  |
| <b>PeA2.1</b>  | AACCTCCTCAAATGTCAGGTTTGGAGTTGA-----                            | <b>201</b>  |

**Abbildung 68:** Aligrierte DNA-Sequenzen der amplifizierten Bereiche des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *GSL2* von *Euglena gracilis* Z (*cds\_Eg2*, LC225615.1), *Euglena gracilis* (*EgA2.1*, 1224/5-25), *Khawkinia quartana* (*KhA2.1*), *Peranema sp.* (*PeA2.1*), (P9 - s. Tab. 49) (Sterne und gold markierte Bereiche zeigen die identischen Nukleotide)

Aus der Abbildung 68 ist zu ersehen, dass geringe Homologien zwischen den Sequenzen bestehen. Diese Sequenzen befinden sich in den *GSL2*-Bereichen zwischen 1.676 und 1.845 Nukleotiden. An einigen Positionen sind konservierte Bereiche zu erkennen. Die Anzahl der identischen Regionen bzw. der Paarweise-Identität liegt bei 47,3 % bzw. 60,4 %.

| BEREICH 2B     |   |             |
|----------------|---|-------------|
| <b>cds_Eg2</b> | GCCCAGGCCGCCGCCAGCAGATGCGCTCCCGGGACATCTACTGGCT-CAACCAGAAGGC   | <b>5236</b> |
| <b>EgA2.3</b>  | -----ACT-CCA-CAGCAG--   | <b>12</b>   |
| <b>DiA2.3</b>  | -----CACT-CCA-CAGCAG--  | <b>13</b>   |
| <b>KhA2.3</b>  | -----CTACAA-CAGCAG--  | <b>12</b>   |
| <b>PeA2.3</b>  | -----   |             |
|                | *** ** * ** * ** * ** * ** *                                  |             |
| <b>cds_Eg2</b> | CAGCCTG----TTCCCTGAAGTTCGGCCTGTTCTTCGGCACCTACGGCTTTTACATCTA-- | <b>5290</b> |
| <b>EgA2.3</b>  | CA-CATGAATATTCCT----CTTCACCTCGTCTGCCGCAGC-AC--CTCT--CATAAAAA  | <b>62</b>   |
| <b>DiA2.3</b>  | CA-CATGAATATTCCTGC--TTACACCTCGTCTGCCGCAGC-AC--CTCT--CATAAAAA  | <b>65</b>   |
| <b>KhA2.3</b>  | CA-CATGAATATTCCT----CTTCACCTCGTCTGCCGCAGC-AC--CTCT--CATAAAAA  | <b>62</b>   |
| <b>PeA2.3</b>  | -----TGC--TCACACCTCGTCTGCCGCAGC-AC--CTCT--CATAAAAA            | <b>38</b>   |
|                | *** * ** * *** ** ** *** ***** ** ** ** ** ** ** ** *         |             |
| <b>cds_Eg2</b> | -CAACACGCT--GATGGCGATGTCC----ATC-----CACCTGTACATCATC---GCCGT  | <b>5335</b> |
| <b>EgA2.3</b>  | GCAA-ATACT-GGTTGGTGAAGTG-GTAGATCTGGAACACCT-----TC-TCGGGGCAGT  | <b>113</b>  |
| <b>DiA2.3</b>  | GCAA-ATACT-GGTTGGTGAAGTG-GTAGATCTGGAACACCT-----TC-TCGGGGCAGT  | <b>116</b>  |
| <b>KhA2.3</b>  | GCAA-ATACTAGGTTGGTGAAGTG-GTAGATCTGGAACACCT-----TC-TCGGGGCAGT  | <b>114</b>  |
| <b>PeA2.3</b>  | GCAA-ATACT-GGTTGGTGAAGTG-GTAGATCTGGAACACCT-----TC-TCGGGGCAGT  | <b>89</b>   |
|                | *** * *** ** * ** * * ** * ** *                               |             |
| <b>cds_Eg2</b> | GGTGTCTTCATGCTGTCCGG----C-GTCACCAACCACGACCTCGGGGTCAACCAGTCC   | <b>5390</b> |
| <b>EgA2.3</b>  | GGT-----TGATGGTG-CCTGAATACTGTCC--A-GCA-----                   | <b>164</b>  |
| <b>DiA2.3</b>  | GGT-----TGATGGTG-CCTGAATACTGTCA--ATGCATTTT-----               | <b>168</b>  |
| <b>KhA2.3</b>  | GGT-----TGATGGTG-CCTGAATACAGTCA-----                          | <b>168</b>  |
| <b>PeA2.3</b>  | GGT-----TGATGGTG-CCTGAATACTGTCA-GATGGA-----                   | <b>142</b>  |

**Abbildung 69:** Aligierte DNA-Sequenzen der amplifizierten Bereiche des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *GSL2* von *Euglena gracilis* Z (*cds\_Eg2*, LC225615.1), *Euglena gracilis* (EgA2.3, 1224/5-25), *Distigma proteus* (DiA2.3), *Khawkinea quartana* (KhA2.3), *Peranema sp.* (PeA2.3), (P10 - s. Tab. 49) (Sterne und gold markierte Bereiche zeigen die identischen Nukleotide)

Die Identifizierung des Beiches 2B erwies sich als erfolgreich, denn alle untersuchten Organismen zeigten die gleiche Genregion. Diese Sequenzen sind in den *GSL2*-Bereichen zwischen 5.236 und 5.390 nt zu finden. Die Anzahl der identischen Regionen bzw. der Paarweise-Identität liegt bei 48,6 % bzw. 75,4 %.

| BEREICH 3B     |  |             |
|----------------|--|-------------|
| <b>cds_Eg2</b> | GACCCAAGCCGAGGCAGCCC GGAGCTGCTCCAGCAGAACCACCACCAGTTCCTGC---AG            | <b>4178</b> |
| <b>Eg1888</b>  | -----ATGATATTCC---TC   | <b>12</b>   |
| <b>Di1888</b>  | -----AAGT---CA   | <b>6</b>    |
|                | * *           ****   *   **** **   *   *                   ** ** ** **   |             |
| <b>cds_Eg2</b> | ATGTTCC---TGAGCGCCGACCCCGCATCATGAAGCACTCCTGGATC-G--TGCTGCAG              | <b>4232</b> |
| <b>Eg1888</b>  | TTCACCT---CGTCTGCCGCAGCACCTCTCATAAAAAGCAAATACTGG-T--TGGTGAAG             | <b>66</b>   |
| <b>Di1888</b>  | TTCACCT---CGTCTGCCGCAGCACCTCTCATAAAAAGCAAATACTGG-T--TGGTGAAG             | <b>60</b>   |
|                | *           *****   * *           ** ***   *                   *   ** ** |             |
| <b>cds_Eg2</b> | TTCCGCCTCTGGGCGTCTGACCACGGCCAGACACT-----GG--TGCGGC--TC-                  | <b>4277</b> |
| <b>Eg1888</b>  | TGGTAGATCTGGAACACCTTCTCGGGGCAGTGGTT-----GA--TGGTGC--CT-                  | <b>111</b>  |
| <b>Di1888</b>  | TGGTAGATCTGGAACACCTTCTCGGGGCAGTGGTT-----GA--TGGTGC--CT-                  | <b>105</b>  |
| <b>cds_Eg2</b> | ATCCGGGGTGTGATGAGTTGGCGCCAAGTTTGGAGCTTCTGGCCACGCTGGAGAATGCG              | <b>4337</b> |
| <b>Eg1888</b>  | GAATACTGTCCG-----  | <b>171</b>  |
| <b>Di1888</b>  | AGAATACTGTCAA-----   | <b>165</b>  |

**Abbildung 70:** Aligierte DNA-Sequenzen der amplifizierten Bereiche des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *GSL2* von *Euglena gracilis* Z (*cds\_Eg2*, LC225615.1), *Euglena gracilis* (Eg1888, 1224/5-25), *Distigma proteus* (Di1888), (P11 - s. Tab. 49) (Sterne und gold markierte Bereiche zeigen die identischen Nukleotide)

Nur bei *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* konnten die Sequenzen erfolgreich lokalisiert werden. Vergleicht man diese, so fällt auf, dass sie sehr geringe Übereinstimmungen zeigen. Diese ermittelten Sequenzen sind in den GLS2-Bereichen zwischen 4.178 und 4.337 nt zu finden. Die Anzahl der identischen Regionen bzw. der Paarweise-Identität liegt bei 37,1 % bzw. 55,4 %.

| BEREICH 4B     |   |       |       |
|----------------|---|-------|-------|
|                |   | **    | ***** |
| <b>cds_Eg2</b> | GGGTTTTTCATTCTTTTGACCTT---GGTGCCGTGGGTCCCGACGGTGTCTCGTGTACC   |       | 477   |
| <b>Eg361</b>   | -----TCTTCTTTTGACCTTG-GG-TGCCGTGGGTCCCGACGGTGTCTCGTGTACC      |       | 50    |
| <b>Di361</b>   | -----GTTAAGTATGCCGTGGGTCCCGACGGTGTCTCGTGTACC                  |       | 40    |
| <b>Kh361</b>   | -----AAAGTTA-GGGTGCCGTGGGTCCCGACGGTGTCTCGTGTACC               |       | 42    |
|                | *****   |       |       |
| <b>cds_Eg2</b> | GCGATCTGTCAAATGCACAAACAAGGCGGGCAGTGGTCTCAGACTGGGGCACCCCTCATTG |       | 537   |
| <b>Eg361</b>   | GCGATCTGTCAAATGCACAAACAAGGCGGGCAGTGGTCTCAGACTGGGGCACCCCTCATTG |       | 110   |
| <b>Di361</b>   | GCGATCTGTCAAATGCACAAACAAGGCGGGCAGTGGTCTCAGACTGGGGCACCCCTCATTG |       | 100   |
| <b>Kh361</b>   | GCGATCTGTCAAATGCACAAACAAGGCGGGCAGTGGTCTCAGACTGGGGCACCCCTCATTG |       | 102   |
|                | *****   |       |       |
| <b>cds_Eg2</b> | ATCAGTATTGGCGGCACCCAGCTGTCATGGGATGGTTAATTGGCAATGAACTTGACATCC  |       | 597   |
| <b>Eg361</b>   | ATCAGTATTGGCGGCACCCAGCTGTCATGGGATGGTTAATTGGCAATGAACTTGACATCC  |       | 170   |
| <b>Di361</b>   | ATCAGTATTGGCGGCACCCAGCTGTCATGGGATGGTTAATTGGCAATGAACTTGACATCC  |       | 160   |
| <b>Kh361</b>   | ATCAGTATTGGCGGCACCCAGCTGTCATGGGATGGTTAATTGGCAATGAACTTGACATCC  |       | 162   |
|                | *****   | ***** |       |
| <b>cds_Eg2</b> | CATTTGGACCTCAAATGAATGAGCTTTTCTCCCTCGCCAACCTTGATG-ATTGATGTTGCC |       | 656   |
| <b>Eg361</b>   | CATTTGGACCTCAAATGAATGAGCTTTTCTCCCTCGCCAACCTTGATGGATTGATGTAGAG |       | 230   |
| <b>Di361</b>   | CATTTGGACCTCAAATGAATGAGCTTTTCTCCCTCGCCAACCTTGAT-GATTGATGTAAGG |       | 219   |
| <b>Kh361</b>   | CATTTGGACCTCAAATGAATGAGCTTTTCTCCCTCGCCAACCTTGAT-GATTGATGTA--- |       | 221   |

**Abbildung 71:** Aligierte DNA-Sequenzen der amplifizierten Bereiche des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *GSL2* von *Euglena gracilis* Z (*cds\_Eg2*, LC225615.1), *Euglena gracilis* (Eg361, 1224/5-25), *Distigma proteus* (Di361), *Khawkinia quartana* (Kh361), (P12 - s. Tab. 49) (Sterne und gold markierte Bereiche zeigen die identischen Nukleotide)

Mit dem Primer-Paar 12 konnte keine Sequenz bei *Peranema sp.* identifiziert werden. Bei Betrachtung der übrigen Alignments wurde festgestellt, dass die ermittelten Sequenzen in dem *GSL2*- Bereich zwischen 477 und 656 nt zu finden sind. Die weitere Untersuchung der Sequenzen zeigte ein interessantes Ergebnis: das Alignment wies bei allen Organismen mit Ausnahme von *Peranema sp.* lange und durchgehende konservierte Bereiche auf. Damit zeigen diese Sequenzen eine höhere Anzahl der identischen Regionen bzw. der Paarweise-Identität, sie liegt bei 92,2 % bzw. 96,2 %.

| BEREICH 5B     |  |             |
|----------------|--|-------------|
| <b>cds_Eg2</b> | ACGTCCAGAAGTATTTCTGCAGATCAAGCTGCAGTGCCTCCCAGCAATCTCCTCTTGTC  | <b>3585</b> |
| <b>Eg3541</b>  | -----  |             |
| <b>Di3541</b>  | -----ACCACCTCCTCTTGTC  | <b>15</b>   |
| <b>Kh3541</b>  | -----CGGAC   | <b>5</b>    |
|                | <b>** *****</b>  |             |
| <b>cds_Eg2</b> | TCTATGCCAAGCACAAACCAGATGGTATTGTGGAAGTGGTTCGTCAATTCGCTGTACAA  | <b>3643</b> |
| <b>Eg3541</b>  | TC-ATGCCAAGCACAAACCAGATGGTATTGTGGAACTGGTTCGTCAATTCGCTGTACAA  | <b>57</b>   |
| <b>Di3541</b>  | TCTATGCCAAGCACAAACCAGATGGGTATTGTGGAACTGGTTCGTCAATTCGCTGTACAA | <b>75</b>   |
| <b>Kh3541</b>  | TCTATGCCAAGCACAAACCAGATGGTATTGTGGAACTGGTTCGTCAATTCGCTGTACAA  | <b>63</b>   |
|                | <b>***** *****</b>   |             |
| <b>cds_Eg2</b> | TGAGTGGCTGATCGACTCCGTGGAGCGGGACCAGCTGAAGATCACATTCCGCCCGCTGGA | <b>3703</b> |
| <b>Eg3541</b>  | TGAGTGGCTGATCGACTCCGTGGAGCGGGACCAGCTGAAGATCACGTTCCGCCCGCTGGA | <b>117</b>  |
| <b>Di3541</b>  | TGAGTGGCTGATCGACTCCGTGGAGCGGGACCAGCTGAAGATCACGTTCCGCCCGCTGGA | <b>135</b>  |
| <b>Kh3541</b>  | TGAGTGGCTGATCGACTCCGTGGAGCGGGACCAGCTGAAGATCACGTTCCGCCCGCTGGA | <b>123</b>  |
|                | <b>***** *****</b>   |             |
| <b>cds_Eg2</b> | CAAGCACGAGACGGCGAAGTGGGAGCTGGACGAGGTGGAG--AACGGCATCAAGTACTCC | <b>3761</b> |
| <b>Eg3541</b>  | CAAGCACGAGACAGCGAAGTGGGAGCTGGACGAGGTGGAAGTAACG-----          | <b>177</b>  |
| <b>Di3541</b>  | CAAGCACGAGACAGCGAAGTGGGAGCTGGACGAGGTGGAG--AACGGCATCAAGTACTCC | <b>193</b>  |
| <b>Kh3541</b>  | CAAGCACGAGACAGCGAAGTGGGAGCTGGACGAGGTGGAG--AACGGCATCAAGTACTCC | <b>181</b>  |
| <b>cds_Eg2</b> | AACCCTCTGTTCTGAAGCAGCCCAAGAACGAGGAAGCTTGCCGCCGCGTCATCTATTTTC | <b>3821</b> |
| <b>Eg3541</b>  | -----  | <b>237</b>  |
| <b>Di3541</b>  | CACA-----  | <b>253</b>  |
| <b>Kh3541</b>  | ACTTCCCCATTCAGGGTG-----                                      | <b>241</b>  |

**Abbildung 72:** Aligierte DNA-Sequenzen der amplifizierten Bereiche des Paramylon-Synthase-Komplexes aus GSL2 von *Euglena gracilis* Z (cds\_Eg2, LC225615.1), *Euglena gracilis* (Eg3541, 1224/5-25), *Distigma proteus* (Di3541), *Khawkinea quartana* (Kh3541), *Peranema sp.* (Pe3541), (P13 - s. Tab. 49) (Sterne und gold markierte Bereiche zeigen die identischen Nukleotide)

Auch bei Primer-Paar 13 konnte keine Sequenz für *Peranema sp.* festgestellt werden. Dieser Sequenzbereich für die Arten *Euglena gracilis*, *Distigma proteus* und *Khawkinea quartana* befindet sich zwischen 3.585 und 3.821 Nukleotiden. Es ist auffällig, dass diese Sequenzen auch viele hoch konservierte Bereiche zeigten, die in Bezug auf die Länge sehr variabel sind. Der kleinste konservierte Bereich beinhaltet 4 Nukleotide. Aufgrund der zahlreichen Homologien in der Sequenz liegen die Anzahl der identischen Regionen bzw. der Paarweise-Identität bei 86,4 % bzw. 94,3 %.

| BEREICH 6B     |  |   |             |
|----------------|--|---|-------------|
|                |  | **    ***   *   **   *   *   *   **    **   ***** |             |
| <b>cds_Eg2</b> | AACCCCTTGCCCACCAC-----CA---AGGATATCGCCTTC-CTGCTGTTT              | GAGGAACAA   | <b>5921</b> |
| <b>Eg6109</b>  | -----GATGAATGGGGCAGGTAGG-TGTC--CAACACCGC-----                    | GAAGAACAC   | <b>41</b>   |
| <b>Di6109</b>  | -----GAGAGCAGGTAGG-TGTC--CAACACCGC-----                          | GAAGAACAC   | <b>35</b>   |
| <b>Kh6109</b>  | -----ACGGGAGCAGGTAGG-TGTC--CAACACCGC-----                        | GAAGAACAC   | <b>37</b>   |
|                | *   **   *****   *   **   *****   *****   *****   **   *   ***** |   |             |
| <b>cds_Eg2</b> | AA-GAGGCAGGACGTGAGCGGCGTC----AACC                                | GAGGACAGAACC                                      | <b>5973</b> |
| <b>Eg6109</b>  | CACGA-GCAGG--GCGAACGGCG-CGGCGAACC----                            | ACAG---CG--AGTAGGTGAAGG                           | <b>88</b>   |
| <b>Di6109</b>  | CACGA-GCAGG--GCGAACGGCG-CGGCGAACC----                            | ACAG---CG--AGTAGGTGAAGG                           | <b>82</b>   |
| <b>Kh6109</b>  | CACGA-GCAGG--GCGAACGGCG-CGGCGAACC----                            | ACAG---CG--AGTAGGTGAAGG                           | <b>84</b>   |
| *****          |  |   |             |
| <b>cds_Eg2</b> | ----CCA--CCAAG-ACGCTGCAGAACTGGGTGGCCAAC--C----                   | AGCGCATGAAGTC                                     | <b>6019</b> |
| <b>Eg6109</b>  | AGGGGCAGGCCAGTACGCC-CAGAAC-----AGCCA-CGGCGCGTAAG-ACAGGAACCC      |   | <b>140</b>  |
| <b>Di6109</b>  | AGGGGCAGGCCAGTACGCC-CAGAAC-----AGCCA-CGGCGCGTAAG-ACAGGAACCC      |   | <b>134</b>  |
| <b>Kh6109</b>  | AGGGGCAGGCCAGTACGCC-CAGAAC-----AGCCA-CGGCGCGTAAG-ACAGGAACCC      |   | <b>136</b>  |
|                | *****   *  |   |             |
| <b>cds_Eg2</b> | GTGGATGGGCTGGTACATGAATGAGGTGCTGCTGGGGCCGTGGAGTGATGAGGAGATGTG     |   | <b>6079</b> |
| <b>Eg6109</b>  | AAGGATGGATTTCAG-----   |   | <b>200</b>  |
| <b>Di6109</b>  | AAGGATGGATTAATAGA-----   |   | <b>194</b>  |
| <b>Kh6109</b>  | AAGGATGGATTA-----  |   | <b>196</b>  |

**Abbildung 73:** Aligierte DNA-Sequenzen der amplifizierten Bereiche des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *GSL2* von *Euglena gracilis* Z (*cds\_Eg2*, LC225615.1), *Euglena gracilis* (Eg6109, 1224/5-25), *Distigma proteus* (Di6109), *Khawkinea quartana* (Kh6109), (P14 - s. Tab. 49) (Sterne und gold markierte Bereiche zeigen die identischen Nukleotide)

Der letzte untersuchte Bereich liegt zwischen 5.921 und 6.079 Nukleotiden. Der Vergleich der Sequenzen zeigt erneut konservierte Bereiche, die allerdings klein und heterogen sind. Damit wurde eine niedrigere Anzahl der identischen Regionen (51,1 %) bzw. unterdurchschnittliche Paarweise-Identität (72,5 %) beobachtet.

Die PCR-Ergebnisse aus den untersuchten Arten der Euglenida (*Euglena gracilis*, *Distigma proteus*, *Khawkinea quartana*, *Peranema sp.*) lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Sequenzierungsergebnisse der PCR-Produkte zeigten, dass alle untersuchten Arten der Euglenida die Paramylon-Synthase-Komplex kodierenden Gensequenzen *GSL1* und *GSL2* enthalten. Je nach untersuchtem Organismus lassen sich jeweils 8 Bereiche bei *GSL1* und 6 Bereiche bei *GSL2* identifizieren. Die Versuche zur Amplifizierung der vollständigen Gensequenzen (*GSL1* und *GSL2*) bei allen untersuchten Arten sind mit den degenerierten Primern nicht gelungen. Da die Primer nicht artenspezifisch degeneriert wurden, ergaben sich häufig Nebenprodukte bei der PCR-Analyse, deren Produkt-Größe sehr nah beieinander lagen. Dies erschwerte wiederum die Aufreinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte.

- Bei GSL1 lag die Sequenzlänge der PCR-Produkte zwischen 82 und 268 nt. Bei allen untersuchten Organismen wurden ein DXD(DVD)-Bereich und eine LacZ ( $\beta$ -galactosidase/ $\beta$ -glucuronidase)-Region identifiziert. Außer bei *Khawkinea quartana* konnte bei den anderen untersuchten Organismen ein Glucan-Synthase-Bereich nachgewiesen werden. Die Alignments dieser Bereiche ergaben, dass die Sequenzen aufgrund der Nukleotidreihenfolge stark variieren.
- Bei GSL2 lag die Sequenzlänge der PCR-Produkte zwischen 73 und 230 nt. Anhand der Alignments wurden durchgehende hoch konservierte Bereiche (4B und 5B) für *Euglena gracilis*, *Distigma proteus* und *Khawkinea quartana* festgestellt. Drei von sechs Bereichen wurden nur bei *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* identifiziert.

Abschließend wurde zum ersten Mal das Vorhandensein des Paramylon-Synthase-Komplexes bei den osmotrophen (*Distigma proteus*, *Khawkinea quartana*) und phagotrophen (*Peranema sp.*) Arten der Euglenida nachgewiesen, obwohl die Paramylon-Granula bei diesen Arten zuvor bereits mikroskopisch beobachtet wurden.

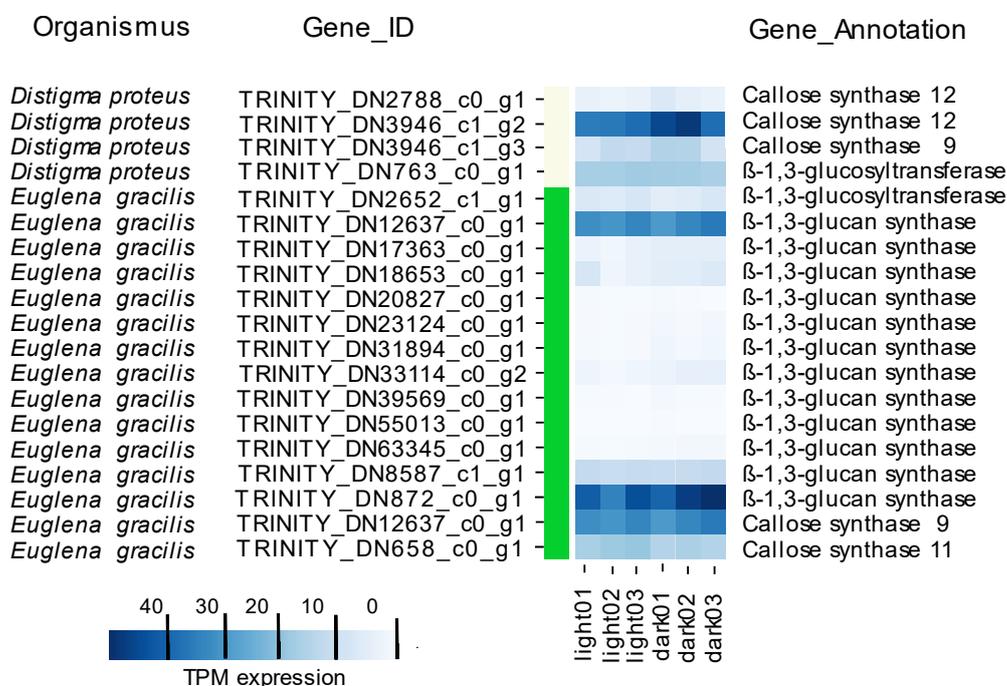
### 3.8. TRANSKRIPTOMANALYSE VON *EUGLENA GRACILIS* UND *DISTIGMA PROTEUS*

Zur Identifizierung des Einflusses auf die lichtabhängige Expression des Paramylon-Synthase-Komplexes und die weiteren  $\beta$ -1,3-Glucan-Synthasen wurden zunächst die untersuchten Organismen (*Euglena gracilis* und *Distigma proteus*) unter der Lichtbank mit einer Lichtintensität (Photosynthetisch Aktive Radiation: PAR) von 20  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  für vier Wochen angezogen. Zur Minimierung der Unterschiede zwischen den Zellkulturen und experimentellen Bedingungen wurden je drei technische Replikate erstellt, wobei für jedes Replikat aus der gleichen Stammkultur umgeimpft wurde. Vor der Probenentnahme von *Euglena gracilis* lag die photosynthetische Effizienz ( $F_v/F_m$ ) zwischen 0,6 und 0,7 (s. Tab. 79). Da *Distigma proteus* nicht photosynthetisch ist, entfiel die entsprechende Messung hier. Von beiden Arten wurde die gesamte RNA isoliert und anschließend von der Firma Novogene analysiert. Eine zusätzliche rRNA-Depletion und eine Anreicherung eukaryotischer RNA (mittels des Poly-A tails) wurden durchgeführt, um die Kontaminationen von Bakterien und rRNA zu vermindern. Für *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* wurden insgesamt 428.526 und 328.908 Transkripte erhalten, die durch clustern mittels cd-hit (###CITE) auf 306.063 und 246.742 verringert werden konnten.

Anschließend wurden die Nukleotidsequenzen mittels TransDecoder und des LongOrfs Befehls (###CITE) in Proteinsequenzen umgeschrieben und diese mit der BLASTp-Suche mit einem e-value von  $1e^{10}$  gegen eine lokale Kopie der Uniprot-Datenbank

(Datum des downloads 31.03.2021) gelistet. Alle Proteine, die in diesem Schritt nicht annotiert wurden, wurden dann mittels BLASTp und einem e-value von  $1e^{10}$  gegen eine modifizierte TrEMBL Datenbank abgeglichen (Datum des downloads 31.03.2021), die nur Sequenzen von Eugleniden enthielt. Insgesamt konnten bei *Euglena gracilis* 32.579 Transkripte und bei *Distigma proteus* 8.835 annotiert werden. Die Annotationsergebnisse ließen sich in einer Heatmap darstellen (s. Abb. 74). Ein Abgleich der annotierten Gene mittels BUSCO (###CITE) ergab, dass 46,2 % bzw. 42,3 % der 130 in allen Eugleniden vorkommenden Gene jeweils im Transkriptom von *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* vorhanden waren. Demnach ist trotz der deutlich geringeren Annotierung des *Distigma* Transkriptoms ein ähnlicher Prozentsatz an eugleniden-spezifischen Genen vorhanden und die beobachteten Unterschiede lassen sich vermutlich auf die phototrophe bzw. heterotrophe Lebensweise von *E. gracilis* und *D. proteus* zurückführen.

In der Heatmap werden Organismus, Gene\_ID und Gene\_Annotation gezeigt. Unten werden die unterschiedlichen Umweltbedingungen (light und dark) für jeweils drei Proben dargestellt. Die Farbskala entspricht der Genexpressionsintensität (TPM-transcripts per million), wobei je dunkler die blaue Farbe erschien, desto höher die Genexpressionsintensität war.



**Abbildung 74:** Heatmap zur Darstellung der Transkriptomanalyse (grüne Linie für *Euglena gracilis*, weiße Linie für *Distigma proteus*)

### 3.8.1. DIE ANNOTIERTEN PROTEINE & EXPRIMIERTEN GENE VON *EUGLENA GRACILIS*

Die 15 Proteine, die bei *Euglena gracilis* in der Lichtphase und Dunkelphase annotiert wurden, werden in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt. Neben der Gene\_ID sind der Genname sowie Mean\_light / Mean\_dark, der log2foldChange, die Protein\_ID und der Proteinname angegeben. Beim Mean\_light / Mean\_dark handelt es sich um das durchschnittliche Expressionslevel des jeweiligen Gens in allen Proben. Der log2fold Change zeigt an, wie stark sich die Genexpression zwischen der Lichtphase und der Dunkelphase unterschied.

**Tabelle 51:** Darstellung der annotierten Proteine bei *Euglena gracilis*

| Protein_ID                   | Proteinname  | Genname                       |
|------------------------------|--|-------------------------------|
| TRINITY_DN2652_c1_g1_i1.p1   | $\beta$ -1,3-glucosyltransferase ( $\beta$ 3Glc-T) (EC 2.4.1.-)                                    | B3GLCT B3GALTL B3GTL          |
| TRINITY_DN12637_c0_g1_i18.p1 | $\beta$ -1,3-glucan synthase   | GSL2                          |
| TRINITY_DN17363_c0_g1_i1.p1  | $\beta$ -1,3-glucan synthase   | GSL1                          |
| TRINITY_DN18653_c0_g1_i1.p1  | $\beta$ -1,3-glucan synthase   | GSL1                          |
| TRINITY_DN20827_c0_g1_i2.p1  | $\beta$ -1,3-glucan synthase   | GSL1                          |
| TRINITY_DN23124_c0_g1_i2.p2  | $\beta$ -1,3-glucan synthase   | GSL1                          |
| TRINITY_DN31894_c0_g1_i1.p1  | $\beta$ -1,3-glucan synthase   | GSL1                          |
| TRINITY_DN33114_c0_g2_i1.p1  | $\beta$ -1,3-glucan synthase   | GSL1                          |
| TRINITY_DN39569_c0_g1_i1.p2  | $\beta$ -1,3-glucan synthase   | GSL1                          |
| TRINITY_DN55013_c0_g1_i1.p2  | $\beta$ -1,3-glucan synthase   | GSL1                          |
| TRINITY_DN63345_c0_g1_i5.p1  | $\beta$ -1,3-glucan synthase   | GSL1                          |
| TRINITY_DN8587_c1_g1_i1.p6   | $\beta$ -1,3-glucan synthase   | GSL1                          |
| TRINITY_DN872_c0_g1_i2.p1    | $\beta$ -1,3-glucan synthase   | GSL1                          |
| TRINITY_DN12637_c0_g1_i18.p1 | Callose synthase 9 (EC 2.4.1.34) (1,3- $\beta$ -glucan synthase) (Protein GLUCAN SYNTHASE-LIKE 10) | CALS9 GSL10 At3g07160 T1B9.18 |
| TRINITY_DN658_c0_g1_i3.p1    | Callose synthase 11 (EC 2.4.1.34) (1,3- $\beta$ -glucan synthase) (Protein GLUCAN SYNTHASE-LIKE 1) | CALS11 GSL1 At4g04970 T32N4.8 |

Insgesamt wurden 15 Aminosäuresequenzen identifiziert, von denen 12 als  $\beta$ -1,3-Glucan-Synthasen, zwei als Callose-Synthasen und eine als  $\beta$ -1,3-Glucosyl-Transferase annotiert werden konnten (s. Tab. 51). Davon wiesen die beiden Proteine TRINITY\_DN872\_c0\_g1\_i2.p1 (GSL1, 2.274 aa) und TRINITY\_DN12637\_c0\_g1\_i18.p1 (GSL2, 2.270 aa) höhere Ähnlichkeiten mit der Proteinsequenz von  $\beta$ -1,3-Glucan-Synthase aus *Euglena gracilis* Z (LC225614.1 und LC225615.1) auf.

**Tabelle 52:** Auflistung der exprimierten Gene bei *Euglena gracilis* in der Lichtphase und Dunkelfase

| Gene_ID               | light01 | light02 | light03 | Mean_light | dark01 | dark02 | dark03 | Mean_dark | log2fold Change |
|-----------------------|---------|---------|---------|------------|--------|--------|--------|-----------|-----------------|
| TRINITY_DN2652_c1_g1  | 6,968   | 6,298   | 7,777   | 7,014      | 5,173  | 5,774  | 7,635  | 6,194     | NA              |
| TRINITY_DN12637_c0_g1 | 30,624  | 29,323  | 32,462  | 30,803     | 28,375 | 32,286 | 34,474 | 31,712    | NA              |
| TRINITY_DN17363_c0_g1 | 3,161   | 2,05    | 3,695   | 2,969      | 4,821  | 4,915  | 5,057  | 4,931     | NA              |
| TRINITY_DN18653_c0_g1 | 8,053   | 2,177   | 3,571   | 4,6        | 5,246  | 5,442  | 6,599  | 5,762     | NA              |
| TRINITY_DN20827_c0_g1 | 0,883   | 0,382   | 0,525   | 0,597      | 0,786  | 0,204  | 0      | 0,33      | NA              |
| TRINITY_DN23124_c0_g1 | 0,634   | 0,474   | 0,63    | 0,579      | 1,402  | 0,641  | 1,5    | 1,181     | NA              |
| TRINITY_DN31894_c0_g1 | 0,843   | 0,547   | 0,668   | 0,686      | 2,218  | 1,198  | 2,004  | 1,807     | NA              |
| TRINITY_DN33114_c0_g2 | 2,455   | 1,213   | 2,114   | 1,927      | 2,913  | 3,976  | 3,952  | 3,614     | NA              |
| TRINITY_DN39569_c0_g1 | 0,518   | 0,28    | 0,171   | 0,323      | 0,983  | 0,408  | 0,342  | 0,578     | NA              |
| TRINITY_DN55013_c0_g1 | 0       | 0       | 0       | 0          | 0,35   | 0      | 0      | 0,117     | NA              |
| TRINITY_DN63345_c0_g1 | 0,779   | 0,393   | 0,822   | 0,665      | 1,137  | 1,426  | 1,453  | 1,339     | NA              |
| TRINITY_DN8587_c1_g1  | 12,375  | 11,314  | 11,896  | 11,862     | 11,581 | 11,887 | 12,678 | 12,049    | NA              |
| TRINITY_DN872_c0_g1   | 39,655  | 32,938  | 42,425  | 38,339     | 38,235 | 45,364 | 48,071 | 43,89     | NA              |
| TRINITY_DN12637_c0_g1 | 30,624  | 29,323  | 32,462  | 30,803     | 28,375 | 32,286 | 34,474 | 31,712    | NA              |
| TRINITY_DN658_c0_g1   | 16,38   | 18,191  | 18,824  | 17,798     | 14,694 | 15,991 | 14,981 | 15,222    | NA              |

Aus Tabelle 52 geht hervor, dass die Expression der Gene bei der Transkriptomanalyse stark variiert. Die Expression lag bei dem Gen TRINITY\_DN55013\_c0\_g1 auf einem niedrigen Niveau (0, 0,35, 0,117). Auffällig ist, dass die Gene TRINITY\_DN872\_c0\_g1 (10.829 bp) und TRINITY\_DN12637\_c0\_g1 (7.958 bp) im Vergleich zu den anderen identifizierten Genen erhöhte Expressionswerte (39,235, 45,364, 48,071 und 28,375, 32,286, 34,474) aufweisen. Allerdings wurden bei diesen Genen zwischen der Lichtphase und der Dunkelfase keine signifikanten Expressionsunterschiede nachgewiesen.

### 3.8.2. DIE ANNOTIERTEN PROTEINE & EXPRIMIERTEN GENE VON *DISTIGMA PROTEUS*

Die 4 Proteine, die bei *Distigma proteus* im Hellen und im Dunkeln annotiert wurden, werden in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt. Neben der Gene\_ID sind der Genname sowie das Mean\_light / Mean\_dark, der log2foldChange, die Protein\_ID und der Proteinname angegeben. Beim Mean\_light / Mean\_dark handelt es sich um das durchschnittliche Expressionslevel des jeweiligen Gens in allen Proben. Der log2fold Change zeigt an, wie stark sich die Genexpression zwischen der Lichtphase und Dunkelfase unterschied.

**Tabelle 53:** Darstellung der annotierten Proteine bei *Distigma proteus*

| Protein_ID                  | Proteinname   | Gename  |
|-----------------------------|---|---|
| TRINITY_DN2788_c0_g1_i10.p1 | Callose synthase 12 (EC 2.4.1.34) ( $\beta$ -1,3-glucan synthase)<br>(Protein GLUCAN SYNTHASE-LIKE 5) | CALS12 GSL5 PMR4 At4g03550<br>F9H3.18 T5L23.4 |
| TRINITY_DN3946_c1_g2_i1.p1  | Callose synthase 12 (EC 2.4.1.34) ( $\beta$ -1,3-glucan synthase)<br>(Protein GLUCAN SYNTHASE-LIKE 5) | CALS12 GSL5 PMR4 At4g03550<br>F9H3.18 T5L23.4 |
| TRINITY_DN3946_c1_g3_i1.p1  | Callose synthase 9 (EC 2.4.1.34) ( $\beta$ -1,3-glucan synthase)<br>(Protein GLUCAN SYNTHASE-LIKE 10) | CALS9 GSL10 At3g07160 T1B9.18                 |
| TRINITY_DN763_c0_g1_i19.p1  | $\beta$ -1,3-glucosyltransferase ( $\beta$ 3Glc-T) (EC 2.4.1.-)                                       | B3glct B3galtl Gm1057                         |

Aus der Transkriptomanalyse geht hervor, dass die beiden Proteine TRINITY\_DN2788\_c0\_g1\_i10.p1 (GSL1, 1518 aa) und TRINITY\_DN3946\_c1\_g2\_i1.p1 (GSL2, 2.298 aa) als Callose-Synthase annotiert wurden. Außerdem konnte eine  $\beta$ -1,3-Glucosyltransferase identifiziert werden. Allerdings zeigten die Proteine TRINITY\_DN2788\_c0\_g1\_i10.p1 (GSL1, 1518 aa) und TRINITY\_DN3946\_c1\_g2\_i1.p1 (GSL2, 2.298 aa) Ähnlichkeiten mit der Proteinsequenz von  $\beta$ -1,3-Glucan-Synthase aus *Euglena gracilis* Z (LC225614.1 und LC225615.1).

**Tabelle 54:** Auflistung der exprimierten Gene bei *Distigma proteus* in der Lichtphase und Dunkelphase

| Gene_ID              | light01 | light02 | light03 | Mean_light | dark01 | dark02 | dark03 | Mean_dark | log2Fold Change |
|----------------------|---------|---------|---------|------------|--------|--------|--------|-----------|-----------------|
| TRINITY_DN2788_c0_g1 | 3,595   | 2,968   | 3,753   | 3,439      | 6,886  | 4,65   | 3,532  | 5,023     | NA              |
| TRINITY_DN3946_c1_g2 | 33,995  | 34,573  | 36,77   | 35,113     | 43,591 | 46,218 | 36,469 | 42,093    | NA              |
| TRINITY_DN3946_c1_g3 | 8,539   | 12,442  | 11,836  | 10,939     | 15,201 | 15,02  | 8,952  | 13,058    | NA              |
| TRINITY_DN763_c0_g1  | 16,587  | 16,726  | 17,722  | 17,012     | 17,418 | 17,185 | 16,138 | 16,914    | NA              |

Die Ergebnisse wiesen auf, dass das Gen TRINITY\_DN3946\_c1\_g2 (7.664 bp) als einziges auf dem höchsten Niveau exprimiert wurde. Allerdings zeigt die Expression dieses Gens keinen signifikanten Anstieg. Die Expressionslevel lagen bei TRINITY\_DN2788\_c0\_g1 (4.842 bp) auf dem niedrigsten Niveau. Beide Gene zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Licht- und Dunkel-Periode.

### 3.8.3. UNTERSUCHUNG DER ANNOTIERTEN PROTEINE

#### 3.8.3.1. SIGNALPEPTID

Die Proteinsequenzen des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* wurden auf das Vorhandensein von Signalpeptiden mittels unterschiedlicher Programme untersucht (Hiller et al. 2004, Nielsen 2017, Horton & Nakai 1997, Letunic et al. 2020). Es wurden keine potentiellen Signalpeptide bei den beiden Proteinsequenzen TRINITY\_DN872\_c0\_g1\_i2.p1 (GSL1, 2274 aa) und TRINITY\_DN2788\_c0\_g1\_i10.p1 (GSL1, 1518 aa) aus *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* gefunden. Im Gegensatz dazu wurde bei den Proteinsequenzen TRINITY\_DN12637\_c0\_g1\_i18.p1 (GSL2, 2270 aa) und TRINITY\_DN3946\_c1\_g2\_i1.p1 (GSL2, 2298 aa) jeweils ein Signalpeptid detektiert. In Tabelle 55 sind die Position des Signalpeptides und die Spaltstelle dargestellt:

**Tabelle 55:** Identifizierung eines Signalpeptides in der Proteinsequenz aus *Euglena gracilis* und *Distigma proteus*

| Programm      | <i>Euglena gracilis</i>     |             | <i>Distigma proteus</i>     |             |
|---------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|
|               | Position des Signalpeptides | Spaltstelle | Position des Signalpeptides | Spaltstelle |
| PrediSi       | 1-34 aa                     | 34          | 1-33 aa                     | 33          |
| SignalP- 4.1  | 1-34 aa                     | 34-35       | 1-33 aa                     | 33-34       |
| PSORTII       | 1-34 aa                     | 34-35       | 1-33 aa                     | 33-34       |
| Genious Prime | 1-34 aa                     | -           | 1-33 aa                     | -           |
| SMART         | 1-34 aa                     | -           | 1-33 aa                     | -           |
| InterPro      | 1-34 aa                     | -           | 1-33 aa                     | -           |

#### 3.8.3.2. TRANSMEMBRAN-HELIX (TMH)

Nachfolgend konnten mit unterschiedlichen Programmen Transmembran-Helices in den Proteinsequenzen von *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* identifiziert werden (Pasquier et al. 1999, Moller et al. 2001). Bei den Proteinsequenzen aus *Euglena gracilis* konnten je nach Programm 4 bis 15 potentielle Transmembran-Helices prognostiziert werden. Im Gegensatz dazu wurden bei *Distigma proteus* keine bis 14 mögliche Transmembran-Helices identifiziert. Die Lage dieser Transmembran-Helices weisen fast identische Aminosäure-Positionen auf. Vergleicht man die Ergebnisse zwischen Genious Prime und SMART, fällt auf, dass die Ergebnisse von Genious Prime einige Überlappungspositionen in den Proteinsequenzen aufweisen. Diese wurden bei dem Programm SMART während der Identifizierung der TMHs automatisch aussortiert.

Aufgrund dieser Überlappungsbereiche umfasst SMART alle möglichen TMHs und Aminosäure-Positionen (s. Tab. 56 & 57).

**Tabelle 56:** Identifizierung der Transmembran-Helices (TMHs) in der Proteinsequenz aus GSL1

| Proteinsequenz aus GSL1 | <i>Euglena gracilis</i> |   | <i>Distigma proteus</i> |   |
|-------------------------|-------------------------|---|-------------------------|---|
|                         | Programm                | Anzahl der TMHs   | Position der TMHs       | Anzahl der TMHs   |
| <b>TMHMM-2.0</b>        | 13                      | 241 - 263, 678 - 700, 705 - 727, 742 - 764, 776 - 798, 813 - 835, 865 - 887, 1852 - 1874, 2082 - 2104, 2119 - 2141, 2148 - 2167, 2172 - 2194, 2227 - 2249   | 11                      | 1045 - 1067, 1079 - 1101, 1106 - 1128, 1184 - 1206, 1211 - 1233, 1311 - 1333, 1348 - 1370, 1382 - 1401, 1416 - 1438, 1457 - 1476, 1480 - 1502 |
| <b>SMART</b>            | 11                      | 243 - 263, 675 - 695, 706 - 719, 740 - 757, 776 - 790, 813 - 833, 866 - 887, 1719 - 1739, 1760 - 1773, 1842 - 1857, 1866 - 1883, 2082 - 2105, 2119 - 2139, 2145 - 2165, 2172 - 2196, 2230 - 2239, 2241 - 2250 | 11                      | 1045 - 1067, 1079 - 1101, 1106 - 1128, 1184 - 1206, 1211 - 1233, 1311 - 1333, 1348 - 1370, 1382 - 1401, 1416 - 1438, 1457 - 1476, 1480 - 1502 |
| <b>Genious Prime</b>    | 13                      | 241 - 263, 678 - 700, 705 - 727, 742 - 764, 776 - 798, 813 - 835, 865 - 887, 1872 - 1874, 2082 - 2104, 2119 - 2141, 2148 - 2167, 2172 - 2194, 2227 - 2249   | 11                      | 1045 - 1067, 1079 - 1101, 1106 - 1128, 1184 - 1206, 1211 - 1233, 1311 - 1333, 1348 - 1370, 1382 - 1401, 1416 - 1438, 1457 - 1476, 1480 - 1502 |
| <b>PRED-TMR</b>         | 6                       | 243 - 263, 492 - 513, 678 - 696, 706 - 728, 814 - 832, 877 - 894  | 0                       | -   |

**Tabelle 57:** Identifizierung der Transmembran-Helices (TMHs) in der Proteinsequenz aus GSL2

| Proteinsequenz aus GSL2 | <i>Euglena gracilis</i> |   | <i>Distigma proteus</i> |   |
|-------------------------|-------------------------|---|-------------------------|---|
|                         | Programm                | Anzahl der TMHs   | Position der TMHs       | Anzahl der TMHs   |
| <b>TMHMM-2.0</b>        | 15                      | 921 - 943, 1007 - 1029, 1033 - 1055, 1076 - 1098, 1139 - 1161, 1766 - 1788, 1803 - 1825, 1832 - 1849, 1886 - 1908, 1921 - 1943, 2036 - 2058, 2065 - 2087, 2092 - 2114, 2123 - 2145, 2201 - 2223 | 14                      | 5 - 27, 438 - 460, 1048 - 1070, 1077 - 1096, 1118 - 1140, 1171 - 1193, 1814 - 1839, 1848 - 1870, 1931 - 1953, 1965 - 1984, 2112 - 2134, 2139 - 2161, 2171 - 2193, 2241 - 2263 |
| <b>SMART</b>            | 10                      | 921 - 943, 1007 - 1029, 1033 - 1055, 1076 - 1098, 1139 - 1161, 2036 - 2058, 2065 - 2087, 2092 - 2114, 2123 - 2145, 2201 - 2223  | 9                       | 5 - 27, 438 - 460, 1048 - 1070, 1077 - 1096, 1118 - 1140, 1171 - 1193, 2112 - 2134, 2139 - 2161, 2171 - 2193, 2241 - 2263   |
| <b>Genious Prime</b>    | 15                      | 921 - 943, 1007 - 1029, 1033 - 1055, 1076 - 1098, 1139 - 1161, 1766 - 1788, 1803 - 1825, 1832 - 1849, 1886 - 1908, 1921 - 1943, 2036 - 2058, 2065 - 2087, 2092 - 2114, 2123 - 2145, 2201 - 2223 | 14                      | 5 - 27, 438 - 460, 1048 - 1070, 1077 - 1096, 1118 - 1140, 1171 - 1193, 1814 - 1839, 1848 - 1870, 1931 - 1953, 1965 - 1984, 2112 - 2134, 2139 - 2161, 2171 - 2193, 2241 - 2263 |
| <b>PRED-TMR</b>         | 4                       | 6 - 28, 443 - 463, 855 - 875, 922 - 940   | 4                       | 9 - 28, 439 - 459, 890 - 910, 957 - 975   |

In Abbildung 75 werden die Positionen der TMHs und weitere identifizierte Bereiche aus GSL2 für *Distigma proteus* exemplarisch veranschaulicht. Die blau markierten Bereiche sind die wahrscheinlichen Positionen der TMHs aus der Aminosäure-Analyse.



**Abbildung 75:** Darstellung der Lage der Transmembran-Helices (TMHs) in der Proteinsequenz der Paramylon-Synthase aus *Distigma proteus* nach SMART (rot: der Bereich des Signalpeptids, blau: Transmembran-Helices (TMHs))

### 3.8.3.3. MEMBRANTOPOLOGIE

Mittels der Programme PSORTII (PSORTII Unterprogramm MTOP) und InterPro wurden die Positionen des C-Terminus und des N-Terminus sowie die Glucosyltransferase-Familie in den Proteinen aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* untersucht. Nach den vorliegenden Ergebnissen der Programme ist davon auszugehen, dass in den Proteinen drei mögliche Bereiche vorhanden sind. Bei *Euglena gracilis* befinden sich der große C-Terminus im nicht-cytoplasmatischen Kompartiment, mehrere Transmembran-Helices und ein kleiner N-Terminus im Cytoplasma. Im Gegensatz dazu lokalisieren bei *Distigma proteus* der kleine C-Terminus im Cytoplasma und der große N-Terminus im nicht-cytoplasmatischen Bereich. Aufgrund der Position des C-Terminus und N-Terminus gehören die Proteine aus GSL1 und GSL2 von *Euglena gracilis* zu der Gruppe I Transmembranproteine, wohingegen die Proteine von *Distigma proteus* in Gruppe II eingeordnet werden (Goder & Spiess 2001).

**Tabelle 58:** Membrantopologie der Paramylon-Synthase aus *Euglena gracilis* und *Distigma proteus*

|  | <i>Euglena gracilis</i>    |                            | <i>Distigma proteus</i>    |                            |
|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|  | Proteinsequenz aus<br>GSL1 | Proteinsequenz aus<br>GSL2 | Proteinsequenz aus<br>GSL1 | Proteinsequenz aus<br>GSL2 |
| <b>Transmembran<br/>Gruppe</b>         | I                          | I                          | II                         | II                         |
| <b>Glucosyltransferase<br/>Familie</b> | GT-48                      | GT-48                      | GT-48                      | GT-48                      |

### 3.8.3.4. LOKALISIERUNG

Um die mögliche Lokalisierung der identifizierten Transmembran-Helices zu bestimmen, wurden die Proteinsequenzen aus dem Paramylon-Synthase-Komplex von *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* mittels des Programms PSORTII (PSORTII Unterprogramm MTOP) in den Membran-Systemen einer eukaryotischen Zelle untersucht (s. Tab. 59).

**Tabelle 59:** Mögliche Lokalisierung des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *Euglena gracilis* und *Distigma proteus*

| Membransysteme                 | <i>Euglena gracilis</i>    |                            | <i>Distigma proteus</i>    |                            |
|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                                | Proteinsequenz aus<br>GSL1 | Proteinsequenz aus<br>GSL2 | Proteinsequenz aus<br>GSL1 | Proteinsequenz aus<br>GSL2 |
| Plasmamembran                  | 69,6 %                     | 78,9 %                     | 69,6 %                     | 73,9 %                     |
| Endoplasmatisches<br>Retikulum | 17,4 %                     | 13,0 %                     | 26,1 %                     | 26,1 %                     |
| Vakuole                        | 8,7 %                      | 4,3 %                      | -                          | -                          |
| Zellkern                       | 4,3 %                      | 4,3 %                      | 4,3 %                      | -                          |
| Cytoplasma                     | -                          | 4,3 %                      | -                          | -                          |

Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse könnte geschlossen werden, dass sich die Transmembran-Helices in der Plasmamembran befinden. Durch die Aktivitätsmessung in den vorherigen Arbeiten wurde jedoch bereits nachgewiesen, dass der Paramylon-Synthase-Komplex sich in der Membran der Paramylon-Granula befindet. Insofern entspricht diese Analyse nicht den vorhandenen Forschungsergebnissen.

### 3.8.3.5. MOLEKULARGEWICHT DER PROTEINE

Mittels der Programme Science Gateway, Altogen Labs, AAT Bioquest und Bioinformatics wurden die Molekulargewichte der Proteine von GSL1 und GLS2 aus *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* eingeschätzt. In Tabelle 60 werden die Ergebnisse dargestellt:

**Tabelle 60:** Mögliches Proteingewicht der Proteine von GSL1 und GLS2 aus *Euglena gracilis* und *Distigma proteus*

| Programm                      | <i>Euglena gracilis</i>    |                            | <i>Distigma proteus</i>    |                            |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                               | Proteinsequenz aus<br>GSL1 | Proteinsequenz aus<br>GSL2 | Proteinsequenz aus<br>GSL1 | Proteinsequenz aus<br>GSL2 |
| Science Gateway               | 257,08 kDa                 | 260,5 kDa                  | 174,81 kDa                 | 264,98 kDa                 |
| Altogen Labs                  | 257,0807 kDa               | 260,4962 kDa               | 174,8079 kDa               | 264,9772 kDa               |
| AAT Bioquest                  | 257,03979 kDa              | 260,45599 kDa              | 174,78419 kDa              | 264,93438 kDa              |
| Bioinformatics                | 257,08 kDa                 | 260,5 kDa                  | 174,81 kDa                 | 264,98 kDa                 |
| Mögliche<br>Molekulargewichte | 257 kDa                    | 261 kDa                    | 175 kDa                    | 265 kDa                    |

### 3.8.3.6. UNTERSUCHUNG DER MOTIVE

Im nächsten Schritt wurden die Proteinsequenzen aus der Transkriptomanalyse auf das Vorhandensein von Motiven untersucht, um den Paramylon-Synthase-Komplex mit den identifizierten Glucosyltransferasen aus den anderen Organismen zu vergleichen. Mit Ausnahme von *Euglena gracilis* wurden bei allen Proteinsequenzen (s. Anhang) DXD-Motive festgestellt. In jedem DXD-Motiv befindet sich zwischen den beiden Aspartaten (D) eine weitere Aminosäure, die je nach Proteintyp variiert. In den analysierten Proteinsequenzen wurden Alanin (A), Glutaminsäure (E), Glycin (G), Histidin (H), Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Serin (S), Valin (V) als beliebige Aminosäure nachgewiesen. Die weiteren RXTG- und QXXRW-Motive wurden auch bei den Proteinsequenzen gezeigt. Die DXD-, RXTG- und QXXRW-Motive und die Position der Aminosäuren in den Proteinsequenzen werden tabellarisch dargestellt:

**Tabelle 61:** Identifizierung der Motive

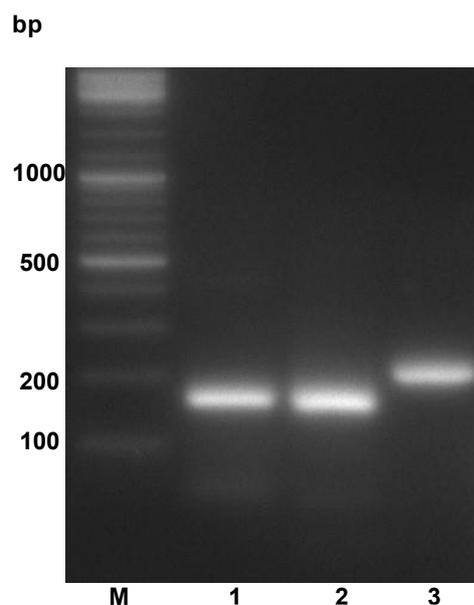
|                                 | <i>Euglena gracilis</i>  |                         | <i>Distigma proteus</i>    |   |
|---------------------------------|--|-------------------------|----------------------------|---|
|                                 | Proteinsequenz aus GSL1  | Proteinsequenz aus GSL2 | Proteinsequenz aus GSL1    | Proteinsequenz aus GSL2   |
| <b>Charakteristische Motive</b> | <b>DXD</b> (DID, DVD, 2xDLD, DAD, DMD), <b>RXTG</b> (RLTG, RRTG), <b>QXXRW</b> (QQVRW)   | <b>RXTG</b> (RCTG)      | <b>DXD</b> (DLD, DSD)      | <b>DXD</b> (DGD, DLD, DED, DHD), <b>RXTG</b> (RCTG)                                       |
| <b>Position der Motive</b>      | D73I74D75,<br>D587V588D589,<br>D1221L1222D1223,<br>D1532A1533D1534,<br>D465M466D467,<br>D1979L1980D1981,<br>R1258L1259T1260G1261,<br>R1625R1626T1627G1628<br>Q1176Q1177V1178R1179W1180 | R35C36T37G38            | D65L66D67,<br>D732S733D734 | D167G168D169,<br>D1288L1289D1290,<br>D1446E1447D1448,<br>D1838H1839D1840,<br>R34C35T36G37 |

## 3.9. ERGEBNISSE DER QUANTITATIVEN ECHTZEIT-PCR (qPCR)

### 3.9.1. ETABLIERUNG DER qPCR

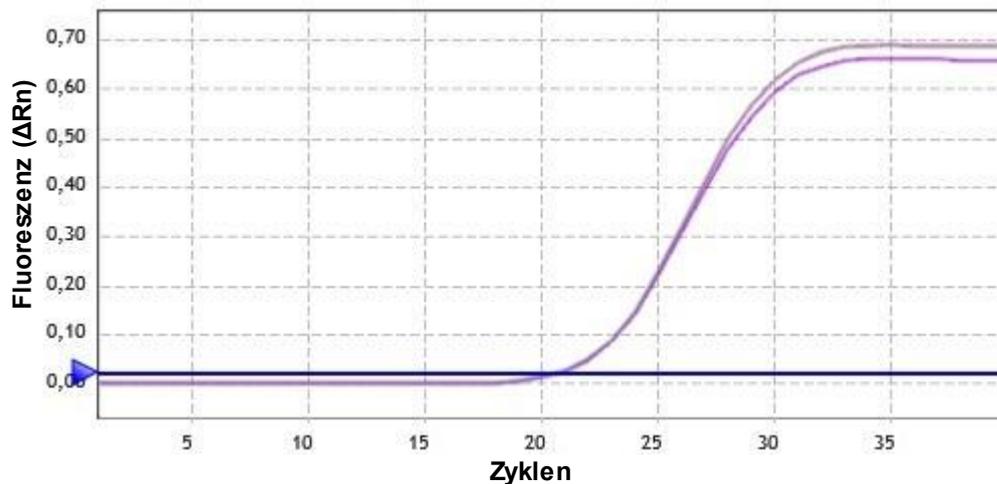
Auch wenn die Proteinforschung mittels zahlreicher optimierter Verfahren und Methoden es ermöglicht, die Proteine zu erfassen, konnten die zeitliche Messung ihrer Konzentration, Lebensdauer und Aktivitätslevel in den Organismen lange Zeit nicht ermittelt werden. Hier bietet die quantitative Real-Time-PCR eine empfindliche Methode, bei der mRNA-Levels statt Protein erfasst werden. Die Ergebnisse werden als C<sub>t</sub>-Wert (Cycle threshold) angegeben, welche als indirektes Maß für die Menge der aktiven mRNA des Zielgens benannt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) zeitliche Veränderungen der Expressionslevels nach Induktion mit Licht untersucht. Hiermit sollte die Frage geklärt werden, zu welchen Zeitpunkten die Gene für den Paramylon-Synthase-Komplex aktiv sind. Zu diesem Zweck wurde die mRNA aus *Euglena gracilis*, die zuvor unter den verschiedenen Lichtverhältnissen (im Dauerdunkeln, unter Dauerlicht und Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 h) angezogen wurden, nach verschiedenen Zeitrahmen (Nullproben, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Tage) isoliert (s. Kap. 2.2.10.1.2). Diese Zeitpunkte wurden gewählt, da bei der Transkriptomanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen der Licht- und Dunkelphase beobachtet werden konnten. Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurde durch den NanoDrop 2000 Spektrophotometer bemessen. Anschließend wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde nach den Angaben des my-Budget 5x EvaGreen® QPCR-Mix Plus Kits für die Real-Time-PCR mit autoklaviertem VE-Wasser verdünnt und bei -80°C gelagert. Die verwendeten Primer (s. Tab. 8) wurden mittels Programmen wie Primer3Plus und Eurofins Primer design degeneriert, wobei darauf geachtet wurde, dass die optimale PCR-Produkt-Länge von 200 bp nicht überschritten wurde. Um zu bestimmen, bei welcher Annealing-Temperatur (58,1°C, 59,1°C, 60,0°C, 61,0°C, 61,9°C oder 62,9°C) keine Nebenprodukte erscheinen, wurden zunächst die Primer-Paare mittels Gradienten-PCR kontrolliert. Bei allen Temperaturen wurde ein einziges PCR-Produkt beobachtet. Es erfolgte die Festlegung der Temperatur auf 60°C (s. Kapitel 2.2.10.5). Abbildung 76 zeigt die PCR-Produkte aus der Gradienten-PCR nebeneinander bei 60°C:



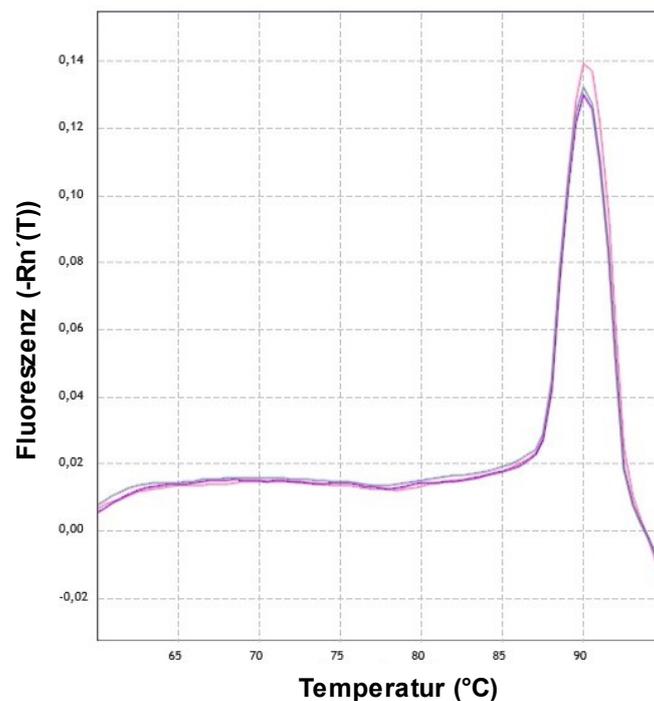
**Abbildung 76:** Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte aus Pars\_2.1888 (1), EF $\alpha$ 1(2) und ParsD4 (3), DNA-Marker in bp (M)

Für jedes Primer-Paar wurden die optimale cDNA-Menge und Primer-Konzentration mit Hilfe einer Primer-Titration getestet. Bei der Bestimmung der optimalen Menge wurde darauf geachtet, dass der  $C_T$ -Wert für die ausgewählte cDNA-Konzentration am niedrigsten ist. Im Gegensatz dazu wurden die höchsten Fluoreszenz-Werte erwartet. Abbildung 77 zeigt exemplarisch die Amplification-Plots, d. h. die in Echtzeit gemessene Fluoreszenz in Abhängigkeit von den Zyklen. Gezeigt ist das Ergebnis für die optimale cDNA-Konzentration für das Primer-Paar ParsD4 Forward und Reverse.



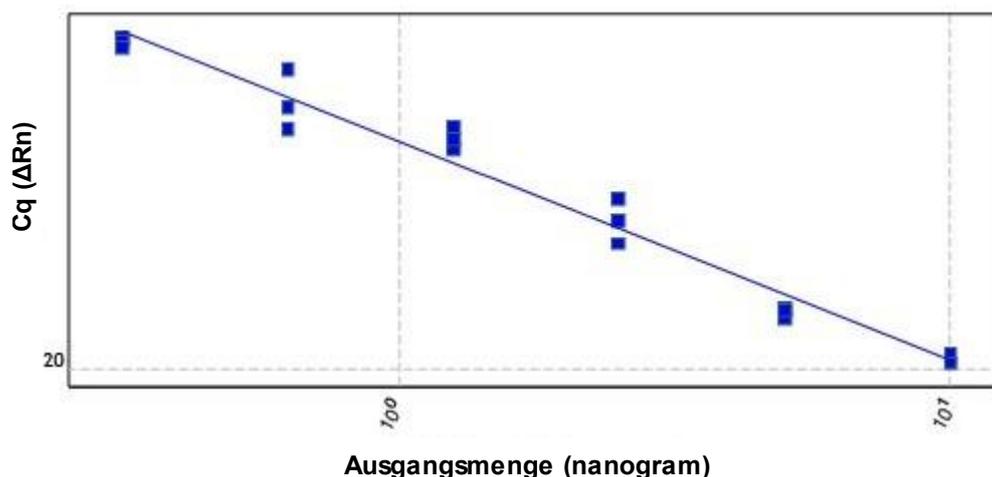
**Abbildung 77:** Darstellung der Amplification-Plots (Triplet) für das Primer-Paar ParsD4

Um die mögliche Amplifizierung von zwei oder mehreren cDNA-Fragmenten auszuschließen, wurden zusätzlich Schmelzkurven für alle Primer-Paare aufgenommen. Diese geben die gemessenen Fluoreszenz-Werte in Abhängigkeit von der Temperatur an.



**Abbildung 78:** Darstellung der Schmelzkurven (Triplet) der optimalen cDNA-Konzentration für das Primer-Paar ParsD4

Abbildung 78 zeigt bei der Temperatur von 90°C ein einziges qPCR-Produkt. Bei dieser spezifischen Schmelztemperatur wurde der DNA-Doppelstrang denaturiert, wobei Eva Green freigesetzt und somit eine Änderung der Fluoreszenz registriert wurde. Anhand dieser Schmelzkurve wurde die Spezifität der qPCR aufgezeigt, da ein deutlicher einzelner Peak beobachtet wurde. Als Nächstes wurde die Effizienz der qPCR für jedes Primer-Paar mit einer Standardkurve bestimmt. Zur Erstellung der Standardkurve wurden unterschiedliche cDNA-Verdünnungsreihen (s. Kapitel 2.2.10.6.3) eingesetzt. Bei der Standardkurve wurde der  $C_q$ - bzw.  $C_t$ -Wert gegen die jeweilige Ausgangsmenge an cDNA aufgetragen. Daraus ergibt sich die Feststellung, dass je höher die cDNA-Konzentration ist, desto weniger qPCR-Zyklen notwendig sind, um das definierte Fluoreszenzniveau zu erreichen. Aus diesem Grund ist der  $C_t$ -Wert bei dieser cDNA-Probe am kleinsten. Mit zunehmender Verdünnung steigt der  $C_t$ -Wert kontinuierlich an. Die Effizienz wurde mittels Agilent Aria Software anhand der erstellten Standardkurve automatisch berechnet. In Abbildung 79 ist die Standardkurve für das Primer-Paar ParsD4 dargestellt.



**Abbildung 79:** Darstellung der Standardkurve für das Primerpaar ParsD4

Aus der Abbildung 79 geht hervor, dass die Effizienz für das Primer-Paar ParsD4 bei etwa 109,26 % liegt. Unter optimierten Reaktionsbedingungen sollte die Real-Time-Effizienz zwischen 90 % und 110 % liegen (Bivins et al. 2021, Parkins et al. 2020). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bedingungen der qPCR erfolgreich etabliert wurden. Die cDNA-Ausgangsmenge, die Primer-Konzentration, die Größe des PCR-Produktes, die Effizienz der qPCR für das ausgewählte Referenzgen (Elongation factor 1-alpha (EFα1), (Gu et al. 2011)) und die untersuchten Zielgene (ParsD4 & Pars2\_1888) sind detailliert in Tabelle 62 dargestellt.

**Tabelle 62:** Darstellung der etablierten Bedingungen der qPCR

| Primer-Paare | Produktgröße | cDNA-Menge | Primer-Konzentration | Effizienz (%) |
|--------------|--------------|------------|----------------------|---------------|
| ParsD4       | 165 bp       | 7,5 ng/μl  | 200 nM / 150 nM      | 109,26        |
| Pars_2.1888  | 123 bp       | 5 ng/μl    | 150 nM / 150 nM      | 109,53        |
| EFα1         | 124 bp       | 7,5 ng/μl  | 100 nM / 150 nM      | 96,39         |

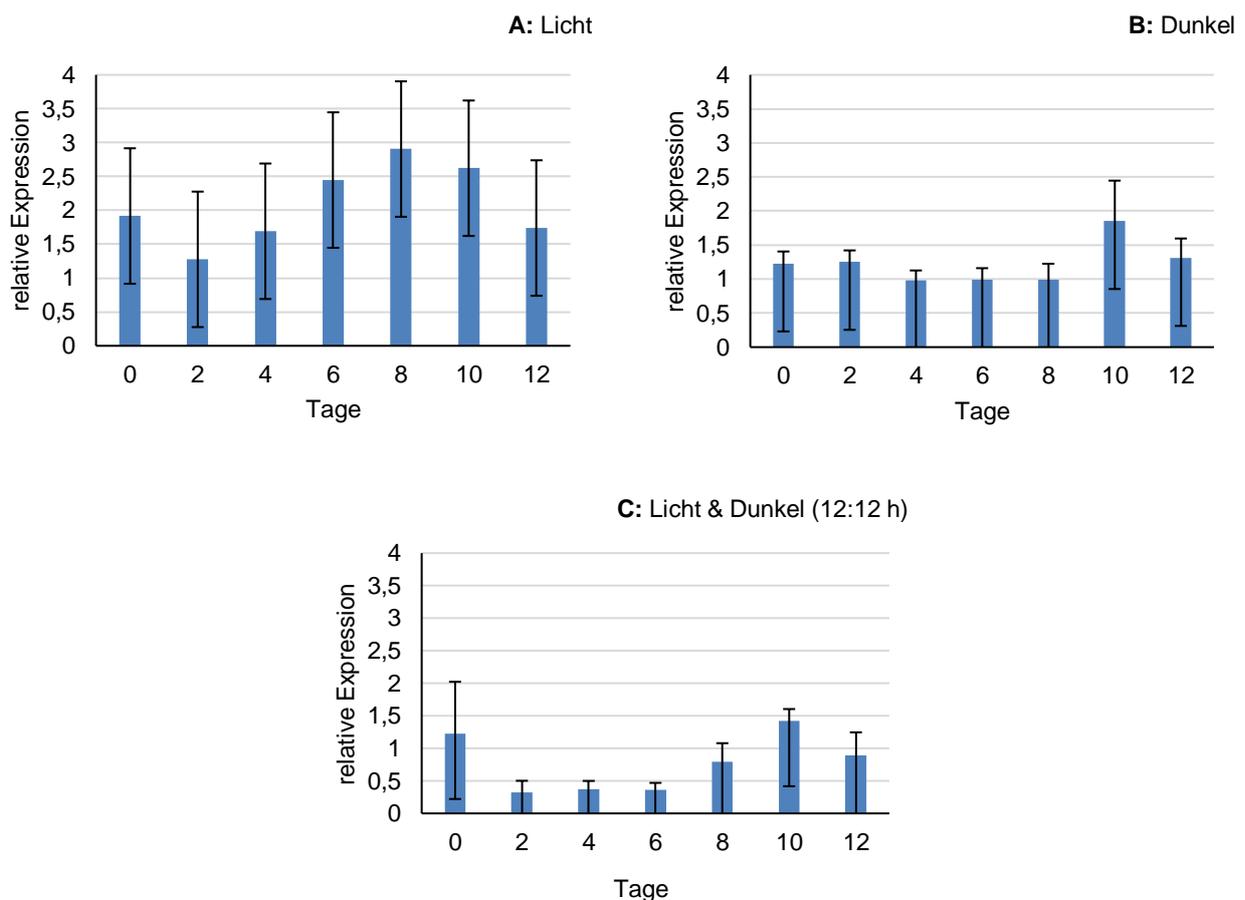
Die Berechnung der relativen Expressionsunterschiede erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak & Schmittgen 2001). Diese Methode wird auch  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  genannt. Nachfolgend ist die Gleichung zur Berechnung der Expressionsunterschiede dargestellt:

$$\Delta\Delta C_t = (C_{tZielgen} - C_{tReferenzgen})_{Zeitx} - (C_{tZielgen} - C_{tReferenzgen})_{Zeit0}$$

### 3.9.2. TÄGLICHE VERÄNDERUNG DER PARAMYLON-SYNTHASE-KOMPLEX-KODIERENDEN GENE (GSL1 (PARSD4) & GSL2 (PARS\_2.1888))

#### 3.9.2.1. EINFLUSS VON LICHT AUF DIE GSL1-EXPRESSION IN *EUGLENA GRACILIS*

Der Einfluss der Lichtverhältnisse auf die Expression von GSL 1 wurde zweimal über 12 Tage bei *Euglena gracilis* gemessen (s. Abb. 80). Dieser Zeitraum wurde gewählt, weil sich die Zellkulturen nach 12 Tagen annähernd im Palmellastadium befinden. Die Proben wurden alle 2 Tage morgens entnommen. Das Expressionslevel von GSL1 variiert zwischen den verschiedenen Lichtverhältnissen. Der Tag 0 beschreibt den Zeitraum, an dem die Zellen umgeimpft wurden. Es fällt auf, dass das Expressionsniveau bei dem Zustand Licht zunächst abnahm. An Tag 2 wurde das niedrigste Expressionsniveau beobachtet. Es folgte eine kontinuierlich steigende Tendenz bis zum Tag 8, an dem der Paramylon-Synthase-Komplex am höchsten exprimiert wurde. Von Tag 8 bis Tag 12 nahm das Expressionslevel ab.



**Abbildung 80:** Veränderung der GSL1-Expression (GSL1, ParsD4) über den Zeitraum von 12 Tagen unter den verschiedenen Licht-Zuständen (Licht, Dunkel, Licht & Dunkel 12:12 h)

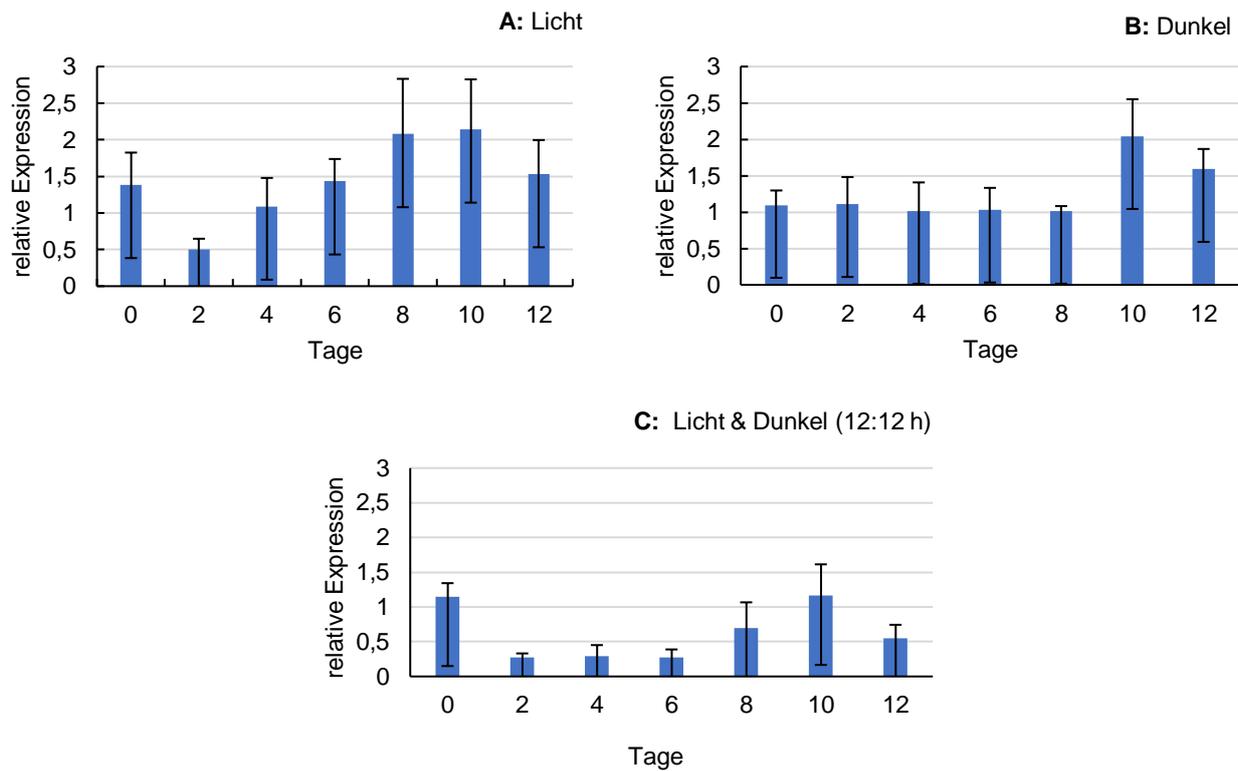
Vermutlich in Folge der Dauerdunkelheit kam es 2 Tage nach der Umimpfung der *Euglena gracilis*-Zellkultur zunächst zu einem leichten Anstieg des Expressionslevels. Von Tag 2 bis Tag 4 ging das Expressionslevel von GSL1 leicht zurück. Mit anhaltender Dunkelheit befand sich die Expression auf einem konstant niedrigen Niveau. Nach 8 Tagen Dauerdunkelheit kam es zu einem signifikanten Anstieg der Expression, wobei das Expressionsniveau am 10. Tag sein Maximum erreichte. Am Ende der Dunkelheit hat sich die Expression wiederum von 1,854 auf 1,312 verringert.

In dem Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 h nahm die Expression zunächst sehr stark ab und erreichte das niedrigste Niveau an Tag 2. Dort verweilte sie bis Tag 6, stieg bis Tag 10 deutlich an und erreichte an diesem Tag auch den Höchststand. Von dort an nahm das Expressionsniveau von 1,417 auf 0,896 ab.

### **3.9.2.2. EINFLUSS VON LICHT AUF DIE GSL2-EXPRESSION IN *EUGLENA GRACILIS***

Die Expression der GSL2 wurde wie bei GSL1 über 12 Tage hinweg gemessen. Im Hellen verringerte sich das Expressionslevel um mehr als die Hälfte bis zum Tag 2. An diesem Tag lag die Expression auf dem niedrigsten Niveau. Im Verlauf des Experiments stieg die Expression beständig an, wobei das Expressionsniveau sein Maximum nach 10 Tagen erreichte. Nach dieser signifikanten Veränderung nahm die Expression wieder ab.

In der Dunkelheit zeigte das Expressionslevel keine nennenswerte Veränderung bis zum Tag 8. Nach diesem Tag zeigte die Expression einen signifikanten Anstieg, wobei sie sich von Tag 8 zu Tag 10 mehr als verdoppelte. Danach nahm das Expressionsniveau wieder um etwa ein Drittel ab.



**Abbildung 81:** Veränderung der GSL2-Expression (GSL2, Pars2\_1888) über den Zeitraum von 12 Tagen unter den verschiedenen Licht-Zuständen (Licht, Dunkel, Licht & Dunkel 12:12 h)

Bei dem Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 h fiel die Expression nach zweitägiger Kultivierung auf ihr Minimum und blieb 6 Tage lang auf annähernd gleichem Niveau. An den Tagen 8 und 10 verdoppelte sich die Expression jeweils, erreichte an Tag 10 ihren Höhepunkt und halbierte sich an Tag 12.

### 3.10. ÜBERSICHT ALLER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- *Distigma proteus*, *Khawkinea quartana* und *Peranema sp.* lassen sich nicht in großen Maßen kultivieren. Die Untersuchungen ergaben, dass die Zellen im Verlauf der Kultivierung Kohlenhydratquellen oder Mikroorganismen wie z. B. Bakterien benötigen.
- Es konnte sowohl bei *Distigma proteus* als auch bei *Peranema sp.* Paramylon-Synthase-Komplex isoliert werden. In den Fraktionen konnten mittels des UDP-Glucosyltransferase-Tests deutliche Aktivitäten des Paramylon-Synthase-Komplexes gezeigt werden. Im Vergleich zu *Distigma proteus* wurden bei *Peranema sp.* höhere Aktivitäten gemessen. Durch Verwendung von  $Mn^{2+}$  zusammen mit  $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$  im UDP-Glucosyltransferase-Test wurde die Aktivität des Paramylon-Synthase-Komplexes aus diesen beiden Spezies in unterschiedlichen Maßen gehemmt, was für die Manganabhängigkeit des Enzyms spricht.
- Der Paramylon-Synthase-Komplex aus den beiden Spezies bandiert bei der NATIVE-PAGE im Polyacrylamidgel mit einem Molekulargewicht von 669 kDa. Unter denaturierenden Bedingungen wurden bei *Distigma proteus* insgesamt drei Untereinheiten detektiert: ca. 60 kDa und zwei Untereinheiten zwischen 34 und 43 kDa. Bei *Peranema sp.* konnte nur eine einzige Untereinheit mit einer Molekularmasse zwischen 50 und 70 kDa nachgewiesen werden. Die Funktion dieser Untereinheiten konnte nicht ermittelt werden.
- Die Untersuchungen mit unterschiedlichen Glucanasen ergaben, dass Paramylon aus *Distigma proteus* und *Peranema sp.* nur aus Glucose-Molekülen besteht. Darüber hinaus wurde mittels Säure- und Alkalihydrolyse festgestellt, dass Paramylon sich durch verdünnte Alkalilösung hydrolysieren lässt.
- Mittels PCR konnten einige Regionen der Gensequenzen GSL1 und GSL2 für den Paramylon-Synthase-Komplex bei *Euglena gracilis*, *Distigma proteus*, *Khawkinea quartana* und *Peranema sp.* nachgewiesen werden. Die Entschlüsselung der vollständigen Gensequenzen ist nicht gelungen.

- 
- Bei der Transkriptomanalyse lassen sich die Genexpressionsniveaus von dem Paramylon-Synthase-Komplex aus *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* vergleichen. Für diese beiden Arten wurden die vollständigen GSL1- und GSL2-Sequenzen und die Proteinsequenzen des Paramylon-Synthase-Komplexes ermittelt. Angesichts der Proteinsequenzen konnten die Paramylon-Synthase-Komplexe von beiden Spezies in die GT 48-Familie eingeordnet werden. Darüber hinaus konnte die Anzahl der Transmembran-Helices (TMHs) jeweils für GSL1 und GSL2 (bei *Euglena gracilis* 11 und 10 sowie bei *Distigma proteus* 11 und 9), Signalpeptide, Motive und Molekulargewichte der Proteine mit Hilfe von spezifischen Programmen eingeschätzt werden.
  
  - Bei den Untersuchungen mit qPCR konnten die Expressionslevels des Paramylon-Synthase-Komplexes von *Euglena gracilis* für GSL1 und GSL2 bei Dauerbelichtung, Dauerdunkelheit und dem Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 h gemessen werden.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. ISOLIERUNG DES PARAMYLON-SYNTHASE-KOMPLEXES

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Vorkommen des Paramylon-Synthase-Komplexes in den einzelligen Flagellaten *Euglena gracilis*, *Distigma proteus*, *Khawkinea quartana* und *Peranema sp.* untersucht. Hinweise auf den Paramylon-Synthase-Komplex aus *Euglena gracilis* liegen in einigen Studien vor: Sie wird in der Paramylon-Membran lokalisiert und interagiert mit mehreren Proteinen. Der in den bisherigen Untersuchungen eingesetzte Paramylon-Synthase-Komplex wurde nur aus *Euglena gracilis* aufgereinigt (Bäumer 1998, Bäumer et al. 2001, Marechal & Goldemberg 1964, Brommund 2004). Bisher liegen keine Informationen über den Paramylon-Synthase-Komplex aus den weiteren farblosen und heterotrophen Arten der Euglenida vor. In dieser vorliegenden Arbeit wurde der Paramylon-Synthase-Komplex aus einigen farblosen Arten der Euglenida *Distigma proteus* und *Peranema sp.* isoliert. Dabei wurden gängige Isolations- und Aufreinigungsmethoden von membranassoziierten  $\beta$ -1,3-Glucosyltransferasen verwendet (Okuda et al. 1993, Kamat et al. 1992), die von Bäumer et al. 2001 optimiert und modifiziert wurden.

Aufgrund der Isolation und der weiteren Untersuchungen des Paramylon-Synthase-Komplexes spielte die optimierte Kultivierung der untersuchten Organismen eine bedeutende Rolle. Allgemein betrachtet unterscheiden sich die Anzuchtbedingungen der Forscher in den einzelnen Arbeitsgruppen (Tamm 1967, Chen 1950, Chang 1966, Roth 1957, Sathe & Durand 2015, Saito et al. 2003, Saranak & Foster 2005, Breglia et al. 2007, Triemer 1997, Noselli et al. 2019, Murray 1984, Rehman et al. 2006, Řezanka et al. 2015). In den meisten dargestellten Studien wurden die Zellen entweder in Erlenmeyerkolben oder in Reagenzgläsern kultiviert, die Ausbeute war entsprechend gering. Für die Kultivierung muss gewährleistet sein, dass die Zellen kontinuierlich in ausreichender Menge mit Nährstoffen versorgt werden, bevor die stationäre Phase des Wachstums eintritt. In dieser sogenannten Phase sind die notwendigen Nährstoffe im Nährmedium kaum noch vorhanden (Werner-Washburne et al. 1996, Pletnev et al. 2015, Kolter et al. 1993, Jaishankar & Srivastava 2017). Die untersuchten Organismen *Distigma proteus*, *Khawkinea quartana* und *Peranema sp.* wurden in einem schwer standardisierbaren Anzuchtmedium bestehend aus Erde, Sand und Erbsen oder Weizenkörnern angezogen (Pringsheim 1946, Kies 1967), wodurch die Optimierung der Kultivierung erschwert wurde. Neben diesen Kulturbedingungen sind der pH-Wert, die Temperatur und die Begasung des Nährmediums von großer Bedeutung. Die Zelldichte variierte in den Erlenmeyerkolben, Schott-Flaschen

und Reagenzgläsern, da die Nährstoffzufuhr nicht fortdauernd erfolgte und der Sauerstoffgehalt, die Temperatur und der pH-Wert des Mediums weder gemessen noch reguliert werden konnten. Basierend auf diesen Erkenntnissen wäre es denkbar, die Anzucht der Zellen in einem Fermenter durchzuführen, in dem sich die Wachstumsbedingungen besser kontrollieren lassen. So könnten eventuell höhere Wachstumsraten und bessere Ausbeuten erzielt werden. Zur Anwendung des Fermenters wäre die Herstellung des Erde-Sand-Erbesen-Mediums in großer Menge notwendig. Eine Schwierigkeit liegt in den üblichen Ansetzungsschritten, da das Medium drei Mal hintereinander im Wasserbad gekocht und im Kühlschrank heruntergekühlt werden muss, um fremde Organismen und einige Bakterien abzutöten. Ein Wasserbad in ausreichender Größe war jedoch nicht vorhanden. Eine Alternative für die Vereinfachung der Ansetzung des Mediums stellt die Sterilisation durch Autoklavieren dar. Bei diesem Verfahren werden Bakterien mitsamt den Sporen und weiteren Organismen, die in den Schichten der Erde leben, vernichtet. In diesem Medium wurde jedoch kein Wachstum der Zellen mehr beobachtet, so dass die Zellkulturen nach drei Tagen im Palmellastadium vorlagen. Da *Distigma proteus* und *Khawkinea quartana* eine osmotrophische Ernährungsweise aufweisen (Preisfeld et al. 2000 & 2001), brauchen die beiden Spezies anscheinend die Nährstoffe oder Kohlenstoffquellen, die von den Bakterien im Medium freigesetzt werden.

Im Falle von *Peranema sp.* wurden in den vorhergehenden Studien die Anzucht ausschließlich in einem 25 - 100 ml Medium mit unterschiedlichen Nährstoffen durchgeführt (Tamm 1967, Saranak & Foster 2005, Triemer 1997, Roth 1957, Chang 1966). Vorversuche unserer Arbeit zeigten bereits, dass *Peranema sp.* sich in einem 200 ml WEES-Medium mit Weizenkörnern kultivieren lässt. Bei einem größeren Mediumvolumen verfielen die Zellen bereits nach kurzer Zeit ins Palmellastadium. Diese Feststellung wies nach, dass die Kultivierung von *Peranema sp.* nur eingeschränkt durchgeführt werden kann. Bei *Euglena gracilis* war die Etablierung der Anzuchtbedingungen nicht notwendig, da für diese Spezies ausreichend empirische Daten vorlagen (Cramer & Myers 1952, Brommund 2004, Muchut et al. 2021, Ebenezer et al. 2019, He et al. 2021, Suzuki et al. 2015).

Nach Optimierung der Kultivierungs- und Isolationsmethoden gelangte die Arbeit zum Kernpunkt des Forschungsziels, dem Paramylon-Synthase-Komplex.

In einigen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass die in *Euglena gracilis* vorliegende Paramylon-Synthase ein großer Proteinkomplex ist, deren Größe bei 669 kDa liegt. Bezüglich der Anzahl und des Molekulargewichtes der Untereinheiten dieses Komplexes werden in der Literatur sehr unterschiedliche Aussagen vertreten. Bäumer 1998 hat durch SDS-PAGE-Ergebnisse nachgewiesen, dass der Paramylon-Synthase-Komplex sich in 13

Untereinheiten austrennt. Dabei sind zwei Proteine mit einer molekularen Masse von 34 kDa und 54 kDa die substratbindenden Untereinheiten des Paramylon-Synthase-Komplexes. Die Größe der übrigen Untereinheiten wurde nicht beschrieben. Zu ganz anderen Ergebnissen führt die Arbeit von Brommund 2004: In dieser Doktorarbeit wurde dargestellt, dass der Paramylon-Synthase-Komplex aus 7 Untereinheiten besteht: 124, 89, 78, 54, 45, 29 und 27 kDa und eine substratbindende Untereinheit wurde mittels der Photoaffinitäts-Markierung mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-UDP-Glucose identifiziert. Allerdings liegt das Molekulargewicht dieser bei 54 kDa. In einer weiteren Veröffentlichung konnte eine einzige Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 37 kDa nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen nachgewiesen werden (Bäumer et al. 2001, Bäumer 1998, Brommund 2004, Suzuki et al. 2013).

In dieser Arbeit ließen sich die Proteine beim Aufreinigen des Paramylon-Synthase-Komplexes aus *Distigma proteus* und *Peranema sp.* mit der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation abtrennen und elektrophoretisch detektierbar machen. Das Molekulargewicht entsprach den Erwartungen und es trat ein 669 kDa großes Protein in einigen Fraktionen auf. Ein wesentlicher Unterschied des Paramylon-Synthase-Komplexes zwischen *Distigma proteus* und *Peranema sp.* liegt in der Größe und der Anzahl der Untereinheiten. Bei *Distigma proteus* wurden insgesamt drei Untereinheiten unter denaturierenden Bedingungen detektiert: ca. 60 kDa und zwei Untereinheiten zwischen 34 und 43 kDa. Interessanterweise wurde bei *Peranema sp.* eine einzige Untereinheit identifiziert, deren Größe zwischen 50 und 70 kDa lag. Genaue Aussagen über die Funktion der erwähnten Proteine sind nicht möglich.

Zwar geben die NATIVE-PAGE- und SDS-PAGE-Ergebnisse Hinweise auf die Molekülgröße der Proteine und die Sauberkeit der Fraktionen, aber es konnten keine eindeutigen Aussagen über die Enzymaktivität gemacht werden. Bei früheren Arbeiten wurde die Aktivitätsmessung der Glucosyltransferasen mittels eines radioaktiven Verfahrens mit  $^{14}$ C-markierter UDP-Glucose über Nacht durchgeführt (Bäumer et al. 2001, Bäumer 1998, Brommund 2004). Bei diesem Enzymtest geht es um den Einbau von radioaktiv markiertem Nukleotidzucker durch die isolierte Glucosyltransferase. Die in dieser vorliegenden Arbeit verwendete Aktivitätsmessung mittels des „UDP-Glo™-Glucosyltransferase-Tests“ im 96-Well-Plattenformat stellte ein schnelles und einfaches Verfahren dar, das auf der Umwandlung von UDP in ATP und der Erzeugung des Lichtsignals einer Luciferase-Reaktion basiert. Somit konnte eine zeit- und kostengünstige Messungsmethode angewendet werden, um verifizierbare Aussagen über die Aktivität des isolierten Enzyms zu erhalten. Da sich diese beiden Methoden für die Aktivitätsmessung in

vielen experimentellen Aspekten, wie der Durchführung und der Dauer des Tests, dem Reaktionsvolumen des Substrats sowie der Entsorgung der Reaktionsprodukte unterscheiden, erschweren diese Unterschiede einen Vergleich der Studien. Die Ergebnisse des UDP-Glc<sup>TM</sup>-Glucosyltransferase-Tests belegen die Existenz des Paramylon-Synthase-Komplexes in *Distigma proteus* und *Peranema sp.*

In der Einleitung wurde schon erwähnt, dass das aus *Euglena gracilis* isolierte Paramylon ein unverzweigtes und wasserunlösliches  $\beta$ -1,3-Glucan ist (Guo et al. 2020, Jeon et al. 2020, Kiss et al. 1987 & 1988, Triemer & Zakryś 2015). In einigen Studien wurden die Synthese, die Struktur, die Formen, die Position und die Menge des Paramylons gezeigt (Pochmann 1956, Marechal & Goldemberg 1964, Marchessault & Deslandes 1979, Kiss et al. 1988a & 1988b, Kiss et al. 1986 & 1987, Monfils et al. 2011). Darüber hinaus wurden die eventuellen industriellen und medizinischen Nutzungsmöglichkeiten des Paramylons in einigen Arbeiten vorgestellt (Gissibl et al. 2019, Kottuparambil et al. 2019, AIST 2013, Shibakami & Sohma 2018, Suzuki et al. 2013, Shibakami et al. 2013b & 2014, Kottuparambil et al. 2019, AK Sonat et al. 2018, Sakagami et al. 1989, Barsanti et al. 2001, Koizumi et al. 1993, Watanabe et al. 2013, Okouchi et al. 2019, Harada et al. 2020, Yasuda et al. 2018, Sugiyama et al. 2009 & 2010, Lee et al. 2016, Barsanti & Gualtieri 2018, Sonck et al. 2010, Skov et al. 2012, Levine et al. 2018, Yamamoto et al. 2018a & b). Die Vermutung, dass Paramylon aus *Distigma proteus* und *Peranema sp.* auch ein unverzweigtes  $\beta$ -1,3-Glucan ist, ließ sich durch die chemischen und enzymatischen Nachweisreaktionen bestätigen. Die Analyse des Enzymproduktes aus *Distigma proteus* und *Peranema sp.* erbrachte weitere Informationen über die Materialeigenschaften und Struktur des Paramylons. Ingold & Seitz 1986 hatten gezeigt, dass es möglich ist, einzelne Komponenten von Nukleotidzucker mit Hilfe von Sprühreagenzien auf der DC-Platte zu detektieren. Diese Methode wurde auch hier mit einigen Modifizierungen eingesetzt. Die dünnschichtchromatographische Analyse der enzymatischen Abbauprodukte stellte fest, dass  $\beta$ -1,3-Glucanase das Paramylon in Glucose-Moleküle zerlegen kann. In einer vorherigen Arbeit wurde nachgewiesen, dass Paramylon aus *Euglena gracilis* bei Behandlung mit  $\beta$ -1,3-Glucanase in Glucose und ein Glucose-Oligomer gespalten wird (Bäumer et al. 2001), deren Größe nicht eindeutig zuzuordnen war. Diese unterschiedlichen Resultate bestätigen die Vermutung, dass der Aufbau des Paramylons innerhalb der Euglenida variieren kann.

Bei den übrigen Enzymreaktionen mit  $\alpha$ -Amylase (1,4- $\alpha$ -D-Glucan-glucanohydrolase) und  $\beta$ -1,4-Glucanase konnten keine Produkte auf der DC-Platte beobachtet werden. Interessanterweise ergab es nur bei der Behandlung mit  $\beta$ -Amylase ein Abbauprodukt, das als Glucose identifiziert wurde.

Diese Ergebnisse entsprechen nur teilweise den Erwartungen, da Paramylon durch die Behandlung mit  $\beta$ -Amylase hydrolysiert wurde.

Es ist nicht möglich, dass  $\alpha$ -Amylase,  $\beta$ -Amylase und  $\beta$ -1,4-Glucanase Paramylon ( $\beta$ -1,3-Glucan) (Šantek et al. 2009) abspalten, weil diese Enzyme die  $\alpha$ -1,4-glykosidischen bzw.  $\beta$ -1,4-glykosidischen Verbindungen hydrolysieren können.

Die Ursache für das unerwartete Produkt bei  $\beta$ -Amylase könnte sein, dass die Aceton-Reste aus dem Waschschrift des Paramylons eine Konformationsänderung des Enzyms verursacht hat. Nie et al. 2015 haben in ihrer Arbeit gezeigt, dass die organischen Lösungen zur Konformationsänderung bei dem Enzym Tannase geführt haben. Diese signifikante Veränderung könnte ermöglichen, dass zwischen Paramylon und  $\beta$ -Amylase ein schwacher Substrat-Enzym-Komplex gebildet und anschließend Glucose als Reaktionsprodukt freigesetzt wird. Kiss et al. 1988a haben im Elektronenmikroskop gezeigt, dass die parallel angeordneten Filamente von Paramylon-Granula innerhalb der Segmente eine weniger homogene Matrix in einer organischen Lösung Ethanol bilden. Es wird vermutet, dass Paramylon aufgrund des Vorhandenseins der Aceton-Reste und der Veränderung der Matrix durch  $\beta$ -Amylase abgebaut werden kann. Konkretere Aussagen konnten bezüglich dieses Ergebnisses nicht gemacht werden, da im Rahmen dieser Analyse keine weiteren Untersuchungen durchgeführt wurden.

Um weiteren Aufschluss über die Eigenschaften des Paramylons aus *Distigma proteus* und *Peranema sp.* zu gewinnen, wurde Paramylon mit einer Säure- und Alkalilösung behandelt. Die DC-Ergebnisse ergaben, dass Paramylon sich nur unter verdünnten alkalischen Bedingungen hydrolysieren lässt, und dass es hauptsächlich aus Glucose-Monomeren besteht. Dieser Befund wurde in den früheren Arbeiten bestätigt (Bäumer 1998, Bäumer et al. 2001). Darüber hinaus können die höhere Konzentration der Säurelösung und Hitzezufuhr die Löslichkeit des Paramylons beeinflussen (Gottlieb 1850). Škodová-Sveráková et al. 2020 haben in ihrer aktuellen Untersuchung von Paramylon aus *Euglena gracilis* und *Diplonema papillatum* dünnschichtchromatographisch dargestellt, dass Paramylon bei der verwendeten Konzentration von 2 M Trifluoressigsäure bei 120°C in die Bestandteile gespalten wird.

#### 4.2. DIE PARAMYLON-SYNTHESE-KOMPLEXE VON *DISTIGMA PROTEUS* UND *PERANEMA SP.* IM VERGLEICH MIT ANDEREN GLUCOSYLTRANSFERASEN

Die Größe der Glucosyltransferasen variieren stark je nach dem Organismus. Beispielsweise verfügt die Glykogen-Synthase aus Säugetieren und Hefen über eine Molekularmasse von ca. 80 kDa. Ein Multienzym-Komplex Curdlan-Synthase aus *Agrobacterium sp.* strain ATCC31749 zeigt eine Molekulargröße zwischen ca. 420 und ca. 500 kDa. Im Gegensatz dazu besitzen Callose-Synthase-Komplexe aus *Arabidopsis thaliana* und *Populus xylem* eine höhere Molekularmasse von ca. 840 kDa (Roach 2002, Karnezis 2003, Song et al. 2010, Wang et al. 2008). In unserer Arbeit wurde Paramylon-Synthase aus *Distigma proteus* und *Peranema sp.* auf der gleichen Höhe von 669 kDa bandiert.

Die Enzymaktivität kann durch Ionenzufuhr ins Reaktionsmilieu beeinflusst werden. In etlichen Studien wurden die Wirkungen divalenten Kationen auf die Aktivität einiger Glucosyltransferasen beobachtet (Li et al. 1993, Robinson 1996, Kamat et al. 1992, Ingold & Seitz 1986, Bäumer et al. 2001, Fredrikson & Larsson 1989, Kohle et al. 1985, Kauss 1986). Hayashi et al. 1986 vertreten die Meinung, dass  $\text{Ca}^{2+}$  für Callose-Synthase bei der Synthese von  $\beta$ -1,3-Glucan in manchen Pflanzen als Aktivator fungiert. Sie wiesen nach, dass die Aktivität der Callose-Synthase durch die zusätzliche Zugabe von  $\text{Mg}^{2+}$  in niedriger Konzentration angehoben werden kann.

In der vorliegenden Arbeit zeigten  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen keine aktivierenden Wirkungen auf die Paramylon-Synthase. Bei dem UDP-Glo<sup>TM</sup>-Glucosyltransferase-Test sank die Aktivität der Paramylon-Synthase aus *Distigma proteus* sogar um 10 % in Anwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen und bei der Zugabe von 2,5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  fand eine weitere Aktivitätsverminderung in Höhe von 22 % statt. Bei *Peranema sp.* ist die Abnahme der Aktivität mit Zufuhr von jeweils 2,5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen im kleinen Rahmen von ca. 5 - 9 % geblieben. Diese Veränderungen hängen wahrscheinlich mit einer kooperativen Konformationsänderung zusammen (D'Urzo et al. 2012, Persson et al. 2001). Die Vermutung liegt nahe, dass das Substrat Schwierigkeiten hatte, an das Enzym zu binden. Die gemessenen Aktivitätswerte wiesen nach, dass  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen als Aktivator fungieren, da die höchste Aktivität beim Vorhandensein dieser Ionen beobachtet wurde. Diese Ergebnisse belegen, dass die Substratbindung bei den beiden isolierten Paramylon-Synthasen von der Anwesenheit eines bestimmten Metallions abhängig ist. Die Manganabhängigkeit der UDP-Glucuronyltransferase in Tieren wird auch durch Untersuchungen von Zakim & Vessey 1976 an Meerschweinchen bestätigt. Diese Analyse erwies, dass  $\text{Mn}^{2+}$  UDP-Glucuronyltransferase in der Vorwärtsreaktion aktiviert. Anders als bei der Vorwärtsreaktion

wird die Aktivität der Rückreaktion durch  $Mn^{2+}$ -Ionen gehemmt. Lairson et al. 2008 haben betont, dass bei der Mehrheit der Glucosyltransferasen die essenziellen zweiwertigen Metallionen wie  $Mn^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  die Trennung der Nukleosid-Diphosphate erleichtern. Dong et al. 2020 haben die Aktivitätsmessung der UDP-Glucosyltransferase, die die Korngröße und abiotische Stresstoleranz in der Reispflanze (*Oryza glaberrima*) reguliert, zum Vorhandensein von 10 nM  $MgCl_2$  gemessen. Dies bestätigt, dass diese UDP-Glucosyltransferase von Reis magnesiumabhängig ist.

Im Gegensatz dazu waren Bäumer et al. 2001 der Auffassung, dass der Paramylon-Synthase-Komplex aus *Euglena gracilis* ein calciumabhängiges Enzym ist, weil  $Ca^{2+}$ -Ionen zur Erhöhung der Aktivität in Höhe von 40 % führte. Auch bei dieser Studie stellte sich heraus, dass  $Mg^{2+}$ -Ionen eine hemmende Wirkung zeigten.

Rodríguez & Durante 1990 gelangen es, protein:Glucosyltransferase und glycogen:Glucosyltransferase aus den menschlichen Blutplättchen partiell zu isolieren. Bei der enzymatischen Kinetikmessung fällt auf, dass die beiden Glucosyltransferasen nicht die gleiche Abhängigkeit von Ionen zeigten, obwohl die Messungen unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden. Bei protein:glucosyltransferase fungierten 5 mM  $Ca^{2+}$ - und  $Mg^{2+}$ - Ionen als Aktivator, die jeweils zu der Erhöhung der Enzymaktivität um 23 % bzw. 11 % führten. Die Zugabe von 5 mM  $Mn^{2+}$  verursachte einen drastischen Rückgang, nämlich eine Hemmung des Enzyms um 76 %. Bei glycogen:glucosyltransferase dienten 5 mM  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ - und  $Mg^{2+}$ - Ionen als Aktivator, die die Enzymaktivität um 43 %, 8 % und 200 % erhöhten. Die Manganabhängigkeit der Glucosyltransferase in Bakterien wird auch durch Untersuchungen von Esposito et al. 2018 an *Salmonella enterica* bestätigt.

Die Literaturrecherchen ergaben, dass einige der bisher untersuchten Glucosyltransferasen ein charakteristisches Sequenzmotiv aufweisen. Bei den Cellulose-Synthasen aus Bakterien, Pflanzen und Pilzen sowie der Curdlan-Synthase aus *Agrobacterium sp.* wurden hoch konservierte D, D, D- und QXXRW-Motive nachgewiesen (Karnezis 2003, Li et al. 2014, Delmer 1999, Colombani et al. 2004, Sun et al. 2016, Stasinopoulos et al. 1999, Fugelstad et al. 2009, Morgan et al. 2012). Fungal-Glucosyltransferasen wie aus *Saccharomyces cerevisiae* zeigen ein konserviertes homologes RXTG-Motiv. Dieses Motiv stimmt mit dem R/KXXG-Motiv für ein UDP-Glucose-Bindungskonsensus überein, welches auch in Glykogen-Synthase existiert (Ishiguro et al. 1997, Tanaka et al. 2017). GSL2 aus *Euglena gracilis* Z hat kein DXD-Motiv, sondern ein RXTG-Motiv (RCTG). Im Gegensatz dazu hat GSL1 aus *Euglena gracilis* Z zwei DVD-Motive und RTLTG-RRTG Motive.

In dieser vorliegenden Arbeit konnten bei der Aminosäuresequenz von GSL1 aus *Euglena gracilis* neben dem RXTG- (RLTG und RCTG) und dem QXXRW-Motiv auch sechs DXD-Bereiche (DID, DVD, 2xDLD, DAD, DMD) identifiziert werden. Im Gegensatz dazu hat GSL2 nur ein RXTG-Motiv (RCTG) und keine DXD-Motive. Bei *Distigma proteus* wurden jeweils zwei DXD-(DLD, DSD) und vier DXD-(DGD, DLD, DED, DHD) Motive in GSL1 und in GSL2 gefunden. Zusätzlich wurde ein RXTG-Motiv (RCTG) in GSL2 nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass GSL1 und GSL2 für den Paramylon-Synthase-Komplex der untersuchten Organismen mit den Glucosyltransferasen aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen Ähnlichkeiten in Bezug auf die Motive aufweisen. Trotz aller Ähnlichkeiten stellt die Paramylon-Synthase eine einzigartige Glucosyltransferase dar.

Diese dargestellten Indizien bestätigen die Vermutung, dass die Paramylon-Synthase-Komplexe aus den untersuchten Organismen zu den Glucosyltransferasen der GT-A-Superfamilie gehören. In einigen Arbeiten wurde erwähnt, dass GT-A zweiwertige Ionen (z. B.  $Mn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$ ) für die enzymatische Aktivität benötigt und als ein weiteres Merkmal ein hochkonserviertes DXD-Motiv aufweist (Esposito et al. 2018, Jank et al. 2007, D'Urzo et al. 2012, Liu & Mushegian 2003, Breton et al. 2005, Lairson et al. 2008, Belyi & Aktories 2010). Die Analysen mittels des Programmes InterPro zeigten, dass die Aminosäuresequenzen von GSL1 und GSL2 aus *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* eine GT-48 Region besitzen und zu der GT-48 Familie gehören. Im Gegensatz dazu gehören einige Glucosyltransferasen wie Cellulose-Synthase und Callose-Synthase zu der GT-2 Familie (Lombard et al. 2013, Cantarel et al. 2009, Sethaphong et al. 2013).

Weitere Untersuchungen von Aminosäuresequenzen haben ergeben, dass die Identifizierung der Transmembran-Helices (TMHs) und ihrer Positionen mittels spezifischer Programme ermöglicht werden kann. Meistens werden diese Topologie-Analysen für Callose-Synthase, Cellulose-Synthase, Curdlan-Synthase und  $\beta$ -1,3-Glucan-Synthase aus den unterschiedlichen Organismen durchgeführt. Aus vielen vorherigen Arbeiten von verschiedenen Forschungsgruppen ist bekannt, dass die Anzahl der TMHs innerhalb der Glucosyltransferasen je nach dem Organismus stark variieren. Ein Vergleich der bekannten Glucosyltransferasen (GSs) bezüglich der Membrantopologie belegt, dass die meisten GSs 16 Transmembran-Helices aufweisen (Dong et al. 2005, Tomazett et al. 2010, Inoue et al. 1995, Beauvais et al. 2001, Hong et al. 2001a & 2001b). Allerdings besitzen einige Vertreter dieser Enzymfamilie eine niedrigere Anzahl (s. Tab. 63). Durch die Überprüfung mit SMART, Genious Pro, TMHMM-2.0 und PRED-TMR konnten die TMHs und ihre Aminosäurepositionen bei den Aminosäuresequenzen aus *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* identifiziert werden. Bei der Untersuchung wurden bei den Programmen Genious

Pro, TMHMM-2.0 identische Ergebnisse erzielt. Hingegen zeigten SMART und PRED-TMR wenige Transmembran-Bereiche. Der Vergleich der Ergebnisse zwischen SMART und Genious Pro stellte heraus, dass einige Überlappungsbereiche durch SMART ausgeschlossen werden. Nach SMART können GSL1 von Paramylon-Synthase-Komplex aus den beiden Organismen 11 Transmembran Helices besitzen. Bei GSL2 liegt die Anzahl der TMHs zwischen 9 und 10.

**Tabelle 63:** Übersicht der verschiedenen  $\beta$ -Glucan-Synthasen im Vergleich mit der Paramylon-Synthase aus *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* (Tanaka et al. 2017, Stasinopoulos et al. 1999, Delmer 1999, Morgan et al. 2012, Drula et al. 2022, Lombard et al. 2013, Cantarel et al. 2009, Li et al. 2014)

| Enzym                 | Enzymprodukt        | Glucosyltransferase Familie | Organismus                           | Genabkürzung | Anzahl der TMHs |
|-----------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------|
| Curdlan-Synthase      | $\beta$ -1,3-glucan | GT-2                        | <i>Agrobacterium sp.</i>             | CrdS         | 7               |
| Cellulose-Synthase    | $\beta$ -1,4-glucan | GT-2                        | <i>Gossypium hirsutum</i>            | GhCeSA-1     | 8               |
| Cellulose-Synthase    | $\beta$ -1,4-glucan | GT-2                        | <i>Rhodobacter sphaeroides</i>       | BcsA         | 8               |
| Paramylon-Synthase    | $\beta$ -1,3-glucan | GT-48                       | <i>Euglena gracilis</i>              | GSL1<br>GSL2 | 11<br>10        |
| Paramylon-Synthase    | $\beta$ -1,3-glucan | GT-48                       | <i>Distigma proteus</i>              | GSL1<br>GSL2 | 11<br>9         |
| Callose-Synthase      | $\beta$ -1,3-glucan | GT-48                       | <i>Arabidopsis thaliana</i>          | CalS5        | 16              |
| Yeast-Glucan-Synthase | $\beta$ -1,3-glucan | GT-48                       | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>      | Fks1p        | 16              |
| Glucan-Synthase       | $\beta$ -1,3-glucan | GT-48                       | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | PbFks1p      | 16              |
| Glucan-Synthase       | $\beta$ -1,3-glucan | GT-48                       | <i>Aspergillus fumigatus</i>         | AfFks1p      | 16              |

Alle eukaryotischen Proteine werden bis auf einige Proteine der Mitochondrien und Chloroplasten, im Zytosol synthetisiert. Viele Proteine müssen zu dem Zielort der Zelle transportiert werden, damit sie ihre Funktion zeigen können. Signalpeptide sind kurze Sequenzsegmente und für den Transport in das endoplasmatische Retikulum, die Chloroplasten, Mitochondrien, Peroxisomen oder den Zellkern und deren Membranen erforderlich. Diese Sequenz ermöglicht, dass die Proteine entweder die Membran

durchdringen oder in der Zielmembran verankern (Allen et al. 2019, Mitra et al. 2006, Johnson et al. 2013, Owji et al. 2018, Pfeiffer 2012, Krämer et al. 2020, Sun et al. 2005). In der Primärstruktur (Aminosequenz) konnte bei GSL2 aus *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* ein Signalpeptid aus 34 bzw. 33 Aminosäuren gefunden werden. Interessanterweise besitzt GSL1 kein Signalpeptid. Zwar befindet sich das Signalpeptid von GSL2 nach InterPro bei *Euglena gracilis* am Ende des N-Terminus, jedoch gibt es keine Information darüber, ob das Signalpeptid bei *Distigma proteus* auch am N-Terminus liegt.

Es wurde in einigen Untersuchungen gezeigt, dass der Paramylon-Synthase-Komplex sich in den Membranen der Paramylon-Granula befindet (Bäumer et al. 2001, Bäumer 1998, Brommund 2004). Bezüglich dieser Befunde könnte vermutet werden, dass das Signalpeptid wichtig ist, um den Paramylon-Synthase-Komplex in der Membran von Paramylon-Granula zu verankern. Es wäre auch denkbar, dass der Paramylon-Synthase-Komplex durch das Signalpeptid in das endoplasmatische Retikulum weitergeleitet werden muss, damit das Enzym seine Funktion entfalten kann.

#### 4.3. NUKLEINSÄURE-ANALYSE DER UNTERSUCHTEN EUGLENIDA

Das Vorkommen des Paramylon-Synthase-Komplexes anhand der Sequenzen führt zu neuen Erkenntnissen. Zu diesem Thema existieren nur sehr wenige weitere Untersuchungen und somit nur wenig Literatur. Zwar haben sich zahlreiche Studien in den letzten Jahren grundsätzlich mit biochemischen Analysen des Paramylons und seinen Anwendungsmöglichkeiten beschäftigt, aber diese Arbeiten hatten meist die Isolierung und Charakterisierung des Paramylon-Synthase-Komplexes zum Ziel. In vorliegender Arbeit wurden zwei neue Sequenzen aus Datenbanken in die Analyse eingeschlossen (Tanaka et al. 2017). Dadurch konnten die Primer für die PCR-Analyse aus *Euglena gracilis* Z erzeugt werden. Anhand der aufgeführten Untersuchungen nach der PCR-Methode konnte gezeigt werden, dass die Produktgröße nicht mit den vorhergesagten Größen der Primerdesign-Programme übereinstimmte. Darüber hinaus entstanden beim Einsetzen von gDNA als Template mehrere PCR-Produkte. Daraus resultiert der Nachteil, dass die Identifizierung durch Sequenzierung mehrerer Produkte mit höheren Kosten verbunden ist. Eine mögliche Ursache besteht darin, dass mehrere Introns in den Sequenzen existieren. Diese Vermutung wurde von den Ergebnissen der Agarosegel-Elektrophorese gestützt, da das Anwenden der cDNA entweder zu der Reduzierung der Anzahl oder der Verminderung der Größe des PCR-Produktes führte. Beide Probleme lassen sich durch die Einsetzung der cDNA umgehen, weil cDNA keine Introns beinhaltet (Carlon et al. 2005).

Ausgehend von den vorliegenden Sequenzen aus *Euglena gracilis* Z konnten für GSL1 und GSL2 insgesamt 23 und 18 Teilsequenzen aus *Euglena gracilis*, *Distigma proteus*, *Khawkinea quartana* und *Peranema sp.* ermittelt werden. Die Länge dieser Sequenzen variiert zwischen 73 und 268 bp. Die Alignments dieser Teilsequenzen sprechen für eine Variabilität der Nukleotidsequenzen. Allerdings ist die komplette Entschlüsselung der Gensequenzen von GSL1 und GSL2 nicht gelungen. Die BLASTx-Analyse ermöglichte, die erhaltenen Sequenzen aus *Euglena gracilis*, *Distigma proteus*, *Khawkinea quartana* und *Peranema sp.* den Sequenzen für den Paramylon-Synthase-Komplex aus *Euglena gracilis* Z zuzuordnen (Altschul et al. 1990, Tanaka et al. 2017). Zum jetzigen Zeitpunkt ist eine exakte Bestimmung der jeweiligen Spezies durch die identifizierten Sequenzen nicht möglich. An dieser Stelle stellt eine BLAST-Suche die einzige Methode für die Identifizierung der Paramylon-Synthase-Komplex kodierenden Gensequenzen dar, da keine Sequenzdaten für Paramylon-Synthase aus den anderen Spezies der Euglenida vorliegen. Diese Sequenzen kodieren jeweils 8 und 6 Regionen auf der GSL1 und GSL2 bei einigen untersuchten Organismen. Bezüglich dieser Erkenntnisse konnte davon ausgegangen werden, dass das Vorhandensein des Enzyms Paramylon-Synthase bei allen untersuchten Euglenida bestätigt wurde.

Tanaka et al. 2017 analysierten in ihrer Studie die Proteinsequenzen von GSL1 und GSL2 aus *Euglena gracilis* Z. Sie erhielten nur bei GSL1 eine MISS-, LacZ-(Beta-galactosidase/beta-glucuronidase) sowie eine Glucan-Synthase-Region und zeigten die Nukleotidsequenzen dieser Regionen. Trotz dieser Erkenntnisse konnte die Funktion dieser Regionen im Paramylon-Synthase-Komplex nicht überprüft werden. Diese ermittelten Sequenzen der Proteine ermöglicht in der vorliegenden Studie, zwei von diesen Regionen bei den untersuchten Organismen festzustellen. Der Bereich LacZ-(Beta-Galactosidase/beta-Glucuronidase) lässt sich in *Euglena gracilis*, *Distigma proteus*, *Khawkinea quartana* und *Peranema sp.* feststellen. Im Gegensatz dazu wurde die Glucan-Synthase-Region ( $\beta$ -1,3-Glucan Synthase Komponente) außer bei *Khawkinea quartana* bei allen anderen untersuchten Euglenida gefunden. Bezüglich dieser Ergebnisse könnte davon ausgegangen werden, dass entweder diese Bereiche je nach Organismus unterschiedlich kodiert sind oder dass diese Primer nicht an die cDNA binden können, weil sie nicht artspezifisch sind. Da in dieser vorliegenden Arbeit die Funktionen dieser Proteinregionen in der Paramylon-Synthese nicht geklärt werden konnten, können nur einige Vermutungen unter Berücksichtigung dieser in vielen Studien bekannten Proteine angestellt werden. Untersuchungen zum LacZ-Gen mit einigen Organismen haben ergeben, dass dieses Gen das Enzym  $\beta$ -Galactosidase kodiert. Die Abspaltung von Lactose in Glucose und Galaktose

kann durch  $\beta$ -Galactosidase erfolgen. Außerdem kann dieses Enzym Transgalactosylierung von Laktose zu Allolactose katalysieren. In einer anderen Reaktion kann Allolactose durch  $\beta$ -Galactosidase wiederum zu Laktose und Galactose gespalten werden. Wenn man in Betracht zieht, dass Paramylon anhand der vorliegenden Forschungsergebnisse nur aus Glucoseeinheiten besteht, wäre es möglich, dass die Zellen unter ungünstigen Umständen die notwendige Glucose mittels dieser entwickelten Strategie für die Paramylon-Synthese erhalten können. Ein weiteres Enzym  $\beta$ -Glucuronidase kann glykosidische Verbindungen bei den Kohlenhydraten hydrolysieren. Mit diesen beiden Enzymen könnte möglicherweise sichergestellt werden, dass UDP-Glucose nicht die einzige Glucosequelle ist. Eine weitere Denkweise wäre, dass  $\beta$ -Glucuronidase mit  $\beta$ -Galactosidase für die Bereitstellung der Glucose-Monomeren für die Paramylon-Synthese interagiert (Juers et al. 2012, Aviv & Gal-Mor 2017, Graaf et al. 2002, Sudan et al. 2006, Ahmad et al. 2011, Sui et al. 2021).

Auch über die Funktion der Glucan-Synthase-Region kann nur gemutmaßt werden. Bei verschiedenen Organismen wurden Glucan-Synthasen erfolgreich isoliert und charakterisiert. Ein wesentlicher Unterschied liegt darin, dass diese Enzyme entweder  $\beta$ -1,3-Glucan oder  $\beta$ -1,4-Glucan synthetisieren. Es ist schon bekannt, dass Paramylon ein  $\beta$ -1,3-Glucan ist. In diesem Zusammenhang könnte vermutet werden, dass Glucan-Synthase im Paramylon-Synthase-Komplex für die  $\beta$ -1,3-Glucan-Synthese zuständig ist (Stasinopoulos et al. 1999, Delmer 1999, Morgan et al. 2012, Drula et al. 2022, Lombard et al. 2013, Cantarel et al. 2009, Li et al. 2014, Youngs et al. 2007, Slabaugh et al. 2014, Turner & Kumar 2017, Kieber & Polko 2019, Endler & Persson 2011, Paerschke et al. 2017, Marin et al. 2003, Linton et al. 2010, Kostygov et al. 2021, Arguelles & Martinez-Goss 2019, O'Neill et al. 2015, Zakryś et al. 2017).

#### **4.4. TRANSKRIPTOMANALYSEN UND QPCR DES PARAMYLON-SYNTHESE-KOMPLEXES**

Bei vielen Arbeiten wurden die Struktur des Paramylons und die Einflüsse auf die Paramylon-Synthese ausführlich erforscht sowie der Paramylon-Synthase-Komplex in *Euglena gracilis* erfolgreich isoliert und charakterisiert (Marchessault & Deslandes 1979, Kiss et al. 1988a & 1988b, Kiss et al. 1986 & 1987, Monfils et al. 2011, Malkoff & Buetow 1964, Tanaka et al. 2017). Trotz der daraus gewonnenen Erkenntnisse liegen keine vergleichbaren Informationen über die lichtabhängige Genregulation des Paramylon-Synthase-Komplexes zwischen einer osmotrophen und phototrophen Art der Euglenida vor. Mittels der Transkriptomanalyse wurden die Genregulationsverhältnisse erforscht und die Identifizierung der Paramylon-Synthase-Komplex kodierenden Gene bei *Euglena gracilis*

und *Distigma proteus* durchgeführt. Für *Euglena gracilis* wurden durch Clustern mittels cd-hit (###CITE) 306.063 Transkripte erhalten. Insgesamt konnten bei *Euglena gracilis* 32.579 Transkripte mittels TransDecoder des LongOrfs Befehls (###CITE) in Proteinsequenzen umgeschrieben und annotiert werden. Durch die Annotation wurden zwei (TRINITY\_DN872\_c0\_g1 und TRINITY\_DN12637\_c0\_g1) von 14 Genen bei *Euglena gracilis* als Paramylon-Synthase-Komplex kodierende Gene GSL1 und GSL2 bezeichnet. Die Länge dieser mRNA-Sequenzen für GSL1 und GSL2 waren 10.829 bp und 7.958 bp groß. Die annotierten Proteine TRINITY\_DN872\_c0\_g1\_i2.p1 und TRINITY\_DN12637\_c0\_g1\_i18.p1 beinhalten 2.274 aa und 2.270 aa, woraus sich die vorhergesagten Molekulargewichte 257 und 261 kDa ergeben. Im Vergleich dazu wurden wenige Transkripte bei *Distigma proteus* mittels cd hit aus den Rohdaten herausgefiltert, deren Anzahl lag bei 246.742. Auch bei *Distigma proteus* wurden TRINITY\_DN2788\_c0\_g1 (4.842 bp) und TRINITY\_DN3946\_c1\_g2 (7.664 bp) als GSL1 und GSL 2 für Paramylon-Synthase identifiziert. Diese Gene kodieren die beiden Proteine TRINITY\_DN2788\_c0\_g1\_i10.p1 (1.518 aa) und TRINITY\_DN3946\_c1\_g2\_i1.p1 (2.298 aa), deren Molekulargewichte mit 175 und 265 kDa eingeschätzt wurden. Trotz erhöhter Transkriptionslevels für GSL1 und GSL2 in *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* zwischen der Licht- und der Dunkelphase, konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Genregulationsniveaus festgestellt werden. Das bedeutet, dass die mRNAs für den Paramylon-Synthase-Komplex zu den beiden Zeitpunkten in den Zellen vorgelegen haben. Es ist ungewöhnlich, dass sich mRNA-Transkripte für den Paramylon-Synthase-Komplex in der Zelle befinden, obwohl die Funktion dieses Proteins nicht erforderlich ist. Es ist bekannt, dass Paramylon bei den phototroph angezogenen Zellen von *Euglena gracilis* in der Belichtungsphase aufgebaut wird. In der Dunkelphase und während der Zellteilung nimmt der Paramylon-Gehalt deutlich ab. Außerdem baut *Euglena gracilis* unter anaeroben Bedingungen das vorhandene Paramylon ab, um durch Wachsester-Synthese Energie zu gewinnen (Bäumer 1998, Triemer & Zakryś 2015, Inui et al. 1992 & 2017, Rotte et al. 2001, Tomita et al. 2016, Calvayrac et al. 1981, Cook 1966, Tanaka et al. 2017). Osmotischer Stress, Umweltanpassungen oder Organellenentwicklung (z. B. Chlorophyll-Synthese) können auch ein Grund für die Reduzierung der Paramylon-Menge sein (Malkoff & Buetow 1964, Tanaka et al. 2017). Aufgrund der Tatsache, dass sich die Menge des Paramylons je nach Lichtverhältnissen oder Kultivierungsbedingungen unterscheidet, wäre zu erwarten, dass die Transkriptionslevels für Paramylon-Synthase bei *Euglena gracilis* in der Dunkelphase oder unter anaeroben Zuständen aufgrund niedrigerer Paramylon-Syntheseleistung abnimmt und während der Lichtphase zunimmt.

Diese Annahmen konnten angesichts der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden.

In der Literatur sind keine Forschungsarbeiten über den Paramylon Metabolismus in den osmotrophen Euglenida vorhanden. Da die primär osmotrophen Spezies der Euglenida keine Chloroplasten besitzen, sind diese Arten wie *Distigma proteus* nicht in der Lage, durch Photosynthese Glucose herzustellen. Die Versorgung der Zellen erfolgt durch Aufnahme der Nährstoffe aus dem Medium (Leander et al. 2007, Yamaguchi & Anderson 1994, Busse & Preisfeld 2003). Infolgedessen wäre es plausibel, dass keine Unterschiede zwischen der Belichtungs- und Dunkelphase in Bezug auf die Paramylon-Synthesefähigkeit gezeigt werden. Diese Annahme wurde bestätigt, denn es wurde keine Veränderung des Genregulationsniveaus für den Paramylon-Synthase-Komplex festgestellt.

Aufgrund der Tatsache, dass die Probenentnahme für diese Transkriptomanalyse bei beiden Organismen in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen innerhalb eines Tages durchgeführt wurde, könnte vermutet werden, dass die Paramylon-Menge sich bei der Zellteilung aufgrund des hohen Energieverbrauches verringert (Cook & James 1960). Infolgedessen wären sinkende Transkriptionslevels von dem Paramylon-synthetisierenden Enzym zu erwarten. Stattdessen sind die Levels gleichgeblieben.

Die mehrfach fehlenden Bestätigungen der Annahmen führen zu der Frage, ob der Zeitraum, die Zeitabstände oder die Lichtverhältnisse der Kultivierung geeignet waren, um die Transkriptionslevels für den Paramylon-Synthase-Komplex zu beobachten. Um weiteren Aufschluss zu erhalten, wurden die Analyse-Umstände drastisch verändert. Hierzu wurden *Euglena gracilis* und *Distigma proteus* im Zeitraum von 12 Tagen jeweils unter Dauerbelichtung, Dauerdunkelheit und dem Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 h ohne zusätzliche Nährstoffzufuhr kultiviert, und es wurden alle zwei Tage Proben entnommen. Die Genexpressionslevels wurden mittels qPCR bestimmt. Bei dieser Methode gibt die Effizienz Auskunft über die Signifikanz der Ergebnisse. Diese ist ein Maß für die Effektivität der Verdoppelung der DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus. Aufgrund der Effizienz-Werte vertreten die Forscher unterschiedliche Meinungen. Bivins et al. 2021 und Parkins et al. 2020 empfehlen, dass die Real-Time-Effizienz unter optimierten Reaktionsbedingungen zwischen 90 % und 110 % liegen sollte. Nach Holzapfel & Wickert 2007 liegt die Effizienz der meisten Real-Time PCRs zwischen 85 % und 95 % und nicht bei 100 %. Da der Effizienz-Wert von 75 % bei *Distigma proteus* berechnet wurde, war es nicht möglich, die Genexpressionsniveaus dieser Spezies mittels qPCR zu messen. In dieser Arbeit wurden die Genexpressionslevels von GSL1 und GSL2 bei *Euglena gracilis* über 12 Tage ermittelt, da sich die Zellkulturen nach 12 Tagen annähernd im Palmellastadium befanden (Häder &

Hemmersbach 2022). Hinsichtlich der steigenden und abnehmenden Tendenzen ähneln sich die Expressionslevels bei GSL1 und GSL2. Es ist auffällig, dass das Expressionslevel von GSL1 und GSL2 bei dem Zustand Dauerlicht nach einem Rückgang regelmäßig anstieg und kurz vor dem Kultivierungsende abnahm. Diese Veränderungen lassen sich auf unterschiedliche Weise erklären. Zu Beginn der Kultivierung befanden sich die *Euglena*-Zellen in der Lag-Phase. Diese Phase ermöglicht den Zellen die Anpassung, um neue Umweltbedingungen zu nutzen (Rolfe et al. 2011). Es wurde bereits erwähnt, dass die Umwelthanpassungen zum Abbau des Paramylons führen kann (Malkoff & Buetow 1964). Vermutlich wurden die Paramylon-Synthase-Komplex kodierenden Gene herunterreguliert, da Paramylon-Synthese im Dauerlicht nicht erforderlich ist. Folgerichtig erhöhte sich die Expression fortlaufend. Dieses Verhalten der Gene war zu erwarten, da bei der kontinuierlichen Photosynthese vermutlich mehr Glucose von den Zellen für die Paramylon-Synthese gespeichert wird. In vielen Arbeiten mit Pflanzen und Moosen wurde bestätigt, dass die Menge der Kohlenhydrate z. B. Stärke bei Dauerlicht zugenommen hat (Aro & Valanne 1979, Haque et al. 2015). Die Abnahme der Expression bei Kultivierungsende lässt sich unterschiedlich erklären. Es wäre möglich, dass Stromathylakoiden teilweise bei der Dauerbelichtung zerstört werden (Aro & Valanne 1979). Eine andere Denkweise wäre, dass die hohe Menge von Paramylon einen negativen Einfluss auf die Photosynthese hat. Studien haben gezeigt, dass die hohe Zuckerkonzentrationen durch zuckerempfindliche Enzyme wie Hexokinase zur Reduzierung der Genexpression wichtiger photosynthetischer Enzyme führen kann, was zu einer Herunterregulierung von Photosynthese führt (Van Gestel et al. 2005).

Es ist schon bekannt, dass die phototroph angezogenen *Euglena gracilis*-Zellen Paramylon speichern können, solange Energie als Licht existiert. Bei Dauerdunkelheit sind die Expressionsniveaus beinahe unverändert geblieben, was den Untersuchungen von anderen Autoren widerspricht. Sie kommen zu dem Ergebnis, dass Paramylon angesichts der Verkleinerung der Paramylon-Granula in der Dunkelphase zur Energiegewinnung beispielsweise für die Zellteilung oder Proteinsynthese abgebaut wird (Cook 1966, Inui et al. 1992 & 2017). Es könnte davon ausgegangen werden, dass die Paramylon-Synthese herunterreguliert werden soll. Diese Erkenntnisse stimmten mit der vorliegenden Arbeit nicht überein. Kurz vor dem Kultivierungsende erreichten die Paramylon-Synthase-Expressionsniveaus den höchsten Stand. Es ist möglich, dass *Euglena gracilis* im Dunkeln Ethanol, Acetate, Butyrate oder andere organische Substanzen als Carbon- und Energiequelle nutzen kann. Garlaschi et al. 1974 haben nachgewiesen, dass 50 % des Methylkohlenstoffs, der durch Oxidation des Ethanols zu Acetaten entstanden ist, in

Paramylon eingebaut werden kann. Vermutlich ist *Euglena gracilis* in der Lage, auch Citrat von Natriumcitrat, das im Medium vorliegt, als Energiequelle oder für die Paramylon-Synthese anzuwenden. Durch den Citrat-Zyklus wird Citrat in einigen Schritten zu Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und Wasser (H<sub>2</sub>O) abgebaut. Dabei werden sowohl organische Bestandteile für den Aufbau als auch Energie in ATP freigesetzt (Martínez-Reyes & Chandel 2020, Iacobazzi & Infantino 2014). In dem Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 h wurde beobachtet, dass das Expressionslevel am niedrigsten war. Einige Studien haben gezeigt, dass die Paramylon-Menge in der Lichtphase kontinuierlich zugenommen hatte (Cook 1966). Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Expressionsniveaus eine steigende Tendenz zeigen, da die Probenentnahme in der Belichtungsphase durchgeführt wurde. Diese Erkenntnisse konnten mit den in der Literatur vorhandenen Studien nicht begründet werden.

---

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

- Aagnes, T. H., Sørmo, W., Mathiesen S. D.** (1995). Ruminal microbial digestion in free-living, in captive lichen-fed, and in starved reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in winter. *Appl Environ Microbiol.*, 61(2):583-91. doi: 10.1128/aem.61.2.583-591.
- Aviv, G. & Gal-Mor, O.** (2017). lacZ Reporter System as a Tool to Study Virulence Gene Regulation in Bacterial Pathogens. *Methods in Molecular Biology*, 39-45. doi:10.1007/978-1-4939-7604-1\_5.
- Ahmad, S., Hughes, M. A., Lane K. T., Redinbo, M. R., Yeh, L-A., Scott, J. E.** (2011). A High Throughput Assay for Discovery of Bacterial  $\beta$ -Glucuronidase Inhibitors. *Current Chemical Genomics*, 5:13-20. doi: 10.2174/1875397301105010013.
- Allen, W. J., Collinson, I. & Römisch, K.** (2019). Post-Translational Protein Transport by the Sec Complex. *Trends in Biochemical Sciences.*, doi:10.1016/j.tibs.2019.03.003.
- Aro, E. M. & Valanne, N.** (1979). Effect of Continuous Light on CO<sub>2</sub> Fixation and Chloroplast Structure of the Mosses *Pleurozium schreberi* and *Ceratodon purpureus*. *Physiologia Plantarum*, 45(4):460-466. doi:10.1111/j.1399-3054.1979.tb02614.x.
- Arroyo, M., Heltai, L., Millan, D., De Simone, A.** (2012). Reverse engineering the euglenoid movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213977109>.
- Anderson, J., Wright, D., Meksem, K.** (2013). Agarose gel electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis for visualization of simple sequence repeats. *Methods Mol Biol.*, 1006:167-77. doi: 10.1007/978-1-62703-389-3\_12. PMID: 23546791.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*, 215(3):403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2. PMID: 2231712.
- Archibald, J. M. & Keeling, P. J.** (2002). Recycled plastids: a “green movement” in eukaryotic evolution. *Trends in Genetics*, 18(11):577-584. doi:10.1016/s0168-9525(02)02777-4.

- Al Abdallah, Q., Nixon, B. T. & Fortwendel, J. R.** (2016). The Enzymatic Conversion of Major Algal and Cyanobacterial Carbohydrates to Bioethanol. *Frontiers in Energy Research*, 4. doi:10.3389/fenrg.2016.00036.
- Arguelles, DLR. E., Martinez-Goss, R. M., Shin, W.** (2014). Some Noteworthy Photosynthetic Euglenophytes from Los Baños, Laguna (Philippines) and its Vicinity. *The Philippine Scientist*, 51:1-36
- Arguelles, DLR. E. & Martinez-Goss, M. R.** (2019). Diversity of Philippine Photosynthetic Euglenophytes and their Potential Biotechnological Uses: A Review. *International Journal on Emerging Technologies*, 10(4):24-31
- Aikawa, S., Ho, S.-H., Nakanishi, A., Chang, J.-S., Hasunuma, T. & Kondo, A.** (2015). Improving polyglucan production in cyanobacteria and microalgae via cultivation design and metabolic engineering. *Biotechnology Journal*, 10(6), 886-898. doi:10.1002/biot.201400344.
- AIST** (2013). Development of Euglena-Based Bioplastics. Available online at: [https://www.aist.go.jp/aist\\_e/list/latest\\_research/2013/20130228/20130228.html](https://www.aist.go.jp/aist_e/list/latest_research/2013/20130228/20130228.html) (accessed February 28, 2013)
- Ak Sonat, F., Alcay, S., Toker, M. B., Peker, S. & Ustuner, B.** (2018). The effects of dietary restriction and administration of  $\beta$ -glucan from *Euglena gracilis* on the sperm characteristics and reproductive organs of rats. *Andrologia*, e13088. doi:10.1111/and.13088.
- Bäumer, D., Preisfeld, A. & Ruppel, H. G.** (2001). Isolation and characterization of paramylonsynthase from *Euglena gracilis* (Euglenophyceae). *Journal of Phycology*, 37:346. doi:10.1046/j.1529-8817.2001.037001038.x.
- Bäumer, D. (1998)**. Isolierung und partielle Charakterisierung der Paramylonsynthase aus *Euglena gracilis* (Euglenozoa). Dissertation Universität Bielefeld
- Bradford, M.** (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999.

- Barras, D. R. & Stone, B. A.** (1965). Carbohydrate composition and metabolism in *Euglena*. *The Biology of Euglena*, Vol. II, Buetow, D. E., ed., 149-187. *Academic Press*: New York, USA.
- Ben Hlima, H., Dammak, M., Karkouch, N., Hentati, F., Laroche, C., Michaud, P., Fednri, I., Abdelkafi, S.** (2019). Optimal cultivation towards enhanced biomass and floridean starch production by *Porphyridium marinum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129:152-161. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.207.
- Brown, E. W.** (1898). Notes on *Cetraria islandica* (Iceland Moss). *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 1(4):455-460. doi:10.1152/ajplegacy.1898.1.4.455.
- Bansal, A., Singh, K., Karnwal, A.** (2019). Effects of abiotic factors on production of Levan by microorganisms: A review. *International Journal of Botany Studies*, Volume 4; Issue 2; Page No. 01-06
- Bourne, E. J., Percival, E. & Smestad, B.** (1972). Carbohydrates of acetabularia species. *Carbohydrate Research*, 22(1):75-82. doi:10.1016/s0008-6215(00)85727-4.
- Beauvais, A., Bruneau, J. M., Mol, P. C., Buitrago, M. J., Legrand, R. & Latge, J. P.** (2001). Glucan Synthase Complex of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Bacteriology*, 183(7): 2273-2279. doi:10.1128/jb.183.7.2273-2279.2001.
- Breton, C., Šnajdrová, L., Jeanneau, C., Koča, J. & Imberty, A.** (2005). Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology*, 16(2):29R-37R. doi: 10.1093/glycob/cwj016.
- Belyi, Y. & Aktories, K.** (2010). Bacterial toxin and effector glycosyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1800(2):134-143. doi:10.1016/j.bbagen.2009.07.022.
- Barsanti, L. & Gualtieri, P.** (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. United States of America : Taylor & Francis Group (S. 17-20)

**Barsanti, L. & Gualtieri, P.** (2018). Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? *Algal Research*, 31:107-115. doi:10.1016/j.algal.2018.02.001.

**Barsanti, L., Vismara, R., Passarelli, V. & Gualtieri, P.** (2001). Paramylon ( $\beta$ -1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions *Journal of Applied Phycology*, 13(1):59-65. doi:10.1023/a:1008105416065.

**Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T. & Pfaffl, M. W.** (2005). Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3):597-601. doi:10.1677/jme.1.01755.

**Bütschli, O.** (1884). Protozoa. In: Bronn, H. G. (ed.), Dr. H.G. Bronn's Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs, wissenschaftlich dargestellt in Wort und Bild. 2, Abt. II Mastigophora. C. F. Winter'sche Verlagsbuchhandlung, Leipzig und Heidelberg:617-1097

**Brust, H., Orzechowski, S. & Fettke, J.** (2020). Starch and Glycogen Analyses: Methods and Techniques. *Biomolecules*, 10(7):1020. doi:10.3390/biom10071020.

**Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2):93-99. doi:10.1002/elps.1150080203.

**Blochmann, F.** (1895). Die microscopische Pflanzen-und Thierwelt des Süßwassers. Theil II. Abteilung I: Protozoa. pp. 50-52.

**Bivins, A., Kaya, D., Bibby, K., Simpson, S. L., Bustin, S. A., Shanks, O. C. & Ahmed, W.** (2021). Variability in RT-qPCR assay parameters indicates unreliable SARS-CoV-2 RNA quantification for wastewater surveillance. *Water Research*, 203, 117516. doi:10.1016/j.watres.2021.117516.

**Bele, A. A. & Khale, A.** (2011). An Overview on Thin Layer Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. Vol. 2(2): 256-267.

- Becker, S., Scheffel, A., Polz, M. F. & Hehemann, J.-H.** (2017). Accurate Quantification of Laminarin in Marine Organic Matter with Enzymes from Marine Microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(9). doi:10.1128/aem.03389-16.
- Becker, S., Tebben, J., Coffinet, S., Wiltshire, K., Iversen, M. H., Harder, T., Hinrichs K.-U., Hehemann, J.-H.** (2020). Laminarin is a major molecule in the marine carbon cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201917001. doi:10.1073/pnas.1917001117.
- Bennett, M. S., Wiegert, K. E. & Triemer, R. E.** (2014). Characterization of Eugleniformisgen. nov. and the chloroplast genome of Eugleniformis [*Euglena*]proxima(Euglenophyta). *Phycologia*, 53(1):66-73. doi:10.2216/13-1981.
- Bonacorsi, S., Visseaux, B., Bouzid, D., Pareja, J., Rao, S. N., Manissero, D., Hansen, G. & Vila, J.** (2021). Systematic Review on the Correlation of Quantitative PCR Cycle Threshold Values of Gastrointestinal Pathogens With Patient Clinical Presentation and Outcomes. *Front. Med.*, 8:711809. doi: 10.3389/fmed.2021.711809.
- Breglia, A. S., Yubuki, N. & Leander, B. S.** (2013). Ultrastructure and Molecular Phylogenetic Position of *Heteronema scaphurum*: A Eukaryovorous Euglenid with a Cytoproct. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60:107-120 <https://doi.org/10.1111/jeu.12014>.
- Breglia, A. S., Yubuki, N., Hoppenrath, M. & Leander, B. S.** (2010). Ultrastructure and molecular phylogenetic position of a novel euglenozoan with extrusive episymbiotic bacteria: *Bihospites bacati* n. gen. et sp. (Symbiontida). *BMC Microbiol*, 10:145. doi: 10.1186/1471-2180-10-145.
- Breglia, A. S., Slamovits, C. H. & Leander, B. S.** (2007). Phylogeny of Phagotrophic Euglenids (Euglenozoa) as Inferred from Hsp90 Gene Sequences. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54(1):86-92. doi:10.1111/j.1550-7408.2006.00233.x.
- Bicudo, C. E. de M. & Menezes, M.** (2016). Phylogeny and Classification of Euglenophyceae: A Brief Review. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 4:17. <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00017>.

- Buckeridge, M. S.** (2010). Seed Cell Wall Storage Polysaccharides: Models to Understand Cell Wall Biosynthesis and Degradation. *Plant Physiology*, 154(3):1017-1023. doi:10.1104/pp.110.158642.
- Buckeridge, M. S., Dietrich, S. M. C. & de Lima, D. U.** (2000). Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. *Carbohydrate Reserves in Plants-Synthesis and Regulation*, 283-316. doi:10.1016/s0378-519x(00)80015-x.
- Buckeridge, M. S., Pessoa dos Santos, H. & Tiné, M. A. S.** (2000a). Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1-2):141-156. doi:10.1016/s0981-9428(00)00162-5.
- Buckeridge, M. S., Rocha, D. C., Reid, J. S. G. & Dietrich, S. M. C.** (1992). Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfii* from savanna and forest populations. *Physiologia Plantarum*, 86(1):145-151. doi:10.1111/j.1399-3054.1992.tb01323.x.
- Busse, I. & Preisfeld, A.** (2002). Phylogenetic position of *Rhynchopus sp.* and *Diplonema ambulator* as indicated by analyses of euglenozoan small subunit ribosomal DNA. *Gene*, 284(1-2):83-91. doi:10.1016/s0378-1119(02)00390-6.
- Busse, I. & Preisfeld, A.** (2003). Systematics of primary osmotrophic euglenids: A molecular approach to the phylogeny of *Distigma* and *Astasia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:617-624 DOI: 10.1099/ijls.0.02295-0.
- Bu, J., Zhao J., Liu, M.** (2016). Expression Stabilities of Candidate Reference Genes for RT-qPCR in Chinese Jujube (*Ziziphus jujuba Mill.*) under a Variety of Conditions. *PLoS ONE* 11(4): e0154212. doi:10.1371/journal.pone.0154212.
- Burchard, W.** (Hrsg.) (1985). Polysaccharide: Eigenschaften und Nutzung. *Springer-Verlag*: Berlin. (S.3-4)
- Burki, F., Roger, A. J., Brown, M. W. & Simpson, A. G. B.** (2019). The New Tree of Eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*. doi:10.1016/j.tree.2019.08.008.

- Burrell, M. M.** (2003). Starch: the need for improved quality or quantity-an overview. *Journal of Experimental Botany*, 54(382):451-456. doi:10.1093/jxb/erg049.
- Bütschli, O.** (1884). Mastigophora. Dr H.G. Bronn's Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs: Vol. 1. *Protozoa*: No. 2. Leipzig: C.F. Winter. pp. 617-1097
- Brommund, U.** (2004). Molekulare Identifizierung und Charakterisierung der Glucosyltransferase EgPaS (Paramylon-Synthase) aus *Euglena gracilis* (Euglenozoa). Dissertation Universität Bielefeld.
- Campbell, N. A. & Reece, J. B.** (2009). Biologie (8. Aufl.). München: Pearson Studium.(S. 540-541
- Cavalier-Smith, T.** (1981). Eukaryote kingdoms: Seven or nine? *Biosystems*, 14(3-4):461-481. doi:10.1016/0303-2647(81)90050-2.
- Cavalier-Smith, T.** (2016). Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. *European Journal of Protistology*, 56:250-276. doi:10.1016/j.ejop.2016.09.003.
- Causey, J. L., Feirtag, J. M., Gallaher, D. D., Tungland, B. C. & Slavin, J. L.** (2000). Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. *Nutrition Research*, 20(2):191-201. doi:10.1016/s0271-5317(99)00152-9.
- Chen, Y. T.** (1950). Investigations of the Biology of *Peranema trichophorum* (Euglenineae). *Journal of Microscopical Science*, Vol. 91, (15):279-308. <https://doi.org/10.1242/jcs.s3-91.15.279>.
- Chang S. L.** (1966). Observations on the organelles, movement, and feeding of *Peranema trichophorum* (Ehrb.) Stein. *Transactions of the American Microscopical*, 85(1):29-45. PMID: 5907534.
- Compton, S. J. & Jones, C. G.** (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 151(2):369-374. doi:10.1016/0003-2697(85)90190-3.

- Cook, J. R.** (1966). Photosynthetic Activity during the Division Cycle in Synchronized *Euglena gracilis*. *Plant Physiology*, 41(5), 821-825. doi:10.1104/pp.41.5.821.
- Chanda, N. B., Hirst, E. L. & Manners, D. J.** (1957). A comparison of isolichenin and lichenin from Iceland moss (*Cetraria islandica*). *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1951. doi:10.1039/jr9570001951.
- Colombani, A., Djerbi, S., Bessueille, L., Blomqvist, K., Ohlsson, A., Berglund, T., Teeri, T. T. & Bulone, V.** (2004). In vitro synthesis of (1→3)-β-D-glucan (callose) and cellulose by detergent extracts of membranes from cell suspension cultures of hybrid aspen. *Cellulose* 11, 313-327. <https://doi.org/10.1023/B:CELL.0000046404.25406.19>.
- Chikwana, V. M., Khanna, M., Baskaran, S., Tagliabracci, V. S., Contreras, C. J., DePaoli-Roach, A., Roach, P. J., Hurley, T. D.** (2013). Structural basis for 2'-phosphate incorporation into glycogen by glycogen synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(52), 20976-20981. doi:10.1073/pnas.1310106111.
- Calvayrac, R., Laval-Martin, D., Briand, J. & Farineau, J.** (1981). Paramylon synthesis by *Euglena gracilis* photoheterotrophically grown under low O<sub>2</sub> pressure. *Planta*, 153(1):6-13. doi:10.1007/bf00385311.
- Carlson, E., Malki, M. L. & Blossey, R.** (2005). Exons, Introns, and DNA Thermodynamics. *Physical Review Letters*, 94(17). doi:10.1103/physrevlett.94.178101.
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. & Henrissat, B.** (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37(Database):D233-D238. doi:10.1093/nar/gkn663.
- Chutia, S. J., Yashwanth, B. S., Kashyap, A., Kumara, R., Dihingia, P., Dekari, D., Bera, K. K., Pal, S., Lukas, V., Goswami, K. K.** (2019). Fundamentals of Agarose Gel Electrophoresis. *Aqua Star Magazine*

- Cook, J. R. & James, T. W.** (1960). Light-induced division synchrony in *Euglena gracilis* var. *Bacillaris*. *Experimental Cell Research*, 21(3):583-589. doi:10.1016/0014-4827(60)90292-5.
- Caoa, P.-J., Bartley, L. E., Jung, K.-H. & Ronald, P. C.** (2008). Construction of a Rice Glycosyltransferase Phylogenomic Database and Identification of Rice-Diverged Glycosyltransferases. *Molecular Plant*, 1(5):858-877. doi:10.1093/mp/ssn052.
- Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Westfall, M. V.** (2011). Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine third Edition, *CRC Press*, Taylor & Francis Group, 298-299
- Conforti, V. T., Ruiz, L. B. & Leonardi, P. I.** (2017). Ultrastructural Alterations in *Lepocinclis acus* (Euglenophyta) Induced by Medium with High Organic Matter Content. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5:141. doi:10.3389/fevo.2017.00141.
- Cook, D. E, Rangaraj, N. I., Best, N., Wilken, D. R.** (1968). Conversion of Glucose to Glycogen in *Tetrahymena pyriformis*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 127, 72-78
- Cocuron, J.-C., Lerouxel, O., Drakakaki, G., Alonso, A. P., Liepman, A. H., Keegstra, K., Raikhel, N., Wilkerson, C. G.** (2007). A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a- $\beta$ -1,4 glucan synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20), 8550-8555. doi:10.1073/pnas.0703133104.
- Crespo, I., Arindra, A., Lualdi, J. T., Rimba, P. A., Putra, A. B. N., Rahardja, R.** (2020). Inulin from Several Tubers Available in Indonesia and the Growth of Gut Microbiota, *Indonesian Journal of Life Sciences*, Vol. 02:01
- Castanheira, E. J., Correia, T. R., Rodrigues, J. M. M., Mano, J. F.** (2020). Novel biodegradable laminarin microparticles for biomedical applications. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, doi:10.1246/bcsj.20200034.
- Cramer, M. & Myers, J.** (1952). Growth and photosynthetic characteristics of *euglena gracilis*. *Archiv Für Mikrobiologie*, 17(1-4):384-402. doi:10.1007/bf00410835.

- Dabbagh, N. & Preisfeld, A.** (2017). The chloroplast genome of *Euglena mutabilis*-cluster arrangement, intron analysis, and intrageneric trends. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 64(1):31-44
- Dabbagh, N., Bennett, M. S., Triemer, R. E. & Preisfeld, A.** (2017). Chloroplast genome expansion by intron multiplication in the basal psychrophilic euglenoid *Eutreptiella pomquetensis*. *PeerJ*, 5, e3725. doi: 10.7717/peerj.3725.
- Dabbagh, N. & Preisfeld, A.** (2018). Intrageneric variability between the chloroplast genomes of *Trachelomonas grandis* and *Trachelomonas volvocina* and phylogenomic analysis of phototrophic Euglenoids. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 65(5):648-660
- Dawson, N. S., Walne, P. L.** (1994). Evolutionary trends in euglenids. *Archiv für Protistenkunde*, 144:221-225. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(11\)80131-4](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(11)80131-4).
- DA, K., Jayashri K, P. & Tauseef J, S.** (2019). Noteworthy on colourless euglenoids from North Maharashtra region, India. *Int. Journal of Life Sciences, Special Issue, A* 13:155-159
- Dawson, S. C. & Paredez, A. R.** (2013). Alternative cytoskeletal landscapes: cytoskeletal novelty and evolution in basal excavate protists. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(1):134-141. doi:10.1016/j.ceb.2012.11.00.
- D'Urzo, N., Malito, E., Biancucci, M., Bottomley, M. J., Maione, D., Scarselli, M. & Martinelli, M.** (2012). The structure of *Clostridium difficile* toxin A glucosyltransferase domain bound to Mn<sup>2+</sup> and UDP provides insights into glucosyltransferase activity and product release. *FEBS Journal*, 279(17):3085-3097. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08688.x.
- Delattre, C., Taratra, T. A., Michaud, P.** (2011). Galactans: An Overview of their Most Important Sourcing and Applications as Natural Polysaccharides. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol.54, n. 6: pp. 1075-1092
- De St. Groth, S. F., Webster, R. G. & Datyner, A.** (1963). Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochimica et Biophysica Acta*, 71:377-391. doi:10.1016/0006-3002(63)91092-8.

- Deflandre, G.** (1930). *Strombomonas*, nouveau genre d'Euglénacées (*Trachelomonas* EHR. pro parte). *Arch Protistenkd*, 69:551-614
- De Sousa, F., Holanda-Araújo, M., de Souza, J., de Souza Miranda, R., Almeida, R., Gomes-Filho, E., Pontes-Ricardo, N., Monteiro-Moreira, A. & de Azevedo Moreira, R.** (2017). Physicochemical Properties of Edible Seed Hemicelluloses. *Open Access Library Journal*, 4, 1-14. doi: 10.4236/oalib.1103683.
- Deloménie, C., Foti, E., Floch, E., Diderot, V., Porquet, D., Dupuy, C. & Bonaly, J.** (2007). A new homolog of FocA transporters identified in cadmium-resistant *Euglena gracilis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(2):455-461. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.145.
- Dong, X., Hong, Z., Sivaramakrishnan, M., Mahfouz, M. & Verma, D. P. S.** (2005). Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 42(3):315-328. doi:10.1111/j.1365-313x.2005.02379.x.
- Di Donato, P., Poli, A., Taurisano, V. & Nicolaus, B.** (2014). Polysaccharides: Applications in Biology and Biotechnology/Polysaccharides from Bioagro-Waste New Biomolecules-Life. *Polysaccharides*, 1-29. doi:10.1007/978-3-319-03751-6\_16-1.
- Drula, E., Garron, M. L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B. & Terrapon, N.** (2022). The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D571-D577. [gkab1045]. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>.
- Dong, N.-Q., Sun, Y., Guo, T., Shi, C.-L., Zhang, Y.-M., Kan, Y., Xiang, Y.-H., Zhang, H., Yang, Y.-B., Li, Y.-C., Zhao, H.-Y., Yu, H.-X., Lu, Z.-Q., Wang, Y., Ye, W.-W., Shan, J.-X. & Lin, H.-X.** (2020). UDP-glucosyltransferase regulates grain size and abiotic stress tolerance associated with metabolic flux redirection in rice. *Nature Communications*, 11(1). doi:10.1038/s41467-020-16403-5.
- Delmer, D. P.** (1999). Cellulose Biosynthesis: Exciting Times for A Difficult Field of Study. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1):245-276. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.245.

- Duval, B., Duval, E., Hoham, R, W.** (1999). Snow algae of the Sierra Nevada, Spain, and High Atlas mountains of Morocco. *International Microbiology : the Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*. 2(1):39-42. PMID: 10943390.
- Dawson, N. S. & Walne, P. L.** (1994). Evolutionary Trends in Euglenoids. *Archiv Für Protistenkunde*, 144(3):221-225. doi:10.1016/s0003-9365(11)80131-4.
- Duangjan, K. & Wołowski, K.** (2013). New Taxa of Loriccate Euglenoids *Strombomonas* and *Trachelomonas* from Thailand. *Polish Botanical Journal*, 58(1):337-345. doi:10.2478/pbj2013-0033.
- Duangjan, K., Peerapornpisal, Y. & Wołowski, K.** (2017). Heterotrophic Euglenoids from Tropical Northern Thailand. *Polish Botanical Journal*, 62(1):41-59. doi:10.1515/pbj-20170005.
- Dahoumane, S. A., Yéprémian, C., Djédiat, C., Couté, A., Fiévet, F., Coradin, T. & Brayner, R.** (2016). Improvement of kinetics, yield, and colloidal stability of biogenic gold nanoparticles using living cells of *Euglena gracilis* microalga. *Journal of Nanoparticle Research*, 18(3). doi:10.1007/s11051-016-3378-1.
- Dujardin, F.** (1841). *Histoire Naturelle des Zoophytes Infusoires*, Roret, Paris
- Ekelhund, F. & Patterson, D. J.** (1997). Some Heterotrophic Flagellates from a Cultivated Garden Soil in Australia. *Archiv für Protistenkunde*, 148:461-478. doi: 10.1016/S0003-9365(97)80022-X.
- Ehrenberg, C.G.** (1831). Über die Entwicklung und Lebensdauer der Infusionsthier; nebst ferneren Beiträgen zu einer Vergleichung ihrer organischen Systeme. *Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften Berlin*, 1-154.
- Ehrenberg, C.G.** (1833). Dritter Beitrag zur Erkenntnis grosser Organisation in der Richtung des Kleinsten Raumes. *Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften Berlin*, 145-336.

- Ehrenberg, C. G.** (1830). Beiträge zur Kenntniß der Organisation der Infusorien und ihrer geographischen Verbreitung, besonders in Sibirien. *Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften*. Berlin, pp 1-88
- Endler, A. & Persson, S.** (2011). Cellulose Synthases and Synthesis in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 4(2):199-211. doi:10.1093/mp/ssq079.
- Ebenezer, T. E., Zoltner, M., Burrell, A., Nenarokova, A., Novák Vanclová, A. M. G., Prasad, B., Soukal, P., Santana-Molina, C., O'Neill, E., Nankissoor, N. N., Vadakedath, N., Daiker, V., Obado, S., Silva-Pereira, S., Jackson, A. P., Devos, D. P., Lukeš, J., Lebert, M., Vaughan, S., Hampl, V., Carrington, M., Ginger, M. L., Dacks, J. B., Kelly, S. und Field, M. C.** (2019). Transcriptome, proteome and draft genome of *Euglena gracilis*. *BMC Biology*, 17(1). doi:10.1186/s12915-019-0626-8.
- Esposito, D., Günster, R. A., Martino, L., El Omari, K., Wagner, A., Thurston, T. L. M. & Rittinger, K.** (2018). Structural basis for the glycosyltransferase activity of the Salmonellaeffector SseK3. *Journal of Biological Chemistry*, 293(14):5064-5078. doi:10.1074/jbc.ra118.001796.
- Fredrikson, K. & Larsson, C.** (1989). Activation of 1,3-β-glucan synthase by Ca<sup>2+</sup>, spermine and cellobiose. - Localization of activator sites using inside-out plasma membrane vesicles. *Physiologia Plantarum*, 77(2), 196-201. doi:10.1111/j.1399-3054.1989.tb04969.x.
- Fugelstad, J., Bouzenzana, J., Djerbi, S., Guerriero, G., Ezcurra, I., Teeri, T. T., Arvestad, L., Bulone, V.** (2009). Identification of the cellulose synthase genes from the Oomycete *Saprolegnia monoica* and effect of cellulose synthesis inhibitors on gene expression and enzyme activity. *Fungal Genetics and Biology*, 46(10):759-767. doi:10.1016/j.fgb.2009.07.001.
- Farmer, M. A.** (1988). A re-evaluation of the taxonomy of the Euglenophyceae based on ultrastructural characteristics. PhD thesis, Rutgers University, Piscataway, NJ
- Farmer, M. A. & Triemer, R. E.** (1988). Flagellar systems in the euglenoid flagellates. *Biosystems*, 21(3-4):283-291. doi:10.1016/0303-2647(88)90024-x.

- Farmer, M. A.** (2009). Euglenozoa. *Encyclopedia of Microbiology*, 634-645. doi:10.1016/b978-012373944-5.00252-2.
- François, J. & Parrou, J. L.** (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1):125-145. doi:10.1111/j.1574-6976.2001.tb00574.x.
- Farkas, V., Hanna, R. & Maclachlan, G.** (1991). Xyloglucan oligosaccharide  $\alpha$ -l-fucosidase activity from growing pea stems and germinating nasturtium seeds. *Phytochemistry*, 30(10): 3203-3207. doi:10.1016/0031-9422(91)83176-l.
- Fan, B., Chen, T., Zhang, S., Wu, B. & He, B.** (2017). Mining of efficient microbial UDP-glycosyltransferases by motif evolution cross plant kingdom for application in biosynthesis of salidroside. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-00568-z.
- Graiff, A., Ruth, W., Kragl, U. & Karsten, U.** (2015). Chemical characterization and quantification of the brown algal storage compound laminarin-A new methodological approach. *Journal of Applied Phycology*, 28(1):533-543. doi:10.1007/s10811-015-0563-z.
- Gentry, M. S., Mattoo, S. & Dixon, J. E.** (2010). Utilizing Red Algae to Understand a Neurodegenerative Disease. *Red Algae in the Genomic Age*, 149-169. doi:10.1007/978-90-481-3795-4\_8.
- Graaf, M., Boven, E., Scheeren, H., Haisma, H. & Pinedo, H.** (2002).  $\beta$ -Glucuronidase-Mediated Drug Release. *Current Pharmaceutical Design*, 8(15):1391-1403. doi:10.2174/1381612023394485.
- Gupta, S. K., Das, P., Singh, S. K., Akhtar, M. S., Meena, D. K., Mandal, S. C.** (2011). Microbial levan, an ideal prebiotic and immunonutrient in aquaculture. *World Aquaculture* 61
- Garlaschi, F. M., Garlaschi, A. M., Lombardi, A. & Forti, G.** (1974). Effect of ethanol on the metabolism of *Euglena gracilis*. *Plant Science Letters*, 2(1):29-39. doi:10.1016/0304-4211(74)90035-2.

- Goh, Y. J. & Klaenhammer, T. R.** (2014). Insights into glycogen metabolism in *Lactobacillus acidophilus*: impact on carbohydrate metabolism, stress tolerance and gut retention. *Microbial Cell Factories*, 13(1). doi:10.1186/s12934-014-0094-3.
- Goder, V. & Spiess, M.** (2001). Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Letters*, 504(3):87-93. doi:10.1016/s0014-5793(01)02712-0.
- Gu, C., Chen, S., Liu, Z., Shan, H., Luo, H., Guan, Z., & Chen, F.** (2011). Reference Gene Selection for Quantitative Real-Time PCR in Chrysanthemum Subjected to Biotic and Abiotic Stress. *Molecular Biotechnology*, 49(2):192-197. doi:10.1007/s12033-011-9394-6.
- Guo, Q., Bi, D., Wu, M., Yu, B., Hu, L., Liu, C., Gu, L., Zhu, H., Lei, A., Wang, J. & Xu., X.** (2020). Immune activation of murine RAW264.7 macrophages by sonicated and alkalized paramylon from *Euglena gracilis*. *BMC Microbiology*, 20(1). doi:10.1186/s12866-020-01782-y.
- Gottlieb J** (1850). Über eine neue, mit Starkmehl isomere Substanz. *Ann Chem Pharm* 75: 51-61.
- Gissibl, A., Sun, A., Care, A., Nevalainen, H. & Sunna, A.** (2019). Bioproducts From *Euglena gracilis*: Synthesis and Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. doi:10.3389/fbioe.2019.00108.
- Harding, K., Müller, J., Timmermann, H., Lorenz, M., Day, J. G., Thomas Friedl, T.** (2010). Encapsulation dehydration colligative cryoprotective strategies and amplified fragment length polymorphism markers to verify the identity and genetic stability of euglenoids following cryopreservation. *CryoLetters*, 31 (6):460-472. PMID: 21410015.
- Hall, M. B.** (2016). Technical note: A method for isolating glycogen granules from ruminal protozoa for further characterization 1. *Journal of Dairy Science*, 99(3):1956-1958. doi:10.3168/jds.2015-10357.
- Harada, R., Nomura, T., Yamada, K., Mochida, K., Suzuki, K.** (2020). Genetic Engineering Strategies for *Euglena gracilis* and Its Industrial Contribution to Sustainable Development Goals: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. doi:10.3389/fbioe.2020.00790.

- Hostettler, C., Kölling, K., Santelia, D., Streb, S., Kötting, O. & Zeeman, S. C.** (2011). Analysis of Starch Metabolism in Chloroplasts. *Methods in Molecular Biology*, 387-410. doi:10.1007/978-1-61779-237-3\_21.
- Häder D-P. & Hemmersbach R.** (2022). *Euglena*, a Gravitactic Flagellate of Multiple Usages. *Life*, 29;12(10):1522. doi: 10.3390/life12101522. PMID: 36294957; PMCID: PMC9605500.
- Hasan, M. T., Sun, A., Khatiwada, B., McQuade, L., Mirzaei, M., Te'o, J., Hobba, G., Sunna, A., Nevalainen, H.** (2019). Comparative proteomics investigation of central carbon metabolism in *Euglena gracilis* grown under predominantly phototrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivations. *Algal Research*, 43, 101638. doi:10.1016/j.algal.2019.101638.
- Haque, M. S., Kjaer, K. H., Rosenqvist, E. & Ottosen, C.-O.** (2015). Continuous light increases growth, daily carbon gain, antioxidants, and alters carbohydrate metabolism in a cultivated and a wild tomato species. *Frontiers in Plant Science*, 6. doi:10.3389/fpls.2015.00522.
- He, J., Liu, C., Du, M., Zhou, X., Hu, Z., Lei, A. & Wang, J.** (2021). Metabolic Responses of a Model Green Microalga *Euglena gracilis* to Different Environmental Stresses. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 20;9:662655. doi: 10.3389/fbioe.2021.662655.
- Hayashi, T., Read, S. M., Bussell, J., Thelen, M., Lin, F.-C., Brown, R. M. & Delmer, D. P.** (1987). UDP-Glucose: (1->3)- $\beta$ -Glucan Synthases from Mung Bean and Cotton: Differential Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  on Enzyme Properties and on Macromolecular Structure of the Glucan Product. *Plant Physiology*, 83(4):1054-1062. doi:10.1104/pp.83.4.1054.
- Hansen, S. F., Harholt, J., Oikawa, A., & Scheller, H. V.** (2012). Plant Glycosyltransferases Beyond CAZy: A Perspective on DUF Families. *Frontiers in Plant Science*, 3. doi:10.3389/fpls.2012.00059.
- Hoch, G.** (2007). Cell wall hemicelluloses as mobile carbon stores in non-reproductive plant tissues. *Functional Ecology*, 21(5):823-834. doi:10.1111/j.1365-2435.2007.01305.x.

- Horton, P. & Nakai, K.** (1997). Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.*, 5:147-52. PMID: 9322029
- Hollande, A.** (1942). Étude cytologique et biologique de quelques flagellés libres. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 83:1-268.
- Heelis, D. V., Kernick, W., Phillips, G. O., Davies, K.** (1979). Separation and identification of the carotenoid pigments of stigmata isolated from light-grown cells of *Euglena gracilis* strain. *Z. Archives of Microbiology*. 121:207-211.
- Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Münch, R., Jahn, D.** (2004). PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions, *Nucleic Acids Research*, Volume 32, Issue suppl\_2, W375-W379, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh378>.
- Honegger, R. & Haisch, A.** (2001). Immunocytochemical location of the (13) (14)-beta-glucan lichenin in the lichen-forming ascomycete *Cetraria islandica* (Icelandic moss)<sup>1</sup>. *New Phytologist*, 150(3):739-746. doi:10.1046/j.1469-8137.2001.00122.x.
- Hong, Z., Delauney, A. J. & Verma, D. P. S.** (2001a). A Cell Plate-Specific Callose Synthase and Its Interaction with Phragmoplastin. *The Plant Cell*, 13(4):755. doi:10.2307/3871338
- Hong, Z., Zhang, Z., John M. Olson, J. M. & Verma, D. P. S.** (2001b). A Novel UDP-Glucose Transferase Is Part of the Callose Synthase Complex and Interacts with Phragmoplastin at the Forming Cell Plate. *The Plant Cell online*, 13(4):769-780. doi:10.1105/tpc.13.4.769.
- Holzappel, B. & Wickert, L.** (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in Unserer Zeit*, 37(2):120-126. doi:10.1002/biuz.200610332.
- Houtz, R. L. & Portis, A. R.** (2003). The life of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase-posttranslational facts and mysteries. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 414(2):150-158. doi:10.1016/s0003-9861(03)00122-x.

- Hoham, R. W. & Blinn, D. W.** (1979). Distribution of cryophilic algae in an arid region, the American Southwest. *Phycologia*, 18:133-145. doi.org/10.2216/i0031-8884-18-2-133.1.
- Hrdá, Š., Fousek, J., Szabová, J., Hampl, V. & Viček, Č.** (2012). The plastid genome of *Eutreptiella* provides a window into the process of secondary endosymbiosis of plastid in euglenids. *PLoS ONE*, 7:e33746. doi: 10.1371/journal.pone.0033746.
- Huber-Pestalozzi, G.** (1955). 4. Euglenophyceen. In A. Thienemann (Ed.), *Das Phytoplankton des Süßwassers: Systematik und Biologie*. Stuttgart: Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
- Islam, S. & Bhat, G.** (2019). Environmentally-friendly thermal and acoustic insulation materials from recycled textiles. *Journal of Environmental Management*, 251:109536. doi:10.1016/j.jenvman.2019.109536.
- Inwongwan, S., Kruger, N. J., Ratcliffe, R. G. & O'Neill, E. C.** (2019). *Euglena* Central Metabolic Pathways and Their Subcellular Locations. *Metabolites*, 9(6):115. doi:10.3390/metabo9060115.
- Iakiviak, M., Mackie, R. I. & Cann, I. K. O.** (2011). Functional Analyses of Multiple Lichenin-Degrading Enzymes from the Rumen Bacterium *Ruminococcus albus* 8. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21):7541-7550. doi:10.1128/aem.06088-11.
- Iwasaki, K., Kaneko, A., Tanaka, Y., Ishikawa, T., Noothalapati, H. & Yamamoto, T.** (2019). Visualizing wax ester fermentation in single *Euglena gracilis* cells by Raman microspectroscopy and multivariate curve resolution analysis. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1). doi:10.1186/s13068-019-1471-2.
- Inoue, S. B., Takewaki, N., Takasuka, T., Mio, T., Adachi, M., Fujii, Y., Miyamoto, C., Arisawa, M., Furuichi, Y. & Watanabe, T.** (1995). Characterization and Gene Cloning of 1,3-beta-D-Glucan Synthase from *Saccharomyces Cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 231(3):845-854. doi:10.1111/j.1432-1033.1995.0845d.x.
- Iacobazzi, V. & Infantino, V.** (2014). Citrate – new functions for an old metabolite. *Biological Chemistry*, 395(4). doi:10.1515/hsz-2013-0271.

- Ingold, E. & Seitz, H. U.** (1986). Characterization and Properties of Different Glucosyltransferases Isolated from Suspension-Cultured Cells of *Daucus carota*. *Z. Naturforsch.* 41c:409-420.
- Ishiguro, J., Saitou, A., Durán, A. & Ribas, J. C.** (1997). cps1+, a *Schizosaccharomyces pombe* gene homolog of *Saccharomyces cerevisiae* FKS genes whose mutation confers hypersensitivity to cyclosporin A and papulacandin B. *Journal of Bacteriology*, 179(24):7653-7662. doi:10.1128/jb.179.24.7653-7662.1997.
- Inui, H., Mlyatake, K., Nakano, Y. & Kitaoka, S.** (1992). Synthesis of reserved polysaccharide from wax esters accumulated as the result of anaerobic energy generation in *Euglena gracilis* returned from anaerobic to aerobic conditions. *International Journal of Biochemistry*, 24(5):799-803. doi:10.1016/0020-711x(92)90015-s.
- Inui, H., Ishikawa, T. & Tamoi, M.** (2017). Wax Ester Fermentation and Its Application for Biofuel Production. *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology*, 269-283. doi:10.1007/978-3-319-54910-1\_13.
- Jiangxin, W., Zhixin, S., Xudong, X.** (2004). Residual plastids of bleached mutants of *Euglena gracilis* and their effects on the expression of nucleus-encoded genes. *Progress in Natural Sciences*, 3:14.
- Jahn, T. L.** (1946). The Euglenoid Flagellates. *The Quarterly Review of Biology*, 21(3):246-274. doi:10.1086/395316.
- Jeon, M. S., Han, S. I., Kim, J. Y., Choi, Y-E.** (2020). Co-cultivation of *Euglena gracilis* and *Pseudoalteromonas* sp. MEBiC 03607 for paramylon production. *J Appl Phycol*, 32:3679-3686. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02215-z>.
- Jaishankar, J. & Srivastava, P.** (2017). Molecular Basis of Stationary Phase Survival and Applications. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02000.
- Jank, T., Giesemann, T. & Aktories, K.** (2007). *Clostridium difficile* Glucosyltransferase Toxin B-essential Amino Acids for Substrate Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 282(48):35222-35231. doi:10.1074/jbc.m703138200.

- Johnson, N., Powis, K. & High, S.** (2013). Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(11):2403-2409. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.12.008.
- Juers, D. H., Matthews, B. W. & Huber, R. E.** (2012). LacZ  $\beta$ -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science*, 21(12):1792-1807. doi:10.1002/pro.2165.
- Karnezis, T.** (2003). Topological characterization of an inner membrane (1->3)-  $\beta$ -D-glucan (curdlan) synthase from *Agrobacterium sp.* strain ATCC31749. *Glycobiology*, 13(10):693-706. doi:10.1093/glycob/cwg093.
- Kolter, R., Siegele, D. A. & Tormo, A.** (1993). The Stationary Phase of The Bacterial Life Cycle. *Annual Review of Microbiology*, 47(1):855-874. doi:10.1146/annurev.mi.47.100193.004231
- Kiss, J. Z., Roberts, E. M., Brown, R. M. & Triemer, R. E.** (1988). X-ray and dissolution studies of paramylon storage granules from *Euglena*. *Protoplasma*, 146(2-3):150-156. doi:10.1007/bf01405924.
- Kies, L.** (1967). Oogamie bei *Eremosphaera viridis* De Bary. *Flora oder Allgemeine botanische Zeitung. Abt. B, Morphologie und Geobotanik*, 157:1-12.
- Kamat, U., Garg, R. & Sharma, C. B.** (1992). Purification to homogeneity and characterization of a 1,3-  $\beta$ -glucan (callose) synthase from germinating *Arachis hypogaea* cotyledons. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 298(2):731-739. doi:10.1016/0003-9861(92)90473-a.
- Kohle, H., Jeblick, W., Poten, F., Blaschek, W. & Kauss, H.** (1985). Chitosan-Elicited Callose Synthesis in Soybean Cells as a  $\text{Ca}^{2+}$ -Dependent Process. *Plant Physiology*, 77(3):544-551. doi:10.1104/pp.77.3.544.
- Krämer, L., Groh, C. & Herrmann, J. M.** (2020). The proteasome: friend and foe of mitochondrial biogenesis. *FEBS Letters*, 595(8):1223-1238. doi:10.1002/1873-3468.14010.

- Kauss, H.** (1986).  $\text{Ca}^{2+}$ -Dependence of Callose Synthesis and the Role of Polyamines in the Activation of 1,3- $\beta$ -Glucan Synthase by  $\text{Ca}^{2+}$ . In: Trewavas, A. J. (eds) *Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development*. *NATO ASI Series*, vol 104. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2177-4\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2177-4_17).
- Keeling, P.J.** (2013). The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annu Rev Plant Biol.*, 64:583-607. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120144. Epub 2013 Feb 28. PMID: 23451781.
- Kieber, J. J. & Polko, J.** (2019). The Regulation of Cellulose Biosynthesis in Plants. *The Plant Cell*, tpc.00760.2018. doi:10.1105/tpc.18.00760.
- Kato, S., Ozasa, K., Maeda, M., Tanno, Y., Tamaki, S., Higuchi-Takeuchi, M., Numata, K., Kodama, Y., Sato, M., Toyooka, K., Shinomura, T.** (2020). Carotenoids in the eyespot apparatus are required for triggering phototaxis in *Euglena gracilis*. *The Plant Journal*, 101:1091-1102.
- Kostygov, A.Y., Karnkowska, A., Votýpka, J., Tashyreva, D., Maciszewski, K., Yurchenko, V., Lukeš, J.** (2021). Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. *Open Biol.*, 11(3):200407. doi: 10.1098/rsob.200407.
- Kato, S., Takaichi, S., Ishikawa, T., Asahina, M., Takahashi, S. & Shinomura, T.** (2016). Identification and functional analysis of the geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene (crtE) and phytoene synthase gene (crtB) for carotenoid biosynthesis in *Euglena gracilis*. *BMC Plant Biology*, 16(1). doi:10.1186/s12870-015-0698-8.
- Kadam, S., O'Donnell, C., Rai, D., Hossain, M., Burgess, C., Walsh, D. & Tiwari, B.** (2015). Laminarin from Irish Brown Seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Laminaria hyperborea*: Ultrasound Assisted Extraction, Characterization and Bioactivity. *Marine Drugs*, 13(7): 4270-4280. doi:10.3390/md13074270.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P.** (2015a). Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(1): 24-31. doi:10.1111/ijfs.12692.

- Kim, J. Y., Oh, J.-J., Jeon, M. S., Kim, G.-H. & Choi, Y.-E.** (2019). Improvement of *Euglena gracilis* paramylon production through a co-cultivation strategy with the indole-3-acetic acid-producing bacterium *Vibrio natriegens*. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:10.1128/aem.01548-19.
- Kuchipudi, S. V., Tellabati, M., Nelli, R. K., White, G. A., Perez, B., Sebastian, S., Slomka, M. J., Brookes, S. M., Brown, I. H., Dunham, S. P., Chang, K. C.** (2012). 18S rRNA is a reliable normalisation gene for real time PCR based on influenza virus infected cells. *Virology Journal*, 9(1):230. doi:10.1186/1743-422x-9-230.
- Khoshnava, S. M., Rostami, R., Mohamad Zin, R., Štreimikiene, D., Mardani, A., Ismail, M.** (2020). The Role of Green Building Materials in Reducing Environmental and Human Health Impacts. *Int J Environ Res Public Health*, 10;17(7):2589. doi: 10.3390/ijerph17072589. PMID: 32290074; PMCID: PMC7177900.
- Kiss, J. Z., Vasconcelos, A. C. & Triemer, R. E.** (1987). Structure of the Euglenoid Storage Carbohydrate, Paramylon. *American Journal of Botany*, 74(6):877. doi:10.2307/2443868.
- Kiss, J. Z., Vasconcelos, A. C. & Triemer, R. E.** (1988a). The intramembranous particle profile of the paramylon membrane during paramylon synthesis in *Euglena* (Euglenophyceae). *Journal of Phycology*, 24:152-157.
- Kiss, J. Z., Roberts, E. M., Brown, R. M. & Triemer, R. E.** (1988b). X-ray and dissolution studies of paramylon storage granules from *Euglena*. *Protoplasma*, 146(2-3):150-156. doi:10.1007/bf01405924.
- Kiss, J. Z., Vasoconcelos, A. C. & Triemer, R. E.** (1986). Paramylonsynthesis and Chloroplast Structure Associateed with Nutrientlevels in *Euglena* (Euglenophyceae). *Journal of Phycology*, 22(3):327-333. doi:10.1111/j.1529-8817.1986.tb00031.x.
- Kivic, P. A. & Walne, P. L.** (1984). An evaluation of a possible phylogenetic relationship between the Euglenophyta and Kinetoplastida. *Origins of Life*, 13(3-4):269-288. doi:10.1007/bf00927177.

- Kim, K. M., Park, J.-H., Bhattacharya, D. & Yoon, H. S.** (2014). Applications of next-generation sequencing to unravelling the evolutionary history of algae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 2):333-345. doi:10.1099/ij.s.0.054221-0.
- Kim, J. I., Shin, W. & Triemer, R. E.** (2010). Multigene Analyses of Photosynthetic Euglenoids and New Family, Phacaceae (Euglenales). *Journal of Phycology*, 46(6):1278-1287. doi:10.1111/j.1529-8817.2010.00910.x.
- Kottuparambil, S., Thankamony, R. L. & Agusti, S.** (2019). *Euglena* as a potential natural source of value-added metabolites. A review. *Algal Research*, 37:154-159. doi:10.1016/j.algal.2018.11.024.
- Koizumi, N., Sakagami, H., Utsumi, A., Fujinaga, S., Takeda, M., Asano, K., Mori, S., Sugawara, I., Ichikawa, S., Kondo, H., Mori, S., Miyatake, K., Nakano, Y., Nakashima, H., Murakami, T., Miyano, N. & Yamamoto, N.** (1993). Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of sulfated paramylon. *Antiviral Research*, 21(1):1-14. doi:10.1016/0166-3542(93)90063.
- Kosmala, S., Karnkowska-Ishikawa, A., Milanowski, R., Kwiatowski, J. & Zakryś, B.** (2009). Phylogeny and Systematics of *Euglena* (Euglenaceae) Species with Axial, Stellate Chloroplasts Based on Morphological and Molecular Data-New Taxa, Emended Diagnoses, and Epitypifications. *Journal of Phycology*, 45(2):464-481. doi:10.1111/j.1529-8817.2009.00653.x.
- Klebs, G.** (1883). Über die Organisation einiger Flagellaten Gruppen und ihre Beziehungen zu Algen und Infusorien. *Unters Bot Inst Tübingen* 1:233-262.
- Krajčovič, J., Matej Vesteg & Schwartzbach, S. D.** (2015). Euglenoid flagellates: A multifaceted biotechnology platform. *Journal of Biotechnology*, 202:135-145. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.11.035.
- Kasperbauer, M. J. & Hamilton, J. L.** (1984). Chloroplast Structure and Starch Grain Accumulation in Leaves That Received Different Red and Far-Red Levels during Development. *Plant Physiology*, 74(4):967-970. doi:10.1104/pp.74.4.967.

- Kusel-Fetzmann, E.** (2002). Die Euglenophytenflora des Neusiedler Sees. Wien: *Zoologisch Botanische Gesellschaft in Österreich*, Band 32
- Kumar, S., Jyotirmayee, K. & Sarangi, M.** (2013). Thin Layer Chromatography: A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 18:126-132.
- Kumawat, D. A, Patil Jayashri, K. & Shaikh Tauseef, J.** (2019). Noteworthy on colourless euglenoids from North Maharashtra region, India, *Int. J. of. Life Sciences*, Special Issue, A13: 155-159
- Leeuwenhoek, A. V.** (1674). *Philos. Trans. R. Soc.*, 9:178-182.
- Lax, G. & Simpson, A. G. B.** (2013). Combining Molecular Data with Classical Morphology for Uncultured Phagotrophic Euglenids (Excavata): A Single-Cell Approach. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60(6):615-625. doi:10.1111/jeu.12068.
- Legros, F., Uytdenhoef, P., Dumont, I., Hanson, B., Jeanmart, J., Massant, B. & Conard, V.** (1975). Specific binding of insulin to the unicellular alga *Acetabularia mediterranea*. *Protoplasma*, 86(1-3):119-134. doi:10.1007/bf01275626.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- López-Molina, D., Navarro-Martínez, M. D., Rojas-Melgarejo, F., Hiner, A. N. P., Chazarra, S. & Rodríguez-López, J. N.** (2005). Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus L.*). *Phytochemistry*, 66(12):1476-1484. doi:10.1016/j.phytochem.2005.04.003.
- Leander B. S., Lax, G., Karnkowska, A., Simpson, A. G. B.** (1990). Euglenida. In Archibald, J. M., Simpson, A. G. B., Slamovits, C. H. (eds.). *Handbook of the Protists* (second Edition), (P. 1058-1065) Switzerland : Springer

- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C-Y, Kim, Y. H.** (2012). Agarose Gel Elektrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*. 62: e3923
- Lee, R. E.** (2008). Phycology. UK: Cambridge University Press, 20-25 pp, 4-520 pp
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J. & Withers, S. G.** (2008). Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1):521-555. doi:10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322.
- Li, S., Bashline, L., Lei, L. & Gu, Y.** (2014). Cellulose Synthesis and Its Regulation. *The Arabidopsis Book*, 12, e0169. doi:10.1199/tab.0169.
- Li, W., Zhang, J., Yu, C., Li, Q., Dong, F., Wang, G., Gu, G., & Guo, Z.** (2015). Extraction, degree of polymerization determination and prebiotic effect evaluation of inulin from Jerusalem artichoke. *Carbohydrate Polymer*, 121:315-319.
- Li, L., Drake Jr, R. R., Clement, S. & Brown Jr, R. M.** (1993). [ $\beta$ ]-Glucan Synthesis in the Cotton Fiber (III. Identification of UDP-Glucose-Binding Subunits of [ $\beta$ ]-Glucan Synthases by Photoaffinity Labeling with [[ $\beta$ - $^{32}$ P]5[prime]-N3-UDP-Glucose. *Plant Physiology*, 101(4):1149-1156. doi:10.1104/pp.101.4.1149.
- Li, J., Hu, D., Zong, W., Lv, G., Zhao, J. & Li, S.** (2014). Determination of Inulin-type Fructooligosaccharides in Edible Plants by High-Performance Liquid Chromatography with Charged Aerosol Detector. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(31):7707-7713. doi:10.1021/jf502329n.
- Liu, C., Xin, N., Zhai, Y., Jiang, L., Zhai, J., Zhang, Q. & Qi, J.** (2014). Reference Gene Selection for Quantitative Real-Time RT-PCR Normalization in the Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*) at Different Developmental Stages, in Various Tissue Types and on Exposure to Chemicals. *PLoS ONE*, 9(3):e91715. doi:10.1371/journal.pone.0091715.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M. & Henrissat, B.** (2013). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1):D490-D495. doi:10.1093/nar/gkt1178.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. L.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1):265-275. doi:10.1016/s0021-9258(19)52451-6.
- Liu, J. & Mushegian, A.** (2003). Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein Science*, 12(7):1418-1431. doi:10.1110/ps.0302103.
- Leander, B. S., Triemer, R. E. & Farmer, M. A.** (2001). Character evolution in heterotrophic euglenids. *Eur J Protistol*, 37:337–356. doi: 10.1078/0932-4739-00842.
- Leander B. S., Witek R.P., Farmer M.A.** (2001a). Trends in the evolution of the euglenid pellicle. *Evolution. International Journal of Organic Evolution*, 11: 2215-2235.
- Linton, E. W., Karnkowska-Ishikawa, A., Kim, J. I., Shin, W., Bennett, M. S., Kwiatowski, J., Zakryś, B. & Triemer, R. E.** (2010). Reconstructing Euglenoid Evolutionary Relationships using Three Genes: Nuclear SSU and LSU, and Chloroplast SSU rDNA Sequences and the Description of Euglenaria gen. nov. (Euglenophyta). *Protist*, 161(4):603-619. doi:10.1016/j.protis.2010.02.002.
- Lemmermann, E.** (1913). Eugleninae. In *Die Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs, und der Schweiz*, Jena.
- Lee, W. J. & Patterson, D. J.** (2000). Heterotrophic flagellates (Protista) from marine sediments of Botany Bay, Australia. *Journal of Natural History*, 34(4):483-562. doi:10.1080/002229300299435.
- Letunic, I., Khedkar, S. & Bork, P.** (2020). SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Research*, 49(D1):D458 -D460. doi:10.1093/nar/gkaa937.
- Lee, R. E.** (2008). Phycology. UK : *Cambridge University Press*: (P. 20-25) (Fourth Edition)
- Leander, B. S.** (2004). Did trypanosomatid parasites have photosynthetic ancestors? *Trends in Microbiology*, 12(6):251-258. doi:10.1016/j.tim.2004.04.001.

- Leander, B. S.** (2008). A Hierarchical View of Convergent Evolution in Microbial Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(2):59-68. doi:10.1111/j.1550-7408.2008.00308.x.
- Leander, B. S. & Farmer, M. A.** (2001). Comparative Morphology of the Euglenid Pellicle. II. Diversity of Strip Substructure. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(2):202-217. doi:10.1111/j.1550-7408.2001.tb00304.x.
- Leander, B. S., Esson, H. J. & Breglia, S. A.** (2007). Macroevolution of complex cytoskeletal systems in euglenids. *Bio Essays*, 29(10):987-1000. doi:10.1002/bies.20645.
- Leander, B. S., Lax, G., Anna Karnkowska, A., Simpson, A.G. B.** (2017). Euglenida. In John M. Archibald, Alastair G.B. Simpson, Claudio H. Slamovits, Lynn Margulis, Michael Melkonian, David J. Chapman, John O. Corliss (Hrsg.), *Handbook of the Protists*, (S.11-20). Schweiz: Springer Nature Second edition
- Leander B.S., Lax G., Karnkowska A., Simpson A.G.B.** (2017). Euglenida. In: Archibald J. et al. (eds) *Handbook of the Protists*, Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6\\_13-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6_13-1).
- Leander, B. S. & Farmer, M. A.** (2000). Comparative morphology of the euglenid pellicle. I. Patterns of strips and pores. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47:469-479.
- Leander B. S., Triemer R. E., Farmer M. A.** (2001); Character evolution in heterotrophic euglenids. *European Journal of Protistology*, 37:337-356.
- Leedale, G. F.** (1967). Euglenoid Flagellates. *Prentice-Hall*, Engelwood-Cliffs, New Jersey.
- Leedale, G. F.** (1964). Pellicule structure in *Euglena*. *Brit. Phycol. Bull.*, 2: 291-306.
- Lee, J. H., Son, S. W. & Cho, S. H.** (2016). A Comprehensive Review of the Treatment of Atopic Eczema. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 8(3):181. doi:10.4168/air.2016.8.3.181.
- Lee, W. J.** (2002). Some free-living heterotrophic flagellates from marine sediments of Inchon and Ganghwa Island, Korea. *Korean J. Biol. Sci.*, 6: 125-143.

- Lee, J. J., Leedale G. F. & Bradbury P. (eds)** (2000). An Illustrated Guide to the Protozoa. 2. *Society of Protozoologists/ Allen Press, Lawrence, Kansas, U.S.A.*
- Lee, W. J., Blackmore R. & Patterson D. J.** (1999). Australian records of two lesser known genera of heterotrophic euglenoids-*Chasmostoma* Massart, 1920 and *Jenningsia* Schaeffer, 1918. *Protistology*, 1: 10-16.
- Lee, W. J., Brandt, S. M., Vřrs, N. & Patterson, D. J.** (2003). Darwin's heterotrophic flagellates. *Ophelia*, 57: 63-98.
- Lee, W. J., Simpson A. G. B. & Patterson D. J.** (2005). Free-living heterotrophic flagellates from freshwater sites in Tasmania Australia, a Field Survey. *Acta Protozoologica* 44: 321-350.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y. & Kim, Y. H.** (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62). doi:10.3791/392.
- Levine, R., Horst, G., Tonda, R., Lumpkins, B. & Mathis, G.** (2018). Evaluation of the effects of feeding dried algae containing  $\beta$ -1,3-glucan on broilers challenged with *Eimeria*. *Poultry Sci.*, 97: 3494-3500. doi: 10.3382/ps/pey227.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685. doi:10.1038/227680a0.
- Lipps, J. H.** (2006). Major Features of Protistan Evolution: Controversies, Problems and a Few Answers. *Anuário do Instituto de Geociências-UFRJ*, Vol. 29-1, p. 55-80
- Lovegrove, A., Edwards, C. H., De Noni, I., Patel, H., El, S. N., Grassby, T., Zielke, C., Ulmius, M., L. Nilsson, L., Butterworth, P.J., Ellis, P. R., Shewry, P. R.** (2015). Role of polysaccharides in food, digestion, and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2):237-253. doi:10.1080/10408398.2014.939263.
- Metting, F. B. Jr.** (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology*, 17:477-489. doi.org/10.1007/BF01574779.

- Lucyszyn, N., Lubambo, A. F., Ono, L., Jó, T. A., de Souza, C. F. & Sierakowski, M. R.** (2011). Chemical, physico-chemical and cytotoxicity characterisation of xyloglucan from *Guibourtia hymenifolia* (Morice) J. Leonard seeds. *Food Hydrocolloids*, 25(5):1242-1250. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.11.012.
- Meeuse, B. J. D. & Kreger, D. R.** (1954). On the nature of floridean starch and ulva starch. *Biochimica et Biophysica Acta*, 13:593-595. doi:10.1016/0006-3002(54)90384-4.
- Markunas, C. M. & Triemer, R. E.** (2016). Evolutionary History of the Enzymes Involved in the Calvin-Benson Cycle in Euglenids. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(3):326-339. doi:10.1111/jeu.12282.
- Markou, G., Angelidaki, I. & Georgakakis, D.** (2012). Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(3):631-645. doi:10.1007/s00253-012-4398-0.
- Marin, B., Palm, A., Klingberg, M. a. x., & Melkonian, M.** (2003). Phylogeny and Taxonomic Revision of Plastid-Containing Euglenophytes based on SSU rDNA Sequence Comparisons and Synapomorphic Signatures in the SSU rRNA Secondary Structure. *Protist*, 154(1):99-145. doi:10.1078/143446103764928521.
- Marchessault, R. H. & Deslandes, Y.** (1979). Fine structure of (1→3)- $\beta$ -d-glucans: curdlan and paramylon. *Carbohydrate Research*, 75:231-242. doi:10.1016/s0008-6215(00)84642-x.
- Mestrom, L., Przypis, M., Kowalczykiewicz, D., Pollender, A., Kumpf, A., Marsden, S. R., Bento, I., Jarz ębski, A. B., Szyma ńska, K., Chru ńciel, A., Tischler, D., Schoevaart, R., Hanefeld, U., Hagedoorn, P. L.** (2019). Leloir Glycosyltransferases in Applied Biocatalysis: A Multidisciplinary Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21):5263. doi:10.3390/ijms20215263.
- Marechal, L. R. & Goldemberg, S. H.** (1964). Uridine Diphosphate Glucose- $\beta$ -1,3-Glucan  $\beta$ -3-Glucosyltransferase from *Euglena gracilis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 239(10), doi:10.1016/s0021-9258(18)97699-4.

- Mereschkowsky, K. S.** (1877). Etiudy nad prostieishchimi sievera Rossii. *Trudy Sankt-Peterburgskago Obshchestva estestvoispytatelei* 8 (pt. 2): 203-205, 275-278, 288-29
- Mao, F., Leung, W.Y. & Xin, X.** (2007). Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol* 7, 76 <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-76>.
- Mehta, D. & Satyanarayana, T.** (2016). Bacterial and Archaeal  $\alpha$ -Amylases: Diversity and Amelioration of the Desirable Characteristics for Industrial Applications. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01129.
- McCleary, B. V., Matheson, N. K. & Small, D. M.** (1976). Galactomannans and a galactoglucomannan in legume seed endosperms: Structural requirements for  $\beta$ -mannanase hydrolysis. *Phytochemistry*, 15(7):1111-1117. doi:10.1016/0031-9422(76)85111-4.
- Mohamed, A. A., Rayas-Duarte P.** (1995). Nonstarchy polysaccharide analysis of cotyledon and hull of *Lupinus albus*. *Cereal Chem* 72: 648-651.
- Monfils, A. K., Triemer, R. E. & Bellairs, E. F.** (2011). Characterization of paramylon morphological diversity in photosynthetic euglenoids (Euglenales, Euglenophyta). *Phycologia*, 50(2):156-169. doi:10.2216/09-112.1.
- Morgan, J. L. W., Strumillo, J. & Zimmer, J.** (2012). Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*, 493(7431):181-186. doi:10.1038/nature11744.
- Martínez-Reyes, I. & Chandel, N. S.** (2020). Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications*, 11(1). doi:10.1038/s41467-019-13668-3.
- Muchut, R. J., Calloni, R. D., Arias, D. G., Arce, A. L., Iglesias, A. A. & Guerrero, S. A.** (2021). Elucidating carbohydrate metabolism in *Euglena gracilis*: Reverse genetics-based evaluation of genes coding for enzymes linked to paramylon accumulation. *Biochimie*, 184: 125-131. doi:10.1016/j.biochi.2021.02.016.

- Murray, J. M.** (1984). Disassembly and reconstitution of a membrane-microtubule complex. *The Journal of Cell Biology*, 98(4):1481-1487. doi:10.1083/jcb.98.4.1481.
- Mucalo, M. R., Bullen, C. R., Manley-Harris, M. & McIntire, T. M.** (2002). *Journal of Materials Science*, 37(3):493-504. doi:10.1023/a:1013757221776.
- Muralikrishna, G. & Nirmala, M.** (2005). Cereal  $\alpha$ -amylases-an overview. *Carbohydrate Polymers*, 60(2):163-173. doi:10.1016/j.carbpol.2004.12.0.
- Mohammed, A. S. A., Naveed, M. & Jost, N.** (2021). Polysaccharides; Classification, Chemical Properties, and Future Perspective Applications in Fields of Pharmacology and Biological Medicine (A Review of Current Applications and Upcoming Potentialities). *Journal of Polymers and the Environment*, <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02052-2>.
- Moller, S., Croning, M. D. R. & Apweiler, R.** (2001). Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics*, 17(7):646-653. doi:10.1093/bioinformatics/17.7.646.
- Miyake, H., Otsuka, C., Nishimura, S., Nitta, Y.** (2002) Catalytic mechanism of  $\beta$ -amylase from *Bacillus cereus* var. *mycoides*: chemical rescue of hydrolytic activity for a catalytic site mutant (Glu367 $\rightarrow$ Ala) by azide. *J. Biochem*, 131:587-591.
- Milanowski, R., Gumińska, N., Karnkowska, A., Ishikawa, T. & Zakryś, B.** (2016). Intermediate introns in nuclear genes of euglenids – are they a distinct type? *BMC Evolutionary Biology*, 16(1). doi:10.1186/s12862-016-0620-5.
- Mitra, K., Frank, J. & Driessen, A.** (2006). Co- and post-translational translocation through the protein-conducting channel: analogous mechanisms at work? *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(11):957-964. doi:10.1038/nsmb1166.
- Malkoff, D. B. & Buetow, D. E.** (1964). Ultrastructural changes during carbon starvation in *Euglena gracilis*. *Experimental Cell Research*, 35(1):58-68. doi:10.1016/0014-4827(64)90071-0.

- Nechita, P. & Roman (Iana-Roman), M.** (2020). Review on Polysaccharides Used in Coatings for Food Packaging Papers. *Coatings*, 10(6):566. doi:10.3390/coatings10060566.
- Nagare, M., Ayachit, M., Agnihotri, A., Schwab, W. & Joshi, R.** (2020). Glycosyltransferases: the multifaceted enzymatic regulator in insects. *Insect Molecular Biology*. doi:10.1111/imb.12686.
- Nielsen, H.** (2017). Protein Function Prediction. pp. 59-73, Springer. In Kihara, D. *Methods in Molecular Biology*, vol. 1611. doi:10.1007/978-1-4939-7015-5\_6 PMID:28451972.
- Namir, H., Hadžić, R., Malešević, I., Jurčević, M., Starčević, D.** (2019). Application of thin layer chromatography for qualitative analysis of gunpowder in purpose of life prediction of ammunition. *International Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 5(1):4-12. DOI: 10.15406/ijbsbe.2019.05.00144.
- Nakamura, Y., Takahashi, J., Sakurai, A., Inaba, Y., Suzuki, E., Nihei, S., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., Miyashita, H., Ikemoto, H., Kawachi, M., Sekiguchi, H., Kurano, N.** (2005). Some Cyanobacteria Synthesize Semi-amylopectin Type  $\alpha$ -Polyglucans Instead of Glycogen. *Plant and Cell Physiology*, 46(3), 539-545. doi:10.1093/pcp/pci045.
- Noselli, G., Beran, A., Arroyo, M. & De Simone, A.** (2019). Swimming *Euglena* respond to confinement with a behavioral change enabling effective crawling. *Nature Physics*, 15(5):496-502. doi:10.1038/s41567-019-0425-8.
- Nie, G., Cai, W., Yao, Z., Zhu, Z., Zhu, X., Zheng, Z. & Yue, W.** (2015). Changing enzymatic conformation in organic media with pH buffer lyophilized powder. *Catalysis Communications*, 65:62-65. doi:10.1016/j.catcom.2015.02.025.
- Narayanan, J., Xiong, J.-Y. & Liu, X.-Y.** (2006). Determination of agarose gel pore size: Absorbance measurements vis a vis other techniques. *Journal of Physics: Conference Series*, 28:83-86. doi:10.1088/1742-6596/28/1/017.
- Olafsdottir, E. S. & Ingólfssdottir, K.** (2001). Polysaccharides from Lichens: Structural Characteristics and Biological Activity. *Planta Medica*, 67(3):199-208. doi:10.1055/s-2001-12012.

- Ogbonna, C. J., Tomiyama, S., Tanaka, H.** (1998). Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* Z for efficient production of  $\alpha$ -tocopherol. *Journal of Applied Phycology*, 10: 67-74.
- Ogbonna, E., Ichige, H., Tanaka, J.** (2002). Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(4):532-538. doi:10.1007/s00253-001-0901-8.
- Owji, H., Nezafat, N., Negahdaripour, M., Hajiebrahimi, A. & Ghasemi, Y.** (2018). A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *European Journal of Cell Biology*, 97(6):422-441. doi:10.1016/j.ejcb.2018.06.003.
- Okuda, K., Li, L., Kudlicka, K., Kuga, S., Brown, R. M. Jr.** (1993).  $\beta$ -Glucan synthesis in the cotton fiber. I. Identification of  $\beta$ -1,4- and  $\beta$ -1,3- glucans synthesized in vitro. *Plant Physiology*, 101: 1131-1142.
- O'Neill, E. C., Trick, M., Hill, L., Rejzek, M., Dusi, R. G., Hamilton, C. J., Zimba, P. V., Henrissat, B. & Field, R. A.** (2015). The transcriptome of *Euglena gracilis* reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry. *Molecular BioSystems*, 11(10):2808-2820. doi:10.1039/c5mb00319a.
- Okouchi, R., E, S., Yamamoto, K., Ota, T., Seki, K., Imai, M., Ota, R., Asayama, Y., Nakashima, A., Kengo Suzuki, K., Tsuduki, T.** (2019) Simultaneous Intake of *Euglena gracilis* and Vegetables Exerts Synergistic Anti-Obesity and Anti-Inflammatory Effects by Modulating the Gut Microbiota in Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*, 11:204. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11010204>.
- Ovchinnikova, O. G., Mallette, E., Koizumi, A., Lowary, T. L., Kimber, M. S. & Whitfield, C.** (2016). Bacterial  $\beta$ -Kdo glycosyltransferases represent a new glycosyltransferase family (GT99). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(22):E3120-E3129. doi:10.1073/pnas.1603146113.
- Öztürk, B. & Serdaroğlu, M.** (2016). A Rising Star Prebiotic Dietary Fiber: Inulin and Recent Applications in Meat Products. *Journal of Food and Health*, 3(1):12-20.

- Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A. & Xiong, G.** (2013). Hemicellulose biosynthesis. *Planta*, 238(4):627-642. doi:10.1007/s00425-013-1921-1.
- Purwoto, H., Takahata, Y., Katsuyama, T., & Yokota, T.** (2003). A Growth Kinetics Model of *Euglena gracilis* in Fed-batch Mixotrophic Culture. *Journal of Chemical engineering of Japan*, 36(5):609-615. doi:10.1252/jcej.36.609.
- Permatasari, N. U., Ratnaningsih, E. & Hertadi, R.** (2018). The Use of Response Surface Method in Optimization of Levan Production by Heterologous Expressed Levansucrase from Halophilic Bacteria *Bacillus licheniformis* BK2. IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 209:012015. doi:10.1088/1755-1315/209/1/012015.
- Paulillo, S. C. de L., Yokoya, F. & Basso, L. C.** (2003). Mobilization of endogenous glycogen and trehalose of industrial yeasts. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(3):249-254. doi:10.1590/s1517-83822003000300014.
- Park, K.-H.** (2015). Roles of Enzymes in Glycogen Metabolism and Degradation in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Glycoscience*, 62(2):37-45. doi:10.5458/jag.jag.jag-2015\_005.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H.** (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10):785-786. doi:10.1038/nmeth.1701.
- Ponce Gordo, F., Herrera, S., Castro, A. T., García Durán, B. & Martínez Díaz, R. A.** (2002). Parasites from farmed ostriches (*Struthio camelus*) and rheas (*Rhea americana*) in Europe. *Veterinary Parasitology*, 107(1-2):137-160. doi:10.1016/s0304-4017(02)00104-8.
- Pierre, G., Delattre, C., Laroche, C. & Michaud, P.** (2014). Galactans and Its Applications of galactans. *Galactans applications of. Polysaccharides*, 1-37. doi:10.1007/978-3-319-03751-6\_69-1.
- Podterob, A. P.** (2008). Chemical composition of lichens and their medical applications. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42(10):582-588. doi:10.1007/s11094-009-0183-5f.

- Prokina, K. I.** (2019). Heterotrophic Flagellates from *Sphagnum* Bogs and Terrace-Forest and Floodplain Water Bodies of the Central Russian Forest-Steppe. *Inland Water Biology*, 12:276-289. <https://doi.org/10.1134/S199508291903012X>.
- Pombert, J.-F., James, E. R., Janouškovec, J., Keeling, P. J. & Mc Cutcheon, J.** (2012). Evidence for Transitional Stages in the Evolution of Euglenid Group II Introns and Twintrons in the *Monomorpha aenigmatica* Plastid Genome. *PLoS ONE*, 7:e53433.doi: 10.1371/journal.pone.0053433.
- Preisfeld, A., Berger, S., Busse, I., Liller, S., Ruppel, H. G.** (2000). Phylogenetic analyses of various euglenoid taxa (Euglenozoa) based on 18S rDNA sequence data. *Journal of Phycology*, 36:220-226 <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99091.x>.
- Preisfeld, A., Busse, I., Klingberg, M., Talke, S., Ruppel, H. G.** (2001). Phylogenetic position and inter-relationships of the osmotrophic euglenids based on SSU rDNA data, with emphasis on the *Rhabdomonadales* (Euglenozoa). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:751-758. DOI: 10.1099/00207713-51-3-751.
- Pringsheim, E. G.** (1942). Contributions to our Knowledge of Saproptic Algae and Flagellate III. *Astasia*, *Distigma*, *Menoidium* and *Rhabdomonas*. *New Phytologist*, 41(3):171-205. doi:10.1111/j.1469-8137.1942.tb07073.x.
- Pringsheim, E. G.** (1946). The Biphasic or Soil-Water Culture Method for Growing Algae and Flagellata. *Journal of Ecology*, 33:193-204. <https://doi.org/10.2307/2256465>.
- Pringsheim, E. G.** (1948). The Loss of Chromatophores in *Euglena gracilis*. *The New Phytologist*, Vol. 47, No. 1, pp. 52-87 <https://doi.org/10.1111/j.14698137.1948.tb05092.x>.
- Pringsheim, E. G.** (1956). Contributions towards a monograph of the genus *Euglena*. *Nova Acta Leopoldina*, 18:1-168.
- Pochmann, A.** (1956). Untersuchungen über Plattenbau und Spiralbau, über Wachstum und Zerteilung der Paramylonkörner. *Österreichische botanische Zeitschrift*, 103:110-141.

**Paerschke, S., Vollmer, A. H. & Preisfeld, A.** (2017). Ultrastructural and immunocytochemical investigation of paramylon combined with new 18S rDNA-based secondary structure analysis clarifies phylogenetic affiliation of *Entosiphon sulcatum* (Euglenida: Euglenozoa). *Organisms Diversity & Evolution*, 17(3):509-520. doi:10.1007/s13127-017-0330-x.

**Parkins, N. D., Stokes, J. V., Gavron, N. A., Frankovich, A. N. & Varela-Stokes, A. S.** (2020). Scarcity of *Hepatozoon americanum* in Gulf Coast tick vectors and potential for cultivating the protozoan. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 21:100421. doi:10.1016/j.vprsr.2020.100421.

**Pletnev, P., Osterman, I., Sergiev, P., Bogdanov, A., Dontsova, O.** (2015). Survival guide: *Escherichia coli* in the stationary phase. *Acta Naturae*, 7(4):22-33. PMID: 26798489; PMCID: PMC4717247.

**Persson, K., Ly, H. D., Dieckelmann, M., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G. & Strynadka, N. C. J.** (2001). Crystal structure of the retaining galactosyltransferase LgtC from *Neisseria meningitidis* in complex with donor and acceptor sugar analogs *Nature Structural Biology*, 8(2):166-175. doi:10.1038/84168.

**Pfeiffer, N. V. M.** (2012). Mitochondriale Zielsteuerung durch N-terminale Signalpeptide sekretorischer Proteine: Mechanismen und pathophysiologische Konsequenzen. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München

**Pasquier C., Promponas V. J., Palaios G. A., Hamodrakas J. S., Hamodrakas S. J.** (1999). A novel method for predicting transmembrane segments in proteins based on a statistical analysis of the SwissProt database: the PRED-TMR algorithm. *Protein Engineering*, 12(5):381-5. doi: 10.1093/protein/12.5.381. PMID: 10360978.

**Piovan, A., Filippini, R., Corbioli, G., Costa, V. D., Giunco, E. M. V., Burbello, G., Pagetta, A., Giusti, P. & Zusso, M.** (2021). Carotenoid Extract Derived from *Euglena gracilis* Overcomes Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation in Microglia: Role of NF- $\kappa$ B and Nrf2 Signaling Pathways. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02353-6>.

**Perty, M.** (1849). Über verticale Verbreitung mikroskopischer Lebensformen. *Mitteilungen der Naturforschenden Gesellschaft in Bern*,17-4.

**Perty, M.** (1852). Zur Kenntniss kleinster Lebensformen nach Bau, Funktionen. Systematik mit Special verzeichniss der in der Schweiz beobachteten. Verlag von Jent und Reinert, Bern, p 228

**Richter, R. P., Strauch, M. S., Ntefidou, M., Schuster, M., Daiker V., Nasir, A., Haag, F. W. M., Lebert, M.** (2014). Influence of Different Light-Dark Cycles on Motility and Photosynthesis of *Euglena gracilis* in Closed Bioreactors. *Astrobiology*,14:10

**Rehman, A., Shakoori, F. R. & Shakoori, A. R.** (2007). Heavy metal resistant *Distigma proteus* (Euglenophyta) isolated from industrial effluents and its possible role in bioremediation of contaminated wastewaters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23:753-758. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9291-5>.

**Rubel, I. A., Iraporda, C., Novosad, R., Cabrera, F. A., Genovese, D. B. & Manrique, G. D.** (2018). Inulin rich carbohydrates extraction from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*) tubers and application of different drying methods. *Food Research International*, 103:226-233. doi:10.1016/j.foodres.2017.10.041.

**Reyes-Prieto, A., Weber, A. P. M. & Bhattacharya, D.** (2007). The Origin and Establishment of the Plastid in Algae and Plants. *Annual Review of Genetics*, 41(1):147-168. doi:10.1146/annurev.genet.41.110306.130134.

**Rao, P.V.S., Periyasamy, C., Kumar, K. S., Rao, A. S. & Anantharaman, P.** (2018). Seaweeds: Distribution, Production and Uses. K. Suresh Kumar, K. S. (Hrsg.), *Bioprospecting of Algae* (pp.59-78). India: Shri Gyansagar Publications

**Rossi, M, Cicconofri, G., Beran, A., Noselli, G. & Antonio DeSimone, A.** (2017). Kinematics of flagellar swimming in *Euglena gracilis*: Helical trajectories and flagellar shapes. *PNAS*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708064114>.

- Rotte, C., Stejskal, F., Zhu, G., Keithly, J. S. & 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. *Molecular Biology and Evolution*, 18(5), 710-720. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003853.
- Robyt, J. F.** (1998). Essentials of Carbohydrate Chemistry. Springer-Verlag: New York (S. 159-160)
- Robyt, J. F.** (2001). Polysaccharides: Energy Storage. *Encyclopedia of Life Sciences*. doi:10.1038/npg.els.0000700.
- Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D. S., Alston, M., Stringer, M. F., Betts, R. P., Baranyi, J., Peck, M. W., Hinton, J. C. D.** (2011). Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology*, 194(3):686-701. doi:10.1128/jb.06112-11.
- Roth, L. E.** (1957). An Electron Microscope Study of The Cytology of The Protozoan *Euplotes Patella*. *The Journal of Cell Biology*, 3(6):985-1000. doi:10.1083/jcb.3.6.985.
- Řezanka, T., Vítová, M., Nováková, A. & Sigler, K.** (2015). Separation and Identification of Odd Chain Triacylglycerols of the Protozoan *Khawkinea quartana* and the Mold *Mortierella alpina* Using LC-MS. *Lipids*, 50(8):811-820. doi:10.1007/s11745-015-4042-8.
- Reisner, A. H., Nemes, P. & Bucholtz, C.** (1975). The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 64(2):509-516. doi:10.1016/0003-2697(75)90461-3.
- Roach, P.** (2002). Glycogen and its Metabolism. *Current Molecular Medicine*, 2(2):101-120. doi:10.2174/1566524024605761.
- Robinson, D. G.** (1996). SuSyergoGluSy: New Developments in the Field of Cellulose Biosynthesis. *Botanica Acta*, 109(4):261-263. doi:10.1111/j.1438-8677.1996.tb00571.x.

**Rodríguez, P. & Durante, P.** (1990). Characterization of a protein: Glucosyltransferase activity in human platelets. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 43(2):147-158. doi:10.1016/0885-4505(90)90020-2.

**Silver, N., Best, S., Jiang, J. & Thein, S.** (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7(1):33. doi:10.1186/1471-2199-7-33.

**Sethaphong, L., Haigler, C. H., Kubicki, J. D., Zimmer, J., Bonetta, D., DeBolt, S. & Yingling, Y. G.** (2013). Tertiary model of a plant cellulose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(18):7512-7517. doi:10.1073/pnas.1301027110.

**Shibakami, M. & Sohma, M.** (2018). Thermal, crystalline, and pressuresensitive adhesive properties of paramylon monoesters derived from an euglenoid polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 200:239-247. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.08.005.

**Šantek, B., Felski, M., Friehs, K., Lotz, M. & Flaschel, E.** (2009). Production of paramylon, a  $\beta$ -1,3-glucan, by heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* on a synthetic medium. *Engineering in Life Sciences*, 9(1):23-28. doi:10.1002/elsc.200700032.

**Shibakami, M., Tsubouchi, G. & Hayashi, M.** (2014). Thermoplasticization of euglenoid  $\beta$ -1,3-glucans by mixed esterification. *Carbohydrate Polymers*, 105:90-96. doi:10.1016/j.carbpol.2014.01.053.

**Suzuki, K., Nakano, R., Yamaguchi, H., Maruta, A. & Nakano, Y.** (2013). Function of Paramylon from *Euglena gracilis* as Filler. *Journal of the Society of Powder Technology*, 50(10):728-732. doi:10.4164/sptj.50.728.

**Shibakami, M., Tsubouchi, G., Nakamura, M. & Hayashi, M.** (2013b). Preparation of carboxylic acid-bearing polysaccharide nanofiber made from euglenoid  $\beta$ -1,3-glucans. *Carbohydrate Polymers*, 98(1):95-101. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.05.026.

**Sedmak, J. J. & Grossberg, S. E.** (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry*, 79(1-2):544-552. doi:10.1016/0003-2697(77)90428-6.

**Shoaib, M., Shehzad, A., Omar, M., Rakha, A., Raza, H., Sharif, H. R., Shakeel, A., Ansari, A., Niazi, S.** (2016). Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydrate Polymers*, 147:444-454. doi:10.1016/j.carbpol.2016.04.020.

**Stonik, I. V.** (2007). Species of the genus *Eutreptiella* (Euglenophyceae) from Russian waters of East/Japan Sea. *Ocean Science Journal*, 42(2):81-88. doi:10.1007/bf03020876.

**Segura-Campos, M. R., López-Sánchez, S. M., Castellanos-Ruelas, A., Betancur-Ancona, D., Chel-Guerrero, L.** (2015). Physicochemical and Functional Characterization of *Mucuna pruriens* Depigmented Starch for Potential Industrial Applications. *International Journal of Organic Chemistry*, 5:1-10.

**Sterner, M. & Gröndahl, F.** (2021). Extraction of laminarin from *Saccharina latissima* seaweed using cross-flow filtration. *Journal of Applied Phycology*, 33(3):1825-1844. doi:10.1007/s10811-021-02398-z.

**Sakagami, H., Unten, S., Hanaoka, A., Ohsawa, N., Fujimaki, M., Komatsu, N., Ichikawa, S., Hata, N., Kondo, H. & Konno, K.** (1989). Chemical modification potentiates paramylon induction of antimicrobial activity. *In Vivo*, 3(4):243-247. PMID: 2519859.

**Sugiyama, A., Suzuki, K., Mitra, S., Arashida, R., Yoshida, E., Nakano, R., Yabuta, Y., Takeuchi, T.** (2009). Hepatoprotective Effects of Paramylon, a  $\beta$ -1,3-D-Glucan Isolated from *Euglena gracilis* Z, on Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(7):885-890. doi:10.1292/jvms.71.885.

**Sugiyama, A., Hata, S., Suzuki, K., Yoshida, E., Nakano, R., Mitra, S., Arashida, R., Asayama, Y., Yabuta, Y., Takeuchi, T.** (2010). Oral Administration of Paramylon, a  $\beta$ -1,3-D-Glucan Isolated from *Euglena gracilis* Z Inhibits Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in NC/Nga Mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(6):755-763. doi:10.1292/jvms.09-0526.

**Sonck, E., Stuyven, E., Goddeeris, B. & Cox, E.** (2010). The effect of  $\beta$ -glucans on porcine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 135(3-4):199-207. doi:10.1016/j.vetimm.2009.11.014.

- Skov, J., Kania, P. W., Holten-Andersen, L., Fouz, B. & Buchmann, K. (2012).** Immunomodulatory effects of dietary  $\beta$ -1,3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(1):111-120. doi:10.1016/j.fsi.2012.04.009.
- Sánchez-Rodríguez, A., Tytgat, H. L., Winderickx, J., Vanderleyden, J., Lebeer, S. & Marchal, K. (2014).** A network-based approach to identify substrate classes of bacterial glycosyltransferases. *BMC Genomics*, 15(1):349. doi:10.1186/1471-2164-15-349.
- Sun, G.-L., Shen, W. & Wen, J.-F. (2008).** Triosephosphate Isomerase Genes in Two Trophic Modes of Euglenoids (Euglenophyceae) and Their Phylogenetic Analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(3):170-177. doi:10.1111/j.1550-7408.2008.00324.x.
- Suzuki, K., Mitra, S., Iwata, O., Ishikawa, T., Kato, S. & Yamada, K. (2015).** Selection and characterization of *Euglena anabaenavar. minoras* a new candidate *Euglena* species for industrial application. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(10):1730-1736. doi:10.1080/09168451.2015.1045828.
- Škodová-Sveráková, I., Prokopchuk, G., Peña-Díaz, P., Záhonová, K., Moos, M., Horváth, A., Horváth, A., Simek, P. & Lukes, J. (2020).** Unique Dynamics of Paramylon Storage in the Marine Euglenozoan *Diplonema papillatum*. *Protist*, 171:125717. doi:10.1016/j.protis.2020.125717.
- Suzuki, K., Yokohama-city, K., Arashida, R., Yoshida, E., Takeda, T., Kitakami-shi, I., Nakano, Y., Konno, N., Kitakami-shi, I., Takahashi, M., Marukawa, Y. (2013).** Veröffentlichung. *Deutsches Patent-und Markenamt*.  $\beta$ -1,3-Glucanase aus *Euglena gracilis*.
- Song, D., Shen, J. & Li, L. (2010).** Characterization of cellulose synthase complexes in *Populus* xylem differentiation. *New Phytologist*, 187(3):777-790. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03315.x.
- Sun, S., Horikawa, Y., Wada, M., Sugiyama, J. & Imai, T. (2016).** Site-directed mutagenesis of bacterial cellulose synthase highlights sulfurarene interaction as key to catalysis. *Carbohydrate Research*, 434:99-106. doi:10.1016/j.carres.2016.08.009.

- Sun, X. S.** (2005). Plant Materials Formation and Growth. *Bio-Based Polymers and Composites*, 15-32. doi:10.1016/b978-012763952-9/50003-4.
- Sudan, C., Prakash, S., Bhomkar, P., Jain, S. & Bhalla-Sarin, N.** (2006). Ubiquitous presence of  $\beta$ -glucuronidase (GUS) in plants and its regulation in some model plants. *Planta*, 224(4):853-864. doi:10.1007/s00425-006-0276-2.
- Satpati, G. G., Barman, N., Chakraborty, T., Pal, Ruma.** (2011). Unusual Habitat of Algae *Journal of Algal Biomass Utilization*. 2 (4): 50-52.
- Sathe, S. & Durand, P. M.** (2015). Cellular aggregation in *Chlamydomonas* (Chlorophyceae) is chimaeric and depends on traits like cell size and motility. *European Journal of Phycology*, 51(2):129-138. doi:10.1080/09670262.2015.110775.
- Saito, A., Suetomo, Y., Arikawa, M., Omura, G., Mostafa Kamal Khan, S. M., Kakuta, S., Suzaki, E., Kataoka, K., Suzaki, T.** (2003). Gliding movement in *Peranema trichophorum* is powered by flagellar surface motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 55(4):244-253. doi:10.1002/cm.10127.
- Saranak, J. & Foster, K. W.** (2005). Photoreceptor for Curling Behavior in *Peranema trichophorum* and Evolution of Eukaryotic Rhodopsins. *Eukaryotic Cell*, 4(10):1605-1612. doi:10.1128/ec.4.10.1605-1612.2005.
- Scheller, H. V. & Ulvskov, P.** (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1):263-289. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112315.
- Stasinopoulos, S. J., Fisher, P. R., Stone, B. A. & Stanisich, V. A.** (1999). Detection of two loci involved in (1-3)- $\beta$ -glucan (curdlan) biosynthesis by *Agrobacterium sp.* ATCC31749, and comparative sequence analysis of the putative curdlan synthase gene. *Glycobiology*, 9(1):31-41. doi:10.1093/glycob/9.1.31.
- Sui Y, Wu J, Chen J.** (2021). The Role of Gut Microbial  $\beta$ -Glucuronidase in Estrogen Reactivation and Breast Cancer. *Front Cell Dev Biol.*, 12;9:631552. doi: 10.3389/fcell.2021.631552.

- Slabaugh, E., Davis, J. K., Haigler, C. H., Yingling, Y. G. & Zimmer, J.** (2014). Cellulose synthases: new insights from crystallography and modeling. *Trends in Plant Science*, 19(2):99-106. doi:10.1016/j.tplants.2013.09.009.
- Sethya, K., Mishra, S. K., Mohanty, P. P., Agarwal, J., Meher, P., Satapathy, D., Sahoo, J. K., Panda, S., Nayak, S. M.** (2015). An Overview of Non Starch Polysaccharide. *Journal of Animal Nutrition and Physiology*, Volume 1, Pages 17-22
- Suetomo, Y., Saito, A., Arikawa, M., Omura, G., Khan, S. M. M. K., Kakuta, S., Yoshimura, C. & Toshinobu Suzuki, T.** (2006). Bacteria-free culture of a colorless euglenoid, *Peranema trichophorum*, and establishment of a method for flagellar isolation. *Japanese Journal of Protozoology*, Vol. 39, No. 1
- Schultink, A., Liu, L., Zhu, L. & Pauly, M.** (2014). Structural Diversity and Function of Xyloglucan Sidechain Substituents. *Plants*, 3(4):526-542. doi:10.3390/plants3040526.
- Simpson, A. G. B.** (1997). The identity and composition of the Euglenozoa. *Archiv Für Protistenkunde*, 148(3):318-328. doi:10.1016/s0003-9365(97)80012-7.
- Simpson, A. G. B. & Patterson, D. J.** (1999). The ultrastructure of *Carpodionomonas membranifera* (Eukaryota) with reference to the "excavate hypothesis. *European Journal of Protistology*, 35(4):353-370. doi:10.1016/s0932-4739(99)80044-3.
- Simpson, A. G. B., Van Den Hoff, J., Bernard, C., Burton, H. R. & Patterson, D. J.** (1997). The ultrastructure and systematic position of the euglenozoon *Postgaardia mariagerensis*, FENCHEL et al. *Arch. Protistenkd.* 147:213-225.
- Storch, V. & Welsch, U.** (2009). *Kükenthal Zoologisches Praktikum. (26. Aufl.). Springer Verlag: Berlin Heidelberg*, S. 23-26
- Schroeckh, S., Lee, W. J. & Patterson, D. J.** (2003). Free-living heterotrophic euglenids from freshwater sites in mainland Australia. *Hydrobiologia*, 493:131-166. doi:10.1023/a:1025457801420.

- Senn, C.** (1900). Euglenineae. In Die natürlichen Pflanzenfamilien (eds. A. Engler and K. Prantl), 1:173-185.
- Stein, F.R.** (1878). Der Organismus Infusionsthier. III. Abt. Der Organismus Flagellaten, William Engelmann, Leipzig.
- Strother, P. K., Taylor, W. A., Schootbrugge, B. V. D., Leander, B. S., Charles H. Wellman, C. H.** (2020). Pellicle ultrastructure demonstrates that Moyeria is a fossil euglenid. *Palynology*, 44:3, 461-471. <https://doi.org/10.1080/01916122.2019.1625457>.
- Turabelidze, A., Guo, S. & DiPietro, L. A.** (2010). Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model. *Wound Repair and Regeneration*, 18(5):460-466. doi:10.1111/j.1524-475x.2010.00611.x.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., Borman B. D., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E.** (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75(2-3):291-295. doi:10.1016/s0168-1656(99)00163-7.
- Tanaka, Y., Ogawa, T., Maruta, T., Yoshida, Y., Arakawa, K. & Ishikawa, T.** (2017). Glucan synthase-like 2 is indispensable for paramylon synthesis in *Euglena gracilis*. *FEBS Letters*, 591(10):1360-1370. doi:10.1002/1873-3468.12659.
- Tian, L., Li, C.-M., Li, Y.-F., Huang, T.-M., Chao, N.-X., Luo, G.-R. & Mo, F.-R.** (2020). Laminarin from Seaweed (*Laminaria japonica*) Inhibits Hepatocellular Carcinoma Through Upregulating Senescence Marker Protein-30. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 35(4):277-283. doi:10.1089/cbr.2019.3179.
- Tomulescu, C., Stoica, R., Sevcenco, C., Cășărică, A., Moscovici, M. & Vamanu, A.** (2016). Levan-a mini review. *Sci. Bull. Ser. F. Biotechnol.*, 20:309-317.
- Tomazett, P. K., Félix, C. R., Lenzi, H. L., de Paula Faria, F., de Almeida Soares, C. M. & Pereira, M.** (2010). 1,3-β-d-Glucan synthase of *Paracoccidioides brasiliensis*: recombinant protein, expression and cytolocalization in the yeast and mycelium phases. *Fungal Biology*, 114(10):809-816. doi:10.1016/j.funbio.2010.07.007.

- Triemer, R. E. & Zakryś, B.** (2015). Photosynthetic Euglenoids. *Freshwater Algae of North America*, 459-483. doi:10.1016/b978-0-12-385876-4.00010-4.
- Triemer, R. E.** (1997). Feeding in *Peranema trichophorum* revisited (Euglenophyta)1. *Journal of Phycology*, 33(4):649-654. doi:10.1111/j.0022-3646.1997.00649.x.
- Turner, S. & Kumar, M.** (2017). Cellulose synthase complex organization and cellulose microfibril structure. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 376(2112):20170048. doi:10.1098/rsta.2017.0048.
- Triemer, R. E. & Farmer, M. A.** (1991). An ultrastructural comparison of the mitotic apparatus, feeding apparatus, flagellar apparatus and cytoskeleton in euglenoids and kinetoplastids. *Protoplasma*, 164(1-3):91-104. doi:10.1007/bf01320817.
- Triemer, R. E. & Zakryś, B.** (2015). Photosynthetic Euglenoids. In Wehr, J. D., Sheath, R. G., Kociolek, J. P. *Freshwater Algae of North America : Ecology and Classification*. San Diego: Academic Press, pp. 464-466
- Tomita, Y., Yoshioka, K., Iijima, H., Nakashima, A., Iwata, O., Suzuki, K., Hasunuma, T., Suzuki, K., Kondo, A., Hirai, M. Y., Osanai, T.** (2016). Succinate and Lactate Production from *Euglena gracilis* during Dark, Anaerobic Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.02050.
- Tamm, S. L.** (1967). Flagellar Development in the Protozoan *Peranema trichophorum*,. *Journal of Experimental Zoology*, 164(2):163-186. doi:10.1002/jez.1401640204.
- Talke, S. & Preisfeld, A.** (2002). Molecular Evolution of Euglenozoan Paraxonemal Rod Genes par1 and par2 Coincides with Phylogenetic Reconstruction Based on Small Subunit rDNA Data1. *Journal of Phycology*, 38(5):995-1003. doi:10.1046/j.1529-8817.2002.02028.x.
- Tamaki, S., Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S. & Ishikawa, T.** (2014). Identification and functional analysis of peroxiredoxin isoforms in *Euglena gracilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(4):593-601. doi:10.1080/09168451.2014.890037.

- Tomos, A. D. & Northcote, D. H.** (1978). A protein-glucan intermediate during paramylon synthesis. *Biochemical Journal*, 174(1):283-290. doi:10.1042/bj1740283.
- Venugopal, V.** (2019). Sulfated and Non-Sulfated Polysaccharides from Seaweeds and their Uses: An Overview". *EC Nutrition* 14.2:126-141
- Van Gestel, N. C., Nesbit, A. D., Gordon, E. P., Green, C., Pare, P. W., Thompson, L., Thompsone, L., Peffley, E. B., Tissue, D. T.** (2005). Continuous light may induce photosynthetic downregulation in onion - consequences for growth and biomass partitioning. *Physiologia Plantarum*, 125(2):235-246. doi:10.1111/j.1399-3054.2005.00560.x.
- Villarruel-López, A., Ascencio, F. & Nuño, K.** (2017). Microalgae, a Potential Natural Functional Food Source-a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 67(4):251-264. doi:10.1515/pjfn-2017-0017.
- Valluru, R. & Van den Ende, W.** (2008). Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany*, 59(11):2905-2916. doi:10.1093/jxb/ern164.
- Valente, V., Teixeira, S. A., Neder, L., Okamoto, O. K., Oba-Shinjo, S. M., Marie, S. K. Scrideli, C.A., Paçó-Larson, M.L., Carlotti, C. G. Jr.** (2009). Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Molecular Biology*, 10(1):17. doi:10.1186/1471-2199-10-17.
- Viola, R., Nyvall, P. & Pedersen, M.** (2001). The unique features of starch metabolism in red algae. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1474):1417-1422. doi:10.1098/rspb.2001.1644.
- Van Dooren, G. G., Schwartzbach, S. D., Osafune, T. & McFadden, G. I.** (2001). Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1541(1-2):34-53. doi:10.1016/s0167-4889(01)00154-9.

- Van Laere, A. & Van Den Ende, W.** (2002). Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell and Environment*, 25(6):803-813. doi:10.1046/j.1365-3040.2002.00865.x.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A. & Rasmussen, R. P.** (2013). Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *Bio Techniques*, 54(6). doi:10.2144/000114043.
- Watanabe, T., Shimada, R., Matsuyama, A., Yuasa, M., Sawamura, H., Yoshida, E. & Suzuki, K.** (2013). Antitumor activity of the  $\beta$ -glucan paramylon from *Euglena* against preneoplastic colonic aberrant crypt foci in mice. *Food & Function*, 4(11):1685. doi:10.1039/c3fo60256g.
- Wang, Y., Seppänen-Laakso, T., Rischer, H. & Wiebe, M. G.** (2018). *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions. *PLOS ONE*, 13(4), e0195329. doi:10.1371/journal.pone.0195329.
- Wang, L., Liu, Q., Tan, X., Wang, Z., Wang, M., Wise, M. J., Li, C., Ma, C., Li, E., Deng, B., Du, Y., Tang, D., Gilbert, R. G.** (2019). Molecular structure of glycogen in *Escherichia coli*. *Biomacromolecules*. doi:10.1021/acs.biomac.9b00586.
- Wolowski, K.** (1998). Taxonomic and environmental studies on Euglenophytes of the Kraków-Czêstochowa Upland (Southern Poland). *Fragmenta Floristica et Geobotanica Supplementum*, 6:1-192.
- Wilson, W. A., Roach, P. J., Montero, M., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F. J., Eydallin, G., Viale, A. M., Pozueta-Romero, J.** (2010). Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6):952-985. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00220.x.
- Walne, P. L., & Dawson, N. S.** (1993). A Comparison of Paraxial Rods in the Flagella of Euglenoids and Kinetoplastids. *Archiv Für Protistenkunde*, 143(1-3):177-194. doi:10.1016/s0003-9365(11)80287-3.

- Wang, J., Elliott, J. E. & Williamson, R. E.** (2008). Features of the primary wall CESA complex in wild type and cellulose-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 59(10):2627-2637.
- Wang, H., Liu, Y. M., Qi, Z. M., Wang, S. Y., Liu, S. X., Li, X., Wang, H. J. & Xia, X. C.** (2013). An Overview on Natural Polysaccharides with Antioxidant Properties. *Current Medicinal Chemistry*, 20(23):2899-2913. doi:10.2174/0929867311320230006.
- Wang, J., Zhang, Q., Huang, Z. & Liu, Z.** (2013). Directed evolution of a family 26 glycoside hydrolase: Endo- $\beta$ -1,4-mannanase from *Pantoea agglomerans* A021. *Journal of Biotechnology*, 167(3):350-356. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.06.019.
- Werner-Washburne, M., Braun, E. L., Crawford, M. E. & Peck, V. M.** (1996). Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 19(6):1159-1166. doi:10.1111/j.1365-2958.1996.tb02461.x.
- Westermeier, R.** (2005). Gel Electrophoresis. *Encyclopedia of Life Sciences*. doi:10.1038/npg.els.0005335.
- Ward, K. A. & Willey, R. L.** (1981). The development of a cell-substrate attachment system in a euglenoid flagellate. *Journal of Ultrastructure Research*, 74(2):165-174. doi:10.1016/s0022-5320(81)80074-3.
- Xing, W., Deng, M., Zhang, J., Huang, H., Dirsch, O., Dahmen, U.** (2009). Quantitative evaluation and selection of reference genes in a rat model of extended liver resection. *J Biomol Tech.*, 20(2):109-15. PMID: 19503622; PMCID: PMC2685606.
- Xue, J.-L. & Cheng, X.-W.** (2010). Using Host 28S Ribosomal RNA as a Housekeeping Gene for Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR (qRT-PCR) in Virus-Infected Animal Cells. *Current Protocols in Microbiology*, 1D.2.1-1D.2.13. doi:10.1002/9780471729259.mc01d02s19.
- Yamaguchi, T. & Roger Anderson, O.** (1994). Fine structure of laboratory cultured *Distigma proteus* and cytochemical localization of acid phosphatase. *Journal of Morphology*, 219(1):89-99. doi:10.1002/jmor.1052190110.

- Yasuda, K., Ogushi, M., Nakashima, A., Nakano, Y. & Suzuki, K.** (2018). Accelerated Wound Healing on the Skin Using a Film Dressing with  $\beta$ -Glucan Paramylon. *In Vivo*, 32(4), 799-805. doi:10.21873/invivo.11310.
- Yubuki, N. & Leander, B. S.** (2011). Reconciling the bizarre inheritance of microtubules in complex (euglenid) microeukaryotes. *Protoplasma*, 249(4):859-869. doi:10.1007/s00709-011-0340-z.
- Yamaguchi, A., Yubuki, N. & Leander, B. S.** (2012). Morphostasis in a novel eukaryote illuminates the evolutionary transition from phagotrophy to phototrophy: description of *Rapaza viridis* n. gen. et sp. (Euglenozoa, Euglenida). *BMC Evolutionary Biology*, 12(1):29. doi:10.1186/1471-2148-12-29.
- Yubuki, N., Edgcomb, V. P., Bernhard, J. M. & Leander, B. S.** (2009). Ultrastructure and molecular phylogeny of *Calkinsia aureus*: cellular identity of a novel clade of deep-sea euglenozoans with epibiotic bacteria. *BMC Microbiology*, 9(1):16. doi:10.1186/1471-2180-9-16.
- Yüzbaşıoğlu, A., Onbaşılar, İ., Kocaefe, Ç. & Özgüç, M.** (2010). Assessment of housekeeping genes for use in normalization of real time PCR in skeletal muscle with chronic degenerative changes. *Experimental and Molecular Pathology*, 88(2):326-329. doi:10.1016/j.yexmp.2009.12.007.
- Youngs, H. L., Hamann, T., Osborne, E. & Somerville, C.** (2007). The Cellulose Synthase Superfamily. Cellulose. *Molecular and Structural Biology*, 35-48. doi:10.1007/978-1-4020-5380-1\_3.
- Yamane, Y., Utsunomiya, T., Watanabe, M. & Sasaki, K.** (2001). Biomass production in mixotrophic culture of *Euglena gracilis* under acidic condition and its growth energetics. *Biotechnology Letters*, 23(15):1223-1228. doi:10.1023/a:1010573218863.
- Yamamoto, F. Y., Sutili, F. J., Hume, M. & Gatlin, D. M.** (2018a). The effect of  $\beta$ -1,3-glucan derived from *Euglena gracilis* (Algamune™) on the innate immunological responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Journal of Fish Diseases*, 41:1579-1588. doi:10.1111/jfd.12871.

- Yamamoto, F. Y., Yin, F., Rossi, W., Hume, M. & Gatlin, D. M.** (2018b).  $\beta$ -1,3 glucan derived from *Euglena gracilis* and Algamune™ enhances innate immune responses of red drum (*Sciaenops ocellatus* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 77:273-279. doi:10.1016/j.fsi.2018.04.003.
- Yamatoya, K., Shirakawa, M., Kuwano, K., Suzuki, J. & Baba, O.** (1997). Hypolipidemic effects of hydrolyzed xyloglucan. *Macromolecular Symposia*, 120(1):231-236. doi:10.1002/masy.19971200123.
- Zeitz, M. A., Tanveer, Z., Openshaw, A. T. & Schmidt, M.** (2019). Genetic Regulators and Physiological Significance of Glycogen Storage in *Candida albicans*. *Journal of Fungi*, 5(4):102. doi:10.3390/jof5040102.
- Zakryś, B., Milanowsko, R., Karnkowska, A.** (2017). Evolutionary Origin of *Euglena*. In S. D. Schwartzbach & S. Shigeoka (Hrsg.), *Euglena: Biochemistry, Cell und Molecular Biology*. Switzerland: *Springer International Publishing* (S. 4-6 und S. 9)
- Zucca, P., Fernandez-Lafuente, R. & Sanjust, E.** (2016). Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. *Molecules*, 21(11):1577. doi:10.3390/molecules21111577.
- Zakryś, B.** (1986). Contribution to the monograph of Polish members of the genus *Euglena* Ehr. 1830. *Nova Hedwigia*, 42:491-540.
- Zhou, C., Xu, Q., He, S., Ye, W., Cao, R., Wang, P., Ling, Y., Xing Yan, X., Wang, Q., Zhang, G.** (2020). GTDB: an integrated resource for glycosyltransferase sequences and annotations. *Database*, 1-9. doi:10.1093/database/baaa047.
- Zakim, D. & Vessey, D. A.** (1976). Regulation of Microsomal UDP-glucuronyltransferase by Metal Ions. Differential Effects of  $Mn^{2+}$  on Forward and Reverse Reactions. *European Journal of Biochemistry*, 64(2):459-463. doi:10.1111/j.1432-1033.1976.tb10323.x.
- Zhang, J., Gao, Y.-Y., Huang, Y.-Q., Fan, Q., Lu, X.-T. & Wang, C.-K.** (2017). Selection of housekeeping genes for quantitative gene expression analysis in yellow-feathered broilers. *Italian Journal of Animal Science*, 17(2):540-546. doi:10.1080/1828051x.2017.136563.

## 6. ANHANG

Tabelle 64: Berechnung der Zellkonzentration für *Distigma proteus*

| Die Anzahl der Zelle |            |                            |
|----------------------|------------|----------------------------|
| Kulturdauer (Tage)   | Zellanzahl | Zellkonzentration [pro ml] |
| 1                    | 17         | 10.625                     |
| 3                    | 18         | 11.250                     |
| 5                    | 21         | 13.125                     |
| 7                    | 33         | 20.525                     |
| 9                    | 41         | 25.625                     |
| 11                   | 48         | 30.000                     |
| 13                   | 55         | 34.375                     |
| 15                   | 67         | 41.875                     |
| 17                   | 72         | 45.000                     |
| 19                   | 91         | 56.975                     |
| 21                   | 105        | 65.625                     |
| 23                   | 107        | 66.875                     |
| 25                   | 112        | 70.000                     |
| 27                   | 106        | 66.250                     |
| 29                   | 106        | 66.250                     |
| 31                   | 105        | 65.625                     |
| 33                   | 105        | 65.625                     |

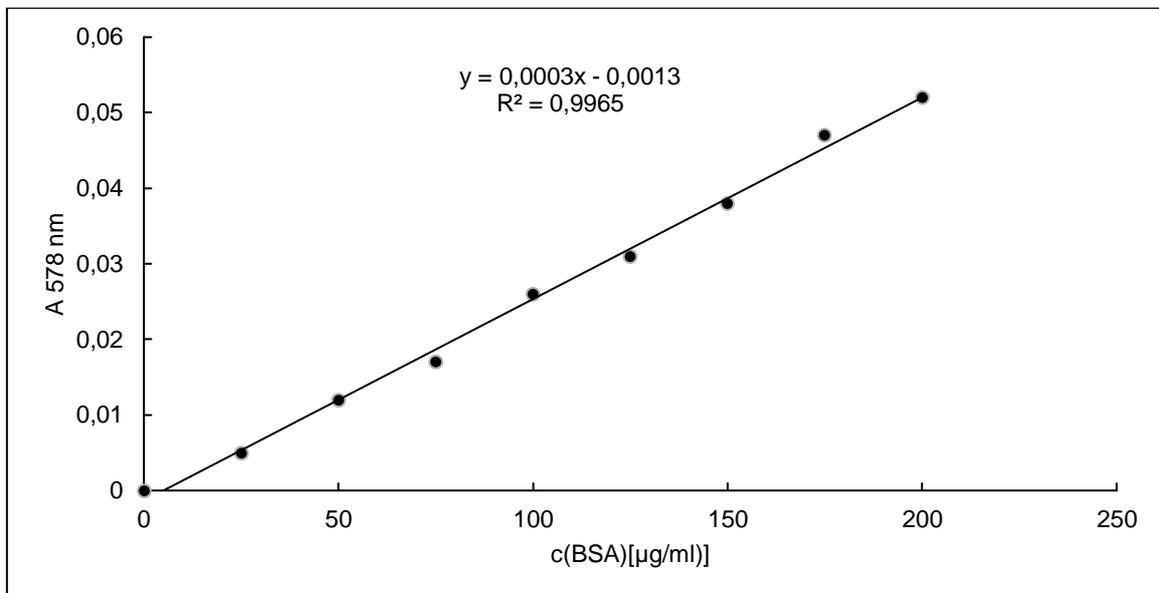


Abbildung 82: Kalibrierungskurve zur Proteinbestimmung nach Lowry

Tabelle 65: Standardlösungen und Messwerte zur Proteinbestimmung nach Lowry

| C(BSA)<br>[µg/ml]   | 0 | 25    | 50    | 75    | 100   | 125   | 150   | 175   | 200   |
|---------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A <sub>578 nm</sub> | 0 | 0,005 | 0,012 | 0,016 | 0,023 | 0,030 | 0,040 | 0,047 | 0,051 |
|                     | 0 | 0,006 | 0,011 | 0,018 | 0,029 | 0,033 | 0,038 | 0,047 | 0,049 |
|                     | 0 | 0,004 | 0,013 | 0,018 | 0,025 | 0,030 | 0,036 | 0,046 | 0,055 |
| MW                  | 0 | 0,005 | 0,012 | 0,017 | 0,026 | 0,031 | 0,038 | 0,047 | 0,052 |

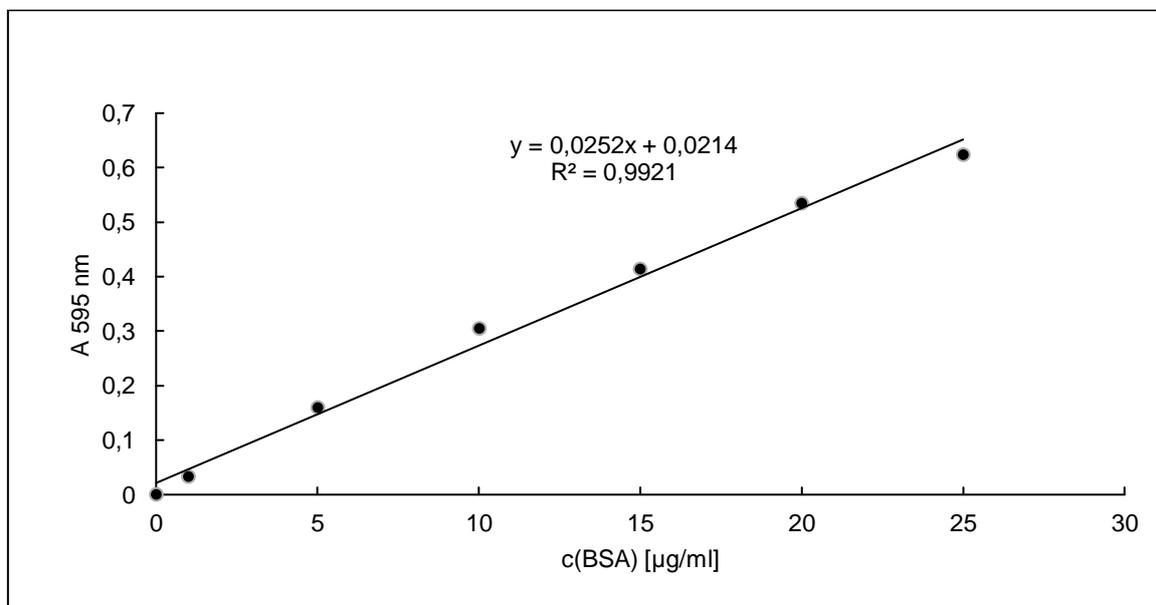


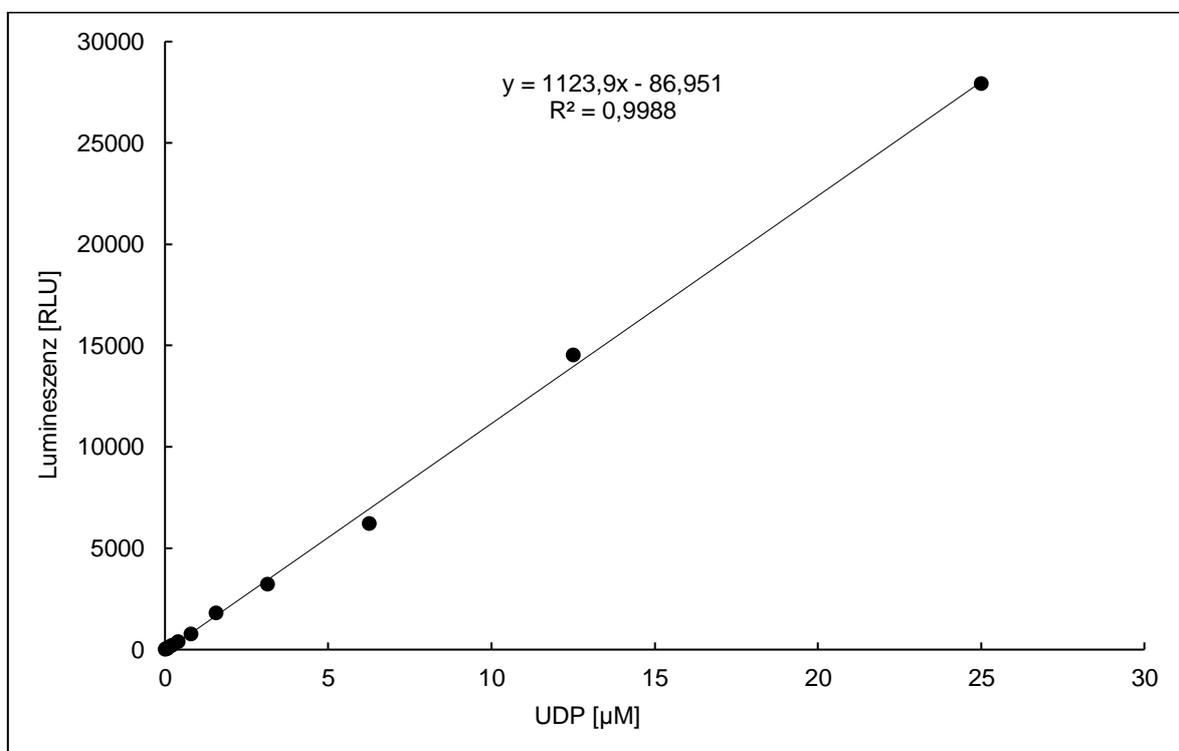
Abbildung 83: Kalibrierungskurve zur Proteinbestimmung nach Bradford

**Tabelle 66:** Standardlösungen und Messwerte zur Proteinbestimmung nach Bradford

| C(BSA)<br>[µg/ml]   | 0 | 1     | 5     | 10    | 15    | 20    | 25    |
|---------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A <sub>595 nm</sub> | 0 | 0,018 | 0,141 | 0,306 | 0,394 | 0,514 | 0,629 |
|                     | 0 | 0,040 | 0,160 | 0,299 | 0,424 | 0,561 | 0,573 |
|                     | 0 | 0,041 | 0,175 | 0,306 | 0,421 | 0,528 | 0,668 |
| MW                  | 0 | 0,033 | 0,159 | 0,304 | 0,413 | 0,534 | 0,623 |

**Tabelle 67:** Extinktionsmesswerte der Fraktionen zur Proteinbestimmung nach Lowry (Paramylon-Synthase-Komplex aus *Distigma proteus*) (Dreifache Messung und 1:20 Verdünnung)

| Fraktionsnummer | Absorptionsmesswerte |       |       |
|-----------------|----------------------|-------|-------|
|                 | 1                    | 2     | 3     |
| 1               | 0,050                | 0,050 | 0,047 |
| 2               | 0,052                | 0,050 | 0,050 |
| 3               | 0,017                | 0,017 | 0,017 |
| 4               | 0,014                | 0,013 | 0,013 |
| 5               | 0,024                | 0,024 | 0,024 |
| 6               | 0,006                | 0,005 | 0,005 |
| 7               | 0,005                | 0,006 | 0,006 |

**Abbildung 84:** Messwerte der Standardkurve zum UDP-Glucosyltransferase-Assay, Messwerte werden noch vom Mittelwert des Nullwertes (= 86) abgezogen und die Proben wurde 1:2 verdünnt

**Tabelle 68:** Standard UDP-Lösungen und Lumineszenz Messwerte [RLU]

| UDP[ $\mu$ M] | Lumineszenz Messwerte [RLU] |        |        |
|---------------|-----------------------------|--------|--------|
|               | 1                           | 2      | 3      |
| 0             | 84                          | 96     | 79     |
| 0,02          | 151                         | 101    | 87     |
| 0,05          | 154                         | 134    | 98     |
| 0,1           | 195                         | 161    | 176    |
| 0,2           | 291                         | 260    | 242    |
| 0,39          | 443                         | 501    | 414    |
| 0,78          | 820                         | 795    | 894    |
| 1,56          | 2.544                       | 1.393  | 1.735  |
| 3,13          | 3.874                       | 3.010  | 2.991  |
| 6,25          | 6.435                       | 5.705  | 6.717  |
| 12,5          | 16.743                      | 14.242 | 12.893 |
| 25            | 27.107                      | 31.944 | 24.985 |

**Tabelle 69:** Lumineszenzmesswerte der Fraktionen aus Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (*Distigma proteus*)

| Aktivitätsmessung ( <i>Distigma proteus</i> ) |            |            |            |            |            |            |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Fraktion 1                                    | Fraktion 2 | Fraktion 3 | Fraktion 4 | Fraktion 5 | Fraktion 6 | Fraktion 7 |
| 7.121   | 12.144     | 2.580      | 1.534      | 1.423      | 1.695      | 3.245      |
| 7.188   | 11.988     | 2.577      | 1.564      | 1.420      | 1.645      | 3.167      |
| 6.509   | 11.310     | 2.526      | 1.443      | 1.412      | 1.684      | 3.185      |
| 7.086   | 9.840      | 2.577      | 1.369      | 1.401      | 1.550      | 3.068      |
| 7.719   | 11.390     | 2.534      | 1.595      | 1.492      | 1.639      | 3.373      |
| 7.614   | 11.198     | 2.582      | 1.550      | 1.442      | 1.615      | 3.540      |
| 6.988   | 11.408     | 2.586      | 1.462      | 1.465      | 1.637      | 3.350      |
| 7.324   | 10.782     | 2.439      | 1.563      | 1.592      | 1.666      | 3.249      |
| 7.646   | 13.471     | 2.747      | 1.623      | 1.547      | 1.696      | 3.675      |
| 7.921   | 12.176     | 3.036      | 1.546      | 1.549      | 1.401      | 3.128      |
| 7.201   | 12.887     | 2.844      | 1.555      | 1.581      | 1.443      | 3.465      |
| 7.042   | 10.294     | 2.974      | 1.575      | 1.458      | 1.560      | 3.941      |

**Tabelle 70:** Messwerte des UDP-Glucosyltransferase-Test Aktivität in Abhängigkeit verschiedener Metallionen (*Distigma proteus*)

| <b>Ionen</b> |              |              |
|--------------|--------------|--------------|
| <b>Mn</b>    | <b>Mn+Mg</b> | <b>Mn+Ca</b> |
| 8.276        | 7.385        | 6.075        |
| 8.458        | 7.138        | 6.021        |
| 8.233        | 7.333        | 6.036        |
| 8.345        | 7.345        | 6.034        |
| 8.421        | 7.413        | 6.004        |
| 8.434        | 7.144        | 6.015        |
| 8.548        | 7.285        | 6.174        |
| 8.609        | 7.336        | 6.112        |
| 8.584        | 7.472        | 6.148        |
| 8.563        | 7.400        | 6.124        |
| 8.495        | 7.476        | 6.128        |
| 8.572        | 7.462        | 6.126        |
| 8.722        | 7.361        | 6.483        |
| 8.315        | 7.179        | 6.753        |
| 8.536        | 7.278        | 6.444        |
| 8.544        | 7.208        | 6.509        |
| 8.412        | 7.387        | 6.686        |
| 8.323        | 7.435        | 6.494        |
| 8.405        | 7.123        | 6.463        |
| 8.120        | 7.963        | 6.370        |
| 8.578        | 7.505        | 5.728        |
| 8.935        | 7.443        | 5.679        |
| 8.055        | 7.456        | 6.521        |
| 7.727        | 7.265        | 6.591        |
| 7.479        | 7.321        | 6.665        |
| 7.444        | 7.256        | 6.749        |
| 8.105        | 7.346        | 6.999        |
| 8.392        | 7.834        | 6.236        |
| 8.471        | 7.766        | 6.275        |
| 8.211        | 7.847        | 6.205        |
| 8.279        | 7.793        | 6.751        |
| 8.290        | 7.108        | 6.210        |

**Tabelle 71:** Ergebnisse der enzymatischen Produktanalyse für Paramylon aus *Distigma proteus*

| DC-Ergebnisse |                        |        |        |                            |
|---------------|------------------------|--------|--------|----------------------------|
| Probe         | Substanz               | a (cm) | b (cm) | Retentionsfaktor ( $R_f$ ) |
| G             | Glucose-Standard       | 5,3    | 8,4    | 0,63                       |
| 1             | $\alpha$ -Amylase      | -      |        | -                          |
| 2             | $\beta$ -Amylase       | 5,3    |        | 0,63                       |
| 3             | $\beta$ -1,3-Glucanase | 5,3    |        | 0,63                       |
| 4             | $\beta$ -1,4-Glucanase | -      |        | -                          |

**Tabelle 72:** Ergebnisse der Alkali- und Säureanalyse für Paramylon aus *Distigma proteus*

| DC-Ergebnisse |                  |        |        |                            |
|---------------|------------------|--------|--------|----------------------------|
| Probe         | Substanz         | a (cm) | b (cm) | Retentionsfaktor ( $R_f$ ) |
| G             | Glucose-Standard | 5,4    | 8,4    | 0,64                       |
| 1             | Säurehydrolyse   | -      |        | -                          |
| 2             | Alkalihydrolyse  | 5,4    |        | 0,64                       |

**Tabelle 73:** Berechnung der Zellkonzentration für *Peranema sp.*

| Die Anzahl der Zelle |            |                            |
|----------------------|------------|----------------------------|
| Kulturdauer (Tage)   | Zellanzahl | Zellkonzentration [pro ml] |
| 1                    | 11         | 13.750                     |
| 3                    | 13         | 16.250                     |
| 5                    | 18         | 22.500                     |
| 7                    | 19         | 23.750                     |
| 9                    | 23         | 28.750                     |
| 11                   | 27         | 33.750                     |
| 13                   | 28         | 35.000                     |
| 15                   | 28         | 35.000                     |
| 17                   | 28         | 35.000                     |
| 19                   | 27         | 33.750                     |
| 21                   | 26         | 32.500                     |
| 23                   | 26         | 32.500                     |
| 25                   | 25         | 31.250                     |
| 27                   | 24         | 30.000                     |
| 29                   | 24         | 30.000                     |
| 31                   | 24         | 30.000                     |

**Tabelle 74:** Extinktionsmesswerte der Fraktionen zur Proteinbestimmung nach Lowry (Paramylon-Synthase-Komplex aus *Peranema sp.*) (Dreifache Messung und 1:20 Verdünnung)

| Fraktionsnummer | Absorptionsmesswerte |       |       |
|-----------------|----------------------|-------|-------|
|                 | 1                    | 2     | 3     |
| 1               | 0,034                | 0,035 | 0,032 |
| 2               | 0,025                | 0,025 | 0,023 |
| 3               | 0,017                | 0,018 | 0,017 |
| 4               | 0,021                | 0,022 | 0,020 |
| 5               | 0,027                | 0,027 | 0,025 |
| 6               | 0,008                | 0,008 | 0,007 |
| 7               | 0,005                | 0,006 | 0,005 |

**Tabelle 75:** Lumineszenzmesswerte der Fraktionen aus Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (*Peranema sp.*)

| <b>Aktivitätsmessung</b> |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Fraktion 1</b>        | <b>Fraktion 2</b> | <b>Fraktion 3</b> | <b>Fraktion 4</b> | <b>Fraktion 5</b> | <b>Fraktion 6</b> | <b>Fraktion 7</b> |
| 1.345                    | 1.238             | 8.956             | 17.922            | 18.731            | 2.364             | 1.803             |
| 1.428                    | 1.278             | 8.864             | 17.911            | 18.428            | 2.268             | 1.812             |
| 1.332                    | 1.298             | 8.765             | 17.904            | 18.436            | 2.354             | 1.823             |
| 1.467                    | 1.302             | 8.869             | 17.973            | 18.221            | 2.238             | 1.847             |
| 1.371                    | 1.221             | 8.775             | 17.899            | 18.866            | 2.357             | 1.809             |
| 1.332                    | 1.233             | 8.774             | 17.236            | 18.521            | 2.274             | 1.824             |
| 1.420                    | 1.238             | 8.874             | 17.906            | 18.338            | 2.369             | 1.823             |
| 1.380                    | 1.246             | 8.872             | 17.909            | 18.406            | 2.340             | 1.826             |

**Tabelle 76:** Messwerte des UDP-Glucosyltransferase-Test Aktivität in Abhängigkeit verschiedener Metallionen (*Peranema sp.*)

| <b>Ionen</b> |              |              |
|--------------|--------------|--------------|
| <b>Mn</b>    | <b>Mn+Mg</b> | <b>Mn+Ca</b> |
| 17.345       | 16.064       | 14.867       |
| 17.225       | 16.282       | 15.456       |
| 17.238       | 16.239       | 15.838       |
| 17.267       | 16.189       | 15.600       |
| 17.333       | 16.211       | 15.444       |
| 17.263       | 16.233       | 15.121       |
| 17.221       | 16.058       | 15.442       |
| 17.118       | 16.433       | 15.389       |
| 17.068       | 16.228       | 15.247       |
| 17.348       | 16.245       | 15.220       |
| 17.633       | 16.233       | 15.034       |
| 17.242       | 16.348       | 15.005       |
| 18.840       | 16.354       | 15.919       |
| 17.506       | 16.424       | 15.346       |
| 17.963       | 16.198       | 15.295       |
| 17.624       | 16.109       | 15.507       |
| 17.608       | 16.916       | 15.576       |
| 17.949       | 17.851       | 15.435       |
| 17.902       | 16.126       | 15.292       |
| 15.238       | 12.489       | 10.848       |
| 14.903       | 12.935       | 11.802       |
| 14.437       | 13.317       | 11.683       |
| 14.856       | 12.383       | 10.293       |
| 15.379       | 14.454       | 11.365       |
| 15.432       | 12.823       | 10.238       |

**Tabelle 77:** Ergebnisse der enzymatischen Produktanalyse für Paramylon aus *Peranema sp.*

| DC-Ergebnisse |                  |        |        |                                    |
|---------------|------------------|--------|--------|------------------------------------|
| Probe         | Substanz         | a (cm) | b (cm) | Retentionsfaktor (R <sub>f</sub> ) |
| G             | Glucose-Standard | 6,7    | 8,3    | 0,81                               |
| 1             | α-Amylase        | -      | -      | -                                  |
| 2             | β-Amylase        | 6,7    | 8,3    | 0,81                               |
| 3             | β-1,3-Glucanase  | 6,7    | 8,3    | 0,81                               |
| 4             | β-1,4-Glucanase  | -      | -      | -                                  |

**Tabelle 78:** Ergebnisse der Alkali- und Säureanalyse für Paramylon aus *Peranema sp.*

| DC- Ergebnisse |                  |        |        |                                    |
|----------------|------------------|--------|--------|------------------------------------|
| Probe          | Substanz         | a (cm) | b (cm) | Retentionsfaktor (R <sub>f</sub> ) |
| G              | Glucose-Standard | 5,3    | 8,3    | 0,64                               |
| 1              | Säurehydrolyse   | -      | -      | -                                  |
| 2              | Alkalihydrolyse  | 5,3    |        | 0,64                               |

**Tabelle 79:** Bestimmung der photosynthetische Effizienz bei *Euglena gracilis*

| Photosynthetische Effizienz |                |  |                                |
|-----------------------------|----------------|--|--------------------------------|
| F <sub>o</sub>              | F <sub>m</sub> | F <sub>v</sub> (F <sub>m</sub> -F <sub>o</sub> ) | F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub> |
| 454                         | 1297           | 843  | 0,649                          |
| 292                         | 950            | 658  | 0,692                          |
| 295                         | 885            | 590  | 0,666                          |

**Tabelle 80:** PCR-Ergebnisse für die Sequenzen aus GSL1 (1)

|         |  |
|---------|--|
| >EgA1.1 | GGACGCGCGCCTGCTGGCAGTGCTCCCCGAAGTCCGCCCACGCCTCCGGGTGCTC<br>TGGCGAGTCCCACGCCTGGTCTAGCGGGTCGAACTCCGGCAACGCAGAGGAGAGG<br>TACTGCCAGATCAC   |
| >DiA1.1 | GGACGCGCGCCTGCTGGCAGTGCTCCCCGAAGTCCGCCCACGCCTCCGGGTGTTT<br>CGGCGAGTCCCACGCCTGGTCCAGCGGGTCAAACCTCCGGCAACGCAGAGGAGAGG<br>TACTGCCAGATAGACGT   |
| >KhA1.1 | ACGCGCGCCTGCTGGCAGTAGCTCCCCGAAGTCCGCCCACGCCTCCGGGTGCTCC<br>GGCGAGTCCCACGCCTGGTCCAGTGGGTCAAACCTCCGGCAACGCAGAGGAGAGGT<br>ACTGCCAGATAAACTGTC  |
| >PeA1.1 | GCATGTGCTTCCCCGAAATCCGCCCACGCCTCCGGGTGTTTCTGGCGAGTCCCACGC<br>CTGGTCTAGTGGGTCAAACCTCCGGCAACGCAGAGGAGAGGTAAGTACTGCCAGTGTGAG  |
| >EgA1.5 | GCATGGTCCCGCCGATCACGCGTCCGCCGCGCCTTTCCGGCGCTTGCCACCTTGGC<br>CTGCTTGTCCCGGCTGTAGGCGTCCCCGACCCGTACACTGTCCCAGTCCCCGAAGC<br>GGGCGAGGATGAGCTGCAGCTTCATGCCCTCGGAGTAGTACACCTCAGGG   |
| >DiA1.5 | TAGGCGTCCCGACCCGTACACTGTCCCAGTCCCCGAAGCGGGGCAGGATGAGCTG<br>CAGCTTCATGCCCTCGGAGTAGTACA  |
| >EgD1.2 | GCCCTAGGACAGGCGTGGGACTCGCCAGAACACCCGGAGGCGTGGGCGGACTTCG<br>GGGAGCACTGCCAACAGGTGCGCGTCTGCTGAAGTACCTGCTGACGCTGGTGGAC<br>AAGAACAGTATCAACTTCGCGGATGTT  |
| >DiD1.2 | GGAACCAGGCGTGGGAATCGCCGGAACCCCGGGAGGCGTGGGCGGACTTCCGGGA<br>GCACTGCCAAGCAAGGCGCGCGCCTGCTGAAGTACCTGCTGACGCTGGTGGACAA<br>GAACAGTATCAACTTCGCGAG  |
| >KhD1.2 | ATCGCCGGAACAACCCGGAGGTGTGGGCGGATTTCCGGGAGCACTGCCAGCAGGC<br>GCGCGTCTGCTGAAGTACCTGCTGACGCTGGTGGACAAGAACAGTATCAACTTTCCG<br>CGGAAGAACAGTATCAACTTCGCGGAACGG   |
| >PeD1.2 | AGGGCTGATGACCCTAGGAACAGGCGTGGGACTCGCCGGAGCCCCGGAGGCGTGG<br>GCGGACTTCCGGGAGCACTGCCAAGCAGGTGCGCGTCTGCTGAAGTACCTGCTG<br>ACGCTGGTGGACAAGAACAGTATCAACTTCGCGGTCAA  |
| >Eg5821 | ACTCCGAAGGGATGAAGCTGCAGCTCATCCTGCCCGCTTCGGGGACTGGGACAGT<br>CTACGGGTCCGGGACGCCTACAGCCGGGACAAGCAGGCCAAGGTGGGCAAGCGCC<br>GAAAGGCGCGCGGGACGCGTTGATTGGCGGGACCAGTGCGCCATCCTGGGCTT<br>CAAGGAGCACATCTTTACGTACCGGGCAGTCGGTGAAAC |
| >Di5821 | ACTCCGAAGGGGCATGAAGCTGCAGCTCATCCTGCCCGCTTCGGGGACTGGGACA<br>GTCTACGGGTCCGGGACGCCTACAGCCGGGACAAGCAGGCCAAGGAGGGCAAGCG<br>CCGAAAGGCGCGCGGGACGCGTTGATTGGCGGGACCAGTGCGCCATCCTGGGC<br>TTCAAGGAGCACTATCTTTACGTACCGGGCA         |
| >Pe5821 | GACTGGGACAGCCTGCGGGTCCGGGACGCCTACGGCCGGGACAAGCAGGCCAAGG<br>TGGGCAAGCGCCGAAAGGCGCGGGACGCG   |

**Tabelle 81:** PCR-Ergebnisse für die Sequenzen aus GSL1 (2)

|           |  |
|-----------|--|
| >Eg6481.1 | ACGTA CTTC CGGCAGGCGAACCTCGGGGAGGTGGATGAGCGGCAGAAGTTTGTGC<br>AGGAGTGGGAGAAGGCCGGCGAAGGGCGGCGGCCAGCAGCGCAGCCTGCAGACGT<br>ACCTCGTGACGCAGTGGTGGCTGTTCTGTGCGACCTCCATGACGCGTACAACGAC<br>CATGCCACCGACGAGGTTTTCAAGTCGTTCTGTGGGACTGGCTGATGAGCTCCCC<br>CGGCTATGGTTTGGATTATGAGCAGGTGGACGCGACGTGAAAAATA |
| >Di6481.1 | ATACCTTTACTGTTGTGGCCCTCATCGCTGCCATCTCGTACATCATCGCCCCGTGC<br>TGTACAACCCAAAGCCACCTGGCGCTCCCTCTGATCGCCCCGAGGATCTCTGG<br>GACTGGCTGACGGCCAGGACGACACGTTGACCGTGGAAGACTACCGCATCATAA<br>GAGGGGGGT   |
| >Eg7081   | TCCACAGGACGACTTGAAAACCTCGTCGGTGGCATGGTCGTTGTACGCGTCATCGA<br>GGTGCACAGGAACAGCCACCACTGCGTCACGAGGTACGTCTGCAGGCTGCGCTG<br>CTGGCCGCCACCCTTCGCCGCTTCTCCCACTCCTGCACAACTTCTGCCGCTCAT<br>CCACCTCCCCGAGGTTGCTGCGGGAAGATCTTAG   |
| >Di7081   | TACAGGAAACGACTTAGAAAACCTCATCGGTGGCATGGTCGTTGTACGCGTCATCG<br>AGGTGCGCACAGGTAACAGCCACCACTGCGTCACGAGGTACGTCTGCAGGCTGCGC<br>TGCTGGCCGCCACCCTTCGCCGCTTCTCCCACTCCTGCACAACTTCTGCCGCTC<br>ATCCACCTCCCCGAGGTTACCTGC   |
| >Eg7561   | GACACCGTCTCCCCCTACAACCTACACCCACTCCATCCCCCTCTCGGCGCTGGTGAT<br>CGTGGCGTTGCGGGTGTCTACAACTGATGCTGCTGCTCATCCCGCCAACCCAC<br>TGCCCGCGTGGCGGTGCGCTGCACGGCGCTGCTGGCGTTGCGGGTGCTGTTCT<br>CATGGTGCTGTTGAAACCTCA   |
| >Di7561   | TTACACCATCTCCCCCTACGACTACACCCACTCCATCCCCCTCTCAGCGCTGGTGAT<br>CGTGGCGTTGCGACGTGTTCTACCAGCTGATGCTGCTGCTCATCCCGGCCAACCCA<br>CTGGCCGCCGTGGCGGTGCGCTGCACGGCGCTGCTGGCGTTGCGGGTGCTGTTCC<br>TCATGGTGCTGTTGAAATGGCCGGCATGTTCTCATGGTGCTGTTGCA  |
| >EgGSHEg2 | ATGCTTCCATAACGGGTGGGCAGTCGGCCGTCGTGGCCCTTAAAGATGGGGTTGT<br>AGTTGACGCCCCGCACGATGTACGGCTGGCCGTCCACGTAGAGTTGCTTCCCCCG<br>GAGCTCCACCTTGGACGGATCGTCCTGATCCTGGAGGGTGACGAAGACCATGACAA<br>CCGGCGAACACGAAGA   |
| >DiGSHEg2 | GGCAACTCCCAATACGGTGGGCAGTCGGCCGTCGTGGCCCTTAAAGATGGGGTTG<br>TAGTTGACGCCCCGCACGATGTACGGCTGGCCGTCCACGTAGAGTTGCTTCCCCCG<br>GAGCTCCACCTTGGACGGATCGTCCTGATCCTGGAGGGTGACGAAGACCATGACAA<br>CCGGCGAACACGAACTTACCCGCCGGCGTTGGGGTTGGGGAGATT   |
| >KhGSHEg2 | GGAATAACGGTGGGCAGTCGGCCGTCGTGGCCCTTAAAGATGGGGTTGTAGTTGA<br>CGCCCCGCACGATGTACGGCTGGCCGTCCACGTAGAGTTGCTTCCCCCGGAGCTC<br>CACCTTGGACGGATCGTCCTGATCCTGGAGGGTGACGAAGACCATGACAACCGCGA<br>ACACGAAGAC   |
| >PeGSHEg2 | TTCCATAACGGTGGGCAGTCGGCCGTCGTGGCCCTTAAAGATGGGGTTGTAGTTG<br>ACGCCCCGCACGATGTACGGCTGGCCGTCCACGTAGAGTTGCTTCCCCCGGAGCT<br>CCACCTTGGACGGATCGTCCTGATCCTGGAGGGTGACGAAGACCATGACAACCGC<br>GAACACGAACG   |

**Tabelle 82:** PCR-Ergebnisse für die Sequenzen aus GSL2 (1)

|          |   |
|----------|---|
| >EgA2.1  | CACCCCATCCTTTTGGGGCGTGCCTTGCTGCCGCCAGACGTAAGTAAGCCCT<br>CCATCAAGCTCAGGACACCC  |
| >KhA2.1  | CTTGCTGCCGCCAGACGTAGTAGCCCTCCATCAGCTTCAGGTACACCACGCGG<br>ATGCATCGGTCCACAACCTCCTCAAAT  |
| >PeA2.1  | CAGCATGTGATCACCGCTGGATGGTTCAGGATGACCGATGCCAGGGGCCACCA<br>CCCCATCCTTTTGGGGCGTGCCTTGCTGCCGCCAGACGTAGTAGCCCTCCATC<br>AGCTTCAGGTACACCACGCGGATGCATCGGTCCACAACCTCCTCAAATGTCAG<br>GTTTGGAGTTGA |
| >EgA2.3  | ACTCCACAGCAGCACATGAATATTCCTCTTCACCTCGTCTGCCGCAGCACCTCT<br>CATAAAAAGCAAATACTGGTTGGTGAAGTGGTAGATCTGGAACACCTTCTCGGG<br>GCAGTGGTTGATGGTGCCTGAATACTGTCCAGCA                                  |
| >DisA2.3 | CACTCCACAGCAGCACATGAATATTCCTGCTTACACCTCGTCTGCCGCAGCACCC<br>TCTCATAAAAAGCAAATACTGGTTGGTGAAGTGGTAGATCTGGAACACCTTCTC<br>GGGGCAGTGGTTGATGGTGCCTGAATACTGTCAATGCATTTT                         |
| >KhA2.3  | CTACAACAGCAGCACATGAATATTCCTCTTCACCTCGTCTGCCGCAGCACCTCT<br>CATAAAAAGCAAATACTAGGTTGGTGAAGTGGTAGATCTGGAACACCTTCTCGG<br>GGCAGTGGTTGATGGTGCCTGAATACAGTCA                                     |
| >PeA2.3  | TGCTCACACCTCGTCTGCCGCAGCACCTCTCATAAAAAGCAAATACTGGTTGGT<br>GAAGTGGTAGATCTGGAACACCTTCTCGGGGCAGTGGTTGATGGTGCCTGAAT<br>ACTGTCAGATGGA  |
| >Eg1888  | ATGATATTCCTCTTCACCTCGTCTGCCGCAGCACCTCTCATAAAAAGCAAATACT<br>GGTTGGTGAAGTGGTAGATCTGGAACACCTTCTCGGGGCAGTGGTTGATGGTG<br>CCTGAATACTGTCCG   |
| >Dis1888 | AAGTCATTCACCTCGTCTGCCGCAGCACCTCTCATAAAAAGCAAATACTGGTTG<br>GTGAAGTGGTAGATCTGGAACACCTTCTCGGGGCAGTGGTTGATGGTGCCTAG<br>AATACTGTCAA  |

**Tabelle 83:** PCR-Ergebnisse für die Sequenzen aus GSL2 (2)

|         |   |
|---------|---|
| >Eg361  | TCTTCTTTTGACCTTGGGTGCCGTGGGTCCCGACGGTGTCTCGTGTACCGCGATCTGT<br>CAAATGCACAAACAAGGCGGGCAGTGGTCTCAGACTGGGCCACCCTCATTGATCAGTAT<br>TGGCGGCACCCAGCTGTCATGGGATGGTTAATTGGCAATGAACTTGACATCCCATTGG<br>ACCTCAAATGAATGAGCTTTTCTCCCTCGCCAACCTTGATGGATTGATGTAGAG |
| >Di361  | GTTAAGTATGCCGTGGGTCCCGACGGTGTCTCGTGTACCGCGATCTGTCAAATGCACA<br>AACAAGGCGGGCAGTGGTCTCAGACTGGGCCACCCTCATTGATCAGTATTGGCGGCAC<br>CCAGCTGTCATGGGATGGTTAATTGGCAATGAACTTGACATCCCATTGGACCTCAAAT<br>GAATGAGCTTTTCTCCCTCGCCAACCTTGATGATTGATGTAAGG            |
| >Kh361  | AAAGTTAGGGTGCCGTGGGTCCCGACGGTGTCTCGTGTACCGCGATCTGTCAAATGC<br>ACAAACAAGGCGGGCAGTGGTCTCAGACTGGGGCACCCTCATTGATCAGTATTGGCGG<br>CACCCAGCTGTCATGGGATGGTTAATTGGCAATGAACTTGACATCCCATTGGACCTCA<br>AATGAATGAGCTTTTCTCCCTCGCCAACCTTGATGATTGATGTA             |
| >Eg3541 | TCATGCCAAGCACAACCAGATGGTATTGTGGAAGTGGTTCGTCAATTCGCTGTACAATG<br>AGTGGCTGATCGACTCCGTGGAGCGGGACCAGCTGAAGATCACGTTCCGCCCACTGGA<br>CAAGCACGAGACAGCGAAGTGGGAGCTGGACGAGGTGGAAGTAACG   |
| >Di3541 | ACCACTCCTCTTGTCTCTATGCCAAGCACAACCAGATGGGTATTGTGGGAAGTGGTTCCG<br>TCAATTCGCTGTACAATGAGTGGCTGATCGACGCCGTGGAGCGGGACCAGCTGAAGAT<br>CACGTTCCGCCCACTGGACAAGCACGAGACAGCGAAGTGGGAGCTGGACGAGGTGGA<br>GAACGGCATCAAGTACTCCCACA                                |
| >Kh3541 | CGGACTCTATGCCAAGCACAACCAGATGGTATTGTGGAAGTGGTTCGTCAATTCGCTGT<br>ACAATGAGTGGCTGATCGACTCCGTGGAGCGGGACCAGCTGAAGATCACGTTCCGCC<br>GCTGGACAAGCACGAGACAGCGAAGTGGGAGCTGGACGAGGTGGAGAACGGCATCAA<br>GTACTCCAATTCCCATTGAGGGTG                                 |
| >Eg6109 | GATGAATGGGGCAGGTAGGTGTCCAACACCGCGAAGAACACCACGAGCAGGGCGAAC<br>GGCGCGGCGAACACAGCGAGTAGGTGAAGGAGGGGCAGGCCAGTACGCCCAGAAC<br>AGCCACGGCGCGTAAGACAGGAACCCAAGGATGGATTGAG  |
| >Di6109 | GAGAGCAGGTAGGTGTCCAACACCGCGAAGAACACCACGAGCAGGGCGAACGGCGCG<br>GCGAACACAGCGAGTAGGTGAAGGAGGGGCAGGCCAGTACGCCCAGAACAGCCAC<br>GGCGCGTAAGACAGGAACCCAAGGATGGATTAATAGA   |
| >Kh6109 | ACGGGAGCAGGTAGGTGTCCAACACCGCGAAGAACACCACGAGCAGGGCGAACGGCG<br>CGGCGAACACAGCGAGTAGGTGAAGGAGGGGCAGGCCAGTACGCCCAGAACAGCC<br>ACGGCGCGTAAGACAGGAACCCAAGGATGGATTA  |

**Tabelle 84:** Sequenzen für Zielgene und Referenzgen

|               |   |
|---------------|---|
| EF1alphaFor   | CTTGCCACATTGCGTGCAAGTTCGCAACGATTCAAACAAAGATTGACAGGCGGTCT<br>GGAAAGGAATTGGAGGCAGAGCCCAAATTCATCAAGTCAGGTGATGCTGCGATTG<br>TCCTGATGAAAGA  |
| EF1alphaRev   | GATGAGGCTCTGCCTCCATTCTTTCCAGACCGCCTGTCAATCTTTGTTTGAATCG<br>TTGCGAACTTGCACGCAATGTGGCAAGTGTGGCAATCCAACACAGGTGCGTACCC<br>GTTCCAATCTGTA   |
| Pars2_1888rev | ATGATATTCCTCTTCACCTCGTCTGCCGCAGCACCTCTCATAAAAAGCAAATACTG<br>GTTGGTGAAGTGGTAGATCTGGAACACCTTCTCGGGGCAGTGGTTGATGGTGCCT<br>GAATACTGTCCG   |
| ParsD4rev     | GAACGATCCGTCCAAGTGGGAGCTCCGGGGGAAGCAACTCTACGTGGACGGCC<br>AGCCGTACATCGTGGGGGCGTCAACTACAACCCCATCTTTAAGGGCCACGACGG<br>CCGACTGCCACCGTATGGGGAGTACTTCGGCAGGGACTACTCGGGAGTCCTCTAT<br>GGC |

```
>TRINITY_DN2788_c0_g1_i10.p1      type:5prime_partial      len:1518
gc:universal TRINITY_DN2788_c0_g1_i10:1-4554(+)
KKFLSENSSQKESKLLSWMYQWKYDPPPKHDFLLKDSTVHGEHTKAESFSLKLRDRTKLRQRNDL
DYVVKMRVRLWASNRCQTLRLTVHGQCEMREAMIDLAINIETMLPSPQREMVFDDIHPDSSSSV
EEVYLWLCRKSFGSDAPLAWQFAFQENGINWTRWKQIKDNSNVWRHLCSPKVHSQINELNEPQDTE
VIRVQTPEGFIAYICNNVSEELLTEVVKEKAKELTRKVRKLTEAQLHERKTRSNALLSANALSLPP
PEDSVTSTSSQGTQREKIEALEKEIENLKLDLGPFFTKVSLADVMKQAEIDGKLLSIHDQADVHF
VVKNEFWSSKLSLENLKETYGILQNFISDTQLKSIPFRDVQOKIILSNLSWESKLLFDWLERYCGNG
ATVLVWQMMYTQIRDEVEGKRTDGVKILQQFRAVARYSNEDILGYCIRMKDNLDTNEGQNLKEA
KHYYKFLGNIITEEYMIEMEWIIRLVEIAQSLEWTINVEKKAKWLAGIKFQILIAAQAYYVDSPT
RQACDELRLKLAKYNCVEYMAPLDRPDIQSYESVYFRNIDPEKLISTITTKPSTCVPTIHSTTPKP
GMNSGFSSSIMITTTPLGGGGMPRNRNSASIHGERQSGKCAMAGCQGDFWDFETRVRGMVEVRAEK
SEDSRVCEFILKSGEDTYDCHESFAKGLKLTQVVKESNGSRDLMTSAVISSFSMSGDLDAKWKTC
FVEVDSLKLLPTVRFVSMKKNAEFFFFFFLWTLISRVNKDNMRGFTLKRKAKVLEMTRYRLVYQPS
TVVIRTCTLHPNCMKCSACFQPIISAQNDRYILTEEKDSHGGFRYLPYHYMCLHTRRVNKGEIRLLR
QAPLIMGEPKSENQNNMLPCAAGQIINIMDMNQDAYYGEGLKPLIIFTFFKRPTEHEEFHILGFRE
HIFTNTHSAIGRYMAIAEFSFVTLIQRFLAKLHNVRLHYGHPDMVNGYFVKQTAGVSRGCKRVNVN
EDVFLGYDMLLMDKGITFLEYLTYGKGREVDFEGASVFLKLAAGAVMQLRTRQVYHLYTSEISLI
TKWALYYGSLAHYINSYLMHTVFLLSYTFVVLSDGIGISILYLNASSLAMPWLIQIGFFNIVPM
LAEMNLEHSYVRFSDLILSLPFFSHQLRITASFFGTTVQGTASYMGTKRIGIGNEYVPMKQLLAHH
FFTNLIPGLKLLTLVVFYLDGGGLSLMVWVIFVAAFSYLCSVPFYNPFPPTFDRWMEELGVFGQFLS
YSAIELPPALSGFRKHVKEDGSLPRVAHFWTKSWLEHLENTTVANSMAAAVECLFSEISYVVVVTY
IFWYLLAAFMLFLNSDQETEMRREPHRFYDIYLVVNTMIAYLVNVLSVKHSSTGNKITRGVRLT
FIPVAYIIMFVALITNDTGMFGRKLVILVAYYFYTGIFFASTNGLI IALANFSLRCRITDPKLLTE
KQYRLIRWMAIHFPGGVLPYKTMVASFFFFSFTHLLAGIAVNIHTTFLFNERVAKRARETISRK
```

>TRINITY\_DN872\_c0\_g1\_i22.p1 type:complete len:2274 gc:universal  
TRINITY\_DN872\_c0\_g1\_i22:8115-1294 (-)  
MVPMADETDLLQQIQTYNYAAHDVWGVNAYRGTFTFGTLFTDYTSNKPLLISEFGMDAYDDVITSP  
AMASAFDIDANNSQVGEEQQNQAVVQLARLVEAQNSHTTAGASCIGGLVFEYTDDEWVKGVSTDAFH  
QNCFLDNASIQSTCGYTSTGAAPDNRLNEELFGLLRVSYPARYLMQLTPRPAYTSL SAYWQPLGLG  
ASSAGNASAVNASRRVARIITLPPQPYQAIFFPTTFTSFEEGYLWICIPVGMVLFGLLPWLWVG  
RDARQRRRTRKNGGTMLPVVQPTAANQAEAEQCQVRFLEGPDTGHYTLQAGFVERLAQFYWISLSP  
GTYEDHVLHTHVLPVLRWKDQREGPTPLPHLAERLEWDVRFSDRVGPLSAFLHQYKDQLTLDTET  
LQIHLKGDAGSSSGAPSMVDGTGAQFIAQCYMRHVRQQLSRAARDRNLALKWNTAEGYESAFKCFD  
GEDMDKAAKRLHLHICPAEPKESHWEPALTVGSAPGYLTYVVYTVLFLAVQQYAENLRQAAHFKK  
RIWQYLSSALPEFDPLDQAWDSPEHPGAWADDFGEHCQQARGLLKYLTLVLDKNSINFADVDDIFRN  
TRVPSAGGPQRIIPMYTAPKRRVHVWAMP SRWLPPLRDLPDFPSRSHGTVVEGSVEPKGKEGLAS  
IYEKTYGETVQLITVLRLEFFVHGHVLMYVLCLLLNVNLALDHSWVLCAL EIGLVLLKTAQQLI  
LFEPHFSQPLLDTVELGLVGMGAMLWDAVRYHAVWGDRFSTLFGRAELNYIFLGVLFGISAVRE  
TLRIIWKVQTFHTRVHFARMVLLFIMAGSFAIAYFLLLPAVASLGTELCKCNVNASGCDVWDPN  
VLCYPALFLHFVMLLSMMFTAAGWMTMVS LVWGLFRGVGKSVGVVRQWPLVQPAMDTLHGDMVMY  
CPTSLHQVGQDQEV LGQNMGLLALQHWVHLWRRDLVSEQVLQDAFRWKFTHQPPSGDAVALTYNHL  
NGHHTLYAYVNLQGSHGADRTRKRI PVTMQSIFGMRAITFFIPVYAETVAYTWDNLKADSTLDHL  
TDLYHEEWLHFCERVFYGA KPDAVRTAFLAKDGS LGKLF LTARAPHVQSVWDRIRAWPPGPKNSKW  
PAHPADYKMH LRF RYFPQDPPPTIPPELDLSANA AKTLEEHKDLVGDVECWAQQQVRWWATLRGQT  
LGRTVYGLMEMREALVDLTFLELKAIYGH TFLDLDYHNPDRSTYDDILAWLQRLRYQLFNWGTA  
RKQRLTGQYRWHS LFGDDVMTASLDKEEILT VVVCGELAMGCFLELCME PQSYGAAASLSPYELLV  
SRAAEGEFLLVKLMTAKVLAHAHALDGLVGS HSRFMFSEALRSFGGGLES LVVANELRAMAEQIVA  
DKFQVLVGAQVYEQQKATYAEINECLSLWKL RHLQFMTAKDDKLRPASYWLRRRDVFSSHKLHSHH  
FFKPQGGVYVFD SKRLAEFAFKTELRRVWHRLKIGEGKAENQNNMINALLGEVVNILD MNQDAYYS  
EGMKLQLILPRFGDADSLRVGDAYGRDKRAKEGKRRKARRDALIGGDQCAILGFKEHIFTYRHSVV  
GRYMALAEHAFGTIVQRFLHYPHHIRMHYGHPDMTNAHLVRRRTGGVSRGAPGVNVNEDI FLAYEML  
SQGLDIEFSESFFYGKGRDVEFNAASVFIKKLAQGCVMQLASRQVCDLYLTHLTI FQKLALFYGTL  
NHFFILYVSDRAVVIYTAMWVLFQVAEVS PNVIASHSSSAGAPWILPLGVLNALPMLLERGIEYTY  
LSVTDIVFSIPFFSHQNRI TADLFSLALQTKKGAYMASGRGLGSTRTSLVDIFVAHAQTNFLPGFR  
LLLLV I IYCSIGGNILYLLWPLIAAISYIIAPVLYNPKPTWRSLLMASSDLVDWLTAQDDTFELED  
YRI IANSYVPLDAAVKEKIFRQANLGEVDERQK FVQEW EKAAGGGQQRSLQTYLVTQWWLFLCDL  
DDAYNDHATDEVFKSFLWDWLMSSPGYGLDYEQVDAAWKLRGYAVAYGPLREFLAKYCTLGMIVLL  
PNAESPETILRPSQGPDASALHYNWDIRRTVPEAQLLAILAYRAVVYLFWACLPTYVLLQRDTVSP  
YNYTHSIPLSALVIVAFGVFYKLM LLLIPANPLAAVAVRCTALLAFAVLFLMVLF DPLAWAYVIVF  
LLILALIVAYLVEVWIYVNNYLIRRTTQRFINRSFQRLGMLMALRDFPLHSLYAPL FALLGAGLLL  
LHLVLSVQALHTTWVFNRRVALRLLPPE

```
>TRINITY_DN12637_c0_g1_i18.p1      type:5prime_partial      len:2270
gc:universal TRINITY_DN12637_c0_g1_i18:7958-1149(-)
RRSSDLFFFVGHWRVMKVFWLVALIGLLATQVSCRCTGNAIGSTEYRVRGTSIEYRYGGDESWTRI
FIRSMGYSPAPPTFAPSEKPYGDYTTNFRHLHERDLPLIRKMGANALRLWNWNMGTSSVGNHADP
LDLCWNNNSQPLRVFIPFDLGA VGP DGVLVYRDL SNAQTRRAVSDWATLIDQYWRHPAVMGWLI G
NELDIPFGPQMNELFSLANLMIDVARDVTKGKVQLISMP LSELSFLRMVKKYYQVAQDFWAFQTY
DRYTKTP E EYVNATYDKRNP DVALKPLVVTEFGHSSIQVSKDEKGRRIQYSNETMQMEEILKFVVR
LENFTKVVAGYSIMEWVDEWWTAVDFRNPNCNHRADLHTYCAHYVLSGEDLLIAIHEEWLGIWM
QTLPEKFR TETTYCIQPKLAYFALAEAWNGTSFHGEKCARHTFPDPVLFMLGPMIAI AVACELLYVL
FEKVTGKKQVPTTRLLS VRQR P SSKLDLTALAE EDEM GVKEAELLKEAMPRDAMGEFFLVQSRVQ
AAFEPFQPR SAPDGESTDIYQFCIKRITTAVWDNLT SYNPTPNLTFEEVVDRCIRVVYLKLM EGY
VVRQQGTPQKDGVVAPGIGHPEPSSGDAMLQEIALYEIVRQYSGTINH CPEKVFQIYHFTNQYLLF
MRGAAADEVKRN I HVLLLELFRVIFCYIAQKVTLDDINADAMVFHQQP VQLSESDMVTAKDIAAVR
ASLNNNNKVYPALVKQVHTCAAIN EPALSPFSCAFFTWIDPKASKQLTGDEADRASRPQPVGSEKE
PLISRTPPTTKLLYGSESLSGQPNATLVVEEKKPEETAVKIESTFKIPELKRAFTQRGGFPPTLYNT
GWVVRIILWCGVSAWYVQPSYPYTPVCLLDAQAWLALLDVLLQFILELCHWR LFMQR LIGLRHIAS
ACYHLTASVVIYCSFLDYLGV RKWLPTMPRLALLPGSHPM EVNPFVLYLMVEAVRLVFTESVNF SR
THAYVLPGR LGKYSK KFFEGAALGGAVALTASSFFCWQMNISVELVAPSVMI FTLAGALAVGIPLS
KLFGR RERTMREAKFLMHNWFFWGV IWTATFYVFYEFIVPVVIKVRPDTLCTCPDERVALTKELVK
RCKFGSRLLCSTGVVMVWLSVIVINLVWVFACFQLMLLVY GIGRGRDRVGNVKDWGDVQKYFLQI
KLQCLPAISSCLYAKHNQMVLWNWFVNSLYNEWLIDAV ERDQLKITFRPLDKHETAKWELDEVENG
IKYSNPLFLKQPKNEEACRRVIYFLWSLQAI AARERSDENISKDPEQAIWRAANRVLAMP SLTIMT
PCAAEPVIYQTEELISTFHKG EKT T TREPRISTMEYATCTYPDEWENFI AWLKI KLREDPSRGSPE
LLQQNH HQFLQMFLSADPRIMKHSWIVLQFRLWASYHGQTLVRLIRGVM SWRQGLELLATLENAQL
PESSRLSDQQIQQLLATK FQFVICHQVYKTKNAQAQTNDVNTL FNDKALGLHKWDLAYPNDRSRYI
SLLRRWTDETEY AVERPGPLRPNEFPTEPKAENQNHAI PFVNGQVIGVLD MNQTCPMEDSFKVPF
CLAKYFTPPSATLNEPFGSSQLHADSVINPYRVVGYGEWQYTRGLSMVGEVAGQAEFCFTSIHQRV
CRWPLRARLHYGHPDLMDGYWVRTRGGLSHASHMVNTAEDVFAGYEVVGRGERVEYIEWLQVQK GK
ESAMVPAFLFEKKLAQAAAQQMRSRDIYWLNQKASLFLKFLFFGTYGFYIYNTLMAMSIHLYIIA
VFFFMLSGVTNHDLGVNQSSLAVPWL FQVGF LFSFPLIVELSIEKGIMQGLVHFLRTL PFAIVYHL
FQLQTKGAFFIEGLVRGKGGYIASARGFGLDRLSFVDIYTTYASSHIHPGVNLLGWVTLYACYS DQ
SWAEISLRCLFMVMVICWIGGPVLFNPFPSYDALTYDISEMVSWLRNPLPTTKDIAFLLFEEQKR
QDVSGVNRGQNRPEVTTKTLQNWVANQRMKSWMGWYMNEVLLGPWSDEEMWFSTLGLLFQKSILGF
LSYAPWLFWAYWACPSFTYSLWFAAPFALLVVFVAVLDTYLP HLQ EYFNIMKLYVPLFALSSAISF
IVMRKITARDVFFYLLFYF ILYALLTDITISAWNFTAKFRSWFRRTKLQGLGLKTRKRTAQHEDSI
WFDRLATPRFLIDIQKMPVIALVLFTIFQTLVCIGSYTITALLFCPAVARAAERSASKPQAATTA
APPPPLSLADVERLIQERLAEKKEL
```

>TRINITY\_DN3946\_c1\_g2\_i1.p1 type:complete len:2298 gc:universal  
TRINITY\_DN3946\_c1\_g2\_i1:7355-462 (-)  
MVRQFLQSFSSAFINVFLFWAVTFCFLVTRSEGRCTGGVAVPTRYRVFTEHFIEIYPPGTGFKRYF  
VKSVGYSAPPTFTQSERPYGDFYTDTRYGYLYNTDLQIIRDMGANTVRLWWTWNYMGSRVEHHSDFL  
DACWNNNEQPLRVFIPFNMGAVGPDGRLLYSLELDGDTRRNALS DWATLVEQYWRHPAIFGWFIGN  
ELDVTFAAQLDALFSLANLMIQVGKEITQGQIQPVTMPLTEGAFTRCVGKIFYAYSNLSFWAIQSYD  
KWTTPKEYMNHTIMKVAQLKPLVFTEFGHSNIFVGTDKQGI PFNRINDTYQATEVMDFINHLEKY  
PVVAGYSVMEYVDEWVKTAVDFRNPECPNRRTDIHTACATYIYRPDGOI IAIHEAWLGFFTQSLPQ  
KFRSYTTYCIKPKALYFALAKYWKGAANEDICRVHXYADPVLFMFVPMMTAVAVELLYFMYRL  
FKRGKSIDKLPKLDLQNPDSQLDLTAQEDAEMGAVDAELNASNGIVLAKGILRDVLEQYVDIRD  
RITAAFEFPQPRTVDETQPANLYQFLIRQLTNAVVDHVTSLDYTHQYTS SPSTAHTDPPEAFDEVM  
DRAIRMVYLKHMEGFYIWRQKGPETS RHVKCPGVGHPEPETADEMLSELALYTI VWMFAGTITHC  
PEKIMEVYHFTTQYLLAVRGSTLENTNRNIHFLLRDVFVIFCYITQKINLDDINSSAAICKADER  
QLPFQAGQQPMDRQFDY PNPTDEQRLKESFNLPTYKQILRQIEKYQVVADPPLSGFTCAYLAFVDP  
RAARPLSEPTARAKQTLWAASQDAASSIAGTPI SRLLYGSITAAAGGPSASSGSFAGKPAKETDSSL  
AGMDGQGPQGOTGFFIPDL PRAFTQ RGGFP TTFYNCGWI IRLILWVGISAWYFQPAYPYTPVCLPDA  
LAWLALLDSSLRLILEICHWRLLFFMQLLTFQHFA SAIYRTSASFLIYIAFLEYQGYHKFLPQLPML  
PPVMIHNQVSGDLEMKLDFFTCYLAIEAYKAVIRESSH FARAHAYTLPGR LFKQHKKFFTGA AFGG  
SVGFISSSIACWIAGIGGEYALPIVIAS TLLVAIVVAVPMSKMF GWKENTIREVRYLVHNTLFWLT  
IWGSAFFVYEWIVPVVIKVRPDTLQCQCPDEQIALTEHLRKRCKFGSRL LCTAAVIMVWLSVIVIN  
FVWVFACFQLMLLVYGVGRGKRDRVGNVKTWRDVQHYFSNIKTTCFPAISTCLH SKHNQMV LWNHI  
VKFMYNEWLLEDEKEYEQLKITCRKLEKNETVKWDLDEVEKGIKYSNPLFLIPPKNEEAQRRIIYFL  
WSLQAIASRERVDAREEGSTQTFKDLNYR KANRVVSMPSLTILTPCAAEPVLYTVDDLISTYHRG  
DALSTRNPRITAI EYVQCIYADEWENFVNWIKKQIQESPGKADASLLAQSHHQWLRMFMDDEDPRVM  
ENEWLVFHIRLYSSHGQTLVRLIRGIMSWRSGLEILAGMENKELPESCQLSEEQVQQLVVSQKFQF  
IICHQVFGQKSCMQQTNDMLALFKKELGLYKFDMVYPDDSQRF TSIIRSWRDETNYWYPRCGPLR  
PNDPFPTEPKAENQNHALPFVQGVFCVLDMNQTGTMEEAIKIPFL LTRYFTPKVQVLTQPFSSAD  
LRAQDVINRYRVVGYAEWQYTRGLSVVGEVAGQAEYCFTTIIHQRVCRWPLRARLHYGHPDFVDGYW  
VRTRGGLSHASHLVNTAEDVFLGYEIVGRGERIEYVEW IQAQKGKESAIGPAFLFEKKLAQAAAQQ  
MRSRDIYYINKGGNIFLKLGCFFGT YGFFIYNTLMALS IHLYIMAI VFFALS GVT DHD LGVNQSSL  
AVPWL FQVGFLFSFPLIVETSIEK GIMQGV LHF IKS LPFAL IYHMFQLQTKCAFFIEGLVRGKGGY  
IASLRGFGLDRLTFVEIYITYASSHIHPSLNLFSWVVLFTTYSQLTFAEIFLRCLFMFLVFCWIG  
APIIYNPFP TMEHLIQDIHEMLEWLSTPLPETKDIAFMLFEEHKR KDV TQRDKKGGSM PDVSTKTL  
QQWVANQRNYSWMSWYMNEVLLG PWSDEEMWFSTIVLIMQKGT LGFMSYTPWLLFSFWACPSLQDS  
MWFSVPLFLGVIFFGILNYCLPHLHDIFNILKMYIPGA AFASAIYFITSWKISVKDIFFNVLFYII  
LWAMFVDICISSWNFTSKFRNWWKRSTFTMRGFVTRPRTAQHNDSLWYDRLVLP RFLFDIQKVYPI  
AALCVFTLLNAMLCLGNTTLTALTYSPAVANAWKRAAAR PQVPKKERGPVVNL

**DANKSAGUNG**

Zuerst möchte ich mich besonders bei Frau Prof. Dr. Angelika Preisfeld für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Bereitstellung dieses interessanten Projektes, die persönliche und wissenschaftliche Unterstützung, Betreuung dieser Arbeit sowie die freundlichen und hilfreichen Besprechungen bedanken.

Vertr. Prof. Dr. Gregor Christa danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit und seine Unterstützung bei der Auswertung der Transkriptome sowie seine wertvollen Tipps.

Herrn Prof. Martin Simon danke ich dafür, dass ich die Geräte in seinem Labor mitbenutzen durfte.

Vielen Dank ebenfalls an Frau Prof. Dr. Julia Bornhorst und Herrn Prof. Dr. Nils Helge Schebb dafür, dass ich den Plattenreader und das Rührwerk (Potter) benutzen durfte. Außerdem möchte ich mich bei den Mitgliedern der AG Schebb und AG Bornhorst bedanken.

Ein großes Danke schön auch an Sabine Stratmann-Lettner für ihre Hilfsbereitschaft, ihre Unterstützung und Einarbeitung sowie ihre hilfreichen Anmerkungen und Anregungen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Jenny Melo für die angenehme Zusammenarbeit und ihre ermutigenden Worte.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Bürokollegin Aida Mesanovic-Voigt für die angenehme Zeit.

Bei Laura Czempik und Wiebke Mieke möchte ich mich für die Unterstützung bei den qPCR-Versuchen bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Zoologie und Biologiedidaktik“ für ihre freundliche Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern Kenan Baltaci und Şükran Cazdan Baltaci, weil sie mich auf meinem Weg stets unterstützt und großes Interesse an meiner Arbeit gezeigt haben.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Nadine Schröder und Michael Johannes Finken für ihre Geduld, Unterstützung und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich

1. die von mir eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe,
2. nur die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche unter Angabe der Quelle gekennzeichnet habe,
3. die Dissertation weder in der vorliegenden noch in ähnlicher Form bei anderen Hochschulen oder wissenschaftlichen Instituten vorgelegt habe und
4. bislang keine Promotionsversuche unternommen habe.

Ich bin damit einverstanden, dass meine Dissertation wissenschaftlich interessierten Personen oder Institutionen zur Einsichtnahme zur Verfügung gestellt werden kann.

Wuppertal,

---

Onur Baltaci