



HEINRICH HEINE  
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Der Zusammenhang zwischen Proteinen mit  
geladenen repetitiven Motiven,  
Intermediärfilamenten und dem Zytoskelett von  
*Tetrahymena thermophila*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Houda El-Haddad  
aus Nettetal

Düsseldorf, Mai 2013

aus dem Institut für Molekulare Evolution  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. William Martin  
Korreferent: Prof. Dr. Laura Rose

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 2013

### **Publikation:**

**Houda El-Haddad**, Jude Przyborski, Lesleigh Kraft, Geoff McFadden, Ross Waller, Sven B. Gould (2013). Characterization of *TtALV2*, an essential charged repeat motif protein of the *Tetrahymena thermophila* membrane skeleton. *Eukaryotic Cell*. In Press.

### **Tagungsbeiträge:**

**Houda El-Haddad**, William Martin and Sven B. Gould (2011). Characterisation of protozoan cytoskeleton proteins with conserved repeat motifs. Asian Congress Of Protistology, Jeju, Süd-Korea. Posterpräsentation.

**Houda El-Haddad**, Jude Przyborski, Jörn Habicht, William Martin and Sven B. Gould (2012). Characterisation of protozoan cytoskeleton proteins with charged repeat motifs. German Society for Cell Biology, Dresden, Deutschland. Posterpräsentation.

**Houda El-Haddad**, Jude Przyborski, William Martin and Sven B. Gould (2012). Characterisation of the charged repeat motifs of alveolin proteins. Protist, Oslo, Norwegen. Posterpräsentation.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>3. EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
3.1. Das eukaryotische Zytoskelett	4
3.2. Taxonomie der Alveolata	7
3.3. Morphologische Charakteristika der Alveolata	8
3.4. Der nukleäre Kerndimorphismus der Ciliophora	11
3.5. <i>Tetrahymena thermophila</i>	13
3.6. Zytoskelett-Organisation in <i>Tetrahymena</i>	16
3.7. Alveoline und Proteine mit geladenen, repetitiven Motiven	18
3.8. Ziele dieser Dissertation	20
<b>4. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
<b>4.1. Material</b>	<b>22</b>
4.1.1. Medien und Chemikalien	22
4.1.2. Antibiotika	22
4.1.3. Antikörper	22
4.1.4. Enzyme	23
4.1.5. Kits	23
4.1.6. Geräte	24
4.1.7. Kulturen	24
4.1.7.1. <i>Tetrahymena thermophila</i>	24
4.1.7.2. Humane, epitheliale Vaginalzellen	24
4.1.7.3. <i>Escherichia coli</i>	24

<b>4.2 Methoden</b>	<b>25</b>
4.2.1. Anzucht von <i>Tetrahymena thermophila</i>	25
4.2.2. Isolierung genomischer DNA aus <i>T. thermophila</i>	25
4.2.3. Isolierung von RNA aus <i>T. thermophila</i> , cDNA Synthese und quantitative Echtzeit-PCR	25
4.2.4. Transfektion von <i>T. thermophila</i>	26
4.2.5. Markierung von <i>T. thermophila</i> -Genen	28
4.2.6. Gendelektion in <i>T. thermophila</i> (Knock-Out)	29
4.2.7. Herunter-Regulierung eines Gens in <i>T. thermophila</i> (Knock-Down)	32
4.2.8. Protein-Isolierung aus <i>T. thermophila</i>	32
4.2.9. Proteomische Methoden	33
4.2.9.1. Elektrophoretische Trennung von Proteinen (SDS-PAGE)	33
4.2.9.2. Western Blot	33
4.2.9.3. Immunodetektion	34
4.2.9.4. Immunfluoreszenz-Mikroskopie	35
4.2.10. Dauerkulturen von <i>T. thermophila</i>	36
4.2.11. Anzucht von humanen, epithelialen Vaginalzellen ( <i>vaginal epithelial cells</i> ; VECs)	37
4.2.12. Transfektion von VECs	37
4.2.13. Dauerkulturen von VECs	38
4.2.14. Klonierung	39
4.2.14.1. Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	39
4.2.14.2. Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
4.2.14.3. Elution von DNA aus Agarose-Gelen	40
4.2.14.4. Klonierung von PCR-Produkten in den pJet1.2 Vektor	40
4.2.14.5. Plasmidpräparation, Sequenzierung, Restriktion	41
4.2.14.6. Klonierung eines PCR-Produkts in den Zielvektor	41
4.2.15. Bioinformatische Methoden	42
<b>5. ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>5.1. Spezifische Domänen von <i>TtALV2</i> führen zu unterschiedlichen Zytoskelett-Assoziationen</b>	<b>43</b>
<b>5.2. Knock-Down von <i>TtALV2</i></b>	<b>49</b>
<b>5.3. CRMs weisen eindeutige Zytoskelett-Assoziationen auf</b>	<b>53</b>
<b>5.4. Zytoskelett-Assoziationen eines synthetischen CRMPs</b>	<b>56</b>
<b>5.5. Die Basalkörper-Assoziationen von Zytoskelett-Proteinen</b>	<b>58</b>

---

<b>5.6. Die Relevanz von CRMPs in anderen Organismen</b>	<b>59</b>
<b>5.7. Lokalisation des synthetischen CRMPs in humanen Zellen</b>	<b>63</b>
<b>6. DISKUSSION</b>	<b>64</b>
<b>6.1. Der Zusammenhang zwischen <i>TtALV2</i> und Intermediärfilamenten</b>	<b>65</b>
<b>6.2. Die Rolle von <i>TtALV2</i> in <i>T. thermophila</i></b>	<b>69</b>
<b>6.3. Die Zytoskelett-Assoziation der CRMPs</b>	<b>72</b>
<b>6.4. Basalkörper als Intermediärfilament-organisierende Zentren</b>	<b>76</b>
<b>6.5. CRMPs als neue Gruppe der Intermediärfilamente</b>	<b>78</b>
<b>6.6. Rückschlüsse aus dieser Arbeit</b>	<b>81</b>
<b>6.7. Ausblick auf weitere Versuche</b>	<b>82</b>
<b>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>84</b>
<b>8. REFERENZEN</b>	<b>87</b>
<b>9. ANHANG</b>	<b>106</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>108</b>

## 1. Zusammenfassung

Das vereinigende zytologische Merkmal der eukaryotischen Gruppe der Alveolata, welche die Ciliaten, Apicomplexa und Dinoflagellaten umfasst, sind die sogenannten Alveoli. Diese sind abgeflachte, membrangebundene Vesikel, die knapp unter der Zytoplasma-Membran dieser eukaryotischen Einzeller vorgefunden werden und einen Teil der komplexen Zell-Pellicula darstellen. Alveolin-Proteine, welche mit den Alveoli assoziiert sind und geladene repetitive Motive aufweisen, konnten als erster molekularer Nexus der Alveolata nachgewiesen werden. Basierend auf einer Proteomanalyse der Pellicula des Ciliaten *Tetrahymena thermophila* wurde im Anschluss bemerkt, dass ein dominanter Anteil der Proteine, ähnlich den Alveolin-Proteinen, *charged repeat motifs* aufweisen. Damit wurden erstmals die *charged repeat motif proteins* (CRMPs) identifiziert und beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde nun der Zusammenhang zwischen den CRMPs, Intermediärfilamenten (IFs) und dem Zytoskelett von *T. thermophila* näher analysiert.

Durch die Herunter-Regulierung eines der beiden Alveolin-Proteine aus *T. thermophila* (*TtALV2*), welches auch ein CRMP darstellt, konnte gezeigt werden, dass *TtALV2* eine essentielle Funktion in der Stabilität der Zell-Pellicula übernimmt. *TtALV2* weist charakteristische CRM-Domänen auf, welche vorhergesagt sind *coiled-coils* zu formen und von Termini, welche keine repetitiven Motive aufweisen, flankiert sind. Diese Domänen stellen zusammen den prinzipiellen Aufbau von IFs dar. Durch die Analyse der einzelnen Domänen konnte gezeigt werden, dass eine Abhängigkeit zwischen den Termini und den CRMs für die korrekte Lokalisation eines CRMPs besteht, was ebenfalls eine Äquivalenz zu den IFs darstellt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Affinität zwischen den CRMs und dem Zytoskelett von *T. thermophila* besteht. Auch die Lokalisationen weiterer CRMPs, inklusive eines synthetischen CRMPs, konnten eine solche Zytoskelett-Assoziation bestätigen. Die Untersuchung bereits bekannter Zytoskelett-assoziiierter Proteine aus anderen Organismen konnte zudem zeigen, dass viele von ihnen ebenfalls CRMs aufweisen. Hinsichtlich der Zytoskelett-Lokalisationen

vieler CRMPs in *Tetrahymena* sind besonders die Assoziationen zu den Basalkörpern interessant, da diese unter Umständen eine Art *Transfer-Station* für peripher assoziierte Zytoskelett-Proteine darstellen könnten, wobei sie sogar in dieser Arbeit als Intermediärfilament-organisierende Zentren hypothetisiert werden.

## 2. Abstract

The unifying cytological feature of the eukaryotic group of Alveolata, which comprises ciliates, apicomplexa and dinoflagellates are the alveoli. These are membrane-bound, flattened sacks below the cytoplasmic membrane of those protozoa being part of the complex cell-pellicle. The first described molecular nexus among the Alveolata were the alveolin-proteins with specific charged repeat motifs that are associated with the alveoli. Based on a pellicle proteome analysis from the pellicle of *Tetrahymena thermophila* proteins with similar characteristics has been identified; the so called „charged repeat motif proteins” (CRMPs). In the present work the correlation between these CRMPs, intermediate filaments (IFs) and the cytoskeleton of *T. thermophila* has been analysed.

The knock-down of one of the two alveolin proteins from *T. thermophila* (*TtALV2*) – a charged repeat motif protein – demonstrated the essential function of *TtALV2* in the stability of the cell-pellicle. Furthermore *TtALV2* possess characteristic domains: the CRMs, which are predicted to build coiled-coil domains and the termini, without any repetitive motifs. These domains reminds of the characteristic structure of IFs. The analysis of the different domains revealed that there seems to be a dependency between the CRMs and the termini for the correct localisation of a CRMP, which is also similar to the IFs. Furthermore it has been shown that there is an affinity amongst the CRMs and the association to the cytoskeleton of *T. thermophila*. The localisation of further CRMPs, including a synthetic CRMP, confirmed such an affinity of cytoskeleton-association. The investigation of common cytoskeleton associated proteins in other organisms could show, that a big proportion feature CRMs and so belong to the CRMPs. An additional interesting observation was, that many of the cytoskeleton associated proteins shown in this work build – amongst others – an association to the ciliary basal bodies of *Tetrahymena*. The basal bodies seem to act as a transfer-station for cytoskeleton proteins that localise to the periphery of the cell. In this case they are also hypothesized as eventual new kind of intermediate filament organizing centres and require further investigations.

## 3. Einleitung

### 3.1. Das eukaryotische Zytoskelett

Das Zytoskelett dient in erster Linie der mechanischen Stabilität einer Zelle und ermöglicht dynamische Fähigkeiten wie die Zellbewegung, Zellteilung und Phagozytose. Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen besteht grundsätzlich aus drei verschiedenen filamentösen Strukturen, welche zusammen ein intrazelluläres Netzwerk darstellen. Diese Filamente werden hinsichtlich ihrer Filament-Durchmesser in Aktinfilamente mit einem ungefähren Durchmesser von 7 nm, Intermediärfilamente mit einem Durchmesser von 8-10 nm und Mikrotubuli mit einem Filament-Durchmesser von etwa 25 nm unterschieden (Fischman, 1967; Peters & Vaughn, 1967; Ishikawa et al, 1968). Nicht nur in ihrem Filament-Durchmesser, sondern auch in ihrem Aufbau und ihren zellulären Aufgaben differenzieren sich die Filamente voneinander. Die Aktin-Filamente bestehen im Grunde aus mehreren globulären Aktin-Molekülen, den sogenannten G-Aktinen, von denen sechs verschiedene Isoformen existieren (Pollard, 2001; Tondeleir et al, 2009). Aktin-Filamente sind polar und ihre beiden Enden haben unterschiedliche biochemische Eigenschaften; so liegt ein Plus- und ein Minus-Ende vor, an denen ein ständiger Auf- und Abbau (Polymerisierung und Depolymerisierung) der Filamente passiert, wobei die Polymerisierung überwiegend am Plus-Ende erfolgt (Welch & Mullins, 2002). Die Funktionen der Aktin-Filamente sind aufgrund der Assoziationen mit verschiedenen Aktin-bindenden Proteinen sehr weit gefächert. So haben sie beispielsweise eine sehr dynamische Funktion bei der Interaktion mit Myosin in Skelettmuskeln und eine sehr statische Funktion bei der Stabilisierung der Mikrovilli. Einige Studien zeigen außerdem, dass Aktine bei der Regulation der Transkription und bei der Gen-Expression (Zheng et al, 2009), bei Apoptose (Franklin-Tong & Gourlay, 2008) und als essentielles Element der Endozytose (Galletta & Cooper, 2009) eine wichtige Rolle spielen.

Mikrotubuli erfüllen unter anderem eine essentielle Rolle in der Zellteilung, der Zellbewegung, dem intrazellulären Transport und in der Aufrechterhaltung der

Zellpolarität (Singh et al, 2008). Die Grundbausteine der Mikrotubuli sind  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubuline, welche zusammen ein Heterodimer bilden und diese sich linear zu Protofilamenten anordnen. Dreizehn Protofilamente bilden wiederum ein röhrenförmiges Mikrotubulus mit einem Durchmesser von etwa 25 nm. Ähnlich wie die Aktin-Filamente sind sie polar und haben ein Minus- und ein Plus-Ende. Am Plus-Ende erfolgt die Polymerisierung und am Minus-Ende die Depolymerisierung. Eine daraus resultierende Netto-Assoziation von Tubulin-Dimeren am Plus-Ende, gekoppelt an die Netto-Dissoziation am Minus-Ende der Mikrotubuli, wird als „Tretmühleneffekt“ bezeichnet, da keine signifikante Änderung der Mikrotubuli-Länge resultiert (Margolis & Wilson, 1978; Panda et al, 1999). Mikrotubuli gehen von sogenannten Mikrotubuli-Organisierungs-Zentren (MTOC, microtubule-organizing-centre) hervor, wobei  $\gamma$ -Tubulin einen Bestandteil der MTOCs selbst darstellt (Martin et al, 1997; Oakley et al, 1990). Zentrosome und Basalkörper von Cilien stellen wichtige MTOCs dar. Eine Fehlfunktion dieser kann zu erheblichen Zellschäden führen (Nigg & Raff, 2009).

Intermediärfilamente (IF) sind stabförmige Filamente, wobei ein filamentäres Protein den Grundbaustein (Monomer) bildet. Dimere entstehen durch eine laterale Assoziation zweier Monomere, die eine  $\alpha$ -helikale „coiled-coil“-Domäne, mit flexiblen N- und C- Termini, bilden. Zwei Dimere gründen durch eine versetzte Anlagerung ein Tetramer. Es folgen laterale und longitudinale Anordnungen der Tetramere, woraus Filamente mit einem Durchmesser von etwa 16 nm entstehen, die letztlich zu einem ungefähren Filament-Durchmesser von 10 nm komprimiert werden (Abb. 1; Godsel et al, 2008). Mit etwa 70 bekannten Genen aus *Homo sapiens*, welche IFs kodieren, stellen sie im Vergleich mit Aktin und Mikrotubuli die höchste Diversität dar (Godsel et al, 2008), welche wiederum zu einem großen Funktionsspektrum führen. So stellen IFs unter anderem wichtige Bestandteile für die mechanische Zell-Stabilität dar (Huen et al, 2002; Omary et al, 2004; Vassar et al, 1991), leisten Widerstand gegen Stress, wobei sich Interaktionen mit bestimmten Kinasen ereignen (Feng et al, 1999; Ku et al, 2002) und spielen möglicherweise eine signifikante Rolle als Vermittler der Kommunikation im intrazellulären Netzwerk (Chang & Goldman, 2004). So viele IF

kodierende Gene in Metazoen – wie etwa in *Homo sapiens* – bekannt sind, so wenig ist jedoch in Protisten über sie bekannt.

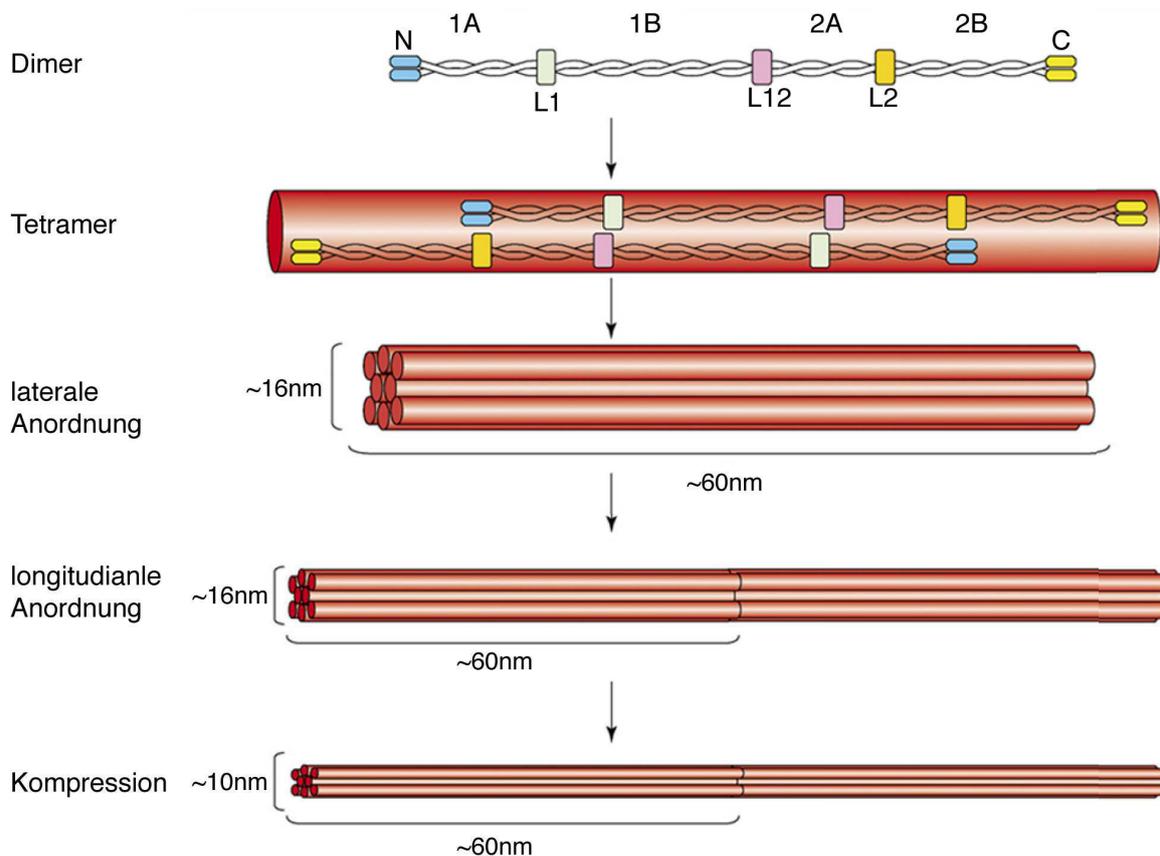


Abb.1: Schematische Darstellung der Formation von Intermediärfilamenten (IFs). Den Grundbaustein von IFs stellt ein filamentöses Monomer dar, bestehend aus einer  $\alpha$ -helikalen coiled-coil Domäne, welche von nicht helikalen N- und C-Termini flankiert wird. Die Formation von IFs beginnt mit der Bildung eines parallelen  $\alpha$ -helikalen coiled-coil Dimers. Die Bildung des Dimers wird durch vier definierte coiled-coil Domänen (1A, 1B, 2A und 2B), welche durch flexible nicht-helikale Bereiche geteilt sind, vermittelt. Anschließend assoziieren Dimere zu einem Tetramer. Nach lateraler und longitudinaler Anordnung dieser, werden sie letztlich zu einem Filament-Durchmesser von 10 nm komprimiert. Modifiziert nach Godsel et al (2008).

Protisten sind mikrobielle Eukaryoten zu denen unter anderem die Protozoen, Schleimpilze und einzellige Algen gehören (Hausmann et al, 2003). Im natürlichen Lebensraum spielen die meisten Protisten eine entscheidende Rolle (Corliss, 2002). So etwa kontrollieren phagotrophe Protozoen die Abundanz von Bakterien und anderen Mikroben. Bei Metazoen werden mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen komplexe Gewebeverbände gebildet werden, wie Organe,

welche in einem Organismus abgegrenzte Funktionseinheiten darstellen (Blankenberg et al, 2003). Protisten hingegen verfügen – auch ohne Organe – über Fähigkeiten wie der Zellbewegung, Fortpflanzung und Reizbarkeit. Dies ist darauf zurückzuführen, dass viele Protisten in ihrer Morphologie höchst spezialisiert sind; so besitzt beispielsweise der Ciliat *Tetrahymena thermophila* einen Mundapparat (Cytostom) zur Nahrungsaufnahme und Cilien zur Fortbewegung (Mehlhorn & Ruthmann, 1992). Der parasitäre Protist *Trichomonas vaginalis* ist in der Lage eine drastische Umwandlung des Zytoskeletts durchzuführen. Er weist bei Kontakt mit Wirtszellen des Urogenitaltrakts eine amöboide Form auf und nimmt während einer Neuinfektion eine frei-schwimmende, ovale Form an (Trophozoit) (Arroyo et al, 1993). Die Tatsache, dass diese ein- bis wenig-zelligen Lebewesen solch komplexe Morphologien aufweisen, deutet darauf hin, dass sie über ein komplexeres Zytoskelett-System, verglichen mit Metazoen, verfügen könnten. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand des Protisten *T. thermophila* untersucht, ob bisher unbekannte Familien von Intermediärfilamenten existieren und des Weiteren, welche Rolle den ciliären Basalkörpern bei der Integration von potentiellen IFs zukommt.

### 3.2. Taxonomie der Alveolata

Den Alveolata werden die Phyla Ciliophora, Apikomplexa und Dinzoa zugeordnet (Adl et al, 2005; Bachvaroff et al, 2011). Neueste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die sogenannten Perkinsozoa, ebenfalls als Phylum, den Alveolata zugeordnet werden sollten (Siddall et al, 1997; Saldarriaga et al, 2003; Stelter et al, 2007; Gould et al, 2008b; Zhang et al, 2011). Frühere Arbeiten ordneten die Alveolata den Chromalveolaten zu (Westheide & Rieger, 1996; Cavalier-Smith, 1999; Adl et al, 2005). Die Chromalveolaten stellen dabei eine der sechs Super-Gruppen der Eukaryoten dar (Simpson & Roger, 2002; Simpson & Roger, 2004). Es besteht die Hypothese, dass die Chromalveolaten aus einer sekundären Endosymbiose zwischen einem phago- und heterotrophen Eukaryoten und einer Rotalge entstanden sind (Cavalier-Smith, 1999) und sie damit monophyletischer

Abstammung sind. Diese Chromalveolaten-Hypothese, welche größtenteils auf der Art und Anzahl der Plastid-Membranen und auf den Besitz von Chlorophyll *c* beruht, wurde zunächst unterstützt (Harper et al, 2005; Patron et al, 2007), ist aber mittlerweile sehr umstritten (Baurain et al, 2010; Bodyl et al, 2009; Felsner et al, 2011; Sanchez-Puerta & Delwiche, 2008; Woehle et al, 2011). Des Weiteren wurde vermutet, dass Alveolata, Cryptophyta, Haptophyta und Heterokonta (auch Stramenopile genannt) den Chromalveolaten als jeweilige Super-Phyla untergeordnet werden (Cavalier-Smith, 1999; Keeling, 2004). Allerdings konnten in den letzten Jahren Sequenz-Analysen zeigen, dass Alveolata und Heterokonten mit einer der Super-Gruppen der Eukaryoten, nämlich der Rhizaria näher verwandt sind als mit Haptophyten und Cryptophyten (Burki et al, 2007; Burki et al, 2008; Burki et al, 2009; Hackett et al, 2007; Adl et al, 2012). Die Vereinheitlichung evolutiver Beziehungen zwischen diesen verschiedenen komplexen Phyla hängt unter anderem von folgenden Fragen ab: deutet der Mangel an Plastiden in einigen Chromalveolaten auf einen Verlust dieser hin (Abrahamsen et al, 2004; Huang et al, 2004; Reyes-Prieto et al, 2008; Tyler et al, 2006), oder besaßen jene Chromalveolaten nie Plastiden (Eisen et al, 2006; Stiller et al, 2009). Diese Fragen werden noch stark diskutiert werden, wobei die hohe Anzahl an Organismen und Genen die Antworten dazu nicht begünstigen werden (Archibald, 2009; Gould et al, 2008b; Keeling, 2010; Sanchez-Puerta & Delwiche, 2008).

### **3.3. Morphologische Charakteristika der Alveolata**

Allen Alveolata gemeinsam und gleichzeitig namensgebend sind die sogenannten Alveoli. Alveoli sind abgeflachte Vesikel, die sich unmittelbar unter der Plasmamembran befinden und zusammen mit den anliegenden Mikrotubuli und dem sogenannten Membran-Skelett, einer elektronendichten Schicht, welche bei den Ciliophora auch als Epiplasma bekannt ist, die komplexe Zell-Pellicula bilden (Cavalier-Smith, 1991; Gould et al, 2008a; Satir & Wissig, 1982).

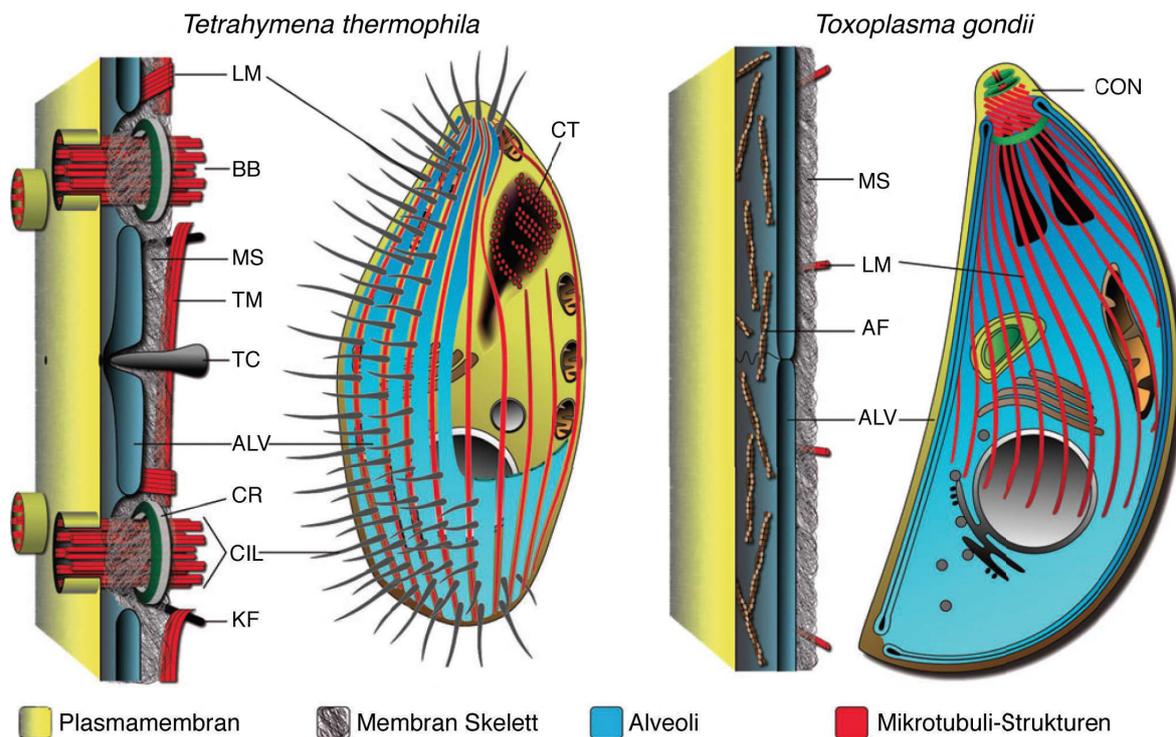


Abb.2: Schematische Darstellung der Pellicularum von *T. thermophila* und des Apicomplexa *Toxoplasma gondii*. Beide Organismen haben ähnliche Pelliculae, welche besonders durch die Alveoli (ALV), welche sich unter der Plasmamembran befinden, dem stützenden Membran-Skelett (MS), welches in Ciliaten als Epiplasma bezeichnet wird, und den assoziierenden Mikrotubuli (longitudinale, LM und transversale, TM) und anderen filamentösen Elementen charakterisiert sind. BB, Basalkörper; TC, Trichozyste; CR, Ring-Komplex (*circumciliary rings*); CIL, Cilii; KF, *kinetodesmal fibres*; CT, Cytostom; CON, Conoid; AF, Aktin-Filamente. (Gould et al, 2011)

Trotz dieser Gemeinsamkeit unterscheiden sich die Alveolata untereinander sehr stark. Die Dinozoa zeichnen sich durch ihre große Anzahl verschiedener, facettenreicher Organismen aus, von denen viele wichtige ökologische Rollen sowohl in Süß- als auch in Salzwasser Habitaten angenommen haben. So sind zum Beispiel einige von ihnen wesentliche Symbionten für riffbildende Korallen. Vor allem aber ist der Nukleus der Dinozoa maßgebend für ihre Einzigartigkeit. Einst wurden die Dinozoa aufgrund ihres ungewöhnlichen Nukleus zwischen Eukaryoten und Prokaryoten als sogenannte „Mesokaryons“ eingestuft (Dodge, 1965). Der Nukleus der Dinozoa wird auch Dinokaryon genannt und zeichnet sich durch ein sehr großes Genom (Wisecaver & Hackett, 2011), sowie seine in allen

Stadien des Zellzyklus permanent kondensierte DNA und das Fehlen von Histonen und damit Nukleosomen aus (Bodansky et al, 1979). Interessanterweise wurde eine neuartige Protein-Gruppe in den Dinzoa identifiziert, die sogenannten DVNPs (*Dinoflagellate Viral Nucleo Proteins*), welche vermutlich über ähnliche Funktionen wie Histone verfügen (Gornik et al, 2012), da sie sehr basisch sind und eine ähnlich hohe Affinität zur DNA zeigen. Andere Wissenschaftler vermuten, dass die Chromosomenstruktur durch die Bildung flüssiger Kristalle im Nukleus möglich ist (Bouligand & Norris, 2001).

Die Namensgebung der Apicomplexa, welche ein Phylum der Alveolata darstellen, erfolgte aufgrund ihres kennzeichnenden apikalen Komplexes (Apicoplast). Apicomplexa sind sehr wichtige parasitäre Protozoen, da viele von ihnen tödliche Krankheiten in Menschen und Tieren hervorrufen (Black & Boothroyd, 2000; Clark, 1999; Sachs & Hotez, 2006). Ein bekannter Parasit unter ihnen ist der Malaria-Erreger *Plasmodium* spp.. Grundsätzlich wird der Lebenszyklus der Apicomplexa allgemein in drei Entwicklungsstadien – der Sporozoit, der Merozoit und der Gametozyt – eingeteilt, wobei die Unterschiede meist in der Anzahl an verschiedenen Wirten liegt (Wasmuth et al, 2009). Die Proliferation der Parasiten beginnt zunächst durch eine Wirtszellen-Invasion, welche durch den Conoid, ein Bestandteil des apikalen Komplexes, und durch das Glideosom, welches die gleitende Beweglichkeit des Parasiten bewirkt, ermöglicht wird (Keeley & Soldati, 2004; Morrissette & Sibley, 2002). Das Glideosom basiert auf einer Aktin-Myosin Maschinerie und befindet sich zwischen der Plasmamembran und den Alveoli (Frenal et al, 2010). Nicht außer Acht zu lassen sind die einzigartigen apikalen Kompartimente der Apicomplexa, die Rhoptrien und die Mikronemen. Sie spielen bei der Zellbewegung, dem Andocken an die Wirtszelle, der eigentlichen Wirtszell-Invasion und bei der Bildung einer parasitären Vakuole eine wichtige Rolle (Carruthers et al, 1999; Carruthers & Sibley, 1997; Dubremetz et al, 1993; Scholtyseck & Mehlhorn, 1970). In der Wirtszelle vermehren sich die Parasiten solange, bis die Wirtszelle letztlich dadurch lysiert wird. Der apikale Pol-Ring-Komplex ist ein weiteres Merkmal der Apicomplexa und zählt als eines der drei Mikrotubuli-Organisierungs-Zentren (engl. *microtubule-organizing-centre*;

MTOC) der Parasiten (Morrissette & Sibley, 2002; Russell & Burns, 1984). Der Apicoplast repräsentiert den Rest der endosymbiontischen Rot-Alge (Wilson et al, 1996) und spielt eine wichtige Rolle bei dem Lipid-Metabolismus. Der Erwerb von Lipiden und Fettsäuren ist ein sehr wichtiger Aspekt im Metabolismus eines intrazellulären Erregers (Mazumdar & Striepen, 2007; Valdivia, 2008; Wasmuth et al, 2009), da diese hauptsächlich Bausteine der Membran darstellen und außerdem bei post-translationalen Modifikationen vieler Proteine eine signifikante Rolle spielen. In Abbildung 3 sind unter anderem die verschiedenen Apicomplexa-kennzeichnenden Kompartimente und Organellen in einem Zell-Schema anschaulich dargestellt.

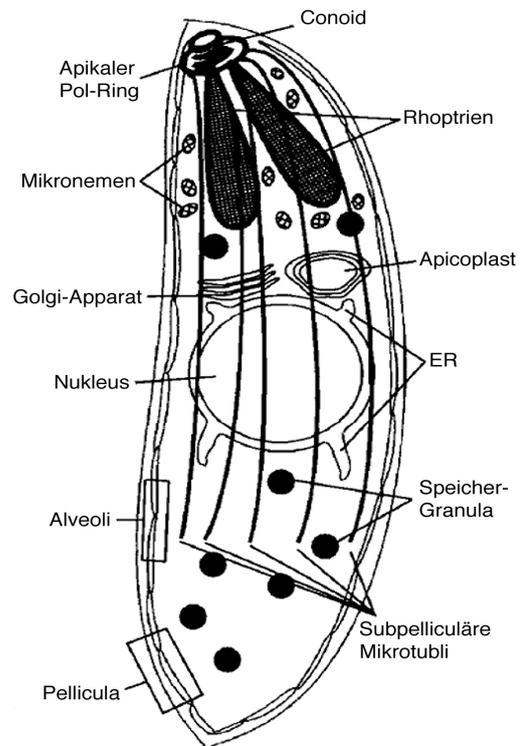


Abb.3: Zell-Schema eines Apicomplexa. Dargestellt sind die vielen Phylum-spezifischen Kompartimente. (Morrissette & Sibley, 2002)

Den Alveolata zugehörige Ciliophora leben im Süßwasser, Meer oder in Böden und verglichen mit den meisten Protozoen sind sie in ihrer genetischen Vielfalt sehr komplexe Zellen. Die Ciliophora können durch zwei Merkmale identifiziert werden: durch ihre Cilien, wobei viele Ciliophora entweder ganz oder teilweise von Cilien bedeckt sind und durch ihren nukleären Dimorphismus (Prescott, 1994).

### 3.4. Der nukleäre Kerndimorphismus der Ciliophora

Ciliophora besitzen im selben Zellplasma zwei Nuklei, die sich sowohl funktionell als auch morphologisch voneinander unterscheiden. Dieser nukleäre Dimorphismus führt dazu, dass in einer einzigen Zelle Prozesse, wie die Meiose

und Fertilisierung und Differenzierung des somatischen und Keimbahn Nukleus, stattfinden können. Der Keimbahn-Mikronukleus ist dabei für die sexuelle Reproduktion und der somatische Makronukleus für die „RNA-Produktion“, das vegetative Zellwachstum und die ungeschlechtliche Proliferation verantwortlich. Verschiedene Ciliophora haben dabei eine unterschiedliche Anzahl an Mikronuklei. Der Ciliat *Paramecium* besitzt beispielsweise zwei oder mehr Mikronuklei, wobei es auf die jeweilige Spezies ankommt. Die *Oxytricha* Spezies besitzen zwei bis vier Mikronuklei, *Stylonychia* besitzen zwei Mikronuklei und ein Extrema ist die *Euplotes*-Spezies *Urostyla grandis* mit fünf bis 20 Mikronuklei (Prescott, 1994). Alle in einem Organismus vorkommenden Mikronuklei sind genetisch vollkommen identisch. Sie entstehen durch Mitose aus einem Mikronukleus, der zuvor bei der Fertilisierung durch eine Zell-Paarung gebildet wurde. Die mitotische Zellteilung passiert dabei während des vegetativen Zellwachstums, ohne dass sich die Kernmembranen auflösen (Jaeckel-Williams, 1978). Die Anzahl der Makronuklei unterscheidet sich bei den verschiedenen Ciliophora ebenfalls. *Paramecium* und *Tetrahymena* haben einen Makronukleus, *Stylonychia* und *Oxytricha* besitzen zwei und wieder stellt *Urostyla grandis* mit mehreren Hundert Makronuklei ein Extrema dar (Prescott, 1994).

Der Mikronukleus ist transkriptionsinaktiv. Somit wird der Phänotyp einer Zelle vom Makronukleus bestimmt. Wurde eine Zelle experimentell so verändert, dass sich ein Allel im Makronukleus vom Mikronukleus unterscheidet, so bestimmt das Allel des Makronukleus den Phänotypen der Zelle (Sonneborn, 1954). Dabei wird dennoch nicht ausgeschlossen, dass einige mikronukleären Gene während des vegetativen Zellwachstums exprimiert werden, da in den Mikronuklei mehrerer Ciliophora radiographisch geringe Mengen einer RNA-Synthese detektiert werden konnten (Ammerman.D, 1970; J., 1967; Murti & Prescott, 1970; Rao & Prescott, 1967). Der Makronukleus teilt sich amitotisch, das heißt ohne funktionelle Zentromere. Mehrere Kopien der makronukleären Chromosomen werden zufällig auf die zwei entstehenden Tochter-Zellen aufgeteilt, so dass einer der beiden neu entstehenden Makronuklei teilweise bis zu 10-15% mehr DNA enthalten kann als der Andere (Berger & Schmidt, 1978; Doerder, 1979; Mcdonald, 1958; Takagi &

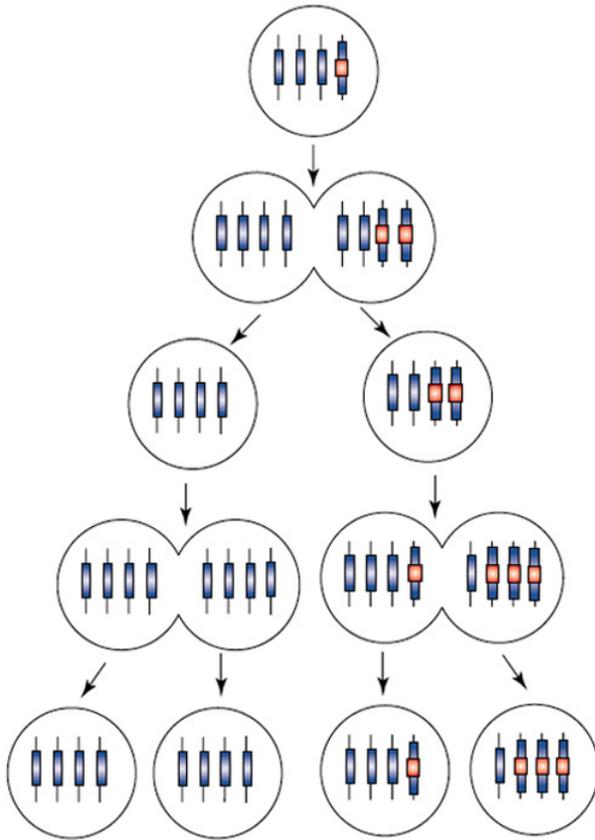


Abb.4: Schema des „Phenotypic Assortment“, dargestellt anhand zweier Zellzyklen. Der oberste Kreis stellt einen heterozygoten Makronukleus dar, welcher entweder aus einer Konjugation oder einer Transfektion mit anschließender integrativer Rekombination hervorgeht. Alle Makronuklei weisen in dieser Abbildung vier Kopien eines repräsentativen Allels auf (anstelle von etwa 45), wobei blau die Wildtyp-Allele und rot-blau die mutierten Allele darstellen. Die fusionierten Kreise repräsentieren die makronukleäre Teilung nach der DNA-Replikation, wobei zu erkennen ist, dass die Allel-Kopien zufällig auf die Makronuklei aufgeteilt werden, was letztlich dazu führen könnte, dass der Makronukleus homozygot für das mutierte Allel werden könnte. (nach Turkewitz et al, 2002)

Kanazawa, 1982; Witt, 1977). Das Ergebnis dieser zufälligen Verteilung von Allelen bei vegetativen Abkömmlingen einer heterozygoten Zelle, welche aus einer Konjugation hervorgeht, ist eine Zelle, die nach etwa 100 Zellteilungen homozygot für ein Allel wird (Orias & Flacks, 1975). Dieses genomische Phänomen wird als „phenotypic assortment“ bezeichnet, das heißt dass bei einer heterozygoten Zelle ein dominantes Allel exprimiert wird, wenn die Zelle durch eine Konjugation entstanden ist. Klone aber welche sich vegetativ vermehren, könnten entweder das dominante oder auch das rezessive Allel exprimieren (Abb.4).

### 3.5. *Tetrahymena thermophila*

Der heterotrophe Organismus *Tetrahymena thermophila* wird aufgrund seiner holotrichen Ciliatur, welche vor allem seiner Fortbewegung als freischwimmender Organismus dient (Mehlhorn & Ruthmann, 1992), den Ciliaten untergeordnet (Westheide & Rieger, 1996). Die pyriforme *T. thermophila* Zelle ist etwa 50  $\mu\text{m}$  lang und 20  $\mu\text{m}$  breit und überwiegend in nährstoffreichen Süßwasserhabitaten zu

finden. Der Ciliat weist alle typischen eukaryotischen Zellstrukturen wie Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum, Lysosomen, Peroxisomen, Dictyosomen und Ribosomen auf. Außerdem besitzt *T. thermophila* Phagosomen, Mucozysten und eine kontraktile Vakuole. Weitere kennzeichnende Merkmale sind der Oralapparat und das Cytoprokt. Der Oralapparat, auch Cytostom genannt, ist eine komplexe Trichter-ähnliche Struktur, welche die ventrale Seite der Zelle definiert und hauptsächlich der Nahrungsaufnahme dient. Das Cytostom besteht aus ungefähr 150 Basalkörpern, die in vier Anhäufungen organisiert sind, wodurch vier ciliär-gebündelte Strukturen entstehen, drei sogenannte Membranellen und eine undulierende Membran (Abb.5) (Bakowska et al, 1982; Nilsson & Williams,

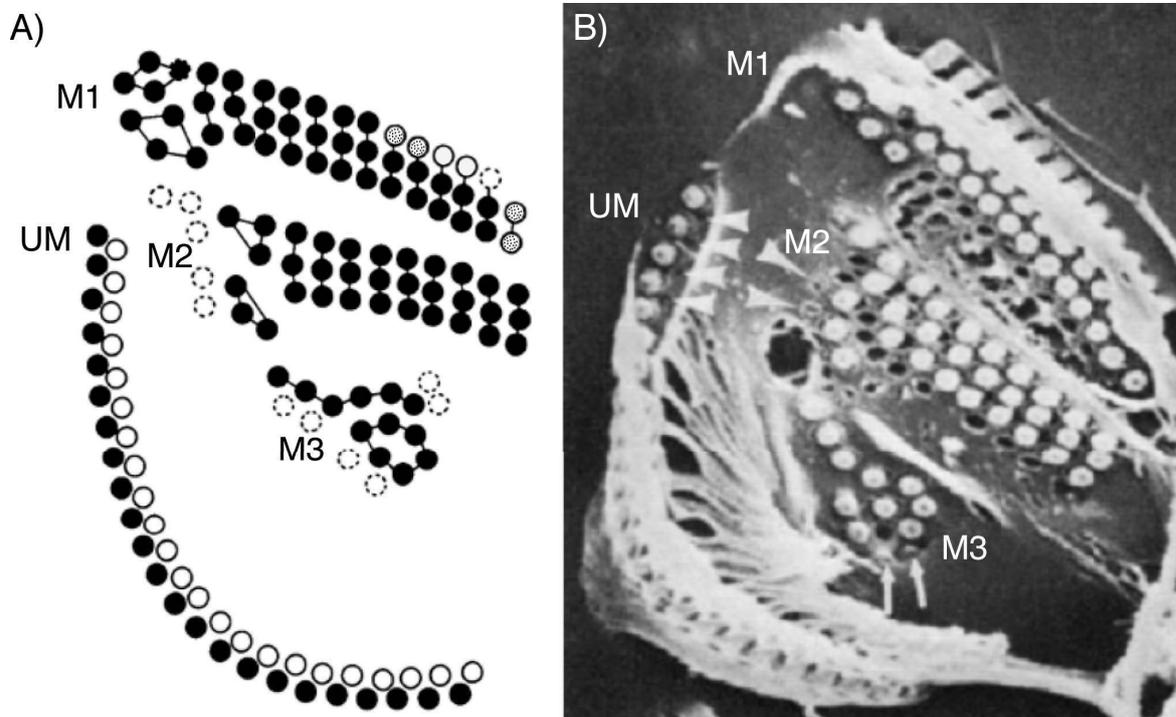


Abb.5: Das Cytostom *Tetrahymenas*. In A ist die schematische Darstellung des Cytostoms von *Tetrahymena thermophila* durch die Anordnung der Basalkörper dargestellt, welche durch Kreise angezeigt werden. Durchgezogene Linien veranschaulichen permanent anwesende Basalkörper und gestrichelte Linien teilweise anwesende Basalkörper. Die schwarzen Kreise stellen Basalkörper dar, die ausschließlich mit Cilien besetzt sind, gepunktete Kreise, die teilweise und weiße Kreise, die nie mit Cilien besetzt sind. In B ist ein Cytostom durch Elektronenmikroskopie illustriert. Die Isolierung des Cytostoms führt zum Verlust der Cilien, jedoch können Basalkörper, die bereits vor der Isolierung nicht mit Cilien besetzt waren identifiziert werden (Pfeilspitzen) und auch Basalkörper, die teilweise mit Cilien besetzt waren (Pfeile). Sowohl in A als auch in B sind die drei Membranellen (M1, M2 und M3) und die undulierende Membran dargestellt. Modifiziert nach Bakowska et al (1982)

1966). Diese vier ciliären Strukturen führten zur Namensgebung von *Tetrahymena* (Levine et al, 1980). Nahe dem posterioren Ende einer Zelle befindet sich das Cytoprokt. Diese schlitzförmige Struktur erhöht ihren Durchmesser bei der Exkretion unverdauter Partikel von etwa 0,3-0,8  $\mu\text{m}$  bis zu 2  $\mu\text{m}$  (Allen, 1979). 1979).

Auf genetischer Ebene weist *T. thermophila*, charakteristisch für Ciliaten, den nukleären Kerndimorphismus auf. Das Genom des diploiden Mikronukleus beinhaltet fünf metazentrische Chromosomen mit 120 Mb und 27.500 putativen offenen Leserahmen (Collins & Gorovsky, 2005). Der Mikronukleus ist während der vegetativen Vermehrung transkriptionsinaktiv. Durch eine Konjugation entstehen neue Mikronuklei, welche sich mitotisch vermehren. Einer der neu entstandenen Nuklei stellt den Mikronukleus dar und ein anderer wird zum neuen Makronukleus ausdifferenziert, wobei der alte Makronukleus apoptotisch zerstört wird (Turkewitz et al, 2002). Bei der Ausbildung des neuen Makronukleus werden die fünf „Keimbahn“-Chromosomen zunächst zu 200-300 Chromosomen-Fragmenten zerlegt, an die Telomere angefügt werden, wobei die Größen der Chromosomen-Fragmente von 21 kb bis zu 3000 kb variieren (Altschuler & Yao, 1985; Blackburn & Gall, 1978; Conover & Brunk, 1986; Hamilton et al, 2006; Yao et al, 1990). Anschließend werden diese Chromosomen mehrfach amplifiziert, was aufgrund des fehlenden mitotischen Spindelapparats als autonome Replikation („*autonomously replicating pieces*“) bezeichnet wird (Wong et al, 2000). Ungefähr 15% der Keimbahn bezogenen DNA (15-20 Mb) werden dabei insgesamt eliminiert, welche etwa 6000 exzidierte genetische Regionen darstellen („*internal eliminated sequences*“; IES), die größtenteils aus repetitiven Sequenzen bestehen (Chalker, 2008; Yao & Gorovsky, 1974). Der Makronukleus ist schließlich mit etwa 45 Kopien der Chromosomen polyploid, teilt sich amitotisch, ist transkriptionsaktiv und bestimmt daher den Phänotypen der Zelle (Collins & Gorovsky, 2005). Solange sich *Tetrahymena* in reichhaltigem Medium befindet, vermehren sich die Zellen vegetativ und sind zudem theoretisch unsterblich. Allerdings kann der Ciliat altern, was sich durch die Abnahme der Fruchtbarkeit äußert. Die Konjugation –

und damit die sexuelle Reproduktion – wird durch einen Nährstoffmangel zwischen komplementären Paarungstypen initiiert (Orias, 1981).

Eine weitere genetische Besonderheit *Tetrahymenas* ist mit einem Durchschnitt von 76% der hohe AT-Gehalt des Genoms (Csank et al, 1990). Eine spezifische Codonpräferenz ist ein weiteres Merkmal des Ciliaten. *Tetrahymena* kodiert bei den üblichen Stopp-Codons UAA und UAG die Aminosäure Glutamin und lediglich das Codon UGA wird als Stopp-Codon genutzt (Eisen et al, 2006). Interessanterweise ergaben makronukleäre Genom-Sequenzierungen *Tetrahymenas*, dass das Stopp-Codon UGA in manchen Fällen, beziehungsweise bei manchen Genen, die Aminosäure Selenocystein kodiert. Damit stellt *Tetrahymena* den ersten Organismus dar, der potentiell alle 64 Codons von nukleären Genen in Aminosäuren translatieren kann (Eisen et al, 2006).

*Tetrahymena thermophila* stellt aufgrund seiner einfachen Kultivierbarkeit im Labor einen geeigneten Modellorganismus für die Grundlagenforschung dar. Unter anderem konnten wichtige Grundlagen der Biologie, wie z.B. enzymatische RNA-Aktivitäten und wichtige Erkenntnisse über Telomere und Telomerasen anhand *Tetrahymenas* Nobelpreise erzielen (Blackburn, 2010; Cech, 1990; Greider, 2010).

### **3.6. Zytoskelett-Organisation in *Tetrahymena***

*Tetrahymena* besitzt etwa 150 orale und 500-600 ciliäre Basalkörper (Bakowska et al, 1982; Nilsson & Williams, 1966), welche in 17 bis 21 longitudinalen Reihen entlang der longitudinalen Mikrotubuli angeordnet sind (Frankel et al, 1980; Nanney, 1966; Nanney, 1971). Ein Basalkörper ist zylinderförmig und durch neun Mikrotubuli-Tripletts aufgebaut, wobei ein Triplett jeweils aus einem A-, B- und C-Tubulus besteht. Ein Querschnitt durch das proximale Ende eines Basalkörpers zeigt die Relation von Tubulin-Strukturen, wie transversale Mikrotubuli und postciliäre Mikrotubuli, aber auch nicht-tubuläre, fädige Strukturen, wie die „*kinetodesmal Fibres*“ (KF), zu den Basalkörpern (Abb.6A). Ein schematischer

Querschnitt durch das distale Ende eines Basalkörpers (Abb.6B) veranschaulicht eine elektronendichte Schicht zwischen den Mikrotubuli-Tripletts, welche die Übergangszone zu den Cilien darstellt (Allen, 1969; Wloga & Frankel, 2012). Mehrere Studien zeigten kürzlich, dass zusätzlich zu  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin fast 100 Proteine an den Basalkörpern präsent oder assoziiert sind (Kilburn et al, 2007) und beispielsweise  $\gamma$ -Tubulin (Shang et al, 2002a), Aktin (Hoey & Gavin, 1992), Calmodulin (Ueno et al, 2003), Centrin1 und Centrin2 (Pearson et al, 2009) dazu gehören.

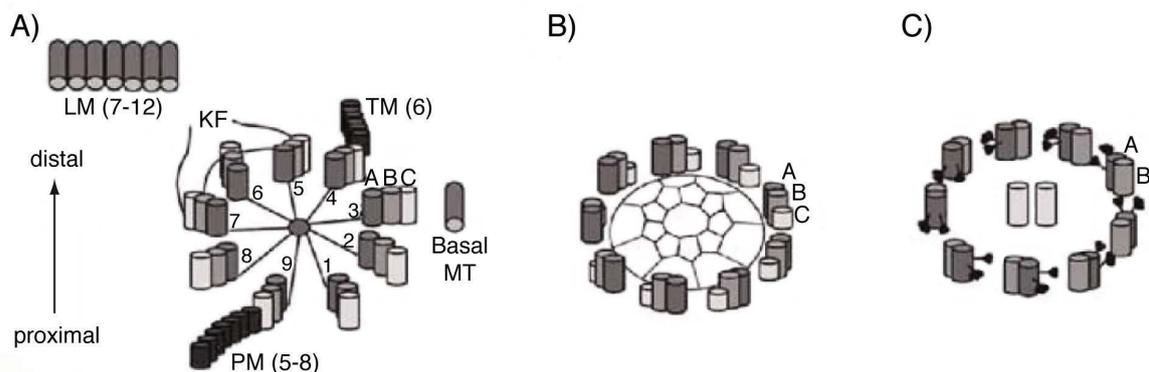


Abb.6: Schematischer Aufbau eines Basalkörpers und einer Cilie. In A wird der Querschnitt durch das proximale Ende eines Basalkörpers mit den Mikrotubuli-Tripletts (A, B und C) veranschaulicht. Die Relation von Strukturen, wie den transversalen Mikrotubuli (TM), die postciliären Mikrotubuli (PM) und die *kinetodesmal fibres* (KF), zu den Basalkörpern sind anhand dieser Abbildung dargestellt. Des Weiteren wird die Angrenzung der longitudinalen Mikrotubuli (LM) und der basalen Mikrotubuli (Basal MT) gezeigt. In B ist ein Querschnitt durch das distale Ende eines Basalkörpers gezeigt. Es wird die Termination des C-Tubulus und die elektronendichte Schicht zwischen den Mikrotubuli-Tripletts veranschaulicht. C demonstriert den Aufbau einer Cilie. Eine Cilie besteht aus neun äußeren und einem zentralen A- und B-Mikrotubuli-Duplett. (Wloga & Frankel, 2012)

Direkt mit den Basalkörpern assoziiert sind die charakteristischen Cilien. Jede Cilie wird von der Plasmamembran umgeben und besteht aus einem „9+2“-Axonem, welches von neun peripheren und einem zentralen Mikrotubuli-Duplett (A- und B-Tubulus) aufgebaut wird (Abb.6C; Allen, 1968); die peripheren Tubuli stellen dabei Verlängerungen des Basalkörpers dar. Am distalen Ende einer Cilie sind die B-Tubuli bereits terminiert und nur die A-Tubuli und das zentrale Mikrotubuli-Duplett extendieren bis zum distalen Ende, wo sie von einer sogenannten ciliären Kappe bedeckt werden, dessen molekulare Komponente

nicht bekannt sind (Dentler, 1984; Suprenant & Dentler, 1988). Analysen durch Massenspektrometrie konnten mehr als 200 ciliäre Proteine in *Tetrahymena* identifizieren, wobei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, welche in *Tetrahymena* durch die Gene *atu1* und *btu1* oder *btu2* kodiert werden, ungefähr 50% der Gesamt-Proteinmasse der Cilien von *Tetrahymena* ausmachen (Wloga & Frankel, 2012). Die Aufgaben der Cilien bestehen hauptsächlich in der Zell-Bewegung (Satir, 1984) und in der Akkumulation von Nahrungspartikeln (Nillson, 1979). Des Weiteren spielen sie eine Rolle beim Abschluss der Zellteilung (Brown et al, 1999).

Ein weiteres spezifisches Zytoskelett-Merkmal von *Tetrahymena*, als Angehöriger der Alveolata, sind die Alveoli. Alveoli sind abgeflachte Vesikel, die sich unmittelbar unter der Plasmamembran befinden und zusammen mit den anliegenden Mikrotubuli und dem Epiplasma die komplexe Zell-Pellicula bilden (Cavalier-Smith, 1991; Gould et al, 2008a). Das Epiplasma besteht dabei aus unbekanntem filamentösen Strukturen, mit Filament-Durchmessern von 8-10 nm (Morrissette & Sibley, 2002), wobei bekannte IFs aus Metazoen, wie z.B. Vimentin, Desmin oder Keratin-ähnliche Proteine fehlen.

### 3.7. Alveoline und Proteine mit geladenen, repetitiven Motiven

Bei den Ciliaten konnte bereits gezeigt werden, dass eine Vielzahl verschiedener Proteine mit dem Epiplasma, und unter Umständen mit den Alveoli assoziiert sind (Vaudaux et al, 1977; Nahon et al, 1993; Williams et al, 1995; Huttenlauch et al, 1998; Huttenlauch et al, 2003). In einem Apicomplexa (*Toxoplasma gondii*) wurden Alveoli-assoziierte Proteine entdeckt, wobei zwei dieser Proteine repetitive Aminosäure-Sequenzen aufwiesen (Gubbels et al, 2004; Mann & Beckers, 2001; Mann et al, 2002). Ausgehend von diesen repetitiven Motiven konnte in allen Alveolata eine hochkonservierte Aminosäuresequenz gezeigt werden (EKIVEVP), welche zur Identifizierung der sogenannten Alveolin-Proteine führte, welche zugleich den ersten molekularen Nexus der Alveolata darstellen (Gould et al, 2008a). Es konnte gezeigt werden, dass die Alveoline in Apicomplexa, Dinzoa und Ciliaten mit den kortikalen Regionen der jeweiligen Zellen assoziiert sind

(Gould et al, 2008a). Von 15 identifizierten Alveolin-Proteinen in *Toxoplasma gondii* beispielsweise, konnten 14 Proteine in Assoziation mit dem subpelliculären Netzwerk lokalisiert werden (Anderson-White et al, 2011). *Tetrahymenas* Genom kodiert zwei Alveolin Gene, *Ttalv1* und *Ttalv2*.

Basierend auf einer Proteomanalyse der Pellicula *Tetrahymenas* wurden neue Proteine mit ähnlichen, repetitiven Aminosäuresequenzen nachgewiesen, welche aufgrund ihrer geladenen Eigenschaft als *charged repeat motif proteins* (CRMPs) bezeichnet wurden (Gould et al, 2011). Die Kriterien, die ein CRMP ausmachen sind i) die sich wiederholende Aminosäuresequenz ist mindestens zehn Aminosäuren lang, ii) diese wird mindestens drei Mal wiederholt und iii) der Anteil der Aminosäuren ist folgendermaßen definiert: K > 6%, E > 6%, Q > 3% und I+L+V > 10%. Die meisten CRMPs haben unbekannte Funktionen, wobei BLAST-Analysen ergaben, dass viele dieser CRMPs putative *structural maintenance of chromosomes* (SMC)- und/oder Viral-A-Domänen aufweisen, welche beide ebenfalls repetitive Motive mit geladenen und hydrophoben Eigenschaften besitzen, die besonders durch die Aminosäuren K, E, Q und I, L bestimmt sind (Funahashi et al, 1988; Gould et al, 2011). Der zweitgrößte Anteil der CRMPs

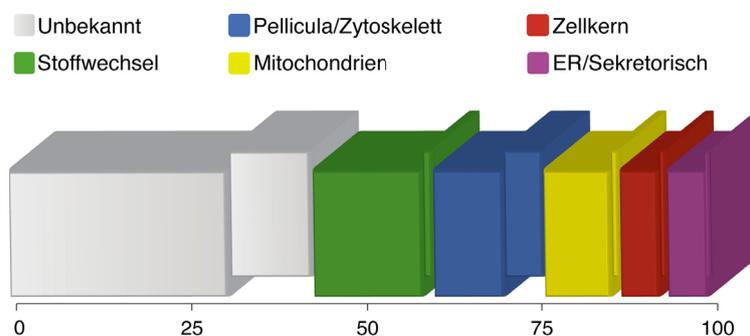


Abb.7: Veranschaulichung des CRMP-Anteils (herausragende Bereiche) in den verschiedenen Kategorien aus dem *T. thermophila* Pellicula-Proteom. Modifiziert nach Gould et al (2011).

konnte Zytoskelett-assoziierten Proteinen zugeordnet werden, wobei bekannte Pellicula-Proteine wie z.B. Tetrine, Basalkörper Protein 39 und 53, EPC 1 (Epiplasmin Gen 1) und die Alveoline dazugehören (Gould et al, 2008a; Honts & Williams, 1990; Kilburn et al, 2007;

Williams & Honts, 1995; Williams et al, 1995). Viele bekannte Zytoskelett-assoziierte Proteine aus Eukaryoten weisen ebenfalls lange repetitive Sequenzen auf, wobei wiederum für viele dieser Proteine coiled-coil Domänen vorhergesagt

werden (Rose & Meier, 2004; Rose et al, 2005). Es werden zwei Formen der coiled-coil Domänen unterschieden: kurze coiled-coil Domänen mit etwa sieben Wiederholungen einer Aminosäuresequenz, die bspw. als Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen und lange coiled-coil Domänen, die aus mehreren hundert repetitiven Aminosäuren bestehen (Bornberg-Bauer et al, 1998). Viele der Proteine mit langen coiled-coil Domänen weisen zudem Aminosäuren mit geladenen Eigenschaften auf (ähnlich wie bei CRMPs) und stellen einen zentralen Baustein von IFs dar (Herrmann & Aebi, 2004).

### 3.8. Ziele dieser Dissertation

In einer Proteomanalyse der Pellicula *Tetrahymenas* wurden erstmals CRMPs (*charged repeat motif proteins*) beschrieben (Gould et al, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass CRMPs in vielen Protozoen, insbesondere bei Alveolata, weit verbreitet sind. In *T. thermophila* sind die meisten CRMPs unbekannter Funktion. Von den CRMPs mit bekannter Funktion haben die meisten eine Zytoskelett-Assoziation. Dies bildete die Basis für die Theorie, dass den CRMPs eine bedeutende Funktion im Zytoskelett zu Grunde liegt. Außerdem wurde hypothetisiert, dass die CRMPs zu der Klasse der Intermediärfilamente gehören, da gezeigt werden konnte, dass den geladenen, repetitiven Aminosäuresequenzen der CRMPs putative coiled-coil Domänen vorhergesagt werden.

Ziel dieser Dissertation sollte es sein die Relevanz der CRMs hinsichtlich einer Zytoskelett-Assoziation zu untersuchen. Hierzu sollte zunächst das CRMP *TtALV2*, welches das kleinere der beiden in *T. thermophila* kodierten Alveolin-Proteine darstellt, charakterisiert werden. Dabei sollten auch einzelne Bereiche des Proteins (CRMs und die Termini, welche keine repetitiven Motive aufweisen) lokalisiert werden, um die genaue Rolle der CRMs und einen eventuellen Lokalisations-Einfluss durch die Termini analysieren zu können. Zur Bestimmung der eigentlichen Funktion des Proteins in *T. thermophila* sollte eine Knock-Out Linie mit deletiertem *TtALV2* generiert werden. Ein weiteres Ziel sollte es sein,

andere CRMPs spezifisch zu lokalisieren, wobei auch ein synthetisches CRMP lokalisiert werden sollte. Dadurch sollte eine eventuell bestehende CRMP-definierende Regel näher charakterisiert werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob CRMs in Zytoskelett-assoziierten Proteinen anderer Organismen ebenfalls vorkommen, um die Relevanz der CRMs hinsichtlich einer generellen Zytoskelett-Assoziation zu untersuchen. Letztlich sollten humane Zellen mit dem synthetischen CRMP transfiziert werden, um die Funktion der CRMPs auch in Metazoen ermitteln zu können.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Medien und Chemikalien

Alle in dieser Arbeit angesetzten Medien und Puffer wurden in demineralisiertem Wasser gelöst und je nach Möglichkeit mit Dampf-Sterilisation autoklaviert oder steril-filtriert.

#### 4.1.2. Antibiotika

Ampicillin	Sigma
Antibiotikum-Antimykotikum	Gibco
Cycloheximid	Sigma
G418 (Geneticin)	Roth
6-Methylpurin	Sigma
Paclitaxel (Inhibitor)	GenDepot
Paromomycin	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Biomedicals LLC

#### 4.1.3. Antikörper

Alexa fluor 488, anti-Maus, IgG	Invitrogen
Alexa fluor 680, anti-Maus, IgG	Invitrogen
Alexa fluor 633, anti-Kaninchen, IgG	Invitrogen
$\alpha$ -Tubulin, monoklonaler Antikörper produziert in Maus	DSHB
$\alpha$ -GFP, polyklonaler Antikörper produziert in Kaninchen	Abcam
$\alpha$ -Alveolin, monoklonaler Antikörper produziert in Kaninchen	Invitrogen
$\alpha$ -HA, monoklonaler Antikörper produziert in Maus	Pierce
ImmunoPure Ziege Anti-Maus IgG, Peroxidase Konjugat	Pierce
ImmunoPure Ziege Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase Konjugat	Pierce

**4.1.4. Enzyme**

<i>Apal</i>	New England Biolabs
<i>BamHI</i>	New England Biolabs
<i>HindIII</i>	New England Biolabs
<i>MluI</i>	New England Biolabs
<i>NsiI</i>	New England Biolabs
<i>PstI</i>	New England Biolabs
<i>SacII</i>	New England Biolabs
<i>SalI</i>	New England Biolabs
<i>SphI</i>	New England Biolabs
<i>XhoI</i>	New England Biolabs
Phusion® High-Fidelity Polymerase	New England Biolabs
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific
T4 DNA Quick-Ligase	New England Biolabs
Trypsin-EDTA	Gibco
VELOCITY DNA Polymerase	Bioline

**4.1.5. Kits**

CloneJet PCR cloning Kit	Thermo Scientific
DNAzol®	Invitrogen
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plamid	Macherey-Nagel, Thermo Scientific
Power SYBR Green	Applied Biosystems
Qubit Quant-iT dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen
Qubit Quant-iT Protein Assay Kit	Invitrogen
Qubit Quant-iT RNA Assay Kit	Invitrogen
Quick Ligation Kit	New England Biolabs
SuperScript First-Strand Sythesis System for RT-PCR	Invitrogen
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific
TRizol®	Invitrogen

#### 4.1.6. Geräte

Autoklav	Fedegari	Mini-Protean® Tetra System	Bio-Rad
Biofuge Fresco	Heraeus	pH-Meter	Schott
Biolistic® PDS-1000/HE	Bio-Rad	Power Pac 300, 3000	Bio-Rad
Brutschrank	Heraeus	Schüttelinkubator	GFL
Eismaschine	Ziegra	Sonifikator Sonoplus HD 60	Bandelin
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf	STEPonePlus Real-Time PCR-System	Applied Biosystems
Feinwaage BP61	Sartorius	Sterilbank	Heraeus
Gelkammer für SDS-Gele	Peqlab	Taumelschüttler 3D	Peqlab
Heizblock HBT 130	HLC	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Konfokalmikroskop LSM 510 Meta	Zeiss	Trans-Blot® Turbo Transfer-System	Bio-Rad
Konfokalmikroskop LSM 710	Zeiss	Universal Hood III, ChemiDoc	Bio-Rad
Lichtmikroskop Dialux 20 EB	Leitz	Vortexer	Heidolph
Magnetrührer IKA-Werk	IKA MAG RCT	Waage ISO 9001	Sartorius
Mastercycler Gradient	Heraeus	Wasserbad	GFL
Mikroliterpipetten	Gilson	Zentrifuge RC 5B Plus	Sorvall
Mikrowelle Quick Cookman	Daewoo		

#### 4.1.7. Kulturen

##### 4.1.7.1. *Tetrahymena thermophila*

Die *Tetrahymena thermophila* Kulturen Cu522, B2086, Cu428, Cu427 und A\*III (*star strain*) wurden von dem *Tetrahymena* Stock Center der Cornell Universität in Ithaca, New York (USA) zur Verfügung gestellt.

##### 4.1.7.2. Humane, epitheliale Vaginalzellen

Adhärente, immortalisierte, humane, epitheliale Vaginalzellen (MS-74) (Klumpp et al, 2002) wurden von Prof. Dr. John F. Alderete von der Washington State Universität in Pullman, Washington (USA) zur Verfügung gestellt.

##### 4.1.7.3. *Escherichia coli*

Alle Klonierungen in dieser Arbeit wurden mit *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' von der Firma Stratagene durchgeführt:  $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^{\text{q}}\text{Z}_{\text{M15 Tn10 (Tet)}^{\text{l}}]$ .

## 4.2 Methoden

### 4.2.1. Anzucht von *Tetrahymena thermophila*

*Tetrahymena thermophila* (*T. thermophila*) wurde in 250 ml-Erlenmeyerkolben mit 50 ml SPP-Medium (1% (w/v) Proteose Pepton, 0,2% (w/v) Glucose, 0,1% (w/v) Hefe-Extrakt, 0,003% (w/v) Fe-EDTA) bei 15 °C angezogen und nach jeweils zwei Wochen in frisches Medium überimpft. Zur Anzucht von Zellen in logarithmischer Wachstums-Phase – für anschließende Versuche – wurden die Zellen bei 30 °C über Nacht angezogen. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde hierbei 1% (v/v) einer Antibiotikum-Antimykotikum-Lösung (Anti-Anti) hinzugefügt.

### 4.2.2. Isolierung genomischer DNA aus *T. thermophila*

Zur Isolierung genomischer DNA aus *Tetrahymena thermophila* wurden zunächst 25 ml einer Kultur mit etwa  $2 \times 10^5$  Zellen/ml bei 1100×g zentrifugiert und mit 25 ml PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen. Die Zellen wurden erneut pelletiert und 1 ml DNAzol® (Invitrogen) durch vielfaches Auf- und Abpipettieren hinzugefügt. Damit Zelltrümmer, RNA und Polysaccharide extrahiert werden können, wurde bei 10.000×g 10 min bei 4 °C zentrifugiert. In dem Überstand befand sich die DNA und um diese zu präzipitieren, wurden 0,5 ml des 99,99%igen (v/v) Ethanol hinzugefügt. Die weißen DNA-Filamente wurden überführt, bei 4.000×g und 4 °C 1min zentrifugiert, mit 75%igem (v/v) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und das Pellet 10 min luftgetrocknet. Die DNA wurde in 200 µl TE-Puffer (10mM Tris-HCl pH 8,0 und 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert und nach einer Konzentrationsbestimmung mit dem Qubit® Fluorometer bei -20 °C gelagert.

### 4.2.3. Isolierung von RNA aus *T. thermophila*, cDNA Synthese und quantitative Echtzeit-PCR

Bei der RNA-Isolierung wurde stets eine Wildtyp-Kultur als Referenz verwendet. Es wurden jeweils etwa  $8 \times 10^5$  Zellen bei 1100×g zentrifugiert und 1 ml TRIzol®

(Invitrogen) auf das Zell-Pellet gegeben. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden strikt nach den Angaben des TRIzol®-Protokolls ausgeführt. Nach einer RNA-Konzentrationsbestimmung mit dem Qubit® Fluorometer wurde die RNA mit DNase behandelt, um sicherzustellen, dass sich keine DNA in der Probe befindet. Hierzu wurde das Kit „DNase I (RNase-free)“ (Fermentas) nach Anleitung angewandt. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

Bei der Synthese von cDNA wurde einzelsträngige RNA durch eine Reverse Transkriptase zu doppelsträngiger DNA transkribiert. Hierzu wurde das „iScript cDNA Synthesis Kit“ (Bio-Rad) nach Protokoll angewandt, wobei jeweils 1 µg DNase behandelte RNA eingesetzt wurde. Anschließend wurde aus diesem Ansatz je 1 µl für die quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt, welche der Quantifizierung von Nukleinsäuren dient. Ein Master Mix wurde mit „Power SYBR Green“ (Applied Biosystems) nach Protokoll angesetzt, wobei jeweils drei technische Replikate angesetzt wurden. Für die quantitative Echtzeit-PCR wurde das Gerät „StepOnePlus™“ (Applied Biosystems) verwendet und die Ergebnisse mit dem Programm Excel ausgewertet. Dabei wurden zur Quantifizierung zunächst die invertierten Mediane der Ct-Werte errechnet und jeweils mit dem Ct-Wert des Wildtypen verglichen.

#### **4.2.4. Transfektion von *T. thermophila***

Die Transfektion des Makronukleus von *Tetrahymena thermophila* ist mit der Elektroporations- und Mikroinjektionsmethode, sowohl bei vegetativ wachsenden Zellen, als auch bei konjugierenden Zellen, wirksam (Brunk & Navas, 1988; Gaertig & Gorovsky, 1992; Tondravi & Yao, 1986). Allerdings konnte keine dieser Methoden bisher erfolgreich bei der Transfektion des Mikronukleus angewandt werden. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Methode mit Hilfe einer „Biolistic Gun“ effektiv sowohl den Makronukleus vegetativer Zellen, als auch den Makro- und Mikronukleus von konjugierenden Zellen transfizieren kann (Cassidy-Hanley et al, 1997). Dabei wird die zu transfizierende Plasmid-DNA mittels einfacher Inkubationsschritte um Goldpartikel gewickelt und durch Helium-Druck in die Zellen geschossen. Zur Transfektion mit der Biolistic Gun wurde in

dieser Arbeit eine modifizierte Version des Protokolls nach Bruns und Cassidy-Hanley benutzt (Bruns & Cassidy-Hanley, 2000), wobei der Ablauf, sowohl bei vegetativen Zellen als auch bei konjugierenden Zellen, der Gleiche ist.

Es war erforderlich das jeweilige Plasmid zu linearisieren und zu reinigen. Um eine hohe Ausbeute zu erlangen, wurde zunächst eine Maxi-Plasmid-Präparation (NucleoBond® Xtra Midi/Maxi, Macherey-Nagel) vollzogen. Anschließend wurden Konstrukte mit dem Vektor pTtag durch das Restriktionsenzym *BssHII* und Konstrukte mit dem Vektor pNeo4 durch das Restriktionsenzym *PvuII* restringiert. Die Reinigung und Konzentrierung erfolgte mittels Isopropanol-Fällung. Dazu wurde dem jeweiligen Restriktionsansatz 10% (v/v) 3M NaOAc pH 5,2 und das 0,7-fache Volumen Isopropanol hinzugefügt. Der Ansatz wurde kurz gemischt und 1 h bei 4 °C und 12.000×g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und in 80 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

Für eine Transfektion waren jeweils 20 µg DNA notwendig, welche zu 60 mg Gold-Partikeln (Durchmesser: 0,6 µm) hinzugefügt wurden. Es wurden außerdem 125 µl einer 2,5 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung und 65 µl 0,1 M Spermidin hinzugefügt und 10 min bei 4-8 °C gemischt. Die DNA sollte so um die Gold-Partikel ummantelt werden, was gänzlich als Mikropartikel bezeichnet wurde. Diese Mikropartikel wurden durch Puls-Zentrifugieren (drei Mal 3500 rpm) pelletiert und mit 200 µl 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Sie wurden erneut puls-zentrifugiert, mit 200 µl 99,99%igem (v/v) Ethanol gewaschen, wieder puls-zentrifugiert und in 15 µl 99,99%igem (v/v) Ethanol gelöst. Anschließend wurde der Ansatz im Reaktionsgefäß 20 sec in einem Ultraschallbad inkubiert, damit die DNA-ummantelten Gold-Partikel im Ethanol relativ vollständig resuspendiert wurden. So konnten die Mikropartikel auf den sogenannten „Macrocarriern“ aufgetragen werden, welche danach in der Kammer der Biolistic Gun platziert wurden. Für eine Transfektion wurden 10<sup>7</sup> – in Hungermedium (10 mM Tris-HCl pH 7,5) inkubierende – Zellen verwendet, welche bei 1100×g pelletiert wurden. Der Überstand wurde nur so weit entfernt, dass etwa 500 µl Medium zum Resuspendieren der Zellen übrig blieben. Die Zellen konnten so auf

einem angefeuchteten Filter in einer Petrischale in der Kammer der Biolistic Gun platziert werden. Es wurde dann ein Vakuum von 27 psi hergestellt und durch eine „rupture disk“ konnte durch Helium ein Druck bis zu 900 psi aufgebaut werden. Sobald der Druck erreicht wurde, platzte die „rupture disk“ und die Mikropartikel wurden so auf die pelletierten Zellen geschossen. Die Zellen wurden zum Schluss in entsprechendem Medium resuspendiert.

#### 4.2.5. Markierung von *T. thermophila*-Genen

Das Plasmid pTtag (GenBank FJ89658), modifiziert nach Shang et al (2002b), besitzt einen induzierbaren Promotor und wurde in dieser Arbeit zur Markierung von Proteinen oder Protein-Abschnitten mittels GFP (grün fluoreszierendes Protein) oder HA (Hämagglutinin) verwendet. pTtag-Konstrukte wurden nur bei makronukleären Transfektionen einer sich vegetativ-vermehrenden Cu522-*Tetrahymena* Kultur verwendet. Der Cu522 Klon besitzt eine Änderung am *btu1* Gen-Lokus, welcher – neben dem *btu2* Gen –  $\beta$ -Tubulin exprimiert (Gaertig et al, 1993). Bei der Veränderung handelt es sich um eine Substitution der Aminosäure Lysin an der 350. Stelle durch Methionin (*btu1-1K350M*). Durch die Substitution weisen diese Zellen eine erhöhte Resistenz gegen Mikrotubuli-depolymerisierende Pharmazeutika, wie z.B. Oryzalin, und eine verringerte Resistenz gegen das Mikrotubuli-stabilisierende Agens Paclitaxel auf (Gaertig et al, 1994). Der Phänotyp des  $\beta$ -Tubulins bleibt dabei unverändert, da dieses weiterhin von *btu2* exprimiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass eine Transfektion, welche einen Austausch des *btu1-1K350M* mit dem Wild-typ *btu1* Gen-Fragment durch homologe Rekombination bewirkte, dazu geführt hat, dass die Zellen Paclitaxel-resistent waren und dennoch durch die Anwesenheit des *btu2* Gens weiterhin  $\beta$ -Tubulin exprimierten (Gaertig et al, 1994). Somit war es möglich Gene oder Gen-Abschnitte durch homologe Rekombination in den *btu1* Lokus zu klonieren und mit Paclitaxel zu selektieren (Gaertig et al, 1999). Nach diesem Prinzip wurden in dieser Arbeit durch das Plasmid pTtag mehrere Gene oder Gen-Abschnitte markiert. Dazu wurde das Plasmid modifiziert, indem eine GFP kodierende Sequenz an *Tetrahymenas* Codon-Spezifität angepasst wurde, die Promotor-

Region um 1 kb gekürzt wurde, einige Schnittstellen entfernt wurden und die *multiple cloning site* erweitert wurde. Anschließend konnten die Gene oder Gen-Abschnitte entweder durch die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *XhoI* oder durch *SphI* und *MluI* am 3'-Ende mit GFP oder HA kodierenden Sequenzen markiert werden. Bei Markierungen am 5'-Ende eines Gens oder Gen-Abschnitts wurden die Restriktionsschnittstellen *NsiI* und *BamHI* verwendet (Oligonukleotide siehe Anhang).

Zur Transfektion wurde eine angezogene *Tetrahymena* Cu522 Kultur ( $10^7$  Zellen) bei  $1100\times g$  zentrifugiert, mit Hungermedium gewaschen und in 50 ml Hungermedium über Nacht bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert, bevor sie dann pelletiert und transfiziert wurde (Kapitel 4.2.4.). Nach der Transfektion wurden die Zellen 2 h in SPP-Medium (mit Anti-Anti) bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert bevor  $30\text{ }\mu\text{M}$  Paclitaxel zur Selektion hinzugefügt wurde. Die Zellen wurden auf 96-well Platten zu je  $100\text{ }\mu\text{l}$  aufgeteilt und nach einer drei-tägigen Inkubation in einer Feucht-Box bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  zur ersten Selektion herangezogen. Die Transfektions-Rate des Makronukleus mit pTtag lag bei etwa 2-5%. Die jeweiligen Zellen wurden 7 Tage lang täglich in frisches SPP-Medium mit Anti-Anti und  $30\text{ }\mu\text{M}$  Paclitaxel umgesetzt. Erst dann wurde der MTT1-Promoter des pTtags durch  $\text{CdCl}_2$  (Shang et al, 2002b) induziert und damit die Expression des jeweiligen Fusions-Proteins. Bereits nach 2 stündiger Inkubation bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  konnten bei positiv transfizierten Zellen durch das GFP eine spezifische Fluoreszenz beobachtet werden. Bei HA-markierten Zellen wurden die Zellen nach der Inkubation mit  $\text{CdCl}_2$  zunächst fixiert (Kapitel 4.2.9.4.) und wiesen dann ebenfalls bei positiver Transfektion eine spezifische Fluoreszenz auf. Für weitere proteomische Analysen dieser Transformanden wurden die Zellen ebenfalls zuvor jeweils 2 h mit  $\text{CdCl}_2$  inkubiert.

#### **4.2.6. Gendelektion in *T. thermophila* (Knock-Out)**

Bei einem Knock-Out wird ein Gen, durch die Insertion einer bestimmten Resistenz-Kassette in den endogenen Locus des jeweiligen Gens, durch homologe Rekombination deletiert. In *Tetrahymena* wurden zu dem Zweck aus den angrenzenden 5'- und 3'-Bereichen eines bestimmten Gens jeweils etwa

800bp amplifiziert und in den Vektor pNeo4 (Mochizuki, 2008), welcher eine Neomycinresistenz-Kassette beinhaltet, kloniert. Damit ein Gen in *Tetrahymena* vollkommen deletiert werden kann, war es zudem notwendig, den Mikronukleus zu transfizieren, welcher zunächst aktiviert werden musste (Dave et al, 2009). Aus diesem Grunde wurde die Konjugation der komplementären Paarungs-Kulturen Cu428 und B2086 initiiert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 30 °C angezogen und anschließend jeweils zu einer Zellkonzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in 50 ml Hungermedium resuspendiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Das Mischen der beiden Kulturen in einem 1:1 Zellzahl-Verhältnis initiierte die Konjugation und die Zellen wurden im Dunkeln bei 30 °C für 2-4 h inkubiert, bevor sie dann zentrifugiert und transfiziert wurden (Kapitel 4.2.4.). Nach der Transfektion wurden die Zellen in 50 ml Hungermedium resuspendiert und inkubierten 12-18 h bei 30 °C. Anschließend wurden sie in 50 ml SPP-Medium mit 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub>, welches den MTT1-Promotor der Neomycinresistenz-Kassette induziert, überführt und inkubierten nochmals 2 h bei 30 °C. Erst dann wurden 100 µg/ml Paromomycin zur Selektion hinzugefügt und die Zellen in 96-well Platten zu je 100 µl gesplittet und drei Tage in einer Feucht-Box bei 30 °C inkubiert. Um zu untersuchen, ob resistente Zellen tatsächlich Keimbahn-Transformanden (G1 Transformanden) waren, und um somatische Transformanden aus zu selektieren, wurden die Zellen mit Hilfe eines 96-well Replikators in SPP-Medium mit 15 µg/ml 6-Methylpurin umgesetzt. Die Cu428 Kultur besitzt im Mikronukleus eine Methylresistenz-Kassette, wobei nur Keimbahn-Transformanden aufgrund der Entwicklung eines neuen Makronukleus eine Resistenz aufweisen konnten. Anschließend sollten die Zellen im Makronukleus die Resistenz gegen Paromomycin verlieren, wozu das Prinzip des „*phenotypic assortments*“ ausgenutzt wurde. Dazu wurden die G1-Transformanden 12-16 Tage täglich in frisches SPP-Medium ohne jegliche Selektionsdroge überimpft, bis sie schließlich die Resistenz verloren hatten. Es folgte ein Kontroll-Schritt, in dem untersucht wurde, ob die G1-Transformanden die Neomycinresistenz-Kassette im mikronukleären Genom enthielten und damit heterozygote G1-Transformanden vorlagen. Hierzu wurden die G1-Transformanden mit der Cu427-Kultur konjugiert, welche eine Cycloheximid-

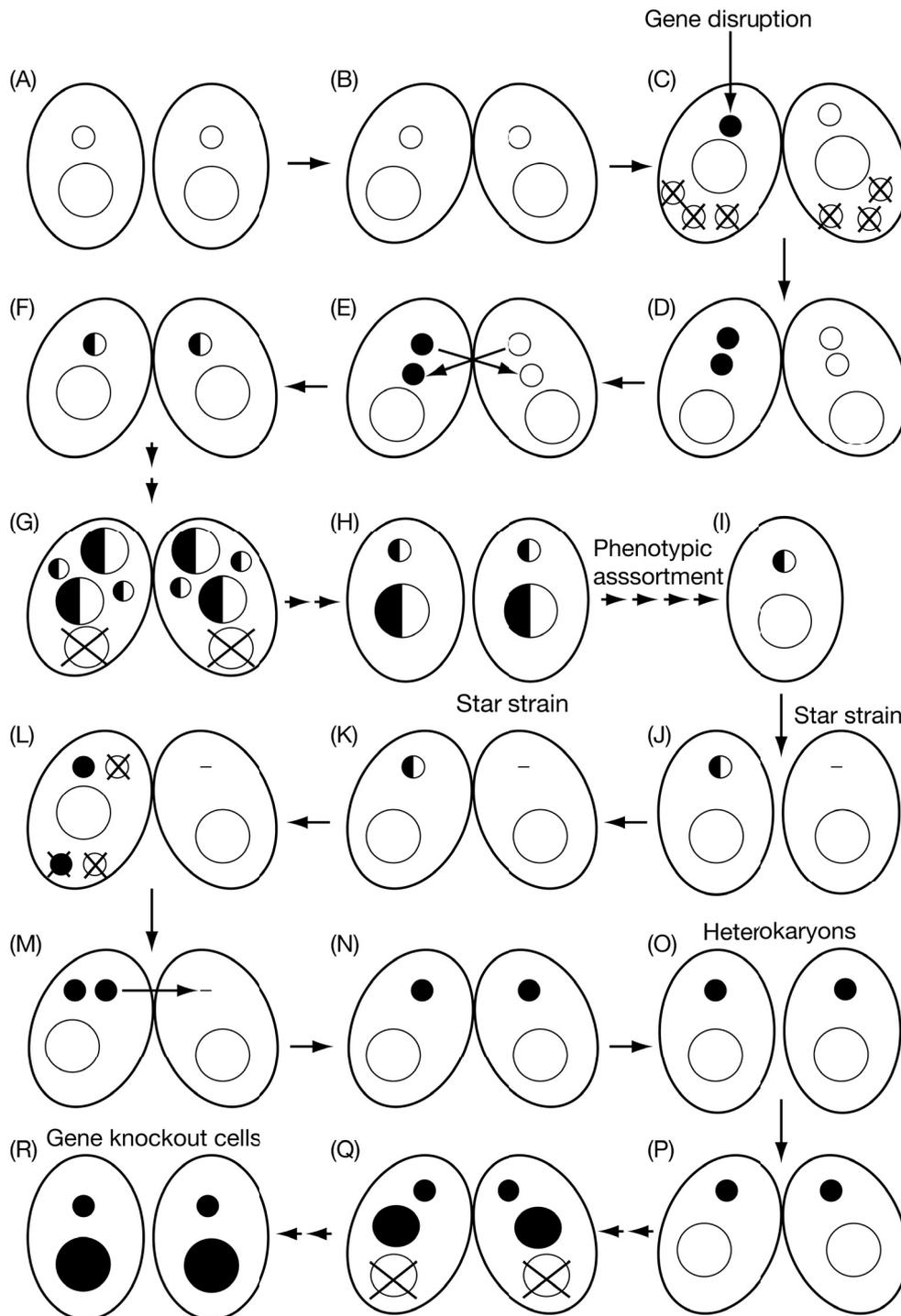


Abb.8: Schematische Darstellung der Entwicklung eines Knock-Out Heterokaryonten. In A bis H wird die Entstehung eines heterozygoten G1-Transformanten durch die Transfektion konjugierender Zellen gezeigt. In I wird ein G1-Transformant dargestellt, welcher die Resistenz-Kassette im Makronukleus durch das „phenotypic assortment“ verloren hat. Die Kreuzung eines solchen G1-Transformanten mit einem Klon ohne Mikronukleus (*star strain*) führt zu einem G2-Transformanten (Heterokaryonten), der homozygot für das ausgeschaltete Gen im Mikronukleus ist (J-N). Eine Konjugation zweier Heterokaryonten führt letztlich zu Nachkommen, die sowohl im Mikro- als auch im Makronukleus homozygot für das ausgeschaltete Gen sind (O-R). (Dave et al, 2009)

Resistenz aufwies und damit als Marker dienen konnte. Bei einem positiven G1-Transformanden wurde dieser letztlich mit einem „Star-Strain“ (A\*III-Kultur) konjugiert, welcher keinen Mikronukleus besitzt und letztlich dazu führte, dass ein homozygoter Klon für die Neomycinresistenz-Kassette entstehen konnte.

#### **4.2.7. Herunter-Regulierung eines Gens in *T. thermophila* (Knock-Down)**

Zur Herunter-Regulierung eines Gens in *T. thermophila* wurde jeweils das gleiche Konstrukt, das beim Knock-Out eingesetzt wurde, verwendet. Jedoch wurde damit nicht der Mikro-, sondern der Makronukleus transfiziert und anschließend die Konzentration der Selektionsdroge erhöht. Es wurde die *Tetrahymena* Cu428-Kultur über Nacht bei 30 °C angezogen, in Hungermedium umgesetzt und erneut über Nacht bei 30 °C inkubiert. Nachdem die Zellen – wie in Kapitel 4.2.4. beschrieben – transfiziert wurden, wurden sie in SPP-Medium mit 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> resuspendiert und eine Stunde bei 30 °C inkubiert, bevor 50 µg/ml Paromomycin zur Selektion hinzugefügt wurden und die Zellen in 96-well Platten zu je 100 µl aufgeteilt wurden. Nach dreitägiger Inkubation bei 30 °C in einer Feucht-Box wurden 48 einzelne Paromomycin-resistente Zellen in Medium mit bereits erhöhter Paromomycin-Konzentration (75 µg/ml) umgesetzt. Über zwei Wochen wurde täglich die Paromomycin-Konzentration bis zu 1 mg/ml erhöht, bevor dann Versuche wie die Immunfluoreszenz-Mikroskopie, DNA- und RNA-Isolierung vollzogen wurden.

#### **4.2.8. Protein-Isolierung aus *T. thermophila***

Für die Protein-Isolierung aus *Tetrahymena thermophila* wurden 10 bis 15 ml Kultur angezogen, mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml. Die Kultur wurde bei 1100×g zentrifugiert, mit 10 mM Tris-HCl gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysis-Puffer (0,3 M NaCl, 1% CHAPS (w/v) in PBS) und 15 µl Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich) resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen durch fünf Ultraschall-Impulse zu je 10 sec aufgeschlossen. Zwischen den einzelnen Ultraschall-

Impulsen wurden die Proben zu je 10 sec auf Eis gelagert, um eine Überhitzung und eine eventuelle Aktivierung von Proteasen zu vermeiden. Die Kraft, die den Aufschluss durch Ultraschall ermöglicht, heißt Kavitationskraft (Patek et al, 2004) und bewirkt ein gegenseitiges Aneinanderstoßen der Zellen, was letztlich zu deren Zerstörung führt. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde das Qubit Quant-iT Protein Assay Kit verwendet. Das Lysat wurde bei -20 °C gelagert.

#### **4.2.9. Proteomische Methoden**

##### **4.2.9.1. Elektrophoretische Trennung von Proteinen (SDS-PAGE)**

Mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) wurden die Proteine ihrer Größe nach elektrophoretisch getrennt. Dazu wurden Standardprotokolle (Sambrook et al, 1989) für 8 bis 12%ige Trenngele, in Kombination mit Elektrophoresekammern der Firma Peqlab, verwendet, oder das Mini-Protean® Tetra System mit Mini-Protean® TGX Stainfree™ Gels der Firma Bio-Rad. Bevor die Proben aufgetragen wurden, wurden sie mit 1× Laemmli-Puffer (10mM Tris, 1mM EDTA, 1% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 10% (v/v) Glycerin, 0,05% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Des Weiteren wurde der vorgefärbte („prestained“) Marker Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad) eingesetzt.

##### **4.2.9.2. Western Blot**

Beim Western Blot werden Proteine eines SDS-Polyacrylamid-Gels durch das Anlegen einer elektrischen Spannung auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond™ C Extra, GE Healthcare) transferiert (Towbin et al, 1979). Hierzu wurden drei Lagen in Transferpuffer (40 mM Glycin, 50 mM Tris-Puffersubstanz, 1 mM SDS und 20% (v/v) Methanol) getränktes Whatman-Papier, die Nitrocellulosemembran, das in Transferpuffer getränkte SDS-Gel und drei weitere in Transferpuffer getränkte Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei auf die Anode des Trans-Blot®

Turbo Transfer-Systems der Firma Bio-Rad aufgetragen, mit der Kathode bedeckt und nach Anweisung des Trans-Blot® Turbo Transfer-Systems gestartet. Teilweise wurden kommerzielle Gele (Mini-Protean® TGX Stainfree™ Gel, Bio-Rad) verwendet, die in Kombination mit entsprechender Membran (Trans-Blot® Turbo™ Membran, Bio-Rad) den gesamten Vorgang verkürzten. Letztlich konnte durch den bei der SDS-PAGE verwendeten Precision Plus Protein™ Dual Color Standards-Marker bei einer Anfärbung der Membran nachgewiesen werden, dass der Western-Blot erfolgreich war.

#### 4.2.9.3. Immunodetektion

Um bestimmte Proteine auf einer aus einem Western Blot resultierenden Nitrocellulosemembran zu markieren und nachzuweisen, wurde diese immunologisch behandelt. Zur Absättigung der Membran wurde sie zunächst für 1 h in TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl und 0,1% (v/v) Tween 20) mit 5% (w/v) Magermilchpulver geschwenkt. Anschließend wurde der primäre Antikörper ( $\alpha$ -HA 1:4.000,  $\alpha$ -GFP 1:1.000 und  $\alpha$ -Alveolin 1:250) in TBS-T mit 3% Magermilchpulver gelöst. Die Membran wurde in dieser Lösung entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf einem 3D-Schüttler inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit TBS-T, wobei zwischenzeitlich der sekundäre Antikörper (sowohl ImmunoPure Ziege Anti-Maus IgG, Peroxidase Konjugat, als auch ImmunoPure Ziege Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase Konjugat 1:10.000) in TBS-T mit 10% Magermilchpulver gelöst wurde. Darin inkubierte anschließend die Membran 1 h bei Raumtemperatur auf einem 3D-Schüttler. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut drei Mal mit TBS-T gewaschen.

Die Detektion erfolgte mittels dem „SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate“ Kit (Thermo Scientific), wobei die beiden Lösungen „Enhancer“ und „Stable Peroxide“ – im Verhältniss 1:1 gemischt – auf die Membran gegeben und für 5 min inkubiert wurden. Dabei katalysiert das Peroxidase Konjugat des sekundären Antikörpers die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid. Dadurch entsteht Chemilumineszenz, welche auf einem Film

detektiert und fixiert werden kann, oder mittels eines Chemidocs (Universal-Hood III, Bio-Rad) aufgezeichnet werden kann.

#### 4.2.9.4. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie können bestimmte Proteine durch Antikörper in einer Zelle lokalisiert werden. Der Nachweis beruht auf der spezifischen Bindung zwischen dem Epitop eines Proteins und Antikörper. Dabei sind die sekundären Antikörper mit Fluoreszenz-Farbstoffen gekoppelt, welche bei Anregung mit einem Laser bestimmter Wellenlängen fluoreszieren.

Zunächst wurden etwa  $10^6$  *Tetrahymena* Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase bei 1100×g zentrifugiert und mit 10 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen. Die anschließende Fixierung der Zellen erfolgte entweder direkt auf Silan oder Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern, nach dem Protokoll von Thazhath (Thazhath et al, 2002) oder im 1,5 ml-Reaktionsgefäß, basierend auf dem Protokoll von Gaertig (Gaertig & Fleury, 1992). Dabei wurden die pelletierten Zellen in 4% (v/v) in PHEM-Puffer (60 mM PIPES; 25 mM HEPES; 10 mM EGTA und 2 mM  $MgCl_2$ , pH 6,9) (Schliwa & van Blerkom, 1981) gelöstes PFA resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur auf einem Rotor (MACSMix™ Tube Rotator) inkubiert. (Alle folgenden Inkubationsschritte im 1,5 ml-Reaktionsgefäß fanden auf dem Rotor statt.) Anschließend wurden die Zellen bei 500×g zentrifugiert, der Überstand entfernt und in PBS mit 0,1% (v/v) Triton-x 100 und 0,1 M Glycin 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diese Lösung wurde die Zellmembran permeabilisiert, wodurch die Antikörper ihre Epitope innerhalb der Zelle binden konnten. Als nächstes wurden sowohl die Zellen, die direkt auf einem Objektträger, als auch die, die im 1,5 ml-Reaktionsgefäß fixiert wurden, zur Absättigung, in PBS mit 1% (w/v) BSA 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte der primäre Antikörper, welcher in PBS mit 0,1% (w/v) BSA ( $\alpha$ -HA 1:500,  $\alpha$ -Tub 1:100,  $\alpha$ -Alveolin 1:100) gelöst wurde. Die Inkubation wurde entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C vollzogen. Es folgten drei Waschrritte in PBS mit 0,05% (v/v) TX-100 zu je 5 min und der sekundäre Antikörper (Alexa fluor 488, anti Maus, IgG 1:1.000; Alexa fluor 680, anti Maus, IgG 1:750; Alexa fluor 633,

anti-Kaninchen, IgG 1:1.000), welcher 1 h bei Raumtemperatur inkubierte. Zuletzt wurden die Zellen erneut drei Mal mit PBS mit 0,05% (v/v) TX-100 gewaschen bevor sie in 10 bzw. 20  $\mu$ l Vectashield Mounting Medium mit DAPI (Vecta Labs Inc.) resuspendiert wurden. Von den Zellen, die im Reaktionsgefäß fixiert wurden, wurden 10  $\mu$ l auf ein Objektträger pipettiert. Bei beiden Versuchen wurde das Deckgläschen mit Glycerol-Gelatine (Sigma-Aldrich) versiegelt und die Proben wurden dunkel bei 4 °C gelagert.

Nur wenige der Proben wurden am konfokalen Fluoreszenzmikroskop LSM 510 (Zeiss) am Institut für Genetik ausgewertet; die meisten Proben wurden am LSM 710 (Zeiss) am Institut für Stoffwechselfysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ausgewertet.

#### **4.2.10. Dauerkulturen von *T. thermophila***

Zur Anlage von Dauerkulturen wurden die Zellen zunächst in 25 ml Neff-Medium (0,25% (w/v) Proteose Pepton, 0,25% (w/v) Hefe-Extrakt, 0,55% (w/v) Glucose, 33  $\mu$ m FeCl<sub>3</sub> und 1% (v/v) Anti-Anti) in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben über Nacht bei 30 °C angezogen (Cassidy-Hanley et al, 1995). Anschließend wurden  $2 \times 10^5$  Zellen bei 1100xg zentrifugiert und in 25 ml einer 10 mM Tris-HCl-Lösung (pH 7,5) resuspendiert. Nach einer dreitägigen Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen bei 1100xg zentrifugiert und im 0,25 ml Rest-Medium hinterlassen. Es wurde 1 ml 10 % DMSO (verdünnt in 10mM Tris-HCl-Lösung (pH 7,5)) hinzugefügt und die Zellen im Anschluss zu 0,3 ml in 2 ml Kryo-Röhrchen aliquotiert. Die Röhrchen wurden 30 min in einem Nalgene -1 °C Kryo-Behälter bei Raumtemperatur und anschließend – samt des Behälters – bei -80 °C gelagert. Der Nalgene -1 °C Kryo-Behälter gewährleistet hierbei eine langsame Abkühlung von einem Grad pro Minute. Nach 24 h wurden die Kryo-Röhrchen aus dem Nalgene -1 °C Kryo-Behälter in flüssigen Stickstoff transferiert.

Zur erneuten Anzucht wurden die Dauerkulturen aus dem flüssigen Stickstoff rasch in ein 42 °C-Wasserbad übertragen und zunächst 15 sec inkubiert. Zu den Zellen wurde 1,7 ml aufgewärmtes SPP-Medium hinzugefügt und im 42 °C-Wasserbad für 45 sec inkubiert. Der gesamte Inhalt des Kryo-Röhrchens (2

ml) wurde dann in ein 50 ml-Falconröhrchen mit 5 ml aufgewärmtem SPP-Medium übertragen und bei 30 °C über Nacht inkubiert.

#### **4.2.11. Anzucht von humanen, epithelialen Vaginalzellen (*vaginal epithelial cells*; VECs)**

Die VECs wurden in T75-Kulturflaschen (VWR) mit 25 ml Voll-Medium (45% (v/v) Keratinocyte-SFM; 45% (v/v) DMEM und 10% (v/v) fötales Kälberserum), welches mit 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin zur Vermeidung von Kontaminationen versehen wurde, in einem 37 °C-Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub>-Anteil angezogen. Nach jeweils zwei bis drei Tagen wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden sie zunächst zwei Mal mit je 10 ml 1× PBS gewaschen und mit 3 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung etwa 5 min bei 37 °C inkubiert. Das EDTA dient dabei als Ca<sup>2+</sup>-Chelator, der vor allem die Zell-Zell-Verbindungen löst und das Trypsin löst die Zell-Matrix Verbindungen, wodurch letztlich die adhärenen Zellen von der Kulturflasche abgelöst wurden. In diesem Schritt war es wichtig, die Inkubationszeit nicht zu verlängern, da sonst die Zellen irreversibel geschädigt werden konnten. Damit das Trypsin und EDTA inaktiviert wurden, wurde als nächstes serumhaltiges Voll-Medium hinzugefügt, wobei das Serum sowohl die Inaktivierung des Trypsins bewirkte, als auch teilweise das cytotoxische EDTA gebunden hat. Die Zellen wurden bei 600×g und 18 °C 5 min zentrifugiert, das Voll-Medium abgesaugt und die Zellen in geringem Volumen (etwa 2 ml) resuspendiert. Das Verdünnungsoptimum der VECs liegt bei 1:5, demnach wurden 400 µl der Zellen in einer neuen Kulturflasche ausgesät und frische 25 ml Voll-Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden in einer Kulturflasche mit Filterdeckel im Brutschrank inkubiert.

#### **4.2.12. Transfektion von VECs**

Das Plasmid, mit dem die VECs transfiziert wurden, bestand aus einem *Tetrahymena* spezifischen Gen (synthetisches CRMP), welches durch den human-spezifischen Vektor pEGFP-N1 (GenBank U55762) am 3'-Ende mit GFP

markiert wurde. Die VECs wurden zunächst zwei Mal mit je 10 ml 1× PBS gewaschen und mit 3 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung etwa 5 min im Brutschrank inkubiert. Als nächstes wurde serumhaltiges Voll-Medium hinzugefügt und die Zellen wurden in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt, worin sie dann bei 600×g und 18 °C 5 min zentrifugiert wurden. Das Voll-Medium wurde abgesaugt und die Zellen in geringem Volumen (etwa 5 ml) resuspendiert. Nun konnte die Zellzahl mittels Thoma-Zählkammer bestimmt werden. Die Zellen wurden zu  $1-8 \times 10^4$  Zellen in je 100  $\mu$ l in 96-well spezielle, schwarze Platten (Greiner Bio-One) pipettiert, welche bei Fluoreszenz-Aufnahmen keine Auto-Fluoreszenz erzeugen. Die Zellen wurden in den Brutschrank gestellt, so dass der Ansatz für die Transfektion zusammenpipettiert werden konnte. Für einen Ansatz, d.h. für die Transfektion von  $1-8 \times 10^4$  Zellen in einem Well, wurden 0,2  $\mu$ g Plasmid-DNA, welche zuvor in 1  $\mu$ l TE-Puffer mit 49  $\mu$ l Serum-freiem Medium gelöst wurden (50% (v/v) Keratinocyte; 50% (v/v) DMEM) und mit 0,75  $\mu$ l des Attractene Reagenz (Qiagen) 15 min bei Raumtemperatur inkubierten, zu den Zellen hinzugefügt. Nach 6 h wurden die Zellen vorsichtig mit 100  $\mu$ l PBS gewaschen und in frischem Voll-Medium mit Penicillin/Streptomycin, zur Vermeidung von Kontaminationen, resuspendiert. Erst 24 h später wurde das Antibiotikum G418 zur Selektion hinzugefügt. Die Ausbeute lag bei etwa 3%.

#### **4.2.13. Dauerkulturen von VECs**

Zur Anlage von Dauerkulturen wurden die Zellen, wie in Kapitel 4.2.11 beschrieben, 2-3 Tage in Voll-Medium angezogen. Anschließend wurden sie mit 1× PBS gewaschen und ein Trypsin-Verdau wurde durchgeführt. Die pelletierten VECs wurden dann in Gefrier-Medium (22,5% (v/v) Keratinocyte; 22,5% (v/v) DMEM; 45% (v/v) fetales Kälberserum und 10% (v/v) DMSO) vorsichtig resuspendiert, zu je 1,5 ml in Kryo-Röhrchen aliquotiert und zunächst direkt auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Röhrchen in einem Nalgene -1 °C Kryo-Behälter bei -80 °C weggefroren. Nach 24 h wurden die Kryo-Röhrchen aus dem Nalgene -1 °C Kryo-Behälter in flüssigen Stickstoff transferiert und dort gelagert.

Zur erneuten Anzucht wurde zu den Dauerkulturen aufgewärmtes Voll-Medium hinzugefügt und angetaute Zellen wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt bis das gesamte Kryo-Röhrchen leer war. Damit die Konzentration des DMSO verringert wurde, wurde zügig das Volumen auf 12 ml erhöht. Die Zellen wurden bei 600xg und 18 °C 5 min lang zentrifugiert und zunächst in geringem Volumen resuspendiert, bevor sie dann ausgesät wurden und 25 ml Voll-Medium hinzugefügt wurde. Mit angedrehtem Deckel wurden die Zellen in den 37 °C-Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub>-Anteil gestellt.

#### **4.2.14. Klonierung**

##### **4.2.14.1. Anzucht von *Escherichia coli***

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme in Flüssig- und auf Festmedium und die Herstellung der jeweiligen Medien erfolgte nach Standardprotokollen von Sambrook et al (1989). Zur Kontrolle von erfolgreichen Transformationen wurden die Zellen auf Agar-Platten kultiviert, welche mit jeweiligen Antibiotika versetzt waren.

##### **4.2.14.2. Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR (*polymerase chain reaction*) dient der Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen (Mullis et al, 1992). Im Rahmen dieser Arbeit wurde entweder die Phusion® Polymerase (Biolabs) oder die Velocity Polymerase (Bioline) verwendet. Beide Polymerasen haben eine Korrekturlese-Funktion (*proof-reading*) und erkennen falsch eingebaute Nukleotide und korrigieren sie. Die Menge aller Substanzen eines Ansatzes (wie z.B. genomische DNA, Oligonukleotide, dNTPs, Puffer, Polymerase) wurde strikt nach Anleitung der jeweiligen Protokolle der Polymerasen eingehalten. Ein Standard-PCR-Programm im PCR-Thermocycler hatte einen Ablauf, wie folgt:

98 °C	30 sec	Initiale Denaturierung
98 °C	10 sec	Denaturierung
53±10 °C	10 sec	Annealing
72 °C	15-30 sec/kb	Elongation
72 °C	5 min	Finale Elongation

Im Anschluss wurde zu den Amplikons 1× Ladepuffer hinzugefügt und anschließend wurden sie auf einem 0,8-1,5% (w/v) Agarose-Gel nach ihren Basenpaar-Größen elektrophoretisch getrennt (Sambrook et al, 1989).

#### 4.2.14.3. Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Elution von DNA-Fragmenten wurde das „QIAquick® MinElute Gel Extraction Kit“ (QIAGEN GmbH) verwendet, welches auf der Bindung der DNA an eine Silikamembran von QIAquick® Säulen unter sauren pH-Bedingungen beruht. Kontaminationen und andere Gelrückstände können durch diese Methode einfach gewaschen werden. Zum Schluss wird die DNA von der Silikamembran gelöst und durch einen finalen Zentrifugations-Schritt in einem Reaktionsgefäß aufgefangen.

#### 4.2.14.4. Klonierung von PCR-Produkten in den pJet1.2 Vektor

Die Klonierung eines PCR-Produkts in den pJet1.2 Vektor dient hauptsächlich der Vermehrung eines Amplifikats. Hierzu wurde zunächst die eluierte DNA mit dem Vektor, welcher eine Ampicillin-Resistenzkassette besitzt, nach dem Protokoll des CloneJet PCR cloning Kit ligiert (mindestens 5 min bis höchstens 30 min bei Raumtemperatur) und anschließend wurden damit ultrakompetente *Escherichia coli* Zellen (XL1-Blue) transformiert. Dazu wurden 5 µl eines Ligationsansatzes zusammen mit 100 µl der ultrakompetenten Zellen gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden sie auf LB-Agar-Platten, die mit Ampicillin versetzt waren, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Erfolgreich transformierte Bakterienkolonien wurden in 4 ml LB-Medium (1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt), das ebenfalls mit Ampicillin versetzt war, umgeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

#### **4.2.14.5. Plasmidpräparation, Sequenzierung, Restriktion**

Die Plasmidpräparation erfolgte mittels dem „Plasmid DNA Purification“-Kit (Genscript). Hierbei wird das Prinzip der alkalischen Lyse genutzt, wobei bakterielle DNA denaturiert und als Präzipitat abgetrennt werden kann. Die Plasmid-DNA kann so aus dem Überstand mittels Silikamembran einer Säule isoliert werden.

Die Sequenzierungen der DNA wurden sowohl von der Firma GATC Biotech AG, als auch von der Firma Metabion MWG Operon durchgeführt. Sobald positive Ergebnisse einer Sequenzierung erhalten wurden, wurde der nächste Schritt initiiert.

Die amplifizierte DNA (Insert) wurde aus dem Vektor pJet1.2 restringiert, um in einen finalen Vektor kloniert werden zu können. Zu dem Zweck wurden bereits in die Oligonukleotide, die unter anderem zur Amplifizierung der DNA dienten, Erkennungs-Sequenzen für die jeweiligen Restriktionsendonukleasen eingebaut. Es wurde jeweils 1 U Restriktionsendonuklease für etwa 100 ng DNA eingesetzt und die Restriktion fand bei der für die Restriktionsendonukleasen vorgesehene Temperatur etwa 1 h statt. Anschließend wurde der Ansatz mit 1x Ladepuffer versehen und auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch getrennt und eluiert.

#### **4.2.14.6. Klonierung eines PCR-Produkts in den Zielvektor**

Bevor ein PCR-Produkt in den finalen Vektor kloniert werden konnte, wurde der Vektor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen restringiert, wie das jeweilige PCR-Produkt, auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch getrennt und eluiert. Nun konnte das Insert mit dem Vektor in 1x „Quick Ligation Buffer“ der Quick T4 DNA Ligase ligiert werden. Das Verhältnis der Mengen eines Ansatzes wurde nach dem Protokoll eingehalten. Ein Ligationsansatz wurde etwa 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen, die Ausplattierung auf LB-Platten, die mit den jeweiligen Antibiotika versetzt waren,

eine Umimpfung in LB-Medium und letztlich die Plasmidpräparation (Kapitel 4.2.14.5).

#### 4.2.15. Bioinformatische Methoden

Aus der Genom Datenbank TGD (*Tetrahymena Genome Database*; [www.ciliate.org](http://www.ciliate.org)) konnten Sequenzen aus dem Genom *Tetrahymenas* bezogen werden. Bei TetraFGD (*Tetrahymena Functional Genomics Database*, <http://tfgd.ihb.ac.cn/>, (Miao et al, 2009)) konnte zudem unter anderem untersucht werden, wie hoch ein bestimmtes Gen exprimiert ist. Sequenzvergleiche erfolgten mit BLAST (Altschul et al, 1997) des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und wurden hauptsächlich mit Proteinsequenzen durchgeführt. Mit BLAST konnten zudem putative SMC- und Viral A-Diomänen gezeigt werden. Das Molekulargewicht eines Proteins wurde mit PeptideMass ([http://web.expasy.org/peptide\\_mass/](http://web.expasy.org/peptide_mass/), ExPASy) errechnet. CRMPs wurden mit Hilfe von Xstream (<http://jimcooperlab.mcdb.ucsb.edu/xstream/>) und RADAR (*Rapid Automatic Detection and Alignment of repeats in protein sequences*; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/radar/>) – wie in Gould et al. 2011 beschrieben – ermittelt. RADAR wurde zudem dazu genutzt, eine Aminosäuresequenz in verschiedene Bereiche zu unterteilen. Das Programm Multicoil wurde verwendet, um putative coiled-coil Domänen nachzuweisen (<http://theory.lcs.mit.edu/multicoil>) (Wolf et al, 1997). Sequenzanalysen wurden mit dem Programm Sequencher 5.0.1 (Gene Codes) durchgeführt. Bildbearbeitungen erfolgten mittels ImageJ (Collins, 2007), Photoshop Elements (Adobe) oder Illustrator CS4 (Adobe).

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Spezifische Domänen von *TtALV2* führen zu unterschiedlichen Zytoskelett-Assoziationen

In *Tetrahymena thermophila* konnten zwei Alveolin-Proteine identifiziert werden, *TtALV1* (TTHERM\_00945250) und *TtALV2* (TTHERM\_00088030) (Gould et al, 2008a), wobei weitere Analysen diese zudem als CRMPs definieren konnten (Gould et al, 2011). In dieser Arbeit wurde das kleinere der beiden Proteine *TtALV2* (GenBank ID FJ789659) mit einer Aminosäuresequenz-Länge von 568 AS

```

304-328  .EV.KIINKETV..K.....EIVIEKP...IE
337-367  IEKVKEIPKIEFVDKekviekPFFVEKL...VD
387-410  VEVPRFIPKEVLVDR.....PVYVDRP...VE
417-440  VKVPQIVEKEKLVER.....PVFIEKP...VD
442-463  .....FIEKETFIDR.....PVYIQEPpvhIE
466-490  IEVPKIIEKQKIIDR.....PIYINQP...rIE

```

Abb.9: Ausschnitt aus dem ‚charged repeat motif‘ aus *TtALV2* (Bereich der Aminosäuren 304-490). Die schwarz markierten Aminosäuren stellen jene dar, die in der repetitiven Sequenz nicht eindeutig wiederholt werden und damit an den Stellen zu Lücken (Punkte) führen.

und einer vorhergesagten Größe von 67,8 kDa näher charakterisiert. Zunächst wurde mit Hilfe des Internet-Tools RADAR (*Rapid Automatic Detection and Alignment of Repeats in protein sequences*) untersucht, in welchem Bereich der Aminosäuresequenz von *TtALV2* die repetitiven Aminosäure-Sequenzen auftreten. Dadurch konnte *TtALV2* in drei Domänen unterteilt werden; den CRM-Bereich (im Bereich der Aminosäuren 92-490) (Abb.9) und die N- und C-Termini (Aminosäuren 1-91 und 491-568), die den CRM-Bereich flankieren. Die Termini weisen beide keine konservierten oder repetitiven Motive auf. Das Protein wurde mittels spezifischem Antikörper (anti-Alveolin, auch anti-74 genannt (Gould et al, 2008a)), welcher eine Peptidsequenz aus der charakteristischen repetitiven Region des Proteins bindet, analysiert. Bei einem Western Blot mit Gesamtzellextrakt aus *T. thermophila* markierte der Antikörper eine distinkte Bande bei etwa 65 kDa, was

mit dem vorhergesagten Molekulargewicht von *TtALV2* kongruiert (Abb.10, Spur A). Anschließend wurde das Protein *TtALV2 in situ* mittels des anti-Alveolin Antikörpers durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass *TtALV2* in seiner endogenen Form fleckenförmige Strukturen in der Peripherie *Tetrahymenas* bildet (Abb.10A). Die zusätzliche Markierung der Mikrotubuli durch einen anti-Tubulin Antikörper konnte zudem demonstrieren, dass das Protein genau zwischen und entlang der longitudinalen Mikrotubuli lokalisiert (Abb.10A) und jeweils von den Ring-Komplexen (*circumciliary rings*) ausgeschlossen ist (Anhang, Abb.25A).

Um *TtALV2* näher zu analysieren und auch die Spezifität des Antikörpers weiter zu testen, wurde ein Fusions-Konstrukt erstellt, indem *TtALV2* am C-Terminus mit GFP markiert wurde (*ALV2::GFP*; 94 kDa). Nach einer erfolgreichen Transfektion von *Tetrahymena* wurde diese Kultur zur Induktion der Fusions-Protein-Expression zwei Stunden mit Cadmiumchlorid ( $\text{CdCl}_2$ ) inkubiert. Anschließende Western Blots (mit anti-GFP und anti-Alveolin) mit Gesamtzellextrakt zeigen, dass das Fusions-Protein das korrekte Molekulargewicht aufweist und dass kein Überexpressions-Artefakt vorliegt. Bei dem Western Blot mit anti-GFP ist ein Signal bei etwa 100 kDa zu sehen, welches mit der vorhergesagten Größe von *ALV2::GFP* übereinstimmt (Abb.10, Spur B). Dieses Signal ist auch bei dem anti-Alveolin-Western Blot zu detektieren, zudem wurde hierbei ebenfalls das endogene Protein detektiert (Abb.10, Spur B). Damit das Fusions-Protein *ALV2::GFP* auch in *T. thermophila* lokalisiert werden konnte, wurden die Zellen zunächst mit  $\text{CdCl}_2$  inkubiert, um die Expression des Fusions-Proteins zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen fixiert. Zur Detektion des GFPs am Fluoreszenz-Mikroskop war es nicht nötig, die Zellen mit einem anti-GFP Antikörper zu markieren, weil das GFP, selbst nach der Fixierung der Zellen, weiterhin fluoreszierte. Interessanterweise lokalisiert *ALV2::GFP* nicht wie das endogene *TtALV2*, jedoch in der Peripherie der Zelle. Das Fusions-Protein *ALV2::GFP* assoziiert mit den ciliären Basalkörpern *T. thermophilas* und bildet ausgehend von diesen faden-förmige Strukturen aus (Abb.10B Pfeile) und ist auch in der Region des Cytostoms zu beobachten. In Folge dessen wurden die Zellen,

die das Fusions-Protein ALV2::GFP exprimierten, auch mit dem anti-Alveolin Antikörper markiert; dadurch konnte sowohl das endogene Protein *Tt*ALV2 als auch das Fusions-Protein ALV2::GFP gleichzeitig in der Zelle nachgewiesen werden (Anhang Abb.25B).

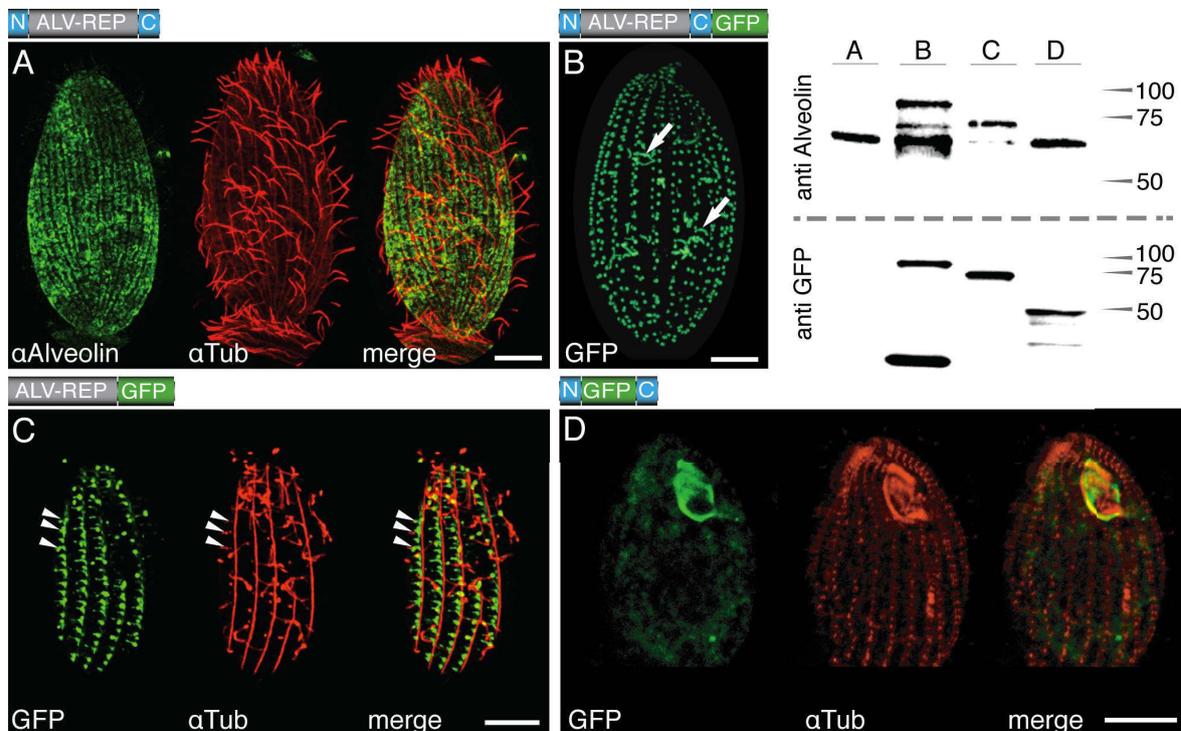


Abb.10: Lokalisation von *Tt*ALV2 und einzelner Abschnitte des Proteins in *T. thermophila*. A: Lokalisation des endogenen *Tt*ALV2 (68 kDa) mittels anti-Alveolin. *Tt*ALV2 lokalisiert als fleckenförmige Struktur zwischen den longitudinalen Mikrotubuli, was besonders durch die gleichzeitige Markierung von Tubulin deutlich wird. B: Markierung von *Tt*ALV2 am C-Terminus mit GFP (*Tt*ALV2::GFP, 94 kDa). Das Fusions-Protein lokalisiert an den Basalkörpern und bildet fädige Strukturen aus (Pfeile). C: Bei der Markierung des repetitiven Bereiches von *Tt*ALV2 (ALV2-REP::GFP, 73 kDa) ist eine Assoziation mit mikrotubulären Strukturen, wie den transversalen Mikrotubuli (Pfeilspitzen) und auch den Basalkörpern zu sehen. D: Der Austausch des repetitiven Bereiches durch das GFP (N::GFP::C, 46 kDa) führt überwiegend zu einer Cytostom-Lokalisation dieses Fusions-Proteins. Der Skalierungsbalken misst 10  $\mu$ m. Die Western Blots (oben rechts) zeigen die Proteinextrakte der jeweiligen Kulturen aus A-D markiert mit anti-Alveolin und anti-GFP Antikörpern. Markerbanden in Kilodalton. (El-Haddad et al, 2013)

Aufgrund der ungleichen Lokalisationen des endogenen *Tt*ALV2, verglichen mit dem Fusions-Protein ALV2::GFP, sollte die Markierung durch das GFP näher analysiert werden. Hierzu wurde zunächst GFP allein in *T. thermophila* exprimiert, um auszuschließen, dass die periphere Assoziation durch das GFP bedingt war.

Das GFP ist sowohl löslich im Zytosol als auch im Makronukleus *Tetrahymenas* zu detektieren (Abb.11).

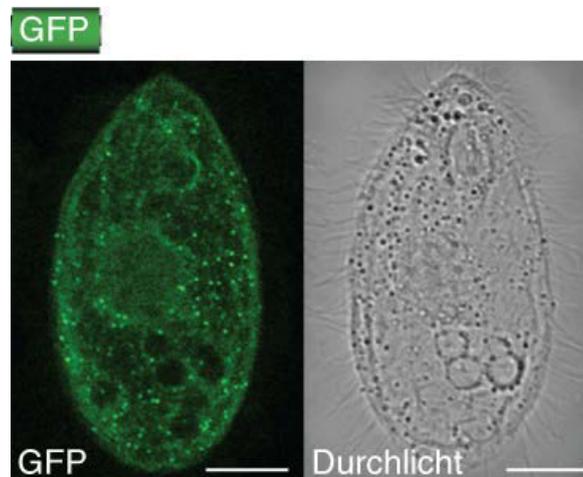


Abb.11: Lokalisation zur Untersuchung des GFP-Markers. Das GFP lokalisiert deutlich im Zytosol und auch im Makronukleus der Zelle. Durch die Durchlicht-Aufnahme wird deutlich, dass das GFP keine Basalkörper- oder andere Zytoskelett-Assoziation bildet. Der Skalierungsbalken misst 10  $\mu\text{m}$ .

Das GFP weist ein ungefähres Molekulargewicht von 27 kDa auf. Durch diese Größe kann bei der Markierung eines Proteins eventuell eine korrekte Assoziation beeinflusst werden. Um auszuschließen, dass die ungleichen Lokalisationen – endogenes *TtALV2* verglichen mit *ALV2::GFP* – durch die Größe des GFPs zustande kamen, wurde *TtALV2* am C-Terminus mit Hämagglutinin (HA) markiert (*ALV2::HA*; 70 kDa), welches ein Molekulargewicht von nur etwa 3 kDa aufweist. Nachdem die Zellen mit diesem Fusions-Konstrukt transfiziert wurden, wurden die Zellen mit  $\text{CdCl}_2$  inkubiert, um damit die Expression des Fusions-Proteins zu induzieren. Da es sich bei der HA-Markierung nicht, wie beim GFP, um ein fluoreszierendes Protein handelt, wurden die Zellen zunächst fixiert und anschließend mit Hilfe eines HA-Antikörpers durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie detektiert. Das Fusions-Protein *ALV2::HA* lokalisiert genau wie das *ALV2::GFP* Fusions-Protein. Es assoziiert mit den ciliären Basalkörpern, bildet ebenfalls fädige Strukturen und ist auch im Cytostom zu beobachten. Es wurden zudem zwei Western Blots mit dem Gesamtzellextrakt der *ALV2::HA* Kultur durchgeführt – mit anti-Alveolin und mit anti-HA – wobei die jeweiligen

entsprechenden Signale auf den korrespondierenden Höhen gezeigt werden konnten (Abb.12).

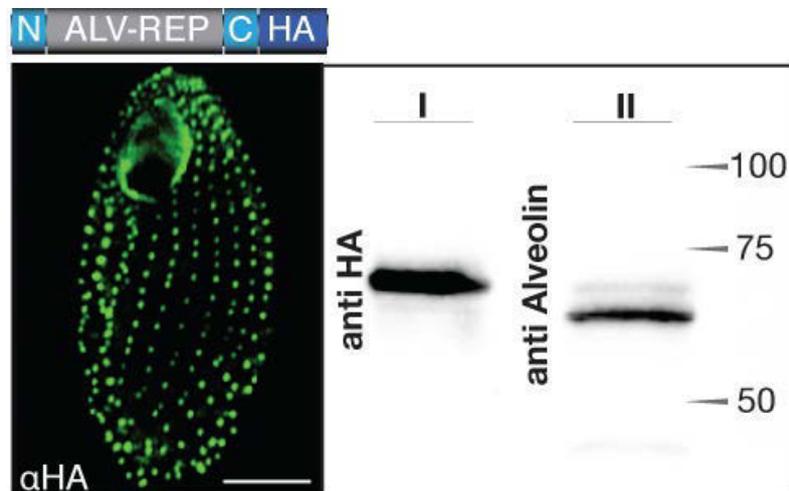


Abb.12: Lokalisation von ALV2::HA. *Tt*ALV2 wurde am C-Terminus mit HA markiert (*Tt*ALV2::HA, 70 kDa) und das Fusions-Protein lokalisiert an den Basalkörpern und am Cytostom *Tetrahymenas*. Der Skalierungsbalken misst 10  $\mu$ m. Die Western Blots zeigen jeweils aufgetragenen Proteinextrakt der Kultur die *Tt*ALV2::HA exprimiert, markiert mit anti-HA und mit anti-Alveolin Antikörpern. Markerbanden in Kilodalton. (El-Haddad et al, 2013)

Damit die einzelnen Domänen von *Tt*ALV2 untersucht werden konnten, wurden zwei weitere Fusions-Konstrukte erstellt: eines, indem nur der CRM-Bereich von *Tt*ALV2 am C-Terminus mit GFP markiert wurde (ALV2-REP::GFP; 75kDa) und ein weiteres, bei dem nur die nicht-repetitiven Termini mit GFP markiert wurden; hierbei wurde der CRM-Bereich durch GFP ersetzt (N::GFP::C; 46 kDa). Nachdem die Transfektionen erfolgreich abgeschlossen waren, wurden die Zellen mit CdCl<sub>2</sub> inkubiert, um die Expressionen der jeweiligen Fusions-Proteine zu induzieren. Anschließend wurde aus beiden Kulturen der Gesamtzellextrakt isoliert und Western Blots sowohl mit anti-GFP, als auch mit anti-Alveolin durchgeführt. Beide Fusions-Proteine weisen ein korrektes Molekulargewicht auf (Abb.10, Spur C und D). Das Fusions-Protein N::GFP::C kann durch anti-Alveolin nicht detektiert werden, da der Antikörper an eine spezifische Peptidsequenz im CRM-Bereich von *Tt*ALV2 bindet und diese in jenem Konstrukt nicht vorhanden ist. Die Bande, die dennoch in dem Western Blot durch anti-Alveolin (Abb.10, Spur D) detektiert wurde, stellt *Tt*ALV2 dar, welches, wie bei allen anderen transfizierten Kulturen nach wie vor durch anti-Alveolin

nachzuweisen ist. Um die Lokalisationen der Fusions-Proteine ALV2-REP::GFP und N::GFP::C in *Tetrahymena* zu untersuchen, wurden erneut die Expressionen der jeweiligen Fusions-Proteine induziert. Auffallend ist, dass beide Fusions-Proteine weiterhin in der Peripherie *Tetrahymenas* lokalisieren. ALV2-REP::GFP assoziiert mit den Basalkörpern und mit dem Cytostom. Die zusätzliche Markierung mit anti-Tubulin zeigt, dass auch eine Assoziation mit den transversalen Mikrotubuli besteht (Abb.10C). Die Markierung dieser Zellen mit dem Anti-Alveolin Antikörper, stellt die Lokalisation des Fusions-Proteins und die des endogenen *Tt*ALV2 gleichzeitig dar (Abb.13). Das Fusions-Protein N::GFP::C assoziiert hingegen überwiegend mit dem Cytostom *Tetrahymenas*. Durch die Markierung mit anti-Tubulin werden sowohl die drei Membranelle als auch die undulierende Membran erkennbar (Abb.10D). Insgesamt lokalisiert keines der vier Fusions-Proteine wie das endogene Protein *Tt*ALV2, dennoch ist jedes mit der Peripherie von *T. thermophila* assoziiert.

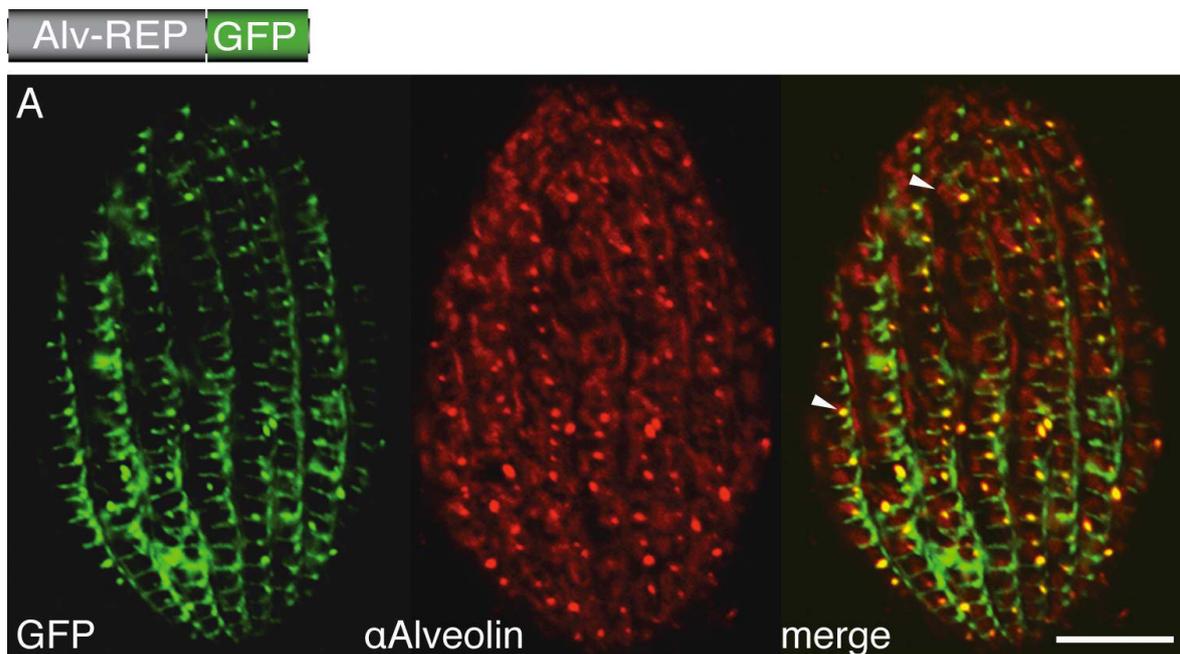


Abb.13: Immunlokalisierung von ALV2-REP::GFP mittels anti-Alveolin. Im grünen Kanal ist die Fluoreszenz des Fusions-Proteins ALV2-REP::GFP zu sehen und der rote Kanal stellt die Markierung durch anti-Alveolin dar. Anti-Alveolin detektiert sowohl das endogene Protein *Tt*ALV2, welches als fleckenförmige Struktur zwischen den longitudinalen Mikrotubuli lokalisiert (obere Pfeilspitze), als auch das Fusions-Protein ALV2-REP::GFP, welches in den Basalkörpern lokalisiert (untere Pfeilspitze) und mit den transversalen Mikrotubuli assoziiert. Der Skalierungsbalken misst 10  $\mu\text{m}$ .

## 5.2. Knock-Down von *TtALV2*

Damit die Funktion von *TtALV2* näher analysiert werden konnte, wurde zuerst versucht, eine mikronukleäre Deletion des Gens durchzuführen. Dazu wurde ein Konstrukt erstellt, mit dem durch homologe Rekombination das Gen durch eine Resistenz-Kassette substituiert werden sollte (Knock-Out). Zum erfolgreichen Knock-Out in *Tetrahymena* ist es notwendig den Mikronukleus zu transfizieren. Damit dieser aktiv war, wurden konjugierende Zellen transfiziert. Mehrere mikronukleäre Keimbahn-Transfektionen waren erfolgreich, was durch die Selektion mit Methylpurin gezeigt werden konnte (Kapitel 4.2.6.). Nachdem das *phenotypic assortment* ebenfalls erfolgreich ausfiel, folgte eine Konjugation mit dem Resultat, dass alle Zellen, welche die Kassette einbauen konnten, durch die Bildung eines neuen Makronukleus und dem damit verbundenen neuen Phänotypen, letal waren. Durch diese Technik konnte in dieser Arbeit, auch durch wiederholte Versuche, keine erfolgreiche Knock-Out Kultur generiert werden.

Aus diesem Grunde wurde versucht, einen makronukleären somatischen Knock-Down zu erzielen. Hierbei wurde das gleiche Konstrukt verwendet, das für den Knock-Out bestimmt war, allerdings wurde der Makronukleus vegetativ wachsender Zellen transfiziert. Zunächst wurden die Zellen mit 50 µg/ml Paromomycin selektiert, anschließend wurden 48 einzelne, Paromomycin-resistente (Par<sup>R</sup>) Zellen isoliert. Zwei Wochen lang wurde täglich die Konzentration der Selektionsdroge erhöht, bis eine Konzentration von 1 mg/ml erreicht war. 26 Klone waren letztlich überlebensfähig, wovon zwölf Klone einen veränderten Phänotyp entwickelten. Die restlichen 22 Klone bildeten ebenfalls einen veränderten Phänotyp aus, allerdings waren sie bei erhöhter Konzentration an Paromomycin nicht überlebensfähig. Von den zwölf Klonen mit verändertem Phänotyp wurden zunächst zwei Klone für weitere Analysen ausgewählt; KD-K1 und KD-K2. Zunächst sollte untersucht werden, ob die Resistenzkassette erfolgreich an der richtigen Stelle im Genom eingebaut wurde. Hierzu wurde die DNA aus diesen beiden Klonen und aus einer Wildtyp-Kultur isoliert. Die Amplifizierung eines Gen-Fragments aus *T. thermophila* (T THERM\_00127110;

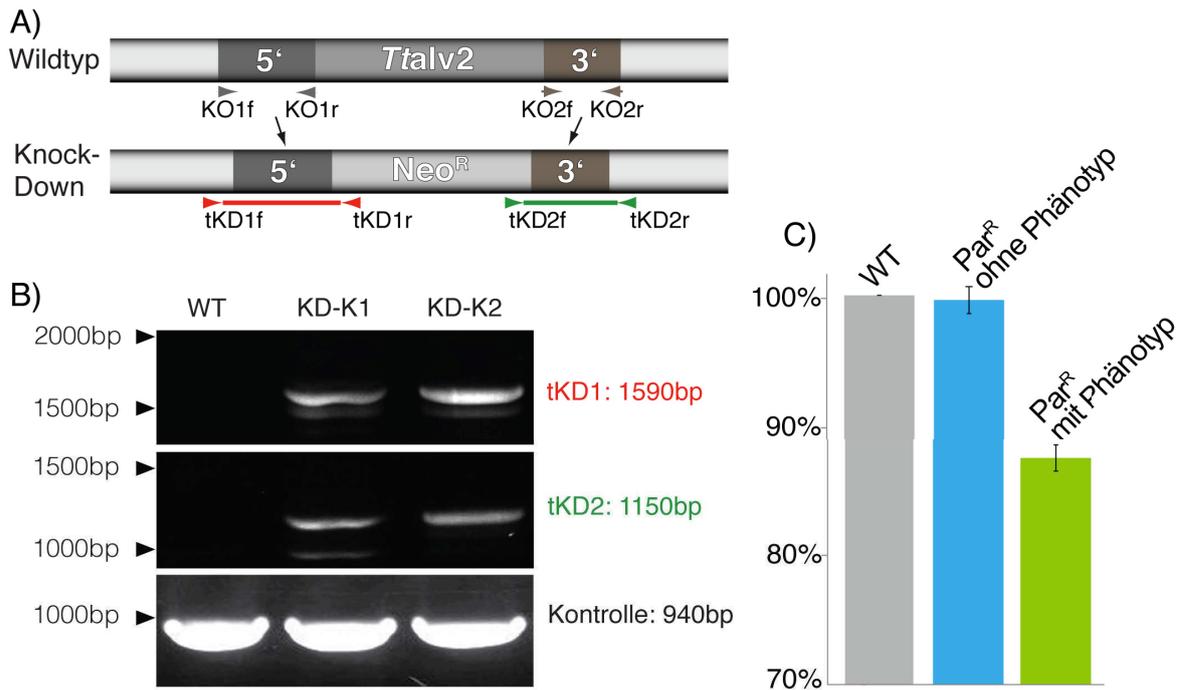


Abb.14: : PCRs zur Überprüfung der korrekten Integration der *Neo<sup>R</sup>*-Kassette in den *Ttalv2*-Lokus und Untersuchung der Herunter-Regulierung der Expression von *Ttalv2*. Es wurde die DNA von Wildtyp-Zellen und zwei Knock-Down Kulturen (KD-K1 und KD-K2), für die PCRs als Matrizen verwendet. Spezifische Primer-Paare (tKD1f-tKD1r und tKD2f-tKD2r) amplifizierten jeweils nur ein Produkt, welche die korrekte 5'- und 3'-Integration der *Neo<sup>R</sup>*-Kassette in den *Ttalv2*-Lokus zeigten (tKD1 mit 1590 bp und tKD2 mit 1150 bp). Das Fragment eines Gens (THERM\_00127110) diente lediglich zur PCR-Kontrolle (940 bp) (A und B). Die dargestellten Primer-Paare KO1f-KO1r und KO2f-KO2r wurden anfangs zur Amplifizierung der 5'- und 3'-Region von *Ttalv2* verwendet, um das *Neo<sup>R</sup>*-Konstrukt für die homologe Rekombination zu generieren. In C ist ein Diagramm zur quantitativen Echtzeit-PCR dargestellt wobei RNA zuvor aus Wildtyp-Zellen, Paromomycin-resistenten Zellen mit veränderten Phänotypen (Abb.15) und ohne veränderten Phänotypen isoliert wurde. Es ist eine deutliche Herunter-Regulierung von etwa 12% bei Klonen mit veränderten Phänotypen zu erkennen. (El-Haddad et al, 2013)

940 bp) diente lediglich als Test, ob die DNA-Isolierung erfolgreich ausgefallen war. Wie in Abbildung 14B zu sehen, konnte eindeutig in allen drei PCRs ein Amplifikat bei 1000 bp nachgewiesen werden. Zur Untersuchung der korrekten Integrierung der Selektionskassette (*Neo<sup>R</sup>*) in den *Ttalv2* Gen-Lokus dienten zwei Oligonukleotid-Paare. Bei dem Ersten (tKD1) sollte die korrekte Integrierung in 5'-Richtung – mit einem zu erwartenden Amplifikat der Größe 1590 bp – und bei dem Zweiten (tKD2) in 3'-Richtung – mit einem zu erwartenden Amplifikat der Größe 1150 bp – gezeigt werden. In der Tat konnte jeweils das korrelierende Amplifikat

auf der richtigen Höhe nachgewiesen werden, wobei kein Amplifikat in der Wildtyp-DNA nachgewiesen werden konnte (Abb.14B).

Anschließend wurde aus einem Par<sup>R</sup>-Klon mit veränderten Phänotyp, aus einem Par<sup>R</sup>-Klon ohne veränderten Phänotyp und aus einer Wildtyp-Kultur RNA isoliert, diese jeweils mittels reverser Transkription zu cDNA umgeschrieben und anschließend eine quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt, wobei technische Triplikate durchgeführt wurden. Verglichen mit dem Wildtyp und dem Par<sup>R</sup>-Klon ohne veränderten Phänotyp konnte nur bei dem Par<sup>R</sup>-Klon mit verändertem Phänotyp eine relative Herunter-Regulierung der Transkription des *Ttalv2*-Gens von ungefähr 12% gezeigt werden (Abb.14C). Eine Konzentrations-Erhöhung von Paromomycin führte zur Letalität der Zellen.

Allgemein waren Zellen, die einen veränderten Phänotyp aufwiesen, sehr instabil, das heißt sie konnten sich nicht mehr vermehren. Nichtsdestotrotz konnten dieselben Phänotypen bei vier unabhängigen Transfektionen mit dem gleichen Konstrukt und der gleichen Selektion beobachtet werden. Durch die Färbung mit DAPI konnten in den veränderten Phänotypen mehrere Mikronuklei und Makronuklei nachgewiesen werden (Abb.15A-D). Des Weiteren schien die Zellpolarität gestört, was bereits bei Durchlicht-Aufnahmen zu beobachten war. Es gibt außerordentliche Ausstülpungen, die keinerlei definierte Zellstruktur aufweisen (Abb.15D; Stern). Allgemein schien die Pellicula nicht mehr intakt und die Zellen bildeten mehrere Cytostome, was insgesamt durch eine anti-Centrin (Abb.15A und B) und eine anti-Tubulin Markierung gezeigt werden konnte (Abb.15C und D).

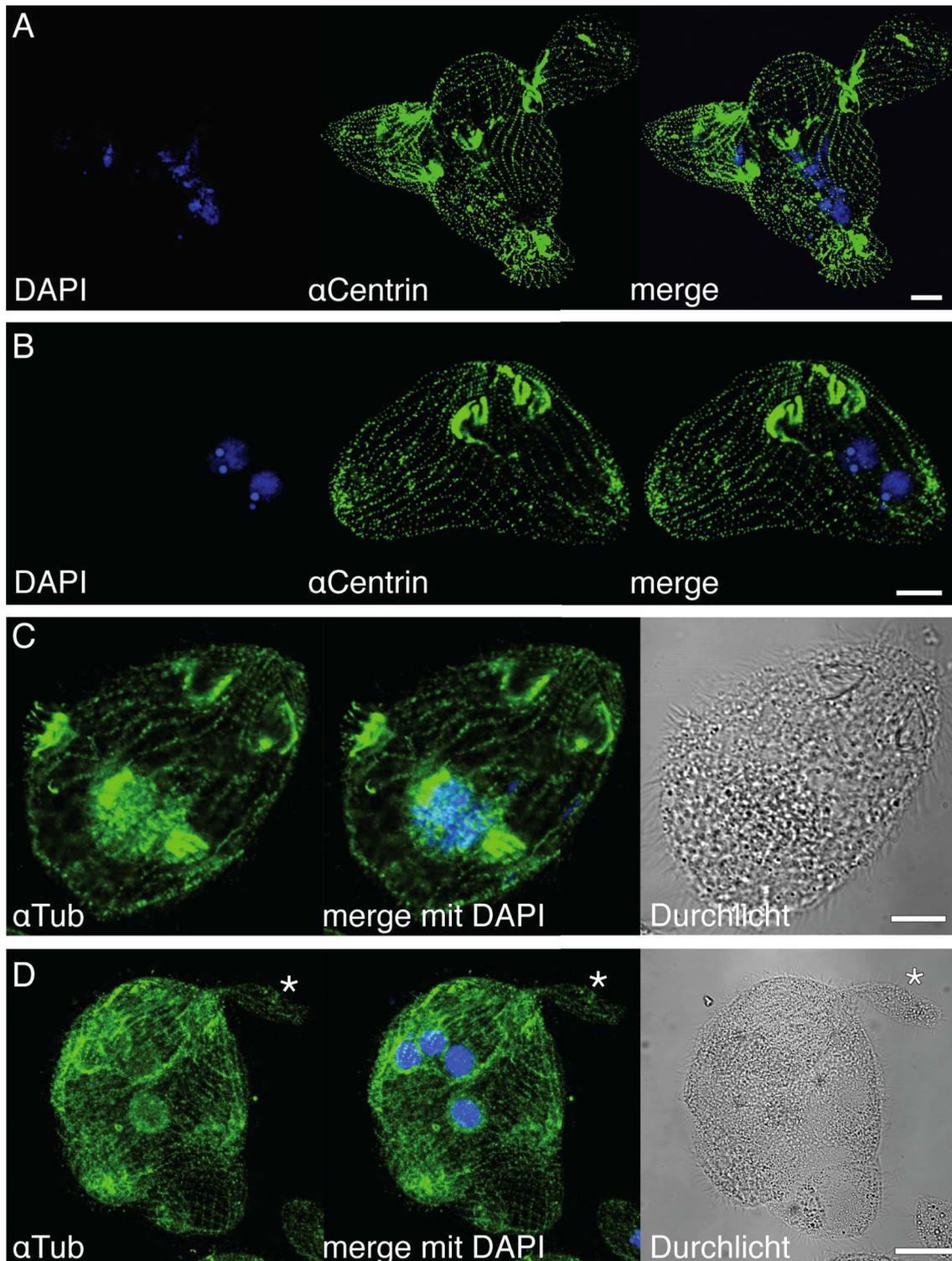


Abb.15: Die makronukleäre Herunter-Regulierung von *TtALV2* in *T. thermophila*. In A bis D sind stark deformierte Zellen durch anti-Centrin und anti-Tubulin Antikörper Markierungen zu beobachten. Es scheint als hätte die Pellicula ihre Intaktheit verloren und damit die Zell-Polarität und auch die Fähigkeit zur vollständigen Zellteilung oder zum Abschluss der Zellteilung; es kann keine eindeutige Zellachse gezeigt werden. Außerdem können mehrere Cytostome beobachtet werden und die Zellen sind multimikro- und multimakronukleär, was durch die DAPI-Markierung deutlich wird. Des Weiteren sind Ausstülpungen ohne definierte Struktur zu beobachten (Stern). Der Skalierungsbalken misst 10  $\mu\text{m}$ . (El-Haddad et al, 2013)

### 5.3. CRMs weisen eindeutige Zytoskelett-Assoziationen auf

In der Arbeit von Gould und Kollegen 2011 wurden bereits einige der CRMPs mit unbekannter Funktion aus *Tetrahymena* erfolgreich lokalisiert. Vier von vier untersuchten Proteinen wiesen Assoziationen mit dem Zytoskelett *Tetrahymenas* auf. In dieser Arbeit wurden vier weitere CRMPs ausgewählt (THERM\_00777250, THERM\_00578520, THERM\_00678010 und THERM\_00127110), wobei

```

10-46      .....IRPAHNPNHYLFPNDGARGYGADFVDRTHPHQEQRN
47-96      QLILTHVKDNvftIRSATNPTHFVFASNDGVRGFGGDFDVRTHASNEERN
97-145     QWIIEH.HGQgyhIRVYTHPNHYLFAANDGSNGFGGDFDVRTHPHQEARN
151-199    GLVFAPATQN.ctIRVKTPNHYLFAASNDGVRGLGGDFDVRTHASQEQRN
200-249    QVLLTRVSRNvytIACAANPNHFFFPSDDGTRAYGGDFDVRTHPHHEERN
250-299    KWIIESDNQgflIRSLVKPQHLYLFAANDGSNGYGGDFDVRTHPHQEARN
    
```

Abb.16: Das CRM aus THERM\_00777250. Die schwarz markierten Aminosäuren stellen jene dar, die in der repetitiven Sequenz nicht wiederholt werden und damit an den Stellen zu Lücken (Punkte) führen.

jeweils der CRM-Bereich näher analysiert werden sollte. THERM\_00777250 wurde bei einer näheren Analyse des bereits lokalisierten CRMPs DFB1 (*deep fibre bundle protein 1*; THERM\_00128280) nachgewiesen. Es wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt, indem THERM\_00777250 als putativer Interaktionspartner des DFB1 gezeigt werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt). THERM\_00777250 weist Homologien zu Proteinen aus anderen Ciliaten auf. Das Expressionsprofil von THERM\_00777250 (*Tetrahymena Functional Genomics Database*; Miao et al, 2009) zeigt, dass dieses ebenso stark wie Tubulin codierende Gene exprimiert wird. Das Protein besteht aus 311 Aminosäuren und diese bestehen gänzlich aus hochkonservierten geladenen repetitiven Motiven. Das Protein wurde am C-Terminus mit GFP markiert (777250::GFP) und der Makronukleus von *T. thermophila* wurde mit jenem Konstrukt erfolgreich transfiziert. Nachdem die Expression des Gens induziert wurde, konnte beobachtet werden, dass das Fusions-Protein 777250::GFP kurz nach der Expression zunächst in den ciliären Basalkörpern lokalisierte. Anschließend konnten Lokalisationen in den Cilien, im Cytostom, im *deep fibre bundle*, löslich im Zytosol und auch als kreisförmige Strukturen beobachtet werden

(Abb.17 A). Bei weiteren Versuchen konnte durch eine Co-Markierung der Zellen mit einem Mito Tracker, welcher selektiv Mitochondrien anfärbt, gezeigt werden, dass sich die kreisförmigen Strukturen unmittelbar um die peripheren Mitochondrien befinden (Wehmöller, 2012). Die Co-Markierung mit anti-Tubulin belegt die Assoziation mit den Cilien und zeigt eine Angrenzung zu den longitudinalen Mikrotubuli (Abb.17 A).

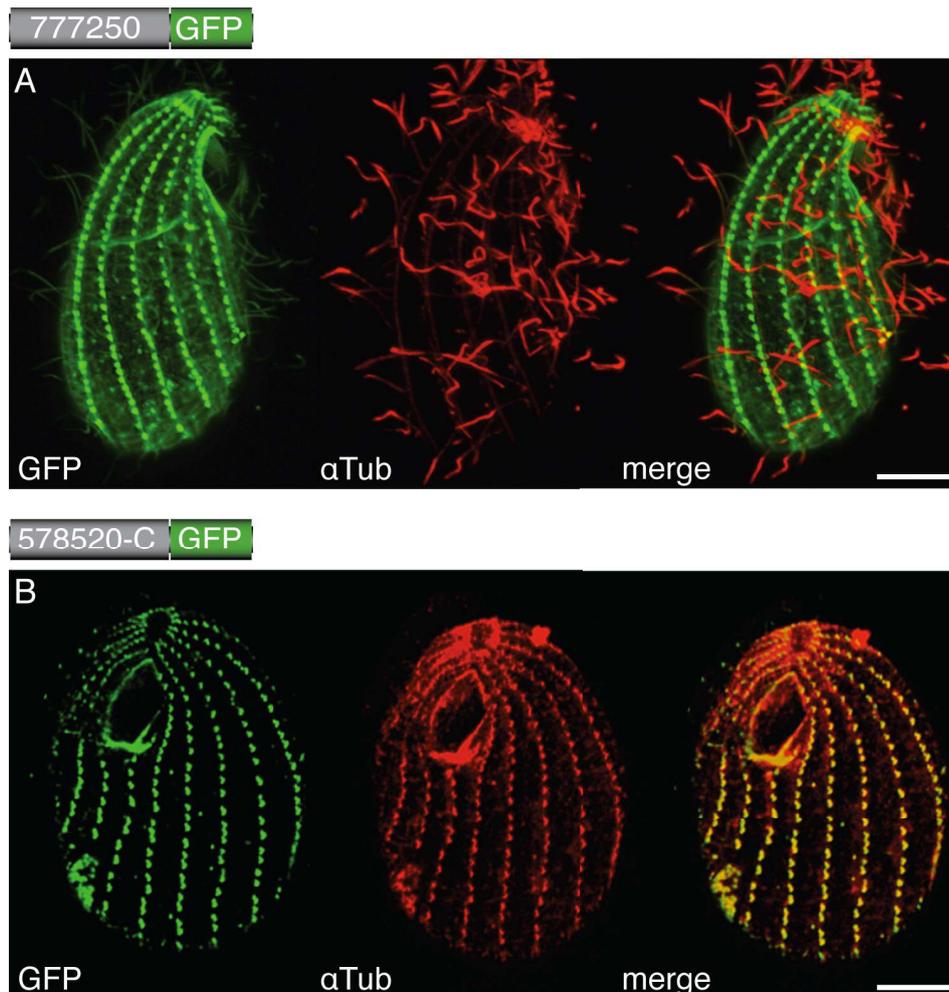


Abb.17: Immunlokalisationen weiterer CRMPs. A: Das Protein THERM\_00777250 wurde am C-Terminus mit GFP markiert. Das Fusions-Protein lokalisiert an den Basalkörpern, am Cytostom und in den Cilien. Des Weiteren assoziiert es mit kreisförmigen Strukturen um die Mitochondrien und lokalisiert außerdem am *deep fibre bundle* und im Zytosol (El-Haddad et al, 2013). B: Der C-terminale Bereich des CRMPs THERM\_00578520 (Aminosäuren 2026-2645), welcher CRMs beinhaltet, wurde C-terminal mit GFP markiert. Dieses Fusions-Protein lokalisiert an den Basalkörpern und am Cytostom, was besonders durch die Markierung mit dem anti-Tubulin Antikörper deutlich wird. Der Skalierungsbalken misst 10  $\mu\text{m}$ .

Das Protein THERM\_00578520 hat ein prognostiziertes Molekulargewicht von 311 kDa. Es weist zudem Homologien zu mehreren Zentromer-Proteinen, wie etwa dem Zentromer Protein F aus einer Felsenauster (*Crassostrea gigas*) oder dem Zentromer Protein E aus *Homo sapiens*, auf. Es besteht zudem eine Homologie zu einem 762 kDa Protein aus *Toxoplasma gondii* (TGME49\_212880), welches ebenfalls CRMs aufweist. Beide Proteine weisen SMC- und Viral-A Domänen auf und ihre Funktionen sind bislang unbekannt. In dieser Arbeit wurde der C-terminale Bereich des Proteins THERM\_00578520 (Aminosäure 2026-2645), welcher einen CRM-Bereich darstellt, am C-Terminus mit GFP markiert (578520-C::GFP). Nach einer erfolgreichen makronukleären Transfektion konnte die Lokalisation dieses Fusions-Proteins an den Basalkörpern und am Cytostom von *T. thermophila* gezeigt werden (Abb.17 B).

Ein weiteres CRMP THERM\_00678010 wurde ebenfalls am C-Terminus mit GFP markiert (678010::GFP). Dieses Fusions-Protein lokalisiert löslich im Zytosol *Tetrahymenas* (Anhang Abb.25). Allerdings bildete das Fusions-Protein in etwa 20-30% der Zellen besonders auffällige filamentöse Strukturen aus, welche wellenförmig vom apikalen bis zum distalen Ende *Tetrahymenas* verliefen (Abb.18). Dabei schienen sich diese nicht zwingend in der Peripherie zu befinden.

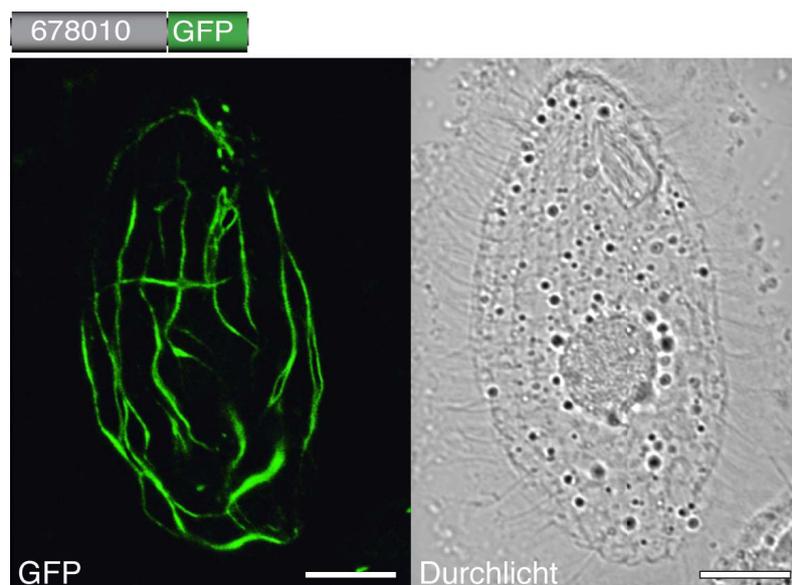


Abb.18: Immunlokalisation des CRMPs THERM\_00678010. Das Protein bildet filamentöse Strukturen, die sowohl am apikalen, als auch am distalen Ende der Zelle auftreten. Bei Durchfokussierung durch die Zelle wurde deutlich, dass es sich nicht zwingend um eine periphere Assoziation handelt. Der Skalierungsbalken misst 10  $\mu$ m.

Auch ein CRM-Bereich des Proteins THERM\_00127110 konnte mittels GFP-Markierung am C-Terminus (127110CRM::GFP) in *Tetrahymena* nachgewiesen werden. Dieses Fusions-Protein weist keine definierte Lokalisation auf und scheint diffus im Zytosol verteilt zu sein (Abb.19).

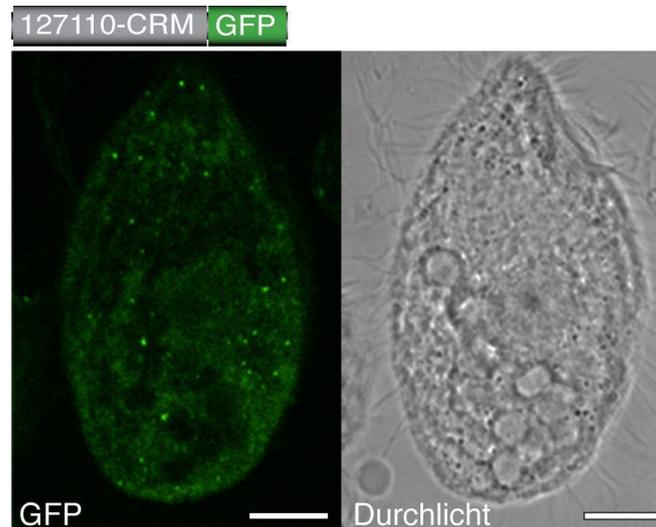


Abb.19: Immunlokalisation eines CRM-Bereichs des Proteins THERM\_00127110. Das Fusions-Protein (127110-CRM::GFP) lokalisiert löslich im Zytosol von *Tetrahymena*. Durch die Durchlicht-Aufnahme wird deutlich, dass keine Basalkörper- oder andere Zytoskelett-Assoziation gebildet wird. Der Skalierungsbalken misst 10  $\mu\text{m}$

#### 5.4. Zytoskelett-Assoziationen eines synthetischen CRMPs

Die Tatsache, dass viele der untersuchten CRMPs tatsächlich, wie bereits vermutet, Assoziationen mit dem Zytoskelett aufwiesen, führte zur Annahme, dass ein CRM eventuell als generelles Motiv zur Zytoskelett-Assoziation eines Proteins fungieren könnte. Hinsichtlich dieser Annahme wurde ein CRMP synthetisch hergestellt, wobei alle drei Kriterien eines CRMPs erfüllt wurden (Kapitel 3.7. (Gould et al, 2011)), indem eine achtfache Wiederholung der Sequenz „DEVINEQERIKQVIKINGQDLQERKE“ (sCRMP; Abb.20A) entwickelt wurde. Diese Sequenz wurde am N-Terminus mit HA und am C-Terminus mit GFP (sCRMP::GFP) markiert. Nach einer erfolgreichen makronukleären Transfektion konnte nachgewiesen werden, dass dieses Fusions-Protein ebenfalls in der Peripherie von *T. thermophila* lokalisiert. Es assoziiert mit den Cilien, den

Basalkörpern und mit dem Cytostom (Abb.20C). Des Weiteren lokalisiert es an den Poren der kontraktiven Vakuole, was besonders in der vergrößerten Aufnahme in Abbildung 20D (Pfeilspitze) deutlich wird und es ist zudem löslich im Zytosol der Zelle vorhanden.

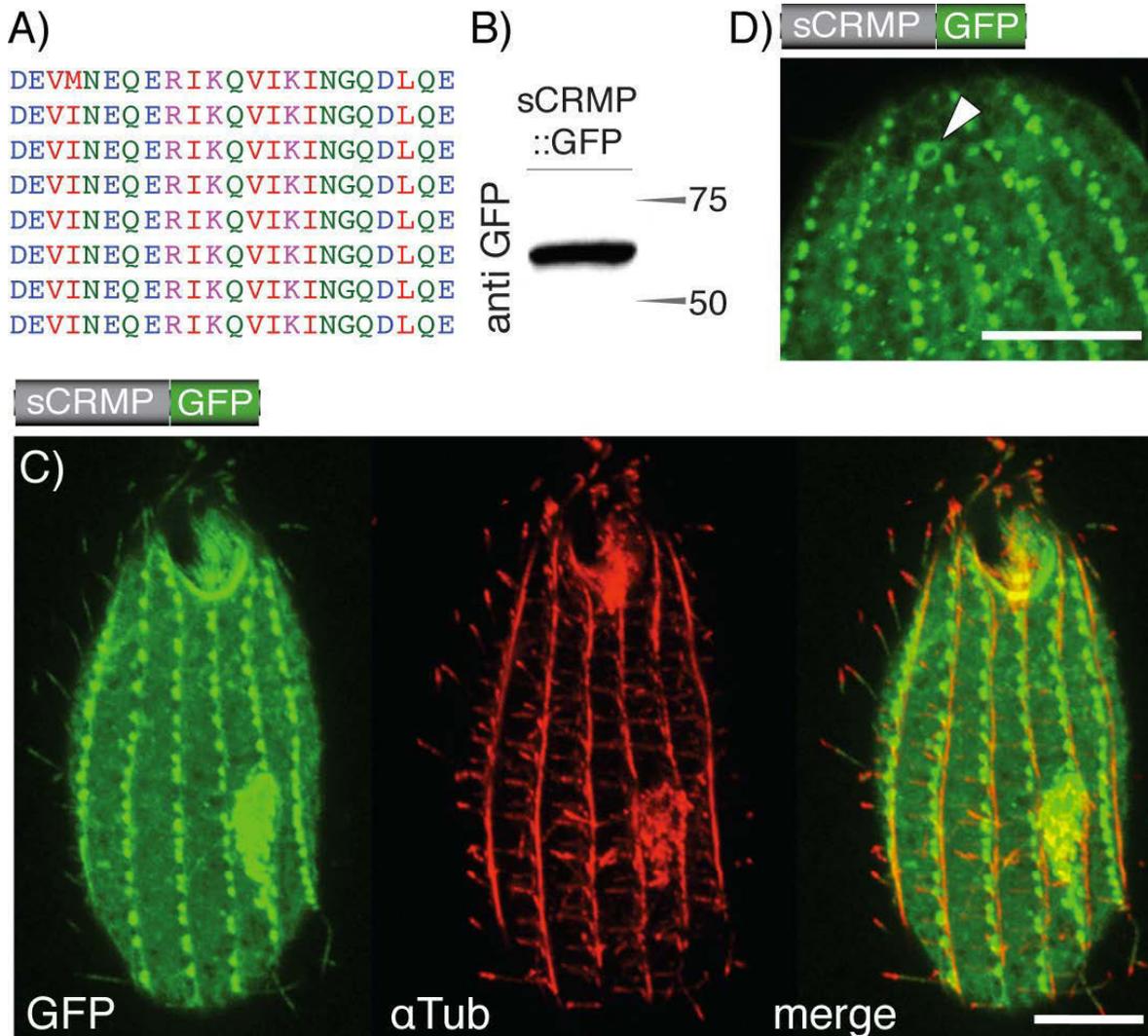


Abb.20: Lokalisation eines synthetischen CRMPs. Es wurde ein synthetisches Protein mit geladenen repetitiven Motiven generiert, welches der Aminosäure-Komposition eines CRMPs ( $K > 6\%$ ,  $E > 6\%$ ,  $Q > 3\%$  und  $I+L+V > 10\%$ ) gerecht wird (A). Anschließend wurde dies am C-Terminus mit GFP markiert (sCRMP::GFP; 55 kDa) und durch den Western Blot in B konnte ein Signal auf der korrelierenden Höhe nachgewiesen werden. Das Fusions-Protein lokalisiert an den Basalkörpern, am Cytostom, in den Cilien (C) und an der Pore der kontraktiven Vakuole (D). Der Skalierungsbalken misst  $10 \mu\text{m}$ . (El-Haddad et al, 2013)

## 5.5. Die Basalkörper-Assoziationen von Zytoskelett-Proteinen

Es war auffällig, dass ALV2::GFP und ALV2::HA eine veränderte Lokalisation im Vergleich zum endogenen Protein *Tt*ALV2 aufwiesen, beide allerdings mit den Basalkörpern assoziierten. Außerdem war es bemerkenswert, dass fast alle Fusions-Proteine dieser Arbeit – unter anderem – mit den Basalkörpern *Tetrahymenas* assoziierten. Zudem schien es, als würden die Proteine zunächst in den Basalkörpern lokalisieren und erst von dort weitere, komplexere Assoziationen im Zytoskelett ausbilden. So konnte dies bei Fusions-Proteinen beobachtet werden, die zusätzlich zu der Lokalisation an den Basalkörpern auch

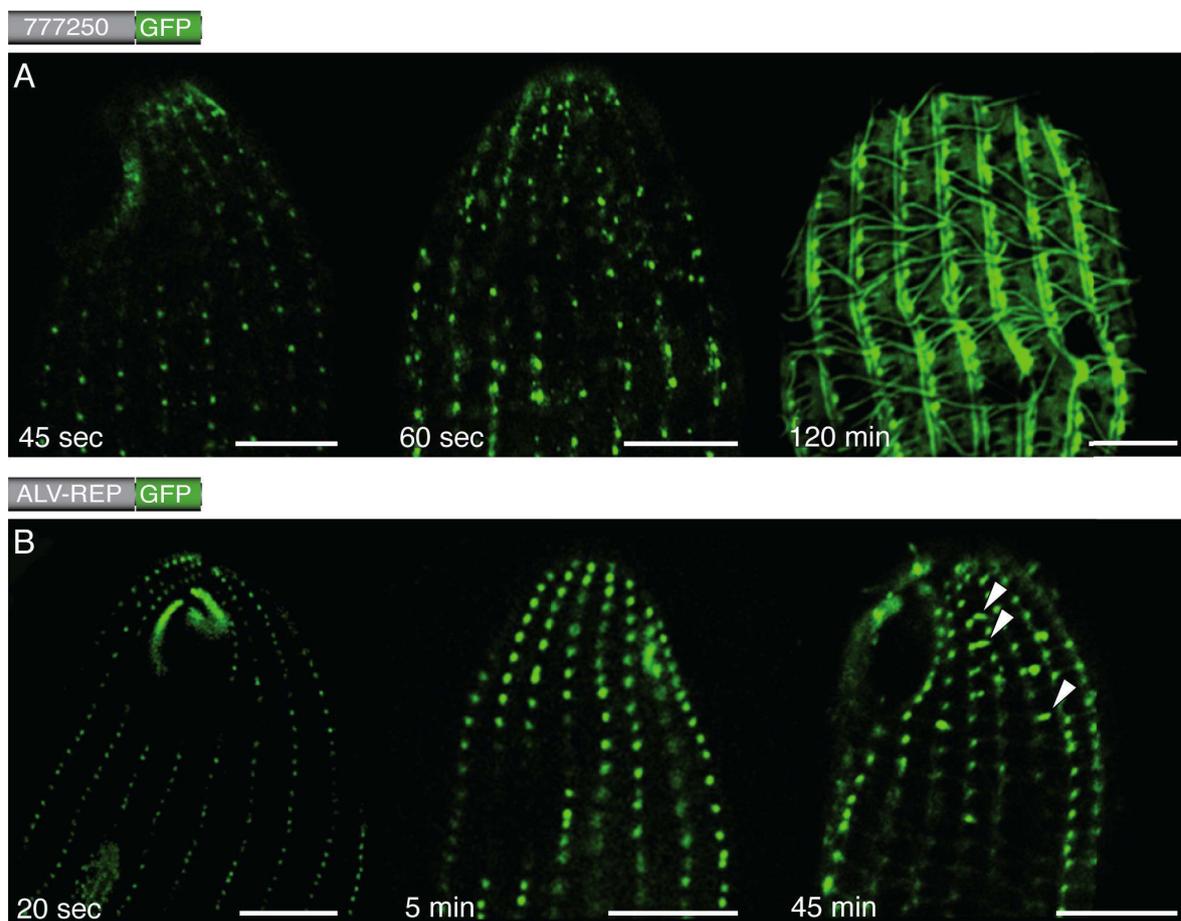


Abb.21: Basalkörper-assoziierte Integration von *de novo* synthetisierten CRMPs. Die Expressionen der beiden Fusions-Proteine (777250::GFP (A) und ALV-REP::GFP (B)) wurden durch  $\text{CdCl}_2$  induziert und die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Bei beiden Fusions-Proteinen ist die anfängliche Lokalisation an den Basalkörpern zu beobachten, von wo sich die verschiedenen Assoziationen der jeweiligen Fusions-Proteine herausbilden (siehe Pfeilspitzen). Der Skalierungsbalken misst  $10 \mu\text{m}$ . (El-Haddad et al, 2013)

filamentöse Strukturen bildeten. Deshalb wurde versucht, eine Assoziation der anfänglichen Basalkörper-Integration von *de novo* synthetisierten Proteinen zu zeigen. Diese Untersuchung wurde mit zwei Fusions-Proteinen durchgeführt, ALV2-REP::GFP und 777250::GFP. Zur Induktion der Expressionen der Fusions-Proteine wurden die jeweiligen Zellen mit CdCl<sub>2</sub> inkubiert und anschließend zu verschiedenen Zeiten fixiert. Tatsächlich konnte bei beiden Fusions-Proteinen gezeigt werden, dass sich eine leichte Fluoreszenz kurz nach der Expression (unter 1 min) zunächst an den Basalkörpern befand. Erst nach wenigen Minuten konnte eine verstärkte Lokalisation an den Basalkörpern beobachtet werden und nach mehreren Minuten (45 min) bereits anfängliche fädige Strukturen, die sich von den Basalkörpern aus bildeten (Abb.21, Pfeilspitzen).

## 5.6. Die Relevanz von CRMPs in anderen Organismen

Nachdem mehrere Beispiele gezeigt haben, dass eine Assoziation von CRMPs und dem Zytoskelett von *T. thermophila* besteht, entwickelte sich die Frage, ob die CRMs im Zytoskelett anderer eukaryotischer Organismen, wie beispielsweise *Homo sapiens*, *Mus musculus* oder *Trichomonas vaginalis* eine ähnliche Assoziation aufweisen. Diesbezüglich wurden Proteine geprüft, deren Assoziationen mit dem Zytoskelett bereits bekannt waren. Zunächst wurden die Aminosäuresequenzen dieser Proteine mittels RADAR analysiert, um zu prüfen, ob diese Proteine allgemeine repetitive Motive aufwiesen. Es konnte gezeigt werden, dass alle in Tabelle 1 aufgezeigten Proteine tatsächlich repetitive Motive aufweisen. Anschließend wurden die Sequenzen daraufhin untersucht, ob sie nach der Vorhersage aus Gould et al (2011), als CRMP gelten oder nicht. Nach dieser Berechnung gelten mehr als zwei Drittel der Proteine (69%) als CRMPs. Hierzu gehören auch Zytoskelett-Proteine aus *Homo sapiens*, wie z.B. Keratin, Kinesin oder Spektrin. Repräsentativ sind in Abbildung 22 die CRMs von Keratin und Kinesin dargestellt. Anschließend wurden alle Proteine mit Hilfe des Programms Multicoil untersucht (Wolf et al, 1997), ob sie putative dimere oder trimere coiled-coil Domänen aufweisen. Von den gezeigten CRMPs weisen 63%

Spektrin *Homo sapiens*

327-362	RKFANSLVG...VQQQL.QAFNTYRTVEK.PPKFTEKGNL
421-460	EQLARRFDRkaamRETWL.SENQRLVSQDNFGFDLPAVEAA
531-566	QKIFQEMLY...IMDWM.DEMKVLVLSQDYGKHLGVEDL
641-676	WKFFWEMAE...EEGWI.REKEKILSSDDYGKDLTSVMRL
747-783	HQFQADADD...IDAWM.LDILKIVSSSDVGHDEYSTQSL
852-887	YKMFSEADA...CELWI.DEKEQWLNMQIPEKLEDLEVI
958-994	QNYHLECNE...TKSWIrEKTkVIESTQDLGNDLAGVMAL
1065-1100	QQFLRDLD...FQSWL.SRTQTAIASEDMPNTLTEAEKL
1172-1207	QQFLRDTKQ...AEAFI.NNQEYVLAHTEMPTTLEGAEAA
1278-1309	QKFLQDCQE...LSLWI.N..EKMLTAQDM..SYDEARNL
1383-1418	ELFTQSCAD...LDKWL.HGLESQIQSDDYGKDLTSVNIL
1488-1523	HQFNRDVED...EILWV.GERMPPLATSTDHGHNLQTVQLL
1595-1630	QQYYFDAE...AEAWM.SEQELYMMSEEKAKDEQSAVSM
1701-1736	FQLNREVD...LEQWI.AEREVVAGSHELQDYEHVTML
1808-1842	HKFYHDAKE...IFGRI.QDKHKKL.PEELGRDQNTVETL
1914-1949	FRFFSMVRD...LMLWM.EDVIRQIEAQEKPRDVSSVELL
2020-2055	HQFSRDASV...AEAWL.LGQEPYLSREIGQSVDEVEKL

Kinesin *Homo sapiens*

193-234	EIPARLRTLHNLVIQyasQGRYEVAVPLCKQALE.DLEKTSGH
235-276	DHPDVATMLNILALVyrDQNKYKEAAHLLNDALA.IREKTLGK
277-318	DHPAVAATLNNLAVLygkRGKYKEAEPLCKRALE.IREKVLGK
319-360	FHPDVAKQLSNLALLcqnQGKAEVEYYYRRALE.IYATRLGP
361-403	DDPNVAKTKNNLASCylkQGKYQDAETLYKEILTraHEKEFGS
444-483	DSPTVNTTLRSLGALyrrQGKL.EAAHTLEDC.A.SRNKQGL

Abb.22: Beispielhafte CRMs bekannter Zytoskelett-Proteine aus *Homo sapiens*. Dargestellt sind einzelne CRM-Bereiche aus den Aminosäuresequenzen von Spektrin und Kinesin.

vorhergesagte coiled-coil Domänen auf. Hiervon weisen 82% putative dimere und 18% putative trimere coiled-coil Domänen auf. Bei bekannten filamentösen Proteinen, wie beispielsweise Keratin, aber auch bei *TtALV2* sind nur im CRM-Bereich coiled-coil Domänen nachzuweisen. Des Weiteren konnte durch BLAST-Analysen gezeigt werden, dass mehr als die Hälfte der CRMPs (52%) SMC-Domänen aufweisen und 22% der CRMPs Viral-A Domänen aufweisen. Die Details hierzu werden in der Diskussion erläutert (Kapitel 6.5.).

Tabelle 1: Dargestellt sind bekannte Zytoskelett und Zytoskelett-assoziierte Proteine. Es wurde untersucht, ob sie zu den CRMPs gehören und ob sie dimere oder trimere coiled-coil-Domänen, SMC- oder Viral A-Domänen aufweisen. In der rechten Spalte sind die Referenzen angegeben, in denen gezeigt wurde, dass das jeweilige Protein mit dem Zytoskelett assoziiert ist. Die GenBank Nummer der untersuchten Aminosäuresequenzen ist angegeben. (El-Haddad et al, 2013)

Organismus	Protein	GenBank	CRMP	Coiled coil	SMC	Viral A	Referenz
<i>H. sapiens</i>	Vimentin	EAW86215.1	-	dimer	+	-	(Blöse & Meltzer, 1981)
<i>H. sapiens</i>	Lamin	EAW52996.1	+	dimer	+	-	(McKeon et al, 1986)
<i>H. sapiens</i>	Keratin1	EAW96642.1	+	dimer	+	+	(Woodcock-Mitchell et al, 1982)
<i>H. sapiens</i>	Spektrin	EAX00140.1	+	dimer	+	-	(Nicolson et al, 1971)
<i>H. sapiens</i>	Kinesin	BAB14039.1	+	dimer	+	-	(Kuznetsov et al, 1989)
<i>H. sapiens</i>	Golgin 84	EAW81502.1	-	dimer	+	-	(Bascom, 1999)
<i>H. sapiens</i>	Tropomyosin	EAW77635.1	+	dimer	+	-	(Perry, 2001)
<i>H. sapiens</i>	Tektin-1	EAW90284.1	+	dimer	+	-	(Nojima et al, 1995)
<i>H. sapiens</i>	Ankyrin 2	EAX06290.1	+	-	-	-	(Bennett & Baines, 2001)
<i>H. sapiens</i>	Ezrin	EAW47646.1	+	dimer	-	-	(Bretscher et al, 2002)
<i>H. sapiens</i>	Desmin	EAW70739.1	-	dimer	+	-	(Lazarides & Hubbard, 1976)
<i>H. sapiens</i>	MARCKS	EAW48258.1	-	-	-	-	(Hartwig et al, 1992)
<i>H. sapiens</i>	Filamin	EAW72745.1	+	-	-	-	(Popowicz et al, 2006)
<i>H. sapiens</i>	TEM4	EAW74891.1	-	trimer	-	-	(Mitin et al, 2012)
<i>H. sapiens</i>	Gelsolin	EAW87491.1	-	-	-	-	(Yin et al, 1981)
<i>H. sapiens</i>	Supervillin	EAW86019.1	+	-	-	-	(Pestonjamas et al, 1997)
<i>R. norvegicu</i>	Spinophilin	AAC05183.1	+	dimer	+	-	(Sato et al, 1998)

<i>M. musculus</i>	KRIT-1	EDL14618.1	+	-	-	-	(Béraud-Dufour et al, 2007)
<i>G. gallus</i>	Titin	AAF35436.1	+	-	-	-	(Wang et al, 1979)
<i>G. gallus</i>	Myosin	AAA48972.1	+	dimer	+	-	(Kuczmarski & Rosenbaum, 1979)
<i>C. reinhardtii</i>	BLD10	EDP06416.1	-	dimer	+	-	(Hiraki et al, 2007)
<i>T. vaginalis</i>	P477	EAY10879.1	+	dimer	+	+	(Bricheux et al, 2007)
<i>T. gondii</i>	ICAMP1	EEA99429.1	+	dimer	+	+	(Heaslip et al, 2008)
<i>T. gondii</i>	SPM1	EEA98311.1	-	-	-	-	(Tran et al, 2012)
<i>T. gondii</i>	IMC3	EEB03770.1	+	-	-	-	(Gubbels et al, 2004)
<i>T. gondii</i>	IMC4	EEB00904.1	+	-	-	-	(Hu et al, 2006)
<i>T. gondii</i>	IMC12	EEB00076.1	+	-	-	-	(Anderson-White et al, 2011)
<i>T. gondii</i>	IMC13	EEB02264.1	+	-	-	-	(Anderson-White et al, 2011)
<i>T. gondii</i>	IMC14	EEA98086.1	+	-	-	-	(Anderson-White et al, 2011)
<i>P. falciparum</i>	<i>PfAlv1</i>	CAD51621.1	+	-	-	-	(Kono et al, 2012)
<i>P. falciparum</i>	<i>PfALV2</i>	AAN35237.1	-	-	-	-	(Kono et al, 2012)
<i>P. falciparum</i>	<i>PfGAP45</i>	AAN36304.1	-	-	-	+	(Gaskins, 2004)
<i>T. thermophila</i>	<i>TtALV2</i>	EAR92507.1	+	dimer	-	-	El-Haddad et al.
<i>T. thermophila</i>	EPC1	EAR95236.2	+	dimer	+	+	(Williams et al, 1995)
<i>T. thermophila</i>	Tetrin D	EAS03720.1	+	trimer	+	+	(Gould et al, 2011)
<i>T. thermophila</i>	Bbc 39	EAS06694.1	+	trimer	+	-	(Kilburn et al, 2007)
<i>T. thermophila</i>	DFB1	EAR96064.1	+	dimer	+	+	(Gould et al, 2011)
<i>T. pyriformis</i>	Tetrin C	EAR86044.1	+	trimer	+	+	(Honts & Williams, 1990)
<i>E. coli</i>	FtsZ	AAC73206.1	-	-	-	-	(Lutkenhaus, 1993)

## 5.7. Lokalisation des synthetischen CRMPs in humanen Zellen

Anhand der Tabelle 1 konnte gezeigt werden, dass ein großer Teil Zytoskelett-assoziiierter Proteine den CRMPs zugeordnet werden kann. Die Identifikation von CRMPs in humanen Zytoskelett-Proteinen schien dabei besonders interessant. Diesbezüglich sollte untersucht werden, ob das synthetische CRMP (sCRMP), welches ursprünglich nach den Eigenschaften der in *Tetrahymena* identifizierten

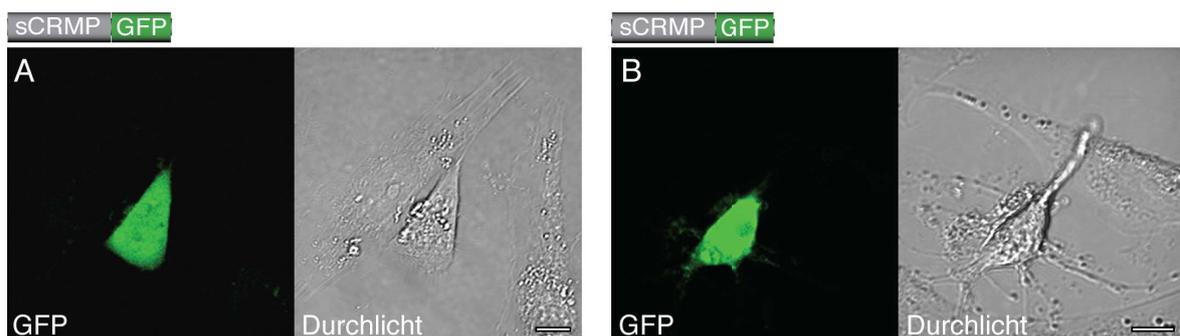


Abb.23: Die Lokalisation des sCRMPs in humanen, epithelialen Vaginalzellen. In A und B sind jeweils einzelne Zellen angezeigt (Durchlicht). Durch die Fluoreszenz-Aufnahmen des GFPs wird die zytosolische Lokalisation des Proteins deutlich. Der Skalierungsbalken misst 10  $\mu\text{m}$ .

CRMPs erstellt wurde, auch in humanen Zellen eine Zytoskelett Assoziation bilden kann. Hierzu wurde das sCRMP mit einer der HA-Markierung am N-Terminus in einen spezifischen Human-Vektor kloniert, wodurch das sCRMP am C-Terminus eine GFP-Markierung erhielt. Anschließend wurden mit diesem Konstrukt humane, epitheliale Vaginalzellen (*vaginal epithelial cells*; VECs) erfolgreich transfiziert. Das Fusions-Protein ist im Zytosol der Zellen vorzufinden (Abb.23). Die Transfektions-Effizienz lag bei etwa 3%, das heißt nur etwa 3% der Zellen wiesen eine Fluoreszenz auf. Zur Kontrolle wurde das GFP allein exprimiert, welches ebenfalls löslich im Zytosol lokalisierte. Die Transfektions-Effizienz betrug hierbei etwa 30%.

## 6. Diskussion

Ciliophora sind in ihrer genetischen und morphologischen Vielfalt sehr komplexe Zellen und können durch zwei Merkmale identifiziert werden: ihrer holotrichen Ciliatur und ihrem nukleären Dimorphismus (Prescott, 1994). Die Ciliophora werden dem Super-Phylum der Alveolata zugeordnet. Allen Alveolata gemeinsam sind die phänotypischen abgeflachten Vesikel, welche sich unter der Plasmamembran befinden und als Alveoli bezeichnet werden. Zusammen mit dem Membran-Skelett (in Ciliophora Epiplasma genannt) und den anliegenden Mikrotubuli bilden sie die komplexe Zell-Pellicula (Cavalier-Smith, 1991; Gould et al, 2008a; Satir & Wissig, 1982). Dieser gesamte Komplex dient allgemein der Aufrechterhaltung der Form und der mechanischen Stabilität eines Alveolata (Bouck & Ngo, 1996). Auf molekularer Ebene stellen die sogenannten Alveolin-Proteine, die mit den Alveoli assoziiert sind (Gould et al, 2008a), den ersten molekularen Nexus zwischen den Alveolata dar. Das erste Alveolin-Protein wurde in *Toxoplasma gondii* identifiziert (*TgAlv1* oder *TgIMC1* genannt) (Mann & Beckers, 2001). In jener Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieses Protein Teil eines Netzwerks mit Filamenten eines Durchmessers von 8-10 nm ist, welches dem Filament-Durchmesser von Intermediärfilamenten entspricht. Des Weiteren wies das Protein *TgALV1* putative coiled-coil Domänen auf. Insgesamt wurden bisher 14 Alveolin-Proteine in *T. gondii* in Assoziation mit den Alveoli nachgewiesen (Anderson-White et al, 2011). Zudem konnte die Wichtigkeit der Funktion des Alveolin-Proteins *TgAlv1* durch eine Mutation gezeigt werden, welche dazu führte, dass die jeweiligen Zellen eine stark verringerte mechanische Stabilität aufwiesen (Mann et al, 2002). Auch in *Plasmodium berghei* konnte die Relevanz eines Alveolin-Proteins (*PbAlv1*) in der Aufrechterhaltung der Zellform und der mechanischen Stabilität der Zelle gezeigt werden (Khater et al, 2004). Alveolin-Proteine weisen alle repetitive Aminosäuresequenzen auf, die in ihren Längen und Wiederholungen variieren, das Motiv „EKIVEVP“ ist jedoch stark konserviert (Gould et al, 2008a). Die repetitiven Motive sind dabei von nicht konservierten und

nicht repetitiven N- und C-Termini umgeben; dies erinnert an den prinzipiellen Aufbau von Intermediärfilamenten (Herrmann & Aebi, 2004) (Abb.1).

Bezüglich der repetitiven Motive aus den Alveolin-Proteinen konnten bei einer Proteom-Analyse der Pellicula *Tetrahymenas* Proteine mit ähnlichen repetitiven Motiven identifiziert werden; die sogenannten *charged repeat motif proteins* (CRMPs) (Gould et al, 2011). Obwohl die meisten CRMPs unbekannte Funktionen haben, ist der größte Anteil von CRMPs mit bekannter Funktion Zytoskelett assoziiert (Gould et al, 2008a; Honts & Williams, 1990; Kilburn et al, 2007; Williams & Honts, 1995; Williams et al, 1995). Auch die Alveolin-Proteine aus *Tetrahymena thermophila*, *TtALV1* und *TtALV2*, werden den CRMPs zugeordnet (Gould et al, 2011). Es wurde vermutet, dass die CRMPs grundsätzlich eine wichtige Rolle im Zytoskelett spielen könnten. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die meisten der CRMPs mit unbekannter Funktion ebenfalls Zytoskelett-Assoziationen aufweisen. Diese Hypothese sollte in der vorliegenden Arbeit näher analysiert werden.

### **6.1. Der Zusammenhang zwischen *TtALV2* und Intermediärfilamenten**

In dieser Arbeit wurde zunächst das Alveolin-Protein *TtALV2* aus *T. thermophila* näher analysiert. Mit einem Alveolin-spezifischen Antikörper (Gould et al, 2008a) wurde zunächst durch einen Western Blot getestet, ob der Antikörper *TtALV2*, mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 67,8 kDa, bindet. Es konnte ein Signal bei etwa 65 kDa nachgewiesen werden (Abb.10 Spur A). Um auszuschließen, dass der Antikörper kein homologes Protein von *TtALV2* gebunden hat, wurde eine BLASTp Analyse durchgeführt. Diese zeigte, dass im Genom von *T. thermophila* kein potenzielles Protein mit einem ähnlichen Molekulargewicht vorhanden ist. Um den Antikörper auf seine Spezifität hin weiter zu untersuchen wurden Fusions-Konstrukte erstellt und *T. thermophila* mit diesen erfolgreich transfiziert (*ALV2::GFP*, *ALV2::HA*). Nachdem die Fusions-Proteine exprimiert wurden, wurde aus den jeweiligen Zellen Gesamtzellextrakt isoliert und

Western Blots sowohl mit dem Alveolin-Antikörper, als auch mit einem GFP- und einem HA-Antikörper durchgeführt. Bei allen Western Blot Analysen konnte das jeweilige Fusions-Protein mit einem korrekten Molekulargewicht nachgewiesen werden. Durch die Western Blots, die mit dem Alveolin-Antikörper durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Fusions-Proteine keinem Überexpressions-Artefakt unterlagen. Außerdem wurde zudem stets ein Signal bei etwa 65 kDa detektiert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass für die Fusions-Konstrukte das Plasmid pTtag verwendet wurde, wobei nach einer Transfektion durch homologe Rekombination das markierte Gen im Lokus des *btu1*-Gens eingebaut wird. Deshalb wird stets das endogene Protein weiter exprimiert und demnach auch mit dem dafür spezifischen Antikörper nachgewiesen. Insgesamt konnte durch diese Analysen gezeigt werden, dass der anti-Alveolin Antikörper spezifisch eine Peptidsequenz aus *TtALV2* bindet und die Fusions-Proteine das erwartete Molekulargewicht aufweisen.

Schließlich konnte der Alveolin-Antikörper zur Lokalisation von *TtALV2* angewandt werden. Das endogene Protein lokalisiert in der Peripherie *Tetrahymenas*. Es bildet fleckenförmige Strukturen, welche sich zwischen den longitudinalen Mikrotubuli befinden und sich vom apikalen bis zum distalen Ende der Zelle erstrecken (Abb.10A). Dies entspricht der grundsätzlichen Anordnung der Alveoli (Satir & Wissig, 1982). Eine ähnliche Assoziation ist auch bei den Epiplasmin Proteinen A, B und C zu beobachten, allerdings weisen diese eine kontinuierlichere Anordnung in der Peripherie auf (Williams, 2003; Williams et al, 1995), was auf eine mögliche neue komplexere Ebene in der Pellicula von *Tetrahymena* hindeutet. Es könnte sein, dass das *TtALV2* eine Ebene zwischen den Alveoli und den anliegenden Mikrotubuli darstellt. Es wurde bereits bei Apicomplexen spekuliert, dass Alveolin-Proteine Filamente bilden, die sich entlang der Alveoli befinden (Bullen et al, 2009). Möglicherweise unterstützen sie dort die Stabilität der Pellicula.

Die Lokalisation des Fusions-Proteins ALV2::GFP war nicht identisch mit der des endogenen Proteins *TtALV2*. Stattdessen lokalisiert dieses Protein in den

Basalkörpern und im Cytostom von *T. thermophila* und bildet zudem ausgehend von den Basalkörpern fadenförmige Strukturen aus. Durch die Markierung der Zellen, die das Fusions-Protein ALV2::GFP exprimieren, mit dem Alveolin-Antikörper konnte deutlich gezeigt werden, dass neben dem Fusions-Protein das endogene Protein *Tt*ALV2 weiterhin exprimiert wird (Anhang Abb.25B). Die Hypothese, dass die alterierte Lokalisation durch die Größe des GFPs hervorgerufen wurde, wurde mit der Markierung des Gens mit HA (ALV2::HA), welches nur ein Molekulargewicht von etwa 3 kDa aufweist, widerlegt, da dieses Fusions-Protein genau die gleichen Assoziationen wie ALV2::GFP aufweist. Es besteht die Annahme, dass eine Interaktion der einzelnen Alveolin-Filamente miteinander inhibiert wurde. Durch die C-terminale Markierung sind mehrere Alveolin-Filamente anscheinend nicht mehr in der Lage eventuelle Anlagerungen aneinander zu vollziehen, die möglicherweise an den Termini stattfinden. Die Annahme solcher Interaktionen zwischen den einzelnen Alveolin-Filamenten besteht bereits (Bullen et al, 2009) und stellt zudem ein ähnliches Interaktionsmuster dar, wie es bereits bei IFs bekannt ist. Bei IFs ist die versetzte Anlagerung der Dimere zu einem Tetramer ohne die unabhängigen Termini nicht möglich (Abb.1; Chernyatina et al, 2012).

Trotz der veränderten Lokalisation des *Tt*ALV2 bei der Markierung mit GFP oder HA – im Vergleich zum endogenen Protein – konnte eine Assoziation mit der Peripherie der Zelle gebildet werden (Basalkörper-, Cytostom-Assoziation). Es folgte die Untersuchung der einzelnen Bereiche von *Tt*ALV2. *Tt*ALV2 hat, wie viele CRMPs und auch die Alveolin-Proteine, nicht konservierte N- und C-Termini, die keine repetitiven Motive aufzeigen und den charakteristischen, repetitiven Bereich (CRM, oder REP genannt) flankieren. Es wurden weitere Fusions-Konstrukte erstellt, wobei auf der einen Seite nur der CRM-Bereich am C-Terminus mit GFP markiert wurde (ALV2-REP::GFP) und auf der anderen Seite der CRM-Bereich durch das GFP ausgetauscht wurde (N::GFP::C). Durch diese Fusions-Proteine sollte die Rolle des CRMs und der Termini hinsichtlich der Zytoskelett-Assoziation untersucht werden. Denn ausgehend von Intermediärfilamenten wäre es möglich, dass die Lokalisationen durch die Termini bestimmt werden, wobei die repetitiven

Motive wahrscheinlich für die Filament-Bildung zuständig wären (Herrmann & Aebi, 2004; Parry et al, 2007). Bei Western Blot Analysen konnte das Fusions-Protein ALV2-REP::GFP sowohl mit GFP-Antikörpern, als auch mit dem Alveolin-Antikörper nachgewiesen werden. Letzteres ergab ein zusätzliches Signal bei etwa 65 kDa, was erneut das endogene Protein *TtALV2* darstellte (Abb.10, Spur C). Das Fusions-Protein N::GFP::C konnte nur mit dem GFP-Antikörper nachgewiesen werden, da der Alveolin Antikörper eine Peptidsequenz aus dem CRM-Bereich bindet und dieser bei dem Fusions-Protein N::GFP::C nicht vorhanden ist. Jedoch wurde auch bei dem Western Blot mit anti-Alveolin und dem Gesamtzellextrakt aus Zellen, die N::GFP::C exprimierten, das endogene Protein nachgewiesen (Abb.10, Spur D). Die Fluoreszenz-Aufnahmen zeigten schließlich die unterschiedlichen Zytoskelett-Assoziationen. Beide Fusions-Proteine lokalisierten weder wie das endogene *TtALV2*, noch wie das Fusions-Protein ALV2::GFP. Dies deutete auf eine mögliche Abhängigkeit der Termini und des CRM-Bereichs für die tatsächliche Lokalisation des Proteins hin. ALV2-REP::GFP lokalisiert in den Basalkörpern, im Cytostom und bildet zudem Assoziationen zu den transversalen Mikrotubuli. N::GFP::C hingegen lokalisiert überwiegend im Cytostom, wobei es anscheinend keine Assoziation mit den Basalkörpern des Cytostoms bildet. Da N::GFP::C das einzige Fusions-Protein ist, das nicht in den Basalkörpern lokalisiert, wäre es möglich, dass eine Affinität zwischen den repetitiven Motiven und den Basalkörpern besteht. Hervorzuheben ist hierbei, dass gerade dem repetitiven Bereich des Proteins coiled-coil Domänen vorhergesagt werden. Nicht außer Acht zu lassen ist, dass N::GFP::C das einzige Fusions-Protein ist, bei dem nicht der C-Terminus durch die Markierung gestört ist. Damit wären eventuelle Interaktionsstellen der Termini nicht maskiert und deshalb müsste nach der Theorie der Anlagerungen einzelner Alveolin-Filamente eine solche hierbei möglich sein. Allerdings scheinen die repetitiven Motive auch hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen, wie es ebenfalls bei IFs bekannt ist (Chernyatina et al, 2012). Dabei konnte gezeigt werden, dass bei der Bildung von IFs die Termini eines IF-Proteins bei der Stabilisierung des Tetramers wichtig sind, aber die Bildung eines Tetramers, ohne die zuvor gebildeten Dimere, welche

hauptsächlich durch die repetitiven Bereiche begünstigt werden, nicht möglich wäre. Fusions-Proteine wie N-REP::GFP::C oder N::GFP::REP-C könnten zur genaueren Charakterisierung der Abhängigkeit zwischen den Termini und dem CRM Bereich mit Hilfe einer GFP-Markierung beitragen. Dabei wären sowohl der CRM Bereich, als auch die Termini im Konstrukt enthalten, aber mögliche Interaktionsstellen der Termini nicht durch GFP maskiert. Solche Konstrukte konnten bisher aufgrund von Klonierungs-Schwierigkeiten nicht in *T. thermophila* lokalisiert werden.

In *T. gondii* wurden ebenfalls Versuche zur möglichen Abhängigkeit zwischen Termini und CRM-Bereich durchgeführt. Dabei wurden bei drei Proteinen (*TgALV1*, TGME49\_031640; *TgALV3*, TGME49\_016000 und *TgALV8*, TGME49\_024520), dessen Assoziationen mit den Alveoli in *T. gondii* zuvor gezeigt wurden, jeweils drei Konstrukte in *T. gondii* lokalisiert: i) der N-Terminus mit dem CRM-Bereich, ii) der C-Terminus mit dem CRM-Bereich und iii) der CRM-Bereich. Bei allen Konstrukten konnte insgesamt gezeigt werden, dass der CRM Bereich allein die gleiche kortikale Lokalisation wie das gesamte Protein aufwies (Anderson-White et al, 2011; El-Haddad et al, 2013). Insgesamt kann damit dem CRM-Bereich eine wichtige Rolle hinsichtlich einer peripheren Zytoskelett-Assoziation zugesprochen werden. Ohne die repetitiven Motive und damit den vorhergesagten coiled-coil Domänen, können wahrscheinlich keine filamentösen Protein-Strukturen – ähnlich wie bei IFs – entstehen. Damit kann hypothetisiert werden, dass für diese Proteine die filamentöse Eigenschaft eine essentielle Rolle für die Anordnung im peripheren Zytoskelett spielen könnte. Sie könnten dort eine wichtige Funktion in der Stabilität der Zelle einnehmen, welche wahrscheinlich nur durch die korrekte Anordnung gewährleistet wäre.

## 6.2. Die Rolle von *TtALV2* in *T. thermophila*

Um die Funktion des *TtALV2* näher zu analysieren, wurde versucht das Gen *Ttalv2* aus dem Genom von *T. thermophila* zu deletieren, indem es durch eine

Resistenz-Kassette ausgetauscht werden sollte. Zuerst wurde nach dem Protokoll von Dave et al (2009) versucht einen mikronukleären Keimbahn-Knock-Out zu erzielen. Jedoch scheiterte dies bei vier Versuchen stets beim Kreuzungstest, bei dem bestimmt wird, ob der Mikronukleus der Zellen heterozygot für das deletierte Gen *Ttalv2* ist. Dies ließ annehmen, dass der Knock-Out dieses Gens zur Letalität der Zellen führen könnte. Um dies näher zu klären, ist es in *T. thermophila* möglich, einen somatischen Knock-Down durchzuführen, wobei der Makronukleus transfiziert wird. Anschließend wird die Selektionsdroge nur soweit erhöht, dass zumindest einige Zellen einen veränderten Phänotyp aufweisen. Der somatische Knock-Down, welcher nach dem Protokoll von Tavares et al (2012) durchgeführt wurde, war erfolgreich. Es konnten interessante Phänotypen beobachtet werden, wobei die Zellen mehrere Cytostome und einige Mikro- und Makronuklei aufwiesen. Aufgrund einer unstablen Zell-Polarität könnten sich die verformten Zellen gebildet haben. Insgesamt schien dadurch eine Beeinträchtigung der Fähigkeit zur vollständigen Zellteilung entstanden zu sein (Abb.15). Dies erinnerte an die Phänotypen des Knock-Downs des Mob1 Proteins in *T. thermophila*, wobei Zellen mit gestörter Zellpolarität beobachtet wurden, die die Zytokinese nicht vollständig ausführen konnten. Auch ihre Cilien-Bildung war verzögert (Tavares et al, 2012). Bei Apicomplexen wird spekuliert, dass Alveolin-Proteine Filamente bilden, die sich entlang den Alveoli befinden (Bullen et al, 2009). Dies würde im Falle des hier beschriebenen Phänotypen bedeuten, dass die Verringerung der Alveolin-Proteine eine Schwächung der Alveoli hervorruft, wodurch insgesamt die Stabilität der Zell-Pellicula beeinträchtigt wird.

In *Tetrahymena* konnte häufig bei Knock-Out und Knock-Down Versuchen beobachtet werden, dass einige Zellen Defekte während der Zytokinese aufwiesen, was zu außergewöhnlichen Phänotypen führte. Es wurde durch eine mündliche Mitteilung (PhD Aaron Turkewitz, *The University of Chicago*, USA) angedeutet, dass solche Zellen einen ähnlich veränderten Phänotyp aufweisen, wie die in dieser Arbeit beschriebenen *Ttalv2*-Knock-Down Phänotypen. Damit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hier beobachteten Phänotypen ebenfalls auf ein solches Ereignis zurückzuführen sind. Dennoch unterstützen die im folgenden

Abschnitt diskutierten Ergebnisse, dass der Knock-Down zu den veränderten Phänotypen führte.

Bei dem Knock-Down wurde das Prinzip des *phenotypic assortments* ausgenutzt, indem die Zellen, die nicht die Resistenz-Kassette eingebaut hatten durch Erhöhung der Selektionsdroge ausgeschlossen wurden (Turkewitz et al, 2002). Zur Untersuchung der Integration der Resistenz-Kassette an der richtigen Stelle im Genom wurden PCRs mit entsprechenden Oligonukleotiden durchgeführt. Dadurch konnte die korrekte Integration der Resistenz-Kassette nachgewiesen werden. Die Kontroll-PCR diente dem Nachweis, dass die Isolierung der DNA erfolgreich war. Besonders bei der Wildtyp-DNA war dies erforderlich, da somit die Abwesenheit eines Signals bei den PCRs (tKD1 und tKD2) mit der Wildtyp-DNA nicht auf mögliche Belange bei der DNA-Isolierung zurückzuführen sind. Dies ist lediglich darauf zurückzuführen, dass sich bei dem Wildtypen an dem Genlokus von *Ttalv2* weiterhin *Ttalv2* befindet und deshalb PCRs mit den Oligonukleotiden, die genutzt wurden, keine Amplifikation zulassen. Durch die Kontroll-PCR kann auch ein Unterschied – verglichen mit tKD1 und tKD2 – in der Menge der Amplikons beobachtet werden. Diesbezüglich wird hypothetisiert, dass dies auf das Stadium der Zellen im *phenotypic assortments* zurückzuführen ist. Viele Zellen bildeten keinen veränderten Phänotyp aus. Dies könnte bedeuten, dass diese Zellen auf eine verminderte Expression des Resistenzgens zurückgreifen mussten, welche ausreichend für die erhöhte Selektion war. Die PCRs, die mit isolierter DNA der Zellen, die einen veränderten Phänotypen aufwiesen, durchgeführt wurden, zeigten mit einer geringen Amplikonmenge zwar die erfolgreiche Amplifikation der Fragmente, jedoch eine geringere Ausbeute im Vergleich zu den Kontroll-PCRs.

Dieselbe Hypothese besteht, wenn die Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR betrachtet werden. Dabei konnte eine relative Herunterregulierung des Gens *Ttalv2* in Zellen, die den veränderten Phänotypen ausbildeten – verglichen mit Wildtyp-Zellen und Zellen, die den veränderten Phänotypen nicht ausbildeten – von etwa 12% gezeigt werden. Hierbei wird ebenfalls vermutet, dass

die Resistenz-Kassette nicht alle der etwa 45 Genkopien von *TtAlv2* ersetzt hat. Es ist zu beachten, dass die RNA aus allen Zellen isoliert wurde und jede Zelle unterschiedliche Mengen an RNA-Kopien aufweist (Paulsson, 2004; Bar-Even et al, 2006; Subkhankulova et al, 2008). Außerdem wiesen nicht alle Zellen den veränderten Phänotyp auf. Dadurch zeigen auch diese Ergebnisse, dass die Zellen ohne veränderten Phänotyp scheinbar nur auf eine verminderte Expression des Resistenzgens zurückgriffen, welche für die erhöhte Selektion nötig war.

### 6.3. Die Zytoskelett-Assoziation der CRMPs

Nachdem das CRM-Protein *TtALV2* charakterisiert werden konnte und sich herausstellte, dass der CRM-Bereich des Proteins eine Affinität zum peripheren Zytoskelett und besonders zu den ciliären Basalkörpern aufwies, sollten weitere CRMPs in *T. thermophila* untersucht werden. Hierzu wurden die Proteine T THERM\_0777250, T THERM\_00678010, der C-terminale Bereich von T THERM\_00578520, welcher einen CRM-Bereich des Proteins darstellt und ein bestimmter CRM-Bereich von T THERM\_00127110 in *T. thermophila* lokalisiert. Bei drei Proteinen (T THERM\_00777250, T THERM\_00678010, T THERM\_00578520-C) konnten ähnliche Zytoskelett-Assoziationen gezeigt werden, wie sie bereits bei vier weiteren CRMPs gezeigt wurden (Gould et al, 2011). Da der CRM-Bereich des Proteins T THERM\_00127110 mit der GFP-Markierung keine Zytoskelett-Assoziation aufwies, belegt dies neben den weiteren durchgeführten Kontrollen, wie ALV2::HA und GFP alleine, dass der Zusammenhang zwischen den CRMPs und der Zytoskelett-Assoziation nicht auf die C-terminale Markierung mit GFP zurückzuführen ist. Dies konnte auch durch die filamentösen Strukturen, die das Fusions-Protein 678010::GFP aufwies, bestätigt werden. Dieses Fusions-Protein lokalisierte nicht – wie die meisten der hier gezeigten Fusions-Proteine – an den Basalkörpern. Es scheint als würden die Filamente ausgehend von dem *deep fiber bundle*, welcher einen Trichterförmigen Faserbündel ausgehend vom Cytostom der Zellen darstellt, gebildet werden, was jedoch näher zu analysieren ist. Insgesamt könnte dies auf eine vielschichtige

Integration von Zytoskelett-Proteinen bei *T. thermophila* hindeuten. Es zeigt, dass Zytoskelett-Proteine nicht mit den Basalkörpern assoziiert sein müssen und unterstützt die Theorie, dass nur peripher-assoziierte Zytoskelett-Proteine mit den Basalkörpern assoziieren könnten (Kapitel 6.4). Da nicht alle Zellen diese fluoreszierenden, filamentösen Strukturen aufwiesen, könnten diese eventuell auch auf ein Überexpressions-Artefakt hindeuten und bedarf ebenfalls weiteren Analysen.

Die meisten der im vorigen Abschnitt diskutierten Proteine könnten – laut Vorhersage – putative coiled-coil Domänen bilden, was auch sie als potenzielle IFs darstellt. Jedoch weisen diese CRMPs – bis auf THERM\_00678010 – keine Termini mit nicht repetitiven Aminosäuresequenzen auf, da ausschließlich CRMs diese Proteine bzw. Protein-Abschnitte bestimmen. Dadurch deuten diese Ergebnisse auch auf eine Abhängigkeit zwischen den CRMs und einer Zytoskelett-Assoziation hin. Zusammengefasst mit den Ergebnissen von *TiALV2* scheinen die repetitiven Motive zwar häufig eine Zytoskelett-Assoziation zu ermöglichen, wobei diese jedoch nicht zwingend korrekt ist. Dies deutet auf eine mögliche regulierende Rolle der Termini hin, welche eventuell zur „Feinjustierung“ der Lokalisation eines Proteins nach der *de novo* Synthese notwendig sind.

Zur Untersuchung der Affinität zwischen CRMs und dem Zytoskelett von *T. thermophila*, wurde ein synthetisches CRMP hergestellt (sCRMP), welches ausschließlich aus repetitiven Motiven besteht, welche die Kriterien eines CRMPs erfüllen. Zur Lokalisation wurde sCRMP am C-Terminus mit GFP markiert. Wie durch die Zytoskelett-Assoziationen der anderen CRMPs erwartet, lokalisierte dieses Fusions-Protein auch im peripheren Zytoskelett von *T. thermophila*. Hinsichtlich aller Lokalisationen kann ausgeschlossen werden, dass das GFP allein die Zytoskelett Assoziation verursacht, da dieses löslich im Zytosol und im Nukleus von *T. thermophila* lokalisiert (Abb.11). Dabei ist die Lokalisation im Nukleus dadurch zu belegen, dass Proteine, die löslich im Zytosol lokalisieren gleichzeitig im Nukleus auftreten können (Gould et al, 2006; Shen et al, 2010).

Besonders interessant ist die Cilien-Lokalisation der Fusions-Proteine sCRMP::GFP und 77250::GFP. Ciliäre Lokalisationen werden durch ein Mikrotubuli-basiertes sogenanntes intraflagellares Transportsystem (*intraflagellar transport system*; IFT) ermöglicht, wobei einzelne Komplexe dieses IFTs selektiv Proteine binden und diese durch Mikrotubuli-Dupletts zwischen dem Zytosol und den Cilien transportiert werden (Pigino et al, 2009; Rosenbaum & Witman, 2002). Die in Abbildung 6 B gezeigte elektronendichte Schicht zwischen der Cilie und dem Basalkörper wurde erst kürzlich als ciliärer Poren-Komplex identifiziert, welcher anhand einer schematischen Darstellung gezeigt wird (Abb.24). Dieser ciliäre Poren-Komplex verhindert, dass Proteine zurück zum Zytosol gelangen und

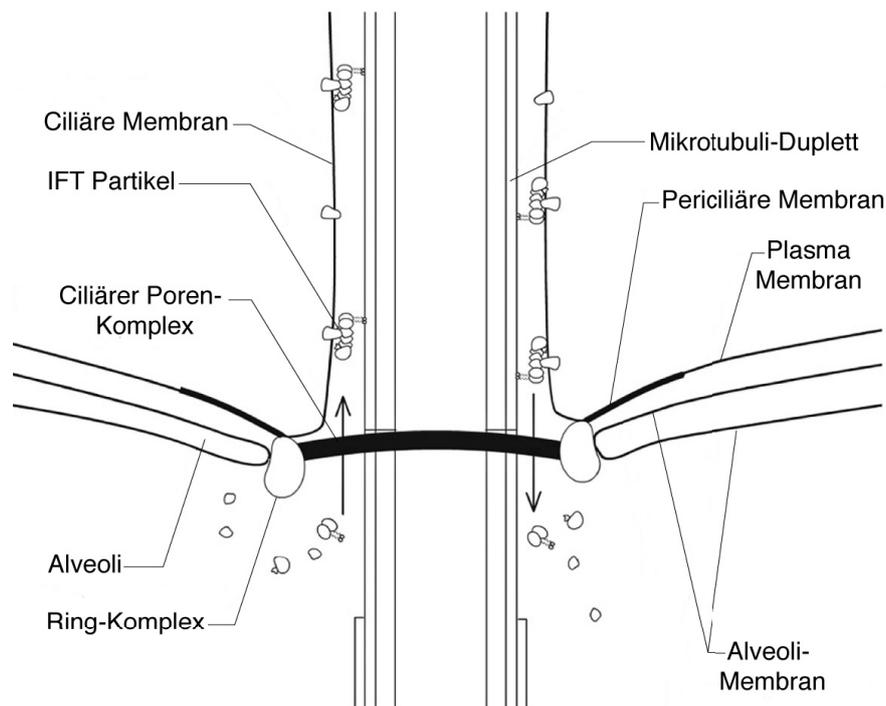


Abb.24: Schematische Darstellung einer Cilie am basalen Ende. Der ciliäre Poren-Komplex ist deutlich zu erkennen, wozu ebenfalls die Diffusions-Barriere gehört, welche aus den Ring-Komplexen und der periciliären Membran besteht. Diese Abbildung verdeutlicht das Verständnis, dass die IFT Partikel sich zunächst in der Nähe, des Basalkörpers ansammeln, bevor sie dann in die Cilie transportiert werden. (Ounjai et al, 2013)

stellt gleichzeitig eine Barriere für „unerwünschte“ Proteine dar (Kee et al, 2012; Ounjai et al, 2013). Proteine, die ein geringeres Molekulargewicht als 41 kDa haben, können diese Barriere passieren (Kee et al, 2012). Da die Fusions-

Proteine sCRMP::GFP und 777250::GFP ein höheres Molekulargewicht aufweisen, ist dies ein weiteres unterstützendes Merkmal dafür, dass die CRMs eine wichtige Rolle bei der Assoziation zum peripheren Zytoskelett spielen.

In der Arbeit von Ounjai et al (2013) wurde eine Proteom-Analyse des ciliären Poren-Komplexes von *Tetrahymena* durchgeführt. Die Proteine wurden unter anderem daraufhin getestet, ob sie auch im Pellicula Proteom aus Gould et al (2011) auftreten. Tatsächlich sind 65% der Proteine (189 Proteine) aus dem ciliären Poren-Komplex Proteom auch im Pellicula Proteom vorzufinden. Dies belegt, dass die Proteom Analysen scheinbar zuverlässig sind, da eine Übereinstimmung von Proteinen aus diesen beiden Analysen zu erwarten war. In dieser Arbeit wurde untersucht, wie viele dieser 189 Proteine aus dem Pellicula Proteom zugleich als CRMPs identifiziert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass 22 dieser Proteine als CRMPs gelten und 16 dieser CRMPs sowohl vorhergesagte coiled-coil Domänen bilden, als auch ein höheres Molekulargewicht als 41 kDa aufweisen. Damit kann hypothetisiert werden, dass diese Proteine und auch die Fusions-Proteine sCRMP::GFP und 777250::GFP aufgrund ihrer vorhergesagten Sekundär-Struktur – coiled-coil Domänen – zum ciliären Poren-Komplex gelangen könnten, welche wahrscheinlich durch ihre repetitiven Aminosäuresequenzen gebildet werden (Rose & Meier, 2004; Rose et al, 2005). Sie könnten jedoch auch bestimmte Signale aufweisen, wie es auch bei Proteinen, die den nukleären Poren-Komplex passieren, der Fall ist (Kee et al, 2012; Stewart, 2007). Bei einer bestimmten Protein-Gruppe (FG-Nups) ist bekannt, dass sie den nukleären Poren-Komplex passieren und zudem FG-reiche Domänen und repetitive Motive bestehend aus GIFG oder FxFG (x stellt eine beliebige Aminosäure dar) aufweisen (Jamali et al, 2011). CRMs weisen zwar nicht diese repetitiven Motive auf, aber es besteht die Möglichkeit, dass ein anderes repetitives Motiv das Signal zum Passieren des ciliären Poren Komplexes darstellt. Dabei könnte die Spezifität in der Zusammensetzung der repetitiven Motive bestimmen, dass ein jeweiliges Protein den ciliären Poren Komplex und nicht den nukleären Poren-Komplex passiert.

#### 6.4. Basalkörper als Intermediärfilament-organisierende Zentren

Basalkörper gelten bekanntlich als Mikrotubuli-Organisierungs-Zentren (MTOCs; *microtubule-organizing-centre*), weil durch sie Cilien gebildet werden (Henneguy, 1898; Lenhossek, 1898; Dawe et al, 2007; Kilburn et al, 2007). In Abbildung 6 ist der schematische Aufbau eines Basalkörpers aus neun Mikrotubuli-Tripletts dargestellt. Ein Basalkörper kann in mehrere Domänen unterteilt werden, wobei diese wahrscheinlich die verschiedenen Funktionen erfüllen. Diese einzelnen Funktionen eines Basalkörpers liegen in der Entstehung dieser, dem kortikalen Andocken, der Aufrechterhaltung der Zell-Polarität, aber vor allem in der Ansammlung von Proteinen für die Cilien und der Cilien-Bildung (Kilburn et al, 2007). An einem einzelnen Basalkörper sind mehr als 100 Proteine beteiligt oder assoziiert (Andersen et al, 2003; Kilburn et al, 2007; Nogales-Cadenas et al, 2009; Stewart, 2007). Dies verdeutlicht die Komplexität dieser Struktur. In dieser Arbeit wiesen auffällig viele der GFP Fusions-Proteine eine Assoziation mit den Basalkörpern auf. Besonders interessant ist dabei die Lokalisation des Fusions-Proteins ALV2::GFP, da das endogene Protein *Tt*ALV2 keinerlei Assoziationen mit den Basalkörpern aufwies. Dass diese Basalkörper-Assoziation nicht auf die GFP-Markierung zurückzuführen ist, konnte durch die Lokalisation des GFPs, welche löslich im Zytosol ist, gezeigt werden. Des Weiteren konnten durch andere Fusions-Proteine mit einer GFP-Markierung in dieser Arbeit (127110CRM::GFP und 678010::GFP) und auch in anderen Arbeiten (Gotesman et al, 2011; Poklepovich et al, 2012; Yao et al, 2007) gezeigt werden, dass GFP Fusions-Proteine nicht zwingend mit dem Zytoskelett und auch nicht mit den Basalkörpern in *Tetrahymena* assoziiert sein müssen. Nicht nur ALV2::GFP, sondern auch die Fusions-Proteine ALV2::HA, ALV2-REP::GFP, sCRMP::GFP, 777250::GFP, 578520-C::GFP lokalisierten unter anderem in den ciliären Basalkörpern von *T. thermophila*. Zudem konnten zwei Proteine des Basalkörper-Proteoms aus Kilburn et al (2007), welche ebenfalls durch C-terminale GFP-Markierung an den Basalkörpern lokalisiert werden konnten, als CRMPs identifiziert werden. Zusammengefasst zeigen diese Fakten, dass anscheinend eine starke Korrelation zwischen den CRMs und der Basalkörper-Assoziation besteht.

In Anbetracht der Tatsache, dass ALV2::GFP nicht wie das endogene Protein *TtALV2* lokalisiert, besteht zudem die Hypothese, dass ein Zytoskelett-assoziiertes Protein nach seiner Expression zunächst in den Basalkörpern lokalisiert und von dort aus zu seiner regulären Lokalisation geleitet wird. Es könnte sein, dass die Basalkörper eine Art „Basis-“ oder „Transfer-Station“ (*default destination*) für Zytoskelett-assoziierte Proteine darstellen und Proteine, die sich eventuell aufgrund der C-terminalen Markierung nicht richtig falten können, oder diese sie daran hindert mit anderen Proteinen notwendige Assoziationen zu bilden, nicht an ihre regulären Lokalisationen weitergeleitet werden können. Hinsichtlich dieser Hypothese wurden Fusions-Proteine untersucht, die nicht nur in den Basalkörpern lokalisierten, sondern auch filamentöse Strukturen ausbildeten (777250::GFP und ALV2-REP::GFP). Die jeweiligen Zellen wurden mit CdCl<sub>2</sub> inkubiert, damit die Expression der Fusions-Proteine induziert wurde, und zu verschiedenen Zeiten fixiert. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass diese Fusions-Proteine kurz nach ihrer *de novo* Synthese zunächst nur in den Basalkörpern lokalisierten. Erst nach einer gewissen Zeit konnte beobachtet werden, wie sich von den Basalkörpern aus die filamentösen Strukturen bildeten (Abb.21). Die Vermutung, die hinsichtlich dieser Ereignisse besteht ist, dass Basalkörper nicht nur als Mikrotubuli-Organisierungs-Zentren dienen könnten, sondern eventuell sogar als Intermediärfilament-organisierende-Zentren fungieren könnten. Basalkörper sind in ihrem Aufbau sehr komplex (Andersen et al, 2003; Kilburn et al, 2007; Nogales-Cadenas et al, 2009; Stewart, 2007) und ihre Funktion ist bis heute nicht gänzlich verstanden. Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein Protein (Mob1) verstärkt in den Basalkörpern am posterioren Ende *Tetrahymenas* lokalisierte (Tavares et al, 2012). Es scheint, als würden sich die Basalkörper am posterioren Ende der Zelle – zumindest in der Zusammensetzung ihrer Assoziations-Proteine – von den Basalkörpern am anterioren Ende unterscheiden. Insgesamt stellen die Basalkörper ein sehr komplexes System dar, was sich bereits in ihrer eigenen Synthese widerspiegelt (Pearson et al, 2009).

## 6.5. CRMPs als neue Gruppe der Intermediärfilamente

Bisher konnte gezeigt werden, dass viele CRMPs in *T. thermophila* Zytoskelett-Assoziationen aufweisen und die repetitiven Motive dafür unter Umständen mit verantwortlich sind. Die nächste Frage die sich stellte war, ob CRMs nur in *T. thermophila* solche Assoziationen dirigieren, oder ob auch eventuell in Metazoen solche Zytoskelett-Assoziationen gezeigt werden könnten. Bereits in Gould et al. (2011) konnte gezeigt werden, dass CRMPs *de facto* nicht nur in *T. thermophila*, sondern auch in anderen Protozoen nachzuweisen sind (Tabelle2).

Tabelle 2: Anteil von CRMPs in Genomen verschiedener Protozoen. Es wird deutlich, dass *T. thermophila* den größten Anteil an CRMPs aufweist. Grau hinterlegt sind Protozoen, die zu den Alveolata gehören. (Gould et al, 2011)

Genom	Anzahl der Proteine	CRMPs	Anteil
<i>Tetrahymena thermophila</i>	24698	3312	13,41%
<i>Plasmodium falciparum</i>	5462	592	10,84%
<i>Paramecium tetraurelia</i>	39240	3550	9,05%
<i>Plasmodium yoelii</i>	7663	509	6,64%
<i>Cryptosporidium parvum</i>	3805	210	5,52%
<i>Plasmodium vivax</i>	5429	269	4,95%
<i>Plasmodium knowlesi</i>	5108	250	4,89%
<i>Neospora canium</i>	5585	220	3,94%
<i>Trichomonas vaginalis</i>	50184	1863	3,71%
<i>Plasmodium berghei</i>	12102	386	3,19%
<i>Giardia lamblia</i>	4770	141	2,96%
<i>Toxoplasma gondii</i> ME49	7986	223	2,79%
<i>Toxoplasma gondii</i> VEG	7839	206	2,63%
<i>Toxoplasma gondii</i> GT1	8100	207	2,56%
<i>Theileria parva</i>	4067	99	2,43%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11081	264	2,38%
<i>Trypanosoma brucei</i>	8824	168	1,90%
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	11340	202	1,78%
<i>Leishmania major</i>	8128	143	1,76%
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	16378	229	1,40%
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	9973	114	1,14%
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	1947	15	0,77%
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	5001	14	0,28%

Der größte Anteil der CRMPs ist in *T. thermophila* nachzuweisen und der zweit-größte Anteil in anderen Alveolata. Hierbei ist zu beachten, dass die CRMPs nach den in *T. thermophila* identifizierten CRMP-Eigenschaften nachgewiesen wurden. Auch in dieser Arbeit konnten mit Hilfe dieser CRMP-Eigenschaften Proteine untersucht werden. Dabei erfolgte die Untersuchung insofern anders, dass nicht das ganze Genom eines Organismus nach CRMPs untersucht wurde, sondern dass bekannte Zytoskelett-assoziierte Proteine aufgelistet wurden und untersucht wurde, wie viele von diesen als CRMPs nachgewiesen werden können. 69% dieser Proteine wurden als CRMPs identifiziert (Tabelle 1). Alle der aufgezeigten Proteine weisen repetitive Motive auf. Sollte also die Berechnung von CRMPs auf einzelne Sequenz-Charakteristika jeweiliger Organismen angepasst werden, würde dies sicherlich zu einem erhöhten Anteil an gezeigten CRMPs in einer derartigen Tabelle führen. Immerhin ist bekannt, dass die Vorhersage von Programmen durch die Vielzahl an Proteinen und/oder Parametern verfeinert werden kann (Burstein et al, 2012; Burstein et al, 2009; Verma & Melcher, 2012; Woodcroft et al, 2012).

Die zytosolische Lokalisation des sCRMPs in Human-Zellen ist wahrscheinlich ebenfalls darauf zurückzuführen, dass dieses CRMP nach den in *Tetrahymena* identifizierten CRMPs definiert wurde. Wenn beispielsweise die CRMPs nach den Sequenz-Charakteristika von epithelialen Vaginalzellen definiert wären und demnach ein synthetisches CRMP synthetisiert worden wäre, hätte wahrscheinlich eine Assoziation mit dem Zytoskelett gezeigt werden können.

In dieser Arbeit wurde bereits oft angemerkt, dass viele CRMPs eine große Ähnlichkeit zu IFs aufweisen. Dies spiegelt sich beispielsweise in der Tabelle 1 wieder, in welcher IF-Proteine wie Lamin und Keratin (McKeon et al, 1986; Woodcock-Mitchell et al, 1982) als CRMPs identifiziert wurden. Demzufolge waren bei jenen Proteinen auch coiled-coil Domänen zu erwarten, da IFs durch diese Domänen charakterisiert sind (Herrmann & Aebi, 2004). Insgesamt konnten 63% aller CRMPs putative coiled-coil Domänen zugeschrieben werden (Tabelle 1). Dabei sind repetitive Sequenzen dafür bekannt eine ideale Grundlage für mögliche

coiled-coil Domänen zu kodieren (Rose & Meier, 2004; Rose et al, 2005). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht alle CRMPs (127110CRM::GFP und 678010::GFP), welche putative coiled-coil Domänen aufweisen, zu Zytoskelett-Assoziationen führen. Dabei ist bekannt, dass Proteine mit coiled-coil Domänen nicht zwingend zu Zytoskelett-Assoziationen führen müssen (Rose & Meier, 2004; Rose et al, 2005). Dennoch wurde gezeigt, dass viele der Zytoskelett-assoziierten CRMPs in Tabelle 1 putative coiled-coil Domänen bilden (63%) und damit potenzielle IFs darstellen könnten (wenn sie nicht bereits als solche identifiziert sind). Damit bleibt die Hypothese bestehen, dass CRMPs eventuell eine Intermediärfilament-ähnliche neuartige Gruppe darstellen. Sie könnten allerdings auch eine neue Art der Klassifizierung von Proteinen darstellen. Zwar kann nicht behauptet werden, dass 100% aller Proteine, die sowohl CRMs, als auch putative coiled-coil Domänen aufweisen gleichzeitig Zytoskelett-Proteine darstellen, jedoch könnten diese Faktoren bei der Vorhersage der Assoziation eines unbekanntes Proteins eine Rolle spielen.

Viele der in Tabelle 1 gezeigten CRMPs wiesen bei BLASTp-Analysen auch putative SMC-Domänen (und/oder Viral-A Domänen) auf. Die *structural maintenance of chromosomes*-Protein Familie gilt sowohl bei den Archaeen als auch bei Eukaryoten als beständige Protein-Familie. Diese Proteine bestehen aus langen repetitiven Domänen (mehr als 250 Aminosäuren lang), welche ebenfalls coiled-coil Domänen ausbilden. Die Funktionen identifizierter SMC-Proteine liegen in der Regulation der strukturellen und funktionellen Organisation von Chromosomen von Bakterien bis hin zu Human-Zellen (Losada, 2005; Nasmyth & Haering, 2005). SMC-Domänen weisen, ähnlich wie CRMPs, positiv geladene Aminosäuren auf. Bezogen auf diese Eigenschaften von SMC-Proteinen ist es wahrscheinlich, dass sie mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA assoziieren. Es konnte zudem gezeigt werden, dass SMC-Proteine unter den eukaryotischen Proteinen, diejenigen mit den am stärksten konservierten coiled-coil Domänen sind (Rose et al, 2005). Insgesamt war die starke Homologie der Zytoskelett-assoziierten CRMPs zu den SMC-Domänen, aufgrund der ähnlichen Eigenschaften, bei BLASTp-Analysen zu erwarten. Bei Viral-A Domänen konnten

ebenfalls repetitive Motive mit geladenen Eigenschaften nachgewiesen werden. Demnach wurde das Auftreten der vorhergesagten Viral-A Domänen bei den CRMPs ebenfalls erwartet (Tabelle 1; Gould et al, 2011). Zusammengenommen könnte die Vorhersage eines CRMPs mit putativen coiled-coil Domänen und sogar den SMC- und Viral-A Domänen als erste Indikatoren für Zytoskelett-assoziierte Proteine, beziehungsweise IFs verwendet werden. Immerhin sind IFs bisweilen nicht ausreichend identifiziert; vor allem nicht in Protozoen. Dies ist wahrscheinlich auf gering konservierte Bereiche innerhalb der Sequenz in diesen Proteinen zurückzuführen, welche dazu führt, dass keine zuverlässigen Homologien aufgezeigt werden können. Aber auch die repetitiven Motive führen wahrscheinlich dazu, dass Alignments mit anderen Aminosäuresequenzen schwer zu erstellen sind, da bei den Sequenzen die keine repetitiven Sequenzen enthalten viele Lücken (*gaps*) entstehen würden. Schließlich bestehen solche Lücken bereits bei der Darstellung der repetitiven Motive einer einzigen Protein-Sequenz (Abb.9 und 22). Deshalb sollten zur Identifizierung von IFs oder von eventuellen Zytoskelett-Proteinen keine Blast Analysen durchgeführt werden, sondern funktionelle Analysen, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurden.

## 6.6. Rückschlüsse aus dieser Arbeit

Alveolata besitzen phänotypische Alveoli, welche einen Teil der komplexen Zell-Pellicula ausmachen. Als erster molekularer Nexus der Alveolata konnten die sogenannten Alveolin-Proteine nachgewiesen werden, welche mit den Alveoli assoziiert sind (Gould et al, 2008a). Basierend auf den charakteristischen repetitiven Motiven der Alveolin-Proteine wurden in dem Ciliat *Tetrahymena thermophila* erstmals CRMPs identifiziert (Gould et al, 2011). In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen den CRMPs und dem Zytoskelett von *T. thermophila* näher analysiert.

Die Importanz eines CRMPs konnte durch die beispielhafte Charakterisierung eines Vertreters, dem *TtALV2* – einem Alveolin-Protein aus *T. thermophila* – gezeigt werden. Dieses Protein erfüllt anscheinend essentielle

Funktionen in Bezug auf die Stabilität der Zell-Pellicula. Den in dieser Arbeit untersuchten CRMPs konnten insgesamt große Parallelen zum Aufbau von Intermediärfilamenten (IFs) nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass teils eine Abhängigkeit zwischen den CRMs und den nicht repetitiven Termini besteht und beide zur korrekten Assoziation eines CRMPs erforderlich sind. Zudem konnte eine starke Affinität zwischen den CRMs und der peripheren Zytoskelett-Assoziation eines CRMPs beobachtet werden. In dem Zusammenhang konnten die ciliären Basalkörper *Tetrahymenas* als mögliche wichtige Transfer-Stationen identifiziert werden, was auf eine mögliche, übergeordnete Funktion als IFs-organisierende-Zentren hindeutet. Durch die Lokalisation eines synthetischen CRMPs konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass CRMPs, entweder aufgrund ihrer Sekundärstruktur oder aufgrund eventueller interner Signale, den ciliären Poren-Komplex passieren können. Insgesamt konnte die Hypothese, es bestehe eine Abhängigkeit zwischen CRMPs und einer Zytoskelett-Assoziation – auch durch die bioinformatische Analyse der CRMPs in anderen Organismen – weiter bestätigt werden.

## 6.7. Ausblick auf weitere Versuche

Als besonders interessant erschienen die Assoziationen vieler CRMPs mit den Basalkörpern und die Tatsache, dass ihnen eine neuartige Funktion zugeschrieben werden könnte (IF-organisierende-Zentren). Hierzu sollte die Wanderung von peripher-assoziierten Proteinen während ihrer *de novo* Synthese exakt beobachtet werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen könnten dabei genauere Erkenntnisse liefern.

Die Analyse der Sekundärstruktur eines CRMPs würde sicherlich das Verständnis hinsichtlich ihrer Zytoskelett-Assoziation erweitern. Dies könnte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie oder der Röntgenstrukturanalyse gelingen. Allerdings ist von IFs bekannt, dass die Kristallisierung – aufgrund ihres Aufbaus –

nicht problemlos ist. Dennoch könnte die Sekundärstruktur Aufschluss darüber bringen, ob CRMPs tatsächlich als neue Gruppe der Intermediärfilamente gelten.

Ein weiterer Ausblick wäre die CRMPs und ihre Eigenschaften als Tool zur Identifizierung einer Vielzahl möglicher bisher unentdeckter IFs in verschiedenen Organismen zu nutzen. Dabei könnten die Ergebnisse dieser Arbeit eine Grundlage für weitere Untersuchungen darstellen.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

AF	Aktin-Filamente
ALV	Alveoli
Alv	Alveolin
BB	Basalkörper
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Bovines (Rinder-)Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CdCl <sub>2</sub>	Cadmiumchlorid
CIL	Cilium
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CON	Conoid
CR	<i>circumciliary rings</i>
CRMP	<i>charged repeat motif protein</i>
CT	Cytostom
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank der Universität von Iowa
DVNP	<i>Dinoflagellate Viral Nucleo Proteins</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
Fe	Eisen
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IF	Intermediär Filament
IFT	<i>Intraflagellar transport system</i>
IgG	Immunoglobulin

k	Kilo
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
kb	Kilobase = 1000 Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KF	<i>Kinetodesmal Fibres</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
LB	lysogeny broth
LM	longitudinale Mikrotubuli
M	mol pro Liter
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
MS	Membran-Skelett
MTOC	<i>microtubule-organizing-centre</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NCBI	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>
Par <sup>R</sup>	Paromomycin-resistent
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PIPES	1,4-Piperazinediethanesulfonic acid
pH	pH-Wert; pH= -log <sub>10</sub> [H <sup>+</sup> ]
RADAR	<i>Rapid Automatic Detection and Alignment of Repeats in protein sequences</i>
REP	<i>Repeat</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunde
SFM	Serum freies Medium
SPP	Super Proteose Pepton
TC	Trichozyste
TE	Tris EDTA
TetraFGD	<i>Tetrahymena Functional Genomics Database</i>
TGD	<i>Tetrahymena Genome Database</i>
TM	transversale Mikrotubuli
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit, <i>unit</i>

v	Volumen
w	Gewicht
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )

## 8. Referenzen

Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, Deng M, Liu C, Widmer G, Tzipori S, Buck GA, Xu P, Bankier AT, Dear PH, Konfortov BA, Spriggs HF, Iyer L, Anantharaman V, Aravind L, Kapur V (2004) Complete genome sequence of the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. *Science* 304: 441-445

Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52: 399-451

Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukés J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EAD, Mozley-Standridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW (2012) The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 59: 429-493

Allen RD (1968) A reinvestigation of cross-sections of cilia. *J Cell Biol* 37: 825-831

Allen RD (1969) The morphogenesis of basal bodies and accessory structures of the cortex of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *J Cell Biol* 40: 716-733

Allen RD, Wolf RW (1979) Membrane recycling at the cytoproct of *Tetrahymena*. *J Cell Sci* 35: 217-227

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* 25: 3389-3402

Altschuler MI, Yao MC (1985) Macronuclear DNA of *Tetrahymena thermophila* exists as defined subchromosomal-sized molecules. *Nucl Acids Res* 13: 5817-5831

Ammerman.D (1970) The Micronucleus of ciliate *Stylonychia mytilus* - Its nucleic acid synthesis and its function. *Exp Cell Res* 61: 6-12

Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA, Mann M (2003) Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* 426: 570-574

- Anderson-White BR, Ivey FD, Cheng K, Szatanek T, Lorestani A, Beckers CJ, Ferguson DJP, Sahoo N, Gubbels M-J (2011) A family of intermediate filament-like proteins is sequentially assembled into the cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol* 13: 18-31
- Archibald JM (2009) The puzzle of plastid evolution. *Curr Biol* 19: R81-88
- Arroyo R, Gonzáles-Robles A, Martínez-Palomo, Alderete JF (1993) Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Mol Microbiol* 7: 299-309
- Bachvaroff TR, Handy SM, Place AR, Delwiche CF (2011) Alveolate phylogeny inferred using concatenated ribosomal proteins. *J Eukaryot Microbiol* 58: 223-233
- Bakowska J, Frankel J, Nelsen EM (1982) Regulation of the pattern of basal bodies within the oral apparatus of *Tetrahymena thermophila*. *J Embryol Exp Morphol* 69: 83-105
- Bar-Even A, Paulsson J, Maheshri N, Carmi M, O'Shea E, Pilpel Y, Barkai N (2006) Noise in protein expression scales with natural protein abundance. *Nature Genetics* 38: 636-643
- Bascom RA (1999) Identification and characterization of golgin-84, a novel Golgi integral membrane protein with a cytoplasmic coiled-coil domain. *J Biol Chem* 274: 2953-2962
- Baurain D, Brinkmann H, Petersen J, Rodriguez-Ezpeleta N, Stechmann A, Demoulin V, Roger AJ, Burger G, Lang BF, Philippe H (2010) Phylogenomic evidence for separate acquisition of plastids in cryptophytes, haptophytes, and stramenopiles. *Mol Biol Evol* 27: 1698-1709
- Bennett V, Baines AJ (2001) Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* 81: 1353-1392
- Béraud-Dufour S, Gautier R, Albiges-Rizo C, Chardin P, Faurobert E (2007) Krit 1 interactions with microtubules and membranes are regulated by Rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1. *FEBS J* 274: 5518-5532
- Berger JD, Schmidt HJ (1978) Regulation of macronuclear DNA content in *Paramecium tetraurelia*. *J Cell Biol* 76: 116-126
- Black MW, Boothroyd JC (2000) Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 607-623
- Blackburn EH (2010) Telomeres and telomerase: the means to the end (Nobel lecture). *Angew Chem* 49: 7405-7421

- Blackburn EH, Gall JG (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 120: 33-53
- Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. *Sleep Med Rev* 170: 191-203
- Blose SH, Meltzer DI (1981) Visualization of the 10-NM filament vimentin rings in vascular endothelial cells in situ: close resemblance to vimentin cytoskeletons found in monolayers in vitro. *Exp Cell Res* 135: 299-309
- Bodansky S, Mintz LB, Holmes DS (1979) The mesokaryote *Gyrodinium cohnii* lacks nucleosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 88: 1329-1336
- Bodyl A, Stiller JW, Mackiewicz P (2009) Chromalveolate plastids: direct descent or multiple endosymbioses? *Trends Ecol Evol* 24: 119-121
- Bornberg-Bauer E, Rivals E, Vingron M (1998) Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic Acids Res* 26: 2740-2746
- Bouck GB, Ngo H (1996) Cortical structure and function in euglenoids with reference to trypanosomes, ciliates, and dinoflagellates. *Int Rev Cytol* 169: 267-318
- Bouligand Y, Norris V (2001) Chromosome separation and segregation in dinoflagellates and bacteria may depend on liquid crystalline states. *Biochimie* 83: 187-192
- Bretscher A, Edwards K, Fehon RG (2002) ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 586-599
- Bricheux G, Coffe G, Brugerolle G (2007) Identification of a new protein in the centrosome-like "attractophore" of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 153: 133-140
- Brown JM, Hardin C, Gaertig J (1999) Rotokinesis, a novel phenomenon of cell locomotion-assisted cytokinesis in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Cell Biol Int* 23: 841-848
- Brunk CF, Navas P (1988) Transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation and parameters effecting cell survival. *Exp Cell Res* 174: 525-532
- Bruns PJ, Cassidy-Hanley D (2000) Biolistic transformation of macro- and micronuclei. *Methods Cell Biol* 62: 501-512
- Bullen HE, Tonkin CJ, O'Donnell RA, Tham WH, Papenfuss AT, Gould S, Cowman AF, Crabb BS, Gilson PR (2009) A novel family of apicomplexan

glideosome-associated proteins with an inner membrane-anchoring role. *J Biol Chem* 284: 25353-25363

Burki F, Inagaki Y, Brate J, Archibald JM, Keeling PJ, Cavalier-Smith T, Sakaguchi M, Hashimoto T, Horak A, Kumar S, Klaveness D, Jakobsen KS, Pawlowski J, Shalchian-Tabrizi K (2009) Large-scale phylogenomic analyses reveal that two enigmatic protist lineages, telonemia and centroheliozoa, are related to photosynthetic chromalveolates. *Genome Biol Evol* 1: 231-238

Burki F, Shalchian-Tabrizi K, Minge M, Skjaeveland A, Nikolaev SI, Jakobsen KS, Pawlowski J (2007) Phylogenomics reshuffles the eukaryotic supergroups. *PLoS One* 2: e790

Burki F, Shalchian-Tabrizi K, Pawlowski J (2008) Phylogenomics reveals a new 'megagroup' including most photosynthetic eukaryotes. *Biol Lett* 4: 366-369

Burstein D, Gould SB, Zimorski V, Kloesges T, Kiosse F, Major P, Martin WF, Pupko T, Dagan T (2012) A machine learning approach to identify hydrogenosomal proteins in *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell* 11: 217-228

Burstein D, Zusman T, Degtyar E, Viner R, Segal G, Pupko T (2009) Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approach. *PLoS Pathog* 5: e1000508

Carruthers VB, Giddings OK, Sibley LD (1999) Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell Microbiol* 1: 225-235

Carruthers VB, Sibley LD (1997) Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 73: 114-123

Cassidy-Hanley D, Bowen J, Lee JH, Cole E, VerPlank LA, Gaertig J, Gorovsky MA, Bruns PJ (1997) Germline and somatic transformation of mating *Tetrahymena thermophila* by particle bombardment. *Genetics* 146: 135-147

Cassidy-Hanley D, Smith HR, Bruns PJ (1995) A simple, efficient technique for freezing *Tetrahymena thermophila*. *J Eukaryot Microbiol* 42: 510-515

Cavalier-Smith T (1991) Cell diversification in heterotrophic flagellates. In *The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates*. Oxford University Press, Oxford. pp. 113–131

Cavalier-Smith T (1999) Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J Eukaryot Microbiol* 46: 347-366

- Cech TR (1990) Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from *Tetrahymena* (Nobel lecture). *Biosci Rep* 10: 239-261
- Chalker DL (2008) Dynamic nuclear reorganization during genome remodeling of *Tetrahymena*. *Biochim Biophys Acta* 1783: 2130-2136
- Chang L, Goldman RD (2004) Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 601-613
- Chernyatina AA, Nicolet S, Aebi U, Herrmann H, Strelkov SV (2012) Atomic structure of the vimentin central alpha-helical domain and its implications for intermediate filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 13620-13625
- Clark DP (1999) New insights into human cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev* 12: 554-563
- Collins K, Gorovsky MA (2005) *Tetrahymena thermophila*. *Curr Biol* 15: R317-318
- Collins TJ (2007) ImageJ for microscopy. *Biotechniques* 43: 25-30
- Conover RK, Brunk CF (1986) Characterization of the macronuclear DNA of different species of *Tetrahymena*. *J Mol Evol* 24: 143-151
- Corliss JO (2002) Biodiversity and biocomplexity of the protists and an overview of their significant roles in maintenance of our biosphere. *Acta Protozool* 41:199–219.
- Csank C, Taylor FM, Martindale DW (1990) Nuclear pre-mRNA introns: analysis and comparison of intron sequences from *Tetrahymena thermophila* and other eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 18: 5133-5141
- Dave D, Wloga D, Gaertig J (2009) Manipulating ciliary protein-encoding genes in *Tetrahymena thermophila*. *Methods Cell Biol* 93: 1-20
- Dawe HR, Farr H, Gull K (2007) Centriol/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *J Cell Sci* 120: 7-15
- Dentler WL (1984) Attachment of the cap to the central microtubules of *Tetrahymena* cilia. *J Cell Sci* 66: 167-173
- Dodge JD (1965) Chromosome structure in the dinoflagellates and the problem of the mesokaryotic cell. *Excerpt Med Int Congr Ser* 91: 339-345
- Doerder FP (1979) Regulation of macronuclear DNA content in *Tetrahymena thermophila*. *J Protozool* 26: 28-35

- Dubremetz JF, Achbarou A, Bermudes D, Joiner KA (1993) Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol Res* 79: 402-408
- Eisen JA, Coyne RS, Wu M, Wu D, Thiagarajan M, Wortman JR, Badger JH, Ren Q, Amedeo P, Jones KM, Tallon LJ, Delcher AL, Salzberg SL, Silva JC, Haas BJ, Majoros WH, Farzad M, Carlton JM, Smith RK, Jr., Garg J, Pearlman RE, Karrer KM, Sun L, Manning G, Elde NC, Turkewitz AP, Asai DJ, Wilkes DE, Wang Y, Cai H, Collins K, Stewart BA, Lee SR, Wilamowska K, Weinberg Z, Ruzzo WL, Wloga D, Gaertig J, Frankel J, Tsao CC, Gorovsky MA, Keeling PJ, Waller RF, Patron NJ, Cherry JM, Stover NA, Krieger CJ, del Toro C, Ryder HF, Williamson SC, Barbeau RA, Hamilton EP, Orias E (2006) Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biol* 4: e286
- El-Haddad H, Przyborski J, Kraft L, McFadden G, Waller R, Gould SB (2013) Characterization of *TtALV2*, an essential charged repeat motif protein of the *Tetrahymena thermophila* membrane skeleton. *Eukaryot Cell*
- Felsner G, Sommer MS, Gruenheit N, Hempel F, Moog D, Zauner S, Martin W, Maier UG (2011) ERAD components in organisms with complex red plastids suggest recruitment of a preexisting protein transport pathway for the periplastid membrane. *Genome Biol Evol* 3: 140-150
- Feng L, Zhou X, Liao J, Omary MB (1999) Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Cell Sci* 112 (Pt 13): 2081-2090
- Fischman DA (1967) An electron microscope study of myofibril formation in embryonic chick skeletal muscle. *J Cell Biol* 32: 557-575
- Frankel J, Mohler J, Frankel AK (1980) Temperature-sensitive periods of mutations affecting cell division in *Tetrahymena thermophila*. *J Cell Sci* 43: 59-74
- Franklin-Tong VE, Gourlay CW (2008) A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. *Biochem J* 413: 389-404
- Frenal K, Polonais V, Marq JB, Stratmann R, Limenitakis J, Soldati-Favre D (2010) Functional dissection of the apicomplexan glideosome molecular architecture. *Cell Host Microbe* 8: 343-357
- Funahashi S, Sato T, Shida H (1988) Cloning and characterization of the gene encoding the major protein of the A-type inclusion body of cowpox virus. *J Gen Virol* 69 (Pt 1): 35-47
- Gaertig J, Fleury A (1992) Spatio-temporal reorganization of intracytoplasmic microtubules is associated with nuclear selection and differentiation during the

developmental process in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Protoplasma* 167: 74-87

Gaertig J, Gao Y, Tishgarten T, Clark TG, Dickerson HW (1999) Surface display of a parasite antigen in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Nat Biotechnol* 17: 462-465

Gaertig J, Gorovsky MA (1992) Efficient mass transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation of conjugants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9196-9200

Gaertig J, Thatcher TH, Gu L, Gorovsky MA (1994) Electroporation-mediated replacement of a positively and negatively selectable beta-tubulin gene in *Tetrahymena thermophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4549-4553

Gaertig J, Thatcher TH, McGrath KE, Callahan RC, Gorovsky MA (1993) Perspectives on tubulin isotype function and evolution based on the observation that *Tetrahymena thermophila* microtubules contain a single alpha- and beta-tubulin. *Cell Motil Cytoskeleton* 25: 243-253

Galletta BJ, Cooper JA (2009) Actin and endocytosis: mechanisms and phylogeny. *Curr Opin Cell Biol* 21: 20-27

Gaskins E (2004) Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol* 165: 383-393

Godsel LM, Hobbs RP, Green KJ (2008) Intermediate filament assembly: dynamics to disease. *Trends Cell Biol* 18: 28-37

Gornik SG, Ford KL, Mulhern TD, Bacic A, McFadden GI, Waller RF (2012) Loss of nucleosomal DNA condensation coincides with appearance of a novel nuclear protein in dinoflagellates. *Curr Biol* 22: 2303-2312

Gotesman M, Hosein RE, Gavin RH (2011) MyTH4, independent of its companion FERM domain, affects the organization of an intramacronuclear microtubule array and is involved in elongation of the macronucleus in *Tetrahymena thermophila*. *Cytoskeleton* 68: 220-236

Gould SB, Kraft LGK, van Dooren GG, Goodman CD, Ford KL, Cassin AM, Bacic A, McFadden GI, Waller RF (2011) Ciliate pellicular proteome identifies novel protein families with characteristic repeat motifs that are common to alveolates. *Mol Biol Evol* 28: 1319-1331

Gould SB, Sommer MS, Kroth PG, Gile GH, Keeling PJ, Maier UG (2006) Nucleus-to-nucleus gene transfer and protein retargeting into a remnant cytoplasm of cryptophytes and diatoms. *Mol Biol Evol* 23: 2413-2422

- Goud SB, Tham WH, Cowman AF, McFadden GI, Waller RF (2008a) Alveolins, a new family of cortical proteins that define the protist infrakingdom alveolata. *Mol Biol Evol* 25: 1219-1230
- Gould SB, Waller RF, McFadden GI (2008b) Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol* 59: 491-517
- Greider CW (2010) Telomerase discovery: the excitement of putting together pieces of the puzzle (Nobel lecture). *Angew Chem* 49: 7422-7439
- Gubbels MJ, Wieffer M, Striepen B (2004) Fluorescent protein tagging in *Toxoplasma gondii*: identification of a novel inner membrane complex component conserved among apicomplexa. *Mol Biochem Parasitol* 137: 99-110
- Hackett JD, Yoon HS, Li S, Reyes-Prieto A, Rummele SE, Bhattacharya D (2007) Phylogenomic analysis supports the monophyly of cryptophytes and haptophytes and the association of rhizaria with chromalveolates. *Mol Biol Evol* 24: 1702-1713
- Hamilton EP, Williamson S, Dunn S, Merriam V, Lin C, Vong L, Russell-Colantonio J, Orias E (2006) The highly conserved family of *Tetrahymena thermophila* chromosome breakage elements contains an invariant 10-base-pair core. *Eukaryot Cell* 5: 771-780
- Harper JT, Waanders E, Keeling PJ (2005) On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 487-496
- Hartwig JH, Thelen M, Resen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A (1992) MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356: 618-622
- Hausmann K, Hülsmann N, Radek R (2003). Protistology. Science Publishers, Stuttgart, Germany.
- Heaslip AT, Ems-McClung SC, Hu K (2008) TgICMAP1 Is a novel microtubule binding protein in *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* 4: e7406
- Henneguy LF (1898) Sur les rapports des cils vibratiles avec les centrosomes. *Arch d'Anatom Microscop* 1: 481-496
- Herrmann H, Aebi U (2004) Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem* 73: 749-789
- Hiraki M, Nakazawa Y, Kamiya R, Hirono M (2007) Bld10p constitutes the cartwheel-spoke tip and stabilizes the 9-fold symmetry of the centriole. *Curr Biol* 17: 1778-1783

- Hoey JG, Gavin RH (1992) Localization of actin in the *Tetrahymena* basal body-cage complex. *J Cell Sci* 103 (Pt 3): 629-641
- Honts JE, Williams NE (1990) Tetrins: polypeptides that form bundled filaments in *Tetrahymena*. *J Cell Sci* 96 (Pt 2): 293-302
- Hu K, Johnson J, Florens L, Fraunholz M, Suravajjala S, DiLullo C, Yates J, Roos DS, Murray JM (2006) Cytoskeletal components of an invasion machine—The apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 2: e13.
- Huang J, Mullapudi N, Lancto CA, Scott M, Abrahamson MS, Kissinger JC (2004) Phylogenomic evidence supports past endosymbiosis, intracellular and horizontal gene transfer in *Cryptosporidium parvum*. *Genome Biol* 5: R88
- Huen AC, Park JK, Godsel LM, Chen X, Bannon LJ, Amargo EV, Hudson TY, Mongiù AK, Leigh IM, Kelsell DP, Gumbiner BM, Green KJ (2002) Intermediate filament-membrane attachments function synergistically with actin-dependent contacts to regulate intercellular adhesive strength. *J Cell Biol* 159: 1005-1017
- Huttenlauch I, Peck RK, Stick R (1998) Articulins and epiplasmins: two distinct classes of cytoskeletal proteins of the membrane skeleton in protists. *J Cell Sci* 111: 3367-3378
- Huttenlauch I, Stick R (2003) Occurrence of articulins and epiplasmins in Protists. *J Eukaryot Microbiol* 50: 15-18
- Ishikawa H, Bischoff R, Holtzer H (1986) Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J Cell Biol* 38: 538-555
- Jaeckel-Williams R (1978) Nuclear divisions with reduced numbers of microtubules in *Tetrahymena*. *J Cell Sci* 34: 303-319
- Jamali T, Jamali Y, Mehrbod M, Mofrad MR (2011) Nuclear pore complex: biochemistry and biophysics of nucleocytoplasmic transport in health and disease. *Int Rev Cell Mol Biol* 287: 233-286.
- Kee HL, Dishinger JF, Blasius TL, Liu C-J, Margolis B, Verhey KJ (2012) A size-exclusion permeability barrier and nucleoporins characterize a ciliary pore complex that regulates transport into cilia. *Nat Cell Biol* 14: 431-437
- Keeley A, Soldati D (2004) The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by apicomplexa. *Trends Cell Biol* 14: 528-532
- Keeling PJ (2004) Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *Am J Bot* 91: 1481-1493

- Keeling PJ (2010) The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365: 729-748
- Khater EI, Sinden RE, Dessens JT (2004) A malaria membrane skeletal protein is essential for normal morphogenesis, motility, and infectivity of sporozoites. *J of Cell Biol* 167: 425-432
- Kilburn CL, Pearson CG, Romijn EP, Meehl JB, Giddings TH, Culver BP, Yates JR, Winey M (2007) New *Tetrahymena* basal body protein components identify basal body domain structure. *J Cell Biol* 178: 905-912
- Klumpp DJ, Forrestal SG, Karr JE, Mudge CS, Anderson BE, Schaeffer AJ (2002) Epithelial differentiation promotes the adherence of type 1-piliated *Escherichia coli* to human vaginal cells. *J Infect Dis* 186: 1631-1638
- Kono M, Herrmann S, Loughran NB, Cabrera A, Engelberg K, Lehmann C, Sinha D, Prinz B, Ruch U, Heussler V, Spielmann T, Parkinson J, Gilberger TW (2012) Evolution and architecture of the inner membrane complex in asexual and sexual stages of the malaria parasite. *Mol Biol Evol* 29: 2113-2132
- Ku NO, Azhar S, Omary MB (2002) Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization: modulation by a keratin 1-like disease causing mutation. *J Biol Chem* 277: 10775-10782
- Kuczumski ER, Rosenbaum JL (1979) Studies on the organization and localization of actin and myosin in neurons. *J Cell Biol* 80: 356-371
- Kuznetsov SA, Vaisberg EA, Murphy BD, Gelfand VI (1989) 45 kDa fragment of the kinesin molecule possesses high ATPase activity and binds to microtubules. *Mol Biol* 23: 580-587
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lazarides E, Hubbard BD (1976) Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 4344
- Lenhossek M (1898) Ueber Flimmerzellen. *Verhandl Anatom Gesellsch* 12: 106-128
- Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, 3rd, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG (1980) A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* 27: 37-58
- Losada A (2005) Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev* 19: 1269-1287

- Lutkenhaus J (1993) FtsZ ring in bacterial cytokinesis. *Mol Microbiol* 9: 403-409
- Mann T, Beckers C (2001) Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 115: 257-268
- Mann T, Gaskins E, Beckers C (2002) Proteolytic processing of TglMC1 during maturation of the membrane skeleton of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 277: 41240-41246
- Margolis RL, Wilson L (1978) Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro. *Cell* 13: 1-8
- Martin MA, Osmani SA, Oakley BR (1997) The role of gamma-tubulin in mitotic spindle formation and cell cycle progression in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Sci* 110 (Pt 5): 623-633
- Mazumdar J, Striepen B (2007) Make it or take it: fatty acid metabolism of apicomplexan parasites. *Eukaryot Cell* 6: 1727-1735
- Mcdonald BB (1958) Quantitative aspects of deoxyribose nucleic acid (DNA) metabolism in an amiconucleate strain of *Tetrahymena*. *Biol Bull* 114: 71-94
- McKeon FD, Kirschner MW, Caput D (1986) Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 319: 463-468
- Mehlhorn H, Ruthmann A (1992) *Allgemeine Protozoologie*. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag
- Miao W, Xiong J, Bowen J, Wang W, Liu Y, Braguinets O, Grigull J, Pearlman RE, Orias E, Gorovsky MA (2009) Microarray analyses of gene expression during the *Tetrahymena thermophila* life cycle. *PLoS One* 4: e4429
- Mitin N, Rossman KL, Der CJ (2012) Identification of a novel actin-binding domain within the Rho guanine nucleotide exchange factor TEM4. *PLoS One* 7: e41876
- Mochizuki K (2008) High efficiency transformation of *Tetrahymena* using a codon-optimized neomycin resistance gene. *Gene* 425: 79-83
- Morrisette NS, Sibley LD (2002) Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 21-38
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* 24: 17-27

- Murti KG, Prescott DM (1970) Micronuclear ribonucleic acid in *Tetrahymena pyriformis*. *J Cell Biol* 47: 460-467
- Nahon P, Coffe G, Guyader HL, Darmanaden-Delorme J, Jeanmaire-Wolf R, Clérot JC, Adoutte A (1993) Identification of the epiplasmins, a new set of cortical proteins of the membrane cytoskeleton in *Paramecium*. *J Cell Sci* 104: 975-990
- Nanney DL (1966) Corticotype transmission in *Tetrahymena*. *Genetics* 54: 955-968
- Nanney DL (1971) The pattern of replication of cortical units in *Tetrahymena*. *Dev Biol* 26: 296-305
- Nasmyth K, Haering CH (2005) The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem* 74: 595-648
- Nicolson GL, Marchesi VT, Singer SJ (1971) The localization of spectrin on the inner surface of human red blood cell membranes by ferritin-conjugated antibodies. *J Cell Biol* 51: 265-272
- Nigg EA, Raff JW (2009) Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell* 139: 663-678
- Nilsson JR (1979) Phagotrophy in *Tetrahymena*. In *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. Academic Press, New York. pp. 329-379
- Nilsson JR, Williams NE (1966) An electron microscope study of the oral apparatus of *Tetrahymena pyriformis*. *C R Trav Lab Carlsberg* 35: 119-141
- Nogales-Cadenas R, Abascal F, Diez-Perez J, Carazo JM, Pascual-Montano A (2009) CentrosomeDB: a human centrosomal proteins database. *Nucleic Acids Res* 37: D175-180
- Nojima D, Linck RW, Egelman EH (1995) At least one of the protofilaments in flagellar microtubules is not composed of tubulin. *Curr Biol* 5: 158-167
- Oakley BR, Oakley CE, Yoon Y, Jung MK (1990) Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 61: 1289-1301
- Omary MB, Coulombe PA, McLean WH (2004) Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med* 351: 2087-2100
- Orias E (1981) Probable somatic DNA rearrangements in mating type determination in *Tetrahymena thermophila* - a review and a model. *Dev Genetics* 2: 185-202

- Orias E, Flacks M (1975) Macronuclear genetics of *Tetrahymena*. I. Random distribution of macronuclear genecopies in *T. pyriformis*, syngen 1. *Genetics* 79: 187-206
- Ounjai P, Kim KD, Liu H, Dong M, Tauscher AN, Witkowska HE, Downing KH (2013) Architectural insights into a ciliary partition. *Curr Biol* 23: 339-344
- Panda D, Miller HP, Wilson L (1999) Rapid treadmilling of brain microtubules free of microtubule-associated proteins in vitro and its suppression by tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12459-12464
- Parry DA, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U, Herrmann H (2007) Towards a molecular description of intermediate filament structure and assembly. *Exp Cell Res* 313: 2204-2216
- Pasternak J (1967) Differential Genic Activity in *Paramecium aurelia*. *J Exp Zool* 165: 395-417
- Patek SN, Korff WL, Caldwell RL (2004) Biomechanics: deadly strike mechanism of a mantis shrimp. *Nature* 428: 819-820
- Patron NJ, Inagaki Y, Keeling PJ (2007) Multiple gene phylogenies support the monophyly of cryptomonad and haptophyte host lineages. *Curr Biol* 17: 887-891
- Paulsson J (2004) Summing up the noise in gene networks. *Nature* 427: 415-418.
- Pearson CG, Giddings THJr, Winey M (2009) Basal body components exhibit differential protein dynamics during nascent basal body assembly. *Mol Biol Cell* 20: 904-914
- Perry SV (2001) Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil* 22: 5-49
- Pestonjamas KN, Pope RK, Wulfkühle JD, Luna EJ (1997) Supervillin (p205): A novel membrane-associated, F-actin-binding protein in the villin/gelsolin superfamily. *J Cell Biol* 139: 1255-1269
- Peters A, Vaughn JE (1967) Microtubules and filaments in the axons and astrocytes of early postnatal rat optic nerves. *J Cell Biol* 32: 113-119
- Pigino G, Geimer S, Lanzavecchia S, Paccagnini E, Cantele F, Diener DR, Rosenbaum JL, Lupetti P (2009) Electron-tomographic analysis of intraflagellar transport particle trains in situ. *J Cell Biol* 187: 135-148
- Poklepovich TJ, Rinaldi MA, Tomazic ML, Favale NO, Turkewitz AP, Nudel CB, Nusblat AD (2012) The cytochrome b5 dependent C-5(6) sterol desaturase DES5A from the endoplasmic reticulum of *Tetrahymena thermophila* complements

- ergosterol biosynthesis mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Steroids* 77: 1313-1320
- Pollard TD (2001) Genomics, the cytoskeleton and motility. *Nature* 409: 842-843
- Popowicz GM, Schleicher M, Noegel AA, Holak TA (2006) Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* 31: 411-419
- Prescott DM (1994) The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol Rev* 58: 233-267
- Rao MVN, Prescott DM (1967) Micronuclear RNA synthesis in *Paramecium caudatum*. *J Cell Biol* 33: 281-285
- Reyes-Prieto A, Moustafa A, Bhattacharya D (2008) Multiple genes of apparent algal origin suggest ciliates may once have been photosynthetic. *Curr Biol* 18: 956-962
- Rose A, Meier I (2004) Scaffolds, levers, rods and springs: diverse cellular functions of long coiled-coil proteins. *Cell Mol Life Sci* 61: 1996-2009
- Rose A, Schraegle SJ, Stahlberg EA, Meier I (2005) Coiled-coil protein composition of 22 proteomes--differences and common themes in subcellular infrastructure and traffic control. *BMC Evol Biol* 5: 66
- Rosenbaum JL, Witman GB (2002) Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 813-825
- Russell DG, Burns RG (1984) The polar ring of coccidian sporozoites: a unique microtubule-organizing centre. *J Cell Sci* 65: 193-207
- Sachs JD, Hotez PJ (2006) Fighting tropical diseases. *Science* 311: 1521
- Saldarriaga JF, McEwan ML, Fast NM, Taylor FJR, Keeling PJ (2003) Multiple protein phylogenies show that *Oxyrrhis marina* and *Perkinsus marinus* are early branches of the dinoflagellate lineage. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 355-365.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez-Puerta MV, Delwiche CF (2008) A hypothesis for plastid evolution in chromalveolates. *J Phycol* 44: 1097-1107
- Satir BH, Wissig SL (1982) Alveolar sacs of *Tetrahymena*: ultrastructural characteristics and similarities to subsurface cisterns of muscle and nerve. *J Cell Sci* 55: 13-33
- Satir P (1984) The generation of ciliary motion. *J Protozool* 31: 8-12

- Satoh A, Nakanishi H, Obaishi H, Wada M, Takahashi K, Satoh K, Hirao K, Nishioka H, Hata Y, Mizoguchi A (1998) Neurabin-II/spinophilin. *J Biol Chem* 273: 3470-3475
- Schliwa M, van Blerkom J (1981) Structural interaction of cytoskeletal components. *J Cell Biol* 90: 222-235
- Scholtyssek E, Mehlhorn H (1970) Ultrastructural study of characteristic organelles (paired organelles, micronemes, micropores) of sporozoa and related organisms. *Z Parasitenkd* 34: 97-127
- Shang Y, Li B, Gorovsky MA (2002a) *Tetrahymena thermophila* contains a conventional gamma-tubulin that is differentially required for the maintenance of different microtubule-organizing centers. *J Cell Biol* 158: 1195-1206
- Shang Y, Song X, Bowen J, Corstanje R, Gao Y, Gaertig J, Gorovsky MA (2002b) A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockouts, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in *Tetrahymena thermophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3734-3739
- Shen G, Kuppu S, Venkataramani S, Wang J, Yan J, Qiu X, Zhang H (2010) Ankyrin repeat-containing protein 2A is an essential molecular chaperone for peroxisomal membrane-bound ascorbate peroxidase3 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 811-831
- Siddall ME, Reece KS, Graves JE, Bureson EM (1997) 'Total evidence' refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum apicomplexa. *Parasitol* 115 (Pt 2): 165-176.
- Simpson AG, Roger AJ (2002) Eukaryotic evolution: getting to the root of the problem. *Curr Biol* 12: R691-693
- Simpson AG, Roger AJ (2004) The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Curr Biol* 14: R693-696
- Singh P, Rathinasamy K, Mohan R, Panda D (2008) Microtubule assembly dynamics: an attractive target for anticancer drugs. *IUBMB Life* 60: 368-375
- Sonneborn TM (1954) Gene-controlled, aberrant nuclear behavior in *Paramecium aurelia*. *Microbiol Genet Bull* 11: 24-25
- Stelter K, El-Sayed NM, Seeber F (2007) The expression of a plant-type ferredoxin redox system provides molecular evidence for a plastid in the early dinoflagellate *Perkinsus marinus*. *Protistol* 158: 119-130.
- Stewart M (2007) Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 195-208

- Stiller JW, Huang J, Ding Q, Tian J, Goodwillie C (2009) Are algal genes in nonphotosynthetic protists evidence of historical plastid endosymbioses? *BMC Genomics* 10: 484
- Subkhankulova T, Gilchrist MJ, Livesey FJ (2008) Modelling and measuring single cell RNA expression levels find considerable transcriptional differences among phenotypically identical cells. *BMC Genomics* 9: 268
- Suprenant KA, Dentler WL (1988) Release of intact microtubule-capping structures from *Tetrahymena* cilia. *J Cell Biol* 107: 2259-2269
- Takagi Y, Kanazawa N (1982) Age-associated change in macronuclear DNA content in *Paramecium caudatum*. *J Cell Sci* 54: 137-147
- Tavares A, Goncalves J, Florindo C, Tavares AA, Soares H (2012) Mob1: defining cell polarity for proper cell division. *J Cell Sci* 125: 516-527
- Thazhath R, Liu C, Gaertig J (2002) Polyglycylation domain of  $\beta$ -tubulin maintains axonemal architecture and affects cytokinesis in *Tetrahymena*. *Nat Cell Biol* 4: 256-259
- Tondeleir D, Vandamme D, Vandekerckhove J, Ampe C, Lambrechts A (2009) Actin isoform expression patterns during mammalian development and in pathology: insights from mouse models. *Cell Motil Cytoskeleton* 66: 798-815
- Tondravi MM, Yao MC (1986) Transformation of *Tetrahymena thermophila* by microinjection of ribosomal RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4369-4373
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354
- Tran JQ, Li C, Chyan A, Chung L, Morrissette NS (2012) SPM1 stabilizes subpellicular microtubules in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell* 11: 206-216
- Turkewitz AP, Orias E, Kapler G (2002) Functional genomics: the coming of age for *Tetrahymena thermophila*. *Trends Genet* 18: 35-40
- Tyler BM, Tripathy S, Zhang X, Dehal P, Jiang RH, Aerts A, Arredondo FD, Baxter L, Bensasson D, Beynon JL, Chapman J, Damasceno CM, Dorrance AE, Dou D, Dickerman AW, Dubchak IL, Garbelotto M, Gijzen M, Gordon SG, Govers F, Grunwald NJ, Huang W, Ivors KL, Jones RW, Kamoun S, Krampis K, Lamour KH, Lee MK, McDonald WH, Medina M, Meijer HJ, Nordberg EK, Maclean DJ, Ospina-Giraldo MD, Morris PF, Phuntumart V, Putnam NH, Rash S, Rose JK, Sakihama Y, Salamov AA, Savidor A, Scheuring CF, Smith BM, Sobral BW, Terry A, Torto-Alalibo TA, Win J, Xu Z, Zhang H, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Boore JL (2006)

- Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 313: 1261-1266
- Ueno H, Gonda K, Takeda T, Numata O (2003) Identification of elongation factor-1alpha as a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-binding protein in *Tetrahymena* cilia. *Cell Motil Cytoskeleton* 55: 51-60
- Valdivia RH (2008) Chlamydia effector proteins and new insights into chlamydial cellular microbiology. *Curr Opin Microbiol* 11: 53-59
- Vassar R, Coulombe PA, Degenstein L, Albers K, Fuchs E (1991) Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 64: 365-380
- Vaudaux PE, Williams NE, Frankel J, Vaudaux C (1977) Inter-strain variability of structural proteins in *Tetrahymena*. *J Protozool* 24: 453-458
- Verma R, Melcher U (2012) A support vector machine based method to distinguish proteobacterial proteins from eukaryotic plant proteins. *BMC Bioinformatics* 15: S9
- Wang K, McClure J, Tu A (1979) Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 3698-3702
- Wasmuth J, Daub J, Peregrin-Alvarez JM, Finney CA, Parkinson J (2009) The origins of apicomplexan sequence innovation. *Genome Res* 19: 1202-1213
- Wehmöller M (2012) Analyse eines Proteins mit geladenen repetitiven Motiven aus dem Protozoon *Tetrahymena thermophila*. Bachelorarbeit, *Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*
- Welch MD, Mullins RD (2002) Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 247-288
- Westheide W, Rieger R (1996) Einzeller und Wirbellose Tiere. In *Spezielle Zoologie*. Elsevier-Spektrum, München.
- Williams NE (2003) The epiplasm gene EPC1 influences cell shape and cortical pattern in *Tetrahymena thermophila*. *J Eukaryot Microbiol* 51: 201-206
- Williams NE, Honts JE (1995) Isolation and fractionation of the *Tetrahymena* cytoskeleton and oral apparatus. *Methods Cell Biol* 47: 301-306
- Williams NE, Honts JE, Dress VM, Nelsen EM, Frankel J (1995) Monoclonal antibodies reveal complex structure in the membrane skeleton of *Tetrahymena*. *J Eukaryot Microbiol* 42: 422-427

- Wilson RJ, Denny PW, Preiser PR, Rangachari K, Roberts K, Roy A, Whyte A, Strath M, Moore DJ, Moore PW, Williamson DH (1996) Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 261: 155-172
- Wisecaver JH, Hackett JD (2011) Dinoflagellate genome evolution. *Annu Rev Microbiol* 65: 369-387
- Witt PL (1977) Unequal distribution of DNA in the macronuclear division of the ciliate *Euplotes eurytomus*. *Chromosoma* 60: 59-67
- Wloga D, Frankel J (2012) From molecules to morphology: cellular organization of *Tetrahymena thermophila*. *Methods Cell Biol* 109: 83-140
- Woehle C, Dagan T, Martin WF, Gould SB (2011) Red and problematic green phylogenetic signals among thousands of nuclear genes from the photosynthetic and apicomplexa-related *Chromera velia*. *Genome Biol Evol* 3: 1220-1230
- Wolf E, Kim PS, Berger B (1997) MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Prot Sci* 6: 1179-1189
- Wong L, Klionsky L, Wickert S, Merriam V, Orias E, Hamilton EP (2000) Autonomously replicating macronuclear DNA pieces are the physical basis of genetic coassortment groups in *Tetrahymena thermophila*. *Genetics* 155: 1119-1125
- Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson WG, Sun TT (1982) Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 95: 580-588
- Woodcroft BJ, McMillan PJ, Dekiwadia C, Tilley L, Ralph SA (2012) Determination of protein subcellular localization in apicomplexan parasites. *Trends Parasitol* 28: 546-554
- Yao MC, Gorovsky MA (1974) Comparison of the sequences of macro- and micronuclear DNA of *Tetrahymena pyriformis*. *Chromosoma* 48: 1-18
- Yao MC, Yao CH, Halasz LM, Fuller P, Rexer CH, Wang SH, Jain R, Coyne RS, Chalker DL (2007) Identification of novel chromatin-associated proteins involved in programmed genome rearrangements in *Tetrahymena*. *J Cell Sci* 120: 1978-1989
- Yao MC, Yao CH, Monks B (1990) The controlling sequence for site-specific chromosome breakage in *Tetrahymena*. *Cell* 63: 763-772
- Yin HL, Albrecht JH, Fattoum A (1981) Identification of gelsolin, a Ca<sup>2+</sup>-dependent regulatory protein of actin gelsol transformation, and its intracellular distribution in a variety of cells and tissues. *J Cell Biol* 91: 901-906

Zhang H, Campbell DA, Sturm NR, Dungan CF, Lin S (2011) Spliced leader RNAs, mitochondrial gene frameshifts and multi-protein phylogeny expand support for the genus *Perkinsus* as a unique group of alveolates. *PLoS One* 6: e19933

Zheng B, Han M, Bernier M, Wen JK (2009) Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *FEBS J* 276: 2669-2685

## 9. Anhang

Tabelle 3: Liste der Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

### *Tetrahymena thermophila*

Alv2GFP_HindIII_F	5'-ATGAAGCTTTAATCAAGCAATTTTGG-3'
Alv2GFP_XhoI_R	5'-AACTCGAGAACATACTATTTAATGTATG-3'
Alv2_REP_HindIII_F	5'-CAGACACAGCAAAGCTTCTTGATC-3'
Alv2_REP_XhoI_R	5'-GAACTCGAGTTTTTCAATAACTCTTTC-3'
N_GFP_C1_SphI_F	5'-TAATAAGAAGCATGCGTATATAATC-3'
N_GFP_C1_MluI_R	5'-GCTGTGTCTGTTTGACGCGTTTCTTGC-3'
N_GFP_C2_NsiI_F	5'-GCGTATGCATAGAGTTATTGAAAAACC-3'
N_GFP_C2_BamHI_R	5'-CAAATAAAGGATCCTCAAACATAC-3'
KO1f	5'-AAATTGAAGAAGGGCCCATCAAAG-3'
KO1r	5'-CTTTATATTTAAAATGTCGACTTTTAC-3'
KO2f	5'-CTCACCTGCAGCTAATTATTAGAG-3'
KO2r	5'-CATTTTCGTTCCGCGGAACATTTGTTTATC-3'
tKD1f	5'-CCTGAAAGATTACTGCAGTATAC-3'
tKD1r	5'-GGAAGCCGGTCTTGTTCGATCAAGATG-3'
tKD2f	5'-GATGAATGAGCTATGTTTTGAGCAGC-3'
tKD2r	5'-GAATGGTGAACAGATAGATAAATG-3'
Alv2_qPCR_F	5'-TTCCAAATGCGCAGACTATT-3'
Alv2_qPCR_R	5'-TGAAGTGCTCACTCCTCCTTT-3'
777250_SphI_F	5'-AGTCAAGCATGCATGCAACACCAAGATC-3'
777250_MluI_R	5'-ATTTTATATATTTACGCGTATAATTGCTT-3'
578520-4_SphI_	5'-ATTAGCATGCATGTAATTAGAAGGTG-3'
578520-4_MluI_R	5'-GATACGCGTTTCTTCAGTTTCAAG-3'
678010_SphI_F	5'-GCATGCATGATAGGAAAAGATGATAGCTTA-3'
678010_SphI_R	5'-AATACGCGTTCCATACTCTTTGCATAGA-3'
127110CRM_XhoI_F	5'-GGCTAAGCTCGAGATTGAAAAAATGAATC-3'
127110CRM_MluI_R	5'-GTTGAATACGCGTTCTTTCCAATTCAAATC-3'

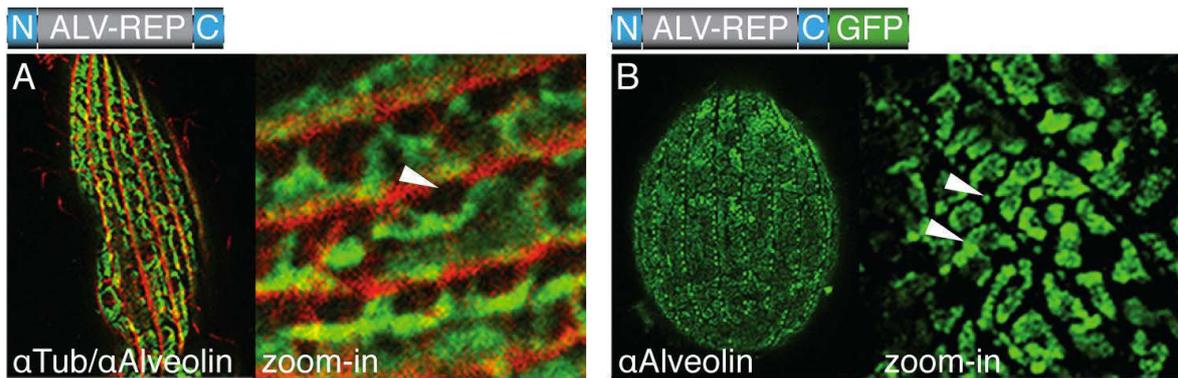


Abb.25: Markierung von *Tt*ALV2 mit anti-Alveolin Antikörper. In A ist eine Doppel-Markierung einer Wildtyp-Kultur von *T. thermophila* mit anti-Alveolin und anti-Tubulin Antikörper dargestellt. Dadurch wird besonders deutlich, dass die fleckenartigen Strukturen von den Ring-Komplexen (*circumciliary rings*) ausgeschlossen sind. In B wurden Zellen, die ALV2::GFP exprimieren, mit anti-Alveolin Antikörper behandelt. Dadurch kann sowohl das endogene Protein, als auch das Fusions-Protein markiert werden (induziert durch Pfeilspitzen). (El-Haddad et al, 2013)

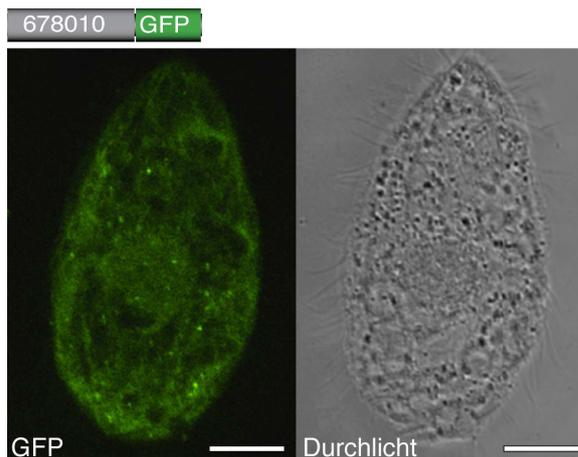


Abb.26: Immunlokalisierung des CRMPs THERM\_00678010. Das Protein lokalisiert löslich im Zytosol von *Tetrahymena*. Die Durchlichtaufnahme zeigt, dass die Peripherie der Zelle dargestellt wird. Der Skalierungsbalken misst 10  $\mu\text{m}$ .

## DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. William Martin bedanken für die Möglichkeit meiner Promotion und für sein entgegengebrachtes Interesse an meinen Projekten. Ich bedanke mich vor allem für die exzellenten Arbeitsbedingungen und wissenschaftlichen Kontakte, insbesondere für die Möglichkeit, dass ich an internationalen Kongressen teilnehmen konnte.

Ich bedanke mich auch bei Frau Prof. Dr. Laura Rose für die freundliche Übernahme des Korreferats und die Durchsicht meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Sven B. Gould für die erstklassige Betreuung mit herausfordernden Themenstellungen und begeisternden Forschungsaufgaben. Ich danke ihm für sein konstantes Interesse, wobei er durch zahlreiche Vorschläge, Ideen und konstruktiver Kritik, die Qualität und den Umfang meiner Dissertation bereichert hat. Weiterhin danke ich ihm für seine stetige Unterstützung und kompetenten Rat.

Ich möchte mich bei Elke Wieneke für ihre kompetente Arbeit im Labor bedanken. Auch danke ich Gary Kusdian für „Gefallen“ im Labor. Ich danke beiden für die tolle Arbeitsatmosphäre am Arbeitsplatz und ihr stets offenes Ohr.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. Verena Zimorski für ihre stetige Hilfsbereitschaft und ihr Engagement. Auch danke ich Christian Wöhle für die kompetente Hilfe und Unterstützung bei bioinformatischen Angelegenheiten.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Evolution danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, ihren vielen nützlichen Tipps und der geleisteten Hilfestellung bei meinen Experimenten. Besonders danke ich den Korrekturlesern, die meine Dissertation aufmerksam durchgelesen haben.

Schließlich danke ich meinem Ehemann Salah El-Haddad, der mich mit all seiner Liebe unterstützt hat und mich während meiner Dissertation stets motivieren konnte. Er war mir eine große seelische Stütze.

Ich versichere hiermit, dass ich meine Dissertation eigenständig und ohne erlaubte Hilfe angefertigt habe. Verwendete Quellen wurden kenntlich gemacht. Meine Dissertation wurde weder in der vorliegenden Form noch in ähnlicher Form bei anderen Instituten eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 17.Mai.2013

---

Houda El-Haddad