



Charakterisierung der expandierten MORN
Proteinfamilie im Ciliat *Tetrahymena thermophila*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Jörn Habicht
aus Schwelm
August 2015**

**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. Heinz Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2015

Publikationen:

Habicht J, Woehle C, Gould SB. 2015. *Tetrahymena* Expresses More than a Hundred Proteins with Lipid-binding MORN Motifs that can Differ in their Subcellular Localisations. J Eukaryot Microbiol. Apr 3. doi: 10.1111/jeu.12216

de Vries J, **Habicht J**, Woehle C, Huang CJ, Christa G, Waegele H, Nickelsen J, Martin WF, Gould SB. 2013. Is ftsH the Key to Plastid Longevity in Sacoglossan Slugs? Genome Biol Evol 5(12):2540-2548.

Tagungsbeiträge:

Jörn Habicht, Christian Wöhle, William Martin und Sven B. Gould (2013). Meet the MORNs. FASEB conference on Ciliate Molecular Biology, Steamboat Springs, USA. Posterpräsentation.

Jörn Habicht, Christian Wöhle, Gregor Christa, Katharina Händler, William Martin und Sven B. Gould (2012). The *Acetabularia acetabulum* chloroplast genome. Protist, Oslo, Norwegen. Posterpräsentation.

Jörn Habicht, Christian Wöhle, Gregor Christa, Katharina Händler, William Martin und Sven B. Gould (2012). The *Acetabularia acetabulum* chloroplast genome. SFB Endosymbiosis: From Prokaryotes to Eukaryotic Organelles, München, Deutschland. Posterpräsentation.

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

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	2
3. Einleitung.....	3
3.1 Membraninteraktionen von Proteinen	3
3.1.1 Lipid-bindende Domänen.....	3
3.1.2 Posttranslationale Modifikationen	10
3.2 Membrane occupation recognition nexus (MORN)	12
3.2.1 MORN-Motive in tierischen Zellen	13
3.2.2 MORN-Motive in Pflanzen	18
3.2.3 MORN-Motive in Protisten	18
3.3 <i>Tetrahymena thermophila</i>	19
3.4 Ziele der Dissertation	22
4. Material und Methoden.....	24
4.1 Material	24
4.1.1 Medien und Chemikalien	24
4.1.2 Antibiotika	24
4.1.3 Antikörper.....	24
4.1.4 Oligonukleotide	25
4.1.5 Enzyme	25
4.1.6 Vektoren.....	26
4.1.7 Reagenzsätze	26
4.1.8 Säulen.....	26
4.1.9 Geräte	26
4.1.10 Kulturen.....	28
4.2 Methoden	28
4.2.1 Kultivierung von Organismen.....	28
4.2.2 Isolierung genomischer DNA	30
4.2.3 Markierung von Genen	31
4.2.4 Transfektion von Protisten	32
4.2.5 Proteomische Methoden	34
4.2.6 Klonierungsarbeiten	41
4.2.7 Isolation von Proteinen via FPLC.....	43
4.2.8 Kristallisationsansätze	44
4.2.9 Strukturaufklärung.....	45
4.2.10 Bioinformatische Methoden	46
5. Ergebnisse	48
5.1 MORN-Proteine sind eine ubiquitär auftretende Protein-Familie	48
5.2 MORN-Proteine von <i>Tetrahymena thermophila</i>	49
5.3 Expression und Isolierung von MRNO51	51
5.4 Antikörper-Synthese gegen MRNO51	54
5.5 MRNO51 bindet spezifisch 1,2-Diacylglycerol, Cardiolipin und Phosphatidylinositole	56
5.6 Lokalisation von MORN-Proteinen.....	58
5.6.1 Lokalisation von MORN-Proteinen in <i>T. thermophila</i>	58
5.6.2 Ektopische Expression von MRNO51	61
5.6.3 Lokalisation von MORN-Proteinen in Spezies der <i>Trichomonadinae</i>	61
5.7 Strukturanalyse des <i>Tetrahymena thermophila</i> MORN-Proteins MRNO51	64
5.7.1 Bioinformatische Strukturanalyse	64
5.7.2 Kristallisationsansätze	66
5.7.3 NMR.....	68

6. Diskussion.....	70
6.1 Dient die expandierte MORN-Familie In Ciliaten als hauptsächliches Membran-binde Motiv?	71
6.2 <i>Tetrahymena</i> MORN Motive sind divers und treten in Verbindung mit einer Vielzahl von anderen Proteindomänen auf	72
6.3 Dienen allein die MORN-Motive einer bestimmten Lokalisierung?	75
6.4 Strukturanalyse	78
6.5 Rückschlüsse aus dieser Arbeit	82
6.6 Ausblick auf weitere Versuche	82
7. Abkürzungsverzeichnis	84
8. Anhang.....	86
9. Literaturverzeichnis.....	91

1. Zusammenfassung

Einige Proteine sind in eine Membran nicht durch Transmembran-Domänen oder posttranslationale Modifikation wie Glycosylphosphatidylinositol-Anker, Palmitoylierung oder Myristoylierung integriert, sondern sind periphere Membranproteine, welche zum Beispiel mit der negativ geladenen und Cytosol zugewandten Seite der Plasmamembran assoziiert sind. Des Weiteren sind eine Vielzahl von Lipid bindenden Proteinmotiven, unter anderem die Pleckstrin-Homologie Domäne, die FYVE-Motive oder die C1- und C2-Domänen beschrieben, welche spezifisch mit Phospholipiden interagieren können.

Die Forschung der letzten Jahre über Proteine mit sogenannten MORN-Motiven, welche 2001 erstmalig identifiziert wurden, deutet darauf hin, dass diese Protein Motive eine ähnliche Funktion aufweisen könnten. Außerdem spielen MORN Proteine wichtige Rollen in essentiellen zellulären Vorgängen. So sind sie mit der Zellteilung in Apicomplexan Parasiten, der Chloroplasten Teilung in *Arabidopsis* und mit der Bewegung von Spermien assoziiert.

In dieser Arbeit konnte durch phylogenetische Analyse gezeigt werden, dass Ciliaten unter den Organismen die MORN-Proteine kodieren, die größte Vielfalt in dieser Proteinfamilie aufweisen. So exprimiert zum Beispiel der etablierte Modelorganismus *Tetrahymena thermophila* 129 MORN-Protein kodierende Gene, von denen einige speziell bei der Konjugation hochreguliert sind. Unterschiedliche Versuchsansätze betreffend der Bindung von MORN-Motiven an Phospholipiden unterstützen die Annahme, dass es die Hauptfunktion der MORN-Motive ist, ähnlich der Funktion der C1, C2 und Pleckstrin-Homologie-Domänen, Proteinen die Fähigkeit der Lipidbindung zu verleihen. Des Weiteren wurde in einer Lokalisationsstudie mit vier MORN-Proteinen mit ähnlichen Eigenschaften gezeigt, dass ihre Domänenarchitektur keine Rückschlüsse auf die subzelluläre Lokalisation von Proteinen gibt, was die funktionelle Diversität dieser Gruppe, vor allem in Ciliaten, unterstreicht. Durch bioinformatische Strukturanalysen konnten Ähnlichkeiten von MORN-Proteinen zu anderen Domänen, welche in der Lage sind, Phospholipide zu binden, festgestellt werden. Die Überexpression von einem Protein der Pellicula des Ciliaten *Tetrahymena thermophila* und dessen Isolation zwecks Strukturanalyse konnten erfolgreich durchgeführt werden. Kristallisationsansätze mit dem isolierten Protein blieben, trotz einer weiten Bandbreite an Variationen erfolglos, sodass die Strukturanalyse eines MORN Proteins in voller Länge eine Herausforderung bleibt.

2. Abstract

Some proteins are not integrated into a membrane by the transmembrane domains or post-translational modification such as glycosylphosphatidylinositol anchor, palmitoylation or myristoylation, but are rather peripheral membrane proteins which are associated with the negatively charged side and cytosol facing side of the plasma membrane for example. Furthermore, a variety of lipid-binding protein motifs, including the pleckstrin homology domain, the FYVE motives or the C1 and C2 domains are described as specifically interacting with phospholipids.

Recent research on proteins with MORN motifs, which were first identified in 2001, suggests that this protein motif may have a similar function. Furthermore, MORN proteins play an important role in essential cellular processes; they are associated with cell division in apicomplexan parasites, the chloroplast division in *Arabidopsis* and with the movement of sperm.

In this thesis, using phylogenetic analysis, it could be shown that ciliates among the MORN organisms encode proteins that exhibit the greatest diversity in this protein family. The established model organism *Tetrahymena thermophila* expresses 129 MORN protein-coding genes, some of which are specifically upregulated in the conjugation. Different experimental approaches concerning the binding of MORN motifs to phospholipids support the assumption that the main function of MORN motifs is similar to the function of C1, C2 and pleckstrin homology domains, namely to confer proteins the ability of lipid binding. Furthermore, it was shown in a study with four localization MORN proteins with similar characteristics, that the domain architecture of MORN proteins are not necessarily indicative of the subcellular localization of proteins. The functional diversity of this group, especially in ciliates, underlines this. Through bioinformatic analysis structural similarities between MORN proteins and other phospholipid binding domains could be detected. Overexpression of a pellicle protein of the ciliate *Tetrahymena thermophila* and its isolation for structural analysis could be carried out successfully. Crystallization approaches with the isolated proteins were, in spite of a wide range of variations, without success. Because of that the structural analysis of MORN proteins remains a challenge in its entirety.

3. Einleitung

3.1 Membraninteraktionen von Proteinen

Protein-Lipid-Interaktionen sind ein wichtiger Mechanismus, welcher es prokaryotischen und eukaryotischen Organismen ermöglicht, Proteine an die Zellmembran zu binden, sowie die Aktivierung von Proteinen zu regulieren. Ermöglicht werden diese Funktionen durch Domänen, die spezifische Wechselwirkungen mit Phospholipiden vermitteln und durch posttranslationale Modifikationen, die eine Verankerung an der Membran ermöglichen.

3.1.1 Lipid-bindende Domänen

Proteinkinase C konservierte Region 1 (C1) Domäne

Die C1-Domäne wurde zum ersten Mal als Interaktionsstelle von Proteinkinase C (PKC) mit Diacylglycerine (DAG) und Phorbol ester beschrieben (Nishizuka 1988). Die Domäne wurde in mehr als 30 Säugetierproteinen (Stahelin 2009) mit unterschiedlichen Funktionen, wie zum Beispiel Proteinkinase D, Chimaerin, Ras-GRP, Unc-13-, Munc13-Isoformen, DA-Kinasen und Raf (Ron und Kazanietz 1999) identifiziert.

C1-Domänen sind 50 Aminosäuren lang und treten als Tandem in PKCs auf. Die Domäne weist eine konservierte, Cystein-reiche, kompakte Struktur auf, welche sich aus fünf kurzen β -Faltblättern, einer kurzen α -Helix und zwei Zink-Ionen zusammensetzt (Hommel et al. 1994; Zhang et al. 1995).

Die Strukturanalyse und Mutationsstudien von zwei verschiedenen PKCs identifizierten eine Phorbol ester- und eine DAG-Interaktionsstelle an der Spitze der Kinase (Kazanietz et al. 1994; Zhang et al. 1995). Die Bindungsstelle ist umgeben von aliphatischen und aromatischen Aminosäuren, welche wiederum von einem Ring kationischer Aminosäuren umgeben sind (Cho 2001). Die kationischen Aminosäuren dienen der C1 zur nichtspezifischen Bindung an die anionischen Phospholipide der Membran (Bittova et al. 2001), während hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Aminosäurenresten der C1-Domäne die Membran für die DAG/Phorbol ester-Bindung öffnen (Medkova und Cho 1999; Xu et al. 1997). Der C1-Membran-Komplex erhält seine Stabilität letztendlich durch die Ausbildung einer hydrophoben

Oberfläche (Zhang et al. 1995), die durch die Bindung des Phorbolesters der Membran entsteht (Medkova und Cho 1999; Mosior und Newton 1995). Konventionelle PKCs werden erst zugänglich für DAG beziehungsweise Phorbolster-Bindung nach Ca^{2+} -abhängiger Membranbindung (Bittova et al. 2001; Oancea und Meyer 1998), während die C1-Domänen von Proteinkinase D (Johannes et al. 1994; Valverde et al. 1994), Chimaerin (Caloca et al. 1999) und Ras-GRP (Tognon et al. 1998) direkt an die Membran über DAG und Phorbolster binden können. Der detaillierte Mechanismus ist jedoch noch nicht geklärt (Cho 2001).

Proteinkinase C konservierte Region 2 (C2) Domäne

C2-Domänen wurden zunächst als Ca^{2+} -Interaktionsstelle in konventionellen PKCs wie Synaptotagmine und Phosphatidylcholin-2-acylhydrolase entdeckt (Xu et al. 1997) und stellen die zweitgrößte Gruppe der Lipid-bindenden Domänen dar (Stahelin 2009). Der Großteil der bis heute identifizierten Proteine, die C2-Domänen aufweisen spielen eine Rolle innerhalb der Signal Transduktion (PKC, cytosolisches PLA, Phospholipase C, Phosphatidylinositol 3-Kinase) oder sind als Transmembranprotein (Synaptotagmine, Rabphilin-3A, Unc-13) im Membrantransport (Nalefski und Falke 1996; Rizo und Sudhof 1998) involviert. C2-Domänen besitzen eine Länge von 130 Aminosäuren und weisen eine Proteinfaltung von acht antiparallelen β -Faltblättern auf, welche durch Loops miteinander verbunden sind, wobei die Ca^{2+} -Bindungsseite sich an einer Seite der Domäne befindet (Essen et al. 1996; Perisic et al. 1998; Shao et al. 1996; Sutton et al. 1995; Verdaguer et al. 1999).

C2-Domänen sind im Vergleich zu C1-Domänen variabler in ihrer Aminosäuresequenz (Nalefski und Falke 1996; Rizo und Sudhof 1998). Besonders die Loop Regionen, welche in der Lipid-Bindung der C2-Domänen involviert sind, weisen unterschiedliche Aminosäuresequenzen sowie Konformationen auf, die einen Einfluss auf die Bindungsspezifität und auf die Funktion der Domänen haben (Cho und Stahelin 2006).

Die meisten Ca^{2+} -abhängigen membranbindenden C2-Domänen präferieren anionische bis zwitterionische Membranen (Cho 2001). Des Weiteren zeigen Ca^{2+} -bindende Domänen Unterschiede in ihrer Lipid Affinität. So bevorzugen C2-Domänen verschiedener Enzyme Phosphatidylcholin- beziehungsweise Phosphatidylserin-Membranen (Lomasney et al. 1999; Medkova und Cho 1998;

Nalefski et al. 1998). Im Übrigen unterscheidet sich auch die Ca^{2+} -Affinität der C2-Domänen. So binden Ca^{2+} -unabhängige C2-Domänen, wie zum Beispiel PTEN-C2 (Lee et al. 1999), auch an Membranen. Für C2-Domänen, die nicht an Membranen binden, wird vermutet, dass diese in Protein-Protein-Interaktionen involviert sein könnten (Nalefski und Falke 1996; Ron und Kazanietz 1999).

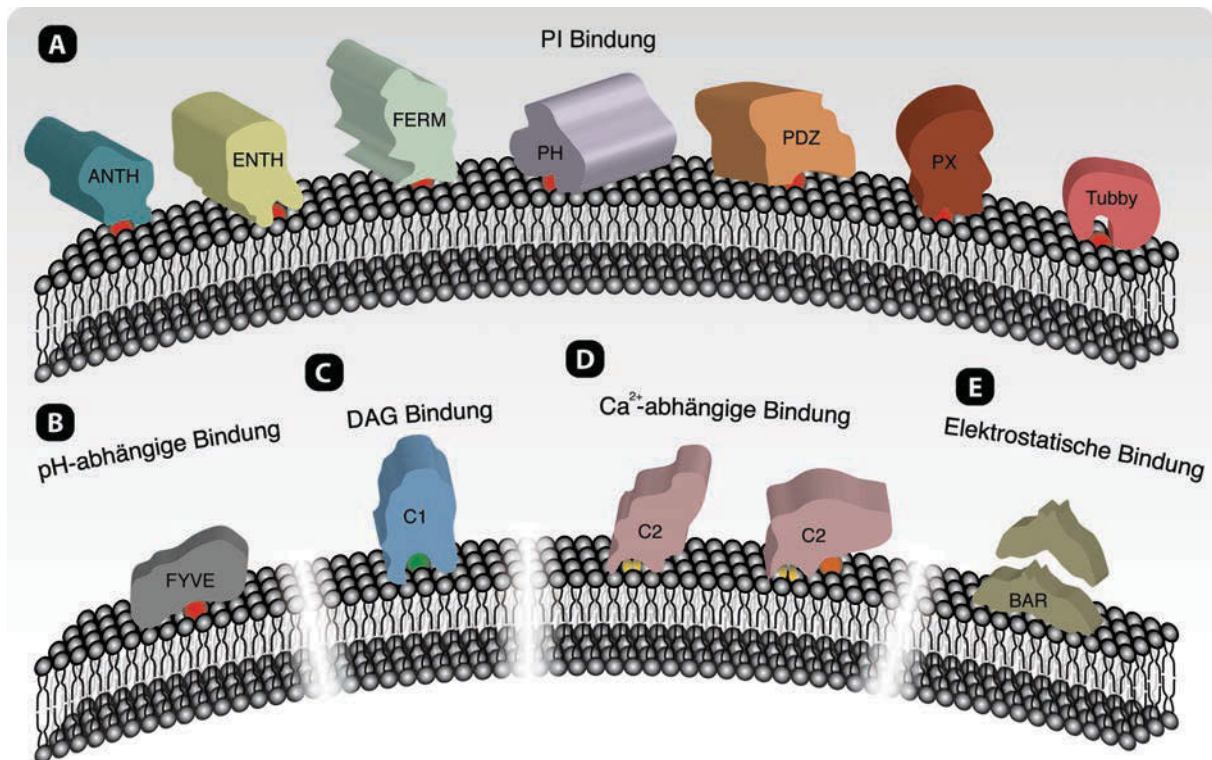


Abbildung 1: Membranbindungsarten von Lipid-bindenden Domänen. A) ANTH-Domänen binden spezifisch an PIP_2 , wobei die Bindungsaktivität durch eine konservierte Region zwischen zwei α -Helices gegeben ist. Die ENTH-Domäne bindet mit einer Präferenz an PIP_2 und PIP_3 über eine amphipathische α -Helix, was zu einer Veränderung in der Membrankrümmung führt. Die FERM-Domäne ist für die PIP_2 regulierte Bindung von ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) Proteinen an Membranen verantwortlich, welche über eine relativ flache Ebene zwischen den FERM-Motiven der Domäne vermittelt wird. PH-Domänen können eine Vielzahl von PIs binden. Einige PH-Domänen assoziieren mit der Membran durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem PI, während andere PH-Domänen ihre Bindung an das PI durch die Verankerung von hydrophoben Resten neben der PI-Bindungsstelle unterstützen. PDZ-Domänen binden spezifisch an PIP_2 , können aber auch Peptide binden. Die Bindungsstelle für Peptide, welche aus einer α -Helix und einem parallel orientierten β -Faltblatt besteht, überlappt mit der mutmaßlichen Bindungsstelle für PIP . Die PX-Domäne bindet mehrere PI. PI induziert zunächst die Bindung an die Membran und ermöglicht die anschließende Wechselwirkung der Domäne mit der Membran. Die rundliche Tubby-Domäne bindet an Membranen über Phosphatidylinositole, mit hoher Spezifität für $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$. B) FYVE-Domänen dringen zunächst mit einer Membraninteraktionsschleife in die Membran ein und verankern durch die spezifische Bindung von PI_3P an ihr. C) Hydrophobe Wechselwirkungen ermöglichen der C1-Domäne das Andocken an die Lipiddoppelschicht für eine effiziente DAG oder Phorbol ester Bindung. D) Zwei Varianten der Bindung von C2-Domänen. C2-Domänen können, je nach ihrer Zusammensetzung der Ca^{2+} -Bindungsstelle, mit anionischen oder zwitterionischen Membranen assoziieren. Andere C2-Domänen besitzen eine zusätzliche Bindungsstelle für PIs. E) Viele BAR-Domänen ähneln in ihrer Form einer Mondsichel. Auf ihrer konkaven Oberfläche sind sie reich an kationischen Resten, welche die Assoziation mit gekrümmten Membranen über elektrostatische Wechselwirkungen ermöglichen. Bei nicht gekrümmten Membranen können BAR-Domänen nur schwache Membran-Bindungen eingehen.

Pleckstrin Homologie (PH) Domäne

Die PH-Domänen sind die meist verbreiteten Lipid bindenden Domänen (Stahelin 2009). Sie binden spezifisch an drei (PIP₃, PI(4,5)P₂, PI(3,4)P₂) von sieben Lipiden der Phosphatidylinositol Lipid Familie (Lemmon 2007). PH-Domänen werden zunächst durch nichtspezifische elektrostatische Interaktionen an die Membran gebunden, anschließend wird die Interaktion mit der Membran durch die spezifische Phosphoinositol-Bindung gefestigt (Stahelin 2008). PH-Domänen bestehen aus 100 bis 120 Aminosäuren (Lemmon 2007) und weisen ein konserviertes Aminosäuren-Motiv von der Abfolge Lys-Xn-(Lys/Arg)-X-Arg auf. Die basischen Lysine und Arginine spielen während der Lipidbindung eine tragende Rolle, da sie Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Phosphat-Inositol-Kopf der Phosphoinositole (PI) ausbilden. Treten weitere basische Aminosäuren innerhalb der Domäne auf können diese die Bindung der Domäne an die Membran verstärken (Stahelin 2009).

FYVE-Domäne

Die FYVE-Zinkfinger-Domäne, welche von Hefe (5 Proteine) bis Mensch (27 Proteine) (Stenmark et al. 2002) konserviert ist, wurde nach den ersten Buchstaben der Proteine Fab1p, YOTB, Vac1p und EEA1 benannt, in welchen das Motiv zum ersten Mal identifiziert wurde (Stenmark et al. 1996). Die FYVE-Domäne gehört neben der Phox-Homologie-Domäne zu den zwei Domänen, die spezifisch Phosphatidylinositol 3-Phosphate (PI3P) erkennen, welches hauptsächlich in den Endosomen vorkommt (Stenmark et al. 2002). Sequenz-Alignements ergaben, dass die 70 Aminosäuren lange Domäne durch drei konservierte Motive definiert ist: Einem Arg/Lys-His-His-Cys-Arg-X-Cys-Gly Motiv am N-Terminus, gefolgt von einem Trp-X-X-Asp Motiv und einem C-terminalen Arg-Cys-Val Motiv (Stenmark et al. 2002). FYVE-Proteine besitzen diverse biologische Funktionen: (i) EEA1, Rabenosin-5, Rabip4, Hrs, Vac1p und Vps27p sind in endozytotische Transportwege involviert und regulieren die Fusion von endosomalen Membranen mit anderen endozytotischen Vesikeln und Organellen; (ii) PIKfyve, Fab1, MTMR3 und MTMR4 sind in der endosomalen Membran lokalisiert (iii) Hrs und SARA sind in der Signaltransduktion involviert (Kutateladze 2007). Die Strukturanalyse von vier FYVE-Proteinen zeigte, dass die Domäne eine Faltung aus zwei antiparallelen β -Faltblättern und einer α -Helix am C-Terminus besitzt, welche durch die Bindung der

Zink Ionen an Cystein-Resten stabilisiert wird (Dumas et al. 2001; Kutateladze und Overduin 2001; Mao et al. 2000; Misra und Hurley 1999). Das β 1-Faltblatt umfasst drei Aminosäuren des Arg/Lys-His-His-Cys-Arg-X-Cys-Gly Motivs und bildet aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaft eine Membraninteraktionsschleife (engl. *membrane interaction loop*) aus, welche die Membran durchdringt und das Binden der FYVE-Domäne an PI3P ermöglicht (Kutateladze 2007).

PhoX Homologie (PX) Domäne

Die Phox-Domäne wurde nach ihrer Entdeckung in phagozytotischen Oxidasen (Phox) benannt (Ponting 1996) und wurde anschließend noch in anderen Säugetier- und Hefeproteinen, wie Signalproteinen, Protein- beziehungsweise Phosphatidylinositol-Kinasen und Phospholipasen identifiziert (Seet und Hong 2006). Die PX-Domäne besitzt eine Größe von 130 Aminosäuren und weist eine konservierte Tertiärstruktur auf, welche sich, ausgehend vom N-Terminus, aus drei β -Faltblättern und drei bis vier Helices zusammensetzt. Die am stärksten konservierten Elemente der Domäne sind eine Prolin-reiche Region (Pro-X-X-Pro), sowie mehrere basische Aminosäuren (Seet und Hong 2006). Die Bindungsstelle der Domäne befindet sich am β 1-Faltblatt und bindet spezifisch PIP3. Proteine mit PX-Domäne lokalisieren aufgrund ihrer Lipidaffinität in PIP3 akkumulierten Kompartimenten wie den Endosomen und in der Vakuole (Cheever et al. 2001; Ellson et al. 2001; Kanai et al. 2001). Des Weiteren sind diese Proteine in unterschiedlichen fundamentalen Zellfunktionen wie Endozytose, Proteinsortierung, Membrantransport, Transkription, Ausbildung der Zellpolarität und der Signaltransduktion involviert (Carlton und Cullen 2005; Seet und Hong 2006).

Epsin N-Terminus Homologie (ENTH) Domäne

Die Epsin N-Terminal Homologie (ENTH) Domäne wurde zum ersten Mal in dem Pflanzenprotein Epsin1 identifiziert (Rosenthal et al. 1999). Die 150 Aminosäuren langen und am N-Terminus orientierten ENTH-Domänen ähneln in ihrer Struktur der Vesikeltransport assoziierten VHS-Domänen (De Camilli et al. 2002). Die Proteinfaltung dieser Domänen besteht aus einer sogenannten Superhelix, zusammengesetzt aus acht α -Helices, welche durch Schleifen unterschiedlicher Größe miteinander verbunden sind (Hyman et al. 2000). Die ENTH-Domänen wurden

in sogenannten Adapterproteinen der Endozytose und des Membrantransports identifiziert, welche eine Konsensus-Sequenz (Lys/Gly)-Ala-(Tyr/Ile)-X6-(Pro/Leu/Val)-Lys-X-Lys-(His/Tyr) aufweisen, die essentiell für die Bindung an Clathrin Mantel Komponenten beziehungsweise deren Co-Faktoren ist. ENTH-Domänen binden Phosphatidylinositole (Ford et al. 2002; Ford et al. 2001; Ye et al. 1995) mit einer Präferenz für PIP2 und PIP3 (Itoh et al. 2001).

AP180 N-Terminus Homologie (ANTH) Domäne

Proteine mit ANTH-Domänen fungieren wie ENTH-Proteine als Adapterproteine und sind sowohl im Membrantransport als auch in der Clathrin vermittelten Endozytose involviert (Ahle und Ungewickell 1986; Mishra et al. 2001; Nonet et al. 1999; Zhang et al. 1998). ANTH-Domänen bestehen aus neun bis zehn Helices und besitzen eine Länge von 250 bis 300 Aminosäuren. ANTH bindet spezifisch an PIP2 (Ford et al. 2001; Itoh et al. 2001), wobei Bindungsaktivität durch ein konserviertes Motiv (Lys/Gly)-Ala-(Tyr/Ile)-X6-(Pro/Leu/Val)-Lys-X-Lys-(His/Tyr) verursacht wird, welches sich zwischen der ersten und zweiten Helix befindet (Ford et al. 2002).

Bin-Amphiphysin-Rvs BAR Domäne

BAR-Domänen sind ungefähr 200 Aminosäuren lang und weisen schwache Homologie auf der Sequenz Ebene auf, sind aber strukturell konserviert. Sie besitzen einen Kern aus einer Coiled-coil-Region, welche aus drei umeinander gewundenen α -Helices zusammengesetzt ist. Des Weiteren dient die Coiled-coil-Region der Verknüpfung von BAR-Domänen untereinander, sodass diese als Dimer vorliegen (Ren et al. 2006). Proteine mit BAR-Domänen sind in mehrere zelluläre Prozesse involviert, welche zur Membrane-Remodellierung beitragen. Dazu zählen endozytotische Vesikel, Anordnung der transversale Tubuli bis zur Zell Migration und Neuromorphogenese (Dharmalingam et al. 2009; Ho et al. 2004; Kamioka et al. 2004; Krugmann et al. 2001; Lim et al. 2008; Salazar et al. 2003). BAR-Domänen können aufgrund ihrer positiven Ladung durch die Coiled-coil-Region mit den negativ geladenen Phospholipiden von Zellmembranen interagieren (Blood und Voth 2006; Peter et al. 2004; Tarricone et al. 2001).

FERM-Domäne

FERM (Four-point-one Protein, Ezrin, Radixin, Moesin) Domänen wurden in Zytoskelett assoziierten Proteinen identifiziert, welche andere Proteine mit der Plasmamembran verknüpfen (Chishti et al. 1998). Diese Bindung wird direkt über Phosphatidylinositole hergestellt (Chishti et al. 1998). Die hauptsächlich am N-Terminus orientierten FERM-Domänen (Chishti et al. 1998; Pearson et al. 2000) sind aus drei Subdomänen zusammengesetzt, welche miteinander verknüpft sind und dadurch die 298 Aminosäuren lange Domäne in eine kompakte, globuläre Form falten (Hamada et al. 2000).

PDZ-Domäne

Die ungefähr 100 Aminosäuren lange PDZ-Domäne, welche auch als DHR-Domäne oder GLGF *repeats* bezeichnet wird, wurde zum ersten Mal im *post-synaptic density* PSD-95- sowie im *tight-junction* ZO-1-Protein im Epithel identifiziert. Die Faltung der Domäne besteht aus sechs β -Faltblättern und zwei α -Helices, wobei eine α -Helix und ein β -Faltblatt eine Substratbindungsstelle mit dem konservierten Motiv Ser/Thr-X-Val-COO⁻ formen (Cabral et al. 1996; Doyle et al. 1996).

PDZ-Domänen kommen hauptsächlich in cytoplasmatischen Proteinen vor und treten entweder einzeln oder in mehreren Kopien auf. Die Domäne ist in der Lage sowohl Sequenzen des Carboxy-Terminus, als auch interne Peptidsequenzen von Proteinen zwecks Protein-Protein-Interaktion zu binden (Ponting 1996). Außerdem können Proteine mit PDZ-Domänen aufgrund ihrer PIP₂-Spezifität auch an Plasmamembranen binden (Zimmermann et al. 2002).

TUBBY-Domäne

Die TUBBY-Domäne wurde erstmals im TUBBY-Protein der Maus, welches im Verdacht steht Fettleibigkeit zu fördern, identifiziert. Die Familie der Tubby-Domänen beschränkt sich auf vielzellige Organismen des Tier- und des Pflanzenreiches (Carroll et al. 2004). Eine Domäne ist etwa 260 Aminosäuren lang und befindet sich am Carboxy-terminalen Ende von Proteinen, während der Amino-Terminus variiert und den Proteinen vielfältige Funktionen verleiht (Mukhopadhyay und Jackson 2011). Die Kristallstruktur von Tub zeigte, dass die Tubby-Domäne eine rundliche Struktur besitzt, welche aus einem geschlossenen β -Fass (engl. *β -barrel*) mit 12 anti-

parallelen β -Faltblättern um eine zentrale hydrophobe α -Helix gebildet wird (Boggon et al. 1999). Die TUBBY-Domäne der TULP-Proteine bindet an Phosphatidylinositol mit hoher Spezifität für PI(4,5)P₂ (Boggon et al. 1999; Santagata et al. 2001).

3.1.2 Posttranslationale Modifikationen

GPI-Anker

Die Verankerung von Proteinen an Membranen mit Glycosylphosphatidylinositol (GPI) ist eine konservierte posttranslationale Modifikation, welche in mehreren hundert Proteinen in Eukaryoten, einschließlich Protisten, Pilzen und Menschen, identifiziert wurde (Ferguson et al. 2009; Fujita und Kinoshita 2012). Die ersten vollständigen GPI-Strukturen, nämlich die von *T. brucei* VSG und Ratten Thy-1, wurden im Jahr 1988 gelöst (Ferguson und Williams 1988). Die Reaktion der Synthese von GPI bis zur Verknüpfung an das Zielprotein umfasst mindestens 10 Reaktionsschritte, woran mehr als 20 Gene beteiligt sind (Fujita und Kinoshita 2010; Kinoshita et al. 2008). Zunächst wird am endoplasmatischen Retikulum die GPI-Vorstufe aus dem Lipid PI, welches schrittweise durch die Zugabe einer Glucosamin (GlcN)-Einheit, drei Mannosen (MANs), einer Fettsäure und Phosphoethanolamin (EtNP) modifiziert wird, gebildet. Anschließend wird die GPI-Vorstufe durch die GPI-Transamidase an Proteine, die eine GPI-Ankersignal Sequenz an ihrem C-Terminus besitzen, transferiert. Die GPI-verankerten Proteine werden anschließend aus dem endoplasmatischen Retikulum durch den Golgi Apparat zu der Membran transportiert, mit der sie durch kovalente Bindungen interagieren (Fujita und Kinoshita 2010; Fujita und Kinoshita 2012; Kinoshita et al. 2008).

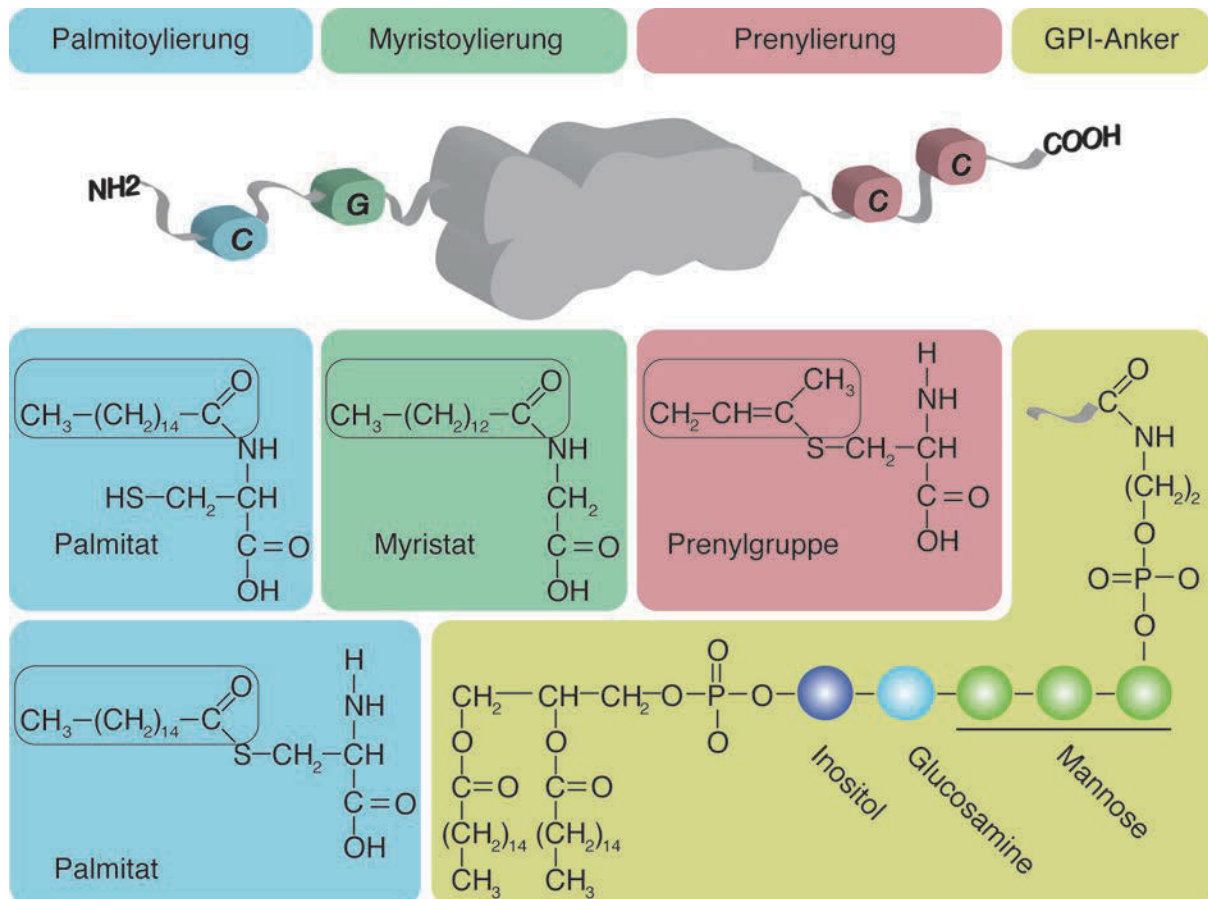


Abbildung 2: Posttranslationale Modifikationen, welche Membranbindung für Proteine ermöglichen. Die Palmitoylierung ist die Verknüpfung von Palmitat (Palmitinsäure) an einem Cysteinrest am N-Terminus von Proteinen über eine Amid- oder Thioester-Bindung. Myristoylierung, auch N-Myristoylierung genannt, ist das Anhängen von Myristat (Myristinsäure) an einem Glycinrest am N-Terminus eines Proteins über eine Thioester-Bindung. Das Enzym Farnesyltransferase katalysiert bei der Prenylierung eine Prenylgruppe, meistens von Farnesylldiphosphat oder Geranylldiphosphat, über eine Thioether Brücke an ein oder zwei Cysteinreste an den carboxyterminalen Teil eines Proteins. GPI-verankerte Proteine sind an ihrem Carboxy-Terminus durch eine Phosphodiesterbindung eines Phosphoethanolamins mit einem tri-Mannosyl-Glucosamin Kern verknüpft. Das Glucosamin ist wiederum mit einem Phosphatidylinositol (PI) verbunden, welches sich über eine Phosphodiesterbindung mit der Membran über deren hydrophoben Bereich verankert.

Palmitoylierung

Die Protein-Palmitoylierung wurde vor über 35 Jahren zum ersten Mal dokumentiert, aber erst 25 Jahre später wurden die Enzyme (Protein-Acyltransferasen, PATs) identifiziert, welche für diese Modifikation verantwortlich sind (Linder und Deschenes 2003; Linder und Deschenes 2004). Die Palmitoylierung bezeichnet die Addition von Fettsäuren (hauptsächlich Palmitinsäure) durch eine N-Amidbindung oder eine Thioesterbindung (S-Acylierung) an Cysteinen von Proteinen, wobei es sich bei der S-Acylierung um die einzige reversible Lipidmodifikation handelt (Linder und Deschenes 2003; Smotrys und Linder 2004). Die Palmitoylierung ist in einer Vielzahl von Proteinen beschrieben und ist neben der Verankerung von Proteinen in der

Membran auch am Proteintransport, der Organell-Vererbung und der Vesikelfusion beteiligt (Smotrys und Linder 2004).

Myristoylierung

Bei der N-Myristoylierung katalysiert N-Myristoyltransferase (NMT), ein allgegenwärtiges und essentielles Enzym in Eukaryoten, die Verknüpfung einer Myristinsäure mit einem Glycin am N-Terminus von Proteinen (Boutin 1997; Farazi et al. 2001; Gordon et al. 1991). Eine Vielzahl der Zielproteine der NMT sind entscheidende Komponenten von Signalwegen. Darüber hinaus ermöglicht Myristoylierung in der Regel die Membranbindung von Proteinen, welche essentiell für die richtige Lokalisierung oder biologische Funktion dieser Proteine ist, sowie die Protein-Protein-Interaktionen und die Proteinstabilität (Resh 1999; Resh 2006).

Prenylierung

Prenylierung ist eine Modifikation von Proteinen mit einem Lipid, welches ein oder zwei Prenylgruppen (Farnesyl oder Geranylgeranyl) besitzt. Die Modifikation ermöglicht Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie die richtige zelluläre Lokalisation des Proteins an Membranen über eine Thioether-Bindung an ein oder zwei Cysteinen am Carboxy-Terminus des Zielproteins (Aligianis et al. 2005; Hancock et al. 1991; Resh 2006; Sinensky 2000). Ungefähr 100 Proteine, welche als Prenylome zusammengefasst werden, sind an dem molekularen Signalweg zur Herstellung dieser Lipidgruppierungen beteiligt oder dienen als Zielproteine für die Prenylierung (McTaggart 2006).

3.2 Membrane occupation recognition nexus (MORN)

Der Membrane occupation recognition nexus (MORN) ist eine 14 Aminosäuren lange Wiederholung, die als Motiv bezeichnet wird. Der allgemeine Konsensus des Motivs besteht aus folgender Wiederholung, wobei die Aminosäuren unterschiedlich stark konserviert sind: Tyr-Gln/Glu-Gly-Glu/Gln-Trp-X-Asn-Gly-Lys-X-His-Gly-Tyr-Gly (Takeshima et al. 2000). Das MORN-Motiv wurde im Jahre 2000 innerhalb der Forschung nach Proteinen, welche die Triaden-Strukturen des Skelettmuskels unterstützen, in dem Protein mitsugumin72 oder *junctionophilin type 1* (JP-1) identifiziert

(Takeshima et al. 2000). Die BLAST-Analyse genomischer Sequenzen unterschiedlicher Organismen identifizierte weitere potentielle Proteine, die MORN-Motive beherbergen. Wenn mehrere MORN-Motive in einem Protein hintereinander angeordnet sind, werden diese als MORN-Domäne bezeichnet. Die Anzahl der MORN-Motive variiert in den bisher untersuchten Proteinen von 2 bis 17 (Choi et al. 2010; Shimada et al. 2004) und sie lokalisieren entweder am Amino-Terminus, am Carboxy-Terminus, oder erstrecken sich über das ganze Protein (Gubbels 2006, Habicht et al. 2015).

3.2.1 MORN-Motive in tierischen Zellen

Junctophilin-Familie

Seit der ursprünglichen Entdeckung der Junctophilin (JP) Protein-Familie wurde die Rolle der Proteine in erregbaren Zellen beschrieben und mit menschlichen Erkrankungen wie Skelettmuskel-Myopathie, Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz, Rhythmusstörungen, Verhaltens- und Lerndefiziten, motorischen Störungen sowie mit der Huntington-Krankheit ähnlichen Symptomen in Verbindung gebracht. Alle vier Junctophilins besitzen acht MORN-Domänen am N-Terminus und eine Transmembran-Domäne am C-Terminus (Landstrom et al. 2014). JP-1 und JP-2 sind die Isoformen der quergestreiften Muskulatur, wobei JP-1 hauptsächlich im Skelettmuskel und JP-2 am stärksten im Herzen detektiert wurde (Nishi et al. 2000; Takeshima et al. 2000).

Beide Junctophilins sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Dyaden- und Triaden-Struktur des *junctional membrane complex* (JMC), welcher aus transversalen Tubuli und dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) gebildet wird. Durch die Verankerung der Junctophilins in der SR-Membran mithilfe der Transmembran-Domäne und durch die selektive Interaktion über die MORN-Motive mit der Plasmamembran der T-Tubuli dienen die Proteine als Abstandhalter innerhalb des JMC (Block et al. 1988; Takeshima et al. 2000). So zeigten mutierte Mäuse, denen JP-1 oder JP-2 fehlten, eine Reduzierung sowie Verformung der intakten Triaden-, beziehungsweise Dyaden-Struktur (Hirata et al. 2006; Takeshima et al. 2000). Des Weiteren sind die JP Muskel Isoformen in der Regulierung des intrazellulären Calcium-Speichers involviert. Außerdem interagieren die JPs mit den

gewebespezifischen Ryanodin-Rezeptor (RyR) Isoformen, welche die Freisetzung von dem im SR gespeicherten Ca^{2+} vermitteln (Liang et al. 2012a; Liang et al. 2012b; Phimister et al. 2007). Der Verlust der Interaktion mit RyR durch Knock-Out von JP-1 und JP-2 resultierte in einem abnormalen Calciumausstrom aus den intrazellulären Speichern und führte letztendlich zur Letalität der mutierten Mäuse (Ito et al. 2001; Takeshima et al. 2000).

Die neuronalen Junctophilins JP-3 und JP-4 lokalisieren partiell innerhalb der Nervenzellen des Gehirns (Moriguchi et al. 2006; Nishi et al. 2003). Die Calcium regulierende Funktion der JP-Muskel-Isoformen sowie die Beobachtung, dass der Knock-Out von JP-3 in Mäusen sich in einem reduzierten Gleichgewicht sowie der Beeinträchtigung der Muskelkoordination äußert, suggerieren auch für die neuronalen JPs eine Calcium regulierende Funktion (Nishi et al. 2002). Dennoch wurde bis heute keine detaillierte intrazelluläre Ca^{2+} -Signalstudie durchgeführt (Landstrom et al. 2014). Zudem wiesen JP-3 Knock-Out-Mäuse keine erkennbare strukturelle Störung auf, sodass diese keine Rolle in der Aufrechterhaltung der neuronalen Zellarchitektur spielen (Nishi et al. 2002). Landstrom et al. (2014) beschrieben für JP-3 und JP-4 eine Funktion wie sie schon für Muskel-Isoformen beschrieben wurde (Takeshima et al. 2000), nämlich als Abstandshalter um einen geeigneten Raum zwischen der neuronalen Zellmembran und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) zu generieren.

Meichroacidin-Familie

Meichroacidins (*male meiotic metaphase chromosome-associated acidic protein*, MCA) sind eine Gruppe von Proteinen mit sieben MORN-Motiven am N-Terminus, welche nach der Lokalisation des ursprünglichen MCA in Maus benannt wurden. Weitere MCA Orthologe sind *CiMORN40* der Schlauchseescheide, *MORN motif-containing sperm-specific axonemal protein* (MSAP) des Karpfens und Radial-spoke-Protein 44 (Rsp44) des Menschen, wobei das Molekulargewicht der MCAs zwischen 40 und 44 kDa variiert (Ju und Huang 2004; Satouh et al. 2005; Shetty et al. 2007; Tokuhiro et al. 2008; Tsuchida et al. 1998). Ursprünglich galten MCA-Proteine als testikelspezifisch (Tsuchida et al. 1998), wurden aber in weiteren Geweben wie Luftröhre, Rückenmark, Schilddrüse und Gehirn identifiziert (Shetty et al. 2007). Subzellulär lokalisieren alle MCAs an den Radialspeichen (engl. *radial*

spoke) des Axonems von Spermatidflagellen, wobei das menschliche MCA auch in den Cilien von Epithelzellen und Maus MCA an den Chromosomen und Spindeln innerhalb der Metaphase der Meiose lokalisieren (Shetty et al. 2007). In Anbetracht der Gemeinsamkeiten bei der männlichen Meiose und der Struktur der Axonemes kann MCA eine Rolle bei der Bindung von Proteinen an Mikrotubuli spielen (Satouh et al. 2005). Des Weiteren wiesen Mäuse, denen MCA fehlte, eine beeinträchtigte Spermienbildung aus, die zu Unfruchtbarkeit und Azoospermie führte (Tokuhiro et al. 2008).

Retinophilin

Drosophila Retinophilin (*rtp*), auch bekannt als Undertaker (*uta*), codiert ein 22,7 kDa großes Protein mit vier MORN-Motiven, welche in der Mitte des Proteins angeordnet sind. Orthologe von *rtp/uta* sind in Säugetieren, Zebrafischen und Insekten beschrieben (Mecklenburg 2007). Insekten *rtp* und MORN4 der Säugetiere, auch bekannt als NPG4, lokalisieren in den Mikrovilli der Rhabdomer innerhalb der Retina beziehungsweise letzteres auch im Zentralnervensystem (Mecklenburg 2007; Mecklenburg et al. 2010). Außerdem wurde *rtp* in der Plasmamembran und im Endoplasmatischen Retikulum von Makrophagen lokalisiert. Das *rtp* der Makrophagen ist, wie die Juncophilins, in der Regulierung des intrazellulären Calciums involviert (Cuttell et al. 2008), während MORN4 und *rtp* der Retina in der Regulation der Phototransduktion eine Rolle spielen (Mecklenburg et al. 2010; Venkatachalam et al. 2010) und die axonale Degeneration sensorischer Axone fördern (Bhattacharya et al. 2012). MORN4 wurde darüber hinaus in neuroprotektiven Prozessen identifiziert (Dai et al. 2010).

16

MOPT

MOPT (MORN-motif protein testis) oder auch MORN2 ist ein 90 kDa großes Protein von Säugetieren mit zwei MORN-Motiven am C-Terminus. MOPT Transkript sowie das codierte Protein wurden in geringen Mengen im Gehirn sowie in Herz, Lunge und Nieren nachgewiesen, sind aber am stärksten in der Skelettmuskulatur sowie im erwachsenen Hoden exprimiert. MOPT ist am endosomalen Transport zwischen der Plasmamembran und dem Scheitelpunkt der Akrosom von runden Spermatisiden beteiligt, was durch ein erhöhtes Level der MOPT mRNA während der Spermiogenese reflektiert wird (Choi et al. 2010). Die massive Expansion von MORN2 Transkripten sowie die Genorganisation zwischen Virulenzfaktoren geben Grund zur Annahme, dass MORN2-Proteine die Adhäsion, Aggregation und Invasion von Fusobakterien an den Wirt begünstigen (McGuire et al. 2014).

Alsin

ALS2 wurde ursprünglich als ursächliches Gen für Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und die seltene primäre Lateralsklerose (PLS) identifiziert (Hadano et al. 2001; Yang et al. 2001). Das *ALS2* Gen von Säugetieren codiert das 180 kDa große Protein Alsin (Yang et al. 2001), welches ausgehend vom N-Terminus eine RhoGEF-Domäne, eine Dbl-Homologie (DH) sowie eine Pleckstrin-Homologie (PH) Domäne, acht MORN-Motive und eine Vacuolar-Protein-Sorting-9 Domäne (VPS9) am C-Terminus beherbergt (Kanekura et al. 2004; Kunita et al. 2007; Otomo et al. 2003). Weitere Orthologe sind sowohl in Wirbeltieren als auch in Fliegen und Mosquito beschrieben (Devon et al. 2005). Die Expression von Alsin ist am stärksten in den Neuronen des Kleinhirns, gefolgt vom Hirnstamm und Rückenmark (Otomo et al. 2003). Des Weiteren wurde in der Leber eine 160 kDa große Isoform von Alsin detektiert (Otomo et al. 2003). Bis dato sind die Mechanismen der durch Mutationen des *ALS2* Gens induzierten Erkrankungen aber weitgehend unverstanden. Die Expression von verkürzten Varianten von Alsin verursachten einen früheren Beginn der ALS (Yamakawa et al. 2015). Noch ist die Funktion von Alsin in der Entwicklung und in gereiften Neuronen nicht identifiziert, dennoch wird ihm eine Rolle bei dem Membran-, Vesikeltransport und beim axonalen Wachstum in Nervenzellen sowie eine neuroprotektive Rolle gegen Zytotoxizität zugesagt (Hadano et al. 2007).

3.2.2 MORN-Motive in Pflanzen

In Pflanzen wird zwischen drei Typen von Proteinen mit MORN-Motiven unterschieden: (i) sind Mono-Phosphatidylinositol-Kinasen (PIPK, PIP5Ks) (Im et al. 2007; Ma et al. 2006; Mueller-Roeber und Pical 2002), (ii) das *accumulation and replication of chloroplast 3* (ARC3) Protein (Shimada et al. 2004) und (iii) *Brassica rapa* MORN-Motiv Protein (*BrMORN*) (Lee et al. 2009).

Im Gegensatz zu tierischen PIPKs weisen Pflanzen PIPKs MORN-Motive am N-Terminus auf. Neun *Arabidopsis* (*At*PIPK1-9), fünf *Oryza* PIPKs (*Os*PIPK1, 3-5, 7) und ein *Physcomitrella* (*Pp*PIPK1), welche sieben bis neun MORN-Motive besitzen, wurden identifiziert (Ma et al. 2006; Mueller-Roeber und Pical 2002). Studien mit Fusionsproteinen und Zellfraktionierung zeigten, dass das 752 Aminosäuren lange *At*PIPK1 beziehungsweise sein Ortholog *Os*PIPK1 in der Plasmamembran lokalisieren. *At*PIPK3, *At*PIPK4, und *Os*PIPK1 regulieren das Wachstum der Wurzelhaare an der Rhizodermis (Kusano et al. 2008; Stenzel et al. 2008), die Pollenbildung (Sousa et al. 2008) sowie die Bildung des Blütenstandes (Ma et al. 2006).

ARC3 von *Arabidopsis thaliana* ist ein 80 kDa großes Protein mit zwei MORN-Domänen am C-Terminus. Das sonst im Stroma lokalisierte Protein lokalisiert während der Zellteilung an der Membran des Chloroplasten (Maple et al. 2007; Shimada et al. 2004) und fungiert dort durch die Interaktion mit den Zellteilungsproteinen FtsZ1, MinD1 und MinE1 (Maple et al. 2007) als Teilungsfaktor von Chloroplasten (Shimada et al. 2004).

BrMORN (56 kDa) besitzt sieben C-terminale MORN-Domänen und zusätzlich zwei N-terminale Transmembran-Domänen. *BrMORN* in *Arabidopsis*-Pflanzen reguliert das Wachstum von Zellen und der vegetativen Organe, sowie die Samenproduktion (Lee et al. 2009).

3.2.3 MORN-Motive in Protisten

In Protisten sind vor allem die Orthologe des *Toxoplasma gondii* Proteins MORN1 (41 kDa) charakterisiert (Gubbels 2006). MORN1 besitzt innerhalb der Apicomplexan eine konservierte Struktur bestehend aus 14 zentral angeordneten MORN-Domänen (Gubbels 2006). Zudem besitzt das Protein eine konservierte Funktion als

Endodyogenie-Marker während der asexuellen und sexuellen Entwicklung (Ferguson et al. 2008) in Apicomplexa. Außerdem wurde gezeigt, dass *TgMORN1* essentiell für die Organisation des basalen Komplexes (Heaslip et al. 2010) und für die Abschnürung während der Zell-Tochter-Teilung des Parasiten ist (Lorestani et al. 2010).

3.3 *Tetrahymena thermophila*

Tetrahymena thermophila ist ein phagotropher, einzelliger Eukaryont (Protist) (Seaman 1961), der als Modellorganismus für die molekulare Forschung in vielen Bereichen genutzt wird (Katz und Turkewitz 2013). Der Protist bewohnt als freischwimmender Organismus Bäche, Seen und Teiche und kann in fast allen Klimazonen gefunden werden (Elliott und Hayes 1955; Katz und Turkewitz 2013). Frühe mikroskopische Beobachtungen identifizierten die holotriche Ciliatur von *Tetrahymena*, die der Organismus als Fortbewegung nutzt und welche ihn als phänotypisches Merkmal in die Gruppe der Ciliaten eingliedert. Ciliaten sind eine der drei Hauptgruppen der Alveolaten (Cavalier-Smith 1993), welche auch Dinoflagellaten und Apicomplexa einschließt (Gajadhar et al. 1991).

T. thermophila ist eine birnenförmig Zelle mit einer Länge von 50 μm und einer maximalen Breite von 30 μm (Collins und Gorovsky 2005; Pesciotta und Satir 1985). Die Zelle besitzt alle typischen Strukturen einer tierischen Zelle, weist aber zusätzlich noch Phagosomen, Mucozysten, eine kontraktile sowie eine Nahrungs-Vakuole auf. Das Zytoskelett von *T. thermophila* setzt sich aus mehreren Strukturen zusammen. Unter der Plasmamembran liegen zunächst die Alveoli (Gould et al. 2008), gefolgt von 18 bis 21 longitudinal orientierten Mikrotubuli mit angrenzenden Basalkörpern, die mit Cilien assoziiert sein können und letztendlich dem Epiplasma (Honts und Williams 2003).

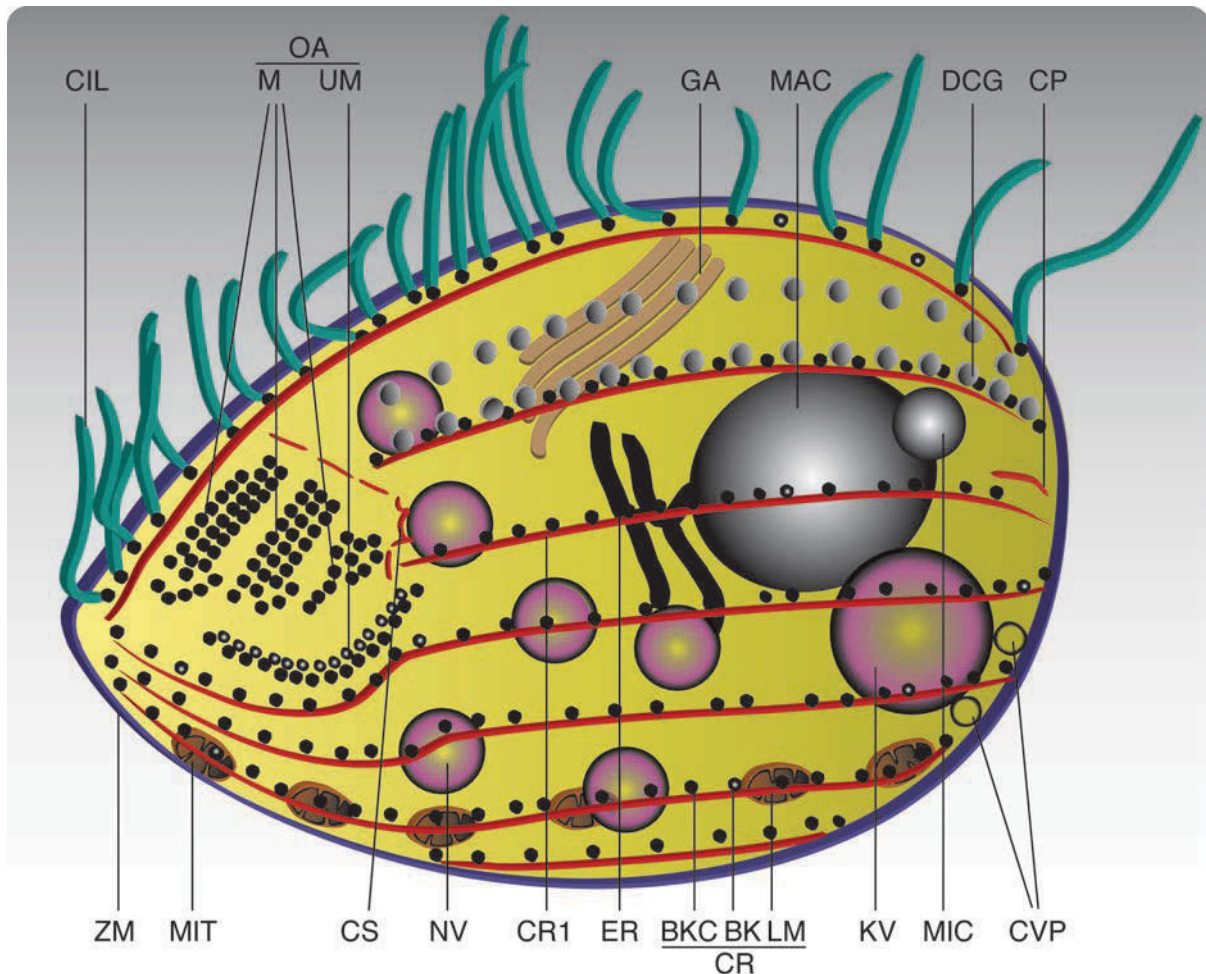


Abbildung 4: Cytoplasmatische Organisation von *Tetrahymena thermophila*, dargestellt von der ventralen Oberfläche des Ciliaten. *Tetrahymena thermophila* besitzt einen nukleären Dimorphismus: Der Keimbahn generierende Mikronukleus (MIC) und der somatische Makronukleus (MAC). Dargestellt sind die Zellmembran (ZM) und sieben von 18 bis 21 Cilien Reihen (CR) bestehend aus longitudinal angeordneten Mikrotubuli Bändern (LM), welche entweder mit uncilierten Basalkörpern (BK) und/oder cilierten Basalkörpern (BKC) assoziiert sind. Aus letzteren entspringen die Cilien. Sekretorische Granula (*engl.: dense core secretory granules*) DCG, auch bekannt als Mucocysten, sind in zwei Reihen zwischen zwei LM lokalisiert. Die drei Besonderheiten der Cortex des Ciliaten sind der Oral-Apparat (OA) am anterioren Ende sowie der Cytoproct (CYP) und die kontraktile Vakuole Poren (CVP) am posterioren Ende. Der CYP ist rechts neben der ciliären Reihe Nummer 1 (CR1) lokalisiert, welche vom Mundapparat bis zum posterioren Ende der Zelle reicht. Die Basalkörper bilden drei Membranellen (M) und eine undulierende Membran (UM), welche letztendlich den OA formen. Die Ms setzen sich aus drei Reihen BK zusammen und die UM aus jeweils einer Reihe BKs und BKC. Der Zellmund, auch Cytostome genannt (CS), befindet sich unterhalb des OA und ist der Ort, an dem die Nahrungsvakoulen (NV) gebildet werden. Eine einzige kontraktile Vakuole (KV) sowie die NV entleeren sich über zwei kontraktile Vakuole Poren (KVP). Die Zelle besitzt alle typischen Zellstrukturen eines Eukaryoten, einschließlich endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi Apparat (GA) und Mitochondrien (MIT), welche entlang der (CR) organisiert sind.

T. thermophila besitzt drei einzigartige Merkmale (Frankel et al. 1993): (i) der trichterartige Oral-Apparat am anterioren Ende der Zelle, welche auch ausschlaggebend für die Namensgebung des Ciliaten ist, setzt sich aus vier Membranen, drei sogenannten Membranellen und einer undulierenden Membran zusammen, die von 150 meist bewimperten Basalkörpern gebildet werden. (ii) Der schlitzförmige Zell-Anus, der auch als Cytoproct bezeichnet wird, befindet sich am gleichen longitudinal Mikrotubuli wie der Oral-Apparat, nahe dem posterioren Ende des Ciliaten und (iii) zwei, in seltenen Fällen auch eine oder drei, kontraktile Vakuolen, die am posterioren Enden gegenüber dem Cytoproct liegen.

Tetrahymena besitzt, wie andere Ciliaten, einen nukleären Kerndimorphismus. Diese beiden Arten von Kernen werden als Mikronukleus (MIC) beziehungsweise Makronukleus (MAC) bezeichnet (Prescott 1994). Die Genome von MIC und MAC sind verschieden, jedoch eng miteinander verwandt (Eisen et al. 2006). Das Genom des diploiden MIC besitzt fünf metazentrische Chromosomen mit einer Größe von 120 Mb und codiert 27.500 putative Proteine, welche für die generativen Funktionen von *Tetrahymena* verantwortlich sind (Collins und Gorovsky 2005). Das Genom des polyploiden Makronukleus besitzt 225 Chromosomen, ist 104 Mb groß und umfasst 27.000 Gene, die potentielle Proteine kodieren (Eisen et al. 2006). Der MAC, dessen Genom von dem MIC verarbeitet wird und welcher dadurch das Zentrum der Genexpression ist, bestimmt die phänotypische Ausprägung der Zelle (Collins und Gorovsky 2005). Ein weiteres Merkmal ist die Codon-Präferenz von *Tetrahymena*, welche den Organismus nur TGA als Stopcodon erkennen lässt, während die zwei Codons TAA und TAG die Aminosäure Glutamin codieren (Salim et al. 2008).

Tetrahymena thermophila ist ein geeigneter Modellorganismus für die Grundlagenforschung. Aufgrund seiner kurzen Generationszeit von zwei bis drei Stunden und der leichten Kultivierbarkeit von großen Kulturen, um eine ausreichende Menge von Makromolekülen für biochemische Studien zu produzieren (Cassidy-Hanley 2012). Des Weiteren ist der Ciliat größer als viele Säugetierzellen (Collins und Gorovsky 2005) und ermöglicht dadurch detaillierte morphologische Beobachtungen. Mit *Tetrahymena* wurden grundlegende biologische Entdeckungen, wie die Identifizierung des ersten Zytoskelett-Motorproteins Dynein (Gibbons und Rowe 1965), der katalytischen RNA (Zaug und Cech 1986), Telomere (Blackburn

und Gall 1978; Yao et al. 1981), Telomerase (Greider und Blackburn 1985) sowie die Histon-Acetylierung (Brownell et al. 1996) errungen.

3.4 Ziele der Dissertation

MORN (*membrane occupation recognition nexus*) Motive wurden erstmals in Juncophilins, Proteine welche Teil des Junctional Komplexes sind, beschrieben. In weiteren wissenschaftlichen Arbeiten nach der ersten Beschreibung des Proteins wurde der konservierte Charakter des Protein Motivs unterstrichen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass das Motiv in Proteinen mit verschiedenen Funktionen und subzellulären Lokalisationen vorkommt. Es wurde mehrmals hypothetisiert, dass das Motiv mit Membranen assoziieren kann. Allerdings ist die genaue Funktion bis dato nicht geklärt.

Ziel dieser Dissertation ist es zunächst, eine systematischen Identifizierung und Katalogisierung der MORN-Protein Familie des Ciliaten *Tetrahymena* vorzunehmen, um potentielle Zusammenhänge zwischen Domänenarchitektur und Expression der MORN-Proteine zu beschreiben. Als Fallstudie sollen MORN-Proteine mit gleicher MORN-Domänen Struktur die Hypothese stützen, dass die Anzahl von MORN-Domänen und deren Kompositionen innerhalb des Proteins entscheidend für die subzelluläre Lokalisation sind. Um den universellen Charakter des Motivs zu unterstreichen wird ein MORN-Protein von *Tetrahymena* hinsichtlich der Fähigkeit, sich selber zu assemblieren in *E. coli* exprimiert. Die Lokalisation eines *Trichomonas vaginalis* MORN-Proteins in *Trichomonas vaginalis* sowie die ektopische Expression des Proteins in *Tetratrichomonas gallinarum* soll die zielgerichtete Lokalisation von MORN-Proteinen widerspiegeln. Das *Tetrahymena* Ortholog von MORN1 des Human Parasiten *Toxoplasma gondii*, welches hoch konserviert in den Apicomplexa ist, soll für anschließende Anwendungen, die zur weiteren Charakterisierung des Motivs beitragen können, zunächst überexprimiert und isoliert werden. Mit Hilfe des isolierten MORN-Proteins sollen potentielle Membran Assoziationen von MORN-Motiven mit unterschiedlichen Versuchsmodellen, in denen die Lipid Affinität untersucht wird, aufgezeigt werden. Die Aufklärung der Proteinstruktur von MORN Domänen und ihre dreidimensionale Anordnung sollen zum Verständnis der noch unbekannten Funktion dieser Domäne

beitragen. Zur Strukturanalyse sollen verschiedene Bedingungen zur Kristallisation des MORN-Proteins getestet werden und die Struktur per Röntgenstrukturanalyse ermittelt werden. Alternativ soll die Struktur per Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) bestimmt werden.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Medien und Chemikalien

In dieser Arbeit wurden Chemikalien von folgenden Firmen verwendet: Acros Organics (Geel, Belgien), AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Difco Laboratories Inc. (Palo Alto, USA), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Merck Biosciences (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Alle verwendeten Lösungen, Nährmedien und Puffer wurden im Autoklaven dampfsterilisiert oder steril filtriert.

4.1.2 Antibiotika

Ampicillin	Sigma
Antibiotikum-Antimykotikum	Gibco
Geneticin	Roth
Paclitaxel (Inhibitor)	GenDepot
Penicillin/Streptomycin	Biomedicals LLC

4.1.3 Antikörper

12G10 anti-alpha-tubulin IgG1 produziert in Maus	DSHB
Alexa Fluor® 488anti-Kaninchen IgG produziert in Ziege	Invitrogen
Anti-GFP antibody IgG produziert in Kaninchen	Abcam
Anti-Glutathione-S-Transferase (GST), IgG Peroxidase Konjugat produziert in Kaninchen	Sigma-Aldrich
ImmunoPure anti-Kaninchen, IgG Peroxidase Konjugat produziert in Ziege	Pierce
ImmunoPure anti-Maus, IgG Peroxidase Konjugat produziert in Ziege	Pierce
TRITC anti-Maus IgG produziert in Ziege	Sigma-Aldrich

4.1.4 Oligonukleotide

MRNC36 SphI F	5'-GATTATATTTGCATGCGAAACATAAATTGTGC-3'
MRNC36 MluI R	5'-GCTTACGCGTTTCGGTAATCCATTTAATACG-3'
MRNC38 SphI F	5'-GGTTAATAGGCATGCGTAATGAATGTTTCAGC-3'
MRNC38 MluI R	5'-GATATTCTAACGCGTTAACCCTTAATTCTTTTGC-3'
MRNC39 SphI F	5'-GATAATAATTGCATGCGTTGCTGTTAATCTGAAC-3'
MRNC39 MluI R	5'-CAACCATCACGCGTTTCACCGTCTTCGTTTG-3'
MRNO51 SphI F	5'-GGTTGTTATTAGAGCATGCTTTATAAC-3'
MRNO51 MluI R	5'-TTACGCGTAATGGTTCCAACAAAATTGTGC-3'
TVAG182670 NdeI F	5'-GGTGGTCATATGATTGAAGAAGAAGAGGAAG-3'
TVAG182670 BamHI R	5'-GGTGGTGGATCCTTGTTTTCTTGGTCTCTTGTT-3'

4.1.5 Enzyme

<i>Bam</i> HI	New England Biolabs
<i>Bgl</i> II	New England Biolabs
<i>Mlu</i> I	New England Biolabs
<i>Nde</i> I	New England Biolabs
Phusion® High-Fidelity Polymerase	New England Biolabs
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich
Protease Inhibitor cOmplete, EDTA-free	Roche
<i>Sph</i> I	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific
T4 DNA Quick-Ligase	New England Biolabs
Thrombin	GE Healthcare

4.1.6 Vektoren

Alle Klonierungsansätze wurden zwecks Sequenzierung zunächst in den Vektor pJET1.2/blunt (Fermentas) ligiert. Zur homologen Expression von Proteinen in *T. thermophila* wurde der Vektor pTtagGFP (El-Haddad et al. 2013) verwendet und für die homologe Expression in *T. vaginalis* und *T. gallinarum* der Vektor pTagvag2 (Hrdy et al. 2004). Für die induzierte Überexpression in *E. coli* BL21 Zellen wurden die Vektoren pET21a und PGEX-4T-2 verwendet.

4.1.7 Reagenzsätze

CloneJet PCR cloning Kit	Thermo Scientific
DNase I (RNase-free)	Fermentas
DNAzol®	Invitrogen
Membrane Lipid Strips™	Echelon Biosciences Inc.
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel, Thermo Scientific
NucleoSpin Plamid	Macherey-Nagel, Thermo Scientific
Qubit Quant-iT dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen
Qubit Quant-iT Protein Assay Kit	Invitrogen
Quick Ligation Kit	New England Biolabs
WesternBright ECL Spray	Advansta

4.1.8 Säulen

GSTrap FF	5 ml	GE Healthcare
HiTrap Protein G HP	1 ml	GE Healthcare

4.1.9 Geräte

Äkta Frac F-920	GE Healthcare
Äkta Monitor UPC-900	GE Healthcare
Äkta Pump P-920	GE Healthcare
Autoklav	Fedegari
Biofuge Fresco	Heraeus

Biolistic® PDS-1000/HE	Bio-Rad
Brutschrank	Heraeus
Cell Disrupter One-Shot	Constant Systems Ltd
Eismaschine	Ziegra
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf
Feinwaage BP61	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop Eclipse Ti	Nikon
Gelkammer für SDS-Gele	Bio-Rad
GENESYS™ 10S UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Scientific
Heizblock HBT 130	HLC
Konfokalmikroskop LSM 710	Zeiss
Lichtmikroskop Dialux 20 EB	Leitz
Magnetrührer IKA-Werk	IKA MAG RCT
Mastercycler Gradient	Heraeus
Mikroliterpipetten	Gilson
Mikrowelle Quick Cookman	Daewoo
Mini-Protean® Tetra System	Bio-Rad
pH-Meter	Schott
Power Pac 300, 3000	Bio-Rad
Qubit® 2.0 Fluorometer	Invitrogen
Schüttelinkubator	GFL
Sonifikator Sonoplus HD 60	Bandelin
Sterilbank	Heraeus
Taumelschüttler 3D	Peqlab
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Trans-Blot® Turbo Transfer-System	Bio-Rad
Universal Hood III, ChemiDoc	Bio-Rad
Vortexer	Heidolph
Waage ISO 9001	Sartorius
Wasserbad	GFL
Zentrifuge RC 5B Plus	Sorvall

4.1.10 Kulturen

Escherichia coli

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen wurden *Escherichia coli* XL1-Blue-MRF'-Zellen (Stratagene) verwendet. Alle heterologen Überexpressionen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit *Escherichia coli* BL21-Zellen durchgeführt.

Tetrahymena thermophila

Die *Tetrahymena thermophila* Zellkultur Cu522 wurde über das National *Tetrahymena* Stock Center (<https://tetrahymena.vet.cornell.edu/>) der Cornell Universität in Ithaca, New York (USA) bezogen.

Trichomonas vaginalis

Der *Trichomonas vaginalis* FMV1 Stamm (Jesus et al. 2004) wurde von M. Benchimol (Santa Ursula Universität, Rio de Janeiro, Brasilien) zur Verfügung gestellt.

Tetratrichomonas gallinarum

Der *Tetratrichomonas gallinarum* M3 Stamm wurde von J. Tachezy (Karls-Universität, Prag, Tschechien) zur Verfügung gestellt.

4.2 Methoden

4.2.1 Kultivierung von Organismen

Anzucht von *Tetrahymena thermophila*

Alle *Tetrahymena thermophila* Kulturen wurden als Langzeitkultur in 50 ml SPP-Medium nach Gorovsky et al. (1975) (1% (w/v) Proteose Pepton, 0,2% (w/v) Glucose, 0,1% (w/v) Hefe-Extrakt, 0,003% (w/v) Fe-EDTA) in 250 ml Erlenmeyerkolben bei 15 °C kultiviert. Alle zwei Wochen wurden 100 µl der dicht gewachsenen Kultur zum Inokulieren von frischen Medien genutzt. Für durchzuführende Experimente wurden SPP-Medien mit der Langzeitkultur inokuliert und bei 30 °C über Nacht kultiviert. Kontaminationen wurden durch die Hinzugabe von 1% (v/v) einer Antibiotikum-Antimykotikum-Lösung verhindert.

Dauerkulturen von T. thermophila

Das Anlegen von Dauerkulturen dient der Sicherung der im Labor genutzten Zelllinien und der positiv transfizierten Klone über mehrere Jahre. Die Dauerkulturen wurden nach dem Protokoll von Cassidy-Hanley et al. (1995) angelegt. Zunächst wurden 25 ml Neff-Medium (0,25% (w/v) Proteose Pepton, 0,25% (w/v) Hefe-Extrakt, 0,55% (w/v) Glucose, 33 μM FeCl_3 und 1% (v/v) Anti-Anti) mit der entsprechenden Kultur inokuliert und über Nacht bei 30 °C in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden 2×10^5 Zellen bei 1100xg zentrifugiert, anschließend mit 25 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert und danach für 72 h bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und das Pellet wurde in 250 μl Neff-Medium resuspendiert. Die Hinzugabe von 1 ml einer 10 mM Tris-HCl-Lösung (pH 7,5) mit 10% des Gefrierschutzmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) diente der Minimierung der Bildung von Eiskristallen. Die Zellsuspension wurde dann zu 300 μl in 2 ml Kryo-Röhrchen aliquotiert. Die Kryo-Röhrchen wurden in einen Kryo-Behälter der Firma Nalgene übertragen und bei -80 °C für 24 h gelagert. Der Behälter sichert durch seine spezifische Konstruktion eine langsame Abkühlung der Kryo-Röhrchen von einem Grad pro Minute. Nach 24 h wurden die Proben in einen Kryo-Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt, in dem die Proben unter Normaldruck bei -196 °C bis zum Wiederauftauen gelagert wurden. Zum Auftauen der Zellen zwecks weiterer Kultivierung wurden diese zunächst aus dem flüssigen Stickstoff in ein Wasserbad mit 37 °C für 15 sec transferiert. Anschließend wurde 1 ml 30 °C warmes SPP-Medium zu den Zellen hinzugefügt und daraufhin die Zellen bei 37 °C in einem Wasserbad für 45 sec inkubiert. Zuletzt wurde der Inhalt des Kryo-Röhrchens zu 5 ml aufgewärmtem, 30 °C warmem SPP-Medium hinzugegeben und bei 30 °C für zunächst 30 min inkubiert. Konnten anschließend unter dem Mikroskop vitale Zellen beobachtet werden, wurde die Kultur über Nacht bei 30 °C inkubiert.

Anzucht von Trichomonas vaginalis und Tetratrichomonas gallinarum

Trichomonas vaginalis und *Tetratrichomonas gallinarum* wurden in 12 ml TYM-Medium (Clark und Diamond 2002; Diamond 1957) (2,22% (w/v) Tryptose; 1,11% (w/v) Hefeextrakt; 15 mM Maltose; 9,16 mM L-Cystein; 1,25 mM L(+)-Ascorbinsäure, 0,77 mM KH_2PO_4 ; 3,86 mM K_2HPO_4 ; 10% (v/v) Pferdeserum;

0,71% (v/v) Eisenlösung bestehend aus 1% (w/v) $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \times 6\text{H}_2\text{O}$ und 0,1% (w/v) 5-Sulfosalicylsäure) mit pH 6,2 beziehungsweise 7,2 in 15 ml Reaktionsgefäßen mit Schraubverschluss bei 37 °C anaerob kultiviert. Jeden zweiten Tag wurden 120 µl der dicht gewachsenen Kultur zur Inokulation von 12 ml frischem TYM Medium genutzt. Zur Vermeidung von möglichen bakteriellen Kontaminationen wurde dem Medium ein Penicillin-Streptomycin-Mix mit einer Endkonzentration von 100 U/ml hinzugefügt. Zur Selektion nach der Transfektion wurde zusätzlich die Selektionsdroge G418 (100 µg/ml) hinzugefügt.

4.2.2 Isolierung genomischer DNA

Isolierung genomischer DNA aus Trichomonas vaginalis

Für die Isolation genomischer DNA aus *Trichomonas vaginalis* wurde die auf Guandinie basierende Reagenz DNAzol® verwendet, welche die selektive Fällung von DNA aus Zelllysate ermöglicht. Pro Isolierung wurden 50 ml Kultur verwendet, welche am Vortag inokuliert wurden. Die Kultur wurde bei 1.500×g zentrifugiert und anschließend mit PBS (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 1,8 mM KH_2PO_4) gewaschen. Anschließend erfolgte die Durchführung nach Herstellerangaben. Nach der Präzipitation der DNA wurde diese in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit Ethanol gewaschen und pelletiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0 und 1 mM EDTA pH 8,0) über Nacht gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Qubit® Fluorometer. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Isolierung genomischer DNA aus Tetrahymena thermophila

Zwecks Isolierung genomischer DNA aus *Tetrahymena thermophila* wurde am Tag zuvor eine Übernachtskultur mit einem Volumen von 10 ml inokuliert. Am Tag der Isolation wurde die Kultur mit einer Zelldichte von ca. 2×10^5 Zellen pro ml zunächst bei 1100×g zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 1,8 mM KH_2PO_4) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte nach dem Protokoll des MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit. Nach erfolgreichem Aufschluss der Zellen und der

Extraktion von Zelltrümmern, RNA und Polysaccharide, wurde die präzipitierte DNA in ein saubereres Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C 10 min zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70%igem (v/v) Ethanol wurde die DNA erneut zentrifugiert und das Pellet 10 min luftgetrocknet. Die DNA wurde vorsichtig in 35 µl TE-Puffer (10mM Tris-HCl pH 8,0 und 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Konzentrationsbestimmung mit dem Qubit® Fluorometer durchgeführt und die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.2.3 Markierung von Genen

Markierung von T. thermophila-Genen

Für Fusionskonstrukte mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) wurde das Plasmid pTtag (GenBank FJ89658) verwendet, welches auf einem GFP-markierenden Plasmid basiert (Shang et al. 2002) und von El-Haddad (2013) modifiziert wurde. pTtag besitzt einen CdCl₂-induzierbaren metallothionein (MTT1) Promotor, welcher zur makronukleären Transfektion von *Tetrahymena thermophila* Cu522 Zellen genutzt wurde. Die *Tetrahymena* Cu522 Zellkultur weist eine Mutation des β-Tubulin exprimierenden Gens *btu1* auf, die zu einer Substitution von Lysin durch Methionin an der Aminosäureposition 350 führt. Da β-Tubulin neben *btu1* auch durch das Gen *btu2* exprimiert wird, beeinträchtigt die Substitution nicht den Phänotyp der Cu522 Zellen. Des Weiteren führt der Aminosäureaustausch zu einer erhöhten Resistenz gegen Oryzalin und zu einer verminderten Resistenz gegen Paclitaxel, das Selektionsdroge nach der Transfektion genutzt wird (Gaertig et al. 1994).

4.2.4 Transfektion von Protisten

Transfektion von Trichomonas und Tetratrichomonas

Die Transfektion von *T. vaginalis* beziehungsweise *T. galinarum* erfolgte mit Hilfe der Elektroporation, welche durch Induktion eines elektrischen Feldes die Zellmembran permeabilisiert und so die Integration von DNA in die Zelle ermöglicht (Delgadillo et al. 1997; Land et al. 2004).

Für die Transfektion von *Trichomonas* und *Tetratrichomonas* wurden am Tag vor der Transfektion 45 ml TYM-Medium mit 5 ml Vorkultur inokuliert. Diese 50 ml Kultur wurde bei 1.500×g und 4 °C zentrifugiert und die pelletierten Zellen wurden in 1,5 ml kaltem TYM-Medium pro Gramm Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend durch eine 23G-Nadel mit einer 1,5 ml-Spritze auf- und abgezogen. Die dabei wirkenden Scherkräfte verhindern die Akkumulation von Zellen und dienen der Anrauhung der Membran des Parasiten. 300 µl Zellsuspension mit ca. $2,5 \times 10^8$ Zellen wurden zunächst in eine eiskalte Elektroporationsküvette pipettiert, anschließend erfolgte die Hinzugabe von 50 µl Plasmid. Die Elektroporation wurde mit einem Puls von 350 V und 960 µF durchgeführt. Im Anschluss wurde die Küvette 10 min auf Eis inkubiert und die Zellen wurden in 12 ml TYM-Medium mit einem Penicillin-Streptomycin-Mix (100 U/ml; 100 µg/ml) bei 37 °C inkubiert. Nach 4 h erfolgte die Hinzugabe der Selektionsdroge G418 (100 µg/ml). Nach zweitägiger Inkubation bei 37 °C wurde die transfizierte Kultur zunächst in ein neues Reaktionsgefäß dekantiert, um tote Zellen zu verwerfen. Anschließend wurde die Kultur bei 1.500×g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in TYM-Medium mit Penicillin-Streptomycin-Mix und G418 resuspendiert. Der Transfektionserfolg wurde durch Western Blot nachgewiesen.

Transfektion von T. thermophila

Bei dem Verfahren der biolistischen Transfektion werden mit DNA beschichtete Mikropartikel auf hohe Geschwindigkeit beschleunigt, um sie anschließend in Zellen zu katapultieren (O'Brien und Lummis 2006). Die Transfektion von *Tetrahymena* basiert auf den Protokollen nach Cassidy-Hanley et al. (1997). Der erste Schritt der Transfektion dient der Herstellung von Mikropartikeln, bestehend aus Gold-Partikeln mit einem Durchmesser von 0,6 µm, welche zunächst mit DNA beschichtet werden.

Pro Transfektion mit der Biolistic Gun wurden 60 mg Gold verwendet, die in 100 μ l 50%igen Glycerol vorlagen. Nach der Hinzugabe von 20 μ g linearisierter DNA und anschließendem Mischen per Vortexer, wurden 125 μ l CaCl_2 hinzugeben und erneut gemischt. Zum Schluss wurden noch 65 μ l 0,1 M Spermidin zum Transfektionsansatz hinzugefügt, welcher daraufhin 10 min bei 4 °C gemischt wurde. Anschließend wurde die Suspension bei 3.500 rpm puls-zentrifugiert, um die Mikropartikel zu pelletieren und anschließend mit 70%igem Ethanol zu waschen. Der Schritt wurde mit 100%igem Ethanol wiederholt. Nach erneutem Puls-Zentrifugieren wurden die Mikropartikel in 15 μ l 100%igem Ethanol aufgenommen und 10 sec in einem Ultraschallbad resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend auf Macrocarrier aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet. Pro Transfektion wurden jeweils $2,5 \times 10^5$ *Tetrahymena* Zellen eingesetzt, welche zuvor 24 h in einem Hungermedium (10 mM Tris-HCl pH 7,5) kultiviert wurden. Die Zellen wurden bei 1.100xg pelletiert und in 500 μ l Hungermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf Filterpapier gegeben, das zuvor mit 1 ml Hungermedium äquilibriert wurde. Sobald die Mikropartikel getrocknet waren, wurde die Biolistic Gun gemäß Hersteller assembliert: Rupture Disk, Macrocarrier und Macrocarrier Holder sowie die Zellen auf dem Filterpapier wurden in die Kammer der Biolistic Gun geschoben. Die Kammer wurde verschlossen und ein Vakuum von 27 psi wurde erzeugt. Sobald dieses erreicht war, wurde durch die Rupture Disk ein 900 psi starker Druck aufgebaut. Als der von der Rupture Disk definierte Druck erreicht war, platze diese und die Mikropartikel wurden auf das Filterpapier mit den Zellen geschossen. Das Filterpapier wurde anschließend in einen 150-ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml SPP und 500 AA gegeben und danach 2 h bei 30 °C inkubiert. Nach 2 h erfolgte die Hinzugabe der Selektionsdroge Paclitaxel und das Ausplattieren der Zellen in 96-Well Platten mit jeweils 100 μ l pro Well. Der Transfektionserfolg wurde nach dreitägiger Inkubation der Zellen bei 30 °C mit Hilfe eines Lichtmikroskops überprüft. Lebende Klone wurden in 24-Well Platten übertragen und für 10 Tage mit AA und Paclitaxel mit einer Endkonzentration von 30 μ M selektiert. Anschließend erfolgte die Überprüfung per Western Blot und Immunofluoreszenz Assay.

4.2.5 Proteomische Methoden

4.2.5.1 Protein-Isolierung aus *T. thermophila*

Für die Protein-Isolierung aus *Tetrahymena thermophila* wurden am Vortag der Isolation 10 ml SPP-Medium mit der entsprechenden Kultur inokuliert und über Nacht bei 30 °C auf eine Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml kultiviert. Die frische Kultur wurde bei $1.100 \times g$ pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 10 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert. Die pelletierte Kultur wurde dann mit 1 ml eiskaltem Lysis-Puffer (0,3 M NaCl, 1% CHAPS (w/v) in PBS) und zusätzlichen 15 μ l Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich) resuspendiert. Die zu isolierenden Proben wurden auf Eis gelagert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mithilfe von Ultraschall. Jede Probe wurde mit einem 10 sec andauernden Impuls sechs Mal behandelt, wobei die Probe zwischen jedem Impuls 10 sec auf Eis verweilte, um eine Degradation der temperatursensitiven Proteine durch Hitze zu unterbinden. Nach dem Ultraschallaufschluss wurden die Proben mit $13.000 \times g$ 30 min lang bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet, bestehend aus Zelltrümmern, wurde verworfen, der Überstand abgenommen und für die Aufbewahrung bei -20 °C in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt.

4.2.5.2 Überexpression von Proteinen in *Escherichia coli* BL21-Zellen

Escherichia coli BL21 Zellen wurden mit dem zu exprimierenden Plasmid in 5 ml LB-Medium mit 5 μ l Ampicillin über Nacht kultiviert. Die Übernachtskultur wurde zur Inokulation einer Überexpressionskultur von 500 ml TB-Medium (Tartof und Hobb 1987) mit 500 μ l Ampicillin genutzt, welche bei 37 °C und 260 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,4 bis 0,6 inkubiert wurde. Daraufhin erfolgte die Induzierung der Kultur mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) mit einer Endkonzentration von 500 μ M und die Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur. Die dicht gewachsene Kultur wurde am nächsten Tag bei $5.000 \times g$ pelletiert, zwei Mal mit PBS gewaschen, mit Stickstoff gefroren und im Anschluss bei -80 °C gelagert.

4.2.5.4 Zellaufschluss der Expressionskulturen

Für den Zellaufschluss zwecks Isolation von GST-markierten Proteinen wurden jeweils 5 g Expressionskultur verwendet, die zuvor pelletiert und bei -80 °C gelagert wurde. Das gefrorene Pellet wurde durch Klopfen des Reagenzgefäßes auf der Arbeitsplatte gelöst und in einen Potter-Elvehjem-Homogenisator überführt. Anschließend wurden 40 ml des Puffers hinzugefügt, welcher auch später als Äquilibrationpuffer für die jeweilige Säule fungierte. Um Degradierung durch Protease und Wärme zu vermeiden wurde zusätzlich eine Tablette eines Protease-Inhibitor-Cocktails (cOmplete, EDTA-free; Roche) hinzugefügt, und die Homogenisierung auf Eis durchgeführt. Sobald die Expressionskultur homogen vorlag, wurde diese in das vorher auf 5 °C gekühlte, kontinuierliche Zellaufschlusssystem (Multi Shot Model Cell Disruptor, Constant Systems) überführt. Die Zellen wurden per Hochdruckverfahren mit 1,35 kBar aufgeschlossen und das resultierende Gesamtzelllysate wurde in einer 100 ml Laborglasflasche (Schott Duran) auf Eis gesammelt. Anschließend wurde das Gesamtzelllysate mit 47.800×g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen gekühlten Messzylinder überführt und das Pellet wurde verworfen.

4.2.5.3 Bestimmung von Konzentrationen

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA sowie von Proteinen wurden das Qubit® dsDNA BR (broad range) beziehungsweise das Qubit® Protein Assay Kit genutzt. Die Kits beinhalten fluoreszierende Farbstoffe, welche spezifisch für DNA beziehungsweise Proteine sind und erst emittieren, wenn diese an die entsprechenden Zielmoleküle gebunden haben. Für die Konzentrationsbestimmung des isolierten Proteins MRNO51 wurde zunächst der Extinktionskoeffizient ϵ des in Lösung vorliegenden Proteins anhand der Aminosäuresequenz (<http://web.expasy.org/protparam>) (Wilkins et al. 1999) berechnet. Anschließend wurden 1 μ l der Proteinlösung im Verhältnis 1:100 verdünnt und in eine Küvette mit der Schichtdicke d pipettiert. Die Absorption der Lösung wurde bei 280 nm photometrisch gemessen und die Konzentration c der Lösung wurde anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes ($E=c*d*\epsilon$) berechnet.

4.2.5.5 Liposomen-binde Test

Soja Bohnen Phospholipide wurden zu einer Endkonzentration von 3 mg/ml in Puffer A (50 mM Hepes, pH 7,2; 100 mM NaCl; 0,5 mM EDTA) aufgenommen und bei 37 °C für 2 h unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Lipid-Puffer-Emulsion im Ultraschallbad sonifiziert bis sich homogene Liposomen geformt hatten. Durch Zentrifugation von 10 min bei 16.000×g wurden die Liposomen pelletiert und mit Puffer B (20 mM Hepes, pH 7,2; 100 mM NaCl, 1 mM EGTA) resuspendiert. Danach wurden 50 µl Liposomen mit 5 µg des zu untersuchenden, GST-markierten Proteins bei 22 °C für 1 h inkubiert. Durch eine darauffolgende 30-minütige Zentrifugation mit 16.000×g wurden die Liposomen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde im gleichen Volumen wie der Überstand mit Puffer resuspendiert. Im Anschluss erfolgte eine elektrophoretische Trennung der Proteine (SDS-PAGE) der einzelnen Proben mit anschließendem Western Blot sowie die Immundetektion der GST-markierten Proben.

4.2.5.6 Lipid Overlay Assay

Der Lipid Overlay Assay dient zur Bestimmung von spezifischen Interaktionen des zu untersuchenden Proteins mit verschiedenen Lipiden. Für die Untersuchung wurden 2 x 6 cm große, hydrophobe Membran-Lipid-Streifen (Echelon Biosciences Inc.) verwendet, die mit 100 pmol von fünfzehn verschiedenen Zellmembranlipiden gepunktet sind. Die Membranen wurden zunächst in PBS mit 3% (w/v) fettsäure-freien Bovines Serumalbumin (BSA) für 1 h bei Raumtemperatur mit leichtem Schütteln inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Das zu untersuchende Protein wurde in PBS mit 3% BSA auf die gewünschte Konzentration verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln der Membran hinzugefügt. Anschließend wurde die Membran drei Mal mit PBS-T (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄ und 0,1% (v/v) Tween 20) für jeweils 10 min gewaschen. Lipid-gebundenes Protein, welches mit GST markiert ist, wurde im Rahmen einer Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern gegen den Fusions-Tag nachgewiesen.

4.2.5.7 Elektrophoretische Trennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Zur Analyse der Größe von Proteinen wurden diese in einem elektrischen Feld mit Hilfe der *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) in einem diskontinuierlichen System nach Ornstein und Davis, zwecks hoher Bandenschärfe aufgetrennt (Knudsen et al. 1970). Die Diskontinuität besteht aufgrund unterschiedlicher pH-Werte der verwendeten Gel- und Laufpuffer sowie der unterschiedlichen Porengröße von Sammel- und Trenngel. Die für die Elektrophorese angewendeten 12%igen Polyacrylamidgele wurden nach Standard Protokollen (Sambrook et al. 1989) gegossen. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Aufragen mit 1/5 ihres Volumens mit 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 bei 95 °C 10 min zwecks Denaturierung behandelt. β -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken, die SDS-Detergenz löst zudem Wasserstoffbrücken und hebt hydrophobe Interaktionen auf beziehungsweise verleiht dem Protein eine negative Ladung, sodass die Trennung nach Größe erfolgt. Zur besseren Auftragung der Probe dient Bromphenolblau als Färbung, während das Glycerin die Dichte der Probe erhöht. Zusätzlich wurden zur Größenbestimmung der Proteine 5 μ l des Proteinmarkers PageRuler™ Plus Prestained #26619 (Thermo Scientific) parallel aufgetragen.

4.2.5.8 Coomassie-Brillant-Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen

Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine in einem Polyacrylamidgel wurden diese mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau, welcher sich an die basischen Seitenketten von Proteinen anlagert, angefärbt (Heukeshoven und Dernick, 1988). Eine Coomassie-Brillant-Blau R-350 Stammlösung (60% (v/v), Methanol und 1 Tablette PhastGel Blue R-350 (GE Healthcare)) wurde bei Bedarf in einem Verhältnis von 1:10 mit einer 10%igen (v/v) Essigsäure verdünnt und anschließend im Wasserbad auf 90 °C erhitzt. Danach wurde das SDS-Polyacrylamidgel für 30 bis 60 min in der Färbelösung unter leichtem Schütteln (50 rpm) inkubiert. Unspezifische Färbung wurde durch die Inkubation des Polyacrylamidgels in destilliertem Wasser über Nacht unter leichtem Schütteln gelöst.

4.2.5.9 Western Blot

Der Western Blot transferiert durch eine elektrisch angelegte Spannung die vorher nach Größe im Polyacrylamidgel aufgetrennten, denaturierten Proteine auf eine Membran, typischerweise bestehend aus Nitrozellulose oder Polyvinylidenfluorid (PVDF) (Renart et al. 1979; Towbin et al. 1992). Für die Durchführung wurden sechs Lagen Whatman-Papier und ein Stück Nitrozellulosemembran (Hybond C Extra, GE Healthcare) durch Zurechtschneiden an die Größe des Gels angepasst. Daraufhin wurden die Whatman-Papiere in Transferpuffer beziehungsweise die Nitrozellulosemembran und das Polyacrylamidgel in destilliertem Wasser äquilibriert. Zunächst wurden drei Lagen des Whatman-Papieres übereinander auf die Anode gelegt, es folgte die Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel und drei weitere Lagen des Whatman-Papieres. Kontinuierliches Rollen über die verschiedenen Lagen, abgesehen von der Membran, diente der Vermeidung von Luftblasen. Nach dem Auflegen der Kathode wurde der Transfer im Trans Blot® Turbo™ Transfer-System (Bio-Rad) mit einer Laufzeit von 30 min bei 1 Ampere und 25 Volt durchgeführt. Der Erfolg des Protein-Transfers auf die Membran konnte anhand einer Färbung mit Ponceau S (0,5% (w/v) und 1% (v/v) Essigsäure) überprüft werden.

4.2.5.10 Immunodetektion

Die Immunodetektion wird genutzt um Proteine, welche zuvor auf Nitrozellulose- oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen per Western Blot transferiert wurden, mit Hilfe von Proteinen oder Tag-spezifischen Antikörpern zu identifizieren. Die Membran wird zunächst in dem Blocking-Puffer TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl und 0,1% (v/v) Tween 20) mit 5% (w/v) Magermilchpulver für 1 h bei Raumtemperatur bei 50 rpm geschüttelt, um die Bereiche der Membran zu sättigen, an die kein Protein transferiert wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation, entweder über Nacht bei 4 °C, oder bei Raumtemperatur für 1 h auf einem 3D-Schüttler mit dem Primär-Antikörper, der vorher nach dem vom Hersteller angegebenen Verhältnis in Blocking-Puffer gelöst wurde. Der Primär-Antikörper wurde in ein Reaktionsgefäß zurückgeführt und für den weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert. Die Membran wurde anschließend drei Mal für 10 min mit TBS-T gewaschen. Der Sekundär-Antikörper (ImmunoPure Ziege Anti-Maus IgG, Peroxidase Konjugat

beziehungsweise ImmunoPure Ziege Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase Konjugat) wurde in einem Verhältnis von 1:10.000 in Blocking-Puffer gelöst und für 1 h bei Raumtemperatur zu der Membran hinzugeben. Es folgten drei Waschschrte von jeweils 10 min mit TBS-T. Die Membran wurde anschließend mit dem Chemilumineszenz Peroxidase Substrat WesternBright™ ECL-Spray (Advansta) besprüht, wobei der Peroxidase konjugierte Sekundär-Antikörper die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid katalysierte. Die dabei emittierte Chemilumineszenz wurde mithilfe der Software Imagelab in Verbindung eines Chemidocs (Universal-Hood III, Bio-Rad) aufgezeichnet.

4.2.5.11 Pufferwechsel und Konzentration von Proteinen

Der Pufferwechsel sowie die Konzentration von Proteinen für Lipid Tests, Immunisierung sowie Strukturanalysen wurde mit Vivaspin-Konzentratoren mit einem Fassungsvermögen von 15 ml und einer Ausschlussgrenze von 10 kDa (Sartorius AG, Göttingen) durchgeführt. Die Konzentratoren besitzen eine Membran durch die der zu entfernende Puffer zentrifugiert wird. Das Protein von Interesse, hier GST::MRNO51 beziehungsweise MRNO51, wird in einem Restvolumen zurückgehalten. Anschließend wird der Konzentrator auf 15 ml mit dem zu wechselnden Puffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Laut Herstellerangaben wird durch das dreimalige Auffüllen und anschließendes zentrifugieren der Puffer ersetzt. Die Zentrifugationsschritte beziehungsweise das Waschen wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Proteine im neuen Puffer wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

4.2.5.12 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie nutzt die spezifische Bindung von Antikörpern zu ihrem Antigen, um fluoreszierende Farbstoffe an Epitope von Proteinen innerhalb einer Zelle zu richten. Durch die Kopplung der sekundären Antikörper mit Fluoreszenz-Farbstoffen, welche bei spezifischer Anregung mit einem Laser eine bestimmte Wellenlängen emittieren, wird die Visualisierung der Lokalisation des Zielmoleküls in der Probe ermöglicht.

Aus einer Übernachtskultur von *Tetrahymena* wurden 1,5 ml von in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Zellen mit einer Zellzahl von 10^6 in ein 1,5 ml großes Reaktionsgefäß überführt und mit CdCl_2 ($2,5 \mu\text{g/ml}$) für 45 min bei 30°C induziert. Danach wurden die Zellen mit $1.100\times\text{g}$ zentrifugiert und mit 10 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen. Das Zellpellet wurde in PHEM-Puffer (60 mM PIPES; 25 mM HEPES; 10 mM EGTA und 2 mM MgCl_2 , pH 6,9) (Schliwa und van Blerkom, 1981) resuspendiert. Die anschließende Präparation der Proben erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Gaertig und Fleury (1992). Die Zellen wurden durch die Hinzugabe von 4%igem PFA 10 min bei Raumtemperatur auf einem Rotor mit ständiger Bewegung (MACSMixTM Tube Rotator) fixiert. Daraufhin wurden die Zellen bei $500\times\text{g}$ zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit PHEM mit 0,1% (v/v) Triton-x 100 und 0,1 M Glycin 5 min bei Raumtemperatur rotierend zur Permeabilisierung der Zellmembran inkubiert, sodass die Antikörper an ihre spezifische Epitope in der Zelle binden konnten. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu reduzieren, wurden die Zellen erneut zentrifugiert und zur Sättigung für 1 h mit einem Blocking-Puffer (PBS mit 1% (w/v) BSA) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit den primären Antikörpern, die zuvor in PBS mit 0,1% (w/v) BSA in bestimmten Konzentrationen verdünnt wurden (α -GFP 1:100, α -Tub 1:100, α -MRNO51 1:10), 1 h bei Raumtemperatur oder optional über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden drei Waschrunde mit PBS mit 0,05% (v/v) Triton x-100 durchgeführt. Die Fluorophore gekoppelten Sekundär-Antikörper (Alexa fluor 488, anti Kaninchen, IgG 1:1.000; Alexa fluor 595, anti Maus, IgG 1:1.000, Alexa fluor 633, anti Ratte, IgG 1:1.000) wurden für 1 h bei Raumtemperatur mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut drei Mal mit PBS mit 0,05% (v/v) Triton-x-100 gewaschen. Von den fixierten Zellen wurden unterschiedliche Verdünnungen mit PBS angesetzt, von denen jeweils $10 \mu\text{l}$ auf eine Fläche entsprechend der Größe eines Deckgläschens auf den Objektträger gegeben wurden. Die Hinzugabe von $10 \mu\text{l}$ Vectashield Mounting Medium mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Vecta Labs Inc.) diente erstens der Markierung von DNA und zweitens der Fluoreszenzerhaltung. Abschließend wurden die Proben mit einem Deckgläschen, das mit Glycerol-Gelatine (Sigma-Aldrich) umrandet wurde, versiegelt. Die Proben wurden vertikal in entsprechenden Boxen im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die mikroskopischen Aufnahmen der Proben erfolgten am Nikon Eclipse Ti

oder am LSM 710 (Zeiss) am Institut für Stoffwechselphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

4.2.6 Klonierungsarbeiten

4.2.6.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Die im Rahmen der Klonierungsarbeiten verwendeten Flüssig- als auch Festmedien wurden nach Standardprotokollen von Sambrook et al. (1989) angefertigt. Zur Selektion bei Transformation oder Anzucht von positiven Klonen wurden die jeweiligen Medien mit entsprechenden Antibiotika versehen.

4.2.6.2 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen von Matrizen unter der Verwendung spezifischer Oligonukleotide (engl. *primer*) und dem Enzym DNA-Polymerase (Mullis et al. 1992). Für die Amplifikation von Sequenzen zur Klonierung wurde die Phusion® Polymerase (Biolabs) verwendet, die eine Korrekturlese-Funktion (engl. *proof-reading*) besitzt. Durch diese Funktion werden falsch verknüpfte Nukleotide erkannt und korrigiert. Die Reaktionsansätze, welche DNA, Oligonukleotide, dNTPs, Puffer und Polymerase enthalten sowie das PCR-Programm für PCR-Thermocycler, wurden gemäß des Herstellerprotokolls angesetzt beziehungsweise durchgeführt. Die Überprüfung der PCR erfolgte per Gel-Elektrophorese. Hierfür wurden die Proben mit dem entsprechenden Volumen an 10-fachem Ladepuffer (0,4% (w/v) Bromphenolblau; 0,4% (w/v) Xylencyanol; 1 mM EDTA, pH 8,0; 20% (v/v) Ficoll) versetzt und auf einem 1%igen (w/v) Agarose-Gel mit 0,3 µl/ml Ethidiumbromid aufgetragen. Anschließend wurden die Proben durch Anlegen einer Spannung elektrophoretisch getrennt (Sambrook et al, 1989). Das mit DNA interkalierende Ethidiumbromid wurde mit der Bestrahlung von UV-Licht sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

4.2.6.3 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Elution von DNA-Fragmenten wurde das QIAquick® MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH) verwendet. Das Kit basiert auf einer Binde-Wasch-Prozedur und nutzt QIAquick® Säulen mit einer Silikamembran, welche die Bindung von DNA durch Herstellung eines sauren pH-Werts mittels eines Hochsalzpuffer ermöglichen. Die Elution geschieht mittels eines Puffers mit geringem Salzgehalt, wie zum Beispiel destilliertem Wasser. Dadurch werden Verunreinigungen wie Enzyme, Salz und Agarose beseitigt und die konzentrierte DNA kann für eine Vielzahl von nachfolgenden Anwendungen genutzt werden.

4.2.6.4 Klonierung von PCR-Produkten in den pJet1.2 Vektor

Das CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher) ist ein Selektionssystem für die Klonierung von PCR-Produkten, die mit einer DNA-Polymerase mit Korrekturlese-Funktion erzeugt wurden. Ligierte Produkte können vervielfältigt beziehungsweise per Sequenzierung überprüft werden. Die Ligation wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Für die Transformation wurden von dem Ligationsansatz 5 µl zu 100 µl ultrakompetente *Escherichia coli* Zellen (XL1-Blue) hinzugegeben und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Bakterienkolonien wurden zur Inokulation von 5 ml LB-Medium (1% (w/v) NaCl; 1% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt), welches zwecks Selektierung mit Ampicillin versetzt war, über Nacht bei 37 °C und 260 rpm inkubiert.

4.2.6.5 Plasmidpräparation, Sequenzierung und Klonierung in den Zielvektor

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels des NucleoSpin® Plasmid-Kits (Macherey-Nagel). Geerntete Bakterien wurden durch das Prinzip der alkalischen Lyse aufgeschlossen und deren DNA über Säulen mit einer Silikamembran isoliert. Die Hinzugabe von Hochsalzpuffer diente der Neutralisierung der Lyse und zur Herstellung der geeigneten Bedingungen für die Bindung der DNA an die Silikamembran. Aliquots der isolierten Plasmid-DNA wurden anschließend zwecks Sequenzierungen an Metabion MWG Operon (Ebersberg) weitergeleitet und

die Sequenzierungsergebnisse mit der Sequencer Software überprüft. Von positiven Klonen wurde das Amplifikat aus dem pJet1.2-Vektor restringiert (Inserts) und per Gelelution isoliert. Des Weiteren wurde der Zielvektor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen linearisiert. Die Ligation des Inserts erfolgte über Restriktionsschnittstellen, die vorher an die zu amplifizierende Sequenz angefügt wurden. Die Ligation von Insert in den Zielvektor wurde mit dem Quick Ligation™ Kit (NEB) und durch die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsansätze durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue-Zellen genutzt, welche anschließend auf LB-Platten ausplattiert wurden. Positive Klone wurden zur Inokulation von 5 ml LB-Medium genutzt, welche am Tag darauf zur Plasmid-Präparation genutzt wurden.

4.2.7 Isolation von Proteinen via FPLC

Die *fast protein liquid chromatography* (FPLC) ist eine Technik zur Analyse beziehungsweise Isolierung von Proteinen, die durch ein Zweipumpensystem angetrieben wird. Die Trennung der Proteine geschieht mittels Puffern, die zum Transport der Proteine dienen und mit Hilfe von Gel-Säulen, welche je nach Beschaffenheit des Säulenmaterials Proteine binden oder diese nach ihrer Größe trennen können. Alle Schritte werden durch die Messung der Absorption nach der Säule photometrisch verfolgt.

4.2.7.1 Isolierung von Fusionsproteinen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Fusionsprotein GST-MRNO51 über eine 5 ml fassende GSTrap Säule (GE Healthcare), die eine Bindung von Glutathion-S-transferase (GST) markierten Proteinen erlaubt, isoliert. Zunächst wurde die Säule mit ihrem fünffachen Volumen mit PBS äquilibriert. Anschließend wurden 40 ml Proteinlysate durch eine der Pumpen in das System geladen. Protein, welches nicht an die Säule gebunden hatte, wurde anschließend mit PBS von der Säule entfernt bis kein unspezifisches Protein mehr gemessen wurde. Das Fusionsprotein wurde mit einem glutathionreichen Puffer durch Übersättigung der Säule eluiert.

Um den GST-Tag von dem Zielprotein zu entfernen, wurde das Fusionsprotein mit

der Serinprotease Thrombin (50 U in 100 μ l PBS), welche spezifisch zwischen dem Tag und dem MORN-Protein restringiert, für 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Puffer der Proteinlösung mit dem restringierten Tag sowie dem MORN Protein wurde durch PBS ausgewechselt und anschließend auf 1 ml konzentriert (Kapitel 4.2.5.11). Das konzentrierte Proteinlysate wurde per Injektion auf die Säule geladen. Das Zielprotein wurde nicht gebunden und der GST-Tag wurde mit dem entsprechenden Puffer von der Säule eluiert.

4.2.7.2 Isolierung von Antikörpern

5 ml Blutserum der immunisierten Tiere wurde zunächst in 40 ml Äquilibrationpuffer (50 mM Na_3PO_4 ; pH 7,0) gewaschen und anschließend per Pumpe auf die zuvor äquilibrierte 1 ml IgG Säule (GE Healthcare) geladen. Verunreinigungen wurden durch den Äquilibrationpuffer von der Säule gewaschen bis kein unspezifisches Protein mehr gemessen wurde. Spezifisch gebundenes Protein wurde durch einen sauren Elutionspuffer (100 mM Glycine-HCl; pH 2,7) von der Säule gelöst und zur Neutralisierung in einem alkalischen Puffer (1 M Tris; pH 9) fraktioniert. Anschließend wurde der Puffer des isolierten Antikörpers gegen TBS (140 mM NaCl; 50 mM) gewechselt und mit 0,02% Azid und 4% Glycerin versetzt. Die Antikörper wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

4.2.8 Kristallisationsansätze

Microbatch Methode

Das Verfahren zur Kristallisation nach der Microbatch-Methode nach Chayen et al. (1990) dient als sog. Miniatur-Methode für erste Kristallisationsversuche einschließlich Screening, Optimierung und letztendlich der Ernte von Kristallen. Das Microbatch-Verfahren beruht auf dem Batch-Verfahren und beinhaltet die Kombination des Proteinlysats mit Fällmittel, Puffer und ggf. weiteren Zusätzen, wie zum Beispiel Lipiden. Alle eingesetzten Lösungen werden zu gleichen Volumina, typischerweise 1 μ l pro Well, in 72-Well Terasaki Platten pipettiert. Jedes Well wird anschließend mit Mineralöl abgedeckt, um die Evaporation des Reaktionsansatzes zu verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1 μ l Proteinlösung mit 1 μ l der Kristallisationslösungen (Fällmittel) von kommerziell erhältlichen Kits pro Well in einer

72-Well Terasaki Platte gemischt und vorsichtig mit Mineralöl überschichtet. Anschließend wurden die Platten bei 20 °C gelagert.

Lipidic Sponge Phase

Zur Herstellung einer artifiziellen Membran (Lipidic Sponge Phase) wurde zunächst Monoolein bei 37 °C unter ständigem Schütteln geschmolzen. Anschließend erfolgte die Hinzugabe von 1% (w/w) Lipid, wobei hier DAG verwendet wurde. 130 g PEG 400 wurden in 100 μ l 25 mM Tris-HCl pH 7.0 gelöst, daraufhin zu 100 mg der gelösten Monoolein/Lipid Emulsion hinzugegeben und über Nacht bei 37 °C unter ständiger Rotation inkubiert. Die Kristallisationsansätze wurden mit folgenden Volumina angesetzt: 1 μ L Lipidic Sponge Phase, 1 μ L Proteinlösung und 1 μ L Fällmittel.

4.2.9 Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung von Proteinen ist eine Methode zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur, die wiederum zum Verständnis der Funktion von Proteinen beitragen kann. Für die Strukturbestimmung wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Techniken verwendet: nämlich die Röntgen-Strukturanalyse und die magnetische Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).

Von den mehr als 100.000 makromolekularen Strukturen, die zur Zeit (Stand März 2015) in der Protein Data Bank (PDB) hinterlegt sind, wurden etwa 87% durch Kristallisation und anschließende Röntgenstrukturanalysen bestimmt. Des Weiteren wird die Bedeutung dieser Methode durch mit Nobelpreis ausgezeichneten Strukturaufklärungen wiedergespiegelt, einschließlich der von DNA (Watson und Crick 1953), Vitamin B12 (Hodgkin et al. 1957) und Ribosomen (Schluzen et al. 2000). Für die Röntgen-Strukturanalyse müssen die zu analysierenden Proteine in Kristallen vorliegen, welche im Rahmen dieser Arbeit durch das Microbatch Verfahren angesetzt wurden. Liegen Proteinkristalle in geeigneter Größe vor, können diese geerntet und anschließend in einer Röntgenanlage mit Röntgenstrahl zwecks Strukturanalyse punktuell bestrahlt werden. Die Tertiärstruktur des Proteins kann durch ein sog. Diffraktionsmuster, welches durch die Beugung der Röntgenstrahlen an den kristallinen Proteinen entsteht, bestimmt werden (Smyth und Martin 2000).

Die im Rahmen dieser Arbeit mit löslichen Proteinen durchgeführte NMR Spektroskopie basiert auf der sog. magnetischen Kernresonanz, die aus der Interaktion zwischen der Stärke eines magnetischen Dipols von Atomkernen der Probe in einem induzierten Magnetfeld und einem magnetischen Feld wechselnder Polung resultiert (Marion 2013). Die vielen Hundert bis mehreren Tausend NMR-Peaks im Chromatogramm werden anschließend sequenzspezifisch dem Protein zugeordnet. Außerdem dienen bioinformatische Programme zur strukturellen Interpretation der NMR-Daten und der Bewertung der resultierenden Molekülstrukturen (Wuthrich 2001).

4.2.10 Bioinformatische Methoden

Alle Sequenzen von Proteinen mit MORN-Domänen wurden von der InterPro Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Hunter et al. 2012) extrahiert und für weitere Analysen wie zur Vorhersage der Domänenarchitektur mit dem Simple Modular Architecture Research Tool (SMART, http://smart.embl-heidelberg.de/smart/change_mode.pl) (Letunic et al. 2006; Letunic et al. 2012) genutzt. Mit dem Programm phyloT (<http://phylot.biobyte.de/>, Biobyte solutions GmbH) wurden phylogenetische Stammbäume auf der Grundlage der NCBI-Taxonomie generiert. Anhand von taxonomischen Namen von Spezies innerhalb einer Familie mit den meisten MORN-Proteinen wurde ein Baum im gewählten Ausgabeformat erzeugt, welcher durch das online Programm Interactive Tree Of Life (<http://itol.embl.de/index.shtml>) (Letunic und Bork 2007; Letunic und Bork 2011) in einem Rundbaumlayout dargestellt wurde.

Trichomonas Vaginalis Sequenzen wurden von Trichdb (<http://trichdb.org/trichdb>) (Aurrecoechea et al. 2009) extrahiert und die Sequenzen aller *Tetrahymena thermophila* Gene wurden der *Tetrahymena* Genome Database (<http://ciliate.org>) (Stover et al. 2006) entnommen. Die entsprechenden Expressionsdaten der Gene wurden von der *Tetrahymena* Functional Genomics Database (TetraFGD, <http://tfgd.ihb.ac.cn/>) (Xiong et al. 2013) extrahiert. Das Programm Matlab (Mathworks) wurde mit den Funktionen pdist und linkage zur Generierung der Pearson Korrelation sowie zur Visualisierung der Analysen der Ko-Expression genutzt. Für die Analyse von Sequenzdaten wurden die Programme

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul und Lipman 1990; Altschul et al. 1997) (blast.ncbi.nlm.nih.gov) sowie Sequencher 5.1 (Gene Codes) verwendet. Für die Proteinstruktur und die Funktionsvorhersage wurden die Programme PSIPRED (Psi-blast based secondary structure prediction) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (McGuffin et al. 2000), sowie I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) (Zhang et. al 2015) genutzt, dessen Analyse auf bereits bekannten Proteinstrukturen basiert. Weitere Analysen zur sekundären Struktur wurden mit der HCA-Methode (hydrophobic cluster analysis) (<http://mobyli.rpbs.univ-paris-diderot.fr>) (Callebaut et al. 1997) durchgeführt. Die Bearbeitung von Bildern erfolgte mit ImageJ 1.49a (Collins 2007), Photoshop Elements 10 (Adobe) und die Illustration von Grafiken mit Illustrator CS4 (Adobe).

5. Ergebnisse

5.1 MORN-Proteine sind eine ubiquitär auftretende Protein-Familie

MORN-Proteine wurden schon in mehreren Organismen einschließlich Säugetieren, Pflanzen, Apicomplexa und Bakterien, identifiziert (Abb. 3). Um dennoch einen allgemeinen Eindruck über die Verteilung von MORN-Proteinen zu bekommen und zu evaluieren, ob gewisse Spezies expandierte MORN-Familien aufweisen, wurde zunächst ein Dendrogramm, basierend auf der NCBI-Taxonomy, generiert. Abbildung 5A zeigt das entsprechende Dendrogramm mit jeweils der Spezies, welche die meisten MORN-Proteine innerhalb einer biologischen Familie aufweist. Zudem zeigt das Dendrogramm, dass MORN-Proteine ubiquitär verteilt sind. Das heißt sie kommen in Bakterien, Archaeen und Eukaryonten, sprich in den drei von Woese et al. (1990) definierten Domänen der Lebewesen, vor und sind außerdem noch in Viren vorhanden. Unter den Chordatieren weist der *Homo sapiens*, gefolgt von Maus, Rhesusaffe (*M. Mulatta*) und Weißbüschelaffe (*C. jacchus*) die größte Diversität an MORNs auf. Weitere erwähnenswerte Spezies sind der Zebrafisch (*D. rerio*) sowie der Kugelfisch (*T. rubripes*), welche deutlich mehr MORN-Proteine codieren als ihre nächsten Verwandten. Bakterien exprimieren fast 40% der bekannten MORN-Proteine (Abb. 5B). Die Gram-positiven Firmicutes besitzen die größte Gesamtanzahl an MORN-Proteinen (Abb. 5B), wobei die meisten Spezies aber nicht mehr als 11 MORN-Proteine besitzen. Unter den Bakterien besitzt das Betaproteobacteria *Neisseria meningitidis* die meisten MORNs (28).

Im Allgemeinen zeigen die unizellularen Ciliaten unter den Eukaryonten die größte Diversität an MORN-Proteinen. Nichtsdestotrotz besitzen nicht alle Ciliaten eine stark expandierte MORN-Familie, so codieren die basalen Ciliaten wie *E. uhligi*, *O. trifallax* und *E. caudatum* jeweils nur ein MORN-Protein. Im Gegensatz dazu stehen *T. thermophila*, *I. multifilis*, welche weit über 130 MORNs besitzen, und *Paramecium tetraurelia*, welche mit 466 MORNs die Spezies mit den meisten Proteinen dieser Familie ist.

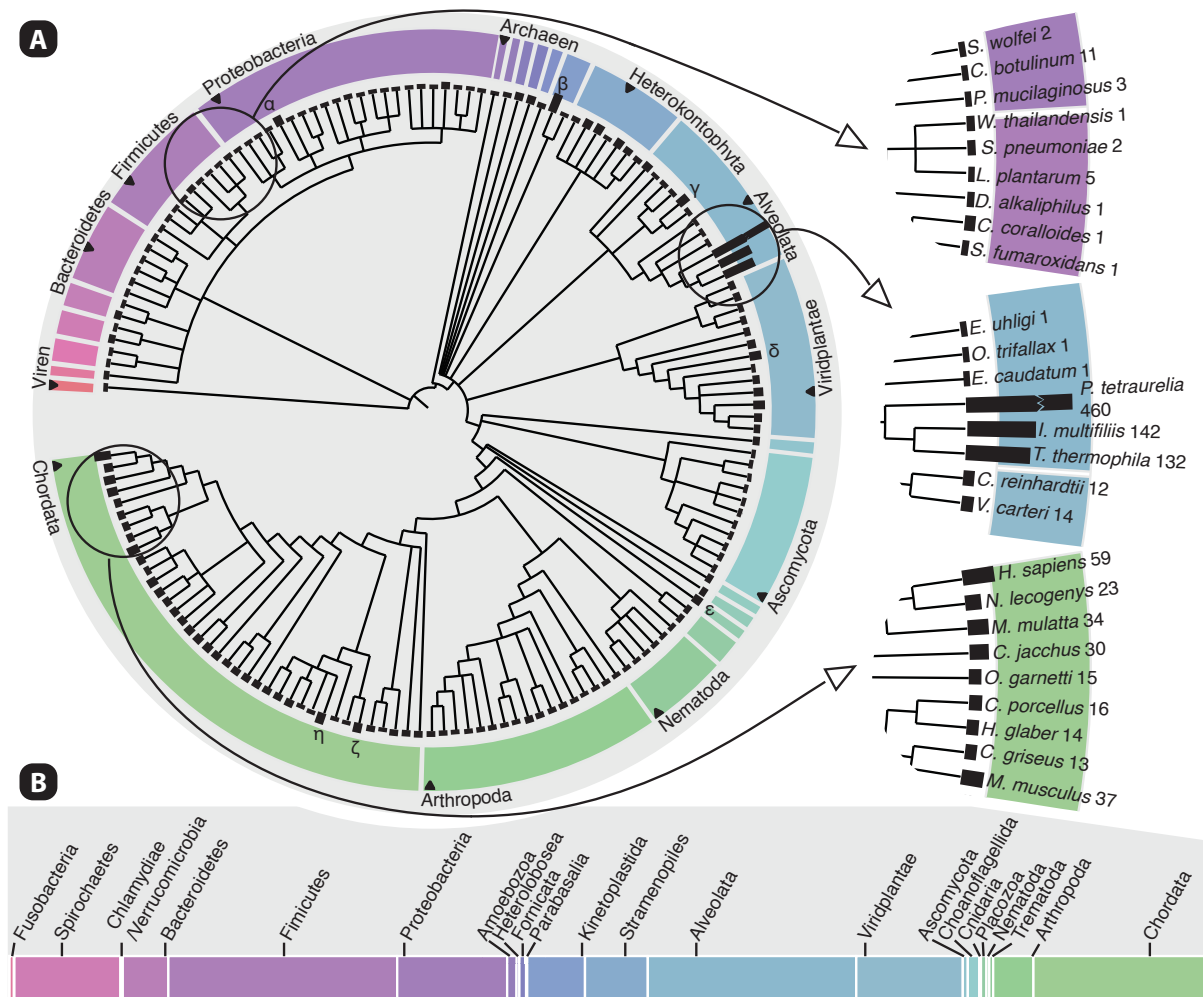


Abbildung 5: A) Phylogenetische Verteilung der MORN-Protein-Familie unter Bakterien, Archaea und Eukaryonten. Das Dendrogramm zeigt die Spezies mit den meisten MORN-Proteinen innerhalb einer Familie. Einige Spezies sind aufgrund ihrer relativ hohen Anzahl an MORN-Proteinen hervorgehoben: α) *Neisseria meningitidis* (28), β) *Trypanosoma cruzi* (70), γ) *Toxoplasma gondii* (36), δ) *Oryza sativa* (36), ε) *Nematostella vectensis* (25), ζ) *Danio rerio* (27), η) *Takifugu rubripes* (34). Rechts: Detaillierter Einblick in das Phylum Firmicutes und Proteobacteria, in die expandierte MORN-Familie der Ciliaten und den Stamm der Euarchontoglires. B) Verteilung aller MORN-Proteine in %, zusammengefasst in phylogenetischen Taxa.

Weitere Protisten mit größeren MORN-Familien im Vergleich zu ihren nächsten Verwandten sind die Parasiten *Trypanosoma cruzi* und *Toxoplasma gondii* mit 70 beziehungsweise 36 MORNs. Letzterer Parasit gehört zu den Apicomplexa, welche u. a. mit den Ciliaten das Superphylum Alveolata bildet. *Plasmodium falciparum*, ein anderer Apicomplexa Parasit, codiert nur 12 MORN-Proteine.

5.2 MORN Proteine von *Tetrahymena thermophila*

Das Genom des Ciliaten *Tetrahymena thermophila* codiert laut Interpro Database 132 verschiedene Proteine, welche mindestens 1 bis maximal 32 MORN-Motive aufweisen (Abb. 6C). Der Vergleich dieser Proteine zeigte, dass das 14 Aminosäuren

lange und stark konservierte MORN-Motiv in unterschiedlicher Anzahl und variierend innerhalb eines Proteins angeordnet sein kann. Im Allgemeinen kann zwischen MORN-Proteinen mit dem Motiv am Amino-Terminus, am Carboxy-Terminus, mit einer mittigen Anordnung oder einer Anordnung, welche sich über die gesamte Länge des Proteins streckt. Des Weiteren können MORN-Motive mit funktionellen Domänen, einschließlich Calmodulin-bindende Domänen, Zinkfingerdomänen,

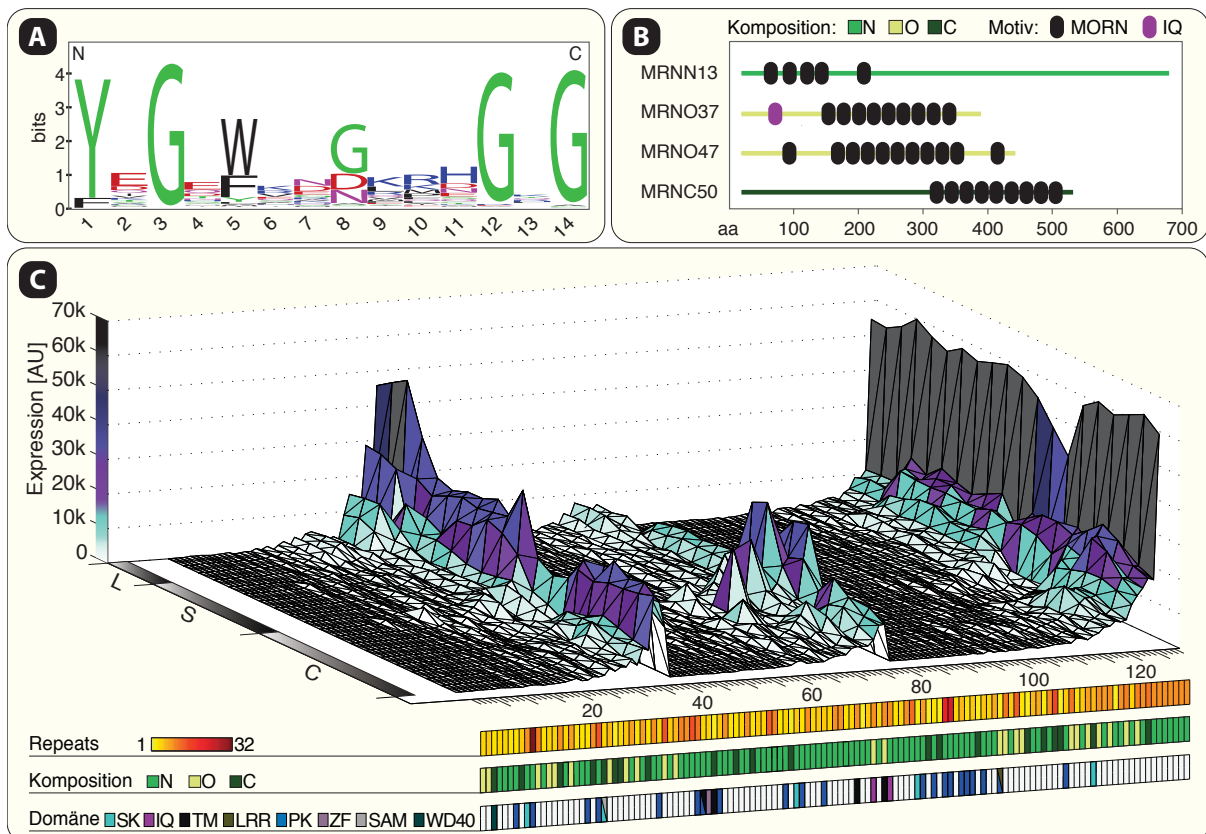


Abbildung 6: Das MORN-Motiv ist im hohen Maße konserviert unter Eukaryoten und in 129 exprimierten Proteinen von *Tetrahymena thermophila* präsent. A) Das Sequenz Logo wurde aus 630 individuellen MORN-Motiven von 100 Proteinen aus 10 verschiedenen Organismen generiert und zeigt die konservierte Natur des 14 Aminosäuren langen Motivs. B) Vier exemplarische MORN Proteine als Repräsentanten für die drei Hauptklassen: (i) Das MORN-Motiv befindet sich am N-Terminus (N; helles grün), oder (ii) am C-Terminus (C; dunkles grün), oder (iii) andernfalls durchgehend im Protein oder in Kombination mit anderen bekannten Domänen wie zum Beispiel dem IQ Motiv (O; gelb). C) Expressions Profile von 129 *Tetrahymena thermophila* MORN Protein codierenden Genen (x-Achse) während der logarithmischen Wachstumsphase (L), der 24-stündigen Hungerphase (S) und während der 18-stündigen Konjugationsphase (C). Die Nummer der MORN-Motive in jedem Protein ist durch einen gelben bis roten Gradienten angegeben. Die Gene sind entsprechend ihrer korrelierenden Ko-Expressions Werte innerhalb der drei verschiedenen Konditionen sortiert. Die Expression Werte sind dargestellt in *arbitrary units* (AU; y-Achse). Die individuellen Expression Werte sind in Tabelle S1 angegeben. Die Assoziationen der MORN-Domänen (wieder N, C oder O) mit anderen Proteindomänen sind dargestellt durch zusätzliche farbliche Rechtecke: SK, Serin/Threonin-Proteinkinasen; PK, Phosphokinase; IQ, IQ-Motiv; ZF, Zinkfingerdomäne; TM, Transmembran-Domäne; LRR, Leucin-reiche-Wiederholung; WD40, Tryptophan-Asparaginsäure-Propeller-Domäne; SAM, Sterile-Alpha-Motiv. (Habicht et al. 2015).

Transmembrane-Domänen und mit der WD-40-Propellerstruktur (Fig. 6C; Tabelle S1) assoziiert sein.

Für einen Überblick wurden alle *Tetrahymena thermophila* MORNs nach der Lokalisation der MORN-Domänen sowie der Assoziation mit weiteren Domänen und anschließend nach der Aminosäurenlänge sortiert und daraufhin in der *Tetrahymena* Genome Database annotiert. Die *Tetrahymena* MORN-Sortierung resultierte in drei Klassen: (i) MORN-Motive, welche in erster Linie am N-Terminus lokalisieren (MRNN, 17 Proteine); (ii) MORN-Motive, welche vorwiegend am C-Terminus lokalisieren (MRNC, 60 Proteine), und (iii), Proteine, deren MORN-Motive durchgehend im Protein lokalisieren und/oder mit anderen Domänen mit bekannter Funktion assoziiert sind (MRNO, 55 Proteine) (Abb. 6B und C; Tab. S1).

Basierend auf Microarray-Daten, extrahiert von der *Tetrahymena* Functional Genomics Database (TetraFGD), wurden die verfügbaren Expressions-Profile von 129 der 132 MORN-Motiv codierenden Gene anhand ihrer Ko-Expression während ihrer logarithmischen Wachstumsphase, der Hungerphase und während der Konjugation gruppiert. Die Gene, welche MORN-Proteine kodieren zeigen im Wesentlichen vier verschiedene Expressions Muster: (i) die erste Gruppe an Genen sind sogenannte ‘housekeeping MORNs’, welche ein durchgehend hohes Level an Expression während aller analysierten Zeitpunkte aufzeigen; (ii) die zweite Gruppe besteht aus Genen die während der logarithmischen Wachstumsphase, Hungerphase und späteren Konjugation eine hohe Expression aufweisen; (iii) die dritte Gruppe beinhaltet Gene welche eine besonders hohe Expression während der frühen Konjugation aufweisen; (iv) die vierte Gruppe, welche auch die Mehrheit der MORN codierenden Gene ausmacht, weist eine grundsätzlich niedrige Expression auf. Abbildung 6C zeigt jedoch, dass keine Verbindung zwischen einem bestimmten Expressionsprofil zu den Motiv-Lokalisationen, der Domänen-Kompositionen oder der Assoziation mit anderen funktionellen Proteindomänen besteht.

5.3 Expression und Isolierung von MRNO51

Die unbekannte Funktion von MORN-Motiven sollte durch die Lokalisation eines endogenen MORN-Proteins durch Antikörperherstellung sowie die Prüfung der Lipid-bindenden Eigenschaft von MORN-Domänen und Strukturanalyse durch

Kristallisation und NMR Spektroskopie charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde das Protein MRNO51 (*T*herm_00584930), welches ein Homolog von *Pf*MORN1 (PF3D7_1031200) und *Tg*MORN1 (TGME49_310440), bereits untersuchten MORN Proteinen der Apicomplexa *Plasmodium* beziehungsweise *Toxoplasma*, (Ferguson et al. 2008; Gubbels 2006; Lorestani et al. 2010) ist, zunächst überexprimiert und anschließend isoliert.

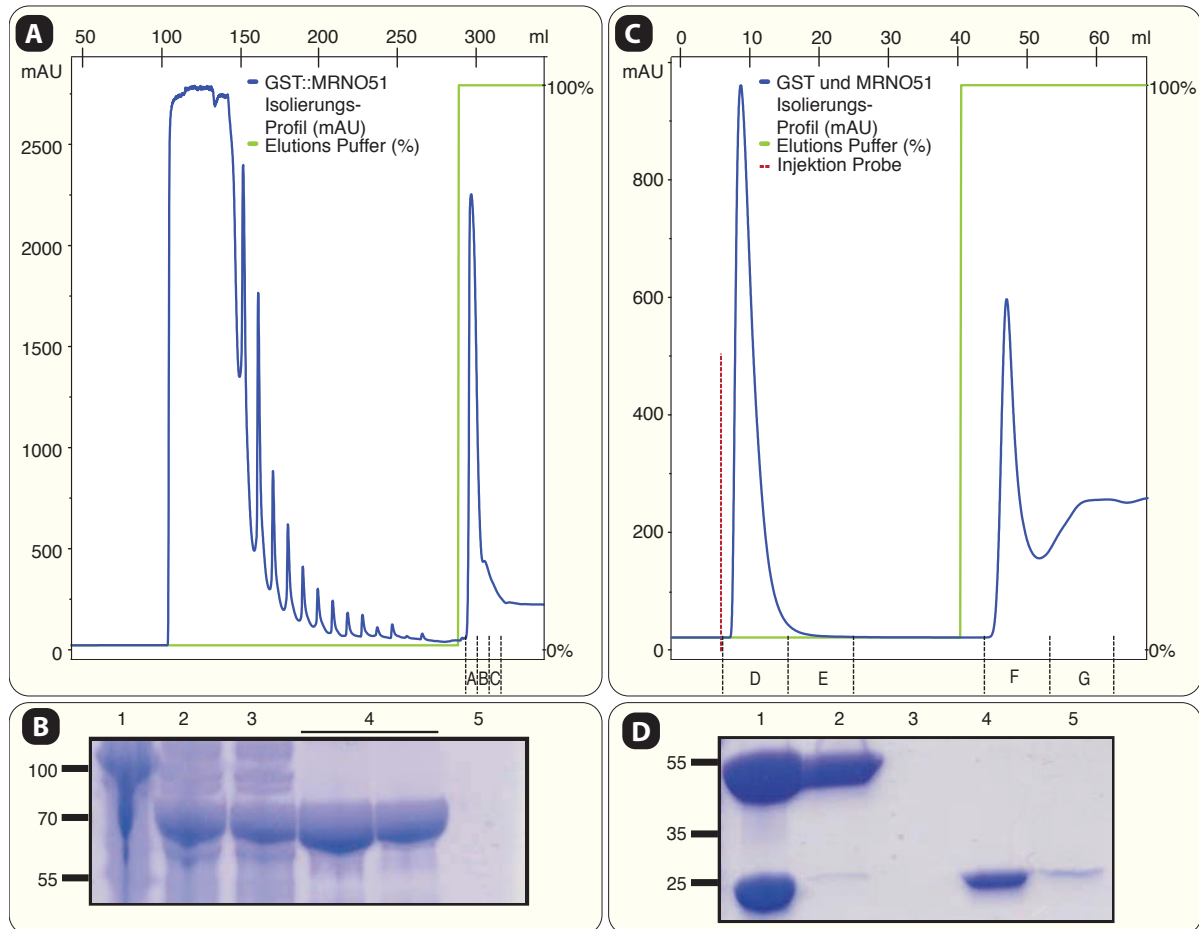


Abbildung 6: Spektren der Isolierung von GST::MRNO51 und der Trennung von GST und MRNO51 per *fast protein liquid chromatography*. A) Isolierungs-Profil von GST::MRNO51, welches durch Messen der Absorption (mAU, blaue Linie) verfolgt wird. 40 ml aufgeschlossenes Gesamtzelllysate wurden auf eine GST-Tag spezifische Säule (GSTrap FF) geladen, unspezifisches Protein wurde mit 170 ml von der Säule gewaschen und an der Säule gebundene Proteine wurden durch den Einsatz von 100% des Elutionspuffers eluiert. Die eluierten Proteine wurden in den Fraktionen A, B und C mit jeweils 9 ml gesammelt. B) Mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel der entsprechenden Fraktionen. Spur 1, 2, 3: Gesamtzelllysate nach Zellaufschluss, vor der Zentrifugation und nach der Zentrifugation; Spur 4: Isoliertes GST::MRNO51 aus Fraktionen A und B; Spur 5: Fraktion C. Pro Spur wurden jeweils 30 μ l aufgetragen. C) Spektrum der Trennung des restringierten GST-Tag von MRNO51. Injektion von MRNO51 und restringiertem GST-Tag auf die GSTrap FF Säule (rot). MRNO51 bindet nicht an die Säule und wird in Fraktion D gesammelt, der GST-Tag wird mit 100% Elutionspuffer eluiert und in den Fraktionen F und G gesammelt. D) Mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel der entsprechenden Fraktionen. Spur 1: Ungetrennte, injizierte Probe; Spur 2: MRNO51 aus Fraktion D; Spur 3: Kein Protein aus Fraktion E; Spur 4 und 5: GST-Tag aus Fraktionen F und G.

Da *Tetrahymena* nur TGA als Stopcodon erkennt, während die zwei Codons TAA und TAG für Glutamin in Ciliaten codieren, musste für die Überexpression in *E. coli* eine Variante von *MRNO51* designt werden, in der die TAA und TAG Codons durch CAA oder CAG ersetzt wurden. Ein entsprechendes Plasmid wurde von der Firma Gentec synthetisiert und anschließend in einen Vektor mit einem N-terminalen Glutathion S-transferase (GST) Tag kloniert. *E. coli* BL21-Zellen wurden mit dem Vektor transformiert und anschließend zur Überexpression von GST::MRNO51 genutzt, pelletiert, aufgeschlossen und der Überstand per Zentrifugation von den Zelltrümmern getrennt.

Abbildung 7A zeigt das Spektrum des spezifischen Isolierungssprofils von GST::MRNO51. Nach einem ausgiebigen Waschschrift wurde GST::MRNO51 mit einer Konzentration von 100% des Elutionspuffers (in Prozent, grüne Linie) eluiert, was durch einen Anstieg der Absorption (mAU, blaue Linie) nachgewiesen werden konnte. Das eluierte Protein wurde in 9 ml Fraktionen gesammelt, deren Inhalt anschließend per SDS-PAGE auf das Molekulargewicht überprüft wurde. Abbildung 6B zeigt das entsprechende SDS-Gel, welches zuvor mit Coomassie gefärbt wurde, mit dem Gesamtzelllysat nach Zellaufschluss, vor der Zentrifugation und nach der Zentrifugation (Spur 1, 2, 3), sowie das isolierte Protein in den gesammelten Fraktionen A und B (Spur 4).

Spuren 1 bis 4 weisen eine deutliche Bande bei 70 kDa auf, welche der zu erwartenden Größe des Fusionsproteins (MRNO51: 49 kDa; GST: 26 kDa) entspricht, wobei letztere Spur frei von Verunreinigungen ist und nur das isolierte GST::MRNO51 aufweist. Spur 5, welche Fraktion C entspricht, enthält kein Protein sondern nur Elutionspuffer. Die isolierten Fraktionen wurden gesammelt und anschließend konzentriert und der Elutionspuffer wurde gegen den gewünschten Puffer für anschließende Anwendungen ersetzt. Isoliertes GST::MRNO51 wurde für die Immunisierung (Kapitel 5.4) sowie für alle Tests der Lipid bindenden Eigenschaft von MORN-Proteinen (Kapitel 5.5) verwendet.

Für Strukturanalysen, sprich Kristallisation und NMR-Spektroskopie, wurde der GST-Tag mit Hilfe von Thrombin von dem MORN-Protein restringiert. Anschließend wurden Tag sowie Zielprotein per FPLC voneinander getrennt. Dies wird in dem entsprechenden Spektrum in Abbildung 7C gezeigt. Nach der Injektion des Restriktionsansatzes (rote Linie) wird ein Anstieg der Absorption von ca. 1000 mAU

(blaue Linie) verzeichnet, bei dem es sich um ungebundenes Protein beziehungsweise MRNO51 handelt. Weiterhin wird ein Anstieg der Absorption, welche dem Tag entspricht, nach dem Einsatz des Elutionpuffers gemessen. Die getrennten Proteine wurden in Fraktionen von 9 ml gesammelt und anschließend per SDS-PAGE überprüft.

Abbildung 7D zeigt das Abbildung 7C entsprechende, mit Coomassie gefärbte SDS-Gel zum Chromatogramm nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Fraktionen. Der Restriktionsansatz korrespondiert mit Spur 1, in welcher der GST-Tag und MRNO51 bei ihrer entsprechenden Größe von 26 beziehungsweise 49 kDa migrieren. Fraktion D, welche Spur 2 entspricht, beinhaltet nur MRNO51. Fraktion E (Spur 3) enthält nur Waschpuffer und die Fraktionen F und G (Spur 4, 5) beinhalten nur den GST-Tag.

5.4 Antikörper-Synthese gegen MRNO51

Zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen MRNO51 wurde das Protein zunächst überexprimiert und anschließend isoliert (Kapitel 5.3). Die Firma Eurogentec (Köln, Germany) wurde mit der Immunisierung beauftragt und nutzte pro Immunisierung 0,3 mg von GST::MRNO51. Zur Immunisierung wurden zwei Ratten, Klon SYR156 und SYR157, verwendet. Beide Ratten wurden in einem Zeitraum von 18 Tagen vier Mal intraperitoneal immunisiert. Drei Wochen nach der ersten Immunisierung erfolgte die erste Blutentnahme (*Large Bleed*) und vier Wochen nach der ersten Immunisierung die finale Blutentnahme aus den Ratten (*Final Bleed*). Die Seren der finalen Entnahme wurden in 50 mM Natriumphosphat Puffer verdünnt und per FPLC über eine Immunglobulin G (IgG; GE Healthcare) spezifische Säule gereinigt, was durch Messen der Absorption verfolgt wurde. Das korrespondierende Spektrum in Abbildung 8A zeigt, dass zunächst ungebundenes, unspezifisches Protein von der Säule gewaschen wurde. Anschließend wurde der Antikörper IgG durch einen sauren Puffer, der einen sog. pH-Shift verursacht, eluiert und in den entsprechenden Fraktionen gesammelt. Die gesammelten Fraktionen wurden per Gelelektrophorese in einem SDS-Gel nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Das mit Coomassie gefärbte Gel (Abbildung 8B) zeigt Banden, die bei einer Höhe von 144, 50 und 22 kDa migrieren. Letztere entsprechen der langen beziehungsweise kurzen

Kette von IgG, während das Protein von 144 kDa IgG entspricht, das sich aus zwei kurzen und zwei langen Ketten zusammensetzt.

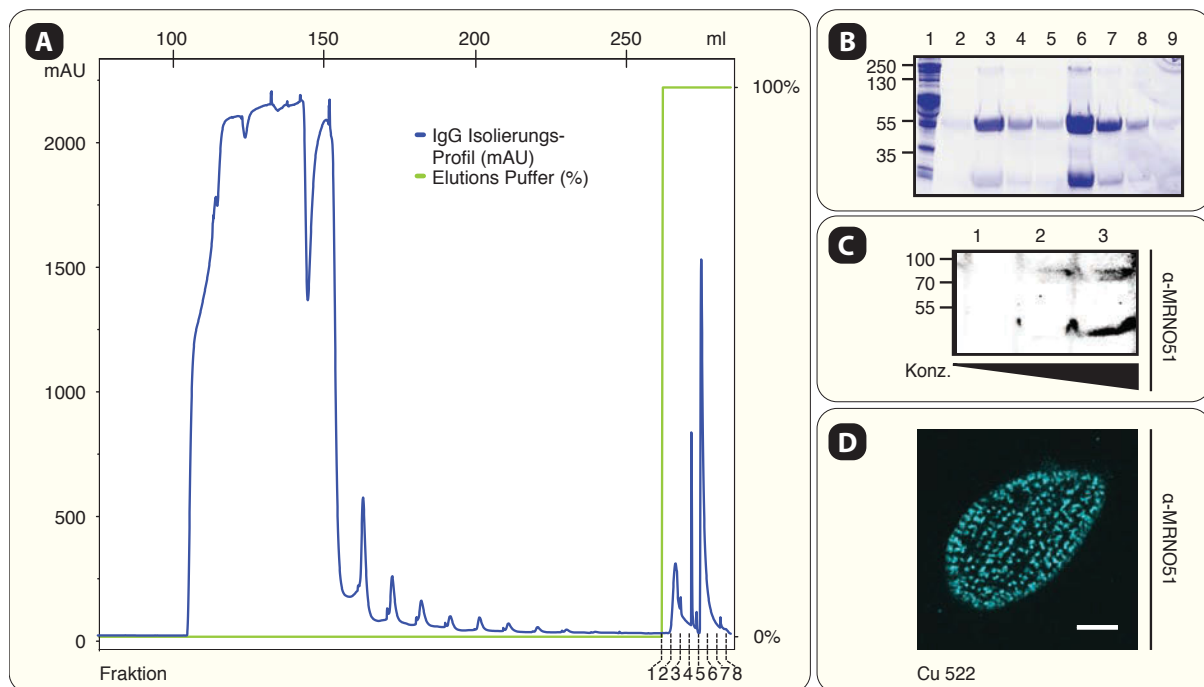


Abbildung 7: Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen MRNO51. A) Immunglobulin G (IgG) wurde per FPLC aus dem Blutserum von Ratten, welche zuvor mit GST::MRNO51 immunisiert wurden, isoliert. B) Eluierte Fraktionen der Proteinisolierung wurden zur Überprüfung auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend elektrophoretisch getrennt. Drei Banden migrieren pro Spur bei 144, 50 und 22 kDa, welche IgG, der schweren Kette beziehungsweise der leichten Kette des Antikörpers entsprechen. C) 30 μ g (Spur 1), 60 μ g (Spur 2), 120 μ g (Spur 3) Zellysate der *Tetrahymena* Zellenlinie Cu522 wurden mit dem isolierten spezifischen anti-MRNO51 Antikörper im Western Blot getestet. In Spur 2 und 3 wurden bei 49 kDa Banden detektiert, die der vorhergesagten Größe von MRNO51 entsprechen. D) Immunfluoreszenz-Assay mit *Tetrahymena* Cu522 Zellen des anti-MRNO51 Antikörpers. Endogenes MRNO51 lokalisiert entlang der longitudinalen Mikrotubuli des Ciliaten. Skalierungsbalken 10 μ m.

Nach der Konzentrierung der Fraktionen auf 100 μ l wurde der Antikörper in einem Immunoblot getestet. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen von Gesamtzelllysate von *T. thermophila* isoliert (Kapitel 4.2.5.1) und elektrophoretisch getrennt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem zuvor isolierten anti-MRNO51 Antikörper mit einer Konzentration von 1:10 sowie die Detektion mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper per Chemilumineszenz. In Spur 2 sowie Spur 3 wurden Banden detektiert, welche unter 55 kDa migrieren und der vorhergesagten Größe von MRNO51 (49 kDa) entsprechen. Zusätzlich wurde anti-MRNO51 auch für IFAs (Kapitel 4.2.5.12) mit *Tetrahymena thermophila* Cu522 Zellen verwendet. Abbildung 8B zeigt, dass der Antikörper an Strukturen entlang der

longitudinalen Mikrotubuli des Ciliaten bindet. Da für die IFAs, wie schon für die Immunodetektion, eine große Menge an anti-MRNO51 eingesetzt werden musste, war der Antikörper für weitere Experimente bereits verbraucht. Aus diesem Grund wurden für weitere Lokalisationsstudien MORN-Proteine mit GFP markiert.

5.5 MRNO51 bindet spezifisch 1,2-Diacylglycerol, Cardiolipin und Phosphatidylinositole

Um zu testen ob, MORN-Motive eines *Tetrahymena*-Proteins die Fähigkeit besitzen, Phospholipide zu binden, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Fallstudie mit den MORN-Motiven von MRNO51 durchgeführt. Zunächst sollte überprüft werden ob die durch SMART vorhergesagten 14 MORN-Motive, welche fast die gesamte 426 Aminosäuren lange Sequenz von MRNO51 umspannen, generell Phospholipide in Form von Liposomen binden. Anschließend sollte die Fähigkeit der Lipidbindung durch einen anderen Versuchsansatz bestätigt sowie spezifiziert werden.

Für beide Untersuchungen wurden nach Kapitel 4.2.7 GST::MRNO51 beziehungsweise der Leervektor PGEX-4T-2 als Kontrolle überexprimiert und isoliert. Die zu testenden Proteine wurden konzentriert und die Puffer gegen die entsprechenden Versuchspuffer ausgetauscht. Die Liposomen wurden nach publizierten Protokollen (Im et al. 2007; Lee et al. 2002; Patki et al. 1997) mit einigen Modifikationen aus Gesamtextraktionen von Phospholipiden aus Sojabohnen präpariert. Nach der Inkubation der Liposomen mit dem Fusionsprotein beziehungsweise der Kontrolle wurden die Proben bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand (S) sowie das Liposomen-Pellet (P) wurden auf das gleiche Volumen eingestellt, durch Gelelektrophorese getrennt und anschließend per Immunoblot detektiert. Abbildung 9A zeigt den Immunoblot von drei unabhängig durchgeführten Liposomen-binde Tests. GST::MRNO51 befindet sich im Überstand sowie im Liposomen-Pellet. Die Kontrolle bindet nicht an Phospholipide und ist nur im Überstand vorhanden. Die Bindung der Liposomen an das GST::MRNO51, welche im Immunoblot dargestellt ist, wurde durch eine densitometrische Messung quantifiziert. Abbildung 9B zeigt die relative Proteinmenge im Pellet sowie im Überstand. GST::MRNO51 liegt zu 70% im Überstand, während der Rest des Proteins an Liposomen bindet und sich im Pellet befindet.

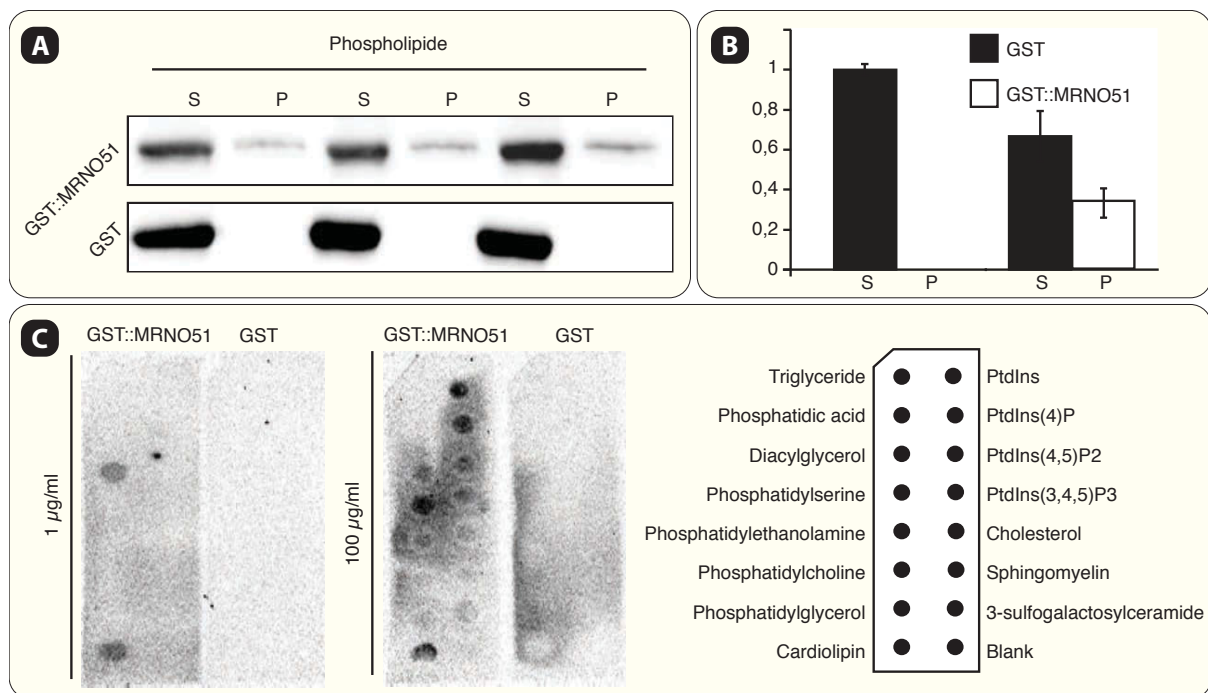


Abbildung 8: Die MORN-Domäne von MRNO51, bestehend aus 14 MORN-Motiven, vermittelt die Assoziation der Glutathion S-transferase (GST) an Phospholipide, wenn die Domäne an dem C-Terminus von GST (GST::MRNO51) fusioniert ist. A) Liposomen wurden aus Sojabohnen-Phospholipiden präpariert. 2 µg des Fusionsproteins, beziehungsweise der Kontrolle wurden mit 50 µl Liposomen bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 16.000×g zentrifugiert. Der Überstand (S) wurde abgenommen und das Liposomen-Pellet (P) im gleichen Volumen wie der Überstand aufgenommen. Die im Überstand und im Pellet enthaltenen Proteine wurden durch Gelelektrophorese getrennt und anschließend per Immunoblot detektiert. B) Die Bindung der Liposomen an GST-Fusionsproteine wurde durch densitometrische Messungen aus drei unabhängigen Experimenten quantifiziert. Die relative Proteinmenge ist als gebunden (Pellet) beziehungsweise frei (Überstand) dargestellt. C) Das Fusionsprotein bindet mit einer Konzentration von 1 µg/ml hauptsächlich an Cardiolipin und an 1,2-Diacylglycerol. Bei einer höheren Konzentration vom 100 µg/ml assoziiert GST::MRNO51 außerdem mit Phosphatidylinositol, Phosphatidylinositol 4-phosphate und Phosphatidylserine. Der isolierte Vektor PGEX-4T-2 nur mit GST diente als Kontrolle. Auf der rechten Seite ist ein schematischer Membran Lipid Streifen dargestellt: PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns4P, Phosphatidylinositol 4-phosphate; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PtdIns(3,4,5)P₃, Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate.

Für den Lipid Overlay Assay wurden kommerziell erhältliche Lipid Membran Streifen (Echelon Biosciences Inc.) mit Blocking-Puffer gesättigt und anschließend mit GST::MRNO51 beziehungsweise der Kontrolle über Nacht inkubiert. Die Membranen wurden gewaschen und danach wie ein Immunoblot behandelt (Kapitel 4.2.5.10). Bei einer Konzentration von 1 µg/ml bindet GST::MRNO51 an Cardiolipin (CL) und an 1,2-Diacylglycerin (DAG). Die Steigerung der Konzentration des Fusionsproteins auf 100 µg/ml resultierte in der Bindung von zusätzlichen Lipiden, wie Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin, mit denen GST::MRNO51, aber nicht die Kontrolle (GST alleine), interagiert (Abb. 9C). Zusammenfassend zeigen beide

Tests auf unterschiedliche Art und Weise, dass die MORN-Domäne von MRNO51 in Verbindung mit einem anderen löslichen Protein (GST) in der Lage ist, eine Vielzahl von isolierten Lipiden zu rekrutieren.

5.6 Lokalisation von MORN-Proteinen

5.6.1 Lokalisation von MORN-Proteinen in *T. thermophila*

Der Liposomen-binde Test sowie der Lipid Overlay Assay demonstrieren, dass MORN-Motive in erster Linie Proteine an Lipide der Zellmembran binden können. Zudem zeigte die Literatur, dass die Anzahl von Motiven, die subzelluläre Lokalisation beeinflussen können (Takeshima 2001; Ma 2003), außerdem ist ungeklärt in welchem Ausmaß sich die subzelluläre Lokalisation von MORN-Proteinen unterscheidet, wenn die Zusammensetzung der MORN-Motive in

fast gleich langen Proteinen nahezu identisch ist. Aus diesem Grund wurden Fusions-Konstrukte für vier MORN-Proteine (MRNC36, TTHERM_01084170; MRNC38, TTHERM_00378500; MRNC39, TTHERM_00590130; MRNO51, TTHERM_00584930) erstellt, um diese am C-Terminus mit GFP zu markieren. Die Expression der Fusionsproteine liegt unter der

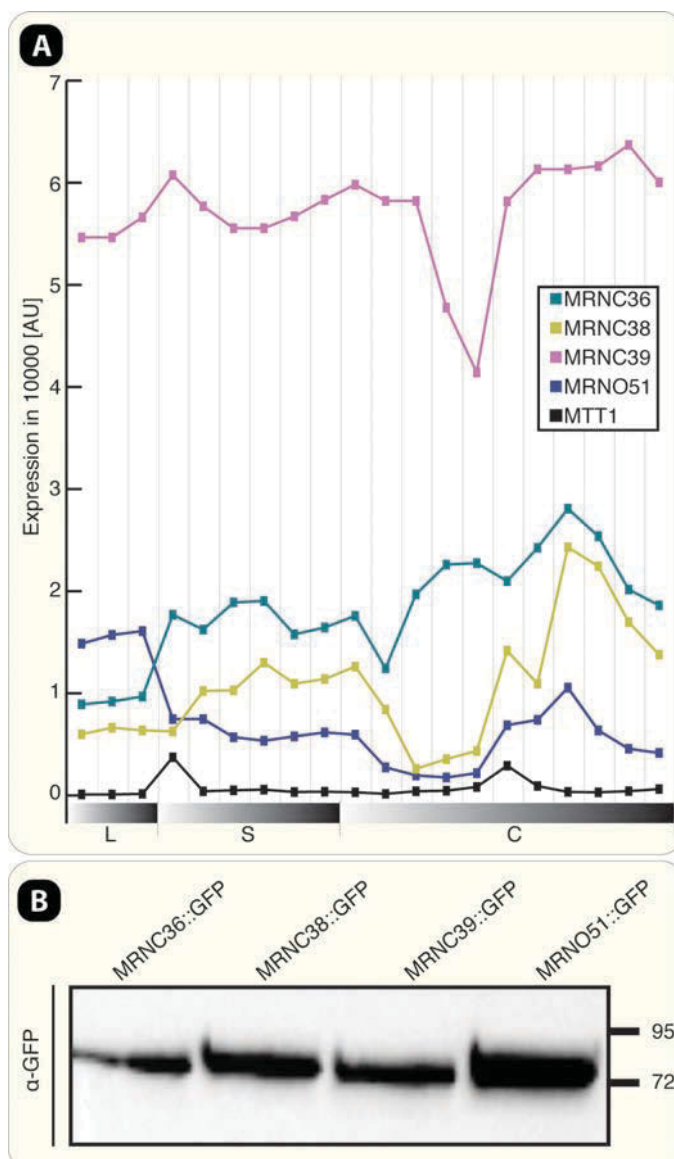


Abbildung 9: A) Vergleich der endogenen Expression von *MRNC36*, *MRNC38*, *MRNC39*, *MRNO51* basierend auf Microarray-Daten extrahiert von TGED. Die Expression von *MTT1*, dessen Promoter für die Lokalisation der GFP-Fusionsprotein genutzt wurde, ist durchgehend niedrig und nur durch CdCl_2 induziert. B) Western Blot von vier MORN Proteinen aus *Tetrahymena thermophila* Gesamtzellextrakt: Fusions-protein *MRNC36::GFP* (Spur 1), *MRNC38::GFP* (Spur 2), *MRNC39::GFP* (Spur 3) und *MRNO51::GFP* (Spur 4) demonstrieren, dass alle Proteine die volle Länge exprimieren.

Kontrolle des induzierbaren Promotor von MTT1, einem Gen, das konstant niedrig im Vergleich zu den zu lokalisierenden MORN-Proteinen ist. Durch die Wahl des geeigneten Promotors können Expressionsartefakte in Immunfluoreszenz-Aufnahmen im Vorfeld vermieden werden (Abb. 10A). Die zu lokalisierenden Kandidaten, MRNC36, MRNC38, MRNC39 und MRNO51, weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit untereinander auf. Dennoch besitzen nicht alle Proteine die gleiche Domänenarchitektur, die schematisch in Abbildung 11 dargestellt ist. MRNO51 besitzt 14 MORN-Motive, die sich über die ganze Länge des Proteins erstrecken, während die anderen drei Proteine neun am C-Terminus angeordnete MORN-Motive besitzen.

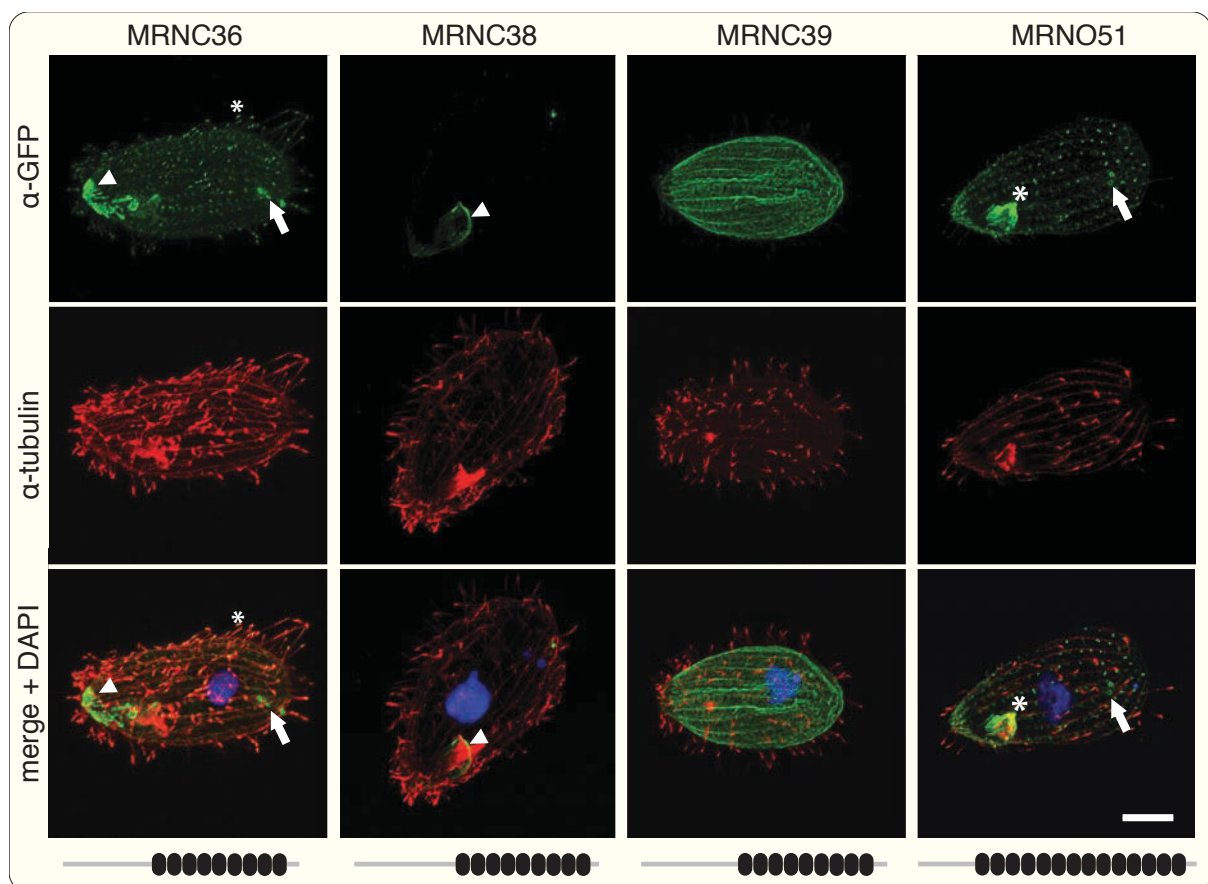


Abbildung 10: Lokalisation von vier MORN-Proteinen in *Tetrahymena thermophila*. Alle vier MORN-Proteine zeigen eine unterschiedliche Lokalisation. MRNC36::GFP lokalisiert in Punkten am apikalen Ende der Zelle (Pfeilspitze), an den kontraktile Vakuolen Poren (CVP; Pfeil) und an der äußeren Spitze der Cilien (Stern). MRNC38::GFP scheint mit der undulierenden Membran des Oral Apparatus (OA, Pfeilspitze) assoziiert zu sein. MRNC39::GFP bindet an die gesamte Zellmembran des Ciliaten. MRNO51::GFP lokalisiert überwiegend an den Oral Apparatus (Stern) und den CVPs (Pfeil). MRNO51::GFP ähnelt der Lokalisation, welche für MRNC36 beobachtet wird, obwohl besonders die Lokalisation am OA komplett unterschiedlich ist. Unten: Schematische Darstellungen von der MORN-Motiv-Komposition für jedes MORN-Protein sind unter dem jeweiligen Protein dargestellt. Alle Bilder wurden 45 Minuten nach der induzierten Expression mit CdCl₂ aufgenommen. Skalierungsbalken 10 μ m. (Habicht et al. 2015).

Nach einer erfolgreichen Transfektion von *Tetrahymena* mit den Fusions-Konstrukten wurden die Kulturen zur Induktion der Fusions-Protein-Expression 45 min mit Cadmiumchlorid (CdCl_2) inkubiert. Anschließende Western Blots (Abb. 10b, Spur 1-4) mit anti-GFP mit Gesamtzellextrakt der entsprechenden Klone zeigen, dass die Fusions-Proteine (MRNC36::GFP, 70 kDa; MRNC38::GFP, 70 kDa; MRNC39::GFP, 70 kDa; MRNO51::GFP, 76 kDa) bei der entsprechenden Größe zu dem vorhergesagten Molekulargewicht migrieren und dass keine Überexpressions-Artefakte oder unspezifische Bindungen des Antikörpers vorliegen.

Um die Lokalisierung der MORN-Proteine in *T. thermophila* zu bestimmen, wurden die Zellen zunächst zwecks Induktionen der Fusions-Proteine für 45 min mit CdCl_2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit anti-Tubulin und anti-GFP markiert. Die Detektion erfolgte an einem Konfokalmikroskop. Der IFA zeigt, dass alle vier MORN-Proteine eine unterschiedliche Lokalisation haben. MRNC36::GFP lokalisiert in Punkten am apikalen Ende der Zelle (Pfeilspitze), an den kontraktile Vakuole Poren (CVP; Pfeil) und an der äußeren Spitze der Cilien (Stern). MRNC38::GFP scheint mit der undulierenden Membran, einer der vier Membranen des Oral Apparatus (OA, Pfeilspitze), assoziiert zu sein. MRNC39::GFP bindet an die gesamte Zellmembran des Ciliaten. MRNO51::GFP lokalisiert überwiegend an den OA (Stern) und den CVPs (Pfeil) aber auch entlang der longitudinalen Mikrotubuli. Dies wurde bereits mit dem selbst hergestellten Antikörper, welcher endogenes MRNO51 markiert, beobachtet (Kapitel 5.4). MRNO51::GFP ähnelt der Lokalisation, die für MRNC36 beobachtet wird. Nichtsdestotrotz zeigt die Lokalisation am OA von MRNO51::GFP und MRNC39::GFP deutliche Unterschiede.

5.6.2 Ektopische Expression von MRNO51

MORN-Motive bilden als Domäne ein strukturelles Modul, das von Bakterien bis zum Menschen konserviert ist (Kapitel 5.1), und Proteinen eine Wechselwirkung mit Lipiden ermöglicht (Kapitel 5.5). Die universale Funktion des MORN-Motivs sollte mit der Expression eines *Tetrahymena* MORN (MRNO51) in *E. coli* evaluiert werden. Dafür wurde MRNO51 zunächst in einen Vektor (6XHIS-mCherryFP) mit einem am

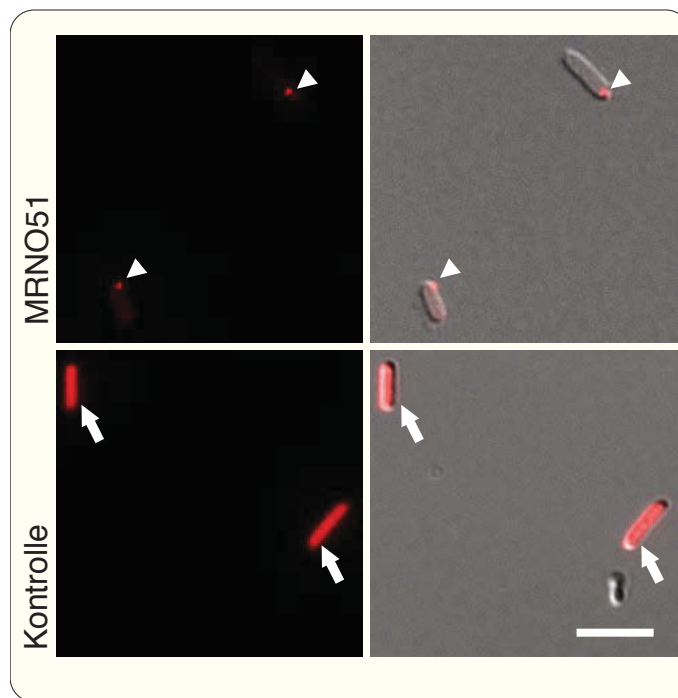


Abbildung 11: Ektopisch exprimiertes *Tetrahymena* MRNO51 akkumuliert in Form eines Punktes am apikalen Ende von *E. coli*. Obere Reihe: 6XHIS-mCherryFP-MRNO51 lokalisiert punktförmig in *E. coli*. Untere Reihe: Als Kontrolle dient der Leervektor 6XHIS-mCherryFP, welcher cytosolisch lokalisiert. Rechts: Überlagerung der Fluoreszenz-Bilder mit Durchlicht. Skalierungsbalken: 5 μ m.

N-Terminus fluoreszierenden Protein kloniert. Nach erfolgreicher Transformation zeigte 6XHIS-mCherryFP-MRNO51, wenn ektopisch exprimiert, dass es sich punktförmig in der Abwesenheit von anderen *T. thermophila* Proteinen (Abb. 12) an einem Ende des Bakteriums akkumuliert, während die Kontrolle, der Leervektor 6XHIS-mCherryFP, dagegen cytosolisch lokalisiert. Die gerichtete Lokalisation des MORN-Proteins in einem Fremdorganismus suggeriert die Tendenz, sich selbst zu assemblieren und kann auf eine strukturelle Funktion hindeuten.

5.6.3 Lokalisation von MORN-Proteinen in Spezies der *Trichomonadinae*

Die Isolation der Pelta des Excavaten *Tetratrichomonas gallinarum* und die anschließende Analyse durch die Massenspektrometrie, beides durchgeführt von Dipl. Biol. Harald Preisner, identifizierte ein MORN-Protein (TEGb034542) von 35 kDa als potentiellen Bestandteil des Cytoskeletts des Flagellaten. Der Sequenzvergleich mit Blast identifizierte TVAG_182670 als das *Trichomonas vaginalis* Homolog des Proteins.

Tabelle 1: Identifikation eines TVAG_182670 Homologs in der Pelta-Fraktion von *Tetratrichomonas gallinarum* anhand von Massenspektrometrie. Zeile 1 und 2: *T. gallinarum* beziehungsweise TrichdB Acession Nummer. Mapping E value: Signifikanz des Sequenzvergleiches von TVAG_182670 und TEGb034542. Σ Coverage: Quotient der beobachteten Anzahl von Aminosäuren und der vorhergesagten Aminosäuren-Länge. Zeile 5, 6: Anzahl unterschiedlicher Peptide beziehungsweise Anzahl gefundener Peptide.

<i>T. gallinarum</i>	TEGb034542
<i>T. vaginalis</i>	TVAG_182670
Mapping E value	5,00E-38
Σ Coverage	87,5
Σ # Unique	
Peptides	5
Σ # PSMs	11

Analysen zeigten, dass TVAG_182670 Coiled-coil-Regionen im N-terminalen Teil des Proteins aufweist und mehrere Wiederholungen an Aminosäuresequenzen, sowie die Aminosäure-Komposition von CRMPs besitzt. Zwecks Lokalisation wurde zunächst ein Fusionskonstrukt von TVAG_182670 mit einem C-terminalen GFP-Tag erstellt. Anschließend wurden *Trichomonas vaginalis* sowie *Tetratrichomonas gallinarum* transfiziert. In Western Blots mit Gesamtzellextrakten aus den positiven Klonen wurden Banden, welche zwischen 70 und 55 kDa migrieren und dem vorhergesagten Molekulargewicht von TVAG_182670::GFP (62 kDa) entsprechen, detektiert (Abb. 13A). Als nächstes wurde TVAG_182670::GFP in *T. vaginalis* sowie *T. gallinarum* unter Einsatz eines anti-GFP Antikörpers durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie lokalisiert. Die Immunfluoreszenzbilder in Abbildung 13C zeigen, dass TVAG_182670::GFP am anterioren Ende der Zelle vor dem Nukleus, welches der Lokalisation der Pelta (siehe Abbildung 13B) entspricht, detektiert wird. Die zusätzliche Markierung der Trichomonaden mit einem anti-Tubulin Antikörper zeigt keine Ko-Lokalisation von TVAG_182670::GFP mit den Flagellen beziehungsweise dem Axostyl. Es wird aber deutlich, dass die anterioren Flagellen und das Axostyl an der Struktur, welche durch TVAG_182670::GFP markiert wird und wahrscheinlich die Pelta ist, entspringen.

Des Weiteren wurden Homologe in *Tetrahymena* sowie in der einzelligen Grünalgenart *Chlamydomonas reinhardtii* identifiziert. Das *Tetrahymena* Protein besitzt eine unbestimmte Funktion, während das *Chlamydomonas* Homolog als Flagellen-assoziiertes Protein in Blast annotiert ist. Die Vorhersage der Domänenarchitektur von TVAG_182670 ergab, dass das Protein sechs MORN-Motive mit einer mittigen Anordnung innerhalb des Proteins aufweist (Abb. 13C). Des Weiteren wurde TVAG_182670 auf *charged repeat motif proteins* (CRMP)-sowie Coiled-coil-Kriterien getestet. Die

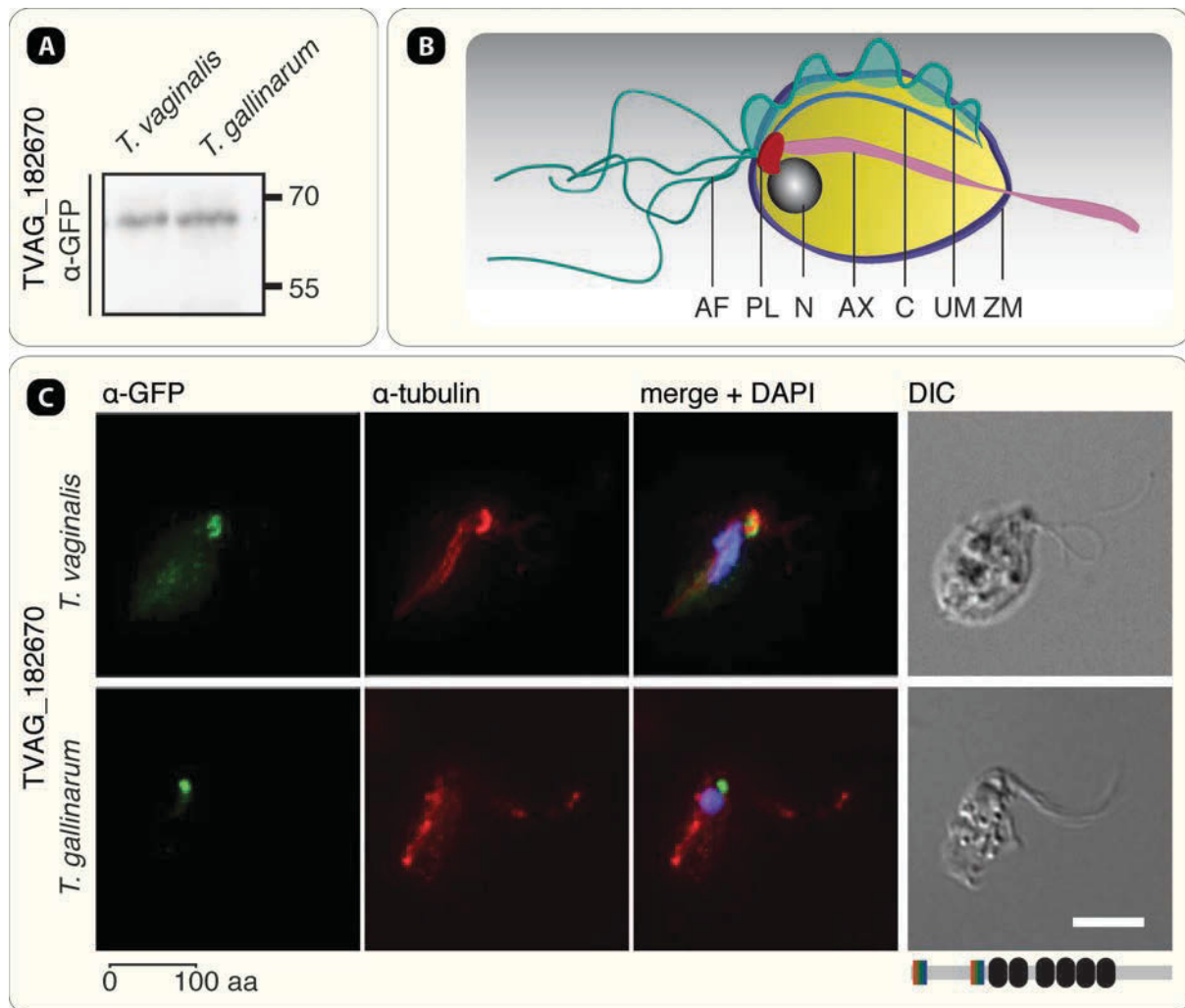


Abbildung 12: Lokalisation von TVAG_182670::GFP in Spezies der *Trichomonadinae* A) Western Blot von Gesamtzellextrakt des MORN-Proteins TVAG_182670::GFP aus *Trichomonas vaginalis* (Spur 1) und *Tetratrichomonas gallinarum* (Spur 2), welcher zeigt, dass alle Proteine die volle Länge exprimieren. B) Illustration von *Trichomonas spec.*: Der Protist wird von einer Zellmembran (ZM) umschlossen. Vier identische Flagellen (AF) befinden sich am anterioren Ende der Zelle und wurzeln in Basalkörpern, welche von der Pelta (PL) umgeben werden. Der Nukleus (N) befindet sich anterior distal der PL. Das Axostyl (AX), welches mit dem PL assoziiert ist, erstreckt sich über den Median zum posterioren Ende der Zelle. Die undulierende Membran (UM) wird durch eine Flagelle gebildet und durch die parallel verlaufende Costa (C) gestützt. C) Lokalisation von TVAG_182670::GFP in *Trichomonas vaginalis* und *Tetratrichomonas galinarum*. TVAG_182670::GFP lokalisiert in beiden Organismen am anterioren Ende der Zelle, apikal des Nukleus, was der Position der PL entspricht. Außerdem entspringen AX sowie AF dem von TVAG_182670::GFP markierten Bereich, zeigen aber keine Ko-Lokalisation mit TVAG_182670::GFP. Unten: Schematische Darstellung der MORN-Motiv-Komposition (schwarz) und der Coiled-coil-Regionen (bunt) von TVAG_182670. Skalierungsbalken: 10 μ m.

5.7 Strukturanalyse des *Tetrahymena thermophila* MORN-Proteins MRNO51

5.7.1 Bioinformatische Strukturanalyse

Die Tertiärstruktur des Proteins MRNO51 wurde mit dem Strukturvorhersageprogramm I-TASSER (Roy et al. 2010) berechnet. Die Modellierung der Struktur wurde anhand der bekannten Struktur einer Histon-Methyltransferase (UniProtKB Q8WTS6), welche zu 40% homolog zu MRNO51 ist,



Abbildung 13: Tertiärstruktur-Vorhersage von MRNO51 durch I-TASSER. Die I-TASSER basierte Prognose zeigt, dass die MORN-Motive eine runde Domäne bilden und spiegeln die große Menge an kurzen β -Faltblättern (violette) sowie die wenigen α -Helices (pink), welche auch durch PSIPRED vorhergesagt werden, wieder.

generiert. Das Model von MRNO51 besitzt eine Alpha-helix am N-Terminus, besteht aber hauptsächlich aus mehreren kurzen β -Faltblättern, welche sich wie die MORN-Domänen von der Aminosäureposition 57 bis zum C-terminalen Teil des Proteins erstrecken. Zudem wird die dichte Abfolge der β -Faltblätter in zwei Bereichen durch zwei kurze α -Helices unterbrochen. Die Vorhersage der Tertiärstruktur von I-TASSER wird durch das Programm PSIPRED unterstützt, das eine Sekundärstruktur für MRNO51 angibt, die auch

hauptsächlich aus β -Faltblättern besteht (Abb. 22). Darüber hinaus wird in beiden vorhergesagten Modellen deutlich, dass die MORN-Motive an der Formung der kurzen β -Faltblätter beteiligt sein können. Zusätzlich wurde das Hydrophobic Cluster Analysis (HCA)-Verfahren durchgeführt, welches Proteinsequenzen zweidimensional darstellt und anhand der Hydrophobizität eines Proteins potentielle Sekundärstrukturen identifiziert. Auch der HCA-Plot zeigte, wie PSIPRED und I-TASSER, dass die MORN-Motive von MRNO51 sowie die Aminosäuren zwischen den MORN-Motiven an der Ausbildung der β -Faltblätter beteiligt sein können.

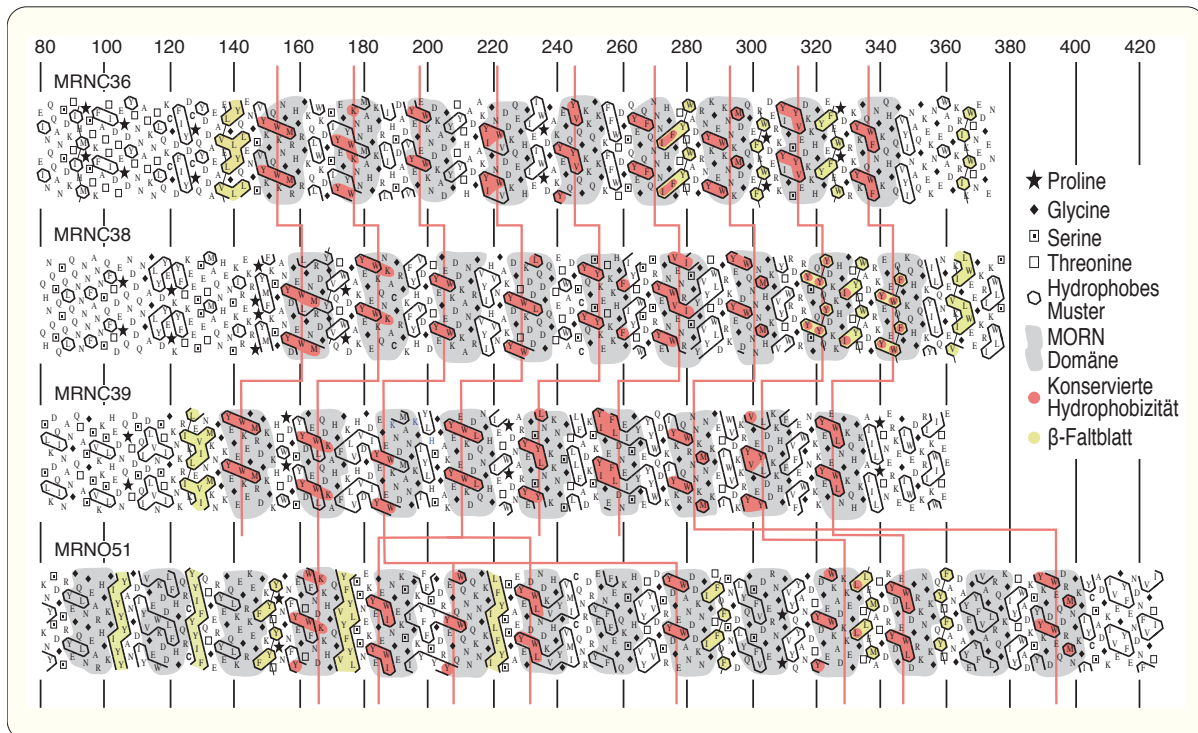


Abbildung 14: Vergleich der HCA Analyse der MORN-Motive von MRNC36, MRNC38, MRNC39 und MRNO51. In jedem Plot sind hydrophobe Muster, MORN-Domänen und β -Faltblätter markiert. Hydrophobe Anordnungen von gleicher Wertigkeit sind rot markiert und zwecks Verdeutlichung der konservierten Positionen in MRNC36, MRNC38 und MRNC39 mit Linien verbunden.

Das HCA-Verfahren wurde auch für die in Kapitel 5.6.1 zu lokalisierenden, nahezu identischen Proteine (MRNC36, MRNC38, MRNC39, MRNO51) angewendet, die trotz gleicher Anzahl der MORN-Motive in Proteinen fast gleicher Länge deutlich unterschiedliche Lokalisationen aufweisen. Da im Allgemeinen eine Korrelation zwischen Hydrophobizität und der Affinität zu Lipiden besteht, stellte sich die Frage, ob die unterschiedlichen Lokalisationen der Proteine in Abhängigkeit der diversen Hydrophobizität der MORN-Motive stehen. Interessanterweise besitzen MRNC36, MRNC38 und MRNC39 eine konservierte Hydrophobizität hinsichtlich der Position der Aminosäuren. Einige der Hydrophobizität-Muster von MRNC36, MRNC3 und MRNC39 wurden auch in den 14 MORN-Motiven von MRNO51 identifiziert, wiesen aber nicht die konservierten Positionen auf.

5.7.2 Kristallisationsansätze

Zwecks Röntgenstrukturanalyse wurde zunächst eine Stopcodon optimierte Version von MRNO51 nach Kapitel 5.3 überexprimiert und isoliert. Das isolierte Protein der einzelnen Fraktionen wurde gesammelt, konzentriert und der Puffer mit einem Puffer niedriger Ionenstärke (10 mM Tris pH 7,5) auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt. Für die Kristallisationsansätze wurden verschiedene kommerziell erhältliche Kits genutzt (siehe Tabelle 2), welche jeweils 96 verschiedene Pufferbedingungen zur Kristallisation von Proteinen besitzen. Die 96 Bedingungen wurden systematisch auf zwei 72-Well Terasaki Platten mit jeweils 1 μ l aufgetragen. Pro Bedingung wurden 10 μ g Protein hinzu pipettiert und durch die Hinzugabe von Mineröl zu jedem Ansatz als Schutz vor Evaporation versiegelt. Die Inkubation der Terasaki Platten erfolgte in einem Klimaschrank bei 21 °C. Nach einer sechswöchigen Inkubation mit regelmäßiger Auswertung wurden Kristalle in Wells gesichtet, welche mit PEGs Suite angesetzt wurden.

Tabelle 2: Übersicht für die in der Kristallisation verwendeten kommerziellen Kristallisationskits von Qiagen (Hilden) beziehungsweise Molecular Dimensions (Suffolk, UK) sowie der Sichtung von potentiellen Proteinkristallen. Alle Kits wurden für Kristallisationsansätze nach dem Microbatch-Verfahren bei 21 °C genutzt und für die Microbatch-Ansätze mit einer Lipidic Sponge Phase.

Kits	21 °C	Lipidic Sponge Phase	Hersteller
Classics II Suite			Qiagen
Classics Suite			Qiagen
Cryos Suite			Qiagen
MbClass II Suite			Qiagen
MbClass Suite			Qiagen
Mem Start			Molecular Dimensions
PEGs II Suite		X	Qiagen
PEGs Suite	X		Qiagen
Pro Complex Suite			Qiagen

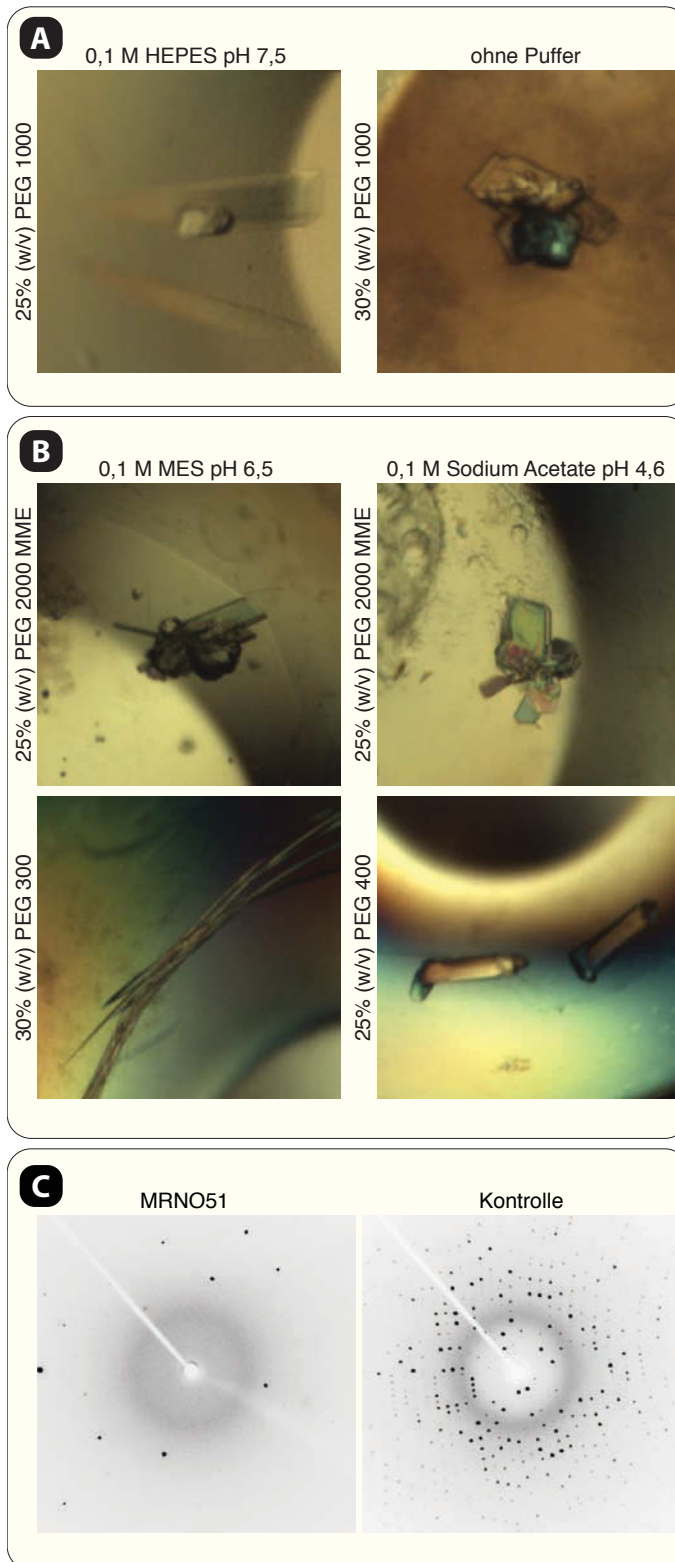


Abbildung 15: Kristallscreening nach dem Microbatch-Verfahren mit kommerziell erhältlichen Kristallisationskits und exemplarischem Diffraktionsbild von einem geernteten Kristall in der Röntgenanlage. A) Kristalle nach einer sechswöchigen Lagerung bei 21 °C. B) Kristalle, die innerhalb von zwei Monaten in einer selbst hergestellten Lipidic Sponge Phase, bestehend aus 40% (w/w) PEG 400; 30% (w/w) 25 mM Tris/HCl pH 7,0; 30% (w/w) Monoolein/Lipid 100:1 gewachsen sind. C) Links: Die gewachsenen Kristalle zeigten in der Röntgenanlage alle ein Diffraktionsbild von Salzkristallen. Rechts: Als Kontrolle für ein Diffraktionsmuster von Proteinen wurde Thrombin verwendet.

In Abbildung 16A linkes Bild sind drei Kristalle sichtbar, die mit der Bedingung: 25% (w/v) PEG 1000 mit 0,1 M Hepes pH 7,5 entstanden sind. Der vordere Kristall ist rundlich und entspricht der äußeren Form eines Salzkristalls. Dahinter befinden sich zwei Kristalle mit scharfen Kanten und gleicher Form, welche von rechts nach links pyramidal zuläuft. Mit 30% (w/v) PEG 1000 (Abb. 16A, rechtes Bild) entstand ein Kristall von unregelmäßiger Form, der sich aus mehreren Plättchen zusammensetzt.

Während Salzkristalle im polarisierten Licht mit intensiveren Farben, die durch vielfaches Brechen des Lichtes durch den Kristall entstehen, erscheinen, zeigten die in Abbildung 16A dargestellten Kristalle eine Doppelbrechung, wie sie typisch für Proteinkristalle ist.

Der Lipid Overlay Assay sowie der Liposomen-binde Test zeigten eine Affinität des isolierten Proteins zu Lipiden. Aus diesem Grund wurde ein

Kristallisationsversuch mit einer künstlichen Membran, der Lipidic Sponge Phase, angesetzt, um das Protein nach der Integration in die artifizielle Membran zu kristallisieren. Pro Reaktionsansatz wurden gleiche Volumina der Lipidic Sponge Phase (40% (w/w) PEG 400; 30% (w/w) 25 mM Tris/HCl pH 7,0; 30% (w/w) Monoolein/Lipid 100:1), Proteinlösung (10 μ g in 10 mM Tris pH 7,5) und Reservoir-Lösung eingesetzt sowie bei 20 °C gelagert. Nach zwei Monaten Inkubation zeigten sich in der selbst hergestellten Lipidic Sponge Phase unter vier Bedingungen potentielle Proteinkristalle. Abbildung 16B, linke Spalte, oberes Bild zeigt einen Kristall in einem Ansatz mit 25% (w/v) PEG 2000 MME mit 0,1 M Hepes pH 6,5. Der Kristall besitzt scharfe Kanten und eine gleichmäßige Form und ist mit Präzipitat umgeben. Ein Ansatz mit gleichem Puffer aber mit 30% eines Polyethylenglycols mit geringerer Molekülmasse (PEG 300) resultierte in der Bildung von dünnen Nadeln, die als Sphärulite bezeichnet werden. Die rechte Spalte zeigt Kristallisationsansätze mit 0,1 M Sodium Acetat pH 4,6 und PEG mit verschiedenen Molekülmassen, welche nach zwei Monaten beobachtet wurden. Das obere Bild (25% (w/v) PEG 2000 MME) zeigt einen Kristall aus mehreren Plättchen, während das untere Bild (25% (w/v) PEG 400 MME) zwei Kristalle von gleicher Form zeigt. Bei beiden Kristallen war unter dem Polarisationsmikroskop eine Doppelbrechung zu erkennen.

Die entsprechenden Kristalle wurden geerntet und in die Röntgenanlage eingespannt. Abbildung 16C zeigt exemplarisch ein Diffraktionsmuster für alle geernteten Kristalle. Das gezeigte Diffraktionsmuster ist typisch für Salzkristalle und nicht für Proteine. Ferner wurde zur Veranschaulichung eines Proteinkristalls, welcher hier als Kontrolle bezeichnet wird, ein Diffraktionsmuster von Thrombin erzeugt.

5.7.3 NMR

Die Strukturauflösung der NMR-Spektroskopie ist durch die Größe des zu untersuchenden Moleküls begrenzt. Dennoch wurde die dreidimensionale Struktur von Proteinen mit gleicher Größe wie MRNO51 über einen längeren Zeitraum mit entsprechender Puffer-Optimierung gelöst. Das hier zu untersuchende Protein MRNO51 wurde zunächst im Rahmen eines Vorversuchs per NMR-Spektroskopie betrachtet. Dafür wurde das Protein zunächst isoliert und der Waschpuffer durch PBS

ersetzt. Der Transport zur NMR-Spektroskopie-Anlage erfolgte am gleichen Tag bei 4 °C. Das Protein wurde in flüssiger Form in die Anlage gegeben. Die Induzierung des magnetischen Feldes mit MRNO51 bei 4 °C resultierte in einem 1D-NMR-Spektrum (Abb. 17A) mit einer zu geringen Auflösung zur Strukturaufklärung. Auch die Erhöhung der Temperatur auf 20 °C und die damit beschleunigte Molekularbewegung resultierte in einem 1D-NMR-Spektrum mit einer Auflösung gleicher Qualität.

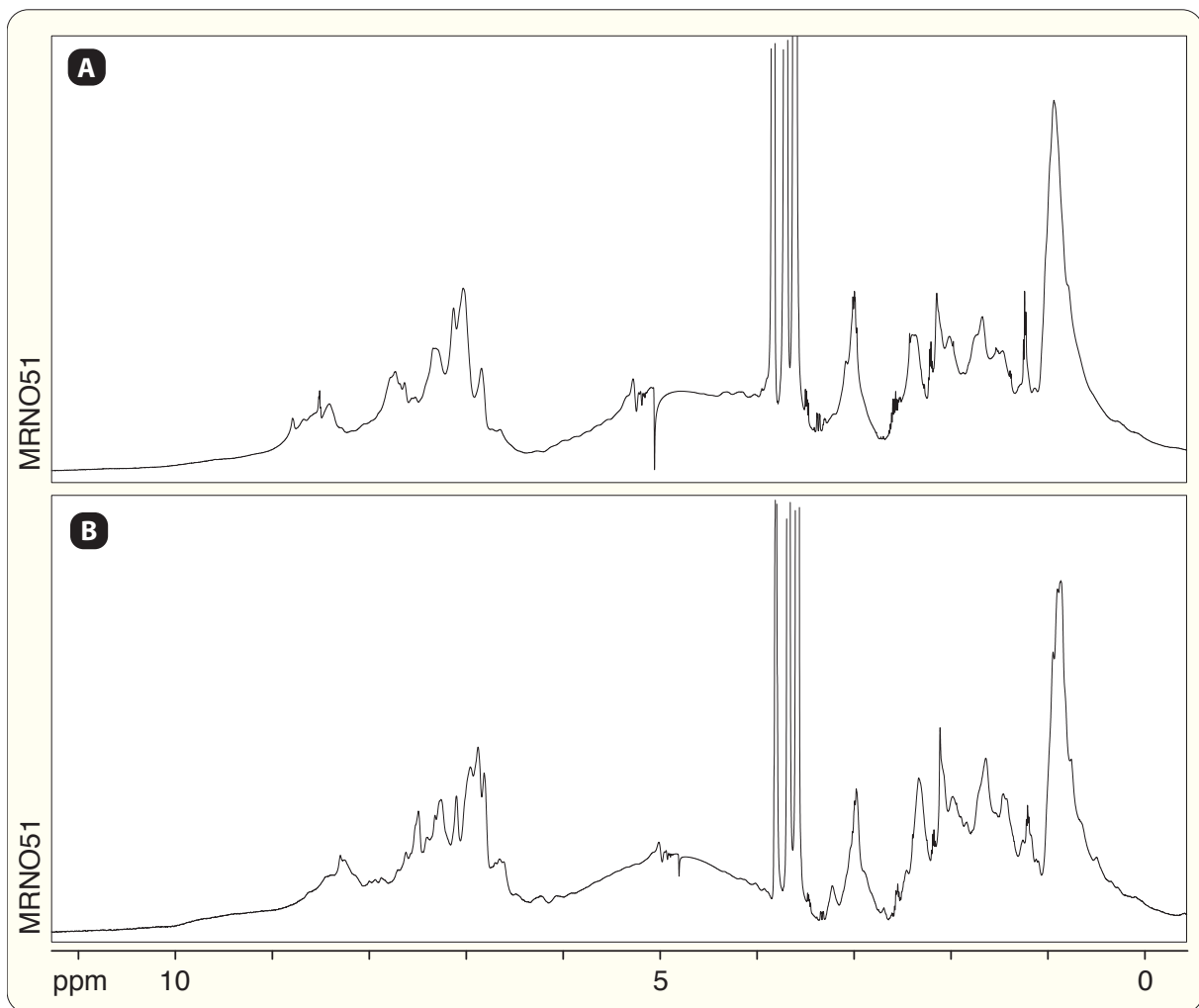


Abbildung 16: H-nuclear magnetic resonance (NMR) Spektrum von MRNO51 in PBS als Test für die Strukturanalyse des Proteins. Die erzeugten NMR-Spektren in parts per million (ppm) bei 4 °C (A) als auch bei 20 °C (B) resultieren in einer zu geringen Auflösungen für die Strukturaufklärung von MRNO51 mit dieser Methode.

6. Diskussion

Seit der ersten Entdeckung einer Lipid-bindenden Domäne im Jahre 1989 wurden bis heute insgesamt 11 Lipid-Bindungsdomänen, einschließlich C1, C2, PH, FYVE, PX, ENTH, ANTH, BAR, FERM, Tubby und PDZ (Abb. 1), sowie drei posttranslationale Modifikationen, die Membranbindung ermöglichen (Abb. 2), beschrieben. Lipid-bindende Domänen weisen konservierte Strukturen (C1, C2, PH) und/oder konservierte Aminosäure Wiederholungen auf (FYVE, PX, ENTH, ANTH, BAR, PDZ, FERM). Bis auf die PDZ-Domänen wurden Lipid-bindende Domänen sowie posttranslationale Modifikationen nur in Eukaryonten identifiziert. Zudem ermöglichen unterschiedliche strukturelle Mechanismen die Membranbindung und damit die Steuerung von zellulären Signalmechanismen. Proteine mit Modulen, welche zur Membranbindung dienen, sind in vielen zellulären Prozessen, einschließlich Membrantransport und Signaltransduktion, identifiziert worden.

MORN-Motive, wenn nacheinander angeordnet als Domäne organisiert, können als weitere potentielle Bindungsdomänen angesehen werden, welche in verschiedenen Proteinen, von Bakterien über Pflanzen bis hinzu Tieren, identifiziert wurden. Ihre Anzahl variiert zwischen 2 und 17, ebenso ihre Anordnung innerhalb des Proteins. So finden sich MORN-Motive am N-Terminus, C-Terminus, mittig, oder über die gesamte Länge des Proteins. Die eigentliche Funktion des Motivs ist bis dato nicht im Detail geklärt. Nichtsdestotrotz finden sich MORN-Motive in Proteinen mit diversen Funktionen. So sind MORN-Proteine involviert in der Anlagerung der Plasmamembran an das endoplasmatische Retikulum (ER), oder an das Retikulum (SR) (Landstrom et al. 2007; Takeshima et al. 2000), in der Zellspaltung von *Toxoplasma gondii* (Gubbels 2006), oder in der Spaltung von Chloroplasten in *Arabidopsis* (Maple et al. 2007; Shimada et al. 2004) sowie in der gerichteten subzellulären Lokalisierung pflanzlicher PIPKs an Membranen (Ma et al. 2006). Des Weiteren besitzen die MORN-Proteine Alsln und die pflanzlichen PIPKs enzymatische Funktionen. Alsln ist ein Rab5 Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF), der den endosomalen Membrantransport steuert (Kunita et al. 2004), während Pflanzen-PIPKs mehrere regulatorische Effekte durch eine Kinase-Domäne vermitteln (Im et al. 2007; Ma et al. 2006). Zusammenfassend wird gezeigt, dass MORN-Motiv tragende Proteine vielfältige Funktionen besitzen, welche stets mit der Membranbindung assoziiert sind.

6.1 Dient die expandierte MORN-Familie in Ciliaten als hauptsächliches Membran-binde Motiv?

Die bisherigen Untersuchungen zur MORN-Protein-Familie bezogen sich hauptsächlich auf Pflanzen und Tiere (Abb. 3). Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst die phylogenetische Verteilung von MORN-Proteinen analysiert werden. MORN codierende Proteine werden in allen nach Woese et al. (1990) definierten Domänen des Lebens sowie in einigen Viren gefunden (Abb. 4). In der InterPro (Hunter et al. 2012) sowie in der Pfam Datenbank (Finn et al. 2014) sind für Bakterien und Eukaryoten jeweils tausende von MORN-Proteinen aufgelistet, allerdings nur zwei für Archaea. Im Allgemeinen sind Membran-bindende Domänen entweder nicht in Archaeen identifiziert, beziehungsweise werden wie die C2-, C1-, FERM- PH- und PX-Domänen in einer ähnlichen Anzahl wie die MORN-Motive in Archaeen codiert oder sind wie PDZ-Domänen mit 690 Proteinen deutlich expandiert. Jedenfalls scheint das isolierte Auftreten von zwei nahezu identischen MORN-Proteinen in Archaeen, die sich nur durch eine einzige Aminosäure ganz am C-Terminus unterscheiden, ein Indiz für eine Akquisition, die fünfmal häufiger von Bakterien zu Archaeen auftritt als umgekehrt (Nelson-Sathi et al. 2014), von diesen MORN Protein codierenden Genen in den zwei Euryarchaeota zu sein.

Menschen kodieren die größte Vielfalt an MORN-Proteinen unter Säugetieren, aber Ciliaten die größte Vielfalt unter allen Eukaryonten. Während die Familie der MORN-Motive unter den Ciliaten expandiert ist, sind die anderen Lipid-bindenden Domänen in deutlich weniger Proteinen vertreten. Dadurch stellt sich die Frage, ob die Ciliaten anstelle der bereits charakterisierten Domänen, das MORN-Motiv hauptsächlich zur Membranbindung nutzen. Interessanterweise besitzen die basalen Ciliaten der Klasse der Oligohymenophorea (Swart et al. 2013) mehr MORN-Proteine. So sind für *Paramecium tetraurelia* 460, *Ichthyophthirius multifiliis* 142 und *Tetrahymena thermophila* 132 individuelle Gene, welche Proteine mit mindestens einem MORN-Motiv codieren, in der InterPro Datenbank notiert.

6.2 *Tetrahymena* MORN-Motive sind divers und treten in Verbindung mit einer Vielzahl von anderen Proteindomänen auf

Nachdem die phylogenetische Analyse von Proteinen mit MORN-Motiven zeigte, dass es sich um ein ubiquitär auftretendes Motiv handelt, welches unter Ciliaten expandiert ist, sollte die Expression der Gene in *Tetrahymena*, welche Proteine mit diesem Motiv kodieren, sowie deren Domänenarchitektur, analysiert werden. MORN-Motiv codierende Gene zeigen vier verschiedene Expressionsmuster, die zusammen den Lebenszyklus von *Tetrahymena* abdecken. Das durchgehend hohe Level an Expression der housekeeping MORNs ist ein Indiz dafür, dass die Gene im Wesentlichen in wichtigen zellulären Prozessen des Stoffwechsels oder Zellwachstums involviert sind (Miao et al. 2009). So sind bereits untersuchte housekeeping Gene zum Beispiel mit Cilien (Gaertig et al. 1993; McGrath et al. 1994), Membranfusion und Zellteilung assoziiert (Miao et al. 2009). Gene mit der höchsten Expression während der vegetativen Phase sind in der Mitose aktiv und spielen wahrscheinlich dort eine essentielle Rolle in der Teilung des MAC sowie in der Verdopplung des cytoplasmatischen Volumens (Yao und Chao 2005). Außerdem wurde schon gezeigt, dass MORNs essentiell für die Abschnürung der Tochterzelle in Aveolaten sind (Lorestani et al. 2010). Für die in der frühen Konjugation hochregulierten MORN-Gene liegt nahe, dass diese in Prozessen wie die RNAi vermittelten IES (engl. *internal eliminated segment*) Eliminierung (Mochizuki et al. 2002), sowie in der Meiose (Mochizuki und Gorovsky 2005), welche in den ersten Stunden der Konjugation initiiert werden, involviert sind. Interessanterweise gibt es keine MORN codierenden Gene, die spezifisch nur in der Hungerphase hochreguliert sind. Das deutet darauf hin, dass diese Gene nicht an Signalübertragungswege in diesem Teil des Lebenszyklus beteiligt sind (Miao et al. 2009), welche die Zelle auf die Transformation der Morphologie (Nelsen 1978; Nelsen und Debault 1978) sowie die beginnende Konjugation vorbereiten (Bruns und Brussard 1974; Bruns und Palestine 1975).

Die meisten *Tetrahymena* Proteine besitzen MORN-Motive am C-Terminus. Am zweithäufigsten ist das Motiv über die Länge des Proteins verteilt oder mittig angeordnet. Die Variation der Position von MORN-Motiven innerhalb eines Proteins konnte schon in anderen Organismen gezeigt werden. Dennoch zeigen die bisher charakterisierten MORN-Proteine eine andere Verteilung, zum Beispiel mit einer

Präferenz am N-Terminus in RSP44 und MCA. Dabei stechen besonders die großen MORN-Protein-Familien PIPK (Ma et al. 2006; Mueller-Roeber und Pical 2002) und Junctophilins (Landstrom et al. 2014; Takeshima et al. 2000) mit MORN-Motiven am N-Terminus hervor. Die C-terminale Orientierung des MORN-Motivs wurde in ALS2, BrMORN, ARC3 und Protein überspannende oder mittig angeordnete MORN-Motive in den Apicomplexa MORN1 Homologen, MSAP und Retinophilin identifiziert.

Vorangegangene Experimente zeigten, dass MORN-Motive auch in Verbindung mit anderen Domänen assoziiert sein können (Kunita et al. 2007; Lee et al. 1999; Ma et al. 2006; Takeshima et al. 2000), die dem MORN-Motiv tragenden Protein zusätzliche Attribute wie Membranverankerung beziehungsweise enzymatische Funktion verleihen. Von den insgesamt 132 MORN codierenden Genen in *Tetrahymena* codieren 34 neben dem MORN-Motiv andere Domänen mit unterschiedlichen Funktionen. Am häufigsten treten MORN-Motive mit Proteinkinasen mit unbekannter beziehungsweise Serine/Threonin-Spezifität auf. Proteinkinasen weisen zwar unterschiedliche Strukturen, Regulationsmechanismen und Substratspezifität auf (Hanks und Hunter 1995), ihre Funktion ist aber evolutionär von *Escherichia coli* bis Menschen konserviert (Manning et al. 2002a). MORN-Gene, die Proteinkinase codieren, sind in der Wachstums- und Hungerphase sowie während der Konjugation von *Tetrahymena* exprimiert. Das unterstreicht die Rolle von Proteinkinasen in einer Vielzahl von zellulären Prozessen, einschließlich der Zellteilung, Proliferation, Apoptose und Differenzierung (Manning et al. 2002b).

Die Bedeutung der MORN-Motive als Membran-bindene Domäne ist aufgrund ihrer Substratspezifität besonders für Enzyme essentiell. Die MORN-Motive in *Tetrahymena* mit Proteinen mit enzymatischer Funktion können der richtigen subzellulären Lokalisation dienen, was schon für PIPK (Ma et al. 2006) und Alsin (Otomo et al. 2003) gezeigt wurde. Erwähnenswert sind auch die *Tetrahymena* MORN-Proteine mit N-terminalen Transmembran-Domänen, die von der Domänenarchitektur eher BrMORN (Lee et al. 2009) als den Junctophilins (Landstrom et al. 2014; Takeshima et al. 2000) ähneln. BrMORN sowie die Junctophilins nutzen ihre MORN-Domänen zur Membranbindung, während die Transmembran-Domäne an Chloroplasten beziehungsweise an das endoplasmatische/sarkoplasmatische Retikulum bindet. Die Lokalisation dieser *Tetrahymena* MORN-Proteine mit Transmembran-Domänen ist noch ungeklärt, die

Assoziation mit Zellorganellen liegt aber nahe, da Transmembran-Domänen Spezifitäten für eine Vielzahl von Organellen aufweisen (Sharpe et al. 2010). Eine Stabilisierung der Mitochondrien durch Verknüpfung an die aveolare Membran, ähnlich wie die Septins, wäre vorstellbar (Wloga und Frankel 2012).

Jedenfalls besteht kein Zusammenhang bestimmter Genexpressionsprofile zur Orientierung der MORN-Motive, der Zusammensetzung der Domänen oder der Assoziation mit anderen Proteindomänen. Die MORN-Proteine in *Tetrahymena* scheinen sich nicht wie eine typische Gen-Familie entwickelt zu haben. Aber aufgrund der universellen Eigenschaft des Motivs treten MORN-Domänen in einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen, welche sich durch Rekombination des genetischen Materials oder durch sogenanntes Exon-Shuffling, welches besonders in Multidomänen-Proteinen vorkommt (Gilbert 1978; Patthy 1996; Patthy 1999), entwickelt haben.

6.3 Dienen allein die MORN-Motive einer bestimmten Lokalisierung?

Die Hypothese, dass MORN-Motive der Bindung an die Plasmamembran dienen, geht auf erste Experimente zurück, die zeigten, dass MORN-Motive am N-Terminus vom JPs mit einem gekürzten C-Terminus strikt an die Plasmamembran lokalisieren (Takeshima et al. 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst gezeigt, dass ein MORN-Protein mit 14 MORN-Motiven, welche sich fast über die gesamte Länge des Proteins strecken, zur Phospholipid-Bindung fähig ist (Abb. 9A). Mit dem Lipid Overlay Assay wurde diese Bindung noch spezifiziert. So bindet MRNO51 mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ an Cardiolipin (CL) und an 1,2-Diacylglycerin (DAG). Letzteres ist ein Membranlipid, das als Second Messenger in der Lage ist, cytosolische Proteine an eine Membran zu rekrutieren (Goni und Alonso 1999; van Meer et al. 2008).

Die C1-Domäne ist die einzige Lipid-bindene Membrandomäne mit einer Affinität für DAG (Cho 2001). Obwohl diese Domäne mit über 12.000 eukaryotischen Proteinen weit verbreitet ist, besitzen Ciliaten nur 20 Proteine mit dieser Domäne (Hunter et al. 2012). Die geringe Anzahl der Domänen und die expandierte MORN-Familie in den Ciliaten suggerieren, dass Ciliaten die MORN-Domäne hauptsächlich zur Bindung von DAG nutzen.

Bei der 100-fachen Konzentration zeigte MRNO51 eine hohe Affinität auch für Phosphatidylinositole und Phosphatidylserin, die zusammen mit über 50% den größten Anteil an Zellmembran-Lipiden in einzelligen Organismen, wie Hefe, bilden (van Meer et al. 2008). Weiterhin konnte die Bindung von MORN-Motiven an Phosphatidylinositole und Phosphatidylserin sowie an weitere Komponenten der Zellmembranen, auch in *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* MORN-Proteinen, gezeigt werden (Im et al. 2007; Ma et al. 2006).

Die Bindung des Proteins an CL, eine universelle Komponente von Mitochondrien in Eukaryonten (Ren et al. 2014), lässt eine mitochondriale Lokalisation vermuten. Immunfluoreszenz-Lokalisationen mit dem MRNO51-spezifischen Antikörper (Abb. 8D) und mit der N-terminalen GFP-getagten Variante des Proteins (Abb. 11) zeigten Lokalisationen, welche von denen mitochondrialer Proteine (Wloga und Frankel 2012) oder Mitochondrien in *Tetrahymena* abweichen (Kobayashi und Endoh 2003). Da CL eine starke Bindungsfähigkeit für viele strukturell nicht verwandte Proteine besitzt (Haines 2009; Ren et al. 2014), basiert die Bindung von CL an MRNO51 eher auf dem universellen Charakter des Lipids als auf einer spezifischen Bindung des Proteins.

Im Allgemeinen sind die gerichtete Lokalisation sowie die Bindung an Membranen für elf unterschiedliche Membran-Domänen bekannt (Abb. 1). Die Größe der Domänen reicht von der Kleinsten (C1-Domäne) mit 50 Aminosäuren (Hommel et al. 1994; Zhang et al. 1995) bis zur Größten (ANTH-Domäne) mit 300 Aminosäuren (Ford et al. 2001; Itoh et al. 2001). Des Weiteren zeigt jede der bisher charakterisierten Membran-bindenden Domänen nur kurze konservierte Motive und eine deutlich höhere Sequenzvariabilität als MORN-Domänen auf, deren Motive unter den Protisten und Eumetazoan stark konserviert sind (Ferguson et al. 2008; Gubbels 2006; Takeshima et al. 2000). Trotz der schwachen Homologie auf der Sequenz-Ebene, sind die jeweiligen Domänen aber strukturell konserviert. Nicht die Sequenzähnlichkeit, sondern eher eine gemeinsame Faltung der jeweiligen Domäne liefert die Lipidaffinität der Membran-bindenden Domänen (Cho 2001; Lemmon 2007; Lemmon et al. 2002).

Die allgemeine Membran-Bindefähigkeit der MORN-Domänen wird dagegen durch eine konservierte, 14-Aminosäuren lange, sich wiederholende (Abb. 6A) Aminosäuresequenz sicher gestellt. Ferner scheint es, dass die Motive im Tandem

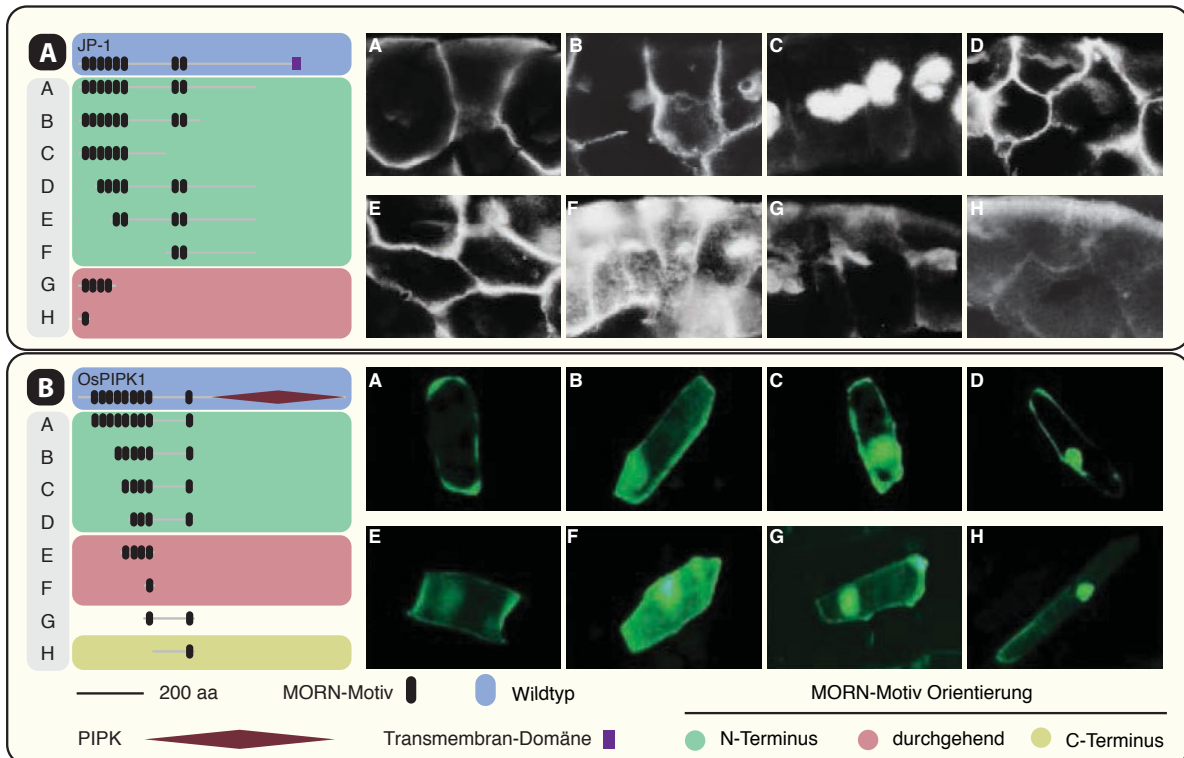


Abbildung 17: Die Anzahl von MORN-Motiven und deren Orientierung beeinflusst die subzelluläre Lokalisation von Proteinen. A) JP1-Varianten von Kaninchen expremiert in Embryonalzellen vom Frosch (Takeshima et al. 2000): Gekürztes JP1 mit allen MORN-Motiven wurde an der Plasmamembran (PM) lokalisiert (A, B). JP1 Variante mit sechs MORN-Motiven lokalisiert am Nukleus (C). JP1 Varianten mit gekürztem N-Terminus lokalisieren an der PM (D, E). Konstrukt F mit zwei MORN-Motiven am N-Terminus lokalisiert an der PM und Nukleus. Konstrukte mit einem (G) beziehungsweise vier MORN-Motiven (H) und einer durchgehenden Orientierung binden nicht an die PM und lokalisieren im Cytoplasma und letztere noch am Nukleus. B) Expression von *Oryza* Phosphatidylinositol-Phosphate-Kinase-1 (PIP1) in Epidermiszellen der Zwiebel (Im et al. 2007): OsPIP1 mit gekürztem C-Terminus und mit allen MORN-Motiven lokalisiert an der PM. Weitere Varianten mit N-terminalen und vier bis sechs MORN-Motiven wurden an der PM und dem Nukleus detektiert. MORN-Motive überspannende Proteine mit vier und einem Motiv lokalisieren an der PM beziehungsweise im Cytoplasma. Konstrukt G mit einem Motiv am N- und C-Terminus lokalisiert an der PM und am Nukleus. OsPIP1 Variante mit einem MORN-Motiv am C-Terminus lokalisiert hauptsächlich am Nukleus. Nachdruck der Immunofluoreszenz-Aufnahmen in Abbildung 18A und B mit freundlicher Genehmigung von Molecular Cell beziehungsweise Cell Research.

angeordnet sein müssen, um eine zuverlässige Membranassoziation vermitteln zu können (Ma et al. 2006, Takeshima et al. 2000). Allerdings ist die genaue Anzahl oder einzelne Anordnung der MORN-Motive, welche eine spezifische Lipid-Bindung gewährleisten, noch nicht experimentell im Detail geklärt.

Wenn der Zweck der MORN-Motive in erster Linie darin liegt, ein Protein an eine Lipid-Doppelschicht zu binden, stellt sich die Frage, in welchem Ausmaß sich die subzelluläre Lokalisation von MORN-Proteinen unterscheidet, wenn die Zusammensetzung der MORN-Motive dieser Proteine nahezu identisch ist. Zu diesem Zweck wurden vier Proteine am C-Terminus mit GFP markiert und lokalisiert. Alle vier Kandidaten teilen eine hohe Sequenzähnlichkeit und sind Homologe zu

*Pf*MORN1 (PF3D7_1031200) und *Tg*MORN1 (TGME49_310440), gut untersuchte MORN-Proteine in den Apicomplexa *Plasmodium* beziehungsweise *Toxoplasma* (Ferguson et al. 2008; Gubbels 2006; Lorestani et al. 2010). Drei der vier Proteine beherbergen neun MORN-Motive, welche in einer Reihe am C-Terminus angeordnet sind (MRNC36, TTHERM_01084170; MRNC38, TTHERM_00378500; MRNC39, TTHERM_00590130), während der vierte Kandidat 14 aufeinanderfolgende MORN-Motive, welche sich fast über die gesamte Länge des Proteins erstrecken (MRNO51; TTHERM_00584930), besitzt. Studien von veränderten Reis und Kaninchen MORN-Proteinen zeigten, dass die Anzahl der MORN-Motive in Kombination mit ihrer Ausrichtung innerhalb des Proteins die subzelluläre Lokalisation im Vergleich zum Wildtyp-Protein beeinflusst (Ma et al. 2006; Takeshima et al. 2000). Dies führte zu der Hypothese, dass die gleiche Ausrichtung sowie die gleiche Anzahl von MORN-Motiven und damit eine ähnliche vorhergesagte Lipidbindungseffizienz der MORN-Domäne zu einer identischen Lokalisierung der Proteine führen würde. Allerdings zeigten alle vier der analysierten MORN-Proteine unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen (Abb. 11). Zudem zeigte die ektopische Expression von MRNO51 eine gerichtete punktförmige Lokalisation in *E. coli*, was von der ringförmigen Lokalisation des *Toxoplasma* homolog von MRNO51 in *E. coli* abweicht (Heaslip et al. 2010). Dennoch kann die Tendenz, sich in einem Fremdorganismus selbst zu assemblieren auf eine strukturelle Funktion hindeuten, was mit der Zytoskelett beziehungsweise Pellicula-Assoziation der MRNO51 Homologe einhergeht (Gould et al. 2011).

Ein MORN-Protein mit einer deutlichen strukturellen Funktion ist das *Trichomonas* Protein TVAG_182670, das als struktureller Bestandteil des Zytoskeletts in einer Fraktionierung mit anschließender MALDI identifiziert wurde. Die anschließende Lokalisation von TVAG_182670, die eine deutliche Assoziation mit der Pelta aufwies, deutet darauf hin, dass das MORN-Protein bei der Bildung der Unterstützung des Flagellen Kanals, aus dem die Flagellen entspringen, eine essentielle Rolle spielen kann (Benchimol 2004; Honigberg et al. 1971).

Zusammenfassend lassen diese Resultate zwei wichtige Folgerungen zu: (i) Die Domänenarchitektur eines MORN-Proteins gibt keine Rückschlüsse auf die Lokalisation von Proteinen mit der selben Domänenarchitektur und (ii) die Spezifität der Lokalisation der MORN-Proteine liegt entweder innerhalb der weniger

konservierten Aminosäuren des Motivs (Abb. 1A) oder ist MORN-Motiv unabhängig. Die MORN-Motive, wenn nacheinander angeordnet, funktionieren als universelle Membran-Bindungsdomäne in einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen, ähnlich der Funktion der C1-, C2- und Pleckstrin-Homologie-Domänen. Die allgegenwärtige Präsenz der MORN-Motive unter den eukaryotischen Gruppen spiegelt die Bedeutung dieser Domänen im Allgemeinen und insbesondere in Ciliaten, in denen die Familie der MORN-Protein massiv expandiert ist, wieder. Für Ciliaten wird angenommen, dass expandierte Gen-Familien, die eine besondere biologische Bedeutung für die Protisten haben, gezielt nach Genomduplikation ausgewählt werden, um nach diesen Ereignissen bestehen zu bleiben (Chalker und Stover 2007; Eisen et al. 2006).

6.4 Strukturanalyse

Da die repetitiven Anordnungen der Motive für die Bindung an Plasmamembranen essentiell zu sein scheinen, stellt sich die Frage, inwieweit MORN-Motive an der Formung der Tertiärstruktur beteiligt sind. Zunächst wurden vor dem experimentellen Ansatz bio-informatische Vorhersagen zu dem MORN-Protein MRNO51 durchgeführt. Dazu wurden Programme mit unterschiedlichen Algorithmen genutzt. Während PSIPRED und die HCA-Methode die Sekundärstruktur vorhersagen, kann I-TASSER die Tertiärstruktur durch bisher bekannte Strukturen prognostizieren. In allen drei genannten Modellen können die MORN-Aminosäure-Wiederholungen an der Formung der kurzen β -Faltblätter beteiligt sein. Unterstützt werden die Vorhersagen durch Strukturdaten der MORN beherbergenden Histon-Methyltransferase SET7/9 (Kwon et al. 2003; Wilson et al. 2002), welche darauf hindeuten, dass individuelle MORN-Motive aus kurzen β -Faltblattregionen bestehen können und so gefaltet vorliegen, dass sie eine relativ flache und große Oberfläche erzeugen, welche die Bindung an Membranen begünstigt. Da sich die bisher durchgeführten Strukturanalysen auf gekürzte Proteine mit einer beziehungsweise zwei Domänen beschränken, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Protein, das fast vollständig aus MORN-Motiven besteht, analysiert werden, um die Funktion der Motive zu eruieren.

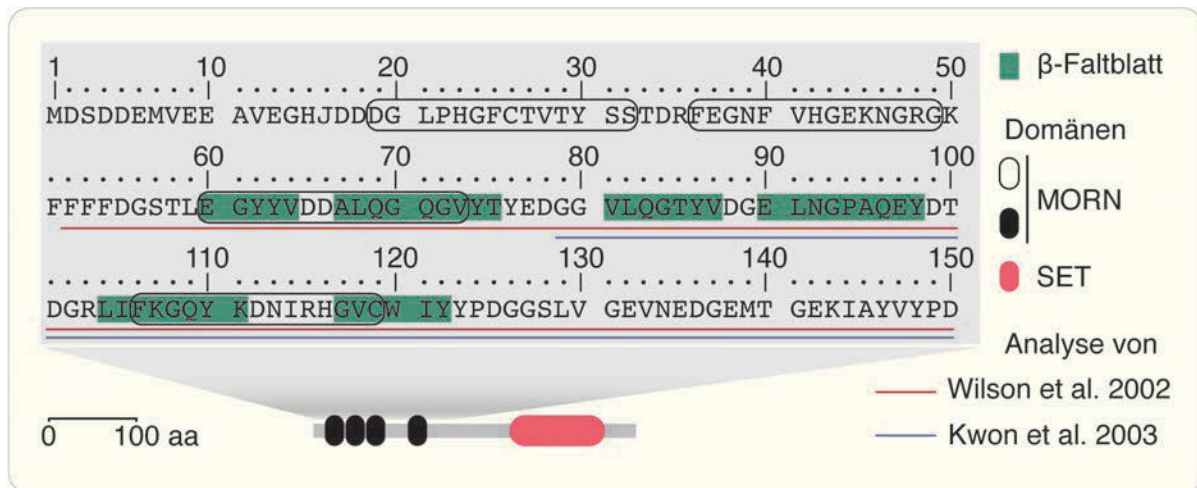


Abbildung 18: Ausschnitt der Sekundärstruktur von SET7/9, einer Histon-Methyltransferase (HMTase) mit vier MORN-Motiven basierend auf den Strukturaufklärungen von Kwon et al. 2003 und Wilson et al. 2002. In beiden Experimenten wurden SET7/9 Varianten mit einem gekürzten N-Terminus verwendet. Das dritte und vierte MORN-Motiv ist an der Ausbildung von β -Faltblättern beteiligt.

Zunächst wurde für die Strukturaufklärung MRNO51 per FPLC aus *E. coli* isoliert. Während das, in Bakterien produziert, rekombinante MRNO51 löslich ist, besitzen das Ciliaten MRNO51 und das *Toxoplasma* Homolog einen unlöslichen Charakter und konnten erst nach einer Detergenzien-Extraktionen als Proteine der Pellicula (Gould et al. 2011) beziehungsweise des Zytoskeletts (Gubbels 2006) identifiziert werden. Die richtige Größe von 49 kDa von MRNO51 wurde per Gelelektrophorese bestätigt (Abb. 7D). Anschließend wurde das Protein in einem Puffer mit niedriger Ionenstärke konzentriert. Die Kristallisationsansätze, welche nach dem Microbatch-Verfahren (Chayen et al. 1990) durchgeführt wurden, führten zur Bildung von Kristallen. Bei der mikroskopischen Überprüfung der Kristalle zeigten sie eine Doppelbrechung, wie sie für viele Proteinkristalle üblich ist (Caffrey und Cherezov 2009; Echalié et al. 2004; Judge et al. 2005; Pantic-Tanner und Eden 1999). Nichtsdestotrotz zeigten die geernteten, vermeintlichen Proteinkristalle in der Röntgenstrukturanalyse ein untypisches Diffraktionsmuster für Proteine. Mit der in den Lipid-binde Tests gewonnenen Erkenntnis, dass GST::MRNO51 eine Affinität für DAG besitzt, wurden Kristallisationsansätze mit einer artifiziellen Membran (Lipidic Sponge Phase) angesetzt, welche dazu dient, dass das Protein die richtige Konformation zur Kristallisation annimmt (Wadsten et al. 2006). Jedenfalls zeigten die in diesem Ansatz geerntete Kristalle in der Röntgenanlage kein Proteinen entsprechendes Diffraktionsmuster. Die Schwierigkeit der Kristallisation beruht

wahrscheinlich auf der Aminosäurekomposition von MRNO51. Das Protein gilt aufgrund seiner geladenen repetitiven Motive zu den *charged repeat motif proteins* (CRMPs) (Gould et al. 2011). CRMPs sind potentiell eine neue Gruppe von Intermediär Filamenten, da bisher charakterisierte CRMPs Zytoskelett-Assoziationen (El-Haddad et al. 2013; Gould et al. 2011) aufweisen und homolog betreffend der Ladung zu Intermediär Filamenten, wie Lamin, sind. Intermediär Filament-Proteine gelten als schwierig zu kristallisieren (Kim und Coulombe 2007). Des Weiteren zeigten die MRNO51 Homologe (Gubbels 2006; Heaslip et al. 2010; Lorestani et al. 2010) sowie andere MORN-Motive tragende Proteine Membran Assoziationen (Ma et al. 2006, Takeshima et al. 2000).

Im Allgemeinen hat sich die strukturelle Analyse von Membranproteinen als schwierig erwiesen. Obwohl 25% aller Proteine Membranproteine sind (Carpenter et al. 2008), wurden erst weniger als 1.000 in ihrer Struktur charakterisiert (Rose et al. 2015). Das liegt an der teilweise hydrophoben Oberfläche, der Flexibilität und der fehlenden Stabilität dieser Proteine (Carpenter et al. 2008). Da die ersten Reaktionsansätze in der Regel unter der Verwendung von Multiwell Platten und dem Dampfdiffusionsverfahren durchgeführt werden, wurden die Reaktionsansätze im Rahmen dieser Arbeit auch nach dieser Methode durchgeführt. Obwohl hierfür vergleichsweise viele Kristallisationskits, zum Beispiel bei Qiagen (Hilden) 23 Stück mit 96 unterschiedlichen Bedingungen für lösliche Proteine, verfügbar sind, enthalten sie viele Bedingungen, bei denen Membranproteine wahrscheinlich nicht kristallisieren. Aus diesem Grund wurden bereits Kristallisation-Screenings konzipiert, die für Membranprotein-Kristallisation optimiert sind (Newstead et al. 2008; Prive 2007), welche aber nicht zwangsläufig den Erfolg der Kristallisation garantieren. So wurden auch in dieser Arbeit Kristallisationskits für Membranproteine verwendet. Außerdem kann die Kristallqualität auch mit Hilfe von zu dem Kristallisationstropfen hinzugegebenen Additiven (Co-Faktoren, Reduktionsmittel und Polymeren) verbessert werden. Manchmal wird die Kristallisation von Membranproteinen in Gegenwart von artifiziellen Membranen, wie der Lipidic Sponge Phase oder Bizellen (Wadsten et al. 2006), an denen Membranproteine frei binden, sich Anreichern und die richtigen Konformationen annehmen können, erreicht. Jedenfalls zeigte dieser experimentelle Ansatz keinen Erfolg bei der Kristallisation, wobei er nur auf ein Lipid (DAG) beschränkt wurde. Mit der Kombination von mehreren Lipiden, wie sie durch

den Lipid Overlay Assay mit einer höheren Proteinkonzentration identifiziert wurden, könnte die Kristallisation eventuell erreicht werden.

Alternativ zur Röntgenstrukturanalyse wurde die NMR-Spektroskopie für die Strukturaufklärung von MRNO51 getestet. Die Isolierung erfolgte wie bei der Kristallisation. Das in PBS konzentrierte Protein wurde bei unterschiedlichen Temperaturen, die in unterschiedlicher Molekularbewegung resultierten, analysiert. In beiden Fällen zeigte das Spektrum eine zu geringe Auflösung, um Aussagen zur Struktur treffen zu können. Mit 49 kDa ist MRNO51 ein schwieriger Kandidat für die Strukturaufklärung per NMR, da diese Methode hauptsächlich für die Strukturaufklärung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von unter 10 kDa genutzt wird (Rose et al. 2015). Die aktuelle Größenbeschränkung von vollen Längen Proteinen für die NMR-Spektroskopie liegt ungefähr bei 50 kDa (Krishnan und Rupp 2012). Dies ist durch zwei technische Hindernisse bedingt: (i) größere Moleküle besitzen eine langsamere Bewegungsrate und kürzere Relaxationszeiten der NMR-Signale, was in der Reduzierung der Empfindlichkeit der Pulssequenzen resultiert und (ii) erhöhtes Molekulargewicht führt aufgrund der höheren Anzahl von NMR-aktiven Kernen und der daher erhöhten Wechselwirkungen zwischen diesen zu mehr Komplexität im resultierenden Spektrum (Yu et al. 1999).

MORN-Motive, wenn hintereinander angeordnet, dienen aufgrund der Beteiligung an der Ausbildung von β -Faltblättern zur Erweiterung der Proteinoberfläche. Die gleiche Strategie nutzen auch andere Membran-bindende Domänen wie C1-, C2-, FYVE-, PX- und PDZ-Domänen (Cabral et al. 1996; Cheever et al. 2001; Dumas et al. 2001; Essen et al. 1996; Hommel et al. 1994). Die erweiterte flache Topologie von MORN-Motiven könnte es Proteinen ermöglichen, sich zu organisieren und Proteine, Phospholipide und andere Komponenten an der Membranoberfläche zu stabilisieren. Dies stünde im Einklang mit der Beobachtung, dass MORN-Proteine häufig Teil von größeren Proteinkomplexen sind (Ju und Huang 2004; Kunita et al. 2007; Satouh et al. 2005).

6.5 Rückschlüsse aus dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Domänenarchitektur von MORN-Motiv tragenden Proteinen und ihrer Lokalisation, sowie der Lipid Affinität des MORN-Motivs selbst in *T. thermophila* analysiert. Die wichtige biologische Bedeutung des Motivs wurde zunächst durch die Darstellung seiner ubiquitären Verteilung gezeigt; es kommt in allen drei Domänen des Lebens vor. Darüber hinaus wurde ersichtlich, dass diese Gruppe von Proteinen in Ciliaten expandiert ist. Der Blick auf *T. thermophila* zeigte, dass MORN codierende Gene vier verschiedene Expressionsmuster innerhalb des Lebenszyklus des Ciliaten besitzen. Ein Zusammenhang zwischen Expressionsmuster und der Domänenarchitektur von MORN-Proteinen sowie deren Assoziation mit anderen funktionellen Domänen besteht aber nicht. Außerdem konnte in einer Fallstudie mit MRNO51 gezeigt werden, dass MORN-Motive Phospholipide binden. Die Hypothese, dass MORN-Proteine mit nahezu gleicher Domänenarchitektur ähnliche Lokalisation zeigen, konnte nicht bestätigt werden. Dennoch unterstreichen die unterschiedlichen Lokalisationen der jeweiligen MORN-Proteine die universelle Funktion des Motivs. Seine Mannigfaltigkeit wurde zudem durch die Expression des *Tetrahymena* Proteins MRNO51 in *E. coli*, in dem das MORN-Protein punktförmig akkumulierte und durch die Lokalisation von einem *Trichomonas vaginalis* MORN, welches dieselbe Zytoskelett-Assoziation in *T. vaginalis* und *T. gallinarum* aufweist, gezeigt. MRNO51 ließ sich zwar isolieren, konnte aber nicht per Microbatch-Verfahren kristallisiert werden. Auch die Behandlung durch Hinzugabe einer artifiziellen Membran resultierte darin, dass MRNO51 die Konformation zur Kristallisation nicht annimmt. Dennoch können die gewonnenen Erkenntnisse der Lipidaffinität von MRNO51 in den hier durchgeführten Lipidbindetests für weitere Kristallisationsansätze genutzt werden.

6.6 Ausblick auf weitere Versuche

Die große Anzahl an MORN-Proteinen in Ciliaten erschwert zunächst den Überblick über die potentielle Funktion des Motivs. Aber vor allem die MORN-Proteine von *Tetrahymena*, welche beispielsweise während der Konjugation hochreguliert sind, besitzen das Potenzial, als neue, wichtige Akteure in Bezug auf die Kommunikation

der beiden komplementären Zellen und der Fusionierung während der sexuellen Fortpflanzung identifiziert zu werden.

Bezüglich der Lipidbindung der MORN-Motive könnte näher untersucht werden, ob verschiedene Proteine mit ähnlicher Domänenarchitektur, zum Beispiel die PIPKs von *Arabidopsis Thaliana*, die gleichen Lipide binden. Da die Lipidaffinität auf den sich wiederholenden Aminosäuren basiert, wäre es interessant, weniger konservierte Aminosäuren des Motivs zu manipulieren, um zu bestimmen, wie weit diese die Lipid-Bindung beeinflussen.

Die Strukturaufklärung von MORN-Proteinen bleibt eine Herausforderung, würde aber weiteren Aufschluss über die Funktion des Motivs geben. Dennoch würde sich empfehlen für die NMR-Spektroskopie, die Kristallisation zwecks Röntgenstrukturanalyse sowie die Atomic Force Mikroskopie kürzere MORN-Proteine oder Varianten von einem MORN-Protein zu verwenden.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AF	Aktin-Filamente
BB	Basalkörper
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovines (Rinder-)Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
CdCl ₂	Cadmiumchlorid
CIL	Cilium
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRMP	charged repeat motif protein
CT	Cytostom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank der Universität von Iowa
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
Fe	Eisen
FPLC	Fast protein liquid chromatography
g	Gramm
GFP	Grün Fluoreszierendes Proteine
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IF	Intermediär Filament
IgG	Immunoglobulin
k	Kilo
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LB	lysogeny broth
LM	longitudinale Mikrotubuli
M	mol pro Liter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction

PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert; $\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$
PIPES	1,4-Piperazinediethanesulfonic acid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RADAR	Rapid Automatic Detection and Alignment of Repeats in protein sequences
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sec	Sekunde
SPP	Super Proteose Pepton
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline mit Tween
TE	Tris EDTA
TetraFGD	<i>Tetrahymena</i> Functional Genomics Database
TGD	<i>Tetrahymena</i> Genome Database
TM	transversale Mikrotubuli
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamine
U	Einheit, unit
v/w	Volumen Gewicht
w/w	Massenprozent
μ	Mikro (10^{-6})

8. Anhang

Tabelle S1 MORN-Proteine von *Tetrahymena thermophila* sortiert nach der MORN-Protein Annotierung ID der *Tetrahymena* genome database (ciliate.org), nicht verfügbare Werte sind mit na (nicht verfügbar) abgekürzt. Die MORN Nomenklatur MRNN, MRNC und MRNO wurde nach der Orientierung der MORN-Domänen am N-Terminus, C-Terminus bzw. durchgehend im Protein und / oder die Zusammenarbeit mit anderen Domänen, zugeordnet. Die Zahl der vorhergesagten MORN-Motive werden in der dritten Spalte angezeigt. Vorhergesagte Assoziationen mit weiteren Domänen werden durch folgenden Abkürzungen in Spalte vier angegeben: SK (Serin/Threonin-Proteinkinasen), PK (Proteinkinase), IQ (IQ-Motiv, EF-Hand-Bindungsstelle), ZF (Zinkfinger-Domäne), TM (Transmembran-Domäne), LRR (Leucin-reiche Regionen), WD40 (Tryptophan-Asparaginsäure Wiederholung), SAM (sterile Alpha-Motiv); na (nicht verfügbar). Spalten fünf bis zwanzig zeigen die Expressionswerte ohne Dezimalstellen während der logarithmischen Wachstumsphase (L), Hungerphase (S) und Konjugation (C) der Gen, welche MORN-Motiven kodieren an. Die Zahlen hinter den Buchstaben in Spalten fünf bis zwanzig zeigen die Stunden für jede Bedingung, welche analysiert wurde (siehe TGED für Details).

TTHERM	ID	#MORNS	Associated Domains	LI	Lm	Lh	S0	S3	S6	S9	S12	S15	S24	C0	C2	C4	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
TTHERM_00046940	MRNC01	2	na	1793	2077	2411	2507	2954	3465	2866	2288	2258	1808	1820	7780	4786	1816	1394	2776	4078	3484	2333	2508
TTHERM_00391430	MRNC02	2	na	2501	2789	3051	1620	1760	1605	2037	1817	1682	1538	2375	628	516	369	1286	1767	3671	3795	2173	2073
TTHERM_00499480	MRNC03	3	na	587	408	316	160	160	218	218	314	215	300	129	216	223	2488	1250	1495	600	822	616	414
TTHERM_00490940	MRNC04	3	na	73	60	83	182	309	279	273	200	261	196	171	57	53	59	77	375	202	173	234	193
TTHERM_00709600	MRNC05	3	na	699	766	842	792	926	1181	1148	838	1097	887	1081	432	242	455	413	434	512	436	489	417
TTHERM_00670360	MRNC06	3	na	553	473	524	384	269	373	235	229	231	193	223	137	138	150	143	147	213	213	194	190
TTHERM_00600230	MRNC07	3	na	145	483	616	2257	3060	1236	1449	1049	1116	1258	4246	4035	3500	3350	9082	4053	2652	1825	1605	1250
TTHERM_01106140	MRNC08	3	na	1534	1621	1380	1262	1107	1384	1035	729	851	829	514	296	157	341	306	577	815	636	566	461
TTHERM_00334470	MRNC09	3	na	3166	4371	4004	4308	6941	4917	5886	4666	4054	4572	9023	8290	13247	10779	7765	4400	3438	4065	4536	4821
TTHERM_00297110	MRNC10	3	na	245	219	205	207	105	120	88	74	72	91	130	166	75	197	211	203	174	194	196	184
TTHERM_00037070	MRNC11	4	na	338	280	248	302	270	406	343	282	267	256	165	60	118	344	585	1276	777	415	222	196
TTHERM_00300020	MRNC12	4	na	44	44	39	41	43	55	55	51	48	48	133	49	48	69	93	168	190	235	144	121
TTHERM_00437420	MRNC13	4	na	1903	2645	2213	2301	4512	3590	4624	4561	4608	4464	11599	3042	32032	15723	8104	6544	10590	11939	8549	6548
TTHERM_00277360	MRNC14	4	na	281	294	187	78	144	145	165	218	170	154	40	58	82	61	135	63	90	274	149	176
TTHERM_00125410	MRNC15	4	na	344	303	206	65	117	126	118	107	134	150	112	1826	315	167	91	187	230	88	66	44
TTHERM_00377350	MRNC16	4	na	4847	5208	4208	4556	4763	4299	4166	4307	4510	4647	4232	16066	5683	3053	3812	4869	11956	5122	3429	4478
TTHERM_00492700	MRNC17	4	na	502	410	450	750	613	535	535	639	666	737	538	1098	1366	967	1336	2391	1707	909	673	629
TTHERM_00149910	MRNC18	4	na	337	289	367	156	235	144	145	155	170	173	221	422	6557	22045	7742	3837	2102	2453	2913	1220
TTHERM_00857870	MRNC19	4	na	132	135	119	77	144	165	141	123	127	135	70	520	165	150	287	288	699	743	366	313
TTHERM_00391520	MRNC20	4	na	3028	3269	3432	1162	2360	2425	2714	2385	1911	1975	3519	4183	1494	839	1681	2271	3066	4947	5264	5366
TTHERM_00142460	MRNC21	4	na	385	421	374	508	502	335	394	451	497	486	279	244	413	382	398	455	404	507	451	491
TTHERM_00196110	MRNC22	4	na	1924	2145	1403	701	1046	762	1216	1153	882	946	1099	652	5431	2157	1663	1465	1959	3887	1882	2032
TTHERM_00728990	MRNC23	4	na	84	78	84	183	122	67	67	68	54	77	142	113	115	95	116	180	163	114	107	92
TTHERM_00757760	MRNC24	5	na	533	1030	702	211	271	237	202	114	120	92	247	1158	371	196	181	208	218	230	164	137
TTHERM_00729130	MRNC25	5	na	849	864	880	1096	1003	1158	1169	1193	1041	1120	1266	1237	598	646	886	1208	1590	1418	1395	1378
TTHERM_00670840	MRNC26	5	na	935	967	1030	1210	641	845	729	820	726	641	782	338	595	524	1057	1510	1097	915	719	842
TTHERM_00373800	MRNC27	5	na	329	282	242	375	280	307	246	206	231	301	421	882	303	188	191	316	447	343	239	234
TTHERM_00463770	MRNC28	5	na	5138	5697	6323	10314	6257	5006	5475	4962	4589	6071	8817	7787	5982	4958	9365	9453	9554	8008	8293	8914
TTHERM_00127110	MRNC29	5	na	2381	2705	2841	947	1993	1376	2385	2848	2880	3510	1989	11703	6743	3970	4003	3973	6485	3543	2708	2674
TTHERM_00486410	MRNC30	6	na	421	471	373	310	213	215	249	296	331	352	296	109	155	211	444	475	642	769	447	353
TTHERM_00043930	MRNC31	7	na	94	106	177	658	521	621	512	402	508	450	417	129	521	317	257	544	603	737	698	725
TTHERM_00245490	MRNC32	7	na	300	299	247	172	185	172	185	172	203	207	218	238	129	160	362	351	580	480	300	278
TTHERM_00672940	MRNC33	8	na	1902	1473	2195	4498	3180	3956	3153	2644	2527	2920	5153	1907	1471	4058	3238	3446	4049	3912	3876	2845
TTHERM_00138540	MRNC34	8	na	2654	2987	2489	3651	2384	2553	2668	2374	1971	2059	849	929	1096	1096	1637	3034	2217	2185	1783	1859
TTHERM_00193630	MRNC35	8	na	1926	1886	1919	1801	1720	1658	1360	1410	1592	1965	1997	2906	1010	599	707	2297	3048	2742	2447	2752
TTHERM_01084170	MRNC36	9	na	8926	9206	9689	17695	16244	18907	19048	15785	16449	17585	12447	19703	22611	22753	20988	24250	28080	25391	20173	18622
TTHERM_01164130	MRNC37	9	na	492	561	546	925	581	604	586	473	443	502	742	221	229	711	882	1735	1730	1304	764	665
TTHERM_00378500	MRNC38	9	na	5996	6636	6376	6278	10228	10301	13007	10946	11408	12615	8418	2609	3561	4353	14176	10942	24315	22445	16979	13799
TTHERM_00590130	MRNC39	9	na	54648	54173	56624	60754	57701	55553	58400	56717	58335	59816	58227	54311	47776	41429	58176	61324	59551	61638	63710	60045

TTHERM	ID	#MORNS	Associated Domains	L1	Lm	Lh	S0	S3	S6	S9	S12	S15	S24	C0	C2	C4	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
TTHERM_00077350	MRNC40	9	na	14072	15694	14419	24948	22053	24076	25769	24612	25442	26369	35962	18213	15283	16734	23782	18324	27698	24470	25537	21872
TTHERM_00052540	MRNC41	9	na	5039	4803	5547	10317	11297	13109	13456	10774	10473	10864	8743	4890	4608	3928	11764	13287	14639	14892	13380	11328
TTHERM_00566710	MRNC42	9	na	9282	5406	5123	4013	7641	7996	9244	8921	8990	8850	5253	2835	10257	17911	19626	12316	18186	14642	11151	10591
TTHERM_00766490	MRNC43	9	na	9208	10599	10169	17154	16587	16509	16964	16486	16449	18213	16540	17988	16826	13619	18234	16651	24805	19480	16839	15840
TTHERM_00318860	MRNC44	9	na	1922	1918	1917	5083	4867	4487	5345	4896	5274	5358	6175	1295	1871	4880	4760	3031	3324	3467	3538	3853
TTHERM_00196080	MRNC45	9	na	2904	3076	3011	7467	6418	7321	7315	7161	6956	6959	4114	2082	2355	3408	5267	7469	10272	10077	8064	7064
TTHERM_01055500	MRNC46	9	na	3759	4386	4325	20670	3942	3919	5247	4520	3726	4640	5099	7321	3243	5038	5345	7861	9584	7158	6834	18059
TTHERM_00078940	MRNC47	9	na	11188	11693	11693	20670	17869	21779	19701	18295	20496	22682	14087	20969	17774	15697	22995	18498	26251	22870	20006	18059
TTHERM_01248870	MRNC48	9	na	381	337	366	251	577	479	611	651	674	665	102	223	267	226	1200	702	1766	1229	720	630
TTHERM_01248870	MRNC49	9	na	2096	1860	1519	1019	2016	1692	2206	2319	1956	1771	2131	906	888	577	2936	3278	5271	5180	3377	3152
TTHERM_00857860	MRNC50	9	na	1898	1976	2237	2128	1449	1331	1309	1421	1370	1576	1532	2349	1186	1873	2295	4315	2669	1657	1277	1229
TTHERM_00112840	MRNC51	9	na	738	952	737	1026	1138	1043	1172	1091	1214	1269	1126	7843	3827	2676	1706	1838	1958	1659	1194	1057
TTHERM_00354600	MRNC52	9	na	418	410	464	427	322	330	215	250	218	218	160	541	231	114	126	124	171	246	195	182
TTHERM_00058629	MRNC53	9	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
TTHERM_00940320	MRNC54	9	na	155	160	172	106	109	90	145	99	97	102	317	92	55	57	135	331	272	289	191	198
TTHERM_00564551	MRNC55	10	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
TTHERM_00338260	MRNC56	10	na	107	85	107	251	329	307	258	237	280	293	268	136	1056	1026	1146	949	938	709	560	513
TTHERM_00086700	MRNC57	10	na	28677	28097	25903	7779	15751	13283	19118	19678	23457	21591	17430	8806	7147	4706	21176	19761	21442	21732	22441	23792
TTHERM_00122390	MRNC58	12	na	6789	6426	7478	5099	9599	10737	11360	10686	11272	11877	6856	29792	22486	28347	29479	12287	12417	11998	13491	10782
TTHERM_00013150	MRNC59	13	na	361	438	507	319	330	224	313	306	338	469	476	594	515	807	407	518	487	358	364	488
TTHERM_00047490	MRNC60	14	na	45773	48662	51309	36848	27159	25517	27176	27277	29147	24838	6303	11436	8594	5347	13905	24028	25105	22810	18000	14468
TTHERM_00144930	MRNN01	1	na	359	369	389	406	493	402	471	481	449	496	479	369	397	493	650	685	944	477	480	551
TTHERM_00334370	MRNN02	1	na	382	362	254	185	213	195	254	307	251	264	220	178	2222	554	827	860	1217	1015	472	397
TTHERM_02499170	MRNN03	2	na	238	228	187	49	115	104	126	178	142	134	46	66	72	90	343	178	430	583	241	221
TTHERM_00324550	MRNN04	2	na	2246	2171	1932	26499	1808	2523	1581	1188	1215	1041	1362	2604	999	614	622	1189	1439	1550	1124	820
TTHERM_00632820	MRNN05	2	na	77	67	61	32	37	39	46	51	47	50	40	32	35	33	77	51	82	100	69	61
TTHERM_00058510	MRNN06	2	na	59	58	57	35	39	41	46	39	44	41	31	36	35	34	64	35	85	62	47	41
TTHERM_00145690	MRNN07	2	na	228	201	235	290	332	228	357	354	273	458	399	287	281	186	373	299	684	448	506	682
TTHERM_00138020	MRNN08	2	na	870	941	932	839	811	621	659	688	694	875	963	484	452	815	911	715	1087	987	877	956
TTHERM_00466880	MRNN09	3	na	375	375	394	225	155	146	85	77	99	105	108	485	140	128	114	168	265	207	167	143
TTHERM_00703320	MRNN10	3	na	2993	3194	2894	2354	2809	2029	2623	2585	2862	4544	6868	6218	3207	3661	4034	4003	4403	2689	3185	3862
TTHERM_00938920	MRNN11	3	na	191	200	187	127	145	113	134	142	157	170	249	1434	233	253	245	412	412	213	225	268
TTHERM_00732890	MRNN12	4	na	4326	4395	4687	2278	2025	2284	1363	1433	1543	1622	1760	943	645	364	631	1490	2636	2581	2241	1703
TTHERM_00196030	MRNN13	5	na	206	196	210	223	199	195	158	161	177	214	168	131	79	145	130	131	166	220	217	182
TTHERM_00080020	MRNN14	9	na	1588	1558	1353	847	1026	687	639	596	650	798	1075	1448	479	300	721	1129	1419	912	737	761
TTHERM_00561720	MRNN15	9	na	476	468	478	744	398	306	218	156	180	237	417	333	170	111	226	635	510	446	518	541
TTHERM_00509110	MRNN16	11	na	3962	4427	4370	4818	5608	4614	6435	5255	5274	6264	7175	3865	3068	2937	5104	7270	10265	9539	6680	6539
TTHERM_00329860	MRNN17	15	na	591	626	704	557	790	815	899	942	1021	1099	832	301	360	367	680	589	1012	1628	1059	1028
TTHERM_00637130	MRNO01	1	SK	22	23	29	33	48	58	60	42	42	35	47	33	37	41758	32	28	30	32	55	95
TTHERM_00823370	MRNO02	2	TM	75	79	70	67	55	47	44	46	38	47	158	255	117	62	68	70	107	135	84	77
TTHERM_00396960	MRNO03	2	PK, LRR	163	156	170	217	200	179	212	283	306	434	375	207	270	310	199	326	350	297	381	496
TTHERM_00698640	MRNO04	3	na	3012	3245	3987	1855	3465	3789	3502	2586	1882	1919	3110	2406	2799	2012	2335	3111	3158	3775	3707	3828
TTHERM_00692980	MRNO05	3	PK	386	463	408	762	389	335	295	280	348	306	525	332	164	1331	1027	1818	1035	614	491	459
TTHERM_00338910	MRNO06	3	PK	301	281	262	153	175	133	132	124	92	118	128	113	106	88	114	210	412	295	198	154
TTHERM_00334450	MRNO07	3	PK	277	439	556	774	1739	780	1123	809	837	806	3997	688	852	778	628	382	532	410	680	595
TTHERM_00424710	MRNO08	3	na	170	176	227	307	231	214	232	190	162	132	296	116	197	203	215	858	1268	742	471	402
TTHERM_00621420	MRNO09	3	na	487	479	733	1062	1086	664	832	895	863	1131	1395	1555	839	796	996	1019	1734	1181	1119	1096
TTHERM_01044740	MRNO10	3	PK	60	55	50	30	36	41819	36	41	40	43	30	34	32	32	74	41	133	109	56	48
TTHERM_00550820	MRNO11	3	PK	307	298	301	243	204	139	105	99	115	158	136	52	69	60	60	113	97	243	213	158
TTHERM_00581840	MRNO12	3	WD40	45	45	46	62	73	72	73	81	66	70	78	61	51	41	62	73	67	70	64	73
TTHERM_00584920	MRNO13	4	na	41	45	44	41	36	44	35	35	40	43	36	35	35	34	34	39	43	37	31	34
TTHERM_00703340	MRNO14	4	na	53	52	48	481	199	1471	837	375	332	108	1342	96	78	71	120	247	237	103	73	81
TTHERM_00522110	MRNO15	5	4 ZF	56	61	56	56	57	57	49	44	54	59	61	58	108	360	71	57	55	67	85	74
TTHERM_00600210	MRNO16	4	na	205	201	276	598	395	432	454	386	337	319	366	256	208	151	237	330	491	556	496	406
TTHERM_00426040	MRNO17	4	PK, TM	88	58	62	36	60	58	56	55	62	63	48	42	40	66	72	117	101	106	87	69
TTHERM_00691730	MRNO18	4	PK	439	563	658	381	540	480	574	474	528	514	578	265	933	522	434	401	553	531	451	430
TTHERM_00653900	MRNO19	4	PK	8976	10273	8281	3338	4476	2849	3981	4376	4348	5489	4210	2176	1912	4193	6150	2827	6923	4957	5297	6043
TTHERM_00522150	MRNO20	4	SK, SAM	811	843	677	1323	1359	1111	1640	2270	2738	2836	1472	1438	1827	1336	861	1353	1113	1169	1221	1593

TTHERM	ID	#MORNS	Associated Domains		L1	Lm	Lh	S0	S3	S6	S9	S12	S15	S24	C0	C2	C4	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C18
			na	na																				
TTHERM_00378600	MRNO21	5	na	na	4876	5557	5772	2807	1574	2662	1547	1483	1338	1411	980	625	390	250	826	1543	2317	2196	1664	1505
TTHERM_00446100	MRNO22	5	na	na	1182	1172	1007	507	813	695	874	883	952	1032	712	258	279	355	916	877	1642	893	811	729
TTHERM_00136280	MRNO23	5	PK	PK	43	43	36	73	52	43	42	46	39	43	59	222	973	359	90	58	58	79	57	46
TTHERM_00566750	MRNO24	5	PK	PK	199	208	177	210	217	163	185	159	187	215	160	213	112	140	174	133	244	229	215	185
TTHERM_00577130	MRNO25	5	PK	PK	729	764	620	428	493	367	477	436	533	642	555	745	420	436	853	739	687	498	485	554
TTHERM_01084140	MRNO26	5	SK	SK	1193	1118	1061	627	842	805	990	1118	1216	1815	1162	2821	981	1742	4206	3332	2622	1181	1352	1764
TTHERM_00148890	MRNO27	5	PK	PK	365	353	229	138	114	79	114	102	96	143	258	147	230	172	316	197	360	373	218	283
TTHERM_00947580	MRNO28	5	PK	PK	9467	10966	10191	17865	10928	11630	10485	8743	8363	9118	10098	3439	2253	1807	4058	9906	12204	10742	9175	8229
TTHERM_00529880	MRNO29	6	na	na	65	64	66	105	131	116	93	97	100	80	50	46	66	60	72	91	157	230	157	156
TTHERM_00102750	MRNO30	6	PK	PK	3605	3809	3590	1092	896	1156	1316	1296	1399	1645	1227	995	447	402	961	1345	1316	1129	845	767
TTHERM_00431310	MRNO31	6	na	na	1829	2101	1854	1195	1022	847	712	753	767	895	682	413	412	501	880	2758	2798	1622	1270	1472
TTHERM_00575440	MRNO32	6	SK	SK	1117	1095	1013	276	331	339	327	339	294	299	273	271	158	187	282	606	534	372	242	249
TTHERM_00823920	MRNO33	8	na	na	44	43	58	42	56	64	59	47	47	42	41	39	42	36	34	30	32	39	42	66
TTHERM_00125250	MRNO34	8	PK	PK	816	764	829	688	1243	1049	1314	1185	1218	1170	1028	426	434	398	1183	1520	1752	2199	1529	1429
TTHERM_00384820	MRNO35	8	na	na	7620	8314	8078	5931	5271	4743	4725	4857	5182	5012	5381	1566	1490	8456	5864	7290	7461	6616	5428	4844
TTHERM_00685930	MRNO36	9	IQ	IQ	1499	1430	1497	2252	2685	3066	3237	2474	2311	2367	2530	15604	6793	3578	4228	5762	8181	5290	2840	2772
TTHERM_00494340	MRNO37	9	IQ	IQ	1878	1399	1162	1077	892	996	1142	1181	1256	1421	1408	1892	1180	575	1662	2057	2432	2434	1466	1484
TTHERM_00476750	MRNO38	9	na	na	1420	1499	1464	1181	1758	1643	2007	1702	1728	1825	2287	1637	1088	1302	2791	1514	2429	3404	2672	2532
TTHERM_00947600	MRNO39	9	na	na	3310	3049	2764	1423	3349	3781	4004	4157	3879	4498	3521	1634	21528	8869	7469	5911	8933	9557	5973	4896
TTHERM_00535430	MRNO40	9	TM	TM	105	75	148	163	259	400	251	183	185	183	239	198	126	169	131	119	89	219	306	398
TTHERM_00637110	MRNO41	9	SK	SK	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
TTHERM_00540299	MRNO42	9	IQ	IQ	1472	1487	1239	1276	1764	2257	2378	2162	2203	2396	1035	5703	7072	4923	4464	3235	3511	3824	2382	2007
TTHERM_00138010	MRNO43	9	TM	TM	358	233	237	282	240	301	236	196	184	233	255	171	165	143	229	252	218	328	350	231
TTHERM_00641220	MRNO44	10	na	na	3223	3249	3760	5563	5315	4694	5788	4751	4449	4220	6094	3419	1858	1146	4004	8136	11014	8051	5840	5489
TTHERM_00724730	MRNO45	10	na	na	2069	2041	2071	2219	2944	2080	2887	2790	2511	2514	4103	1672	1340	923	2178	2397	3747	4108	3013	3810
TTHERM_00133460	MRNO46	10	na	na	955	984	816	773	746	820	919	982	868	751	302	239	398	295	940	1497	2196	2196	1081	865
TTHERM_00471440	MRNO47	11	na	na	326	305	292	338	243	171	296	253	179	192	458	401	155	74	214	200	462	519	290	304
TTHERM_01093650	MRNO48	11	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
TTHERM_00355710	MRNO49	11	PK	PK	61	54	60	54	63	54	60	54	66	55	39	37	35	25	79	43	43	43	55	42
TTHERM_00637120	MRNO50	13	na	na	119	81	199	127	364	622	474	460	294	241	554	179	258	183	249	196	136	335	646	935
TTHERM_00584930	MRNO51	14	na	na	14867	15719	16097	7483	7483	5705	5365	5782	6179	5952	2750	1969	1759	2187	6880	7405	10551	6373	4574	4164
TTHERM_01044720	MRNO52	14	PK	PK	2579	2746	2356	1883	974	821	880	911	1015	1263	501	717	458	370	765	673	804	1386	1094	1137
TTHERM_00637100	MRNO53	21	PK	PK	43	36	59	50	70	71	58	56	57	69	77	41	41	48	44	56	59	70	104	107
TTHERM_00641130	MRNO54	24	PK	PK	62	52	62	54	80	83	72	59	70	59	109	43	51	48	60	54	58	58	78	116
TTHERM_00637140	MRNO55	32	PK	PK	276	243	378	170	250	288	209	238	209	221	416	164	194	128	176	128	152	228	334	331

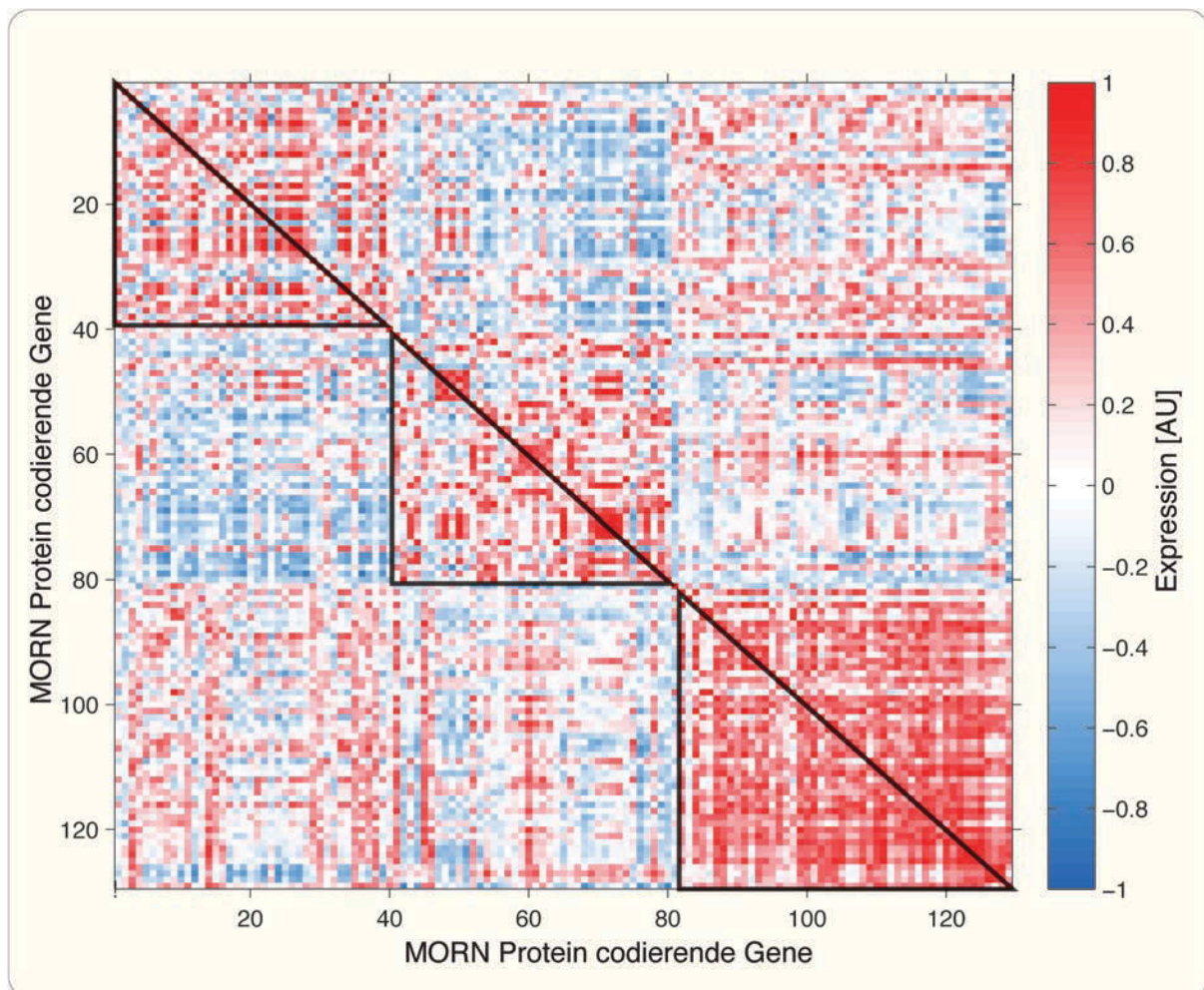


Abbildung 19: Pearson-Korrelationen der Ko-Expression von Genen, welche MORN-Proteine codieren. Die Gene sind in Korrespondenz zu denen der Abbildung 6C sortiert. Alle Expressionswerte wurden normalisiert und aufgetragen von -1 bis 1. Drei unterschiedliche Anordnungen, markiert mit Dreiecken, geben die drei Expressionsmuster hochexprimierter MORN-Proteine wieder, wie sie in Abbildung 6C beobachtet werden.

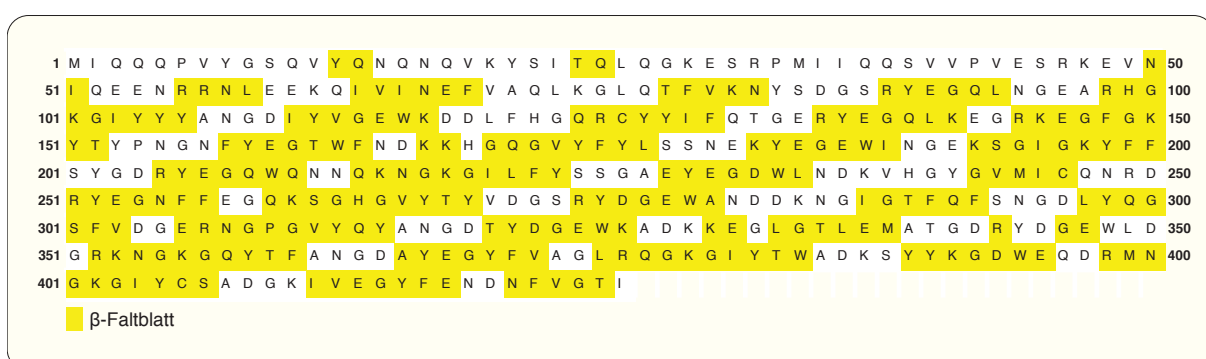


Abbildung 22: PSIPRED Vorhersage der Sekundärstruktur von MRNO51. Bereiche mit β -Faltblättern sind gelb markiert.

9. Literaturverzeichnis

- Ahle S, Ungewickell E. 1986. Purification and properties of a new clathrin assembly protein. *EMBO J* 5(12):3143-9.
- Aligianis IA, Johnson CA, Gissen P, Chen DR, Hampshire D, Hoffmann K, Maina EN, Morgan NV, Tee L, Morton J und andere. 2005. Mutations of the catalytic subunit of RAB3GAP cause Warburg Micro syndrome. *Nature Genet* 37(3):221-223.
- Altschul SF, Lipman DJ. 1990. Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(14):5509-13.
- 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. *Nucleic Acids Res* 25(17):3389-402.
- Aurrecoechea C, Brestelli J, Brunk BP, Carlton JM, Dommer J, Fischer S, Gajria B, Gao X, Gingle A, Grant G und andere. 2009. GiardiaDB and TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Nucleic Acids Res* 37:D526-30.
- Benchimol M. 2004. Trichomonads under microscopy. *Microsc Microanal* 10(5):528-50.
- Bhattacharya MRC, Gerdt J, Naylor SA, Royse EX, Ebstein SY, Sasaki Y, Milbrandt J, DiAntonio A. 2012. A model of toxic neuropathy in *Drosophila* reveals a role for MORN4 in promoting axonal degeneration. *J Neurosci* p 5054-5061
- Bittova L, Stahelin RV, Cho W. 2001. Roles of ionic residues of the C1 domain in protein kinase C- α activation and the origin of phosphatidylserine specificity. *J Biol Chem* 276(6):4218-4226.
- lackburn EH, Gall JG. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 120(1):33-53.
- Block BA, Imagawa T, Campbell KP, Franzini-Armstrong C. 1988. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol* 107(6 Pt 2):2587-600.
- Blood PD, Voth GA. 2006. Direct observation of Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-induced membrane curvature by means of molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(41):15068-15072.

- Boggon TJ, Shan WS, Santagata S, Myers SC, Shapiro L. 1999. Implication of tubby proteins as transcription factors by structure-based functional analysis. *Science* 286(5447):2119-25.
- Boutin JA. 1997. Myristoylation. *Cell Signal* 9(1):15-35.
- Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD. 1996. *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84(6):843-51.
- Bruns PJ, Brussard TB. 1974. Positive selection for mating with functional heterokaryons in *Tetrahymena pyriformis*. *Genetics* 78(3):831-41.
- Bruns PJ, Palestine RF. 1975. Costimulation in *Tetrahymena pyriformis*: a developmental interaction between specially prepared cells. *Dev Biol* 42(1):75-83.
- Cabral JHM, Petosa C, Sutcliffe MJ, Raza S, Byron O, Poy F, Marfatia SM, Chishti AH, Liddington RC. 1996. Crystal structure of a PDZ domain. *Nature* 382(6592):649-652.
- Caffrey M, Cherezov V. 2009. Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases. *Nat Protoc* 4(5):706-31.
- Callebaut I, Labesse G, Durand P, Poupon A, Canard L, Chomilier J, Henrissat B, Mornon JP. 1997. Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci* 53(8):621-45.
- Caloca MJ, Garcia-Bermejo ML, Blumberg PM, Lewin NE, Kremmer E, Mischak H, Wang SM, Nacro K, Bienfait B, Marquez VE und andere. 1999. beta 2-chimaerin is a novel target for diacylglycerol: binding properties and changes in subcellular localization mediated by ligand binding to its C1 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21):11854-11859.
- Carlton JG, Cullen PJ. 2005. Sorting nexins. *Curr Biol* 15(20):R819-R820.
- Carpenter EP, Beis K, Cameron AD, Iwata S. 2008. Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol* 18(5):581-6.
- Carroll K, Gomez C, Shapiro L. 2004. Tubby proteins: the plot thickens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(1):55-63.
- Cassidy-Hanley D, Smith HR, Bruns PJ. 1995. A simple, efficient technique for freezing *Tetrahymena thermophila*. *J Eukaryot Microbiol* 42(5):510-5.
- Cassidy-Hanley DM. 2012. *Tetrahymena* in the laboratory: strain resources, methods for culture, maintenance, and storage. *Methods Cell Biol* 109:237-76.

- Cavalier-Smith T. 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev* 57(4):953-94.
- Chalker DL, Stover NA. 2007. Genome evolution: a double take for *Paramecium*. *Curr Biol* 17(3):R97-9.
- Cheeever ML, Sato TK, de Beer T, Kutateladze TG, Emr SD, Overduin M. 2001. Phox domain interaction with PtdIns(3)P targets the Vam7 t-SNARE to vacuole membranes. *Nat Cell Biol* 3(7):613-8.
- Chishti AH, Kim AC, Marfatia SM, Lutichman M, Hanspal M, Jindal H, Liu SC, Low PS, Rouleau GA, Mohandas N und andere. 1998. The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci* 23(8):281-2.
- Cho W. 2001. Membrane Targeting by C1 and C2 Domains. *J Biol Chem* 276(35):32407-10.
- Cho W, Stahelin RV. 2006. Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. *Biochim Biophys Acta* 1761(8):838-849.
- Choi Y-J, Hwang K-C, Park J-Y, Park K-K, Kim J-H, Park S-B, Hwang S, Park H, Park C, Kim J-H. 2010. Identification and characterization of a novel mouse and human MOPT gene containing MORN-motif protein in testis. *Theriogenology* 73(3):273-81.
- Clark CG, Diamond LS. 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* 15(3):329-41.
- Collins K, Gorovsky MA. 2005. *Tetrahymena thermophila*. *Curr Biol* 15(9):R317-8.
- Collins TJ. 2007. ImageJ for microscopy. *Biotechniques* 43(1 Suppl):25-30.
- Cuttell L, Vaughan A, Silva E, Escaron CJ, Lavine M, Van Goethem E, Eid JP, Quirin M, Franc NC. 2008. Undertaker, a *Drosophila* Junctophilin, links draper-mediated phagocytosis and calcium homeostasis. *Cell* 135(3):524-534.
- Dai C, Liang D, Li HW, Sasaki M, Dawson TM, Dawson VL. 2010. Functional identification of neuroprotective molecules. *Plos One* 5(11):e15008.
- De Camilli P, Chen H, Hyman J, Panepucci E, Bateman A, Brunger AT. 2002. The ENTH domain. *FEBS Lett* 513(1):11-8.
- Delgadillo MG, Liston DR, Niazi K, Johnson PJ. 1997. Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9):4716-20.

- Devon RS, Schwab C, Topp JD, Orban PC, Yang YZ, Pape TD, Helm JR, Davidson TL, Rogers DA, Gros-Louis F und andere. 2005. Cross-species characterization of the ALS2 gene and analysis of its pattern of expression in development and adulthood. *Neurobiol Dis* 18(2):243-57.
- Dharmalingam E, Haeckel A, Pinyol R, Schwintzer L, Koch D, Kessels MM, Qualmann B. 2009. F-BAR proteins of the syndapin family shape the plasma membrane and are crucial for neuromorphogenesis. *J Neurosci* 29(42):13315-27.
- Diamond LS. 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol* 43(4):488-90.
- Doyle DA, Lee A, Lewis J, Kim E, Sheng M, MacKinnon R. 1996. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85(7):1067-1076.
- Dumas JJ, Merithew E, Sudharshan E, Rajamani D, Hayes S, Lawe D, Corvera S, Lambright DG. 2001. Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1. *Mol Cell* 8(5):947-958.
- Echalier A, Glazer RL, Fulop V, Geday MA. 2004. Assessing crystallization droplets using birefringence. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 4):696-702.
- Eisen JA, Coyne RS, Wu M, Wu D, Thiagarajan M, Wortman JR, Badger JH, Ren Q, Amedeo P, Jones KM und andere. 2006. Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biol* 4(9):e286.
- El-Haddad H, Przyborski JM, Kraft LG, McFadden GI, Waller RF, Gould SB. 2013. Characterization of TtALV2, an essential charged repeat motif protein of the *Tetrahymena thermophila* membrane skeleton. *Eukaryot Cell* 12(6):932-40.
- Elliott, AM und Hayes, RE. 1955. *Tetrahymena* from Mexico, Panama, and Colombia, with special reference to sexuality. *J Protozool* 2: 75–80.
- Ellson CD, Gobert-Gosse S, Anderson KE, Davidson K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Thuring JW, Cooper MA, Lim ZY, Holmes AB und andere. 2001. PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). *Nat Cell Biol* 3(7):679-82.
- Essen LO, Perisic O, Cheung R, Katan M, Williams RL. 1996. Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. *Nature* 380(6575):595-602.
- Farazi TA, Waksman G, Gordon JL. 2001. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem* 276(43):39501-39504.

- Ferguson DJP, Sahoo N, Pinches RA, Bumstead JM, Tomley FM, Gubbels MJ. 2008. MORN1 has a conserved role in asexual and sexual development across the apicomplexa. *Eukaryot Cell* 7(4):698-711.
- Ferguson MA, Williams AF. 1988. Cell-surface anchoring of proteins via glycosylphosphatidylinositol structures. *Annu Rev Biochem* 57:285-320.
- Ferguson MAJ, Kinoshita T, Hart GW. 2009. Glycosylphosphatidylinositol anchors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY).
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J und andere. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42:D222-30.
- Ford MG, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJ, Evans PR, McMahon HT. 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419(6905):361-6.
- Ford MG, Pearse BM, Higgins MK, Vallis Y, Owen DJ, Gibson A, Hopkins CR, Evans PR, McMahon HT. 2001. Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* 291(5506):1051-5.
- Frankel J, Jenkins LM, Nelsen EM, Stoltzman CA. 1993. Hypoangular: a gene potentially involved in specifying positional information in a ciliate, *Tetrahymena thermophila*. *Dev Biol* 160(2):333-54.
- Fujita M, Kinoshita T. 2010. Structural remodeling of GPI anchors during biosynthesis and after attachment to proteins. *FEBS Lett* 584(9):1670-7.
- Fujita M, Kinoshita T. 2012. GPI-anchor remodeling: potential functions of GPI-anchors in intracellular trafficking and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1821(8):1050-8.
- 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, Gu L, Hai B, Gorovsky MA. 1994. High frequency vector-mediated transformation and gene replacement in *Tetrahymena*. *Nucleic Acids Res* 22(24):5391-8.
- 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(3):243-53.

- Gajadhar AA, Marquardt WC, Hall R, Gunderson J, Ariztia-Carmona EV, Sogin ML. 1991. Ribosomal RNA sequences of *Sarcocystis muris*, *Theileria annulata* and *Cryptosporidium parvum* reveal evolutionary relationships among apicomplexans, dinoflagellates, and ciliates. *Mol Biochem Parasitol* 45(1):147-54.
- Gibbons IR, Rowe AJ. 1965. Dynein: a protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science* 149(3682):424-6.
- Gilbert W. 1978. Why genes in pieces? *Nature* 271(5645):501.
- Goni FM, Alonso A. 1999. Structure and functional properties of diacylglycerols in membranes. *Prog Lipid Res* 38(1):1-48.
- Gordon JI, Duronio RJ, Rudnick DA, Adams SP, Gokel GW. 1991. Protein N-myristoylation. *J Biol Chem* 266(14):8647-8650.
- Gorovsky MA, Yao MC, Keevert JB, Pleger GL. 1975. Isolation of micro- and macronuclei of *Tetrahymena pyriformis*. *Methods Cell Biol* 9(0):311-27.
- Gould SB, Kraft LG, 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(3):1319-31.
- Gould SB, Tham WH, Cowman AF, McFadden GI, Waller RF. 2008. Alveolins, a new family of cortical proteins that define the protist infrakingdom Alveolata. *Mol Biol Evol* 25(6):1219-30.
- Greider CW, Blackburn EH. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43(2 Pt 1):405-13.
- Gubbels MJ. 2006. A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *J Cell Sci* 119(Pt 11):2236-45.
- Habicht J, Woehle C, Gould SB. 2015. *Tetrahymena* expresses more than a hundred proteins with lipid-binding MORN motifs that can differ in their subcellular localisations. *J Eukaryot Microbiol* doi: 10.1111/jeu.12216.
- Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Showguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R und andere. 2001. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 29(2):166-73.
- Hadano S, Kunita R, Otomo A, Suzuki-Utsunomiya K, Ikeda JE. 2007. Molecular and cellular function of ALS2/alsin: implication of membrane dynamics in neuronal development and degeneration. *Neurochem Int* 51(2-4):74-84.

- Haines TH. 2009. A new look at Cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* 1788(10):1997-2002.
- Hamada K, Shimizu T, Matsui T, Tsukita S, Hakoshima T. 2000. Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J* 19(17):4449-62.
- Hancock JF, Cadwallader K, Marshall CJ. 1991. Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane-binding of prenylated P21k-Ras(B). *Embo J* 10(3):641-646.
- Hanks SK, Hunter T. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9(8):576-96.
- Heaslip AT, Dzierszinski F, Stein B, Hu K. 2010. *TgMORN1* is a key organizer for the basal complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 6(2):e1000754.
- Hirata Y, Brotto M, Weisleder N, Chu Y, Lin P, Zhao X, Thornton A, Komazaki S, Takeshima H, Ma J und andere. 2006. Uncoupling store-operated Ca²⁺ entry and altered Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum through silencing of junctophilin genes. *Biophys J* 90(12):4418-27.
- Ho HY, Rohatgi R, Lebensohn AM, Le M, Li J, Gygi SP, Kirschner MW. 2004. Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* 118(2):203-16.
- Hodgkin DC, Kamper J, Lindsey J, Mackay M, Pickworth J, Robertson JH, Shoemaker CB, White JG, Prosen RJ, Trueblood KN. 1957. The Structure of Vitamin-B12 .1. An Outline of the Crystallographic Investigation of Vitamin-B12. *Proc Math Phys Eng Sci* 242(1229):228-&.
- Hommel U, Zurini M, Luyten M. 1994. Solution structure of a cysteine-rich domain of rat protein-kinase-C. *Nature Struct Biol* 1(6):383-387.
- Honigberg BM, Mattern CF, Daniel WA. 1971. Fine structure of the mastigont system in *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller). *J Protozool* 18(2):183-98.
- Honts JE, Williams NE. 2003. Novel cytoskeletal proteins in the cortex of *Tetrahymena*. *J Eukaryot Microbiol* 50(1):9-14.
- Hrdy I, Hirt RP, Dolezal P, Bardanova L, Foster PG, Tachezy J, Embley TM. 2004. *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* 432(7017):618-22.

- Hunter S, Jones P, Mitchell A, Apweiler R, Attwood TK, Bateman A, Bernard T, Binns D, Bork P, Burge S und andere. 2012. InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res* 40:D306-12.
- Hyman J, Chen H, Di Fiore PP, De Camilli P, Brunger AT. 2000. Epsin 1 undergoes nucleocytoplasmic shuttling and its eps15 interactor NH(2)-terminal homology (ENTH) domain, structurally similar to Armadillo and HEAT repeats, interacts with the transcription factor promyelocytic leukemia Zn(2)+ finger protein (PLZF). *J Cell Biol* 149(3):537-46.
- Im YJ, Davis AJ, Perera IY, Johannes E, Allen NS, Boss WF. 2007. The N-terminal membrane occupation and recognition nexus domain of *Arabidopsis* phosphatidylinositol phosphate kinase 1 regulates enzyme activity. *J Biol Chem* 282(8):5443-52.
- Ito K, Komazaki S, Sasamoto K, Yoshida M, Nishi M, Kitamura K, Takeshima H. 2001. Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J Cell Biol* 154(5):1059-67.
- Itoh T, Koshiba S, Kigawa T, Kikuchi A, Yokoyama S, Takenawa T. 2001. Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* 291(5506):1047-51.
- Jesus JB, Vannier-Santos MA, Britto C, Godefroy P, Silva-Filho FC, Pinheiro AA, Rocha-Azevedo B, Lopes AH, Meyer-Fernandes JR. 2004. *Trichomonas vaginalis* virulence against epithelial cells and morphological variability: the comparison between a well-established strain and a fresh isolate. *Parasitol Res* 93(5):369-77.
- Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P, Pfizenmaier K. 1994. Pkc ϵ is a novel, atypical member of the protein-kinase-C family. *J Biol Chem* 269(8):6140-6148.
- Ju TK, Huang FL. 2004. MSAP, the meichroacidin homolog of carp (*Cyprinus carpio*), differs from the rodent counterpart in germline expression and involves flagellar differentiation. *Biol Reprod* 71(5):1419-29.
- Judge RA, Swift K, Gonzalez C. 2005. An ultraviolet fluorescence-based method for identifying and distinguishing protein crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61(Pt 1):60-6.
- Kamioka Y, Fukuhara S, Sawa H, Nagashima K, Masuda M, Matsuda M, Mochizuki N. 2004. A novel dynamin-associating molecule, formin-binding protein 17, induces tubular membrane invaginations and participates in endocytosis. *J Biol Chem* 279(38):40091-9.
- Kanai F, Liu H, Field SJ, Akbary H, Matsuo T, Brown GE, Cantley LC, Yaffe MB. 2001. The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol* 3(7):675-8.

- Kanekura K, Hashimoto Y, Niikura T, Aiso S, Matsuoka M, Nishimoto I. 2004. Alsln, the product of ALS2 gene, suppresses SOD1 mutant neurotoxicity through RhoGEF domain by interacting with SOD1 mutants. *J Biol Chem* 279(18):19247-56.
- Katz LA, Turkewitz AP. 2013. Stalking the wild *Tetrahymena*. *Mol Ecol* 22(4):912-4.
- Kazanietz MG, Bustelo XR, Barbacid M, Kolch W, Mischak H, Wong G, Pettit GR, Bruns JD, Blumberg PM. 1994. Zinc-finger domains and phorbol ester pharmacophore - analysis of binding to mutated form of protein kinase-C-Tau and the Vav and c-Raf protooncogene products. *J Biol Chem* 269(15):11590-11594.
- Kim S, Coulombe PA. 2007. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev* 21(13):1581-97.
- Kinoshita T, Fujita M, Maeda Y. 2008. Biosynthesis, remodelling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: recent progress. *J Biochem* 144(3):287-94.
- Knudsen FU, Knudsen HE, Gormsen J. 1970. Temperatures in polyacrylamide disc electrophoresis: influence on LDH isoenzymes. *Anal Biochem* 36(1):192-6.
- Kobayashi T, Endoh H. 2003. Caspase-like activity in programmed nuclear death during conjugation of *Tetrahymena thermophila*. *Cell Death Differ* 10(6):634-40.
- Krugmann S, Jordens I, Gevaert K, Driessens M, Vandekerckhove J, Hall A. 2001. Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr Biol* 11(21):1645-55.
- Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki K, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Hadano S, Ikeda JE. 2004. Homo-oligomerization of ALS2 through its unique carboxyl-terminal regions is essential for the ALS2-associated Rab5 guanine nucleotide exchange activity and its regulatory function on endosome trafficking. *J Biol Chem* 279(37):38626-35.
- Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE. 2007. The Rab5 activator ALS2/alsln acts as a novel Rac1 effector through Rac1-activated endocytosis. *J Biol Chem* 282(22):16599-611.
- Kusano H, Testerink C, Vermeer JEM, Tsuge T, Shimada H, Oka A, Munnik T, Aoyama T. 2008. The *Arabidopsis* phosphatidylinositol phosphate 5-kinase PIP5K3 is a key regulator of root hair tip growth. *Plant Cell* 20(2):367-380.
- Kutateladze T, Overduin M. 2001. Structural mechanism of endosome docking by the FYVE domain. *Science* 291(5509):1793-1796.

- Kutateladze TG. 2007. Mechanistic similarities in docking of the FYVE and PX domains to phosphatidylinositol 3-phosphate containing membranes. *Prog Lipid Res* 46(6):315-327.
- Krishnan VV, Rupp B. 2001. Macromolecular structure determination: comparison of x-ray Crystallography and NMR spectroscopy. eLS: John Wiley & Sons, Ltd.
- Kwon T, Chang JH, Kwak E, Lee CW, Joachimiak A, Kim YC, Lee J, Cho Y. 2003. Mechanism of histone lysine methyl transfer revealed by the structure of SET7/9-AdoMet. *EMBO J* 22(2):292-303.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.
- Land KM, Delgadillo-Correa MG, Tachezy J, Vanacova S, Hsieh CL, Sutak R, Johnson PJ. 2004. Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. *Mol Microbiol* 51(1):115-22.
- Landstrom AP, Beavers DL, Wehrens XH. 2014. The junctophilin family of proteins: from bench to bedside. *Trends Mol Med* 20(6):353-62.
- Landstrom AP, Weisleder N, Batalden KB, Bos JM, Tester DJ, Ommen SR, Wehrens XH, Claycomb WC, Ko JK, Hwang M and others. 2007. Mutations in JPH2-encoded junctophilin-2 associated with hypertrophic cardiomyopathy in humans. *J Mol Cell Cardiol* 42(6):1026-35.
- Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, Ochoa GC, Farsad K, Wenk MR, De Camilli P. 2002. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* 297(5584):1193-6.
- Lee J, Han C-T, Hur Y. 2009. Overexpression of *BrMORN*, a novel 'membrane occupation and recognition nexus' motif protein gene from Chinese cabbage, promotes vegetative growth and seed production in *Arabidopsis*. *Mol Cells* 29(2):113-22
- Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, Dixon JE, Pandolfi P, Pavletich NP. 1999. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 99(3):323-34.
- Lemmon MA. 2007. Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochem Soc Symp* (74):81-93.
- Lemmon MA, Ferguson KM, Abrams CS. 2002. Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett* 513(1):71-6.
- Letunic I, Bork P. 2007. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23(1):127-8.

- Letunic I, Bork P. 2011. Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res* 39:W475-8.
- Letunic I, Copley RR, Pils B, Pinkert S, Schultz J, Bork P. 2006. SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res* 34:D257-60.
- Letunic I, Doerks T, Bork P. 2012. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res* 40:D302-5.
- Liang X, Mei Y, Huang X, Shen G, Zhu D, Yu Y, Wang J, Lou Y. 2012a. Junctophilin 2 knockdown interfere with mitochondrium status in ESC-CMs and cardiogenesis of ES cells. *J Cell Biochem* 113(9):2884-94.
- Liang XG, Wu BW, Zhang WC, Zhou LM, Zhu DY, Lou YJ. 2012b. Expression of Junctophilin 1 during cardiogenesis of mouse embryonic stem cells and rat embryos. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 41(4):359-65.
- Lim KB, Bu W, Goh WI, Koh E, Ong SH, Pawson T, Sudhaharan T, Ahmed S. 2008. The Cdc42 effector IRSp53 generates filopodia by coupling membrane protrusion with actin dynamics. *J Biol Chem* 283(29):20454-72.
- Linder ME, Deschenes RJ. 2003. New insights into the mechanisms of protein palmitoylation. *Biochemistry* 42(15):4311-4320.
- Linder ME, Deschenes RJ. 2004. Model organisms lead the way to protein palmitoyltransferases. *J Cell Sci* 117(4):521-526.
- Lomasney JW, Cheng HF, Roffler SR, King K. 1999. Activation of phospholipase C delta1 through C2 domain by a Ca(2+)-enzyme-phosphatidylserine ternary complex. *J Biol Chem* 274(31):21995-2001.
- Lorestani A, Sheiner L, Yang K, Robertson SD, Sahoo N, Brooks CF, Ferguson DJP, Striepen B, Gubbels MJ. 2010. A *Toxoplasma* MORN1 null mutant undergoes repeated divisions but is defective in basal assembly, apicoplast division and cytokinesis. *PLoS ONE* 5(8):e12302.
- Ma H, Lou Y, Lin WH, Xue HW. 2006. MORN motifs in plant PIPKs are involved in the regulation of subcellular localization and phospholipid binding. *Cell Res* 16(5):466-78.
- Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S. 2002a. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci* 27(10):514-20.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. 2002b. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298(5600):1912-34.
- Mao YX, Nickitenko A, Duan XQ, Lloyd TE, Wu MN, Bellen H, Quirocho FA. 2000. Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved in membrane trafficking and signal transduction. *Cell* 100(4):447-456.

- Maple J, Vojta L, Soll J, Møller SG. 2007. ARC3 is a stromal Z-ring accessory protein essential for plastid division. *EMBO Rep* 8(3):293-9.
- Marion D. 2013. An introduction to biological NMR spectroscopy. *Mol Cell Proteomics* 12(11):3006-25.
- McGrath KE, Yu SM, Heruth DP, Kelly AA, Gorovsky MA. 1994. Regulation and evolution of the single alpha-tubulin gene of the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Cell Motil Cytoskeleton* 27(3):272-83.
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. 2000. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16(4):404-5.
- McGuire AM, Cochrane K, Griggs AD, Haas BJ, Abeel T, Zeng QD, Nice JB, MacDonald H, Birren BW, Berger BW und andere. 2014. Evolution of invasion in a diverse set of fusobacterium Species. *Mbio* 5(6).
- McTaggart SJ. 2006. Isoprenylated proteins. *Cell Mol Life Sci* 63(3):255-267.
- Mecklenburg KL. 2007. *Drosophila* retinophilin contains MORN repeats and is conserved in humans. *Mol Genet Genomics* 277(5):481-9.
- Mecklenburg KL, Takemori N, Komori N, Chu B, Hardie RC, Matsumoto H, O'Tousa JE. 2010. Retinophilin is a light-regulated phosphoprotein required to suppress photoreceptor dark noise in *Drosophila*. *J Neurosci* 30(4):1238-1249.
- Medkova M, Cho WH. 1998. Differential membrane-binding and activation mechanisms of protein kinase C-alpha and -epsilon. *Biochemistry* 37(14):4892-4900.
- Medkova M, Cho WH. 1999. Interplay of C1 and C2 domains of protein kinase C-alpha in its membrane binding and activation. *J Biol Chem* 274(28):19852-19861.
- 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(2):e4429.
- Mishra SK, Agostinelli NR, Brett TJ, Mizukami I, Ross TS, Traub LM. 2001. Clathrin- and AP-2-binding sites in HIP1 uncover a general assembly role for endocytic accessory proteins. *J Biol Chem* 276(49):46230-6.
- Misra S, Hurley JH. 1999. Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell* 97(5):657-666.
- Mochizuki K, Fine NA, Fujisawa T, Gorovsky MA. 2002. Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*. *Cell* 110(6):689-99.

- Mochizuki K, Gorovsky MA. 2005. A Dicer-like protein in *Tetrahymena* has distinct functions in genome rearrangement, chromosome segregation, and meiotic prophase. *Genes Dev* 19(1):77-89.
- Moriguchi S, Nishi M, Komazaki S, Sakagami H, Miyazaki T, Masumiya H, Saito SY, Watanabe M, Kondo H, Yawo H und andere. 2006. Functional uncoupling between Ca²⁺ release and afterhyperpolarization in mutant hippocampal neurons lacking junctophilins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(28):10811-6.
- Mosior M, Newton AC. 1995. Mechanism of interaction of protein-kinase-C with phorbol esters - reversibility and nature of membrane association. *J Biol Chem* 270(43):25526-25533.
- Mueller-Roeber B, Pical C. 2002. Inositol phospholipid metabolism in *Arabidopsis*. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Physiol* 130(1):22-46.
- Mukhopadhyay S, Jackson PK. 2011. The tubby family proteins. *Genome Biol* 12(6):225.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24:17-27.
- Nalefski EA, Falke JJ. 1996. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* 5(12):2375-2390.
- Nalefski EA, McDonagh T, Somers W, Seehra J, Falke JJ, Clark JD. 1998. Independent folding and ligand specificity of the C2 calcium-dependent lipid binding domain of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 273(3):1365-72.
- Nelsen EM. 1978. Transformation in *Tetrahymena thermophila*. Development of an inducible phenotype. *Dev Biol* 66(1):17-31.
- Nelsen EM, Debault LE. 1978. Transformation in *Tetrahymena pyriformis*: description of an inducible phenotype. *J Protozool* 25(1):113-9.
- Nelson-Sathi S, Sousa FL, Roettger M, Lozada-Chavez N, Thiergart T, Janssen A, Bryant D, Landan G, Schonheit P, Siebers B und andere. 2014. Origins of major archaeal clades correspond to gene acquisitions from bacteria. *Nature* 517(7532):77-80.
- Newstead S, Ferrandon S, Iwata S. 2008. Rationalizing alpha-helical membrane protein crystallization. *Protein Sci* 17(3):466-72.
- Nishi M, Hashimoto K, Kuriyama K, Komazaki S, Kano M, Shibata S, Takeshima H. 2002. Motor discoordination in mutant mice lacking junctophilin type 3. *Biochem Biophys Res Commun* 292(2):318-24.

- Nishi M, Mizushima A, Nakagawara K, Takeshima H. 2000. Characterization of human junctophilin subtype genes. *Biochem Biophys Res Commun* 273(3):920-7.
- Nishi M, Sakagami H, Komazaki S, Kondo H, Takeshima H. 2003. Coexpression of junctophilin type 3 and type 4 in brain. *Brain Res Mol Brain Res* 118(1-2):102-10.
- Nishizuka Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase-c and its implications for cellular-regulation. *Nature* 334(6184):661-665.
- Nonet ML, Holgado AM, Brewer F, Serpe CJ, Norbeck BA, Holleran J, Wei L, Hartweg E, Jorgensen EM, Alfonso A. 1999. UNC-11, a *Caenorhabditis elegans* AP180 homologue, regulates the size and protein composition of synaptic vesicles. *Mol Biol Cell* 10(7):2343-60.
- O'Brien JA, Lummis SC. 2006. Biolistic transfection of neuronal cultures using a hand-held gene gun. *Nat Protoc* 1(2):977-81.
- Oancea E, Meyer T. 1998. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* 95(3):307-318.
- Otomo A, Hadano S, Okada T, Mizumura H, Kunita R, Nishijima H, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Kohiki E, Suga E und andere. 2003. ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet* 12(14):1671-87.
- Pantic-Tanner Z, Eden D. 1999. Calculation of protein form birefringence using the finite element method. *Biophys J* 76(6):2943-50.
- Patki V, Virbasius J, Lane WS, Toh BH, Shpetner HS, Corvera S. 1997. Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(14):7326-30.
- Patthy L. 1996. Exon shuffling and other ways of module exchange. *Matrix Biol* 15(5):301-10.
- Patthy L. 1999. Genome evolution and the evolution of exon-shuffling--a review. *Gene* 238(1):103-14.
- Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA. 2000. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* 101(3):259-70.
- Perisic O, Fong S, Lynch DE, Bycroft M, Williams RL. 1998. Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 273(3):1596-604.

- Pesciotta DM, Satir BH. 1985. Effect of Cerophyl growth medium on exocytosis in *Tetrahymena thermophila*. J Cell Sci 78:23-48.
- Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJG, Evans PR, McMahon HT. 2004. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. Science 303(5657):495-499.
- Phimister AJ, Lango J, Lee EH, Ernst-Russell MA, Takeshima H, Ma J, Allen PD, Pessah IN. 2007. Conformation-dependent stability of junctophilin 1 (JP1) and ryanodine receptor type 1 (RyR1) channel complex is mediated by their hyper-reactive thiols. J Biol Chem 282(12):8667-77.
- Ponting CP. 1996. Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: Binding partners of SH3 domains? Protein Sci 5(11):2353-2357.
- Prescott DM. 1994. The DNA of ciliated protozoa. Microbiol Rev 58(2):233-67.
- Prive GG. 2007. Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. Methods 41(4):388-97.
- Ren G, Vajjhala P, Lee JS, Winsor B, Munn AL. 2006. The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. Microbiol Mol Biol Rev 70(1):37-120.
- Ren M, Phoon CK, Schlame M. 2014. Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin. Prog Lipid Res 55:1-16.
- Renart J, Reiser J, Stark GR. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc Natl Acad Sci U S A 76(7):3116-20.
- Resh MD. 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. Biochim Biophys Acta, Mol Cell Res 1451(1):1-16.
- Resh MD. 2006. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. Nat Chem Biol 2(11):584-590.
- Rizo J, Sudhof TC. 1998. C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. J Biol Chem 273(26):15879-82.
- Ron D, Kazanietz MG. 1999. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. Faseb J 13(13):1658-1676.

- Rose PW, Prlic A, Bi C, Bluhm WF, Christie CH, Dutta S, Green RK, Goodsell DS, Westbrook JD, Woo J und andere. 2015. The RCSB protein data bank: views of structural biology for basic and applied research and education. *Nucleic Acids Res* 43:D345-56.
- Rosenthal JA, Chen H, Slepnev VI, Pellegrini L, Salcini AE, Di Fiore PP, De Camilli P. 1999. The epsins define a family of proteins that interact with components of the clathrin coat and contain a new protein module. *J Biol Chem* 274(48):33959-33965.
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5(4):725-38.
- Salazar MA, Kwiatkowski AV, Pellegrini L, Cestra G, Butler MH, Rossman KL, Serna DM, Sondek J, Gertler FB, De Camilli P. 2003. Tuba, a novel protein containing bin/amphiphysin/Rvs and Dbl homology domains, links dynamin to regulation of the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 278(49):49031-43.
- Salim HM, Ring KL, Cavalcanti AR. 2008. Patterns of codon usage in two ciliates that reassign the genetic code: *Tetrahymena thermophila* and *Paramecium tetraurelia*. *Protist* 159(2):283-98.
- Sambrook T, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. A laboratory manual. In: Green MR, editor. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Santagata S, Boggon TJ, Baird CL, Gomez CA, Zhao J, Shan WS, Myszka DG, Shapiro L. 2001. G-protein signaling through tubby proteins. *Science* 292(5524):2041-50.
- Satouh Y, Padma P, Toda T, Satoh N, Ide H, Inaba K. 2005. Molecular characterization of radial spoke subcomplex containing radial spoke protein 3 and heat shock protein 40 in sperm flagella of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol. Biol. Cell*. p 626-636.
- Schlutzenzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Franceschi F und andere. 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* 102(5):615-23.
- Seaman GR. 1961. Acid phosphatase activity associated with phagotrophy in the ciliate, *Tetrahymena*. *J Biophys Biochem Cytol* 9:243-5.
- Seet LF, Hong WJ. 2006. The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* 1761(8):878-896.
- Shang Y, Song X, Bowen J, Corstanje R, Gao Y, Gaertig J, Gorovsky MA. 2002. 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(6):3734-9.

- Shao X, Davletov BA, Sutton RB, Sudhof TC, Rizo J. 1996. Bipartite Ca²⁺-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science* 273(5272):248-51.
- Sharpe HJ, Stevens TJ, Munro S. 2010. A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties. *Cell* 142(1):158-69.
- Shetty J, Klotz KL, Wolkowicz MJ, Flickinger CJ, Herr JC. 2007. Radial spoke protein 44 (human meichroacidin) is an axonemal alloantigen of sperm and cilia. *Gene* 396(1):93-107.
- Shimada H, Koizumi M, Kuroki K, Mochizuki M, Fujimoto H, Ohta H, Masuda T, Takamiya K-i. 2004. ARC3, a chloroplast division factor, is a chimera of prokaryotic FtsZ and part of eukaryotic phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Plant Cell Physiol* 396(1):93-107.
- Sinensky M. 2000. Recent advances in the study of prenylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1484(2-3):93-106.
- Smotrys JE, Linder ME. 2004. Palmitoylation of intracellular signaling proteins: Regulation and function. *Annu Rev Biochem* 73:559-587.
- Smyth MS, Martin JH. 2000. X ray crystallography. *Mol Pathol* 53(1):8-14.
- Sousa E, Kost B, Malho R. 2008. *Arabidopsis* phosphatidylinositol-4-monophosphate 5-kinase 4 regulates pollen tube growth and polarity by modulating membrane recycling. *Plant Cell* 20(11):3050-3064.
- Stahelin RV. 2008. Peripheral proteins as drug targets. *Curr Drug Targets* 9(8):601-2.
- Stahelin RV. 2009. Lipid binding domains: more than simple lipid effectors. *J Lipid Res* 50:S299-S304.
- Stenmark H, Aasland R, Driscoll PC. 2002. The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. *Febs Letters* 513(1):77-84.
- Stenmark H, Aasland R, Toh BH, DArrigo A. 1996. Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J Biol Chem* 271(39):24048-24054.
- Stenzel I, Ischebeck T, Konig S, Holubowska A, Sporysz M, Hause B, Heilmann I. 2008. The type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 3 is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20(1):124-141.
- Stover NA, Krieger CJ, Binkley G, Dong Q, Fisk DG, Nash R, Sethuraman A, Weng S, Cherry JM. 2006. *Tetrahymena* Genome Database (TGD): a new genomic resource for *Tetrahymena thermophila* research. *Nucleic Acids Res* 34:D500-3.

- Sutton RB, Davletov BA, Berghuis AM, Sudhof TC, Sprang SR. 1995. Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca^{2+} /phospholipid-binding fold. *Cell* 80(6):929-38.
- Swart EC, Bracht JR, Magrini V, Minx P, Chen X, Zhou Y, Khurana JS, Goldman AD, Nowacki M, Schotanus K und andere. 2013. The *Oxytricha trifallax* macronuclear genome: a complex eukaryotic genome with 16,000 tiny chromosomes. *PLoS Biol* 11(1):e1001473.
- Takeshima H, Komazaki S, Nishi M, Iino M, Kangawa K. 2000. Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol Cell* 6(1):11-22.
- Tarricone C, Xiao B, Justin N, Walker PA, Rittinger K, Gamblin SJ, Smerdon SJ. 2001. The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. *Nature* 411(6834):215-219.
- Tognon CE, Kirk HE, Passmore LA, Whitehead IP, Der CJ, Kay RJ. 1998. Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain. *Mol Cell Biol* 18(12):6995-7008.
- Tokuhiro K, Hirose M, Miyagawa Y, Tsujimura A, Irie S, Isotani A, Okabe M, Toyama Y, Ito C, Toshimori K und andere. 2008. Meichroacidin containing the membrane occupation and recognition nexus motif is essential for spermatozoa morphogenesis. *J Biol Chem* 283(27):19039-48
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24:145-9.
- Tsuchida J, Nishina Y, Wakabayashi N, Nozaki M, Sakai Y, Nishimune Y. 1998. Molecular cloning and characterization of meichroacidin (male meiotic metaphase chromosome-associated acidic protein). *Dev Biol* 197(1):67-76.
- Valverde AM, Sinnett-Smith J, Vanlint J, Rozengurt E. 1994. Molecular-cloning and characterization of protein-Kkinase-D - a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(18):8572-8576.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(2):112-24.
- Venkatachalam K, Wasserman D, Wang XY, Li RX, Mills E, Elsaesser R, Li HS, Montell C. 2010. Dependence on a retinophilin/myosin complex for stability of PKC and INAD and termination of phototransduction. *J Neurosci* 30(34):11337-11345.
- Verdaguer N, Corbalan-Garcia S, Ochoa WF, Fita I, Gomez-Fernandez JC. 1999. Ca^{2+} bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase C alpha directly to phosphatidylserine. *EMBO J* 18(22):6329-38.

- Wadsten P, Wohri AB, Snijder A, Katona G, Gardiner AT, Cogdell RJ, Neutze R, Engstrom S. 2006. Lipidic sponge phase crystallization of membrane proteins. *J Mol Biol* 364(1):44-53.
- Watson JD, Crick FH. 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171(4356):737-8.
- Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. 1999. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* 112:531-52.
- Wilson JR, Jing C, Walker PA, Martin SR, Howell SA, Blackburn GM, Gamblin SJ, Xiao B. 2002. Crystal structure and functional analysis of the histone methyltransferase SET7/9. *Cell* 111(1):105-15.
- Wloga D, Frankel J. 2012. From molecules to morphology: cellular organization of *Tetrahymena thermophila*. *Methods Cell Biol* 109:83-140.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(12):4576-9.
- Wuthrich K. 2001. The way to NMR structures of proteins. *Nat Struct Biol* 8(11):923-5.
- Xiong J, Lu Y, Feng J, Yuan D, Tian M, Chang Y, Fu C, Wang G, Zeng H, Miao W. 2013. *Tetrahymena* functional genomics database (TetraFGD): an integrated resource for *Tetrahymena* functional genomics. *Database (Oxford)* 2013:bat008.
- Xu RX, Pawelczyk T, Xia TH, Brown SC. 1997. NMR structure of a protein kinase C-gamma phorbol-binding domain and study of protein-lipid micelle interactions. *Biochemistry* 36(35):10709-10717.
- Yamakawa M, Ito D, Honda T, Kubo K, Noda M, Nakajima K, Suzuki N. 2015. Characterization of the dipeptide repeat protein in the molecular pathogenesis of c9FTD/ALS. *Hum Mol Genet* 24(6):1630-45.
- Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC und andere. 2001. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 29(2):160-5.
- Yao MC, Blackburn E, Gall J. 1981. Tandemly repeated C-C-C-C-A-A hexanucleotide of *Tetrahymena* rDNA is present elsewhere in the genome and may be related to the alteration of the somatic genome. *J Cell Biol* 90(2):515-20.

- Yao MC, Chao JL. 2005. RNA-guided DNA deletion in *Tetrahymena*: an RNAi-based mechanism for programmed genome rearrangements. *Annu Rev Genet* 39:537-59.
- Ye W, Ali N, Bembenek ME, Shears SB, Lafer EM. 1995. Inhibition of clathrin assembly by high affinity binding of specific inositol polyphosphates to the synapse-specific clathrin assembly protein AP-3. *J Biol Chem* 270(4):1564-8.
- Yu H. 1999. Extending the size limit of protein nuclear magnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(2):332-4.
- Zaug AJ, Cech TR. 1986. The intervening sequence RNA of *Tetrahymena* is an enzyme. *Science* 231(4737):470-5.
- Zhang B, Koh YH, Beckstead RB, Budnik V, Ganetzky B, Bellen HJ. 1998. Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. *Neuron* 21(6):1465-75.
- Zhang GG, Kazanietz MG, Blumberg PM, Hurley JH. 1995. Crystal-structure of the Cys2 activator-binding domain of protein-kinase C-delta in complex with phorbol ester. *Cell* 81(6):917-924.
- Zimmermann P, Meerschaert K, Reekmans G, Leenaerts I, Small JV, Vandekerckhove J, David G, Gettemans J. 2002. PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Mol Cell* 9(6):1215-25.

Danksagung

Mein Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. William Martin für die Möglichkeit der Promotion und für sein bekundetes Interesse an meinen Projekten. Besonders bedanke ich mich bei Dr. Sven Gould für die herausfordernde Themenstellung und die Betreuung meiner Arbeit sowie für seine stetige Motivation. Ich bedanke mich vor allem für die sehr guten Arbeitsbedingungen und wissenschaftlichen Kontakte, insbesondere für die Möglichkeit, dass ich an nationalen und internationalen Kongressen teilnehmen konnte.

Ich bedanke mich auch bei Herrn Prof. Dr. Heinz Melhorn für die freundliche Übernahme des Korreferats und die Durchsicht meiner Arbeit.

Dem gesamten Team des Instituts für Molekulare Evolution möchte ich für eine entspannte Arbeitsatmosphäre sowie für die hilfreiche Unterstützung danken.

Mein letzter Dank richtet sich an meine Freunde, meine Eltern und Tina, die stets an mich geglaubt haben.

Ich versichere an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. 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 28.08.2015

Jörn Habicht