



**Cytoskelett-Analyse parabasalischer Parasiten:  
Die Präsenz potentieller Intermediärfilament-  
Proteine in Protisten**

**Inaugural-Dissertation**

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

vorgelegt von

**Harald Preisner**

aus Freiburg im Breisgau

Düsseldorf, Dezember 2016

---

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

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

Erstgutachter: **Prof. Dr. William F. Martin**  
Zweitgutachter: **PD Dr. Sven B. Gould**

Tag der mündlichen Prüfung: **01.02.2017**

---

## **Publikation**

**Preisner H, Karin EL, Poschmann G, Stühler K, Pupko T, Gould SB (2016)**  
The cytoskeleton of parabasal parasites comprises proteins that share properties common to intermediate filament proteins. *Protist* **167**:526–543.

## **Tagungsbeiträge**

**Preisner H, Karin EL, Pupko T, Gould SB (2015)** Lineage-defining cytoskeletal structures of parabasal parasites harbour proteins that resemble intermediate filament proteins. VII European Congress of Protistology (ECOP) – International Society of Protistology (ISOP) Joint Meeting, Sevilla, Spanien. Posterpräsentation.

**Preisner H, Karin EL, Pupko T, Gould SB (2015)** Lineage-defining cytoskeletal structures of parabasal parasites harbour proteins that resemble intermediate filament proteins. XVII Jahrestagung der Deutschen Sektion der Internationalen Gesellschaft für Endocytobiologie, Berlin, Deutschland. Posterpräsentation.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Summary</b> .....	<b>2</b>
<b>3. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
3.1. Das eukaryotische Cytoskelett .....	3
3.1.1 Aktinfilamente .....	3
3.1.2 Mikrotubuli .....	5
3.1.3 Intermediärfilamente .....	8
3.2 Protisten und die Diversität des Cytoskeletts im Kontext von IF Proteinen .....	13
3.3 Die Parabasalia und deren Cytoskelett .....	18
3.4 <i>Tetratrichomonas gallinarum</i> und <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	25
3.5 Ziele der Dissertation .....	27
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>30</b>
4.1 Material .....	30
4.1.1 Medien und Chemikalien .....	30
4.1.2 Antibiotika .....	30
4.1.3 Antikörper und Fluorophore .....	30
4.1.4 Oligonukleotide .....	31
4.1.5 Enzyme .....	31
4.1.6 Kits .....	31
4.1.7 Vektoren .....	32
4.1.8 Geräte .....	34
4.1.9 Organismen und deren Kultivierung .....	35
4.1.9.1 <i>Tetratrichomonas gallinarum</i> und <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	35
4.1.9.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	35
4.1.9.3 <i>Escherichia coli</i> .....	36
4.2 Methoden .....	36
4.2.1 Nukleinsäure orientierte Methoden .....	36
4.2.1.1 Extraktion genomischer DNA aus <i>T. vaginalis</i> .....	36
4.2.1.2 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	36
4.2.1.3 Herstellung der Expressionsvektoren .....	37
4.2.1.4 RNA-Extraktion aus <i>S. cerevisiae</i> .....	37
4.2.1.5 cDNA-Synthese .....	38
4.2.1.6 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) .....	38
4.2.2 Protein orientierte Methoden .....	38
4.2.2.1 Extraktion des Cytoskeletts von <i>T. gallinarum</i> .....	38
4.2.2.2 Protein-Identifikation durch Flüssigkeitschromatographie gekoppelte Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS) .....	39

4.2.2.3 Transfektion von <i>T. gallinarum</i> und <i>T. vaginalis</i> .....	40
4.2.2.4 Transfektion von <i>S. cerevisiae</i> .....	40
4.2.2.5 Protein-Extraktion aus <i>T. vaginalis</i> .....	41
4.2.2.6 Protein-Extraktion aus <i>S. cerevisiae</i> .....	41
4.2.2.7 Elektrophoretische Trennung von Proteinen (SDS-PAGE) .....	42
4.2.2.8 Western Blot .....	42
4.2.2.9 Immunodetektion .....	42
4.2.2.10 Immunfluoreszenz-Mikroskopie .....	43
4.2.2.11 Lebendzellobservierung .....	44
4.2.2.12 Transmissionselektronen-Mikroskopie .....	44
4.2.2.12.1 Fixierung und Pelletieren der Zellen .....	44
4.2.2.12.2 Einbettung und Schnitt .....	45
4.2.3 Bioinformatische Methoden .....	46
4.2.3.1 Identifikation der massenspektrometrisch erfassten Proteine .....	46
4.2.3.2 Protein-Datensätze und deren Analyse .....	47
<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
5.1. Extraktion des Cytoskeletts von <i>T. gallinarum</i> .....	49
5.2. Massenspektrometrische Proteom-Analyse des Cytoskeletts von <i>T. gallinarum</i> .....	51
5.3. Cytoskelett-assoziierte Proteine zeigen eine erhöhte Anzahl langer Coiled-Coil Segmente und anderer repetitiver Motive .....	55
5.4 Homologe Proteine von <i>T. vaginalis</i> lokalisieren in filamentösen Strukturen .....	57
5.5 Die heterologe Expression von TVAG_474360 in <i>T. gallinarum</i> induziert die Formation zusätzlicher gestreifter Filamente zu einer langen, stabartigen Struktur .....	64
5.6 Heterologe Expressions-Analyse Cytoskelett-assoziiierter Proteine von <i>T. vaginalis</i> auf deren Fähigkeit in <i>S. cerevisiae</i> Filamente zu formen .....	67
<b>6. Diskussion</b> .....	<b>70</b>
6.1 Die Spezifität Cytoskelett-assoziiierter Proteine in Spezies der Trichomonadidae .....	71
6.2 Coiled-Coils und repetitive Motive als Kennzeichen Cytoskelett-assoziiierter Proteine .....	73
6.3 Die Assoziation Repeat-haltiger Proteine mit filamentösen Cytoskelett-Strukturen .....	75
6.4 IF Proteine in Protisten und die Herausforderung ihrer Identifikation .....	80
6.5 Erkenntnisse dieser Doktorarbeit .....	82
6.6 Ausblick .....	83
<b>7. Anhang</b> .....	<b>85</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>97</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>98</b>

## 1. Zusammenfassung

Das Cytoskelett ist ein fundamentaler Bestandteil der eukaryotischen Zelle. Neben einer stabilisierenden Funktion zur Erhaltung der Zellintegrität gegenüber Scher- und anderen deformierend einwirkenden Kräften, ermöglicht es unter anderem die Zellmotilität, den intrazellulären Transport, die Transduktion von Signalkaskaden als auch die Regulation der Genexpression. Hierbei stützt es sich auf ein komplexes, dynamisch interagierendes Netzwerk der drei Filamentklassen: Aktinfilamente (syn. Mikrofilamente), Mikrotubuli und Intermediärfilamente (IF). Während die strukturaufbauenden Proteine der Aktinfilamente und der Mikrotubuli hoch konserviert sind und sich anhand ihrer Primärsequenz in einer Vielzahl phylogenetisch differenzierter Eukaryoten nachweisen lassen, trifft dies nicht für IF Proteine zu. Aufgrund dessen dominiert in der Fachliteratur allgemein die Ansicht, dass IF Proteine eine evolutionär limitierte Errungenschaft der Metazoa (Vielzeller) sei. Aktuelle Forschungsergebnisse weisen jedoch vermehrt darauf hin, dass IF Proteine bereits in Protisten, und womöglich im letzten gemeinsamen Vorgänger aller Eukaryoten, präsent waren.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde in der vorliegenden Dissertation das Cytoskelett der Excavaten *Tetratrichomonas gallinarum* und *Trichomonas vaginalis* (beides Mitglieder der Trichomonadida) analysiert. Die massenspektrometrische Proteom-Analyse extrahierter Cytoskelett-Fraktionen enthüllte 203 Proteine, welche in beiden Parasiten reziprok determiniert wurden. Für mehr als 50% dieser Proteine konnten über öffentliche Datenbanken weder Funktionsvorhersagen noch Homologe in Organismen außerhalb der Trichomonadida ermittelt werden. Durch bioinformatische Struktur-Analysen wurde ferner vorhergesagt, dass die 203 Proteine signifikant mehr und längere Coiled-Coil Segmente und andere repetitive Struktur motive beinhalten als die entsprechenden Kontroll-Datensätze. Lange Coiled-Coil Motive gelten als ein definierendes Charakteristikum metazoischer IF Proteine. Die Immunfluoreszenz-basierte Lokalisation von fünf unbekannt Kandidatenproteinen mit repetitiver Sequenzarchitektur, veranschaulichte deren Assoziation mit filamentösen Cytoskelett-Strukturen in beiden Flagellaten. Weiterhin induzierte die heterologe Expression einer der Kandidaten (TVAG\_474360) in *T. gallinarum* die Formation zusätzlicher gestreifter Filamente zu einer auffälligen und steif erscheinenden Struktur.

Ergänzend zu der Vielzahl an Cytoskelett-assoziierten Proteinen, die sich häufig durch lange Coiled-Coil Segmente und einer repetitiven Sequenzanordnung auszeichnen und meist unabhängig von Aktin und Tubulin in diversen Protisten beschrieben wurden, unterstützen die in dieser Dissertation erarbeiteten Resultate die Schlussfolgerung, dass IF Proteine auch in Protisten vorkommen. Dies stellt zugleich die bisherige Verwendung des Begriffs *Intermediärfilament* in exklusivem Bezug auf die Metazoa in Frage.

## 2. Summary

The cytoskeleton is regarded a fundamental part of the eukaryotic cell. Besides its function in protecting the cell's integrity against shearing- and other deforming forces, it enables, inter alia, cell motility, intracellular transport, the transduction of signaling and the regulation of gene expression. Therefore, it relies on a complex and dynamic interacting network comprised of the following three filament classes: actin filaments (syn. microfilaments), microtubules and intermediate filaments (IF). While the two structure-defining proteins actin and tubulin are highly conserved and can be identified by their primary sequence in a range of phylogenetically distant eukaryotes, this is not the case for IF proteins. As a result, the subject literature is dominated by the common notion that IF proteins are an evolutionary invention of the metazoa and restricted to this group. Recent findings, however, increasingly indicate that IF proteins are present among protists and possibly a part of the biology of the last common ancestor of all eukaryotes.

Building up on these insights, this dissertation aimed to analyze the cytoskeleton of the Excavata *Tetratrichomonas gallinarum* and *Trichomonas vaginalis* (both members of the Trichomonadida). The mass spectrometry-based proteome profiling of extracted cytoskeleton fractions revealed 203 proteins which could be reciprocally identified in both parasites. For more than 50% of these proteins public databases neither contained annotations of function nor protein homologs of organisms outside of the Trichomonadida. Bioinformatical structure analyses further predicted that the 203 proteins harbor significantly more and longer coiled-coil segments and other repetitive motives than the control datasets. Long coiled-coil motives are considered one defining feature of metazoan IF proteins. The immunofluorescence-based localization of five unknown candidate proteins containing repetitive motives demonstrated their association with filamentous cytoskeletal structures in both flagellates. Moreover, the heterologous expression of one candidate (TVAG\_474360) in *T. gallinarum* induced the formation of additional striated filaments bundled into a conspicuous stiff structure.

In addition to the many cytoskeleton associated proteins which harbor long coiled-coil segments within their repetitive sequence architecture, and were often described as being independent of actin and tubulin in diverse protists, the results of this PhD thesis at hand supports the conclusion that IF proteins do occur in protists and furthermore questions the restrictive use of the term *intermediate filament* for metazoa.

### 3. Einleitung

#### 3.1 Das eukaryotische Cytoskelett

Die Fähigkeit einer eukaryotischen Zelle ihre Integrität und Stabilität entgegen von außen einwirkenden Kräften zu bewahren, stützt sich maßgeblich auf das Cytoskelett. Ferner koordiniert das Cytoskelett fundamentale Funktionen wie (i) die Bewegung und Formänderung einer Zelle (ii) die räumliche und dynamische Organisation im Zellinneren sowie (iii) die Verknüpfung und Kommunikation mit der externen Umgebung, beispielsweise beim Verbund von Einzellern oder bei der Ausbildung eines Gewebes in multizellulären Organismen (Fletcher und Mullins, 2010). Gewährleistet werden diese Funktionen durch die Interaktion regulatorischer Proteine mit einem komplexen filamentösen Netzwerk, welches auf den drei Filamentklassen der Aktinfilamente (syn. Mikrofilamente), Mikrotubuli und Intermediärfilamente aufgebaut ist. Jede dieser Filamentklassen erfüllt spezifische Funktionen, was sich in ihrer unterschiedlichen Architektur, Proteinzusammensetzung, Assemblierungs- und Disassemblierungs-Dynamik, sowie biochemischen- und biophysikalischen Eigenschaften, widerspiegelt.

##### 3.1.1 Aktinfilamente

Aktinfilamente kleiden als lineare Bündel, zweidimensionale Netzwerke und dreidimensionale Geflechte weite Bereiche der Zelle und vermehrt den Zellcortex unterhalb der Plasmamembran aus. Involviert in einer Vielzahl zellulärer Prozesse stützen sie zum Beispiel Bewegungsvorgänge bei der Lamellipodien vermittelten Migration (*crawling motion*) und bei der Kontraktion von Skelettmuskelzellen von Säugetieren (Dominguez und Holmes, 2011; Hanson und Lowy, 1963; Mattila und Lappalainen, 2008). Sie ermöglichen Adhäsionsvorgänge wie beispielsweise die Anheftung von extrazellulären Parasiten an Wirtszelle (Kusdian et al., 2013). Sie vermitteln die Morphogenese und Apoptose von Zellen (Desouza et al., 2012) und gelten als stabilisierender Bestandteil der Endo- und Phagozytose-Maschinerie (Kress et al., 2007). Neben der Präsenz im Cytoplasma sind Aktinfilamente auch an genregulatorischen Prozessen wie der Transkription und der Anordnung chromosomaler Loci im Nukleus beteiligt (Dundr et al., 2007; Grosse und Vartiainen, 2013).

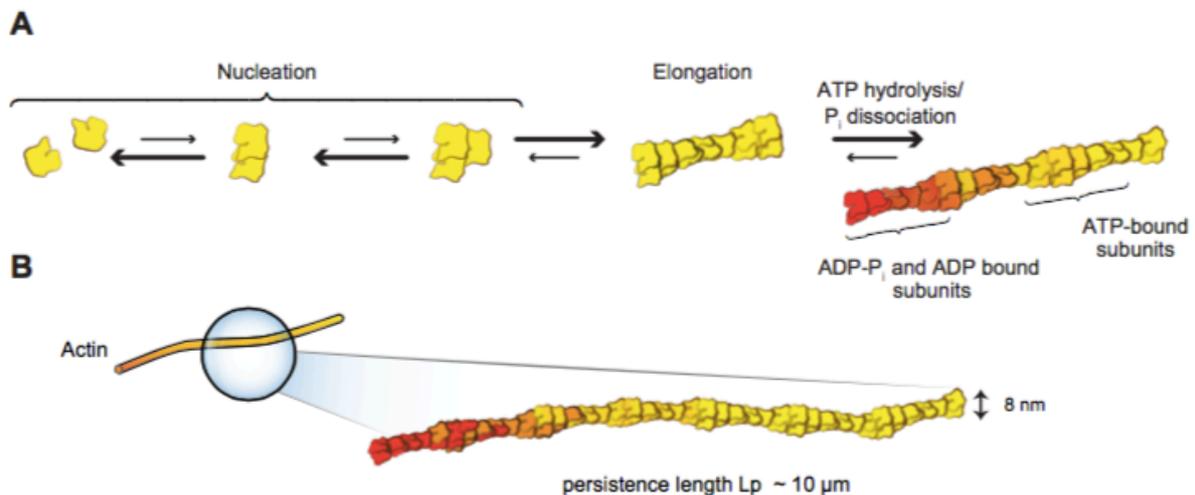
Strukturell gelten Aktinfilamente als semi-flexible Polymere mit einem Durchmesser von circa 8 nm und einer Persistenzlänge von 10  $\mu\text{m}$  als die schmalsten der drei Filamentklassen (Blanchoin et al. 2014). Der Grundbaustein eines doppelsträngig-helikalen Aktinfilaments (F-Aktin) ist das Aktin-Monomer (G-Aktin), ein globuläres 42 kDa Protein,

welches in Eukaryoten hoch konserviert ist (Blanchoin et al., 2014; Huber et al., 2013). Das Protein besitzt Bindestellen für ATP und ADP, die für die Assemblierungsreaktion zum F-Aktin essentiell sind. Als polares Polymer mit einer rechtsorientierten Drehung besitzt F-Aktin zwei dynamisch unterschiedliche Enden, das Plus- (syn. hakenartige) und das Minus- (syn. spitze) Ende, an denen ein ständiger Auf- und Abbau an G-Aktin erfolgt. Das Plus-Ende erscheint hierbei dynamischer und vermittelt den Elongationsschritt der Assemblierungsreaktion bis zu zehnfach schneller als das Minus-Ende (Blanchoin et al., 2014). Die Reaktion vollzieht sich in zwei Schritten: (1) die Nukleation umfasst die Formation von Di- und Trimeren auf Basis der G-Aktin-Monomere, gefolgt von (2) der zügigen Elongation am Plus-Ende unter der Hydrolyse von ATP und der Abspaltung von Phosphat (Abb. 3.1). Der kontinuierliche Abbau am Minus- und Anbau von G-Aktin am Plus-Ende im Rahmen einer konstant anhaltenden Filamentlänge (*steady-state-phase*) wird als *Treadmilling*-Effekt bezeichnet (Huber et al., 2013).

Aktinfilamente interagieren mit einem umfangreichen Pool an Aktin-bindenden akzessorischen Proteinen, wozu auch die Motorproteine (syn. molekulare Motoren) der Myosin Proteinfamilie zählen. Myosin (M2) wurde erstmals im Jahr 1859 beschrieben und später als Aktin-assoziierte ATPase als das erste Motorprotein identifiziert (Engelhardt und Ljubimowa, 1939; Kühne, 1859). Mittlerweile sind diverse Isomere dokumentiert, die kollektiv einer Myosin Superfamilie mit bisweilen 35 Klassen zugeordnet wurden (Odronitz und Kollmar, 2007). Aktuelle Phylogenie-Studien basal abzweigender Eukaryoten weisen jedoch auf die Existenz weiterer, divergenter und unkonventioneller Myosine hin, mit einer Einteilung in insgesamt 45 Klassen (Pasha et al., 2016). Während die meisten Eukaryoten Myosine exprimieren und Säugetiere beispielsweise bis zu 40 verschiedene Myosin-Gene codieren, konnten in den Protisten der Rhodophyceae und Diplomonadida (wozu auch die Trichomonadida zählen) bisher keine Myosin-Homologe identifiziert werden (Dawson und Paredez, 2013; Foth et al., 2006; Paredez et al., 2011).

Als molekulare Motoren vermitteln Myosine vielfältige Bewegungsvorgänge entlang von Aktinfilamenten. Neben der Motilität und der Division einer Zelle, katalysieren sie den intrazellulären Transport von Organellen und Vesikeln, die Kontraktion von Muskel- und Sinneszellen in Vertebraten als auch die Invasion von Wirtszellen wie im Fall von Parasiten der Apicomplexa (Foth et al., 2006). Ermöglicht werden diese Prozesse durch die dreiteilige Architektur einer konservierten Head-, einer Neck- und einer variablen Tail-Domäne. Die Head-Domäne vermittelt die Bindung mit Aktin und katalysiert unter Hydrolyse von ATP den schrittartigen Bewegungsablauf entlang eines Aktinfilaments. Die Neck-Domäne interagiert

mit den leichten Ketten des Proteins. Die auffällig variable Tail-Domäne verschiedener Myosin-Isomere ermöglicht schließlich die spezifische Interaktion mit unterschiedlichen Bindungspartnern unter Ausführung der entsprechenden Zellprozesse (Hartman und Spudich, 2012).



**Abbildung 3.1: Aktinfilamente und deren Assemblierungsreaktion.** (A) Schematisiert sind die beiden Assemblierungs-Reaktionsschritte: Nukleation und Elongation. Bei der Nukleation werden globuläre Aktin-Monomere (gelb) zu Di- und Trimeren formiert. Die Elongation zu Filamenten erfolgt anschließend am Plus-Ende unter ATP-Hydrolyse und Phosphat-Abspaltung. (B) Das elongierte Filament besitzt einen Durchmesser von etwa 8 nm und einer Persistenzlänge von circa 10 µm. Basierend auf Blanchoin et al., 2014.

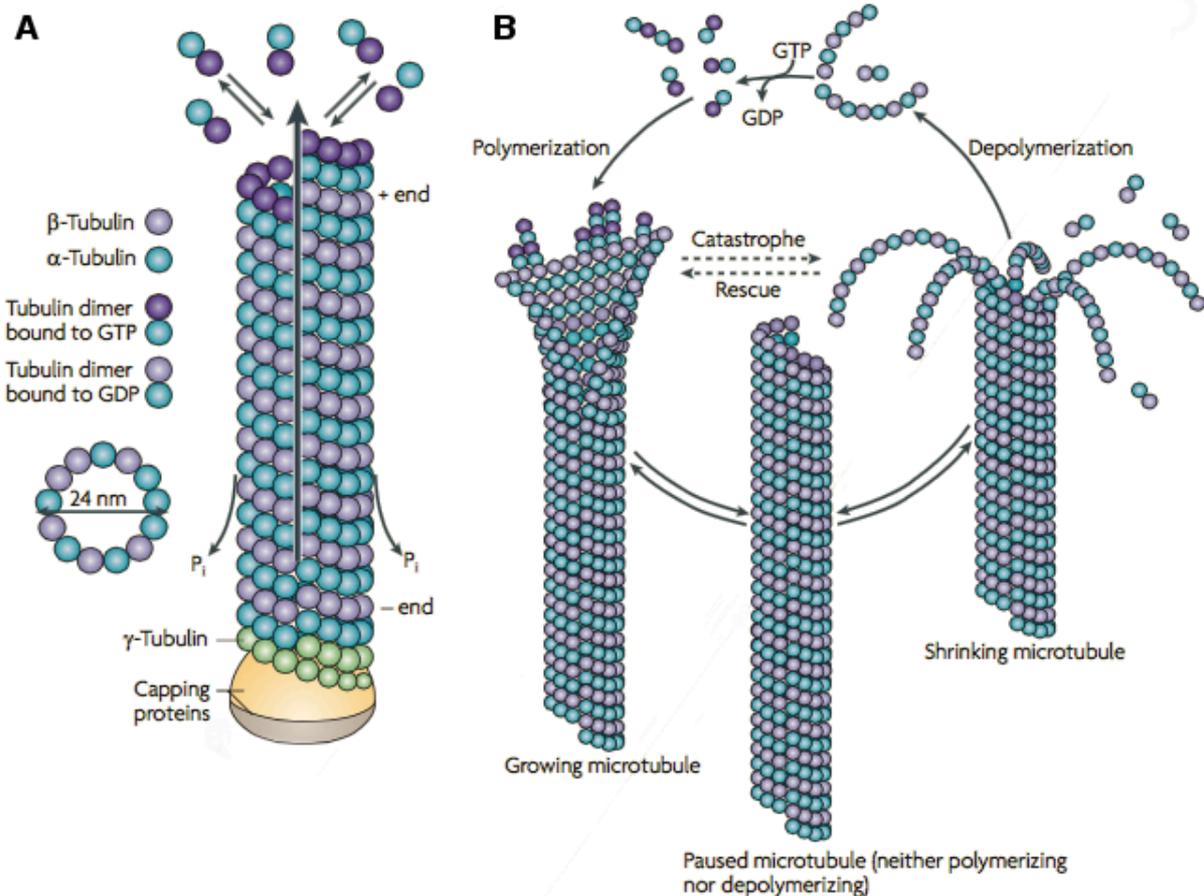
### 3.1.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli bilden als „Schienen“ der Zelle die Infrastruktur des intrazellulären Transports und determinieren die Position von Organellen wie Mitochondrien und Lysosomen. Im Zuge der Zellteilung vermitteln sie als Teil des Spindelapparats die Trennung und Aufteilung der Schwesterchromatide. Als Hauptbestandteil von Cilien und Flagellen formieren sie den Basalkörper und das Axonem und gewährleisten deren Bewegungsvorgänge (Akhmanova und Steinmetz, 2015; Alper et al., 2014).

Analog zu Aktinfilamenten stellen Mikrotubuli polare Polymere dar. Sie gelten als die steifsten und widerstandsfähigsten der drei Filamentklassen (Fletcher und Mullins 2010). Als röhrenförmige, zylinderartige Hohlkörper mit einem Durchmesser von 24-25 nm und einer Persistenzlänge von 1-5 mm, können sie eine eukaryotische Zelle komplett durchspannen (Blanchoin et al., 2014; Fletcher und Mullins 2010). Typischerweise bestehen sie aus 13 oder 14 parallel zu einem Zylinder angeordneten Protofilamenten (mit Variationen von 8-20), die aus heterodimeren Einheiten der globulären Proteine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin aufgebaut sind (Abb. 3.2). Der strukturelle Aufbau der Mikrotubuli als auch die Proteinsequenz von  $\alpha$ - und  $\beta$ -

Tubulin ist hoch konserviert innerhalb der Eukaryoten (Wade, 2009). Neben diesen sind mindestens sechs weitere Tubulin-Klassen ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\iota$ ) bekannt, wobei sich Proteine der  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Klasse bis zum letzten gemeinsamen Vorfahren aller Eukaryoten (LECA) zurückverfolgen lassen (Wickstead und Gull, 2011).

Mikrotubuli werden von *Mikrotubuli-organisierenden Centren* (MTOC), primär den Centrosomen oder den Basalkörpern gebildet (Brinkley, 1985). Arrangiert werden sie in diesen Strukturen typischerweise im 9x3 Muster, was in einer kreisförmigen Anordnung von jeweils neun Mikrotubuli-Triplets resultiert. Axoneme von Cilien und Flagellen visualisieren das 9+2 Muster, bei dem neun Mikrotubuli-Paare kreisförmig um ein zentrales Mikrotubuli-Paar angeordnet sind. Dieses Arrangement gilt ebenfalls als hoch konserviert, von Protisten bis zum Homo sapiens (Mohri et al., 2012). Als polare und hoch dynamische Strukturen verfügen sie wie Aktinfilamente auch, über ein dynamischeres Plus- und ein weniger dynamisches Minus-Ende. Das Ausstrahlen (Nukleation) eines Mikrotubulus mit dessen Plus-Ende ins Cytoplasma gerichtet, erfolgt vom Minus-Ende, welches über einen  $\gamma$ -Tubulin-haltigen Ringkomplex ( $\gamma$ -TuRC) im MTOC verankert ist und durch diesen initiiert wird (Kollman et al., 2011). Die sogenannte „Dynamische Instabilität“, die zyklische und rapide Abfolge von Verlängerung und Verkürzung, ist in Abbildung 3.2 schematisiert (Huber et al., 2013). Die Assemblierung eines Mikrotubulus vollzieht sich durch die Nukleation von GTP-gebundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Dimeren ( $\alpha$ - $\beta$ -Dimer) am Plus-Ende (Abb. 3.2B). Werden mehr GTP- $\alpha$ - $\beta$ -Dimere an das Plus-Ende des Mikrotubulus hinzugefügt als zu GDP- $\alpha$ - $\beta$ -Dimere hydrolysiert werden, so bildet sich dort eine stabilisierende Schicht, die sogenannte GTP-Cap, welche die Elongationsreaktion fördert. Nimmt die Hydrolyse der GTP- $\alpha$ - $\beta$ -Dimere überhand, so zerfällt die GTP-Cap und der Mikrotubulus wird instabil und disassembliert (Catastrophe, Abb. 3.2B). Die mit der zügigen Disassemblierung verbundene Verkürzung des Mikrotubulus kann durch den Konzentrationsanstieg an freien GTP- $\alpha$ - $\beta$ -Dimeren rückgängig gemacht werden (Rescue, Abb. 3.2B). Entsprechend den Aktinfilamenten findet auch hier der *Treadmilling*-Effekt statt, bei dem die Mikrotubulus-Länge konstant bleibt.



**Abbildung 3.2: Assemblierung und dynamische Instabilität von Mikrotubuli.** (A) Im GTP-gebundenen Zustand assemblieren die Tubulin-Heterodimere zu einem röhrenförmigen Zylinder, der meist aus 13 Protofilamenten besteht. Nach der Assemblierung folgt die GTP-Hydrolyse. (B) Sobald die Konzentration an freien GTP-Dimeren einen kritischen Schwellenwert unterschreitet, zerfallen die instabileren GDP-Dimere und der Mikrotubuli-Zylinder schrumpft (Catastrophe). Dieser Prozess kann nur durch den Konzentrationsanstieg an GTP-Dimeren, die eine stabilisierende Schicht bilden (capping), rückgängig gemacht werden (Rescue). Basierend auf Huber et al., 2013.

Koordiniert werden diese dynamischen Prozesse durch eine Vielzahl assoziierter Proteine, die allgemein als *Microtubule Associated Proteins* (MAPs) und Motorproteine zusammengefasst werden (Akhmanova und Steinmetz 2015). Zu den MAPs zählen unter anderem die *plus-end-Tracking Proteins* (+TIPs), die am Plus-Ende akkumulieren, dort den Anbau von Tubulin-Dimeren und damit deren Verlängerung fördern. Zu den destabilisierenden Proteinen zählen mitunter Katanin und Spastin, die als *ATPases Associated with various cellular Activities* (AAA Proteine) Mikrotubuli gezielt zerschneiden können (Lacroix et al., 2010; Zhang et al., 2011). Weiterhin katalysieren Depolymerasen der Kinesin Familien Kinesin-13, Kinesin-8 oder Kinesin-14 die Verkürzung der Mikrotubuli (Akhmanova und Steinmetz, 2015; Asenjo et al., 2013). Die Motorproteine der Mikrotubuli umfassen diverse Mitglieder der Kinesin- und Dynein-Superfamilien. Diese Proteine repräsentieren im Allgemeinen ATPasen, die sich unter der Hydrolyse von ATP entlang der Mikrotubuli bewegen und mitunter zur Zellteilung

beitragen. Vergleichbar mit einem beladenen Zugwaggon auf einem Schienensystem, vermitteln sie wie die Myosine der Aktinfilamente ebenfalls den intrazellulären Transport von Organellen und Vesikeln. Kinesine und Myosine visualisieren auch eine ähnliche Faltungsstruktur, was auf einen gemeinsamen Ursprung hindeutet (Kull et al., 1996). Während die konventionellen Kinesine (Kinesin-1-Familie) eine N-terminale Motor-Domäne besitzen und sich typischerweise zum Plus-Ende des Mikrotubulus bewegen, existieren auch Kinesine mit C-terminaler Motor-Domäne, wie zum Beispiel Ncd (Kinesin-14-Familie), die das Minus-Ende ansteuern (Wade, 2009). Für Vertreter der Kinesin-1-Familie wurden hierbei Geschwindigkeiten von circa  $1 \mu\text{m/s}$  determiniert (Verbrugge et al., 2007).

Dyneine können in cytoplasmatische und Axonem-assoziierte Typen unterschieden werden. Die Cytoplasmatischen repräsentieren umfangreiche Proteinkomplexe ( $\sim 500 \text{ kDa}$ ) mit mehreren schweren Ketten, die auch am Aufbau des mitotischen Spindelapparats und der Sekretion der Chromosomen beteiligt sind (Vallee et al., 2004). Sie steuern üblicherweise das Minus-Ende an, können sich aber auch lateral und rückwärts auf den Mikrotubuli bewegen. Mit einer Geschwindigkeit von mehr als  $2 \mu\text{m/s}$  sind sie schneller als Kinesine (Wade, 2009). Durch die Interaktion mit dem Axonem eukaryotischer Cilien und Flagellen ermöglichen sie deren Bewegungsabläufe und damit auch die Lokomotion flagellierter Einzeller (Mohri et al., 2012). Im Gegensatz zu Kinesinen, deren Mitglieder bisher in allen sequenzierten Genomen eukaryotischer Organismen gefunden wurden, gelten Dyneine in den Gattungen *Entamoeba* (Amoebozoa), sowie in *Cyanidioschyzon*, *Populus*, *Arabidopsis* und *Oryza* (Archaeplastida) bisher als sekundär verloren (Wickstead und Gull 2011).

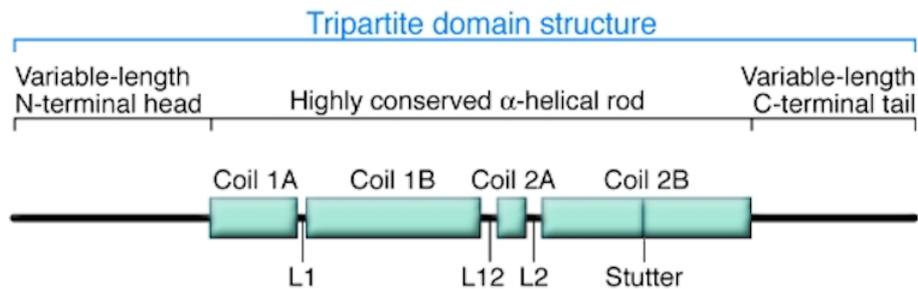
### 3.1.3 Intermediärfilamente

Intermediärfilamente (IF) wurden erstmals vor annähernd 50 Jahren in Muskelzellen von Hühnerembryonen beschrieben (Ishikawa et al., 1968). Neben ihrer primären Funktion als mechanischer „Stress-Absorber“ zur Erhaltung der Zellintegrität entgegen externen Scherkräften kommen ihnen weitere essentielle und vielfältige Funktionen zu (Goldman et al., 1996; Herrmann et al., 2009). Sie determinieren die Architektur der Zelle, gewährleisten ihre Motilität und regulieren diverse Signalwege wie beispielsweise jene des programmierten Zelltods, der Zellmigration und des Zell- und Gewebewachstums (Coulombe und Wong, 2004; Helfand et al., 2011). Sie vermitteln den gerichteten Transport von Proteinen und Vesikeln sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsvorgänge im Gewebeverbund (Kim und Coulombe, 2007). Ermöglicht wird dieses umfangreiche Funktionsspektrum durch ein

komplexes Netzwerk an IF im Cytoplasma und im Innern des Nukleus, welches sich je nach Zelltyp spezifisch aus einer Gruppe heterogener Proteine zusammensetzt.

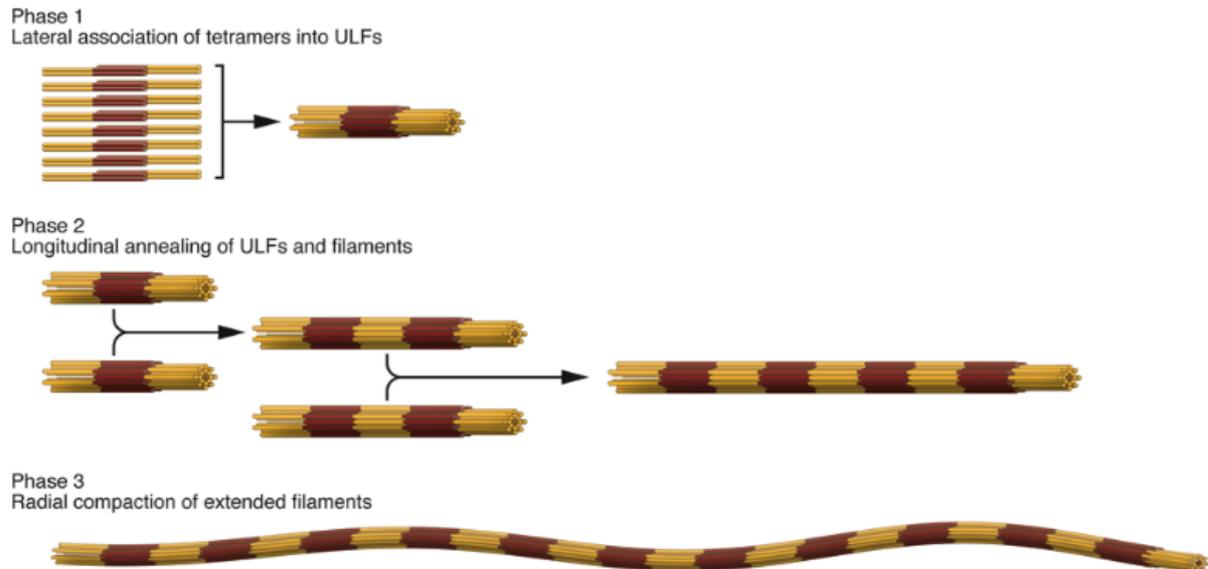
Strukturell unterscheiden sich IF deutlich von Aktinfilamenten und Mikrotubuli. Ihr Durchmesser von circa 10 nm liegt allgemein — jedoch mit Ausnahmen — zwischen den der beiden anderen Filamentarten, was sich als namensgebende Eigenschaft etablierte (Ishikawa et al., 1968; Goldman et al. 2012). Häufig beschrieben als seil- oder strickartig gelten sie als die elastischste und aufgrund ihrer Protein-Diversität die am wenigsten charakterisierte der drei Filamentklassen (Kreplak et al., 2008; Snider und Omary, 2014). Sie besitzen keine Polarität, verfügen über keine Nukleosid- (ATP/GTP) gekoppelte Assemblierungs-Dynamik und bestehen aus nicht-globulären Proteinen, die sich in ihrer Primärsequenz auffällig voneinander unterscheiden. Assemblierungs-Inhibitoren, wie beispielsweise Cytochalasin B für Aktinfilamente und Colchicin für Mikrotubuli, sind für IF bisher keine bekannt (Herrmann et al., 2009).

IF bestehen grundlegend aus monomeren Polypeptiden, die typischerweise einen dreiteiligen Aufbau aus Head-, Rod- und Tail-Domäne aufweisen (Abb. 3.3). Während die lange und häufig zentral gelegene Rod-Domäne  $\alpha$ -helikale Coiled-Coil Segmente besitzt, die essentiell für die Filament-Formierung sind, besteht die N-terminale Head- und die C-terminale Tail-Domäne stets aus nicht helikalen Regionen variabler Länge und Sequenz. Im Gegensatz dazu gilt die Architektur der Rod-Domäne als hoch konserviert. Jedoch nicht aufgrund ihrer Primärsequenz, sondern aufgrund der Anzahl und Anordnung der Coiled-Coil Segmente, die bei cytoplasmatischen IF Proteinen für gewöhnlich einen Längenbereich von ~310 Aminosäuren und bei nuklearen einen von ~356 Aminosäuren einnehmen (Fuchs und Weber, 1994; Kim und Coulombe, 2007).



**Abbildung 3.3: Dreiteilige Architektur von Intermediärfilament Proteinen.** IF Proteine multizellulärer Organismen besitzen eine dreiteilige Struktur aus einer langen, zentralen  $\alpha$ -helikalen Rod-, einer N-terminalen Head- und einer C-terminalen Tail-Domäne. Im Gegensatz zur nicht helikalen Head- und Tail-Domäne, die in Sequenz und Länge häufig variieren, gilt die Rod-Domäne mit ihrer Anordnung und Anzahl Coiled-Coil-haltiger Segmente als hoch konserviert, trotz signifikanter Unterschiede in der Primärsequenz. Die schematisierte Rod-Domäne besteht aus vier Coiled-Coil Segmenten (Coil1A, 1B, 2A und 2B), die durch nicht-helikale Linker-Regionen (L1, L12 und L2) getrennt sind. Die Stutter-Region in Coil 2B deutet auf eine konservierte Irregularität des Heptad-repetitiven Coiled-Coil Musters hin. Basierend auf Eriksson et al., 2009.

Die Assemblierung cytoplasmatischer IF erfolgt durch die mehrstufige und hierarchische Bündelung von Mono-, Di-, Tetra- und Oktamer-Untereinheiten wie am Beispiel von Vimentin durch *in vitro* Experimente von Herrmann und Kollegen (Kirmse et al., 2007) determiniert wurde und in Abbildung 3.4 schematisiert ist. Dimere formieren sich durch die Interaktion von zwei anti-parallel angeordneten Monomeren auf Basis ihrer rechtsdrehenden Coiled-Coil-haltigen Rod-Domäne. Die weitere Assemblierung erfolgt in drei Schritten: (1) Zwei Dimere assoziieren jeweils spontan zu Tetrameren von den sich acht zu einem Längeneinheitlichen Filament (*Unit-Length Filament*, ULF) bündeln. (2) Zwei ULFs fusionieren longitudinal zu einem Filamentblock, der mit einem weiteren Filamentblock einen 16 nm breiten Filamentvorläufer formiert. (3) Durch radiale Kompression des Filamentvorläufers entsteht schließlich das reife, circa 10 nm breite Intermediärfilament (Herrmann et al., 2009).



**Abbildung 3.4: Assemblierung cytoplasmatischer Intermediärfilamente. Schritt 1:** Acht Tetramer-Untereinheiten, die jeweils aus zwei antiparallelen Coiled-Coil Dimeren bestehen, assemblieren im Zuge der Initiation lateral zu einem längen-einheitlichen Filament (ULF). Das dunkelrote Segment visualisiert Coil 1 und das Gelbe Coil 2 der  $\alpha$ -helikalen-Rod-Domäne eines jeden Monomers. **Schritt 2:** Zwei ULFs lagern sich longitudinal zu kurzen Filamentblöcken an, die durch Verknüpfung ihrer Enden ein längeres Filament formieren. **Schritt 3:** Dieses verlängerte Filament mit einem Durchmesser von ~16 nm wird schließlich radial zu einem schmalen, ~11 nm breiten Filament komprimiert. Basierend auf Herrmann et al., 2009.

IF Proteine repräsentieren eine große und heterogene Proteinfamilie die in Säugetieren auf der Expression von circa 70 Genen (67 cytoplasmatische und 3 nukleare) basiert und mit diversen Erkrankungen in Zusammenhang stehen (Goldman et al., 2012; Szeverenyi et al., 2008). Aufgrund auffälliger Unterschiede in Größe, Primärsequenz, Genstruktur, Assemblierungs- und Regulationsmechanismen werden sie allgemein in sechs Homologie-Klassen und weiter in drei Assemblierungsgruppen eingeteilt (Kim und Coulombe 2007; Herrmann et al., 2009; Eriksson et al., 2009) (Tab. 3.1). Hierbei sei erwähnt, dass für bestimmte Proteine wie zum Beispiel Nestin, Synemin und Syncoilin alternative Klassifizierungen beschrieben wurden (Eriksson et al., 2009; Guerette et al., 2007). Im Folgenden wird die Klassifizierung nach Kim und Coulombe 2007; Oshima 2007 und Herrmann 2009 dargestellt.

Zu den Klassen I und II zählen die insgesamt 54 sauren und basischen Keratine, die vor allem in Epithelien von Haut, Haaren und Nägeln auftreten und deren Festigkeit gewährleisten. Keratine gelten als die einzigen IF Proteine, die im Zuge ihrer Assemblierung obligatorische Heterodimere (Assemblierungsgruppe 1) aus sauren (Klasse I) und basischen (Klasse II) Polypeptiden bilden (Hatzfeld und Weber, 1990). Die Klasse III umfasst die Proteine Vimentin, Desmin, *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) und Peripherin, die jeweils ~50 kDa groß sind und in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden. Vertreter

dieser Gruppe formieren selbständig Homodimere oder Heterodimere mit Proteinen der Klasse IV (Assemblierungsgruppe 2), welche die drei Neurofilament-Einheiten NF-L, NF-M, und NF-H sowie  $\alpha$ -Internexin, Nestin, Syncoilin und Synemin vereint. Nestin und Synemin unterscheiden sich von anderen IF Proteinen durch ihre außergewöhnlich lange C-Terminale Tail-Domäne und der Tatsache, dass sie nicht selbständig zu Filamenten assemblieren können. Aufgrund dessen wurde ihre Zuordnung in Klasse VI, die Klasse der außergewöhnlichen IF Proteine, vorgeschlagen (Guerette et al., 2007; Steinert et al., 1999). In Klasse V sind die vier Lamin-Isomere B1, B2, A und C vereint, die mit der nuklearen Lamina assoziiert sind und sich in ihrer Architektur und im Assemblierungsverhalten (Assemblierungsgruppe 3) von cytoplasmatischen IF Proteine unterscheiden (Eriksson et al., 2009). Lamine besitzen eine längere Rod-Domäne und ihre Tail-Domäne verfügt neben einem Ig-Motiv zusätzlich über zwei nukleare Targetingsequenzen (NLS, CaaX), die ihre Verknüpfung mit der inneren nuklearen Membran vermitteln (Peter und Stick, 2015). Die Formation zu Homodimeren erfolgt parallel, nicht anti-parallel wie im Fall cytoplasmatischer IF Proteine, und basiert ausschließlich auf individuellen Lamin-Isomeren (Aebi et al., 1986; Ben-Harush et al., 2009). Lamine gelten als die ursprünglichsten IF Proteine metazoischer Lebewesen (Erber et al., 1999; Peter und Stick, 2012). Die Klasse VI repräsentiert schließlich Filensin (syn. Bfsp1) und Phakinin (syn. Bfsp2, CP49), die in Epithelien der Augenlinse vorkommen und aufgrund ihrer Struktureigenheit auch als orphan IF Proteine bezeichnet werden (Herrmann et al., 2009; Oshima, 2007).

Intermediärfilamente stehen mit Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Organellen in dynamischer Wechselwirkung unter Ausbildung eines cytoplasmatisch- und Zellmembranverankerten Netzwerkes (Green et al., 2005). Vermittelt werden diese Interaktionen mitunter durch *Intermediate Filament Associated Proteines* (IFAPs) wie beispielsweise Plectin und *Bulous Pemphigoid AntiGen-1* (BPAG1), die als sogenannte Cytolinker zur überschaubaren Proteinfamilie der Plakine gehören und die verschiedenen Filamentarten miteinander verknüpfen und regulieren (Chang und Goldman, 2004; Guo et al., 1995; Leung et al., 2002). Plectin, das in mehreren Isoformen existiert, bildet einen großen multifunktionalen Komplex (> 500 kDa) und verlinkt IF jeweils mit Mikrotubuli, Aktinfilamenten, Myosinfilamenten und Membran-Komponenten in verschiedenen Zell- und Gewebetypen (Foisner und Wiche, 1991; Svitkina et al., 1996). BPAG1e, eine Splicevariante von BPAG, ist 230 kDa groß und verknüpft IF mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli hauptsächlich in Neuronen. Die Signifikanz beider Proteine für die Aufrechterhaltung der Zellintegrität wird anhand von Knockout-Studien in Säugetier-Modellen deutlich. Die Abstinenz von Plectin resultiert in

degenerierten Haut-, Skelett- und Herzmuskelzellen und wirkt letal (Andra et al., 1997). Nullmutationen von BPAG1 führen zur Degeneration von primärsensorischen Neuronen mit abnormaler Akkumulation von IF in Axonen, was charakteristisch für Autoimmunerkrankungen wie Bullöses Pemphigoid und Paraneoplastischer Pemphigus und ebenfalls letal ist (Leung et al. 2002).

**Tabelle 3.1: Intermediärfilament Proteine und deren Eigenschaften**

IF-Proteinklasse	Name	Größe (kDa)	Zell- und Gewebe-Verteilung	Schlüsseleigenschaften
<u>Cytoplasmatische</u>				
I (n = 28)	Keratine (sauer)	40-64	Epithelien, Haare, Nägel	Keratine (I, II) formen obligatorische 1:1 Heteropolymere
II (n = 26)	Keratine (basisch)	52-68	Epithelien, Haare	
III	Vimentin	55	Mesenchymal	Exprimiert in Embryonen
III	Desmin	53	Muskeln	Mutiert in Kardiomyopathien
III	GFAP	52	Astrocyten/Glia	Mutiert in Alexander-Krankheit
III	Peripherin	54	Periphere Neuronen	Induziert nach neuronaler Verletzung
IV	Neurofilamente (L-,M-,H-Ketten)	61-110	Neuronen des ZNS	Formen obligatorische Heteropolymere mit $\alpha$ -Internexin
IV	$\alpha$ -Internexin	66	Neuronen des ZNS	Wachstumseffektoren von Axonen
IV	Nestin	177	Neuroepithelien	Marker für Stammzellen
IV	Syncoilin	54	Muskeln	Interagiert mit $\alpha$ -Dystrobrevin
IV	Synemin	182	Muskeln	$\alpha$ - & $\beta$ -Isoformen, $\beta$ -Form auch bekannt als Desmuslin, interagiert mit Aktin-assoziierten Proteinen
<u>Nukleare</u>				
V	Lamine B1, B2	66-68	Nukleare Lamina	Vermehrt in Vorläuferzellen
V	Lamine A/C	62-78	Nukleare Lamina	Vermehrt in ausdifferenzierten Zellen, Mutiert in muskulärer Dystrophie, u.a.
<u>VI (Orphane)</u>				
?	Filensin (Bfsp1)	83	Augenlinse	Formieren <i>beaded filaments</i> in
?	Phakinin (Bfsp2, CP49)	47	Augenlinse	Linsenepithel-Zellen. Phakinin-Mutationen verursachen Altersstarr

Tabelle 3.1, basierend auf Kim und Coulombe 2007; Eriksson et al., 2009. Zentrales Nervensystem; ZNS.

### 3.2 Protisten und die Diversität des Cytoskeletts im Kontext von IF Proteinen

Die Gruppe der Protisten (gr. „Urwesen“) vereint eine Vielzahl von einzelligen und wenigen multizellulären Organismen, die autotroph, heterotroph und mixotroph weltweit die unterschiedlichsten Habitate besiedeln (Patterson, 1999). Verteilt über die sechs Supergruppen: Opisthokonta, Amoebozoa, Archaeplastida, Rhizaria, Chromalveolata und Excavata besitzen sie die höchste genetische und morphologische Diversität aller Eukaryoten,

was sich nicht zuletzt in der Spezialisierung ihres Cytoskeletts äußert (Baldauf, 2008; Dawson und Paredez, 2013; Hampl et al., 2009).

Trotz dieser morphologischen Vielfalt existieren in Vertretern aller sechs Gruppen, essentielle und hoch konservierte Cytoskelett-vermittelte Mechanismen. Als Beispiel seien die beiden Fortbewegungsstrategien amöboides Gleiten und flagelliertes Schwimmen genannt, die sich maßgeblich auf die Proteinfamilien Aktin und Tubulin, denen darauf aufbauenden Filamenten (Aktinfilamente, Mikrotubuli) sowie deren akzessorischen Proteinen stützen (Kusdian et al., 2013; Wickstead und Gull 2011). Auch die Maschinerie der mitotischen Zellteilung von der unterschiedliche Varianten existieren (offene, geschlossene und semi-geschlossene Mitose; Boettcher und Barral, 2013; Sazer et al., 2014), basiert grundlegend auf dem Aktin- und Tubulin-assoziierten Cytoskelett (Dawson und Paredez, 2013; Paredez et al., 2011).

Während Homologe von Aktin und Tubulin, wie beispielsweise die Proteine MreB und FtsZ, bis ins Reich der Eubakterien zurückverfolgt werden können, gilt die eindeutige Identifikation von IF Proteinen außerhalb der Metazoa als erschwert (Kollmar, 2015; Koreny und Field, 2016; Wickstead und Gull, 2011). Infolgedessen wurden IF Proteine Jahrzehnte lang als evolutionär restringierte Errungenschaft der Metazoa angesehen und beschrieben (Fuchs und Weber, 1994; Herrmann und Strelkov, 2011; Peter und Stick, 2015). Aktuelle Forschungsergebnisse jedoch, stützen vermehrt die Hypothese, dass IF Proteine bereits in den ursprünglichsten Protisten präsent waren (Kollmar 2015; Koreny und Field 2016). Das bisher offensichtlichste Beispiel außerhalb der Metazoa stellt das Lamin-Homolog N81 der einzelligen Amöbe *Dictyostellium* dar. Die Strukturvorhersage für N81 deckt sich weitgehend mit der kanonischer Lamine, inklusiver der Präsenzen der charakteristischen CDK1-, Ig-, NLS- und CaaX-Box-Domänen. Lokalisations- und Knockout-Studien bestätigten zudem die Assoziation von N81 mit der nuklearen Lamina in *Dictyostellium* als auch die Kolo-kalisation mit Lamin B1 im Rahmen der heterologen Expression in Humanzellen (Krüger et al., 2012).

Ergänzend zu diesen aktuellen Erkenntnissen wurden bereits im vergangenen Jahrhundert diverse Protisten beschrieben, die Cytoskelett-assoziierte Proteine nutzen, deren Charakteristika denen von IF Proteinen entsprechen und weder zur Aktin- noch zur Tubulin-Familie zugeordnet werden können (Lechtreck und Melkonian, 1998; Roberts, 1987; Viscogliosi und Brugerolle, 1994). Hierzu zählt beispielsweise das von dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* synthetisierte Protein MDM1. Das 51 kDa große Protein ähnelt kanonischen IF Proteinen im Löslichkeitsverhalten, in der

Aminosäuresequenz und durch die Fähigkeit eigenständig in Filamente zu assemblieren (McConnell und Yaffe, 1993).

Ein weiteres Beispiel repräsentieren die Articuline die als Strukturproteine das Membranskelett von Euglenoiden und Ciliaten aufbauen. Diese zeichnen sich durch eine dreiteilige Protein-Architektur mit einer zentralen, auffallenden Verteilung geladener Aminosäuren, dem VPV-Motiv (bestehend aus Valin und Prolin), aus (Huttenlauch et al., 1995; Marrs und Bouck, 1992). In diesem Zusammenhang sind auch die Alveoline zu nennen, die als stabilisierender Bestandteil der säckchenartigen Alveoli unterhalb der Plasmamembran lokalisiert- und charakteristisch für die Gruppe der Alveolata sind (Gould et al., 2008; Mann und Beckers, 2001). Entsprechend den Articulinen, besitzen auch sie geladene repetitive Motive (*Charged Repetitive Motif*; CRM) wie zum Beispiel „EKIVEVP“ und „VPV“, denen im Fall von *TtALV2* eine essentielle Funktion im Targeting und der Integration in das periphere Cytoskelett von *Tetrahymena thermophila* zukommt (El-Haddad et al., 2013; Gould et al., 2011).

Auch die Epiplasmine werden von Ciliaten codiert. Als Hauptbestandteil des Epiplasmas gehören sie mit 51 Proteinen zu einer Multigenfamilie, die sich über fünf phylogenetische Gruppen verteilt (Aubusson-Fleury et al., 2013; Coffe et al., 1996; Damaj et al., 2009). Kennzeichnend ist ihre sequenzielle Architektur mit einer hoch konservierten zentralen Domäne, die aus sieben repetitiven Elementen (Heptad-Repeats) mit dem Konsensus-Motiv [ERK]xx[VILT]EY[VIY] besteht und von weiteren repetitiven Segmenten flankiert wird (Damaj et al., 2009).

Nicht zu Letzt sind die Giardine des Excavaten *Giardia lamblia* aufzuführen, die als Vertreter einer wachsenden Proteingruppe mittlerweile auch als *Disc Associated Proteins* (DAPs) bezeichnet werden (Hagen et al., 2011). Charakteristisch für diese Proteine ist ihre Assoziation mit der Ventralen Disk, einer einzigartigen und spezialisierten Cytoskelett-Struktur des Humanpathogens. Auch für einige Giardine konnten repetitive Motive vorhergesagt und zudem die Fähigkeit Filamente zu formieren determiniert werden (Crossley und Holberton, 1985; Crossley und Holberton, 1983).

Neben den bisher beschriebenen Exemplaren existiert eine Vielzahl weiterer Proteine, die häufig mit spezialisierten Cytoskelett-Komponenten diverser Protisten verknüpft und strukturell sowie funktionell den metazoischen IF Proteine ähnlich sind (Tab. 3.2).

**Tabelle 3.2. Cytoskelett-assoziierte Proteine diverser Protisten, die Charakteristika metazoischer IF Proteine besitzen.** Kennzeichnend für die aufgeführten Proteine ist die Strukturvorhersage von Coiled-Coils und/oder repetitiven Motiven und häufig die Fähigkeit Filamente zu formieren.

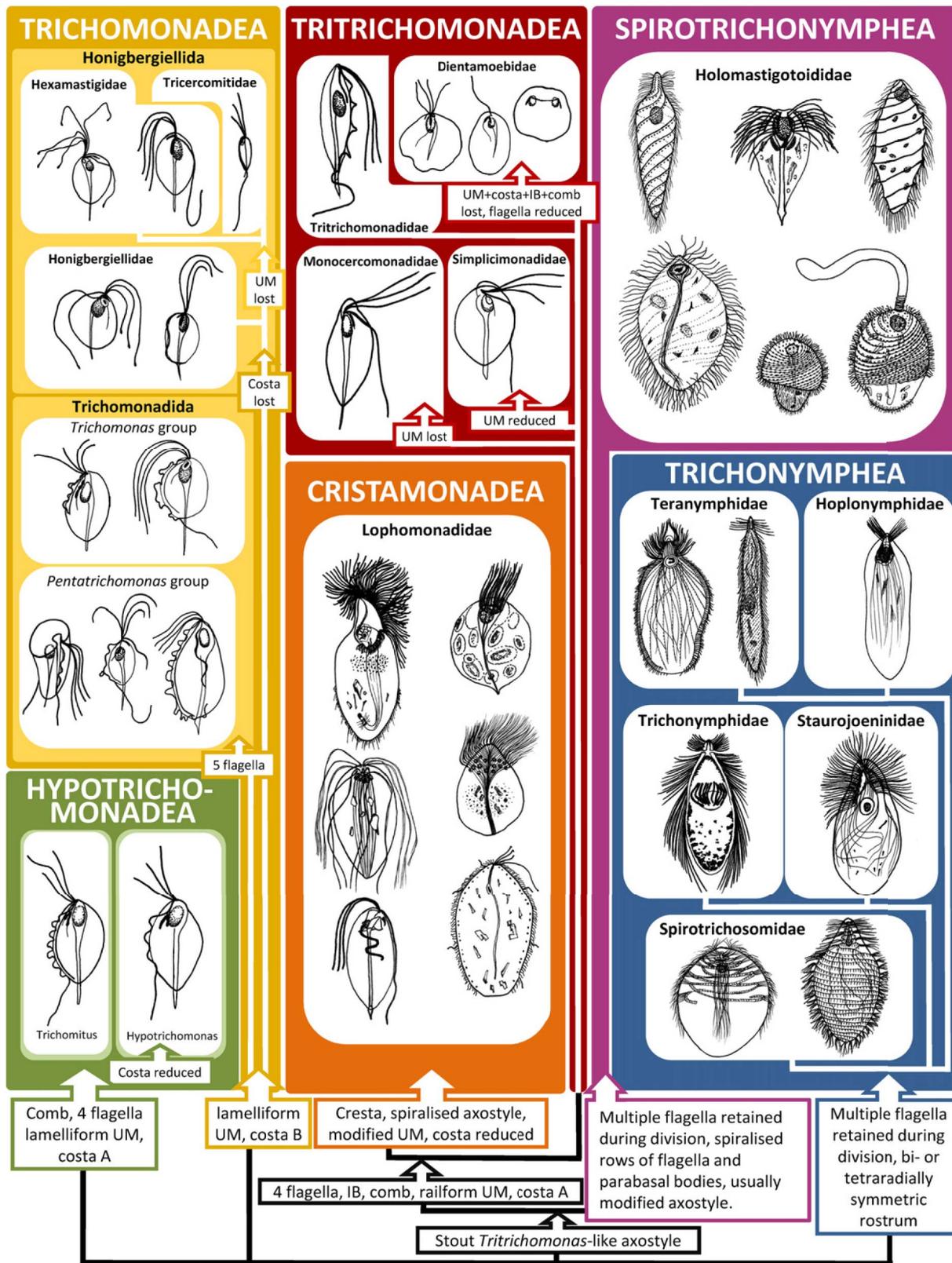
Protein	Organismus	Lokalisation	Referenz
<b>Alveoline / IMC Proteine</b> <sup>a</sup> Alveolin1, <sup>b</sup> Alveolin2, <sup>c</sup> IMC1, <sup>d</sup> IMC3, <sup>e</sup> IMC4, <sup>f</sup> IMC5, <sup>g</sup> IMC6, <sup>h</sup> IMC7, <sup>i</sup> IMC8, <sup>j</sup> IMC9, <sup>k</sup> IMC10, <sup>l</sup> IMC11, <sup>m</sup> IMC12, <sup>n</sup> IMC13, <sup>o</sup> IMC14, <sup>p</sup> IMC15	<sup>a,b</sup> <i>Tetrahymena thermophila</i> , <sup>c-p</sup> <i>Toxoplasma gondii</i>	<sup>a</sup> Alveoli, <sup>b</sup> zwischen longitudinalen Mikrotubuli, <sup>c,d,e,g,h,k,m,o</sup> kortikaler IMC, <sup>f,i</sup> Basalkomplex, <sup>l</sup> apikale Cap, basales Ende des IMC, <sup>n</sup> kortikaler IMC, Basalkomplex, <sup>p</sup> kortikaler IMC, apikale Cap, Basalkomplex, Centrosom	<sup>a</sup> Gould et al., 2008; <sup>b</sup> El-Haddad et al., 2013; <sup>c</sup> Mann et al., 2002; <sup>d</sup> Gubbels et al., 2004; <sup>e</sup> Hu et al., 2006; <sup>f-p</sup> Anderson-White et al., 2011
<b>Apical Polar Ring Proteine</b> <sup>a</sup> RNG1, <sup>b</sup> RNG2	<i>Toxoplasma gondii</i>	Apikal polarer Ring	<sup>a</sup> Tran et al., 2010; <sup>b</sup> Katris et al., 2014
<b>Articuline</b> <sup>a</sup> 80 kDa Articulin, <sup>a</sup> 86 kDa Articulin, <sup>b</sup> Articulin 1, <sup>b</sup> Articulin 4, <sup>c</sup> Articulin p60	<sup>a,b</sup> <i>Euglena gracilis</i> , <sup>c</sup> <i>Pseudomicrothorax dubius</i>	Epiplasma	<sup>a</sup> Marrs und Bouck 1992; <sup>b</sup> Huttenlauch et al., 1998; <sup>c</sup> Huttenlauch et al., 1995
<b>Basal Apparatus Proteine</b> <sup>a</sup> BAP90, <sup>b</sup> BAP95	<i>Spermatozopsis similis</i>	Proximal-Platten des Basalapparats	<sup>a</sup> Geimer et al., 1998a; <sup>b</sup> Geimer et al., 1998b
<b>Epiplasmine</b> <sup>a</sup> EPI11, <sup>a</sup> EPI20, <sup>a</sup> EPI30, <sup>a</sup> EPI38, <sup>a</sup> EPI40, <sup>a</sup> EPI41, <sup>b</sup> Epiplasmin C,	<sup>a</sup> <i>Paramecium tetraurelia</i> <sup>b</sup> <i>Tetrahymena pyriformis</i>	Epiplasma	<sup>a</sup> Aubusson-Fleury et al., 2013; <sup>b</sup> Bouchard et al., 2001
<b>Giardine</b> <sup>a</sup> $\alpha$ -1 Giardin, <sup>b</sup> $\alpha$ -2 Giardin, <sup>c</sup> $\beta$ -Giardin, <sup>d</sup> $\beta$ -Giardin, <sup>e</sup> DAPs	<i>Giardia lamblia</i>	<sup>a</sup> Plasmamembran der Trophozoiten, <sup>b</sup> Microribbons, <sup>c,d,e</sup> Ventrale Disk	<sup>a,b</sup> Feliziani et al., 2011; <sup>b</sup> Alonso and Peattie, 1992; Peattie et al., 1989; <sup>c</sup> Nohria et al., 1992; <sup>e</sup> Hagen et al., 2011

<b>Gliding-Associated Proteine</b> GAP45, GAP50	<i>Plasmodium falciparum</i>	IMC	Baum et al., 2006
<b>Head-Stalk Proteine</b> <sup>a</sup> 183 kDa head-stalk protein, <sup>b</sup> GASP-180, <sup>c</sup> GHSP115	<i>Giardia lamblia</i>	<sup>a</sup> Lokalisation unbekannt, <sup>b</sup> Axonem der anterioren Flagellen, <sup>c</sup> Plasmamembran der Trophozoiten, Cytoplasma	<sup>a</sup> Marshall und Holberton, 1995; <sup>b</sup> Elmendorf et al., 2005; <sup>c</sup> Bae et al., 2009
<b>Plateine</b> alpha-1 Platein, alpha-2 Platein, beta-/gamma Platein	<i>Euplotes aediculatus</i>	Alveoläre Platten	Kloetzel et al., 2003
<b>Septine</b> <sup>a</sup> Cdc10, <sup>a</sup> Cdc11, <sup>a</sup> Cdc12, <sup>a</sup> Cdc3, <sup>b</sup> Sep1, <sup>b</sup> Sep2, <sup>b</sup> Sep3	<sup>a</sup> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <sup>b</sup> <i>Tetrahymena thermophila</i>	<sup>a</sup> Zellcortex, <sup>b</sup> Mitochondrien	<sup>a</sup> Hartwell, 1971; <sup>b</sup> Wloga et al., 2008
<b>Tetrine</b> Tetrin A, Tetrin B, Tetrin C	<i>Tetrahymena</i>	Cytostom	Brimmer und Weber, 2000
<b>Andere Proteine</b> FAZ1 Fenestrin Fin1 Lamin-like Proteine MDM1 Median Body Protein NE81 p477 SALP-1 SF-Assemblin SPM1 TgME49_044470 TgME49_052880 THERM_00188980 THERM_00128280 (DFB1) THERM_00388620 THERM_00474830 WCB	<i>Trypanosoma brucei</i> <i>Tetrahymena</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Amphidinium carterae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Dictyostelium</i> <i>Trichomonas vaginalis</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Chlorophyceae</i> <i>Toxoplasma</i> <i>Toxoplasma gondii</i> <i>Toxoplasma gondii</i> <i>Tetrahymena thermophila</i> <i>Tetrahymena thermophila</i> <i>Tetrahymena thermophila</i> <i>Tetrahymena thermophila</i> <i>Trypanosoma brucei</i>	Flagellum Attachment Zone Unterhalb des Epiplasmas Zwischen den Spindelpolen Nukleare Matrix Cytoplasma Ventrale Disk Nukleushülle Atractophor Ventrale Disk Basalapparat Subpelliculäre Mikrotubuli Zellapex Zellapex Periodische Anordnung unterhalb der Plasmamembran entlang der longitudinal verlaufenden Cilien Cytostom Plasmamembran	Vaughan et al., 2008 Nelsen et al., 1994 van Hemert et al., 2002 Minguez et al., 1994 McConnell und Yaffe, 1993 Woessner und Dawson, 2012 Krüger et al., 2012 Bricheux et al., 2007 Palm et al., 2003 Lechtreck und Melkonian, 1991 Tran et al., 2012 Gould et al., 2011 Gould et al., 2011 Baines und Gull, 2008

### 3.3 Die Parabasalia und deren Cytoskelett

Die Parabasalia repräsentieren mit 466 rezenten Spezies eine monophyletische Gruppe diverser ökologisch und medizinisch relevanter Flagellaten innerhalb der Supergruppe Excavata (Adl et al., 2007; Hirt und Sherrard, 2015). Abgeleitet von der Anzahl und dem Arrangement der Flagellen wird die Gruppe traditionell in die zwei Untergruppen Hypermastigida und Trichomonadida unterteilt (Cepicka et al., 2010; Honigberg, 1963). Die Hypermastigida beinhaltet Spezies mit größerem Zellvolumen und einer Vielzahl an Flagellen. Die Trichomonadida dagegen kleinere und simpler strukturierte Protisten mit bis zu sechs Flagellen (Brugerolle, 1991; Noda et al., 2012). Eine aktuellere Klassifizierung, gestützt durch ultrastrukturelle und molekular-phylogenetische Daten, postuliert die sechs parabasalen Linien: Hypotrichomonadea, Trichomonadea, Tritrichomonadea, Cristamonadea, Trichonympha und Spirotrichonympha (Cepicka et al., 2010). Repräsentiert durch Protisten mit vielseitig morphologischer Komplexität, wie in Abbildung 3.5 schematisch illustriert, werden diese generell durch den namensgebenden (i) Parabasal-Apparat (einen durch gestreifte Filamente gestützten Golgi-Apparat), (ii) die Crypto-Pleuro-Mitose (eine geschlossene Form der Mitose mit externem Spindelapparat), (iii) die Hydrogenosomen (eine anaerobe Form von Mitochondrien) vereinernd charakterisiert (Brugerolle, 1991; Embley und Martin, 2006; Noda et al., 2012).

Obwohl sich das Cytoskelett der Parabasalia durch eine hohe Diversität innerhalb der sechs Familien auszeichnet, lässt sich eine Grundausrüstung an Cytoskelett-Elementen erkennen (Abb. 3.6). Allgemein besteht diese aus dem Mikrotubuli-haltigen Axostyl und der damit verknüpften Pelta, sowie dem Karyomastigont-System, welches sich aus dem Nukleus, den Basalkörpern (syn. Kinetosome) und den Flagellen zusammensetzt (Cepicka et al., 2010). Das Axostyl formt die Zellachse und durchzieht den Einzeller rückgratartig von anterior nach posterior. Bestehend aus einem spiralförmigen Band an longitudinal verlaufenden Mikrotubuli formt das starr und stabil erscheinende Axostyl eine löffelartig erweiterte Region (das Capitulum) im anterioren Bereich und verläuft zum posterioren Ende schmaler zu, wo es in einer Zellausstülpung mündet (Benchimol et al., 2000; Rosa et al., 2013). Im Gegensatz zu anderen Cytoskelett-Strukturen ist das Axostyl und dessen Architektur unter Spezies der Parabasalia hoch konserviert (Cepicka et al., 2010). Funktionell kann es neben der Stabilisation auch aktiv zur Karyokinese während der Zellteilung beitragen, wie es für *Tritrichomonas foetus* beschrieben wurde (Ribeiro et al., 2000)

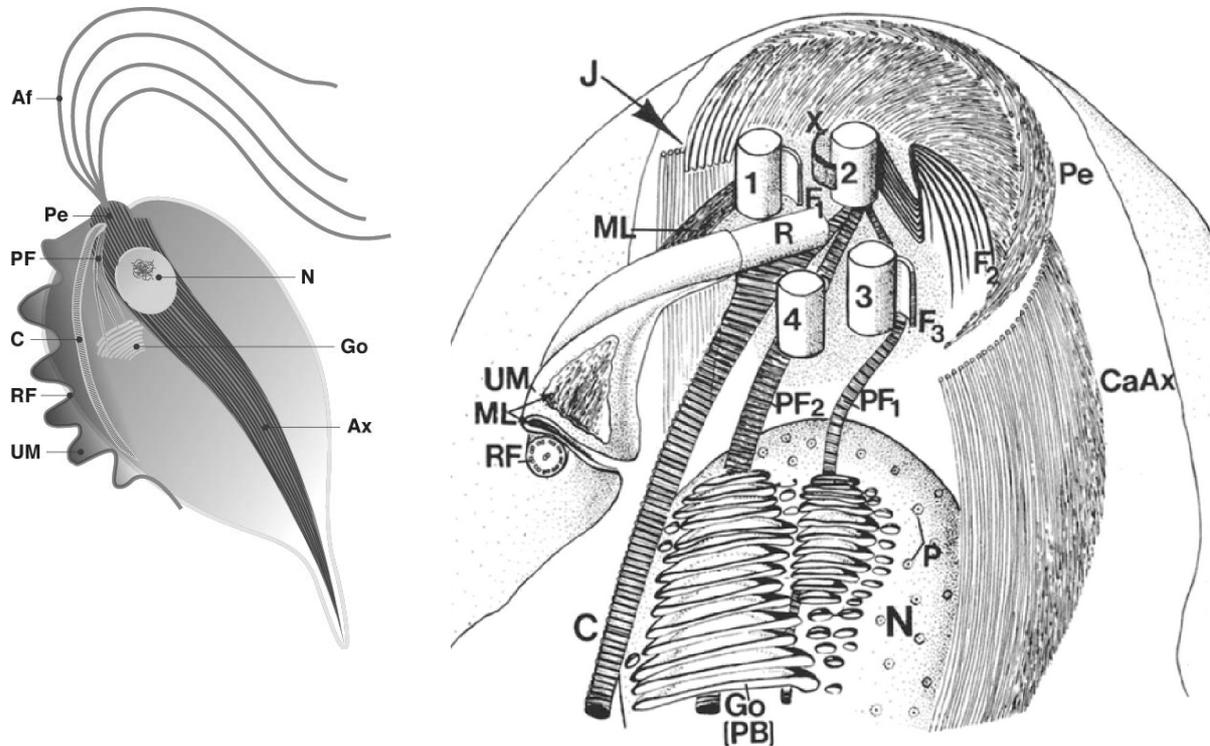


**Abbildung 3.5:** Morphologische Diversität innerhalb der sechs Parabasalia-Gruppen: Trichomonadea, Tritrichomonadea, Spirotrichonymphea, Trichonymphea, Cristamonadea und Hypotrichomonadea. In allen Gruppen ist das Axostyl vorzufinden. Die Costa und die undulierende Membran sind nicht in allen Familien präsent und teilweise reduziert. Die Cresta ist eine modifizierte Form der Costa in Vertretern der Cristamonadea. Von allen Parabasalia zeigt die Familie Tritrichomonadidae (Gruppe: Tritrichomonadidae) das komplexeste Cytoskelett mit zusätzlichen Komponenten: Infrabasalkörper (IB) und Comb (dt. Kamm). Basierend auf Cepicka et al., 2010.

Anterior des Nukleus geht das Axostyl in die Pelta über und formt die sogenannte *Pelta-Axostylar-Junction*. Die Pelta umschließt die Basalkörper semi-zirkulär und stützt somit den Flagellenkanal von wo die Flagellen entspringen (Benchimol et al., 2000; Honigberg BM, 1990). Das einfachste Karyomastigont-System beinhaltet einen Nukleus und vier Basalkörper – drei anteriore und einen rückläufig gerichteten – welche jeweils alle eine Flagelle führen (Brugerolle, 1991; Cepicka et al., 2010). Die rückläufige Flagelle ist peripher mit der cytoplasmatischen Zellmembran verknüpft und schlängelt sich entlang des Zellkörpers als Bestandteil der Undulierenden Membran (UM). Die UM, welche die dreidimensionale Lokomotion der Zelle in viskosen Flüssigkeiten steigert, ist nicht in allen Mitgliedern der Parabasalia vorhanden (Cepicka et al., 2010). In manchen Spezies fehlt sie komplett, erscheint reduziert oder ist vollständig ausgebildet, wobei die zwei Formen – laminär (Trichomonadidae) oder *rail-typ* (Tritrichomonadidae) – unterschieden werden. Gestützt wird die UM durch ein angrenzendes, auffällig gestreiftes und starr erscheinendes Filament – die Costa.

Die Costa ist ein spezifisches Merkmal der Parabasalia und konnte bisher nicht in anderen Gruppen identifiziert werden (Cepicka et al., 2010). Häufig wurde die Costa in Koexistenz mit der UM beobachtet, was ihre Funktion als stabilisierende Struktur der mit der rückläufigen Schleppgeißel verknüpften UM bekräftigt (Honigberg BM, 1990; Kulda et al., 1986). Basierend auf Unterschiede im Bandenmuster der gestreiften Costa wurden zwei Typen beschrieben – ein A- und ein B-Typ (Honigberg BM, 1971). Der A-Typ gilt als ein definierendes Kennzeichen der Familie Tritrichomonadidae zu der unter anderem *Tritrichomonas foetus* zählt. Der B-Typ ist unter den Parabasalia ein einzigartiges Charakteristikum der Trichomonadidae, die auch *Tetratrichomonas gallinarum* und *Trichomonas vaginalis* vereint. Neben der häufig beschriebenen immotilen Form existiert auch eine motile B-Typ Costa wie im Fall von *Trichomitopsis* (Amos et al., 1979). Die Proteinkomposition der Costa unterscheidet sich deutlich von üblichen Cytoskelett-Strukturen und erscheint unabhängig von Aktin und Tubulin. Viscogliosi und Brugerolle (1994) determinierten die Proteine der B-Typ Costa von *T. gallinarum* und *T. vaginalis* mit einem Molekulargewicht zwischen 100-135 kDa und postulierten diese als eine neue Klasse an Cytoskelett-Proteinen. Im Vergleich zu Proteinen gestreifter Filamente anderer Protisten, wie beispielsweise Giardin (*Giardia lamblia*) und SF-Assemblin (diverser Grünalgen), unterscheiden sich Proteine der Costa durch ihr hohes Molekulargewicht und in ihrem biochemischen Verhalten gegenüber chaotropen Agenzien. Weiterhin wurde auf eine ähnliche Proteinzusammensetzung der A- und B-Typ Costae hingewiesen und deren Homologie

diskutiert. Neben der Costa sind weitere filamentöse Strukturen vorhanden, die auffallend ähnliche Eigenschaften aufweisen.



**Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Cytoskelett-Architektur von *T. vaginalis* (Trichomonadidae).** Schematisiert ist die ganze Zelle (links) und die anteriore Region des Cytoskeletts im Detail (rechts). Die vier anterioren Flagellen (Af) entspringen den Basalkörper (1-4) und die rückläufige Schleppeiße (RF) dem hierzu orthogonal gerichteten Basalkörper (R). Von Basalkörper 1 aus entspringt das Filament F1 im Uhrzeigersinn und die Marginale Lamelle (ML) der Undulierenden Membran (UM). Das X-Filament ummantelt den Basalkörper 2 von wo das sigmoidale Filament F2 ventral entspringt und sich über den Pelta-Axostylar-Complex (Pe-CaAx), bestehend aus Pelta (Pe) und Capitulum-Axostyl (CaAx), bis zur Pelta-Axostylar-Junction (J) erstreckt, welche den Übergang der Mikrotubuli von Axostyl und Pelta definiert. Filament F3 entspringt von Basalkörper 3. Die Parabasalen Filamente (PF1, 2) besitzen das A-typ Bandenmuster. Sie sind distal mit den Basalkörpern 3, 4 und proximal mit jeweils einem Golgi-Apparat (Go) verbunden unter Formation des Parabasal-Apparats (PB) nahe des Nukleus (N). Die Costa trägt das B-Typ Bandenmuster und ist mit den Basalkörpern 2 und R proximal verknüpft. Rechte Abbildung basierend auf Honigberg 1990.

Die Parabasalen Filamente (Pf) repräsentieren gestreifte, rigide erscheinende Filamente, die in unterschiedlicher Anzahl in allen Vertretern der Parabasalia vorkommen. In *T. gallinarum* und *T. vaginalis* beispielsweise wurden jeweils zwei bis drei Pf beschrieben (Brugerolle und Viscogliosi, 1994; Lee et al., 2009). Distal sind die Pf mit den Basalkörpern und proximal mit den Dictyosomen des Golgi-Apparats perinukleär verknüpft. Aufgrund ihrer Assoziation mit dem Golgi-Apparat wurde der Begriff „Parabasal-Apparat“ etabliert, welcher als ein synapomorphes Merkmal namensgebend für die gesamte Gruppe der Parabasalia ist (Brugerolle 1991; Carpenter et al., 2011). Basierend auf der Interpretation von

Transmissionselektronen-Mikroskop-Aufnahmen wurde die Positionierung und Stabilisierung der Golgi-Dictyosomen nahe des Nukleus als Hauptfunktion der Pf postuliert (Brugerolle 1991; Brugerolle und Viscogliosi 1994). Im Vergleich mit der Costa lassen sich einige Gemeinsamkeiten erkennen: Die Pf besitzen (i) ein auffällig ähnlich gestreiftes Bandenmuster wie das des A-typs, (ii) die Proteinzusammensetzung zeigt die gleiche Größenverteilung (100-135 kDa) und (iii) eine Antikörper-vermittelte Kreuzreaktivität mit Proteinen (SF-Assemblin, Centrin, Giardin) gestreifter Filamente anderer Protisten außerhalb der Parabasalia konnte nicht nachgewiesen werden (Brugerolle und Viscogliosi 1994).

Weitere filamentöse Strukturen umfassen die hakenförmigen Filamente F1, F3 inklusive des X-Filaments und des sigmoidalen Filaments F2 (Abb. 3.6), deren Funktion in der Verknüpfung der Basalkörper miteinander sowie mit der Pelta und dem Cytoplasma besteht (Benchimol 2005; Honigberg 1990). Zusätzlich zur Grundausstattung sind weitere Cytoskelett-Elemente spezifisch für einzelne Familien beschrieben worden. Der Comb (dt. Kamm) beispielsweise wurde in Vertretern der Cristamonadea, Tritrichomonadea und Hypotrichomonadea observiert. Diese periodisch gestreifte Struktur, dessen exakte Funktion unbekannt ist, befindet sich zwischen Costa und einem Basalkörper (Benchimol 2005). Der Suprabasal- und der Infrabasalkörper, deren Funktion ebenfalls nicht geklärt ist, sind charakteristisch für Spezies der Tritrichomonadea. Ersterer schmiegt sich in Form eines Stängels an einen Basalkörper, letzterer liegt dem gesamten Basalkörper-Komplex zu Grunde. Zur Übersicht sind sämtliche Cytoskelett-Komponenten in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.3: Spezifische Cytoskelett-Komponenten der Parabasalia in Ergänzung zu Abbildung 3.6

Cytoskelett-Element	Beschreibung	Funktion
<b>Atractophor</b> (syn. Centrosom)	Mikrotubuli-organisierendes Centrum, elektronendichte Struktur nahe des Costa-Ursprungs ( <i>T. foetus</i> ) oder der Parabasalen Filamente ( <i>T. vaginalis</i> ).	Organisation der Spindel-Mikrotubuli bei der Zellteilung.
<b>Axonem</b>	Mikrotubuli-basierte, bewegliche Struktur der Flagellen im 9+2 Arrangement. Die Anzahl variiert mit 4 in Tritrichomonadidae, 5 in Trichomonadidae.	Motilität, Beitrag zur Zellteilung.
<b>Axostyl</b>	Mikrotubuli-basierte, rückgratartige, Band-förmige die Zelle von posterior nach anterior durchziehende Struktur.	Beitrag zur Zellteilung (Karyokinese) Stabilisation der Zelle.
<b>Basalkörper</b> (syn. Kinetosom)	Basisstruktur der Flagellen im 9+3 Arrangement.	Festigung, Verankerung der Flagellen.
<b>Costa</b>	Rigide erscheinende, filamentöse Struktur mit einem auffälligen periodischen Bandenmuster, die sich intrazellulär an der Zelloberfläche angrenzend zur undulierenden Membran erstreckt und zwei Basalkörper miteinander verbindet. Über Filamente mit dem Nukleus verbunden.	Stabilisation der undulierenden Membran und der angrenzenden Zellmembran.
<b>Comb (dt. Kamm)</b>	Filamentöse Struktur, die sich zwischen des Costa-Ursprungs und dem Basalkörper der Schleppgeißel befindet.	Funktion unbekannt, vermutlich Stabilisation.

<b>Parabasale Filamente (Pf)</b>	Gestreifte Filamente mit periodischem Bandenmuster (ähnlich dem der Costa). Anzahl variiert: 2 Pf ( <i>T. foetus</i> ), 3 Pf ( <i>T. vaginalis</i> ). In Kombination mit dem Golgi-Apparat als Parabasal-Apparat bezeichnet, namensgebend für die Gruppe der Parabasalia.	Stabilisation des Golgi-Apparats.
<b>Pelta</b>	Mikrotubuli-basierte, löffelartige Struktur und Bestandteil des Axostyls im anterioren Bereich. Umschließt die Basalkörper mantelartig.	Stabilisation des Flagellen-Kanals
<b>Sigmoidales Filament (F2) &amp; X-Filament</b>	Filamente in kurvig erscheinender Anordnung, verbinden die Basalkörper miteinander, mit dem Pelta-Axostylar-Komplex und dem Cytoplasma.	Verankerung, Stabilisation. Beinhalten Centrin.
<b>Infrabasalkörper</b>	Große und dicht erscheinende Struktur unterhalb des Basalkörper-Komplexes (Tritrichomonadae spezifisch).	Funktion unbekannt.
<b>Suprabasalkörper</b>	Stängelartige Struktur nahe der Basalkörper (Tritrichomonadae spezifisch).	Funktion unbekannt.
<b>Hakenförmige Filamente (F1, F3)</b>	Periodisch gestreifte Filamente, die gebogen von den Basalkörpern entspringen und die Basalkörper miteinander als auch mit Pelta verbinden.	Funktion unbekannt. Beinhalten Centrin.
<b>Undulierende Membran</b>	Besteht aus einer dorsalen Falte der cytoplasmatischen Membran, verwoben mit der rückläufigen Schleppgeißel.	Steigert die Lokomotion der rückläufigen Schleppgeißel, vermutlich eine Adaption an viskose Habitate (Körperflüssigkeiten des Wirts).

Tabelle 3.3, basierend auf Benchimol 2005; Cepicka et al., 2010; Honigberg et al., 1971, Honigberg und Brugerolle 1990; Kulda et al., 1986.

### 3.4 *Tetratrichomonas gallinarum* und *Trichomonas vaginalis*

Die in dieser Forschungsarbeit untersuchten Flagellaten *T. gallinarum* und *T. vaginalis* zählen phylogenetisch zur Supergruppe der Excavata und weiterhin zur Klasse der Parabasalia, dem Stamm der Diplomonadida und im Rahmen der Ordnung Trichomonadida zur Familie der Trichomonadidae (Adl et al., 2012; Cepicka et al., 2010). Der zelluläre- und Cytoskelettgestützte Aufbau beider Einzeller zeigt deutliche Ähnlichkeit, wie in Kapitel 3.3 genauer beschrieben ist. Ferner zeichnen sich beide Organismen durch einen obligatorisch parasitären Lebensstil in Vertebraten aus (Cepicka et al., 2005; Ryan et al., 2011).

*T. gallinarum* wurde erstmalig im Caceum von Hühnern beschrieben (Martin und Robertson, 1911). Mittlerweile gilt der Flagellat als ein weltweit verbreiteter Parasit des Verdauungstrakts diverser domestizierter und wild lebender Vogelarten (Cepicka et al., 2005; Hess und McDougald, 2013). Der Nachweis bestimmter Spezies im Bereich der Mundhöhle und den Atemwegen von lungenerkrankten Menschen deutet allerdings auf ein breiteres Wirtsspektrum hin, wobei die Pathogenität des Parasiten generell umstritten ist (Amin et al., 2011; Teras et al., 1980). Molekulare Phylogenie-Analysen demonstrierten für *Tetratrichomonas*-Isolate aus verschiedenen Wirten einen in Relation zu anderen *Trichomonaden* auffällig höheren intraspezifischen Polymorphismus, mit mindestens drei Morphospezies (Cepicka et al., 2005). Das weltweite Vorkommen diverser Spezies könnte demnach die unterschiedlichen Pathogenitätsmerkmale erklären, die durch mehrere unabhängig durchgeführter Studien dokumentiert wurden (Cepicka et al., 2005; Kulda et al., 1974; Liebhart et al., 2014). Auch eine Mixinfektion mit den Flagellaten *Histomonas meleagridis*, *Spironucleus meleagridis* oder *Trichomonas gallinae* stehen in Zusammenhang das Pathogenitätspotential von *T. gallinarum* zu beeinflussen (Kemp und Reid, 1965; Tyzzer, 1920). Im Vergleich zu *T. gallinarum* ist das Humanpathogen *T. vaginalis* nicht nur im Hinblick medizinischer, sondern auch evolutions- und vor allem molekularbiologischer Fragestellungen umfangreicher erforscht.

*Trichomonas vaginalis* ist ein mikroaerophil lebender Parasit des menschlichen Urogenitaltrakts. Erstmals im Jahr 1836 von Alfred F. Donné beschrieben gilt der Erreger zwischenzeitlich als Ursache der weltweit am häufigsten, nicht-viralen und sexuell übertragbaren Geschlechtskrankheit Trichomoniasis (Hirt, 2013). Im Jahr 2008 schätzte die *World Health Organisation* (WHO) die globale Inzidenz an *T. vaginalis* Infektionen auf 276,4 Millionen, mit einer Zunahme von 11,2% im Vergleich zu 2005 (WHO, 2012). Basierend auf Datenerhebungen im Zeitraum von 2005 bis 2012 wurde die globale Prävalenz im Jahr 2012 auf 143 Millionen kalkuliert (Newman et al., 2015). Die Infektion mit *T. vaginalis* kann

unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen. In Frauen kann es zur Entzündung der Vagina, des Gebärmutterhalses und der Harnröhre kommen. Ferner steht die Infektion in Zusammenhang mit bakterieller Vaginose, Candidiasis, Chlamydia, Gonorrhoea und Syphilis (Kissinger, 2015). In der Schwangerschaft kann es zu frühzeitigem Reißen der Plazenta und damit zur Frühgeburt kommen (Silver et al., 2014). Bei Männern kann der Befall des Pathogens eine Urethritis beziehungsweise eine Prostatitis verursachen, die symptomlos verlaufen und neben Unfruchtbarkeit auch Prostatakarzinome zur Folge haben kann (Sena et al., 2007; Sutcliffe et al., 2006). Zudem ist die Infektionsanfälligkeit gegenüber dem *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) durch eine Trichomoniasis in beiden Geschlechtern erhöht (Hobbs et al., 1999; McClelland et al., 2007). Zur Behandlung des Parasiten wird standardmäßig Metronidazol eingesetzt, welches als antibiotisches 5-Nitroimidazol in den Stoffwechsel des Erregers eingreift und DNA-Strangbrüche herbeiführt (Cudmore und Garber, 2010; Tocher und Edwards, 1994). Jedoch wurden bereits Metronidazol-resistente Stämme von *T. vaginalis* nachgewiesen (Upcroft et al., 2006).

Die Morphologie des Flagellaten ist komplex (Kap. 3.3) und reflektiert die Anpassung an ein dickflüssiges und säurehaltiges Milieu des urogenitalen Wirtsgewebes. Im Zuge der Infektion ermöglicht das Cytoskelett dem Parasiten sowohl eine amöboide als auch eine freischwimmende Form anzunehmen. Während die amöboide Form durch eine Oberflächenvergrößerung das Anheften an die Wirtszelle ermöglicht, fördert die freischwimmende Form die Motilität innerhalb des Wirtsgewebes (Arroyo et al., 1993; Kusdian et al., 2013). Als freischwimmender Trophozoit zeigt er eine ovale, birnenartige Gestalt, die im Durchschnitt eine Länge von 10 µm und eine Breite von 7 µm aufweist (Petrin et al., 1998). Ergänzend zur freischwimmenden Form wird die dreidimensionale Motilität im flüssigen Milieu durch insgesamt fünf Flagellen gewährleistet. Vier Flagellen befinden sich anterior während die fünfte Flagelle, die Schleppeiße, mit der undulierenden Membran verknüpft ist und sich rückläufig über zwei Drittel der Zelle erstreckt (Kap. 3.3). Unter Stress- und ungünstigen Wachstumsbedingungen bildet der Parasit eine sogenannte Pseudozyste, wobei er eine runde, spherische Form annimmt und seine Flagellen internalisiert, was das Erscheinungsbild einer Zyste vermittelt (Pereira-Neves et al., 2003). Die Überdauerungsfähigkeit der Pseudozyste gilt generell als umstritten und es wird vermutet, dass sich die Zelle lediglich im Zuge der Degeneration abrundet (Kusdian und Gould, 2014; Petrin et al., 1998). Demgegenüber weisen pathologische Studien auf das Infektionspotential der Pseudozysten in Verbindung mit Trichomoniasis hin (Afzan und Suresh, 2012; Hussein und Atwa, 2008).

Neben der medizinischen Relevanz stellt *T. vaginalis* auch hinsichtlich evolutionsbiologischer Fragestellungen im Rahmen vergleichender Genom- und Proteomstudien einen wichtigen Forschungsorganismus dar. Im Jahr 2007 konnte das Genom des Parasiten vollständig sequenziert werden. Die Sequenz-Analyse enthüllte ~60.000 Protein-codierende Gene auf sechs haploiden Chromosomen, womit *T. vaginalis* unter allen Eukaryoten eines der umfangreichsten Genome beherbergt (Carlton et al., 2007). Auffälligerweise bestehen mindestens 60% des ~160 Megabasenpaaren (Mbp) großen Genoms aus repetitiven Sequenzen inklusive transponierbaren Elementen. Der Befund, dass die Mehrheit der repetitiven Sequenzen in hundertfachen Kopien mit geringfügigen Polymorphismen vorliegen, deutet auf eine abrupte Expansion des genetischen Materials hin, die wahrscheinlich mit der Adaption an den Urogenitaltrakt einherging (Carlton et al., 2007). Neueren Analysen zu Folge, unter Berücksichtigung und Klassifizierung von Genfamilien, wird das Genom auf 175 Mbp mit ~46.000 Protein-codierenden Genen geschätzt (Smith und Johnson, 2011). Basierend auf diesen Daten konnten dem Cytoskelett insgesamt 122 Mikrotubuli-assoziierte- (repräsentiert durch Mitglieder der Tubulin-, Kinesin- und Dynein Genfamilien) und 73 Aktinfilament-assoziierte Gene zugewiesen werden, wobei keine Gene der Myosin-Familie identifiziert wurden (Carlton et al., 2007; Dawson und Paredez 2013).

### **3.5 Ziele der Dissertation**

Die Mitglieder der Trichomonadida besitzen ein komplexes und spezialisiertes Cytoskelett, welches die Anpassung an den parasitären Lebensstil in unterschiedlichen Wirten reflektiert. Im Fall von *Trichomonas vaginalis*, der in dieser Ordnung am gründlichsten erforschten Spezies, trägt es entscheidend zur schlagartigen Morphologieänderung im Zuge des Infektionsmechanismus humaner Epithelzellen im Urogenitalbereich bei (Kusdian et al., 2013). Die Dynamik der Zellmorphologie wird hierbei überwiegend durch konservierte Cytoskelett-Proteine der Aktin- und Tubulin-Familie gestützt und gesteuert. Während Aktin primär im Zellcortex und Tubulin als Hauptbestandteil des Axostyls und den Flagellen vorkommen, existieren weitere Trichomonadida-spezifische Cytoskelett-Komponenten, wie beispielsweise die Costa und die Parabasalen Filamente, deren Proteinzusammensetzung bislang als unbekannt galt (Brugerolle und Viscogliosi 1994).

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit bestand demzufolge in der Identifizierung sämtlicher Cytoskelett-assoziiierter Proteine mit dem Fokus auf die gestreiften Filamente – die Costa und die Parabasalen Filamente – von *T. vaginalis* als Vertreter der Trichomonadidae.

Diesbezüglich sollte das Cytoskelett von *T. vaginalis* vollständig extrahiert und dessen Proteom massenspektrometrisch determiniert werden. Da sich das Cytoskelett von *Tetratrichomonas gallinarum* jedoch merklich reiner und quantitativer extrahieren ließ, galt es kurzfristig dieses der massenspektrometrischen Analyse vorzuziehen. Unter Aufruf der Datenbank TrichDB (<http://trichDB.org>) und den hierüber zugänglichen Genomdaten des *T. vaginalis*-Stammes G3, sollten nun mittels der massenspektrometrisch erfassten Daten sämtliche Cytoskelett-assoziierten Proteine erfasst werden. Zur Identifikation dieser war es notwendig das Transkriptom von *T. gallinarum* zu sequenzieren und eine Transkriptom-Bibliothek zu generieren, zumal von diesem Organismus bis dato keine Sequenzdaten öffentlich zur Verfügung standen (Melzer et al., unpublizierte Daten).

Um die Assoziation der massenspektrometrisch identifizierten Proteine mit dem Cytoskelett und damit die experimentelle Vorgehensweise zu verifizieren, galt es fünf Kandidatenproteine für *in vivo* Immunfluoreszenz-vermittelte Lokalisationsstudien zu selektieren. Für diese fünf Proteine sollten Green Fluorescence Protein- (GFP) beziehungsweise Hämagglutinin- (HA) Reporter-Konstrukte kloniert und für die homologe Expression in *T. vaginalis* sowie die heterologe Expression in *T. gallinarum* induziert werden.

Weiterhin galt es das Cytoskelett-Proteom bioinformatisch zu untersuchen. Potentielle Struktur- und Funktionshomologe sollten über die Datenbank-basierten Programme BLAST Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) und EuKaryotic Orthologous Groups (KOG) determiniert werden. Zudem sollten sämtliche Proteine auf charakteristische Strukturmerkmale hin analysiert werden. Zu diesen zählten primär repetitive Proteinsequenzen und Domänen, insbesondere Coiled-Coil Motive, die als ein Kennzeichen metazoischer IF Proteine gelten. Hierfür wurde ein Suchalgorithmus verwendet, der bereits in *Tetrahymena thermophila* erfolgreich zur Identifikation einzigartiger Strukturproteine, die in Aufbau und Funktion metazoischen IF Proteinen gleichen, angewandt wurde (Gould et al., 2011). Im Zuge dessen sollte statistisch überprüft werden, ob die Cytoskelett-assoziierten Proteine generell mehr Coiled-Coils und andere repetitive Motive aufweisen als Cytoskelett-unabhängige Proteingruppen von *T. vaginalis*.

Darauf aufbauend galt es zu testen, ob das Proteom über Coiled-Coil-haltige Proteine verfügt, die analog zu einigen metazoischen IF Proteinen, die intrinsische Fähigkeit besitzen auch isoliert *in vitro* zu Filamenten zu assemblieren. Hierzu sollten drei Coiled-Coil-haltige Kandidaten als Histidin-Fusionsproteine heterolog in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert, per Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) purifiziert und einem Filament-Assemblierungs-Assay unterzogen werden.

Zusammenfassend bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit in der Identifikation des vollständigen Cytoskelett-assoziierten Proteoms von *T. vaginalis*. Der Fokus lag hierbei auf Proteinen mit repetitiver Sequenzarchitektur, die mit filamentösen Strukturen assoziiert- und anhand ihrer Eigenschaften weder der Aktin- noch der Tubulin-Proteinfamilie zuzuordnen sind. Basierend auf Erkenntnissen spezialisierter Cytoskelett-Morphologien diverser Protisten, wie beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae*, *Tetrahymena thermophila* und *Giardia lamblia*, war das Ziel im weiteren Sinne Indizien für das Vorkommen von IF Proteinen im Reich der Protisten zu ermitteln und diese im Kontext metazoischer Organismen zu diskutieren; zumal bis zu Beginn dieser Doktorarbeit die Präsenz von IF Proteinen außerhalb der Metazoa von der IF Protein-Forschungsgemeinde generell angezweifelt wurde (Herrmann und Strelkov 2011; Goldmann et al., 2012; Peter und Stick 2015; Koreny und Field 2016).

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Medien und Chemikalien

Sämtliche Puffer, Medien und Lösungen wurden in demineralisiertem Wasser gelöst und per Dampf-Sterilisation autoklaviert beziehungsweise steril-filtriert. Die hierzu verwendeten Chemikalien standen in höchster Reinheit und Qualität zur Verfügung.

#### 4.1.2 Antibiotika

Bezeichnung	Hersteller
Ampicillin	Sigma
Geneticin (G418)	Roth
Penicillin/Streptomycin	Biomedicals LLC

#### 4.1.3 Antikörper und Fluorophore

Bezeichnung	Herkunft
<u>Primärantikörper</u>	
Anti-GFP, polyklonaler Antikörper aus Kaninchen	Abcam
Anti-HA, monoklonaler Antikörper aus Kaninchen (H6908)	Sigma
Anti-HA, monoklonaler Antikörper aus Maus (H9658)	Sigma
Anti-HIS, monoklonaler Antikörper aus Maus (A00186-100)	Genscript
Anti-Tubulin, monoklonaler Antikörper aus Maus (1G10)	Bricheux et al. 2007
Anti-SCS, polyklonaler Antikörper aus Kaninchen	Eurogentec
<u>Sekundärantikörper</u>	
Ziege anti-Kaninchen, IgG, Alexa fluor 488, (A-11008)	ThermoFischer
Esel anti-Maus IgG, Alexa fluor 594, (A-21203)	ThermoFischer
Peroxidase konjugiert, Ziege anti-Maus IgG, ImmunoPure® (31430)	Pierce
<u>Mounting Medium</u>	
Fluoroshield™ mit DAPI (F6057)	Sigma

#### 4.1.4 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) synthetisiert. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sind in der folgenden Auflistung unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz (5'– 3')
TV474360_NdeI_F	GGTGGT <u>CATATGATGAGTGATCAAGAAATTGCCG</u>
TV474360_BamHI_R	GGTGGT <u>GGATCCATTC</u> TTTGCAACAAGGATCTGAG
TV339450_NdeI_F	GGTGGT <u>CATATGATGAGTGACCAGGAATCATTTG</u>
TV339450_BamHI_R	GGTGGT <u>GGATCCATCTTTTCTTGGTGAAATCGAGA</u>
TV117060_NdeI_F	GGTGGT <u>CATATGATGTCTGACGTTGAACTTAGTG</u>
TV117060_BamHI_R	GGTGGT <u>GGATCCCTCAGTTTGCGCTAGCTTTG</u>
TV059360_KpnI_F	GGTGGT <u>GGTACCATGTCGAAACAACAGAAGAATG</u>
TV059360_BamHI_R	GGTGGT <u>GGATCCGCTTCGTAGTTATCAATCTC</u>
TV030160_KpnI_F	GGTGGT <u>GGTACCATGGCTGACGAACTCAAGCT</u>
TV030160_BamHI_R	GGTGGT <u>GGATCCTTTTCATTTTCCAAATGTAAATGCC</u>

#### 4.1.5 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
NdeI, KpnI, BamHI	New England Biolabs
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific
T4 DNA Quick Ligase	New England Biolabs
Phusion <sup>®</sup> DNA Polymerase	New England Biolabs
Velocity <sup>®</sup> DNA Polymerase	Bioline

#### 4.1.6 Kits

Bezeichnung	Hersteller
CloneJET <sup>™</sup> PCR Cloning Kit	Thermo Scientific
DNase I (RNase-free)	Fermentas
DNAzol <sup>®</sup>	Invitrogen
iScript <sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad
MinElute <sup>™</sup> Gel Extraction Kit	Quiagen

NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
Quant-iT dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen
Qubit <sup>®</sup> Quant-iT Protein Assay Kit	Invitrogen
Qubit <sup>®</sup> Quant-iT RNA Assay Kit	Invitrogen
Quick <sup>®</sup> Ligation <sup>™</sup> Kit	New England Biolabs
SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Bioline
SuperSignal <sup>™</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific
TRIzol <sup>®</sup> Reagent	Ambion life tech.
WesternBright ECL Spray	Advansta

#### 4.1.7 Vektoren

Bezeichnung	Hersteller
pTv_GFP, pTv_HA	Basierend auf pTagvag2 (Hrdy et al., 2004)
pYES2/CT	Invitrogen
pJET1.2/blunt	Thermo Scientific

##### pTv\_GFP, pTv\_HA

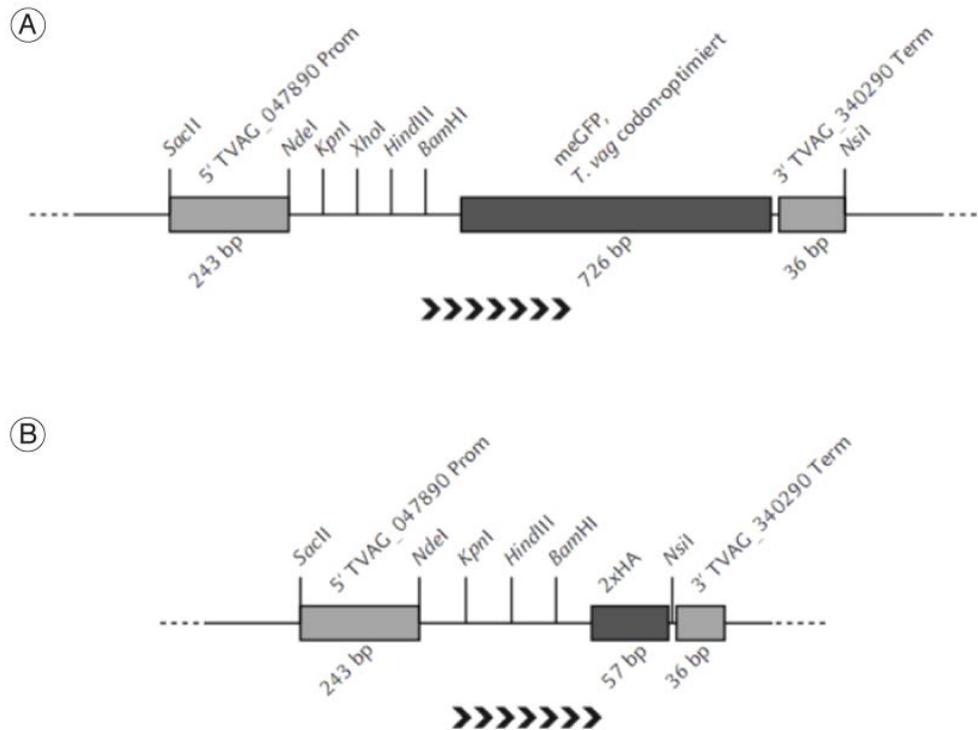
Zur Transfektion von *Tetratrichomonas gallinarum* und *Trichomonas vaginalis* wurden die Vektoren pTv\_GFP und pTv\_HA verwendet. Beide Vektoren basieren auf pTagvag2 – freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. J. Tachezy, Prag, Tschechien (Hrdy et al., 2004). Die ursprüngliche Expressions-Kassette des pTagvag2 wurde für beide Vektoren von Dr. Gary Kusdian und Mitarbeitern modifiziert und ist dementsprechend in Abbildung 4.1. illustriert. Die Sequenz des Polylinkers (*Multiple Cloning Site*, MCS) sowie die des grün-fluoreszierenden Proteins (*monomeric enhanced Green Fluorescent Protein*, kurz meGFP) wurde von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Dieser Sequenzbereich wurde über die Endonukleasen SacII und NsiI in pTagvag2 inseriert. In pTv\_HA wurde der Polylinker über SacII und BamHI in pTagvag2 integriert.

##### pYES2/CT

Die heterologe Proteinexpression in *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte über pYES2/CT (Invitrogen).

pJET1.2/blunt

Sämtliche Gen-Amplifikate wurden in *Escherichia coli* über pJET1.2/blunt (Thermo Scientific) vervielfältigt.



**Abbildung 4.1:** Illustration der Expressions-Kassetten von (A) pTv\_GFP und (B) pTv\_HA. Beide Vektoren basieren auf pTagvag2 (Hrdy et al. 2004). Für die Konstruktion von pTv\_GFP wurde die modifizierte *Multiple Cloning Site* (MCS) inklusive der codon-optimierten Sequenz von meGFP über NdeI und NsiI in pTagvag2 inseriert. Diese MCS wurde auch zur Konstruktion von pTv\_HA, über die Insertion mit SacII und BamHI, verwendet. Promotor, Prom. Basierend auf der Dissertation von Dr. Gary Kusdian 2014.

## 4.1.8 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
2D-Schüttler	GFL
Autoklav	Fedegari
Brutschrank	Heraeus
Brutschrank	Memmert
Brutschrank + Schüttler, 3033	GFL
ChemiDoc™, Universal Hood III	Bio-Rad
Eismaschine	Ziegra
Elektrophorese Power Pac 300, 3000	Bio-Rad
Elektroporator, GenePulser Xcell™	Bio-Rad
Fluoreszenz-Mikroskop, Ti eclipse	Nikon
Folienschweissgerät, VC10	Caso
GelDoc-It™	UVP
Heizblock, HBT 130	HLC
Kühlschrank, <i>Premium</i>	Liebherr
Kühlschrank, Heraeus HERA <i>freeze</i>	Thermo Scientific
Lichtmikroskop, Dialux 20 EB	Leitz
Magnetrührer, IKA-Werk	IKA MAG RCT
MacBook Pro	Apple
Mikroliterpipetten	Gilson
Mikrowelle	Exquisit
Mini-Protean® Tetra System	Bio-Rad
Mini-Zentrifuge, Galaxy MiniStar	VWR
pH-Meter	Schott
Qubit® fluorometer	Invitrogen
Sonifikator, Sonoplus HD 60	Bandelin
Spectrophotometer, Genesys 10uv	Thermo Fischer
Spectrophotometer, NanoDrop 2000c	Scientific
Sterilbank, Heraeus HERA <i>safe</i>	Thermo Scientific
Thermomixer, comfort	Thermo Scientific
Thermocycler, Mastercycler gradient	Eppendorf
Trans-Blot® Turbo™ Transfer-System	Bio-Rad
Transelektronen-Mikroskop, 902	Zeiss
Tube Rotator, MACSmix™	Miltenyi
Vortexer, REAX top	Heidolph
Waage ISO 9001	Sartorius
Waage, Feinwaage, TE64	Sartorius
Wasserbad	GFL
Wasserfiltrationsanlage, Synergy UV	Millipore
Zentrifuge, Biofuge Fresco Heraeus	Thermo Scientific
Zentrifuge, Sorvall LYNX 4000	Thermo Scientific
Zentrifuge, Megafuge 1.0R Heraeus	Thermo Scientific
Zentrifuge, 5417R	Eppendorf
Zellzähler, TC20™	Bio-Rad

## 4.1.9 Organismen und deren Kultivierung

### 4.1.9.1 *Tetratrichomonas gallinarum* und *Trichomonas vaginalis*

Für Experimente mit *Tetratrichomonas gallinarum* wurde der Stamm M3 verwendet – freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Tachezy, Institut für Parasitologie, Charles Universität Prag, Tschechische Republik). Experimente mit *Trichomonas vaginalis* wurden mit dem hochinfektiösen Stamm FMV-1 (Jesus et al., 2004) durchgeführt – freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Benchimol (Santa Úrsula Universität, Rio de Janeiro, Brasilien).

Die Kultivierung beider Organismen erfolgte anaerob bei 37 °C in konischen 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 12 ml TYM-Medium [2,22% (w/v) Tryptose; 1,11% (w/v) Hefeextrakt; 15,0 mM Maltose; 9,16 mM L-Cystein; 1,25 mM L(+)-Ascorbinsäure; 0,77 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3,86 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> inklusive 10% (v/v) hitzeinaktiviertem Pferdeserum und 0,71% (v/v) Eisenlösung (1% (w/v) Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)x6H<sub>2</sub>O; 0,1% (w/v) 5-Sulfosalicylsäure)] (Clark und Diamond, 2002; Diamond, 1957). *T. vaginalis* wurde in TYM-Medium mit pH 6,2 und *T. gallinarum* in TYM-Medium mit pH 7,2 kultiviert. Um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden wurden die Kulturen mit 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (P/S) inkubiert. Zur Selektion transfizierter Trichomonaden wurde zusätzlich 100 µg/ml des Neomycin Derivats G418 zugesetzt. Die Kulturen wurden spätestens alle drei Tage in frisches Medium transferiert. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden 0,5 ml Kultur zu 0,5 ml TYM-Medium inklusive 20% (v/v) DMSO in 2 ml Cryo-Röhrchen pipettiert. Nach einer Lagerung auf Eis für 2 h erfolgte eine Inkubation bei -20 °C für 2 h, wonach die Kultur bei -80 °C eingefroren wurde.

### 4.1.9.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Die Experimente zur heterologen Proteinexpression durch *Saccharomyces cerevisiae* wurden mit dem Stamm INVSc1 von der Firma Invitrogen durchgeführt. Dieser Stamm besitzt den Genotyp: *his3Δ1/his3Δ1 leu2/leu2 trp1-289/trp1-289 ura3-52/ura3-52* und den Phänotyp: His<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>, Ura<sup>-</sup>. Die Kultivierung der INVSc1-Zellen auf Fest- und in Flüssigmedium sowie die Herstellung der benötigten Medien erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Induktion der mit pYES2/CT transfizierten INVSc1-Zellen wurde ebenfalls nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

### 4.1.9.3 *Escherichia coli*

Die Vervielfältigung sämtlicher Vektor-Konstrukte erfolgte durch *E. coli XLI-Blue MRF'* von der Firma Stratagene. Dieser Stamm besitzt den Genotyp:  $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^{\text{q}}\text{Z\_M15 Tn10 (Tet}^{\text{r}}\text{)]}$ . Die Kultivierung der Bakterienzellen auf Fest- und in Flüssigmedium sowie die Herstellung der benötigten Medien erfolgte nach Protokollen von Sambrook et al., 1989. Zur Selektion erfolgreicher Transformanten wurden die Bakterienzellen auf LB-Agarplatten mit 0,1 mg/ml Ampicillin ausgestrichen.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Nukleinsäure orientierte Methoden

#### 4.2.1.1 Extraktion genomischer DNA aus *T. vaginalis*

Zur Extraktion genomischer DNA von *T. vaginalis* wurde das organische Reagenz DNAzol<sup>®</sup> (ThermoFischer Scientific) verwendet. Durch die darin enthaltenen Guanidinsalze lässt sich die genomische DNA selektiv aus einem Zelllysat präzipitieren. Hierzu wurden 50 ml Kultur mit einer Zellkonzentration von  $\sim 3 \times 10^6$  Zellen/ml für 10 min bei 1.500xg, 4 °C pelletiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Schließlich wurde die genomische DNA in TE-Puffer (10 mM Tris-HCL pH 8,0 inklusive 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Spectrophotometer NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

#### 4.2.1.2 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) durchgeführt. Diese ermöglichte die Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen mittels sequenzspezifischer Oligonukleotide durch die Katalyse einer DNA-Polymerase (Mullis et al., 1986). Um eine möglichst korrekte DNA-Synthese zu gewährleisten, wurde stets mit einer DNA-Polymerase mit Korrekturlese-Funktion gearbeitet. Hierzu kamen die DNA-Polymerasen *Phusion* (New England Biolabs) und *VELOCITY* (Bioline) zum Einsatz. Die Reaktionsansätze, die Thermocycler-Einstellungen sowie die Durchführung erfolgten nach den Herstellerprotokollen der jeweiligen Enzym-Kits. Nach der PCR wurden die Proben mit 1/10 ihres Volumen mit 10x Ladepuffer versetzt (10x Ladepuffer: 0,4% (w/v) Bromphenolblau; 0,4% (w/v) Xylencyanol; 1 mM EDTA, pH

8,0; 20% (v/v) Ficoll) und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in einem 1% Agarose-Gel mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid und 1xTAE Puffer (50x TAE Puffer: 2 M Tris; 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA, pH 8,0) (Sambrook et al., 1989).

#### 4.2.1.3 Herstellung der Expressionsvektoren

Zur Herstellung der Expressionsvektoren wurde die Sequenz des entsprechenden Gens via PCR vervielfältigt, elektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Agarose-Gel mittels dem MinElute™ Gel Extraction Kit (Quiagen) extrahiert. Das eluierte Genfragment wurde in den Vektor pJET1.2/blunt (Kap. 4.1.7) mit dem CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) ligiert und zur weiteren Vervielfältigung in ultra-kompetente *E. coli* XL1-blue Zellen (Kap. 4.1.9.3) eingebracht. Die Transformation der *E. coli*-Zellen erfolgte durch Zugabe von 3 µl Ligationsansatz mit einer Inkubation von 20 min auf Eis. Anschließend wurden 20-30 µl der transformierten Bakterienzellen auf eine LB-Agar-Platte mit Ampicillin (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die mit pJET1.2/blunt inklusive inseriertem Genfragment erfolgreich transformierten Zellen bildeten daraufhin Kolonien aus. Die Bakterienkolonien wurden jeweils in 5 ml LB Medium (1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt), inklusive Ampicillin (100 µg/ml) transferiert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Plasmidisolierung durch alkalische Lyse erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin Plasmid Kits (Macherey-Nagel). Um zu überprüfen, ob die inserierte Gensequenz tatsächlich die gewünschte ist, wurde die isolierte Plasmidprobe einer entsprechenden Bakterienkolonie zu der Firma Eurofins MWG Operon geschickt und dort mit pJET1.2/blunt spezifischen Oligonukleotiden sequenziert. Lag die korrekte Gensequenz vor, so wurde diese aus pJET1.2/blunt restringiert und in die Expressionsvektoren pTv\_GFP, pTv\_HA oder pYES2/CT (Kap. 4.1.7) ligiert.

#### 4.2.1.4 RNA-Extraktion aus *S. cerevisiae*

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae* erfolgte unter Verwendung von TRIzol® Reagent (Ambion™ life technologies) nach Protokoll des Herstellers. Je Ansatz wurden 6 ml Hefe-Kultur mit einer Zelldichte von  $\sim 6 \times 10^5$  Zellen/ml mit 500 µl TRIzol® Reagent behandelt.

#### 4.2.1.5 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA erfolgte durch das Enzym Reverse Transkriptase. Dieses ermöglicht die Umschreibung von RNA in cDNA (*complementary* DNA). Durch die Übersetzung von mRNA (*messenger* RNA) in cDNA kann überprüft werden, ob ein Gen tatsächlich transkribiert wird. Zudem kann dessen Transkription durch die cDNA quantitativ erfasst werden. Im Vorfeld muss sichergestellt sein, dass die eingesetzte RNA-Probe frei von DNA ist, um Artefakte auszuschließen. Hierzu wurden 10 µg Gesamt-RNA aus *S. cerevisiae* mit DNase I (Fermentas) nach Herstellerprotokoll behandelt. Dieses Enzym katalysiert den gezielten Abbau von DNA. Die Konzentration der mit DNase-behandelten RNA wurde mit dem Spectrophotometer NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) bestimmt, damit je Ansatz 1 µg RNA mit dem iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) nach Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben werden konnten. Die anschließende RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) erfolgte je Ansatz stets mit einer Negativkontrolle die keine Reverse Transkriptase enthielt.

#### 4.2.1.6 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ermöglicht eine qualitative Transkriptions-Analyse von Genen. Durch die Methode lässt sich feststellen, ob die mRNA eines bestimmten Gens von einer Zelle synthetisiert wurde oder nicht. Hierfür wurden 1 µl cDNA als Matrize im Zuge der PCR eingesetzt (Kap. 4.2.1.2).

### 4.2.2 Protein orientierte Methoden

#### 4.2.2.1 Extraktion des Cytoskeletts von *Tetratrichomonas gallinarum*

Zur Extraktion des Cytoskeletts aus *T. gallinarum* wurden Durchführungsschritte aus unterschiedlichen Protokollen kombiniert (de Souza und da Cunha-e-Silva, 2003; Palm et al., 2005; Viscogliosi und Brugerolle, 1994). Demnach wurden 500 ml Kultur mit  $\sim 7 \times 10^6$  Zellen/ml für 10 min bei 1.500xg und RT pelletiert. Es folgten zwei Waschschritte in Ringer-Lösung [(0,12 M NaCl; 3,5 mM KCl; 2,0 mM CaCl<sub>2</sub>; 2,5 mM NaHCO<sub>3</sub>; pH 7,2 (Viscogliosi und Brugerolle 1994)] mit Zentrifugationen bei 999xg, 10 min, RT. Die gewaschenen Zellen wurden in 30 ml eiskalter Triton-Lösung [10 mM Tris; 2 mM EDTA; 2 mM DTT; 1 mM ATP; 2 mM MgSO<sub>4</sub>; 200 mM KCl; 1,5% (v/v) Triton™ X-100, pH 7,8 (modifiziert nach Palm et al., 2005) inklusiver einer Protease Inhibitor Tablette (1x *cOmplete Mini protease inhibitor*, Roche)] resuspendiert. Die Zellsuspension wurde rigoros für 2 min gevortext und 2 min auf

Eis inkubiert. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Nach Bestätigung der Zelllyse mittels Lichtmikroskop wurde das Gesamtzelllysate für 15 min bei 277xg, RT zentrifugiert. Um die Ausbeute und Reinheit des Cytoskeletts zu steigern wurde die Isolation über einen Sucrose-Dichtegradienten fortgesetzt. Hierfür wurde das resultierende Pellet auf 1 ml 2 M Sucrose in einem 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 15 min bei 1.000xg, 4 °C zentrifugiert. Dadurch formierte sich eine obere und eine untere Bande. Die obere Bande wurde abgenommen und auf 1 ml 1,5 M Sucrose transferiert und für 15 min bei 10.000xg, 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend auf einen vierfach-Gradienten bestehend aus 1 M, 1,5 M, 2 M und 2,5 M Sucrose (von oben nach unten) innerhalb eines 2 ml Reaktionsgefäßes überführt und für 1 h bei 19.000xg, 4 °C zentrifugiert. Dabei bildeten sich drei Pellets entlang des 2 ml Reaktionsgefäßes aus. Das oberste Pellet, in der Phase zwischen 1 M und 1,5 M Sucrose, enthielt die reinste und am stärksten konzentrierte Fraktion des Cytoskeletts, wie sich durch Lichtmikroskop- und Western Blot-Analysen feststellen ließ (Kap. 5.1, Abb. 5.1). Dieses Pellet wurde schließlich zweimal in PBS gewaschen mit Zentrifugationen von 5 min bei 12.000xg, 4 °C.

#### **4.2.2.2 Protein-Identifikation durch Flüssigkeitschromatographie gekoppelte Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS)**

Zur Identifikation der Proteine wurden die extrahierten Cytoskelett-Fractionen von *T. gallinarum* in einem Polyacrylamid-Gel (~4 mm Laufweite) aufgetrennt. Protein-haltige Gelbanden wurden aus dem silber gefärbten Gel herausgeschnitten, entfärbt, reduziert, mit Iodacetamid alkyliert und mit Trypsin (1:50 (w/w), Serva) bei 37 °C über Nacht verdaut (Poschmann et al., 2014). Die resultierenden Peptide wurden aus dem Gel extrahiert und schließlich in 0,1% Trifluoressigsäure aufgenommen. Vor der massenspektrometrischen Analyse, wurden die Peptide über 2 h mittels Ultimate 3000 *Rapid Separation Liquid Chromatography System* (RSLC, Thermo Scientific) aufgetrennt. Hierzu kam eine analytische Säule (Acclaim PepMapRSLC, 2 µm C18 Partikelgröße, 100 Å Kerngröße, 75 µm Innendurchmesser, 25 cm Länge, Thermo Scientific) zum Einsatz (Hartwig et al., 2014). Unter Verwendung einer Nano-Elektrospray-Ionisierungsquelle wurden die Peptide in ein Orbitrap Elite Massenspektrometer (Thermo Scientific) injiziert. Dieses wurde im Positivmodus mit einer Kapillartemperatur von 275 °C und einer Spannungsquelle von 1,4 kV betrieben. Zunächst wurden die Vorläuferionenmassen im Orbitrap-Analysator des Gerätes über einen Massenbereich von 350-1.700 m/z bestimmt. Hierbei wurde eine Auflösung von 60.000 (bei 400 m/z) verwendet. Anschließend wurden bis zu 20 Fragmentspektren der

intensivsten 2+ und 3+ geladenen Peptid-Ionen (minimal Signalintensität 500) in der linearen Ionenfalle des Instruments aufgezeichnet. Dies geschah nach der Fragmentierung (basierend auf Kollision induzierter Dissoziation) unter Verwendung eines verfügbaren Massenbereichs von 200-2.000 m/z und einer Auflösung von 5.400 (bei 400 m/z). Bereits fragmentierte Ionen wurden von einer weiteren Fragmentierung für 45 Sekunden ausgeschlossen.

#### **4.2.2.3 Transfektion von *T. gallinarum* und *T. vaginalis***

Die Transfektion beider Organismen erfolgte durch Elektroporation (Delgadillo et al., 1997). Hierzu wurden 50 ml einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Wildtyp-Kultur eingesetzt. Die Zellen wurden für 10 min bei 1.500xg und 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde gewogen und je Gramm in 1,5 ml eiskaltem TYM Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit einer Spritze durch eine 23G-Kanüle gezogen, um die Zellmembran zu perforieren. Circa 300 µl Zellsuspension wurden mit 30-50 µg Plasmid-DNA in einer 0,4 cm Elektroporationsküvette gemischt und in die Schockkammer des Elektroporators gestellt. Der elektrische Impuls erfolgte bei 350 V und 960 µFd. Nach einer Inkubation auf Eis für 10 min wurden die Zellen in 12 ml 37 °C vorgewärmtes TYM Medium inklusive P/S resuspendiert und anaerob bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion wurden frühestens 4 h später 100 µg/ml G418 hinzugefügt. Nach 48 h wurde die Kultur für 10 min bei 1.000xg und RT pelletiert und in frischem TYM Medium inklusive P/S und G418 resuspendiert. Um festzustellen, ob die Transfektion erfolgreich war und die Zellen das gewünschte Protein exprimierten, wurde eine Immunodetektion durchgeführt (Kap. 4.2.2.9).

#### **4.2.2.4 Transfektion von *S. cerevisiae***

Zur Transfektion kompetenter INVSc-Hefezellen wurde zunächst Träger-DNA (Heringssperma) für 10 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis gelagert. Zu den noch gefrorenen Hefezellen wurden 50 µg Träger-DNA und 2-3 µg Plasmid-DNA (pYES2/CT, Kap. 4.1.7) pipettiert. Der Ansatz wurde für 1 min bei 37 °C im Schüttelthermostat mit 550 rpm geschüttelt. Es wurden 15 µl 100 mM CaCl<sub>2</sub> zugesetzt und weitere 3 min geschüttelt. Nun wurden 75 µl 100 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 ml Puffer 2 (200 mM Bicin pH 8,35; 40% (w/v) PEG 1000) hinzugefügt. Das Reaktionsgefäß wurde dreimal behutsam invertiert und anschließend für 1 h bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin für 1 min bei 800xg pelletiert. Das Zellpellet wurde mit 500 µl Puffer 3 (10 mM Bicin pH 8,35; 150 mM NaCl) gewaschen und in 200 µl Puffer 3 resuspendiert. Der gesamte Ansatz wurde auf

Selektivmedium [(0,67% (w/v) *yeast nitrogen base*; *yeast synthetic dropout medium supplement* (ohne Uracil, (Sigma-Aldrich)); 10% (w/v) Agar; 2% (w/v) Raffinose)] ausplattiert und für mindestens zwei Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

Die Induktion zur Expression der transfizierten pYES2/CT-Konstrukte erfolgte durch Überführung der Hefezellen in Induktionsmedium (2% (w/v) Galaktose; 1% (w/v) Raffinose) mit einer Inkubationszeit von mindestens 4 h nach Protokoll des Herstellers (Invitrogen).

#### 4.2.2.5 Protein-Extraktion aus *T. vaginalis*

Zur Extraktion des proteinhaltigen Gesamtzelllysates wurden 12 ml Kultur mit einer Konzentration von  $\sim 5 \times 10^7$  Zellen/ml für 5 min bei 1.500xg und 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß transferiert, zweifach mit PBS gewaschen und in 1 ml eisgekühlter Triton-Lösung [(10 mM Tris, 2 mM DTT, 1 mM ATP, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 200 mM KCl, 1,5% (v/v) Triton™ X-100, pH 7,8 inklusive einer Protease Inhibitor Tablette (1x *cOmplete Mini protease inhibitor*, Roche); modifiziert nach Palm et al., 2005)] resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch rigoroses Vortexen der Zellsuspension für 2 min mit einer anschließenden Kühlung auf Eis für 2 min. Diese Prozedur wurde insgesamt dreimal wiederholt. Der Erfolg des Zellaufschlusses wurde unter dem Lichtmikroskop überprüft. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) ermittelt.

#### 4.2.2.6 Protein-Extraktion aus *S. cerevisiae*

Zur Extraktion des proteinhaltigen Gesamtzellextraktes wurden 30 ml Kultur mit einer Konzentration von  $\sim 6 \times 10^5$  Zellen/ml für 5 min bei 1.500xg, RT pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und zweifach mit 1 ml sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Zellpellet wurde gewogen und entsprechend dem Gewicht sterile Glasperlen (0,4-0,6 mm) und *Breaking-Puffer* (50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4; 1 mM EDTA; 5% (v/v) Glycerol; 1 mM PMSF) hinzugegeben (z.B. für 100 mg Zellpellet wurden 100 mg Glasperlen und 200 µl *Breaking-Puffer* verwendet). Der Ansatz wurde für 1 min gevortext und direkt für 1 min auf Eis gekühlt. Diese Prozedur wurde mindestens viermal wiederholt. Der Zellaufschluss wurde am Lichtmikroskop überprüft. Das resultierende Zelllysate wurde für 2 min bei 14.000xg, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für weitere Analysen verwendet.

#### 4.2.2.7 Elektrophoretische Trennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Sämtliche Proteinproben wurden über eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in 8-12% Acrylamid-Gelen aufgetrennt (Laemmli, 1970; Sambrook et al., 1989). Die Denaturierung der Proteinproben erfolgte zuvor in Laemmli-Puffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA; 1% (w/v) SDS; 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 10% (v/v) Glycerin; 0,05% (w/v) Bromphenolblau) für 5 min bei 95 °C. Das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine wurde über den Proteinmarker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFischer Scientific) ermittelt. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das entsprechende Gel anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (Heukeshoven und Dernick, 1988).

#### 4.2.2.8 Western Blot

Mittels Western Blot erfolgte der Transfer der per SDS-PAGE separierten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond C Extra, GE Healthcare). Hierzu kam das Trans-Blot® Turbo™ Transfer-System (BioRad) zum Einsatz. Das SDS-Gel, die Nitrocellulosemembran (NCM) und insgesamt sechs Lagen Whatman 3MM-Papier wurden als Sandwich in der Transferkassette angeordnet. Das Whatman Papier wurde zuvor mit Transferpuffer (39 mM Glycin; 48 mM Tris; 1,3 mM SDS; 20% (v/v) Methanol) benetzt. Der elektrische Transfer erfolgte im Standard-Preset des Trans-Blot® Turbo™ Transfer-Systems mit einer konstanten Spannung von 25 V für 30 min. Die Übertragung der Proteine wurde anschließend durch reversibles Anfärben der NCM mit Ponceau S (0,5% (w/v) Ponceau S; 1% (v/v) Essigsäure) überprüft.

#### 4.2.2.9 Immunodetektion

Die Visualisierung der auf die Nitrocellulosemembran (NCM) transferierten Proteine erfolgte durch spezifische Antikörper, die über deren Chemilumineszenz- beziehungsweise Fluoreszenzeigenschaften detektiert werden konnten. Hierzu wurde die NCM nach dem Western Blot in Blockingpuffer [5% (w/v) Magermilchpulver in TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl)] für mindestens 30 min geschwenkt, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Nach Verwerfen des Blockingpuffers wurde die NCM in frischem Blockingpuffer inklusive einem oder zwei entsprechenden Primärantikörper/n für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C schwenkend inkubiert. Die eingesetzten Antikörper und Fluorophore sind in Kapitel 4.1.3 aufgeführt, die Antikörperverdünnungen

und weitere Parameter der angewandten Chemilumineszenz- und Multiplex Fluoreszenz-Detektionsverfahren sind in Tabelle 4.1 ersichtlich. Die NCM wurde in TBS-T (TBS inklusive 0,1% (v/v) Tween 20) gewaschen und anschließend in Blockingpuffer mit einem oder zwei entsprechenden Sekundärantikörper/n für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C schwenkend inkubiert.

Beim Chemilumineszenz-Verfahren wurde ein Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper verwendet. Die Luminol-Reaktion wurde hierbei mit dem WesternBright ECL Spray (Advansta) initiiert. Die Detektion der Proteine erfolgte anschließend im ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad). Das Multiplex Fluoreszenz-Verfahren ermöglichte die Detektion von zwei unterschiedlichen Proteinen simultan. Hierfür wurden zwei fluoreszierende Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsspektren eingesetzt. Die Handhabung erfolgte daher stets im Dunkeln beziehungsweise bei abgeschwächtem Licht. Die Proteine wurden schließlich ebenfalls mit dem ChemiDoc™ MP System visualisiert. Im Gegensatz zur Chemilumineszenz-Methodik jedoch unter Anregung unterschiedlicher Wellenlängen der Sekundärantikörper-gebundenen Fluorophore.

**Tab. 4.1 - Immunodetektionsverfahren und deren Spezifität im Überblick**

	<b>Chemilumineszenz</b>	<b>Multiplex Fluoreszenz</b>
Antikörper	Peroxidase-konjugiert	Fluorophor-konjugiert
Antikörperverdünnung	Primärantikörper: 1:5.000 Sekundärantikörper: 1:10.000 (Jeweils in Blockingpuffer)	Primärantikörper: 1:1.000 (in Blockingpuffer) Sekundärantikörper: 1:3.000 (in Waschpuffer)
Waschschritte	3x a 10 min	5x a 5 min

#### 4.2.2.10 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie ermöglichte die Antikörper-vermittelte Visualisierung von spezifischen Proteinen und Proteinkomplexen innerhalb einer fixierten Trichomonaden-Zelle. Anhand dieser Methode lassen sich somit Rückschlüsse auf die Lokalisation der Proteine *in vivo* ziehen.

Hierzu wurden jeweils 12 ml einer *T. vaginalis*- beziehungsweise einer *T. gallinarum*-Kultur mit einer Konzentration von  $\sim 7 \times 10^6$  Zellen/ml für 8 min bei 914xg, RT pelletiert. Der

Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgten zwei Waschschrte in 1 ml PBS, wobei die Zellen für 2 min bei 550xg, RT erneut pelletiert wurden. Alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten für 2 min bei 550xg, RT. Zur Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen in 1 ml Fix-Perm-Lösung für 20 min bei RT rotierend inkubiert. Die Fix-Perm-Lösung beinhaltete 3,5% (v/v) Paraformaldehyd und Triton™ X-100 in PBS. *T. vaginalis*-Zellen wurden mit 0,4% (v/v) Triton™ X-100 und *T. gallinarum*-Zellen mit 0,03% (v/v) Triton™ X-100 behandelt. Die Zellen wurden zentrifugiert, in 1 ml Blocking-PBS (0,1% (w/v) BSA in PBS) resuspendiert und 20 min bei RT rotierend inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 0,5 ml Primärantikörper-Lösung [(anti-HA beziehungsweise anti-GFP und anti-Tubulin (Kap. 4.1.3) in Blocking-PBS, 1:1000)] für 2 h rotierend bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert, zweifach in PBS gewaschen, in 0,5 ml Sekundärantikörper-Lösung [(Fluorophor-gekoppelte Antikörper (Kap. 4.1.3) verdünnt in Blocking-PBS 1:1000)] und für 2 h rotierend bei RT im Dunkeln inkubiert. Es folgten erneut zwei Waschschrte in PBS, wonach die Zellen mit DAPI-Lösung (Kap. 4.1.3), verdünnt in PBS 1:1, behandelt wurden. Die fixierten Zellen wurden daraufhin mit dem Immunfluoreszenz-Mikroskop Nikon ECLIPSE Ti beobachtet.

#### **4.2.2.11 Lebendzellobservierung**

Die Lebendzellobservierung erfolgte am Immunfluoreszenz-Mikroskop Nikon ECLIPSE Ti. Um die Zellen von *T. vaginalis* und *T. gallinarum* präziser betrachten zu können wurde deren Motilität in manchen Untersuchungen durch Zugabe von 2% Methylcellulose reduziert. Hierzu wurden 5 µl 2% Methylcellulose auf einem Objektträger vorgelegt, 10 µl Zellkultur hinzu pipettiert und mit einer Mikroliterpipettenspitze behutsam gemischt. Bei den Analysen der *T. gallinarum*-Zellen, die TVAG\_474360::HA heterolog exprimierten, wurde keine Methylcellulose verwendet.

#### **4.2.2.12 Transmissionselektronen-Mikroskopie**

##### **4.2.2.12.1 Fixierung und Pelletieren der Zellen**

Zu den transmissionselektronen-mikroskopischen Untersuchungen wurden jeweils 12 ml einer *T. gallinarum*-Kultur mit einer Konzentration von  $\sim 7 \times 10^6$  Zellen/ml für 8 min bei 914xg, RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgten zwei Waschschrte in

1 ml PBS, wobei die Zellen für 2 min bei 550xg, RT erneut pelletiert wurden. Die Zellfixierung erfolgte in einer Lösung mit 2,5% Glutaraldehyd und 0,1 M Cacodylat-Puffer für 24 h bei 4 °C. Die fixierten Zellen wurden in Cacodylat-Puffer resuspendiert und viermal mit diesem gewaschen. Die Zentrifugationsschritte hierfür erfolgten jeweils für 1 min bei 16.000xg, RT. Die Zellen wurden anschließend in Waschpuffer resuspendiert. Die Kontrastierung der fixierten Zellen erfolgte durch Inkubation in OsO<sub>4</sub>-Lösung (2% (w/v) Osmiumtetroxid mit 0,8% (w/v) Kaliumhexacyanoferrat III) für 1 h bei RT. Das kontrastierte Zellpellet wurde gründlich in Cacodylat-Puffer per Pasteur Glaspipette gewaschen, bis keine braunen OsO<sub>4</sub>-Rückstände mehr erkennbar waren. Unter leichtem Schwenken folgte die Zugabe von erwärmten 3,5% Agar mit anschließender Inkubation auf Eis, um das Aushärten des Zellpellets am Boden des 1,5 ml Reaktionsgefäßes einzuleiten. Der Reaktionsgefäßboden einschließlich das in Agar eingebettete Zellpellet wurde mit einem Skalpell oder mit einer kleinen Guillotine abgetrennt und in ein Glasgefäß mit 1 ml Cacodylat-Puffer transferiert.

#### **4.2.2.12.2 Einbettung und Schnitt**

Die Lösungen und Inkubationszeiten für die Einbettung des Zellpellets sind zur Übersicht schrittweise in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die Dehydrierung und Waschung des Zellpellets erfolgte unter Anwendung einer steigenden Ethanolreihe (Tab. 4.2). Sämtliche Ethanol-Lösungen waren auf 4 °C vorgekühlt, bevor sie dem Glasgefäß mit Zellpellet hinzugeführt wurden. Das dehydrierte Zellpellet wurde schrittweise in Epoxidharz aufgenommen. Die dafür frisch angesetzten EPON-Lösungen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen mit Propylenoxid gemischt (Tab. 4.2). Im letzten Schritt der Einbettung erfolgte die Inkubation des Zellpellets im EPON-Propylenoxid-Gemisch über Nacht in vakuumierten Glasgefäßen, um das Aushärten der Lösung zu unterdrücken. Das Zellpellet wurde mit einer Pinzette aus der EPON-Lösung entnommen und mit einer Rasierklinge in ~2 mm breite Scheiben geschnitten. Die Scheiben wurden jeweils passgenau in einzelne Fugen einer Kunststoff-Kassette positioniert. Die Fugen wurden bis leicht über den Rand mit EPON befüllt. Die Aushärtung der EPON-Blöcke sowie die Polymerisierung der geschnittenen Zellprobe wurde durch die Inkubation im Heizofen für 24 h bei 40 °C und folgenden 24 h bei 60 °C gewährleistet. Von der eingebetteten Zellprobe wurden am Ultramikrotom (Ultracut E) vorerst Semi-Schnitte und schließlich Ultradünnschnitte (70-80 nm) angefertigt. Die Dünnschnitte wurden auf Kupfernetze aufgezogen und weiterhin für 10 min mit Uranylacetat und 5 min mit Bleicitrat kontrastiert. Die Observierung erfolgte schließlich am Transmissionselektronen-Mikroskop 902 (Zeiss).

**Tabelle 4.2 : Lösungen und Inkubationszeiten zur Einbettung des Zellpellets**

Lösung	Inkubationszeit
60% Ethanol	1x 10 min
70% Ethanol	Über Nacht bei 4 °C
80% Ethanol	1x 10 min
90% Ethanol	2x 10 min
100% Ethanol	1x 10 min
100% Ethanol + Molekularsieb	1x 10 min
Propylenoxid	1x 15 min
EPON + Propylenoxid (1:2)	60 min
EPON + Propylenoxid (1:1)	60 min
EPON + Propylenoxid (2:1)	Über Nacht bei RT

### 4.2.3 Bioinformatische Methoden

#### 4.2.3.1 Identifikation der massenspektrometrisch erfassten Proteine

Um die massenspektrometrische Protein-Analyse des Cytoskeletts auswerten zu können, war es notwendig das Transkriptom von *T. gallinarum* zu kennen, zumal von diesem Organismus bisher kein Genom veröffentlicht wurde. Die RNA-Sequenzierung erfolgte über Illumina Sequenzierung (BMFZ, HHU Düsseldorf) basierend auf RNA von *T. gallinarum* M3 (NCBI, accession SRA318841). Um die Qualität der Reads zu steigern wurde ein Filter angewandt, durch den die ersten neun Nukleotid-Positionen verworfen wurden. Dieser Schritt wurde auf Grundlage einer FastQC-Analyse (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) durchgeführt. Es wurden ausschließlich Reads mit einem Minimum von 25 Nukleotiden berücksichtigt. Zudem wurden sämtliche Reads, die zu 25% aus Nukleotiden mit geringer Qualität bestanden (25% aller Basen mit Werten  $\leq$  Q15, identifiziert über ein von Dr. Mayo Röttger geschriebenes Perl Script), ebenfalls verworfen. Die Assemblierung sämtlicher Reads erfolgte über *Trinity assembler* (Version r20121110) (Grabherr et al., 2011). Von allen assemblierten contigs wurde ausschließlich die längste Isoform eines Kandidaten verwendet. Dies wurde ebenfalls über ein hierfür geschriebenes Perl Script realisiert. Offene Leseraster (ORFs) wurden mit *getorf* von *EMBOSS 6.6.0* (Rice et al., 2000) identifiziert und in die entsprechende Aminosäuresequenz translatiert. Für die Definition von ORFs wurden

ausschließlich Stop-Codons berücksichtigt (option-find 0). Darüberhinaus wurden zur Identifikation der Proteine nur diejenigen Sequenzen selektiert, welche ein Minimum von 100 Aminosäuren aufwiesen. Für diese Sequenzen wurden schließlich die entsprechenden Homologe von *T. vaginalis*-annotierten Genen ermittelt. Hierzu wurde unter Verwendung des BLAST Programms (Version 2.2.28) (Altschul et al., 1997) und der Trichomonas-Genom-Datenbank, TrichDB (Version 1.3) (Aurrecochea et al., 2009) mit einem e-value cutoff bei  $\leq 1e^{-10}$  gearbeitet.

Die Protein-Identifikation der massenspektrometrisch ermittelten Daten erfolgte mit Hilfe der Suchmaschine MASCOT (Version 2.4.1, Matrix Science, London, UK), welche in die *Proteome Discoverer* Software (Version 1.4.1.14, Thermo Scientific) eingebunden war. Für die Spektrenidentifizierung wurde eine *T. gallinarum*-spezifische Datenbank bestehend aus 37.740 Proteineinträgen (determiniert durch die Transkriptom-Analyse, Kap. 5.2) zu Grunde gelegt. Bei den Suchen wurden tryptische Peptide mit maximal einer nicht geschnitten Schnittstelle beachtet. Die Vorläufer-Massentoleranz wurde auf 10 ppm, die Fragment-Massentoleranz auf 0,4 Da eingestellt. Carbamidomethyl an Cysteinen wurden als statische Modifikation, Methionin-Oxidation und N-terminale Acetylierung als variable Modifikation berücksichtigt. Zur Evaluation der Peptide wurde der „Percolator“-Algorithmus verwendet (Falsch-Positiv-Rate maximal 1%). Zudem wurden ausschließlich jene Proteine betrachtet, deren Detektion mit einem Minimum von zwei Peptiden erfolgte. Die Daten der massenspektrometrischen Proteom-Analyse sind über das *ProteomeXchange Consortium* in der PRIDE Datenbank (Vizcaino et al., 2014) unter PXD003212 hinterlegt.

#### 4.2.3.2 Protein-Datensätze und deren Analyse

Von allen massenspektrometrisch erfassten Proteinen wurden nur diejenigen berücksichtigt, die mit mindestens zwei Peptiden detektiert wurden. Demnach wurden insgesamt 582 Proteine in den drei extrahierten Cytoskelett-Proben von *T. gallinarum* gefunden. Homologe Proteine in *T. vaginalis* wurden über reziproke best BLAST Homologie-Suchen (best BLASTp hits mit 25% Identität und einem Minimum e-value von  $\leq 1e^{-10}$ , ohne *low complexity filter* über die Trichomonas-Genom-Datenbank TrichDB; Version 2.0, März 2015) ermittelt. Hierdurch konnten 271 Paare putativ orthologer Proteine erfasst werden. Diese wurden anschließend manuell gefiltert um Cytoskelett-unspezifische Proteine, wie zum Beispiel ribosomale Untereinheiten, von der weiteren Analyse auszuschließen. Dieser Filterschritt erfolgte auf Basis von TrichDB-Annotationen und brachte schließlich einen finalen Protein-Datensatz von 203 Cytoskelett-assoziierten Proteinen hervor.

Um die Proteine und deren Struktureigenschaften statistisch zu validieren, wurden zwei Proteinsets als Kontrolle zusammengestellt. Das erste Set bestand aus 301 hydrogenosomalen Proteinen. Dieser Datensatz basierte auf 359 Proteinen des hydrogenosomalen Proteoms von *T. vaginalis* (Garg et al., 2015) und wurde ebenfalls manuell gefiltert um Hydrogenosomen-unspezifische Proteine auszuschließen. Das zweite Kontrollset bestand aus 203 zufällig selektierten Proteinen des *T. vaginalis*-Genoms über die Datenbank TrichDB. Im Rahmen einer weiteren Analyse, welche die Proteinlänge berücksichtigte, wurden beide Kontrollsets zusätzlich gefiltert und enthielten schließlich nur Proteine mit einer ähnlichen Größe wie das zu vergleichende Cytoskelett-Proteomset.

Die Vorhersage für die Anzahl und die Länge von Coiled-Coil Motiven in den analysierten Proteinen erfolgte mit COILS und NCOILS (Lupas et al., 1991). Die Ermittlung der repetitiven Motive basierte auf RADAR (Heger und Holm, 2000). Als repetitives Motiv wurde eine Proteinsequenz mit mindestens drei repetitiven Segmenten, jedes mit einer Mindestlänge von zehn Aminosäuren, definiert. Entsprechende Suchkriterien wurden bereits zuvor erfolgreich angewandt, um Cytoskelett-assoziierte Proteine in *Tetrahymena thermophila* zu identifizieren (Gould et al. 2011). Die funktionelle Zuordnung der 203 Cytoskelett-assoziierten Proteinen basierte auf den Annotationen der KOG-Datenbank (Koonin et al., 2004; Tatusov et al., 2003). Die Identifikation von Protein-Domänen innerhalb der Proteine erfolgte durch SMART (Letunic et al., 2015).

## 5. Ergebnisse

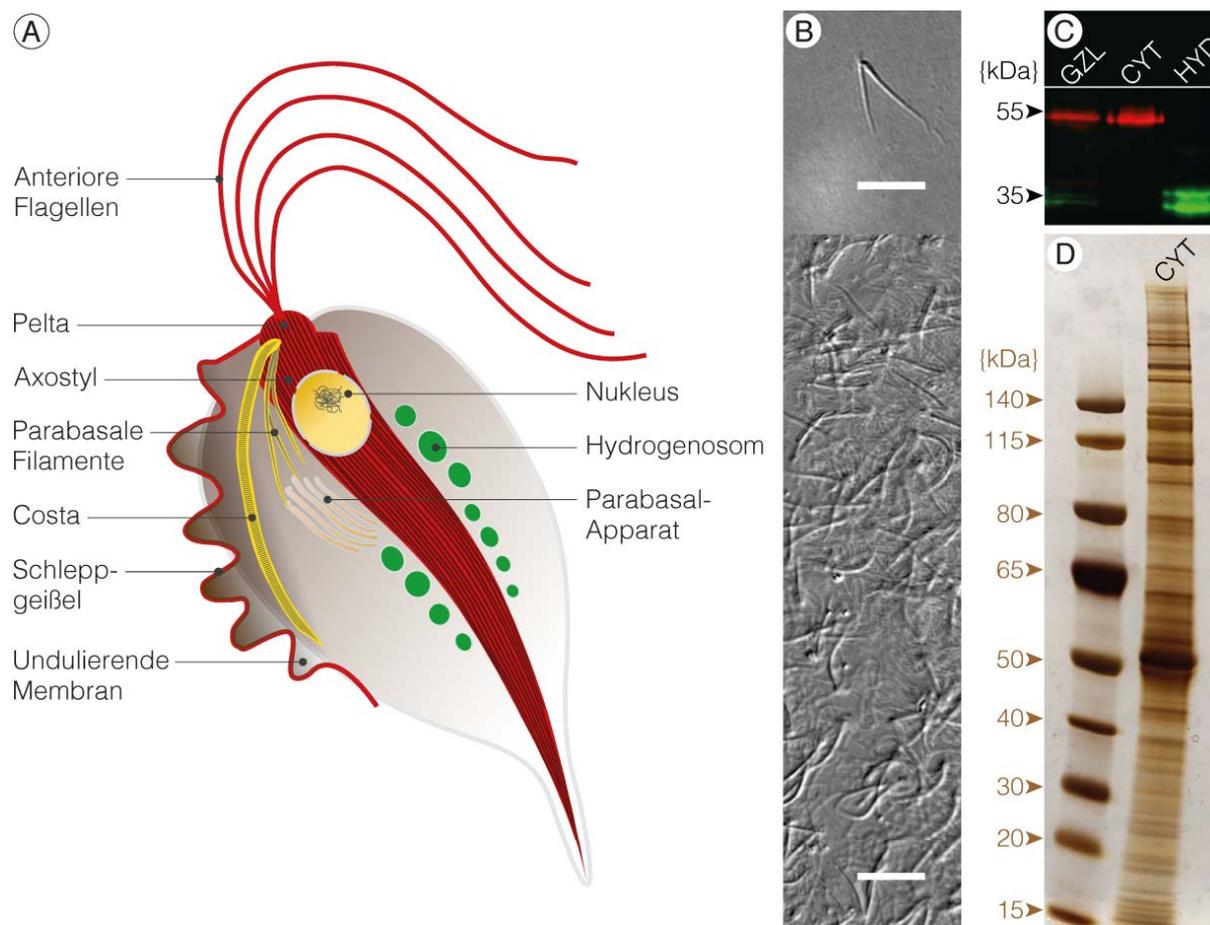
### 5.1 Extraktion des Cytoskeletts von *Tetratrichomonas gallinarum*

Das Cytoskelett der Trichomonadidae ist ein komplexes Arrangement, welches mitunter maßgebend von den makromolekularen Strukturen Axostyl, Costa und den gestreiften Parabasalen Filamenten aufgebaut und gestützt wird (Honigberg BM, 1971; Lopes et al., 2001). Die in Abbildung 5.1A dargestellte Illustration dient zur Orientierung der vorliegenden Forschungsergebnisse.

Um das Cytoskelett von Spezies der Trichomonadidae auf dessen Proteinkomposition zu analysieren, war es erforderlich dieses möglichst vollständig und rein aus dem jeweiligen Organismus zu extrahieren. Protokolle zur Isolation des Cytoskeletts existierten bereits für *Tetratrichomonas gallinarum*, *Trichomonas vaginalis*, *Pentatrichomonas hominis* und *Tritrichomonas foetus* (de Souza und da Cunha-e-Silva, 2003; Rosa et al., 2013; Viscogliosi und Brugerolle, 1994). Die experimentelle Anwendung dieser Protokolle brachte allerdings nicht die gewünschte Reinheit an Cytoskelett-Fractionen hervor, weder für *T. vaginalis* noch für *T. gallinarum*. Die Durchführung eines Cytoskelett-Extraktionsprotokolls für *Giardia lamblia* (Palm et al., 2005) in Kombination mit einem Sucrose-Dichtegradienten (de Souza und da Cunha-e-Silva, 2003) ermöglichte schließlich die Extraktion weitgehend reiner Cytoskelett-Fractionen (Abb. 5.1B, C, D).

Das Cytoskelett von *T. gallinarum* ließ sich im Hinblick auf Ausbeute und Reinheit wesentlich besser isolieren als dasjenige von *T. vaginalis*; wie zuvor auch schon für die Extraktion der Costa beschrieben wurde (Viscogliosi und Brugerolle, 1994). Deutlich wurde dies durch Inspektionen der extrahierten Fractionen mittels Lichtmikroskop und *Multiplex Fluorescence Western Blot* (MFWB) (Abb. 5.1B, C). Im Lichtmikroskop war die Detergenzien-resistente, gabelartige Struktur von Axostyl und Costa präzise zu erkennen (Abb. 5.1B). Dieses Erscheinungsbild deckte sich mit zuvor beschriebenen lichtmikroskopischen Cytoskelett-Aufnahmen (Viscogliosi und Brugerolle, 1994). Die MFWB-Analysen mit Antikörpern gegen Tubulin und gegen das hydrogenosomale Markerprotein *Succinyl-CoA-Synthetase* (SCS) zeigten, dass die Cytoskelett-Fraction (CYT) frei von SCS und somit weitgehend frei von Hydrogenosomen als eine häufige Kontaminationsquelle war (Abb. 5.1C). Als Positivkontrolle fungierte hierbei eine isolierte Hydrogenosomen-Fraction (HYD; Abb. 5.1C). Das silber gefärbte SDS-Gel visualisiert ein umfangreiches Größenspektrum für die Proteine der extrahierten Cytoskelett-Fraction (Abb. 5.1D). Auffällig erschien die stark ausgeprägte Proteinbande bei ~50 kDa, die

wahrscheinlich Tubulin mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 50,1 kDa (TVAG\_467840) repräsentiert. Weiterhin sind im Größenbereich von 100-140 kDa definierte, intensivere Proteinbanden zu erkennen, die in ihrem Muster weitgehend zuvor durchgeführten SDS-PAGE-Analysen entsprechen (Viscogliosi und Brugerolle, 1994). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden zur massenspektrometrischen Proteom-Analyse ausschließlich Cytoskelett-Fractionen aus *T. gallinarum* verwendet.



**Abbildung 5.1: Das Cytoskelett der Trichomonadidae.** (A) Illustration der Cytoskelett-Hauptkomponenten und deren assoziierte Organellen. (B) Lichtmikroskopische-Aufnahmen einer extrahierten Cytoskelett-Fraktion aus *T. gallinarum* im Differential-Interferenz-Kontrast. Maßstabsleiste: 10 µm. (C) Multiplex Fluoreszenz Western Blot der Zellfraktionen Gesamtzelllysate, GZL; Cytoskelett, CYT und Hydrogenosomen, HYD. (D) Silber gefärbtes Polyacrylamid-Gel der Cytoskelett-Fraktion aus Grafik B, C. Die Größenstandards in Grafik C und D erscheinen in Kilodalton, kDa. Modifiziert nach Preisner et al. 2016.

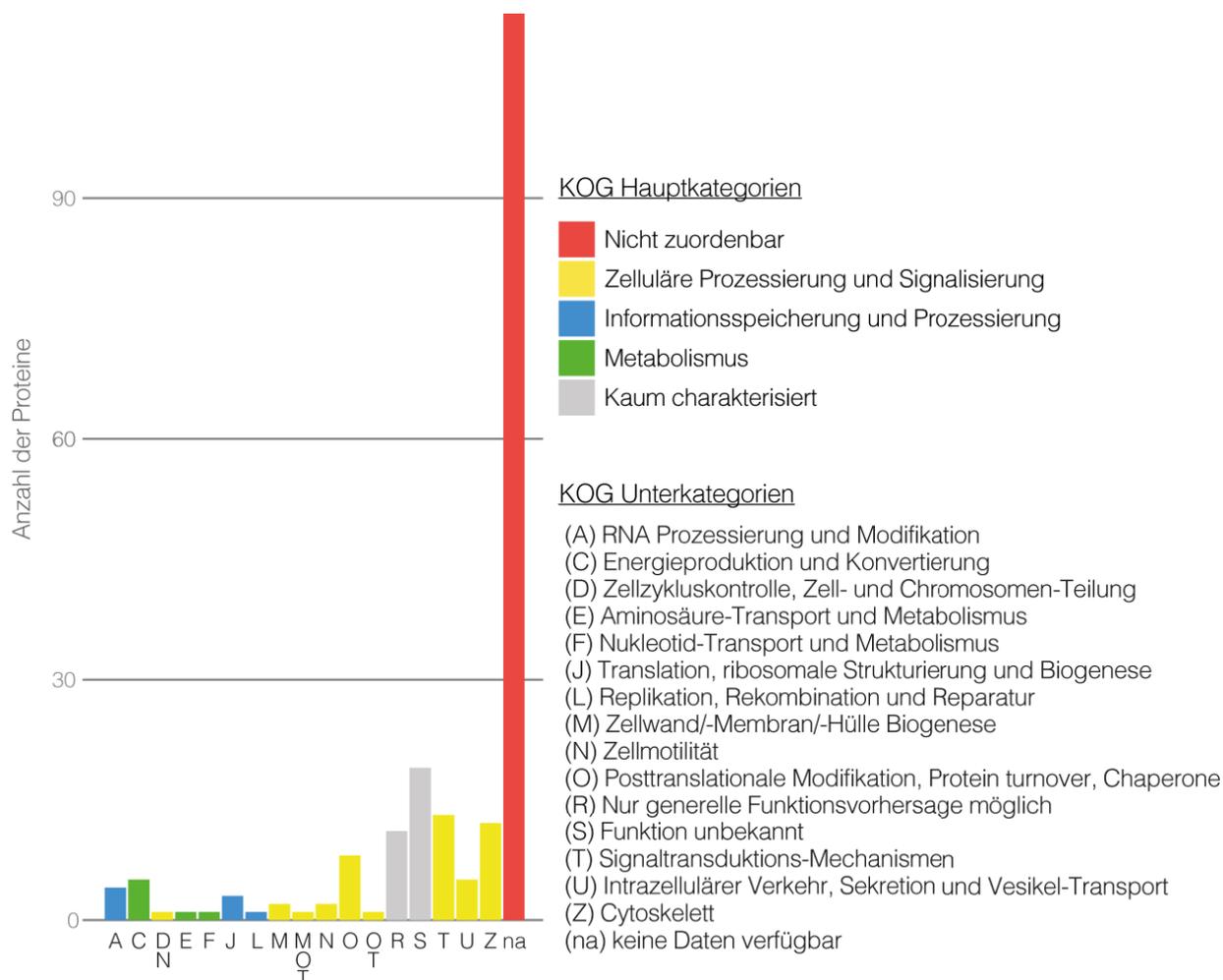
## 5.2 Massenspektrometrische Proteom-Analyse des Cytoskeletts von *T. gallinarum*

Die Proteom-Analyse erfolgte durch das Verfahren der *Flüssigkeitschromatographie gekoppelten Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie* (ESI-MS; Kap. 4.2.2.2) auf Grundlage von drei individuell extrahierten Cytoskelett-Fractionen aus *T. gallinarum* (Kap. 7, Abb. 7.1). Um mit den massenspektrometrisch erfassten Daten homologe Proteine identifizieren zu können, war es notwendig eine Transkriptom-Bibliothek von *T. gallinarum* zu erstellen, zumal von diesem Organismus bisher keine Sequenzdaten zur Verfügung standen (Kap. 4.2.3.1).

Durch die RNA-Sequenzierung des *T. gallinarum*-Stammes M3 konnten insgesamt 20.982.889 Reads generiert werden, welche als Roh-Daten nun über die NCBI SRA Datenbank (accession SRA318841) zugänglich sind. Von den Reads passierten 20.638.776 den Qualitätsfilter. Die anschließende Assemblierung erbrachte 64.756 contigs (mit einer N50-Länge von 694), die nach Isoformen gefiltert und nach offenen Leserastern (*Open Reading Frames*; ORFs) durchsucht wurden. Von insgesamt 37.740 detektierten ORFs, zeigten 26.130 Homologien zu Genen (mit 11.268 einzigartigen Treffern) des sequenzierten Genoms des *T. vaginalis* Stammes G3, welches über die Datenbank TrichDB (v2.0) zur Verfügung stand (Aurrecoechea et al., 2009).

Mittels der translatierten Transkriptom-Assemblierung (zugänglich unter [http://www.molevol.de/resources/008preisner/ORFs\\_TGAL\\_translated\\_into\\_aa.xlsx](http://www.molevol.de/resources/008preisner/ORFs_TGAL_translated_into_aa.xlsx)) konnten im Rahmen der ESI-MS-Analyse, in jeder der drei Cytoskelett-Fraktion, insgesamt 582 Proteine mit einem Minimum von zwei Peptiden per Protein identifiziert werden (accession PXD003212; ProteomXchange.org). Durch reziproke Homologie-Suchen (best BLASTp) über die Software *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST; Altschul et al., 1997) konnten die entsprechenden Protein-Homologe von *T. vaginalis* ermittelt werden. Das Suchergebnis wurde anhand der TrichDB-Annotierungen manuell editiert, um sämtliche Proteine auszuschließen, die offensichtlich nicht mit dem Cytoskelett direkt assoziiert sind, wie beispielsweise ribosomale Proteine. Hierdurch wurden insgesamt 203 Cytoskelett-assoziierte Proteine ermittelt und anschließend anhand der Datenbank *EuKaryotic Orthologous Groups* (KOG; Koonin et al., 2004; Tatusov et al., 2003) funktionell kategorisiert (Abb. 5.2). Von den 203 Proteinen konnten 113 (56%) überhaupt keiner funktionellen Klasse (Abb. 5.2; roter Balken) zugeordnet werden und für weitere 30 Proteine war die Funktion entweder unbekannt oder lediglich mit einer generellen Funktionsvorhersage verknüpft (Abb. 5.2; graue Balken). Die verbleibenden Proteine wurden den drei Hauptkategorien: (i) *Zelluläre Prozessierung und Signalisierung* (47 Proteine, inklusive Aktin und Tubulin), (ii) *Informationsspeicher und*

*Prozessierung* (8 Proteine) und (iii) *Metabolismus* (7 Proteine) zugeordnet. Die detaillierte Zuordnung sämtlicher Proteine zu den KOG-Unterkategorien ist in Tabelle 7.1 (Kap. 7) ersichtlich. Hierbei sei erwähnt, dass drei Proteine aufgrund ihrer Eigenschaften mit mehreren Unterkategorien gleichzeitig verknüpft wurden.



**Abbildung 5.2: Zuordnung der 203 Cytoskelett-assoziierten Proteine in funktionelle Kategorien der *EuKaryotic Orthologous Groups* (KOG) Datenbank.** Für die Mehrheit der Proteine (113) sind in der KOG-Datenbank keine Informationen hinterlegt (na). Zudem ist die Funktion von 19 Proteinen unbekannt (S) und für 11 Proteine kann die Funktion lediglich vorhergesagt werden (R). Drei Proteine wurden aufgrund ihrer Eigenschaften zu mehr als nur einer Unterkategorie zugeordnet, zum Beispiel zu DN, MOT und OT (gelbe Balken). Basierend auf den Daten der Tabelle 7.1. Modifiziert nach Preisner et al. 2016.

Unter den Proteinen, die eindeutig und mit den höchsten Werten an *Peptide Spectrum Matches* (PSM; ein semi-quantitativer Parameter) massenspektrometrisch identifiziert wurden, befand sich Tubulin mit seiner beta- (TEGb007706; homolog zu TVAG\_467840) und seiner epsilon-Kette (TEGb007357; homolog zu TVAG\_008680) mit PSM-Werten von 1.228 und 456 und einer Sequenzübereinstimmung von jeweils 75%. Neben Tubulin, waren es die Proteine TEGb005933 (TVAG\_339450), TEGb003426 (TVAG\_474360),

TEGb019317 (TVAG\_117060), TEGb017573 (TVAG\_030160) und TEGb012599 (TVAG\_059360), die mit PSM-Werten zwischen 111 und 330 und einer Sequenzübereinstimmung zwischen 63% und 76% detektiert wurden (Tab. 5.1).

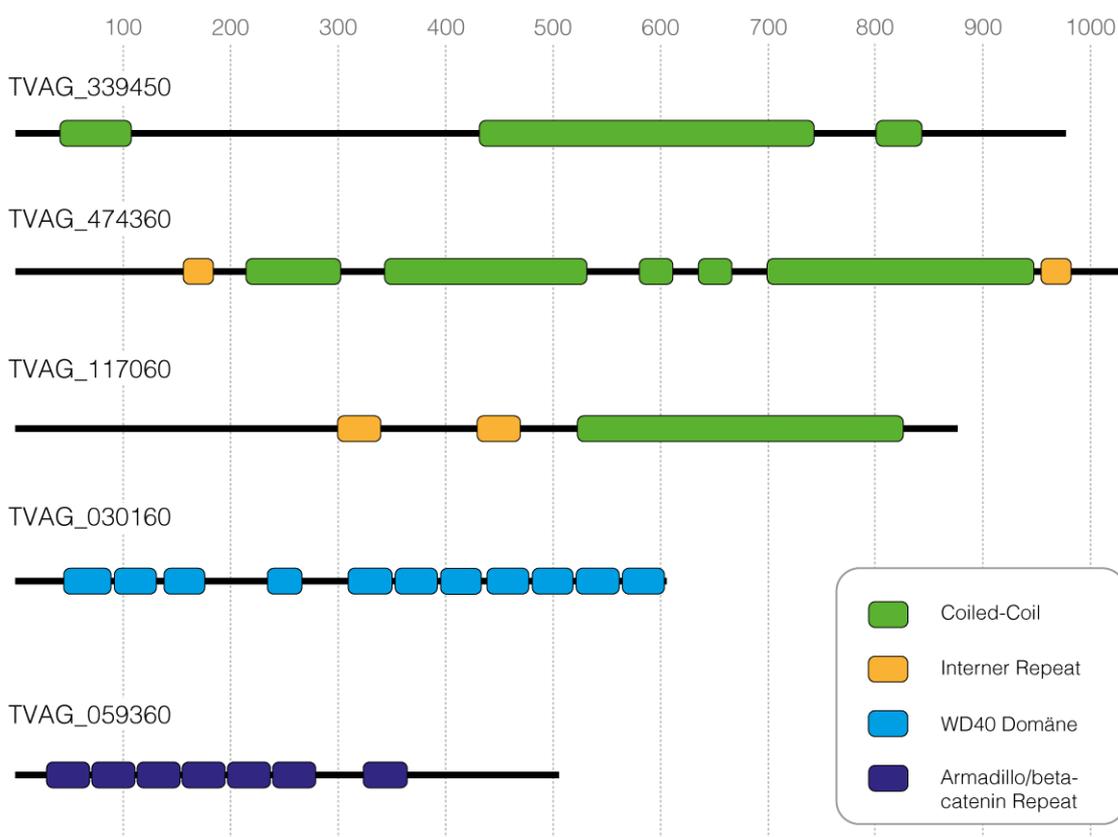
**Tabelle 5.1: Eigenschaften der fünf selektierten und *in vivo* lokalisierten Proteine im Vergleich zu Aktin und Tubulin.** Die fünf aufgeführten Proteine wurden aufgrund ihrer PSM-Werte und ihrem Molekulargewicht für Immunfluoreszenz-basierte Lokalisationsstudien ausgewählt. Die beta-Kette von Tubulin (TVAG\_467840) und Aktin (TVAG\_172680) wurden ebenfalls massenspektrometrisch erfasst und sind als Referenzen gelistet. Die Datenbank-assoziierten Werte wurden von TrichDB v2.0 (Aurrecochea et al., 2009) übernommen. Basierend auf Transkriptom-Daten von *T. vaginalis* sind zusätzlich die absoluten Expressionswerte der Proteine aufgeführt (Gould et al., 2013). Sequenzidentität, coverage %; unique peptides, UP; peptide spectrum matches, PSM; Aminosäuren, AA; Molekulargewicht, MW; Isoelektrischer Punkt, IEP. Modifiziert nach Preisner et al. 2016.

Zugangsnummern		Annotierte Funktion	Transkriptom Daten von <i>T. vaginalis</i>	Massenspektrometrie Daten von <i>T. gallinarum</i>			TrichDB annotierte Daten		
<i>T. gallinarum</i>	<i>T. vaginalis</i>		Expression (absolut)	Coverage %	UP	PSM	AA	MW (kDa)	IEP
TEGb005933	TVAG_339450	Unknown	665	65	67	256	977	113,5	4,9
TEGb003426	TVAG_474360	Unknown	2.267	65	66	244	1.042	119,1	4,8
TEGb019317	TVAG_117060	Unknown	502	70	64	330	878	100,5	4,9
TEGb017573	TVAG_030160	WD repeat protein	682	76	33	163	605	65,7	6,9
TEGb012599	TVAG_059360	Sperm associated antigen 6	941	63	30	111	505	55,0	7,1
TEGb007706	TVAG_467840	Tubulin beta chain, putative	29.130	75	27	1.228	452	50,1	4,7
TEGb007619	TVAG_172680	Actin	18.485	8	9	24	386	43,0	5,3

Um Homologe dieser Proteine auch außerhalb der Trichomonadida zu finden, wurde eine erweiterte BLAST-Suche gegen die *Reference Sequence*-Datenbank (RefSeq database, NCBI) durchgeführt. Für TVAG\_339450, TVAG\_474360 und TjVAG\_117060 konnten hierbei keine signifikanten Homologe (e-value cutoff von  $\leq 1e^{-10}$ ) determiniert werden. Für TVAG\_030160 fanden sich WD40-Domäne codierende Homologe in einer Vielzahl von Organismen (mit e-values  $\leq 1e^{-138}$ ). Unter diesen waren uncharakterisierte Proteine diverser Protisten wie beispielsweise des Ciliaten *Tetrahymena thermophila* (TTHERM\_01094880; e-value  $8e^{-141}$ ), des Trypanosomatiden *Angomonas deanei* (EPY27992.1; e-value  $2e^{-134}$ ) und der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (XP\_001690930; e-value  $2e^{-137}$ ). Die Mehrheit dieser Proteine sind als “flagellar associated protein“ annotiert. Gleichermäßen konnten für TVAG\_059360 BLAST-Treffer mit Proteinen diverser Organismen gefunden werden (mit e-values  $\leq 1e^{-150}$ ), die häufig als “Sperm-associated antigen 6 (Spag6)“ verschiedener Säugetiere oder auch als „axonem central apparatus protein“, wie im Fall von *Trypanosoma vivax* Y486

(CCC46476.1; e-value  $1e^{-150}$ ) und einigen *Leishmania*-Arten (e-value  $2e^{-151}$ ) annotiert waren. Auffälligerweise enthalten alle fünf Proteine eine Vielzahl repetitiver Motive, wie sich durch die Software *Simple Modular Architecture Research Tool* (SMART; Letunic et al., 2015) ermitteln ließ (Abb. 5.3). Zudem konnten für TVAG\_339450, TVAG\_474360 und TVAG\_117060 mittels COILS (Lupas et al., 1999) weitreichende, rechts gewundene Coiled-Coil Segmente vorhergesagt werden (Abb. 7.2).

Weiterhin wurden die fünf Proteine auf potentielle Consensus-Motive, wie beispielsweise das VPV-Motiv der Articuline (Marrs und Brouck 1993) oder jene der Alveoline (Gould et al. 2011), hin untersucht (Kap. 3.2). Ein vergleichbar ähnlich eindeutiges Sequenz-Motiv konnte für keinen der fünf Proteine determiniert werden. Allerdings visualisiert die vorhergesagte Aminosäuresequenz von TVAG\_339450, TVAG\_474360, TVAG\_117060 und TVAG\_059360 analog zu den Pellicula-assoziierten Proteinen von *T. thermophila* eine Häufigkeitsverteilung von Glutaminsäure  $\geq 6\%$ , Lysin  $\geq 6\%$ , Glutamin  $\geq 3\%$ , und die Summe von Isoleucin, Leucin, und Valin  $\geq 10\%$  (Gould et al., 2011).



**Abbildung 5.3: Verteilung konservierter Domänen innerhalb der fünf selektierten und *in vivo* lokalisierten Proteine von *T. vaginalis*.** Die farblich gekennzeichneten Protein-Domänen basieren auf der Strukturvorhersage des SMART-Algorithmus (Letunic et al., 2015). Anhand des Rasters mit 100-1000 Aminosäuren, oberhalb der Illustration, ist die Position der Domänen entlang der Proteinsequenzen ersichtlich. Modifiziert nach Preisner et al. 2016.

### 5.3 Cytoskelett-assoziierte Proteine zeigen eine erhöhte Anzahl langer Coiled-Coil Segmente und anderer repetitiver Motive

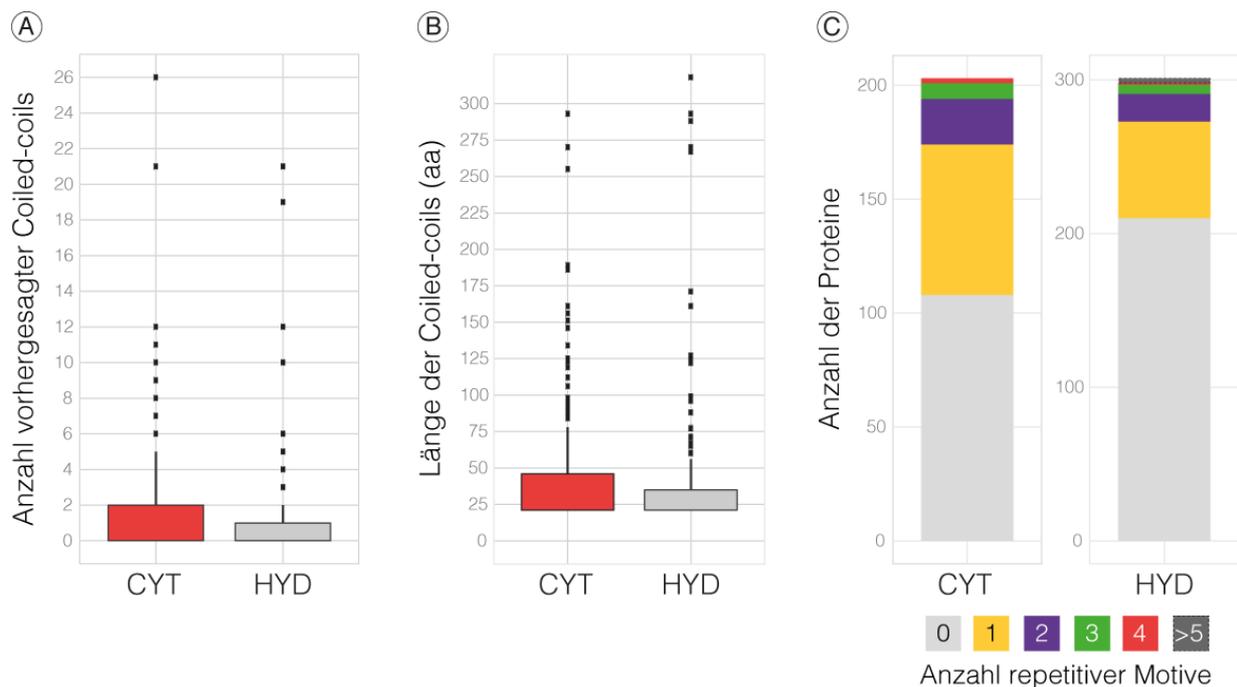
Lange und dominante Coiled-Coil Proteinsequenzen sind ein charakteristisches Merkmal der meisten IF Proteine metazoischer Organismen (Herrmann et al., 2007; Rose et al., 2005). Darüberhinaus zeigen Cytoskelett-assoziierte Proteine von Spezies der Excavata und der Ciliata generell ein erhöhtes Vorkommen repetitiver und geladener Sequenzmotive (Elmendorf et al., 2003; Gould et al., 2011; Kloetzel et al., 2003).

Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Forschungsarbeit getestet, ob auch die Proteine des aus *T. gallinarum* extrahierten Cytoskeletts derartige Sequenzmerkmale besitzen. Hierzu wurden die 203 Cytoskelett-assoziierten Proteine (Kap. 5.2) mit zwei Kontroll-Protein-Datensätzen verglichen. Das erste Set umfasste 301 Hydrogenosomen-assoziierte Proteine (Garg et al., 2015) und das zweite ein Set gleicher Größe von 203 zufällig selektierten Proteinen aus dem Genom von *T. vaginalis*. Verglichen und auf die statistische Signifikanz geprüft, wurden hierfür die drei Parameter (i) Anzahl der Coiled-Coils, (ii) Länge der Coiled-Coils und (iii) Anzahl der repetitiven Motive innerhalb jedes Proteins (Abb. 5.4, 5.5; Tab. 7.2, 7.3, 7.4)

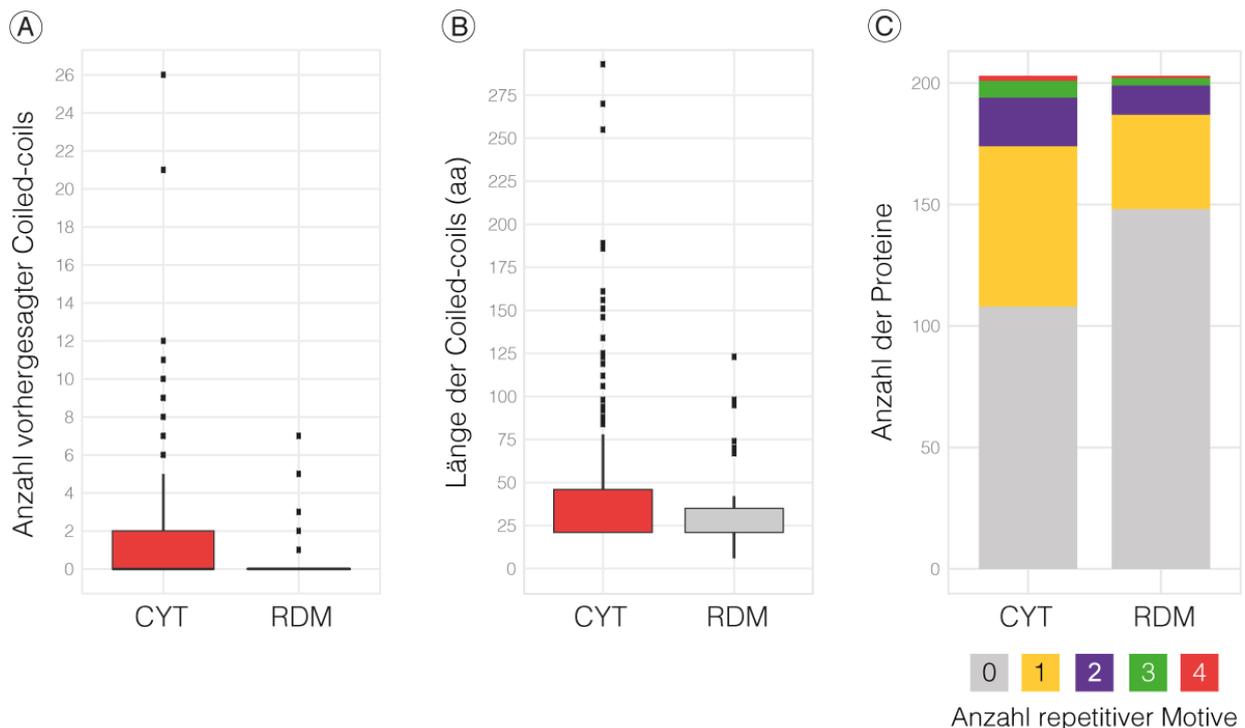
In Abbildung 5.4A ist die Verteilung der Anzahl an vorhergesagten Coiled-Coils pro Protein für das Cytoskelett- (CYT) und das hydrogenosomale Set (HYD) visualisiert. Beide Verteilungen erwiesen sich als statistisch unterschiedlich (*Mann-Whitney test* (MWt), p-value  $< 2,1e^{-6}$ ) und verdeutlichen, dass Coiled-Coils im CYT-Set signifikant häufiger auftraten als im HYD-Set. Dies bestätigte sich auch im Vergleich mit dem zweiten, randomisierten Kontrollset (RDM; Abb. 5.5A), welcher ebenfalls signifikant unterschiedlich ausfiel (MWt, p-value  $< 3e^{-12}$ ). Auch die Länge der Coiled-Coil Segmente innerhalb des CYT-Sets war signifikant erhöht im Vergleich zu denen des HYD-Sets (MWt, p-value  $< 1,9e^{-5}$ ; Abb. 5.4B) und des RDM-Sets (MWt, p-value  $< 0,022$ ; Abb. 5.5B). Darüberhinaus, zeigten Cytoskelett-assoziierte Proteine signifikant mehr repetitive Motive pro Protein im Vergleich mit dem HYD-Set (MWt, p-value  $< 0,0003$ ; Abb. 5.4C) und dem RDM-Datenset (MWt, p-value  $< 4,8e^{-5}$ ; Abb. 5.5C). Allerdings wurden im HYD-Set vereinzelt auch Proteine mit mehr als fünf repetitiven Motiven identifiziert, was in den CYT- und RDM-Datensätzen nicht der Fall war.

Um zu überprüfen, ob lange Proteinsequenzen tendenziell mehr Coiled-Coils und repetitive Motive besitzen als kürzere, wurde eine weitere Analyse durchgeführt, bei der die beiden Kontrollsets (HYD und RDM) nach Proteinen ähnlicher Größe wie die des CYT-Sets gefiltert wurden. Hierbei zeigte der Vergleich zwischen dem CYT- und dem HYD-Set erneut

die gleiche Tendenz mit entsprechender Signifikanz (Anzahl der Coiled-Coils: MWt, p-value  $< 4,8e^{-6}$ ; Länge der Coiled-Coils: MWt, p-value  $< 1,3e^{-9}$ ; Anzahl der repetitiven Motive: MWt, p-value  $< 0,0001$ ). Die Re-Analyse zwischen dem CYT- und dem RDM-Set bestätigte ebenfalls die Ergebnisse der ursprünglichen Untersuchung, ausgenommen für die Anzahl repetitiver Motive, welche diesmal nicht signifikant unterschiedlich war (Anzahl der Coiled-Coils: MWt, p-value  $< 1,8e^{-10}$ ; Länge der Coiled-Coils: MWt, p-value  $< 0,0004$ ; Anzahl der repetitiven Motive: MWt, p-value  $< 0,73$ ).



**Abbildung 5.4: Coiled-Coils und andere repetitive Motive kommen im Proteom des Cytoskeletts vermehrt vor.** (A) Der Box-Plot zeigt die Anzahl an vorhergesagten Coiled-Coils innerhalb der 203 extrahierten Cytoskelett-Proteine (CYT) im Vergleich zu 301 Hydrogenosomen-assoziierten Proteinen (HYD; Garg et al., 2015) als Kontrolle. (B) Der Box-Plot visualisiert die Länge der Coiled-Coils in Aminosäuren (aa) basierend auf den selben Datensätzen. (C) Das Säulendiagramm veranschaulicht die Anzahl an repetitiven Motiven pro Protein für beide Datensätze. Ein Motiv besteht aus mindestens drei repetitiven Segmenten mit jeweils einer Mindestlänge von 10 Aminosäuren. Die Anzahl an Proteinen mit 1, 2, 3 oder 4 repetitiven Motiven ist signifikant höher im CYT-Datensatz als im HYD-Datensatz. Um diese Tendenz zu verifizieren wurden die CYT-Proteine zusätzlich noch mit einem Datensatz von 203 zufällig selektierten Proteinen (RDM) von *T. vaginalis* verglichen (Abb. 5.5). Im Gegensatz zum CYT- und RDM-Datensatz konnten im HYD-Set auch Proteine mit mehr als 5 repetitiven Motiven identifiziert werden. Basierend auf den Daten der Tabellen 7.2, 7.3 und 7.4. Modifiziert nach Preisner et al. 2016.



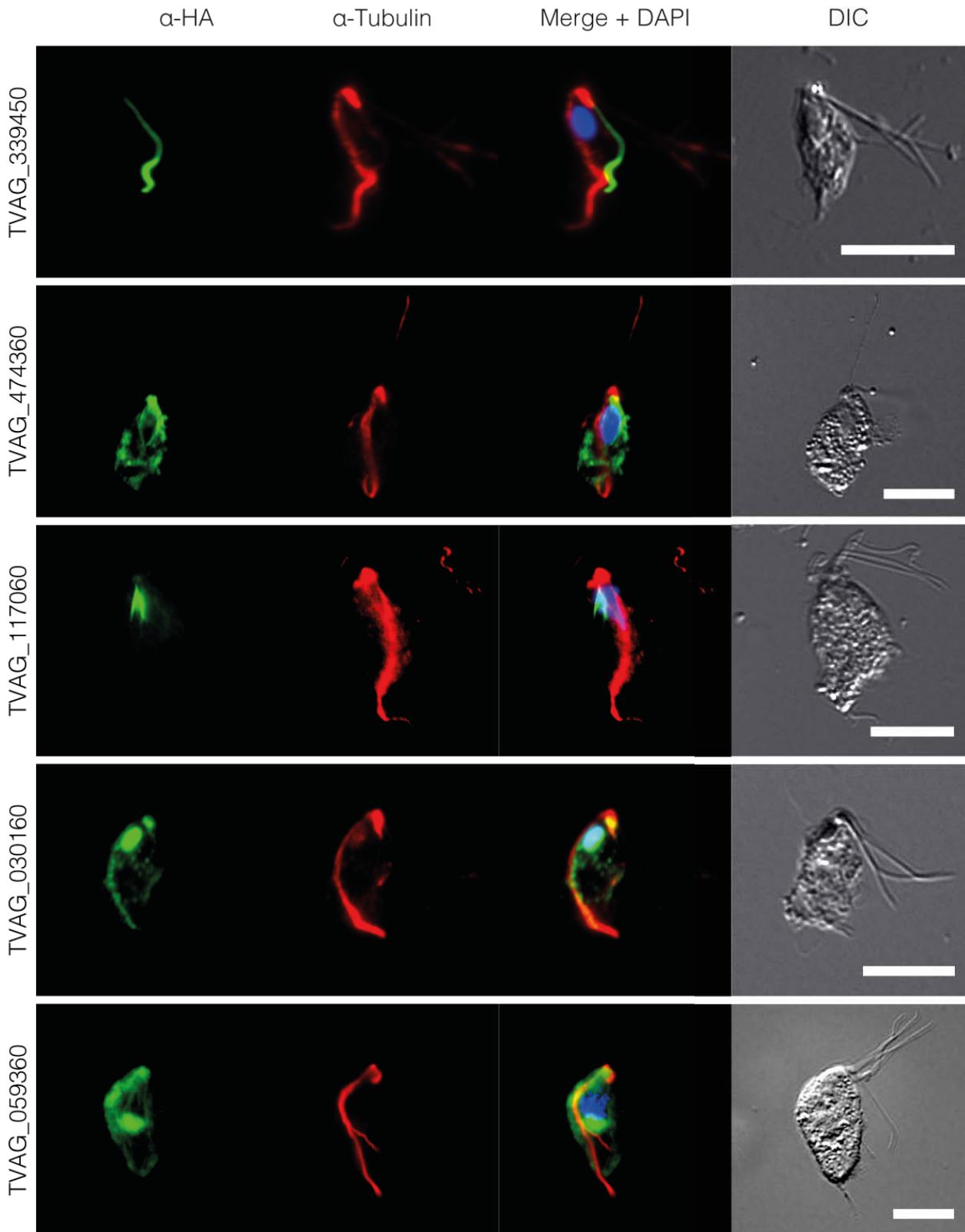
**Abbildung 5.5: Coiled-Coils und andere repetitive Motive sind im Cytoskelett-Proteom vermehrt vertreten.** (A) Der Box-Plot zeigt die Anzahl an vorhergesagten Coiled-Coils innerhalb der 203 extrahierten Cytoskelett-Proteine (CYT) im Vergleich mit 203 zufällig selektierten Proteinen (RDM) als Kontrolle. (B) Der Box-Plot visualisiert die Länge der Coiled-Coils in Aminosäuren (aa) auf Basis der selben Datensätze. (C) Das Säulendiagramm veranschaulicht die Anzahl an repetitiven Motiven pro Protein für beide Datensätze. Ein Motiv besteht aus mindestens drei repetitiven Segmenten mit jeweils einer Mindestlänge von 10 Aminosäuren. Die Anzahl an Proteinen mit 1, 2, 3 oder 4 repetitiven Motiven ist signifikant höher im CYT-Datensatz als im RDM-Datensatz. Basierend auf den Daten der Tabellen 7.2, 7.3 und 7.4. Modifiziert nach Preisner et al. 2016.

#### 5.4 Homologe Proteine von *T. vaginalis* lokalisieren in filamentösen Strukturen

Um zu überprüfen, ob die per ESI-MS identifizierten Proteine tatsächlich mit dem Cytoskelett assoziiert sind wurden Lokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt. Hierzu wurden fünf Proteine, die mit den höchsten PSM-Werten erfasst wurden (Tab. 5.1), als GFP- beziehungsweise HA-Fusionsproteine sowohl homolog in *T. vaginalis* (Abb. 5.6; Kap. 7, Abb. 7.3) als auch heterolog in *T. gallinarum* (Abb. 5.8) exprimiert.

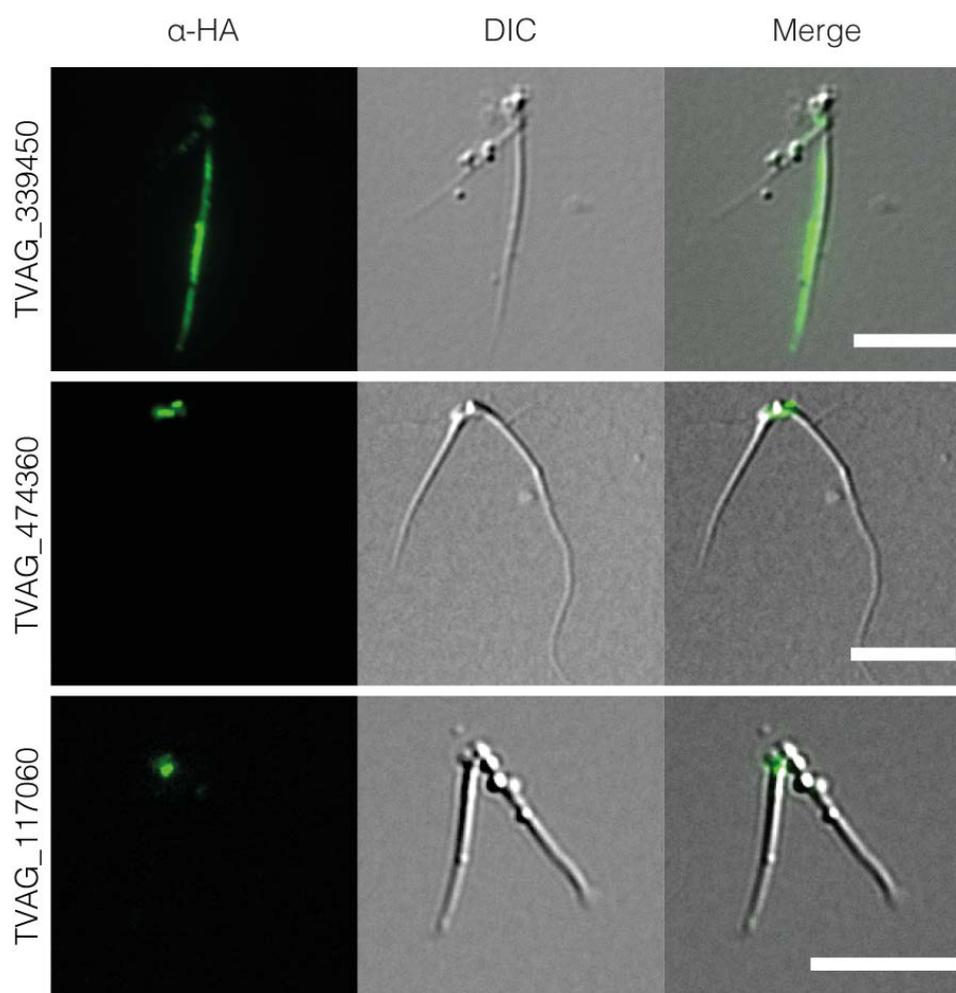
Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen in Abbildung 5.6 visualisieren die Lokalisation des ersten Proteins, TVAG\_339450, in einem einzelnen länglichen Filament, das sich an der Zellperipherie befindet. Hierbei zeigte das Protein keine Kolo-kalisation mit Tubulin, wodurch sich das durch TVAG\_339450 dekorierte Filament deutlich vom Axostyl und der mit der undulierenden Membran verknüpften Schleppgeißel unterscheiden und abgrenzen lässt. Neben der Lokalisation *in vivo* konnte das Protein auch in extrahierten Cytoskelett-Fractionen als Bestandteil eines langen Filaments (mutmaßlich die Costa) nachgewiesen werden (Abb. 5.7). Der zweite Kandidat, TVAG\_474360 zeigte ein deutlich komplexeres

Lokalisationsmuster. Dieses akkumulierte im apikalen Bereich des Nukleus, kolokalisierte mit Tubulin in der Region der Pelta und im distalen Teil des Axostyls und dekorierte filigrane, filamentöse Strukturen um den Nukleus herum (Abb. 5.6). Die Assoziation mit der Pelta konnte auch in extrahierten Cytoskelett-Fractionen dokumentiert werden (Abb. 5.7). Zudem zeigte dieses Protein vereinzelt Ansammlungen im Cytosol, was gegebenenfalls auf dessen Überexpression zurückzuführen sein könnte. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass TVAG\_474360 basierend auf Transkriptom-Analysen von allen fünf selektierten Kandidaten die höchste native Expression besaß (Tab. 5.1). Das dritte Protein, TVAG\_117060, dekorierte *in vivo* eine gabelartige Struktur unterhalb der Pelta, nahe des Nukleus womit es sich um die Parabasalen Filamente handeln könnte (Abb. 5.6). In extrahierten Cytoskelett-Fractionen konnte für das Protein lediglich eine Assoziation mit der Pelta nachgewiesen werden (Abb. 5.7). Das vierte Protein, TVAG\_030160, kolokalisierte weitgehend mit dem Axostyl, von der anterior gelegenen Pelta bis in den posterioren Bereich, jedoch nicht mit dessen terminalen Ende, welches aus der Zelle herausragt. Ferner dekorierte es den Bereich des Nukleus flächendeckend (Abb. 5.6). Auffälligerweise, wurde dieses Protein in Western Blot-Analysen, in zwei unterschiedlichen Größen detektiert (Kap. 7, Abb. 7.5). Einerseits mit einem schwachen Signal bei ~66 kDa (in etwaiger Übereinstimmung mit der vorhergesagten Größe von 55,7 kDa, basierend auf den TrichDB annotierten ORFs) und andererseits mit einem dominanten Signal bei ~110 kDa, was auf eine Dimerisierungsfähigkeit des Proteins hinweisen könnte. Das fünfte Protein, TVAG\_059360, zeigte keine eindeutige Kolokalisation mit dem Axostyl, obwohl in manchen Zellen eine leichte Überlagerung mit Tubulin im anterioren Bereich zu erkennen war. Deutlicher lokalisierte es zu filigranen Filamenten um rum des Nukleus, als auch geflechtartig in weite Bereiche innerhalb der Zelle (Abb. 5.6, Abb. 7.3).



**Abbildung 5.6: Immunfluoreszenz-Mikroskopie-Aufnahmen zur Lokalisation der fünf selektierten Kandidatenproteine in *T. vaginalis*.** Die Proteine die mit dem Präfix TVAG\_ in der Grafik gekennzeichnet sind, wurden als Hämaggglutinin-Fusionsproteine (anti-HA, grünes Signal) homolog in *T. vaginalis* exprimiert und *in vivo* lokalisiert. Tubulin (anti-Tubulin, rotes Signal) fungierte als Marker für das Axostyl. DAPI (blaues Signal) visualisiert den Zellkern im Rahmen der Überlagerung (Merge) des grünen und roten Signals. Die Aufnahme im Differential-Interferenz-Kontrast (DIC) veranschaulicht die gesamte Zellmorphologie. Maßstableiste: 10 µm. Modifiziert nach Preisner et al. 2016.

Ergänzend zu den *in vivo* Lokalisationsstudien konnten die Coiled-Coil Proteine TVAG\_339450, TVAG\_474360 und TVAG\_117060 auch in extrahierten Cytoskelett-Fractionen von *T. vaginalis* nachgewiesen werden (Abb. 5.7). Wie oben detaillierter erwähnt, unterschied sich das Lokalisationsmuster von TVAG\_474360 und TVAG\_117060 zu demjenigen *in vivo* (Abb. 5.6, 5.7). Eine Kolokalisation mit Tubulin konnte für keinen der drei Coiled-Coil Kandidaten beobachtet werden.



**Abbildung 5.7: Immunfluoreszenz-Mikroskopie-Aufnahmen zur Lokalisation der drei Coiled-Coil Proteine TVAG\_339450, TVAG\_474360 und TVAG\_117060 in extrahierten Cytoskelett-Fractionen von *T. vaginalis*.** Die drei Proteine die mit dem Präfix TVAG\_ in der Abbildung dargestellt sind, wurden als Hämagglutinin-Fusionsproteine (anti-HA, grünes Signal) homolog in *T. vaginalis* exprimiert und in extrahierten Cytoskelett-Fractionen lokalisiert. Die Aufnahme im Differential-Interferenz-Kontrast (DIC) zeigt das extrahierte Cytoskelett-Gerüst. Die Überlagerung (Merge) der anti-HA und DIC-Aufnahme visualisiert die Lokalisation der Proteine. Maßstabsleiste: 10  $\mu\text{m}$ . Modifiziert nach Preisner et al. 2016.

Um festzustellen, ob sich das Lokalisationsmuster der Cytoskelett-assoziierten Proteine von *T. vaginalis* (Abb. 5.6) auch in *T. gallinarum* bestätigt, wurden bis auf TVAG\_339450 sämtliche HA-Fusionskonstrukte heterolog in *T. gallinarum* exprimiert. Interessanterweise konnten hier einige Unterschiede festgestellt werden. Bereits bei der Zell-Fixierung zeigte sich, dass die Anwendung des Protokolls für *T. vaginalis*-Zellen bei *T. gallinarum* stark deformierte und lysierte Zellen hervorbrachte. Nachdem die Konzentration von Triton<sup>TM</sup> X-100 reduziert wurde (Kap. 4.2.2.10), konnte die natürliche Zellmorphologie von *T. gallinarum* wesentlich besser fixiert werden. Dies deutet auf eine unterschiedliche Zellmembran-Zusammensetzung beider Spezies hin.

Die Lokalisation von TVAG\_339450 in *T. gallinarum* unterschied sich zu der von *T. vaginalis* (Abb. 5.6, 5.8). An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Etablierung einer lebensfähigen *T. gallinarum*-Kultur, die TVAG\_339450 in HA-markierter Form exprimierte, auch nach mehreren Transfektions- und Kultivierungsversuchen erfolglos blieb. Alternativ gelang es *T. gallinarum* mit einer GFP-markierten Variante von TVAG\_339450, über die Transfektion mit pTv\_GFP (Kap. 4.1.7), zu kultivieren. Dieses Protein dekorierte im Gegensatz zu *T. vaginalis* zwei filamentöse Strukturen, wobei die eine circa doppelt so lang erschien als die andere (Abb. 5.8; Kap. 7, Abb. 7.4). Hierbei könnte es sich erneut um die Costa und ein Parabasales Filament handeln, zumal auch hier die Signale keine Kolokalisation mit dem Axostyl zeigten. Um dieses Ergebnis mit dem von *T. vaginalis* präziser vergleichen zu können, wurde ebenfalls eine TVAG\_339450::GFP exprimierende Kultur des Humanpathogens etabliert. In *T. vaginalis* resultierte die Lokalisation wiederum in einer einzigen filamentösen Struktur und bestätigte damit das Ergebnis des HA-markierten Proteins (Abb. 7.4). Demzufolge scheint in *T. gallinarum* TVAG\_339450 Bestandteil von mehr als nur einem Filament zu sein, was auf eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung der Filamente beider Spezies hindeutet.

Das Coiled-Coil Protein TVAG\_474360 lokalisierte auffälligerweise in einer stabartig, steif erscheinenden Struktur, die sich zentral von anterior nach posterior über die gesamte Zelle erstreckte und darüber hinausragte (Abb. 5.8). Die Lokalisation unterschied sich eindeutig zu der von *T. vaginalis* (Abb. 5.6) und eine Kolokalisation mit dem Axostyl konnte nicht detektiert werden. In manchen Zellen dekorierte das Protein neben der stabartigen Struktur auch ein längeres und filigranes Filament, welches anterior im Bereich der Pelta entsprang (Abb. 5.8), wobei sich eine Kolokalisation mit Tubulin jedoch nicht detektieren ließ. Um die Struktur des steif erscheinenden Gebildes detaillierter und hochauflösender

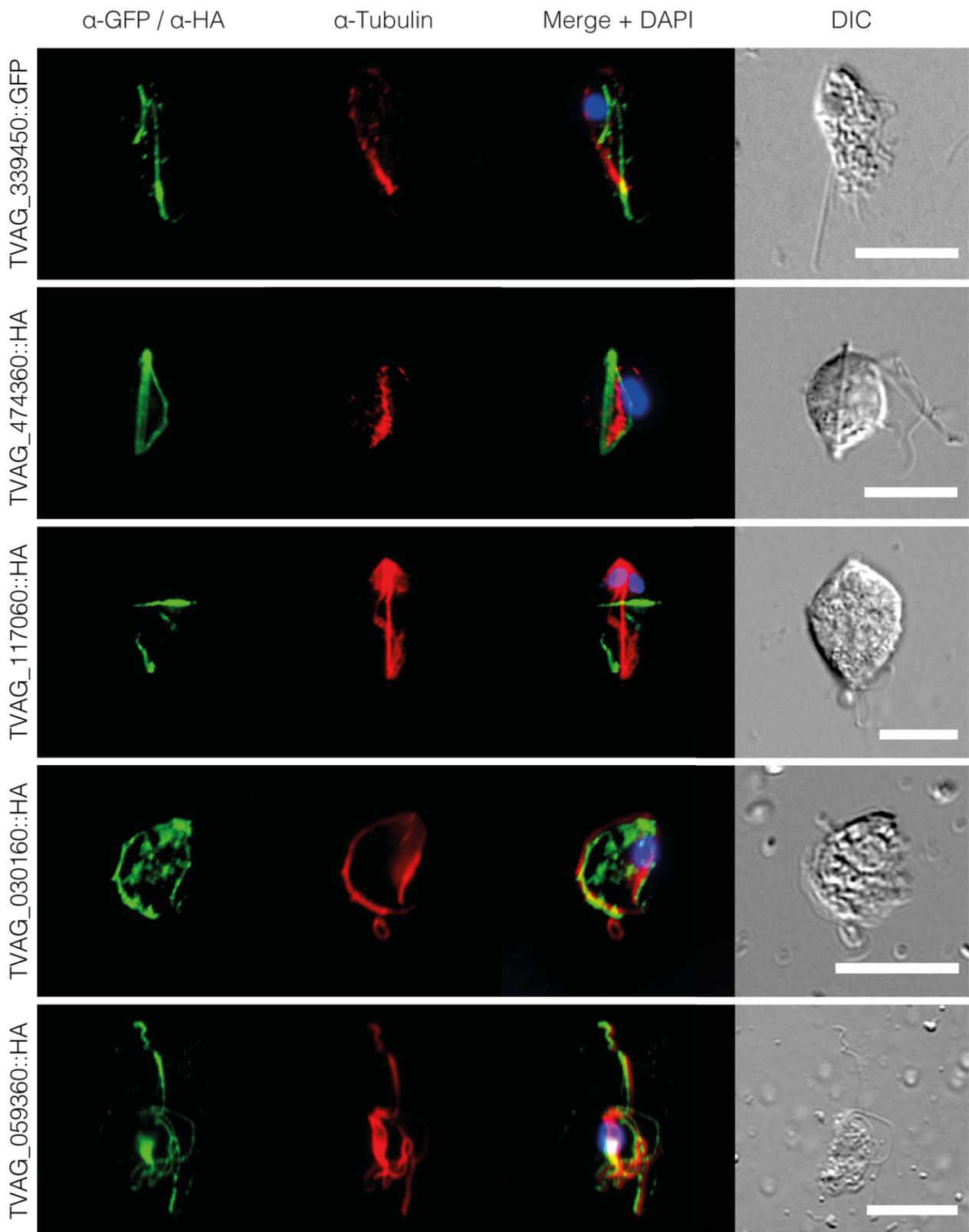
analysieren zu können, wurde die Zellkultur unter dem Transmissionselektronen-Mikroskop (TEM) observiert wie in Kapitel 5.5 beschrieben ist.

Das Protein TVAG\_117060 lokalisierte in zwei Filamenten, die eine ähnliche Länge zeigten wie die in *T. vaginalis* und ebenfalls nicht mit dem Axostyl kolokalisierten. Anhand der in Abbildung 5.8 dargestellten mitotischen Zelle lässt sich erkennen, dass diese Filamente formiert werden, bevor die binäre Längsteilung vollzogen wurde. Ferner war das Protein in manchen Zellen zusätzlich punktuell mit den anterioren Flagellen assoziiert.

Analog zu *T. vaginalis* lokalisierte TVAG\_030160 in *T. gallinarum* dorsal weitgehend mit dem Axostyl. Eine eindeutige Kolokalisation mit der Pelta und dem Nukleus konnte jedoch nicht dokumentiert werden. Neben einer schwachen Kolokalisation mit einem Tubulin-haltigen Filament, vermutlich einer Flagelle im ventralen Bereich, akkumulierte das Protein weitläufig im Cytosol (Abb. 5.8).

Der fünfte Kandidat, TVAG\_059360 zeigte die umfangreichste Kolokalisation mit Tubulin und dekorierte neben den Flagellen auch das Axostyl annähernd komplett. Lediglich in den Bereichen des Nukleus und der Pelta wurde das Protein nicht detektiert (Abb. 5.8). Die partielle Kolokalisation mit dem Axostyl konnte auch in *T. vaginalis* beobachtet werden.

Ungeachtet dessen, dass sich das Lokalisationsmuster für die Mehrzahl der fünf Kandidatenproteine in *T. vaginalis* und *T. gallinarum* unterschied, waren die Proteine in beiden Organismen stets mit filamentösen Strukturen des Cytoskeletts assoziiert, was die experimentelle Durchführung der Proteom-Analyse soweit als erfolgreich validiert.



**Abbildung 5.8: Immunfluoreszenz-Mikroskopie-Aufnahmen zur Lokalisation der fünf selektierten Kandidatenproteine in *T. gallinarum*.** Die Proteine die mit dem Präfix TVAG\_ in der Abbildung gekennzeichnet sind, wurden als GFP- oder HA-Fusions-Proteine (anti-GFP/anti-HA, grünes Signal) heterolog in *T. gallinarum* exprimiert und *in vivo* lokalisiert. Tubulin (anti-Tubulin, rotes Signal) diente als Marker für das Axostyl. DAPI (blaues Signal) zeigt den Zellkern im Rahmen der Überlagerung (Merge) des grünen und roten Signals. In der Aufnahme mit Differential-Interferenz-Kontrast (DIC) ist die gesamte Zellmorphologie dargestellt. Maßstableiste: 10  $\mu$ m. Modifiziert nach Preisner et al. 2016.

## 5.5 Die heterologe Expression von TVAG\_474360 in *T. gallinarum* induziert die Formation zusätzlicher gestreifter Filamente zu einer langen, stabartigen Struktur

*T. gallinarum*-Zellen, die mit pTv\_474360::HA transfiziert wurden, formten ein auffällig steifes und stabartiges Gebilde, welches zentral die gesamte Zelle durchzieht und über diese anterior und posterior hinausragt.

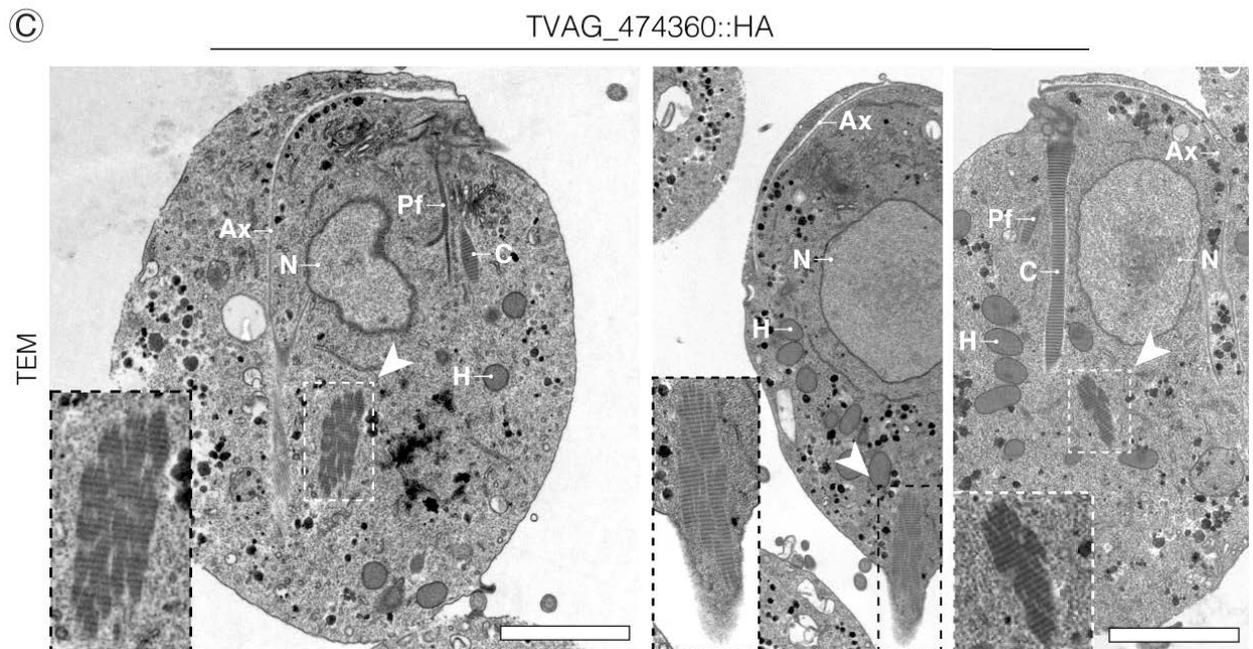
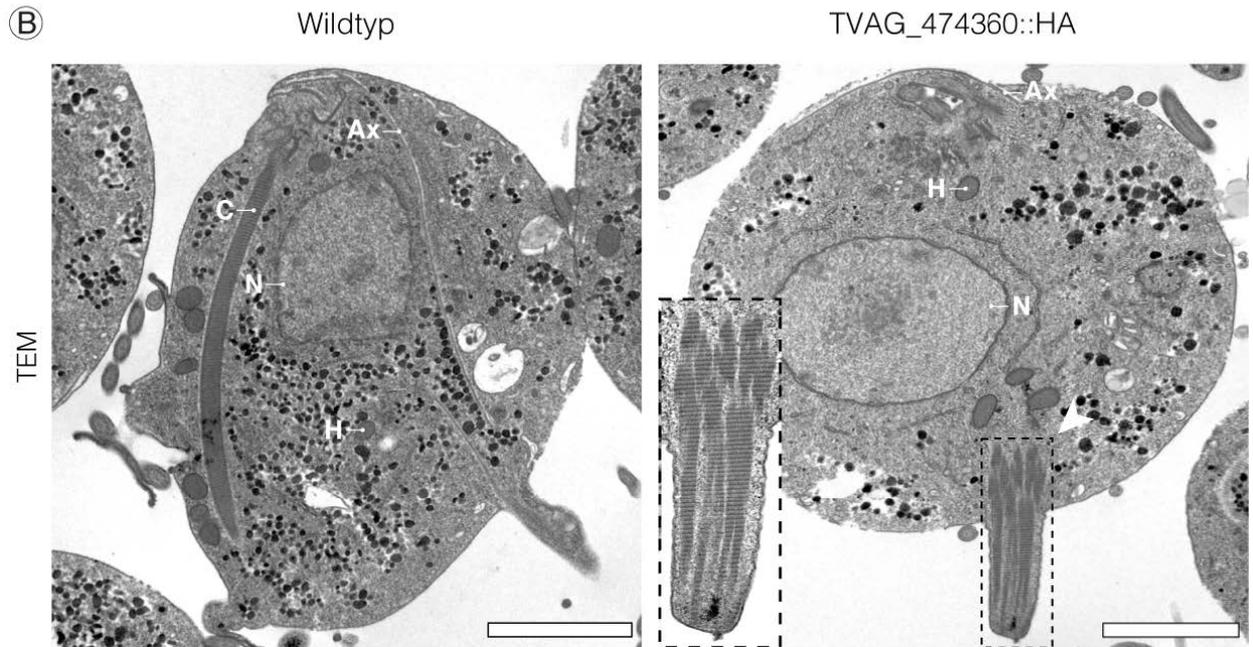
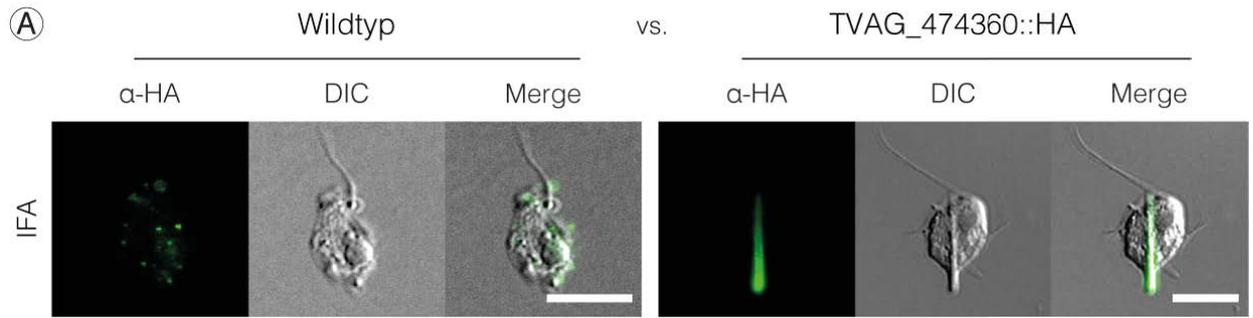
Immunfluoreszenz-Mikroskopie-Analysen zeigten weiterhin, dass diese Struktur hauptsächlich aus dem Protein TVAG\_474360 besteht und nicht mit dem Tubulin-haltigen Axostyl kolokalisierte (Abb. 5.8, 5.9A). Weder in wildtypischen noch in transfizierten *T. gallinarum*-Zellen, die andere HA-markierte Cytoskelett-Proteine exprimierten, war eine derartig auffällige Struktur zu erkennen. Dies gilt auch für die analysierten *T. vaginalis*-Zellkulturen und bestätigt den außergewöhnlichen Phänotyp von TVAG\_474360::HA ausschließlich in *T. gallinarum*, wie im Vergleich der Immunfluoreszenz-Mikroskopie-Aufnahmen der Abbildungen 5.6, 5.8 und 5.9A ersichtlich ist. Die in Abbildung 5.9A dargestellte wildtypische Zelle dient als Kontrolle und visualisiert die Behandlung mit dem selben HA-Antikörper als eine unspezifische, punktförmige und cytosolische Detektion.

Transmissionselektronen-Mikroskopie-Aufnahmen (TEM) der transfizierten und mutierten Zellen im Longitudinalschnitt veranschaulichen, dass sich die stabartige Struktur aus einer Akkumulation parallel angeordneter, gestreifter Filamente zusammensetzte, wie in Abbildung 5.9B und C anhand der gestrichelten Vergrößerungen zu sehen ist. Die einzelnen, längsgeschnittenen Filament-Einheiten ähneln in ihrem Bandenmuster dem der Costa und denen der Parabasalen Filamente (Pf). Eine Kolokalisation mit diesen Cytoskelett-Komponenten wurde allerdings nicht beobachtet (Abb. 5.9C). Unbeeinflusst von der Expression des Proteins TVAG\_474360::HA erschienen die Costa und die Pf in ihrer nativen Form in mutierten Zellen weiterhin vorhanden zu sein (Abb. 5.9C).

Während in Präparaten des Mutanten die multiplen Filamentbündel in etwa 50% der analysierten Zellen zu sehen waren, konnten im Wildtyp derartige Akkumulationen in keiner Zelle determiniert werden (Abb. 5.9B; Kap. 7, Abb. 7.6). Abbildung 5.9B zeigt auch, dass die starke Ausstülpung im posterioren Bereich der Zelle auf die Bündelung dieser Filamente zurückzuführen war, wobei die Zellmembran hierdurch nicht perforiert wurde. Dieses Erscheinungsbild erinnert an die posteriore Zellausstülpung wildtypischer Zellen, mit dem Unterschied, dass diese nativ vom Axostyl geformt wird (Abb. 5.9B). Das Strukturmuster des Axostyls unterschied sich in diesem Bereich deutlich von dem der gestreiften Filamentbündel mutierter Zellen, wie in Abbildung 7.6 (Kap. 7) anhand der gestrichelten Vergrößerungen erkennbar ist.

Um festzustellen, ob das Strukturmuster der gestreiften Filamentbündel mit dem der Costa beziehungsweise mit dem der Pf im Detail übereinstimmt, wurden TEM-Aufnahmen von wildtypischen und mutierten *T. gallinarum*-Zellen digital (Adobe Illustrator CS6) ausgemessen. Untersucht wurden die Costa und die Pf auf Breite und Periodizität ihres Bandenmusters. Der Fokus lag hierbei auf den schmalen und dunkler erscheinenden Banden. Die Bandenbreite der Costa ließ sich nicht eindeutig bestimmen und variierte zwischen 137-231 nm, höchstwahrscheinlich aufgrund der unterschiedlichen Schnittebenen der Zellen und der schmaler zulaufenden Architektur der Costa. Die Bandenbreite der Pf lag bei ~70 nm. Für die Bandenmuster-Periodizität der Costa und der Pf des Wildtyps sowie des Mutanten ließ sich ein Median von ~40 nm determinieren. Dieser Wert deckte sich mit zuvor ermittelten Messungen der Pf von *Tritrichomonas foetus* (Honigberg BM, 1971) und liegt nahe dem der B-type Costa mit 42 nm (Viscogliosi und Brugerolle 1994). Demzufolge zeigte das Bandenmuster der gestreiften Filamentbündel des Mutanten keine Abweichungen zur Costa beziehungsweise zu den Pf des Wildtyps. Augenscheinlich erschienen die einzelnen Filamentbündel-Einheiten in ihrer Breite schmaler als die Costa, und zeigten somit mehr Ähnlichkeit mit den Pf.

Lichtmikroskopische Lebendzell-Videoaufnahmen deuteten weiterhin an, dass mutierte Zellen durch die Ausbildung der steif erscheinenden Stabstruktur im Vergleich zu wildtypischen Zellen in Dynamik ihrer Motilität eingeschränkt waren (<https://youtu.be/ScKXw7GMgyU>).



**Abbildung 5.9: Die heterologe Expression von TVAG\_474360 in *T. gallinarum* induziert die Formation einer langen, stabartigen und aus gestreiften Filamenten aufgebauten Struktur.** (A) Immunfluoreszenz-Mikroskopie-Aufnahmen des Wildtyps (links, als Kontrolle) und des Mutanten (rechts). Das HA-markierte Protein TVAG\_474360 (anti-HA, grünes Signal) erstreckt sich zentral von anterior nach posterior durch die Zelle und darüber hinaus als Bestandteil einer stabartigen Struktur. Im Wildtyp fehlt eine derartige Struktur. Maßstableiste: 10 µm. (B, C) Transmissionselektronen-Mikroskop-Aufnahmen (TEM) visualisieren im Longitudinalschnitt, dass mutierte Zellen (TVAG\_474360::HA) unterhalb des Nukleus eine Akkumulation gestreifter Filamente ausbilden (siehe Pfeilkopf und die gestrichelten Ausschnitte). Das Bandenmuster dieser Filamente ähnelt dem der Costa (C) und dem der Parabasalen Filamente (Pf). In wildtypischen Zellen konnten solche Akkumulationen nicht beobachtet werden. Axostyl, Ax; Costa, C; Hydrogenosomen, H; Nukleus, N; Parabasales Filament, Pf. Maßstableiste: 1 µm. Modifiziert nach Preisner et al. 2016.

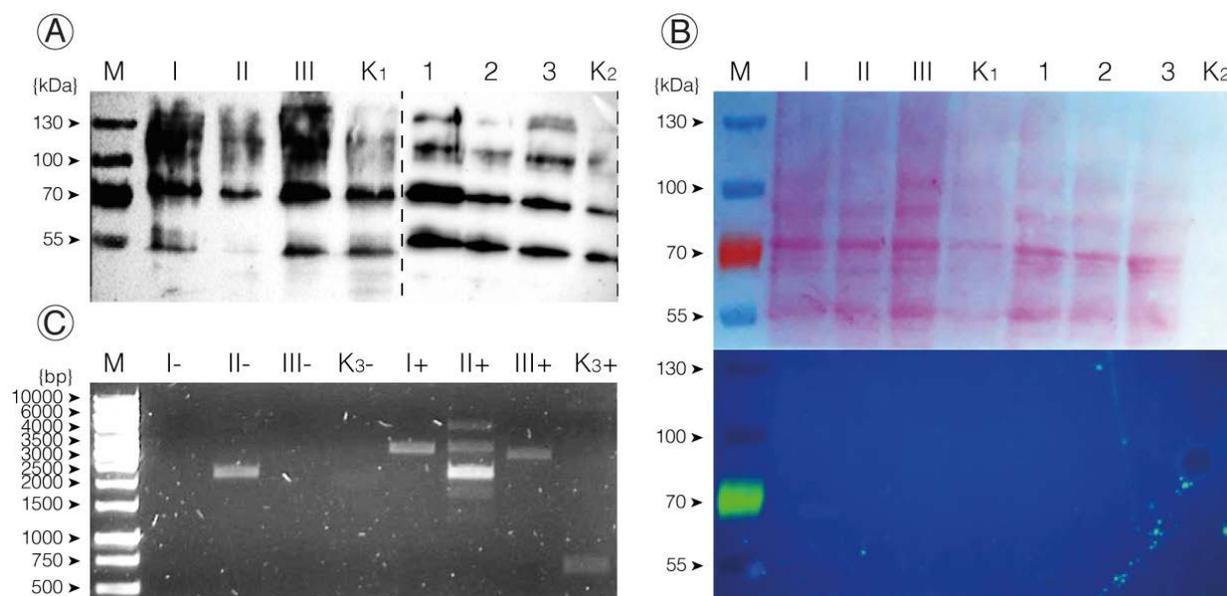
### 5.6 Heterologe Expressions-Analyse Cytoskelett-assoziiierter Proteine von *T. vaginalis* auf deren Fähigkeit in *Saccharomyces cerevisiae* Filamente zu formen

Um zu testen, ob die Coiled-Coil-haltigen Proteine TVAG\_339450, TVAG\_474360 und TVAG\_117060 intrinsisch die Fähigkeit besitzen Filamente zu formen (häufig als Charakteristikum von IF Proteinen beschrieben, Fuchs und Weber 1994; Herrmann et al., 2009), wurden diese als Vektorkonstrukte zur heterologen Expression in *Saccharomyces cerevisiae* eingebracht (Kap. 4.2.2.4). Ziel war es zum einen die Proteine *in vivo* zu analysieren und zum anderen über die *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) aufzureinigen und *in vitro* Assemblierungs-Assays durchzuführen. Für das von *S. cerevisiae* synthetisierte Protein MDM1 wurde die Fähigkeit zur *in vitro* Assemblierung bereits in ähnlicher Vorgehensweise beschrieben (McConnell und Yaffe 1993).

Insgesamt wurden pro Vektorkonstrukt drei Transfektionen mit *S. cerevisiae* durchgeführt. Zwei der drei Transfektionsansätze brachten lebende Zellkulturen hervor. Der Erfolg der heterologen Proteinexpression wurde mittels Immunodetektion überprüft (Abb. 5.10A, B). In Abbildung 5.10A ist die Proteindetektion der Gesamtzelllysate aus den Kulturen: I, II, III, K1 (erste Transfektion) sowie 1, 2, 3, K2 (zweite Transfektion) dargestellt. Die römischen und arabischen Ziffern repräsentieren die pYES2/CT-Vektorkonstrukte mit: I, 1 (TVAG\_339450); II, 2 (TVAG\_474360); III, 3 (TVAG\_117060) sowie K1 und K2 (Kontrollen, Leervektor). Die Extraktion der Gesamtzelllysate aus den Kulturen I, II, III und K1 erfolgte acht Stunden nach Induktion der Proteinexpression, die der Kulturen 1, 2, 3 und K2 nach 20 Stunden. Der Chemilumineszenz-vermittelte Proteinnachweis über einen primären Histidin-Antikörper zeigte weitreichende und unspezifisch erscheinende Signale (Abb. 5.10A). In allen sechs Gesamtzelllysaten, inklusive der Kontrollen K1 und K2, wurden Proteine bei circa 55, 70, 110 und über 130 kDa in unterschiedlichen Intensitäten detektiert. Das Detektionsmuster erschien vor allem in den Gesamtzelllysaten 1, 2, 3 und K2 äußerst

ähnlich, was eine unspezifische Proteindetektion vermuten lässt (Abb. 5.10A). Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden die selben Proben per *Multiplex Fluorescence Western Blot* (MFWB) analysiert (Abb. 5.10B). Die Färbung mit Ponceau S verdeutlicht, dass die Proteine der Gesamtzelllysate (bis auf Probe K2) aufgetrennt und auf die Polyacrylamid-Membran übertragen wurden (Abb. 5.10B, oben). Im MFWB konnten allerdings bis auf die vermutlich Poly-Histidin-haltige Markerbande bei 70 kDa keine Proteine detektiert werden (Abb. 5.10B, unten). Diese Markerbande wurde bereits zuvor in mehreren Chemilumineszenz- und Fluoreszenz-basierten Western Blots über den Histidin-Antikörper detektiert, womit sie als technische Positivkontrolle Anwendung fand. Hierbei sei erwähnt, dass der Hersteller keine Auskunft über die exakte Proteinzusammensetzung des Markers geben konnte. Auf Grundlage der vorliegenden Immunodetektions-Ergebnisse, konnte die Expression von TVAG\_339450, TVAG\_474360 und TVAG\_117060 auf Proteinebene in *S. cerevisiae* nicht nachgewiesen werden.

Um festzustellen, ob RNA-Transkripte der genannten Proteine in *S. cerevisiae* vorlagen, wurde eine Reverse Transkriptase PCR-Analyse (Kap. 4.2.1.6) durchgeführt. Hierzu wurde Total-RNA aus den Kulturen I, II, III und K3 (Kontrolle, eine mit pYES2/CT\_Malat-Enzym transfizierter Kultur) isoliert (Kap. 7, Abb. 7.7) und anschließend im Rahmen der cDNA-Synthese jeweils mit (+) und ohne (-) Reverser Transkriptase behandelt. Die cDNA-Proben wurden schließlich als Matrize der PCR mit Gen-spezifischen Primern eingesetzt. Das Agarose-Gel in Abbildung 5.10C visualisiert deutliche Signale in denen mit Transkriptase behandelten cDNA-Proben für I+ (bei ~3000 bp), II+ (bei ~2000, 2500, 3000 und ~4000 bp), III+ (bei ~2500 bp) und K+ (bei ~600 bp). Entgegen der Erwartung zeigte auch die Negativkontrolle (II-) ein Signal bei ~2500 bp. Die Signale von I+ (TVAG\_339450) und III+ (TVAG\_117060) liegen im erwarteten Größenbereich von 3030 bp und 2730 bp. Unter den multiplen Signalen von II+ (TVAG\_474360; 3238 bp) wurde lediglich das Fragment bei ~3000 bp erwartet. Die Bande der Positivkontrolle K3+ (Malat-Enzym) entspricht mit ~600 bp dem Erwartungswert, zumal die bei der PCR verwendeten Primer ursprünglich konzipiert wurden, um eine verkürzte Version des DNA-Fragments zu amplifizieren (Abb. 5.10C). Demnach, deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass RNA-Transkripte von TVAG\_339450, TVAG\_474360 und TVAG\_117060 von den entsprechend transfizierten *S. cerevisiae*-Kulturen synthetisiert wurden.



**Abbildung 5.10: Heterologe Expressions-Analyse von TVAG\_339450 (I,1), TVAG\_474360 (II,2) und TVAG\_117060 (III,3) in *Saccharomyces cerevisiae*.** (A) Der Chemilumineszenz Western Blot visualisiert eine weitreichende Proteindetektion in den Gesamtzelllysaten der transfizierten *S. cerevisiae*-Kulturen: I, II, III, K1 und 1, 2, 3, K2. Die Gesamtzelllysate repräsentieren die Transfektion der pYES2/CT-Vektorstrukture: I, 1 (TVAG\_339450); II, 2 (TVAG\_474360); III, 3 (TVAG\_117060) sowie K1 und K2 (Kontrolle, Leervektor). Primärantikörper: anti-Histidin (Maus, 1:3.000), Sekundärantikörper: anti-Maus (Hase, 1:10.000). (B) Die Ponceau S Färbung (obere Abbildung) visualisiert, dass Proteine der jeweiligen Gesamtzelllysate auf die Membran transferiert, jedoch im MFWB (untere Abbildung) nicht detektiert wurden. Die grün fluoreszierende Markerbande bei 70 kDa fungierte als Positivkontrolle des Blots. Primärantikörper: anti-Histidin (Maus, 1:3.000), Sekundärantikörper: anti-Maus Alexa fluor 488 (Hase, 1:1.000). (C) Reverse Transkriptase PCR basierend auf Total-RNA der transfizierten Kulturen I, II, III und K3 (Kontrolle, Malat-Enzym) in Anwesenheit (+) beziehungsweise in Abwesenheit (-) der Reversen Transkriptase.

## 6. Diskussion

Das Cytoskelett der Trichomonadidae visualisiert eine komplexe und spezialisierte Architektur, deren Ultrastruktur durch elektronenmikroskopische Observierungen bereits vor Jahrzehnten für verschiedene Organismen dieser Familie umfangreich und detailliert beschrieben wurde (Amos et al., 1979; Honigberg BM, 1990; Mattern et al., 1967; Nielsen et al., 1966). Als charakteristisches Merkmal wurde hierbei stets auf die auffällig gestreiften und filamentösen Strukturen – die Costa und die Parabasalen Filamente – aufmerksam gemacht. Letztere sind durch ihre Assoziation mit dem Golgi-Apparat sogar namensgebend für die gesamte Gruppe der Parabasalia (Kap. 3.3). Interessanterweise existieren neben den Parabasalia eine Vielzahl weiterer Protisten, die auffallend ähnlich gestreifte Filamente besitzen (Dingle und Larson, 1981; Roberts, 1987).

Biochemische Untersuchungen extrahierter Cytoskelett-Fractionen verschiedener Trichomonaden deuteten weiterhin an, dass die gestreifte Costa und die Parabasalen Filamente, eine ähnliche und unter Protisten neuartige Proteinkomposition aufweisen, deren Eigenschaften weder mit Vertretern der Aktin- noch der Tubulin-Proteinfamilie übereinstimmten (Viscogliosi und Brugerolle 1994; Brugerolle und Viscogliosi 1994). Aufgrund dessen wurden diese Proteine, deren Größenbereich zwischen 100-135 kDa lag, als eine neue Klasse von Filament formierenden Proteinen postuliert. Die potentielle Zugehörigkeit zur Klasse der Intermediärfilament (IF) Proteine, die in Metazoa neben Aktin und Tubulin als die dritte essentielle Klasse Filament formierender Proteine definiert ist (Kap. 3.1), wurde in diesen Arbeiten nicht diskutiert; obwohl einige ihrer Eigenschaften wie beispielsweise das Löslichkeitsverhalten, die Resistenz gegenüber chaotropen Agenzien und die Assoziation mit filamentösen Strukturen dafür sprachen. Eine weitere Charakterisierung dieser Proteine erfolgte nicht, was unter anderem auch damit zusammenhängt, dass zu dieser Zeit weder Genom- noch Transkriptomdaten von Spezies der Trichomonadidae zur Verfügung standen.

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es nun, auf den gewonnenen Erkenntnissen aufzubauen und das Cytoskelett-Proteom von *Trichomonas vaginalis*, als Vertreter der Trichomonadidae, zu determinieren. Dies vor allem auch im Hinblick auf Filament formierende Proteine und deren evolutionäre Beziehung zu Cytoskelett-Proteinen anderer Protisten einerseits und zu IF Proteinen der Metazoa andererseits; zumal in der Fachliteratur bis heute die Vorstellung dominiert, dass IF Proteine eine evolutionär exklusive Erfindung der Metazoa sind.

## 6.1 Die Spezifität Cytoskelett-assoziiierter Proteine in Spezies der Trichomonadidae

Die per Massenspektrometrie-Analyse erfassten Daten weisen auf eine spezifische und neuartige Cytoskelett-Proteinkomposition der Trichomonadidae hin. Basierend auf den drei extrahierten Cytoskelett-Fraktionen von *T. gallinarum* konnten insgesamt 203 homologe Proteine reziprok in beiden Trichomonaden determiniert werden (Kap. 5.2). Unter diesen befanden sich auch die charakteristischen Cytoskelett-Proteine Aktin, Tubulin, Centrin und Dynein mit entsprechend signifikanten Sequenzübereinstimmungen und PSM-Werten, was auf den Erfolg der Cytoskelett-Extraktion hindeutete (Kap. 5.2, Tab. 5.1). Über die KOG-Datenbank sollten diese 203 Proteine bekannten funktionellen Gruppen eukaryotischer Organismen zugewiesen werden. Allerdings konnten 56% dieser Proteine überhaupt keiner funktionellen Klasse zugeordnet- und für weitere 14% keine eindeutige Funktionsvorhersage getroffen werden (Abb. 5.2); womit die Mehrheit der 203 Proteine als unbekannt, beziehungsweise als neuartig erscheint.

Dieses Ergebnis bekräftigt die Erkenntnisse von Brugerolle und Viscogliosi 1994, die einst vorschlugen die Proteine der Costa und der Parabasalen Filamente als eine neue Klasse gestreifter Filamentproteine zu definieren. In diesem Zusammenhang ist auch die Pellicula der Alveolata, insbesondere des Ciliaten *Tetrahymena thermophila*, interessant. Die Proteom-Analyse dieser spezialisierten Cytoskelett-Struktur identifizierte 45% der Pellicula-Proteine in *T. thermophila* als neuartig, da auch für diese Cytoskelett-Fraktion keine Sequenz-basierten Homologe gefunden wurden (Gould et al., 2011). Des Weiteren ist die Ventrale Disk des Excavaten *Giardia lamblia* erwähnenswert. Proteom-Analysen dieser einzigartigen Cytoskelett-Struktur enthüllten Proteine, wie beispielsweise das *Median Body Protein* (MBP) und DAP16424, die ebenfalls keine Sequenzhomologien zu anderen bekannten Proteinen zeigten (Hagen et al., 2011). Diese Befunde verdeutlichen die Spezifität von Cytoskelett-assoziierten Proteinen in phylogenetisch entfernten Eukaryoten, welche mutmaßlich mit der Spezialisierung des gesamten Cytoskeletts in Anpassung an unterschiedliche Habitate und Lebensweisen einherging.

Die verbleibenden 30% der 203 Cytoskelett-assoziierten Proteine konnten den KOG-Kategorien *Zelluläre Prozessierung und Signalisierung, Informationsspeicher und Prozessierung* sowie *Metabolismus* zugewiesen werden (Kap 5.2, Abb. 5.2). Dieser Prozentteil beinhaltet neben Proteinen die eindeutig der Unterkategorie Cytoskelett zugeordnet wurden, auch welche anderer zellulärer Funktionsbereiche. Hierbei kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass sich unter den 203 identifizierten Proteinen auch Exemplare befanden, die nicht mit dem Cytoskelett verknüpft sind. Jedoch wurden ergänzend

zur reziproken BLAST Homologie-Suche anhand der TrichDB-Annotierungen im Vorfeld sämtliche Proteine herausgefiltert, die offensichtlich nicht mit dem Cytoskelett assoziiert waren (Kap. 5.2).

Zu den Proteinen, die quantitativ mit den höchsten PSM-Werten und einer signifikanten Sequenzübereinstimmung massenspektrometrisch erfasst wurden, zählten neben Tubulin, die unbekannt Proteine TEGb005933 (TVAG\_339450), TEGb003426 (TVAG\_474360), TEGb019317 (TVAG\_117060), TEGb017573 (TVAG\_030160) und TEGb012599 (TVAG\_059360), für welche alle eine Assoziation mit dem Cytoskelett nachgewiesen werden konnte (Kap. 5.2, Tab. 5.1; Kap. 5.4). Mittels einer erweiterten BLAST-Suche gegen RefSeq wurde versucht für diese fünf unbekannt Proteine auch außerhalb der Trichomonadida Homologe zu determinieren. Für TVAG\_339450, TVAG\_474360 und TVAG\_117060 konnten keine signifikanten Homologe (e-value cutoff von  $\leq 1e^{-10}$ ) ausfindig gemacht werden. Auch die KOG-Datenbank führte für die drei Kandidaten keine Informationen, womit diese zur Mehrheit neuartiger Proteine zu zählen sind (Kap. 5.2). Das Protein TVAG\_030160 wurde der KOG-Kategorie S (unbekannte Funktion, Abb. 5.2) zugewiesen. Über die BLAST-Suche konnten für dieses Protein jedoch WD40-Domänen-codierende Homologe diverser Organismen ermittelt werden (mit e-values  $\leq 1e^{-138}$ ). Hierzu zählten primär uncharakterisierte Proteine von beispielsweise *Tetrahymena thermophila* (THERM\_01094880), *Angomonas deanei* (EPY27992.1) und *Chlamydomonas reinhardtii* (XP\_001690930). Einige der verbleibenden Proteine sind als “flagellar associated protein“ annotiert und somit vermutlich mit dem Cytoskelett assoziiert. Dies deckt sich mit dem Funktionsbereich WD40-Domänenhaltiger Proteine, die unter anderem auch bei der Assemblierung des Cytoskeletts relevant sind (Stirnemann et al., 2010).

Auch für TVAG\_059360 konnten BLAST-Treffer mit Proteinen diverser Organismen gefunden werden (mit e-values  $\leq 1e^{-150}$ ); diese waren häufig als “Sperm-associated antigen 6, (Spag6)” verschiedener Säugetiere oder als „axonem central apparatus protein“, wie im Fall von *Trypanosoma vivax* Y486 und einigen *Leishmania*-Arten annotiert. Eine Forschungsarbeit zeigte in diesem Kontext, dass Spag6 in den Testis von Säugetieren ein Ortholog des Zentralapparat-Proteins PF16 von *Chlamydomonas* darstellt und dessen Interaktion mit PF20, einem weiteren Zentralapparat-Protein, Einfluss auf Struktur und Funktion von Axonemen hat (Zhang et al., 2002). Dies veranschaulicht die konservierte Funktionsweise von Spag6 und PF16. Interessanterweise wurde für die Struktur von PF16 analog zu der von TVAG\_059360 Armadillo-Repeats (ARM-Repeats) vorhergesagt (Zhang et al., 2002). Die KOG-Datenbank wies TVAG\_059360 der Kategorie U (intrazellulärer

Verkehr, Sekretion und Vesikel-Transport, Abb. 5.2) zu, womit diesem Protein eine Rolle am (intraflagellaren) Transport entlang des Axonems zukommen könnte.

Die Tatsache, dass viele der Datenbank-annotierten Homologe von TVAG\_030160 und TVAG\_059360 als uncharakterisiert beschrieben sind, legt nahe, dass deren Lokalisation in den jeweiligen Organismen noch nicht determiniert wurde. Möglicherweise sind diese Homologe in den entsprechenden Protisten Bestandteil filamentöser, spezifischer Cytoskelett-assoziiierter Strukturen analog zur Costa, beziehungsweise den Parabasalen Filamenten der Trichomonadidae; zumal *Tetrahymena*- und *Chlamydomonas*-Arten ebenfalls gestreifte Filamente (syn. striated roots, striated fibers) ausbilden (Roberts, 1987).

Zusammenfassend zeigen die ermittelten Ergebnisse an, dass das differenzierte Cytoskelett der Trichomonadidae aus sowohl konservierten-, jedoch überwiegend aus bislang unbekanntem und spezialisierten Proteinen besteht, für die — zumindest auf Ebene der Primärsequenz — keine Homologe außerhalb der Trichomonadida identifiziert werden können.

## 6.2 Coiled-Coils und repetitive Motive als Kennzeichen Cytoskelett-assoziiierter Proteine

Coiled-Coil Domänen gelten als vielseitige Interaktionseinheit deren Hauptfunktion als „zellulärer Reissverschluss“ in der dynamischen Verknüpfung und Stabilisierung von Nukleinsäuren, Proteinen, Molekülen, subzellulären Strukturen und Geweben beschrieben wurde (Rose et al., 2005). Typischerweise sind sie Bestandteil diverser Cytoskelett-Komponenten und insbesondere lange Coiled-Coil Domänen ein charakteristisches Kennzeichen von Intermediärfilament Proteinen (Herrmann et al., 2009). Den Grundbaustein dieser Domänen bilden repetitive Aminosäuresequenzen, sogenannte *Heptad-Repeats*, deren biochemisch- und elektrostatische Eigenschaften die Ausbildung helikaler Sekundärstrukturen ermöglichen (Mason und Arndt, 2004). Repetitive und meist geladene Aminosäuresequenzen können demnach als Identifikationsmerkmal Cytoskelett-assoziiierter Proteine in diversen Eukaryoten fungieren (Gould et al., 2011).

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden die 203 massenspektrometrisch erfassten Cytoskelett-assoziierten Proteine (Kap. 5.2) auf Coiled-Coils und andere repetitive Aminosäuresequenz-Merkmale im Vergleich mit zwei Kontroll-Datensätzen quantitativ untersucht (Kap. 5.3). Die Cytoskelett-assoziierten Proteine beinhalteten signifikant mehr und auch längere Coiled-Coil Segmente als die beiden Kontrollsets der hydrogenosomalen (Abb. 5.4A, B) und randomisierten Proteine (Abb. 5.5A, B). Auch die Anzahl repetitiver Motive je Cytoskelett-assoziiertes Protein war signifikant erhöht (Abb. 5.4C, 5.5C). Die

Detektion dieser repetitiven Motive erfolgte über einen definierten Suchalgorithmus (Kap. 4.2.3.2) der zuvor in *T. thermophila* erfolgreich zur Identifikation von geladenen, repetitiven Motiven Pellicula-assoziiierter Proteine angewendet wurde (Gould et al., 2011). Unter Betrachtung dessen, demonstrieren die vorliegenden Ergebnisse erneut, dass geladene, repetitive Sequenzmotive und lange Coiled-Coil Domänen unter Cytoskelett-assoziierten Proteinen tendenziell häufiger auftreten, als bei Proteinen die nicht dem Cytoskelett angehören. Derartige Sequenzmotive können demnach als Indikator für Cytoskelett-Proteine unterschiedlicher Protistengruppen dienen.

Bekräftigt wird diese Erkenntnis auch durch eine Proteom-basierte Studie der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Wang et al., 2012). Hierbei wurden für Cytoskelett-assoziierte Proteinkomplexe zum einen signifikant mehr Coiled-Coil Proteine (> 50%) und zum anderen eine gesteigerte Interaktionsrate von Coiled-Coil Domänen in Relation zu Proteinen anderer Funktionsbereiche vorhergesagt (Wang et al., 2012). In diesem Kontext sollte auch erwähnt werden, dass Coiled-Coil Domänen mit circa 10% eines eukaryotischen Proteoms als eine der häufigsten Interaktionsmotive prognostiziert und neben dem Cytoskelett auch vermehrt den Funktionsbereichen Transkription, Zellzyklus und dem intrazellulären Transport zugeordnet wurden (Liu und Rost, 2001; Wang et al., 2012). Die dabei detektierten Coiled-Coil Proteine zählten demzufolge zu den Heterogensten aller identifizierten Proteinklassen, was mitunter in der Strukturvielfalt des Coiled-Coil Motivs begründet liegt (Wang et al., 2012).

Abweichend vom Coiled-Coil Standard Modell, welches an sich schon eine beachtliche Anzahl an Strukturparametern umfasst und primär durch die Präsenz von Heptad-Repeats definiert wird, existieren sogenannte „nicht kanonische Coiled-Coils“ mit Diskontinuitäten ihrer Repeats (sogenannte *skips*, *stammers* und *stutters*) (Brown et al., 1996; Hicks et al., 2002; Lupas und Gruber, 2005). Interessanterweise wurden derartig abweichende Repeats in den drei Cytoskelett-Proteinen  $\beta$ -Giardin, MBP und HPSR2 des Excavaten *Giardia lamblia* identifiziert. Anstelle des rein Heptad-basierten Repeat-Sequenz-Musters mit dreimal sieben Aminosäuren (7-7-7), zeigten diese Proteine ungewöhnlich lange Repeat-Sequenzen mit 11-7-11 in  $\beta$ -Giardin, 7-11-7 in HPSR2 und 7-10-7 in MBP, was jeweils eine spezialisierte Molekülgeometrie zur Folge hat (Hicks et al., 1997; Holberton et al., 1988; Marshall und Holberton, 1993). Obwohl die exakte Funktion dieser außergewöhnlichen Repeat-Sequenzen unbekannt ist, konnte für  $\beta$ -Giardin demonstriert werden, dass es *in vitro* selbständig zu Filamenten mit einem Durchmesser von 2,5 nm assembliert (Crossley und Holberton, 1985). In diesem Zusammenhang ist auch das Protein *Striated Fiber Assemblin* (SFA) des Basalapparats diverser Grünalgen beachtungswürdig, welches auffällig ähnliche Struktur- und

Sequenzmerkmale mit  $\beta$ -Giardin teilt. Über zentrale Coiled-Coil Domänen und eine Prolinreiche Head-Domäne ist es befähigt selbstständig zu gestreiften, Mikrotubuli-assoziierten Filamenten zu assemblieren (Lehtreck et al., 2002; Weber et al., 1993). Neben diesen beiden Beispielen existiert eine Vielzahl weiterer Strukturproteine, die sich durch eine repetitive Sequenzarchitektur und der Assoziation mit spezifischen, häufig filamentösen Cytoskelett-Strukturen diverser Protisten auszeichnen (Kap. 3.2, Tab. 3.2).

Zusammengefasst veranschaulichen diese Befunde allgemein die strukturelle Diversität von Proteinuntereinheiten, insbesondere von alpha-helikalen Coiled-Coil Motiven, die im Fall des Cytoskeletts unterschiedlicher Zelltypen offenbar primär einer Funktion dienen – der dynamischen Stabilisierung.

### 6.3 Die Assoziation Repeat-haltiger Proteine mit filamentösen Cytoskelett-Strukturen

Anhand der Lokalisationsexperimente konnte demonstriert werden, dass die fünf Repeat-haltigen Kandidatenproteine: TVAG\_339450, TVAG\_474360, TVAG\_117060, TVAG\_030160 und TVAG\_059360 wie erwartet mit dem Cytoskelett von *T. vaginalis* und *T. gallinarum* assoziiert sind (Kap. 5.2, Abb. 5.3; Kap. 5.4, Abb. 5.6, 5.8).

In *T. vaginalis*-Zellen lokalisierte TVAG\_339450 stets in einem einzelnen langen Filament nahe der Zellperipherie, womit es als dessen Hauptbestandteil erschien (Abb. 5.6). Bei diesem Filament handelte es sich vermutlich um die Costa, zumal es sich durch die fehlende Kolo-kalisation mit Tubulin eindeutig vom Axostyl und den fünf Flagellen unterscheiden ließ, was auch durch die Lokalisation in isolierten Cytoskelett-Frak-tionen belegt wurde (Abb. 5.7). Im Vergleich zu den Parabasalen Filamenten gilt die Costa als das längste und dickste gestreifte Filament in *T. vaginalis* (Lee et al., 2009) und *T. foetus* (Rosa et al., 2013). Die Western Blot-Analysen bestätigten zudem das vorhergesagte Molekulargewicht von circa 118 kDa (Abb. 7.5), welches auch zuvor für ein Costa-assoziiertes Protein determiniert wurde (Viscogliosi und Brugerolle 1994). Die Untersuchungen von Viscogliosi und Brugerolle basierten mitunter auf einem polyklonalen Antikörper, der auf Grundlage extrahierter Cytoskelett-Frak-tionen von *T. vaginalis* generiert wurde. Interessanterweise detektierte dieser Antikörper auch ein 118 kDa großes Costa-assoziiertes Protein in *T. gallinarum* und *Pentatrichomonas hominis*, was auf ein ähnliches, vermutlich konserviertes Epitop hinwies. Auch in deren Immunfluoreszenz-vermittelten Lokalisationsstudien wurde die Costa in allen drei Organismen mit jenem Antikörper dekoriert. Zugleich bemerkten die Autoren, dass in *T. vaginalis* und *T. gallinarum*, neben der Costa auch die Parabasalen Filamente durch den Antikörper detektiert wurden; jedoch in

geringerer Intensität. Diese Beobachtung deckt sich nicht mit dem ermittelten Lokalisationsmuster von TVAG\_339450 in *T. vaginalis*, allerdings mit demjenigen von *T. gallinarum*, bei dem neben der Costa noch ein zweites, kürzeres Filament zu erkennen war (Abb. 5.8, 7.4).

Die beiden Coiled-Coil-haltigen Proteine TVAG\_474360 und TVAG\_117060 lokalisierten nicht mit der Costa, jedoch auch mit filamentösen Strukturen in *T. vaginalis* (Abb. 5.6) und *T. gallinarum* (Abb. 5.8). In mehreren individuellen Experimenten dekorierte TVAG\_474360 in *T. vaginalis* stets den Bereich der Pelta sowie zwei definierte Filamente, die den Nukleus ringartig umschlossen (Abb. 5.6, 7.3). Demnach könnte das Protein als Crosslinker zwischen verschiedenen Cytoskelett-Komponenten bei der Stabilisierung und Positionierung des Nukleus involviert sein. Eine derartige Funktion im Bereich des Nukleus wurde bereits für einige IF Proteine beschrieben (Goldman et al., 1985; Trevor et al., 1995).

Auffälligerweise unterschied sich die Lokalisation von TVAG\_474360 in *T. gallinarum* merklich. Die heterologe Expression des Proteins resultierte in *T. gallinarum* in der Formation einer stabartig definierten, steif erscheinenden Struktur, welche die Zelle zentral komplett durchzog und sowohl anterior als auch posterior über diese hinausragte (Kap. 5.4, Abb. 5.8; Kap. 5.5, Abb. 5.9). Die Mikroskopie-Aufnahmen veranschaulichen demzufolge für TVAG\_474360 eine fundamentale Funktion bei der Formierung gestreifter Filamente. Das konzentrierte Lokalisationsmuster spricht dafür, dass das Protein als ein Hauptbestandteil der zusätzlich akkumulierten gestreiften Filamente diese weitgehend selbst formiert. Es könnte allerdings auch als akzessorisches Protein die Rekrutierung anderer Strukturproteine vermitteln. Warum ein derartig auffälliger und definierter Phänotyp lediglich in *T. gallinarum* und nicht in *T. vaginalis* festzustellen ist, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Es könnte mit der nativen Expressionsrate von TVAG\_474360 zusammenhängen, die in *T. vaginalis* im Vergleich mit den anderen fünf Kandidatenproteinen am höchsten ausfiel (Kap. 5.2, Tab. 5.1) und auf eine gesteigerte Relevanz des Proteins hindeutet. Vermutlich besitzt das Protein in *T. gallinarum* eine noch bedeutendere Rolle bei der Formation gestreifter Filamente als es in *T. vaginalis* der Fall ist.

Während das filamentöse Lokalisationsmuster von TVAG\_339450 *in vivo* als auch in extrahierten Cytoskelett-Fraktionen von *T. vaginalis* identisch war, konnten für TVAG\_474360 und TVAG\_117060 Unterschiede festgestellt werden. Beide Proteine zeigten in extrahierten Cytoskelett-Proben jeweils eine punktuelle Lokalisation im Bereich der Pelta. Möglicherweise benötigen diese Kandidaten weitere akzessorische Proteine, die in vitalen *T. vaginalis*-Zellen die Formation zu Filamenten unterstützen. Unter Umständen wurden die

filamentösen Strukturen, die durch die beiden Proteine aufgebaut werden, auch bei der Cytoskelett-Extraktion beziehungsweise bei deren Fixierung teilweise zerstört, so dass nur noch ein punktueller Teil dieser detektiert werden konnte (Abb. 5.7).

Unterschiede im Lokalisationsmuster von *T. vaginalis* und *T. gallinarum* konnten auch für die beiden Proteine TVAG\_030160 und TVAG\_059360 beobachtet werden; wenn auch in geringerem Maße. TVAG\_030160 kolokalisierte in beiden Organismen weitgehend mit dem Axostyl, inklusive der Pelta. In *T. vaginalis* dekorierte das WD40-Repeat-haltige Protein zusätzlich auch die Region des Nukleus flächendeckend, was neben einer stabilisierenden Funktion auch auf eine Rolle in genregulatorischen Mechanismen hinweisen könnte. Das Funktionsspektrum WD40-Repeat-haltiger Proteine gilt als vielseitig und umfasst sowohl die Assemblierung des Cytoskeletts als auch die Transduktion von Signalkaskaden und die Prozessierung von RNA (Stirnemann et al., 2010).

Auch TVAG\_059360 kolokalisierte in beiden Spezies stellenweise mit dem Axostyl (Abb. 5.6, 5.8). In *T. vaginalis* erschien das ARM-Repeat-haltige Protein in einem filamentösen, taschenartigen Gebilde um rum des Nukleus zu lokalisieren; womit eine stützende Funktion impliziert wird (Abb. 5.6; Kap. 7, Abb. 7.3). In *T. gallinarum* war diese Struktur nicht zu erkennen, stattdessen dekorierte das Protein hier sämtliche Flagellen (Abb. 5.8), was bereits zuvor durch die BLAST-basierten Homologie-Treffer und deren Annotierung als Axonem-assoziierte Proteine angedeutet wurde (Kap. 5.2.).

Eine Assoziation von ARM-Repeat-haltigen Proteinen mit dem Cytoskelett konnte auch anhand der Proteine  $\beta$ -Catenin in tierischen Zellen und Vac8p in Hefezellen demonstriert werden (Wang et al., 1998). Weiterhin repräsentiert das humane *Kinesin-Associated Protein 3* (KAP3) ein multifunktionales ARM-Repeat-Protein, welches als Bestandteil von Motorprotein-Komplexen Moleküle entlang von Mikrotubuli neuronaler Axone und Flagellen transportiert (Choi et al., 2008). Auch an der MAP-Kinase vermittelten Signaltransduktion und der Chromosomensegregation während der Mitose ist es beteiligt (Choi et al., 2008). Basierend auf Sequenzvergleichen konnten KAP3 ähnliche Proteine auch in diversen Protisten, wie zum Beispiel den Grünalgen, Chromalveolaten und dem Excavaten *T. vaginalis*, ermittelt werden. Demnach könnte ein KAP3-Vorläufer bereits im letzten gemeinsamen Vorfahren aller Eukaryoten vorhanden gewesen sein. Interessanterweise lässt die Kristallstruktur einiger ARM-Repeat-Proteine eine auffallend ähnliche Architektur erkennen – und dies obwohl sich manche dieser Proteine in ihrer Primärsequenz deutlich von einander unterscheiden (Tewari et al., 2010).

### **Das Potential von Coiled-Coil Proteinen selbständig Filamente zu formieren**

Ergänzend zu den Lokalisationsstudien sollte weiterhin determiniert werden, ob die drei Coiled-Coil Proteine TVAG\_339450, TVAG\_474360 und TVAG\_117060 selbständig zu Filamenten assemblieren können; eine Eigenschaft die mitunter als definierendes Merkmal der IF Proteinklasse metazoischer Organismen gilt (Fuchs und Weber 1994; Herrmann et al., 2009). Hierzu sollten die drei Proteine heterolog in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert, per FPLC aufgereinigt und schließlich per Assemblierungs-Assay untersucht werden (Kap. 5.6).

Auf Grundlage der durchgeführten Immunodetektionen konnte die heterologe Expression in *S. cerevisiae* für keines der drei Coiled-Coil Proteine eindeutig bestätigt werden. Die Detektion im Chemilumineszenz Western Blot zeigte für alle drei Proteine weitreichend unspezifische Signale, die dem Detektionsmuster der Positivkontrollen ähnlich waren (Abb. 5.10A). Dagegen konnten im Multiplex Fluoreszenz Western Blot in den jeweils aufgetrennten Proteinproben der Gesamtzelllysate keine Signale dokumentiert werden (Abb. 5.10B). Diese Ergebnisse deuten einerseits auf eine unspezifische Bindung des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers im Chemilumineszenz Western Blot hin und andererseits, dass die Coiled-Coil Proteine von den entsprechend transfizierten Hefekulturen nicht exprimiert wurden.

Infolgedessen wurde anschließend überprüft, ob RNA-Transkripte der Coiled-Coil Proteine in den Hefekulturen vorhanden waren. Durch die Analyse per Reverse-Transkriptase PCR (RT-PCR) konnten für I+ (TVAG\_339450) und III+ (TVAG\_117060) Signale im erwarteten Größenbereich festgestellt werden (Abb. 5.10C). Im Fall von II+ (TVAG\_474360) wurden mehrere Signale zwischen ~2000 bp und ~4000 bp detektiert, was auf unterschiedliche mRNA-Splice-Varianten oder degenerierte Fragmente zurückzuführen sein könnte. Das Signal bei ~2500 bp in der Negativkontrolle II- (TVAG\_474360), die keine Reverse-Transkriptase enthielt, entsprach nicht der Erwartung und kann an dieser Stelle nur durch die Präsenz von Fremd-DNA im Reaktionsansatz der PCR erklärt werden. Das Resultat der RT-PCR signalisiert schließlich, dass RNA-Transkripte der drei Coiled-Coil Proteine von den jeweiligen Hefekulturen synthetisiert wurden.

Die Ursachen für die ausbleibende Detektion der Coiled-Coil Proteine in den Western Blot-Analysen können vielseitig und mit verschiedenen Ebenen der Genexpression verknüpft sein. Der Nachweis von mRNA deutet an, dass die Expression beziehungsweise die Detektion der drei Proteine im Zuge posttranskriptionaler Prozesse beeinträchtigt wurde. Hierbei soll nochmals erwähnt werden, dass bereits zur Transfektion der Hefekulturen sichergestellt wurde, dass die pYES2/CT-Vektor-Konstrukte korrekt und *in frame* vorlagen. Demnach gilt

es fortan zwischen einer fehlenden Proteinexpression an sich und zwischen technischen Aspekten der ausbleibenden Proteindetektion zu differenzieren.

Grundsätzlich könnte die Größe der Proteine ( $> 100$  kDa) eine Rolle spielen. Lange mRNA-Moleküle als auch lange Polypeptide gelten als instabiler und anfälliger für Degenerierungsprozesse als kürzere (Romanos et al., 1992). Derartig große und artfremde Coiled-Coil Proteine könnten zudem eine Belastung für *S. cerevisiae* darstellen und sogar toxisch wirken, so dass diese entweder überhaupt nicht oder nur unvollständig synthetisiert wurden; bevor sie der Proteolyse unterlagen. Weiterhin könnte es während der Translation und im Zuge posttranslationaler Modifikationen, wie beispielsweise bei der Faltung der artfremden Proteine, zu Komplikationen gekommen sein, was schließlich ebenfalls zu deren Abbau führte. Außerdem könnte das Poly-Histidin-Tag durch C-terminale Modifikationen entfernt worden sein, wodurch die Proteine per Western Blot-Analysen nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Für einige in *S. cerevisiae* heterolog exprimierte Membranproteine ist bekannt, dass deren C-terminale Isoprenylierung und Methyl-Veresterung unter Entfernung von Aminosäuren erfolgt (Schafer et al., 1990). Darüberhinaus konnte für verschiedene Poly-Histidin-markierte Erythropoetine (Epo) des Menschen gezeigt werden, dass deren Immunodetektion stark variierte und besonderes vom anti-His Antikörper abhängig war (Debeljak et al., 2006).

Zusammengefasst gilt die heterologe Proteinexpression durch unterschiedliche Host-Organismen im Bereich der Forschung und der Industrie als äußerst wertvolle, jedoch auch herausfordernde Methodik. Die erfolgreiche Proteinexpression ist unter anderem abhängig von Vektor- und Codon-spezifischen Eigenschaften sowie von der individuellen Transkriptions- und Translations-Leistung des Host-Organismus (Routledge et al., 2016). Beispielsweise wurde dokumentiert, dass die Präsenz der *alpha-factor signal* Sequenz in kommerziellen Expressionsvektoren die Synthese des 5-HT<sub>5A</sub> Serotonin Rezeptors der Maus steigert, jedoch einen drastisch reduzierenden Effekt auf die heterologe Expression des Histamin H1 Rezeptors in der Hefe *Pichia pastoris* hat (Shiroishi et al., 2011; Weiss et al., 1995).

#### 6.4 IF Proteine in Protisten und die Herausforderung ihrer Identifikation

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Coiled-Coil Proteine TVAG\_339450, TVAG\_474360 und TVAG\_117060 der zwei Spezies der Trichomonadidae teilen unverkennbar ähnliche Charakteristika mit Intermediärfilament Proteinen multizellulärer Organismen. Hierzu zählen (i) weitläufige Coiled-Coil Domänen (Abb. 5.3), (ii) biochemische Eigenschaften wie das Löslichkeitsverhalten, insbesondere die Resistenz gegenüber chaotropen Agenzien; auf denen die Extraktion der Cytoskelett-assoziierten Proteine basierte (Kap. 4.2.2.1), und (iii) die Assoziation mit filamentösen Cytoskelett-Komponenten der Trichomonadidae, die weitgehend unabhängig von Tubulin nachgewiesen wurde und – analog zu vielen IF Proteinen – primär eine stabilisierende Funktion impliziert (Abb. 5.6, 5.7, 5.8). Ob die drei Coiled-Coil Proteine *in vitro* selbstständig zu Filamenten assemblieren können, konnte experimentell nicht determiniert werden (Kap. 5.6). Die Präsenz hydrophober und hydrophiler Aminosäuren in den Coiled-Coil Domänen legt jedoch grundsätzlich die Fähigkeit zur Selbstassemblierung unter Einfluss des hydrophoben Effekts in wässriger Lösung nahe (Woolfson, 2005).

Ob die Fähigkeit zur selbständigen Filamentformierung *in vitro* an sich als definierendes Charakteristikum von IF Proteinen herangezogen werden kann, ist fragwürdig; zumal die Proteine Nestin, Synemin, Tanabin, Transitin und Paranemin offensichtlich nicht über diese Fähigkeit verfügen (Steinert et al., 1999; Guerette et al., 2007). Nestin, ein in Säugetierzellen vorkommendes IF Protein (Kap. 3.1.3) benötigt Interaktionspartner wie Vimentin und  $\alpha$ -Internexin um in Intermediärfilamente integriert zu werden (Steinert et al., 1999; Herrmann et al., 2009). Demnach ist Nestin eher mit einem Intermediärfilament assoziiert, als dass es selbst zu diesem assembliert. Darüberhinaus unterscheidet sich Nestin deutlich von der Mehrheit aller IF Proteine durch eine außergewöhnlich lange Tail-Domäne (1300 Aminosäuren), wodurch die sonst übliche zentrale alpha-helikale Rod-Domäne in diesem Protein nicht mehr als zentral angesehen werden kann (Herrmann et al., 2009; Neradil und Veselska, 2015). Aufgrund dieser und weiterer Eigenschaften besteht in der Fachliteratur Uneinigkeit über die Zuordnung von Nestin zwischen den IF Proteinklassen IV und VI (Guerette et al., 2007). Nestin veranschaulicht somit exemplarisch die auffallende Heterogenität der IF Proteinfamilie und stellt zugleich grundlegend die strikt Struktur- und Sequenz-bezogene Definition und damit die bisher genutzte Identifikationsmethodik von IF Proteinen in Frage.

Im Gegensatz zu Proteinen der Aktin- und Tubulin-Familie, die unter Eukaryoten hoch konserviert sind und für die Strukturhomologe auch in Eubakterien gefunden wurden, gilt die

Identifikation von IF Proteinen außerhalb der Metazoa generell als erschwert (Dawson und Paredez 2013; Koreny und Field 2016). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass (1) IF Proteine primär anhand von Sequenzmerkmalen ihrer „zentralen“ alpha-helikalen Rod-Domäne definiert und identifiziert werden, welche auf dem Muster metazoischer IF Proteine – vornehmlich den Laminen – beruht (Erber et al., 1999; Peter und Stick 2015), (2) bereits innerhalb der Metazoa eine beachtliche Strukturheterogenität in den verschiedenen IF Proteinklassen I-VI vorherrscht (Guerette et al., 2007; Herrmann und Strelkov 2011), (3) Coiled-Coil Motive in Proteinen nicht-homologer Proteinfamilien eine biochemisch ähnliche Aminosäure-Zusammensetzung besitzen, die aufgrund ihrer repetitiven Anordnung (Heptad-Repeats) essentiell für die Formation von Helices ist (Koreny und Field, 2016) und (4) Coiled-Coil-haltige Segmente durch ihre geringe Sequenzkomplexität rapide evolvieren (Gould et al., 2011). Basierend auf dem Konzept funktionaler Module (Hartwell et al., 1999) könnten sich demnach Mutationen in IF Proteinen schneller manifestieren als in Proteinen der Aktin- oder Tubulin-Familie, da IF Proteine in essentiellen Zellprozessen (funktionale Module) tendenziell weniger häufig involviert sind, als Aktin oder Tubulin, die an vielen überlebenswichtigen Zellprozessen (i.a. Lokomotion, Zellteilung, intrazellulärer Transport) beteiligt und damit wesentlich konservierter sind (Fleury-Aubusson 2003).

Dies hat zur Folge, dass Coiled-Coil Proteine die zur selben Proteinfamilie gehören ein ähnliches Maß an Divergenz ihrer Aminosäuresequenz visualisieren, wie diejenigen anderer Proteinfamilien, womit eine rein Primärsequenz-basierte Identifikation entfernter IF Protein-Homologe außerhalb der Metazoa nur eingeschränkt möglich erscheint (Koreny und Field, 2016). Ungeachtet dessen beschrieben Koreny und Field ferner, anhand von Suchalgorithmen die verstärkt Lamin typische Protein-Domänen berücksichtigten, potentielle Lamin-Homologe in diversen unizellulären Organismen detektiert zu haben. Hierzu zählten auch Protisten wie der Dinoflagellat *Symbiodinium goreau* und der Oomycet *Phytophthora infestans*, für deren Lamin-Homologe sogar eine Assoziation mit filamentösen Strukturen des Nukleus in Säugetierzellen nachgewiesen werden konnte (Koreny und Field 2016).

Eine ebenfalls Domänen-basierte Identifikation eines potentiellen Lamin-Homologs wurde für *Tetrahymena pyriformis* beschrieben. Für das im Epiplasma des Ciliaten ubiquitär lokalisierte Protein EpiC konnten mittels Hydrophober Cluster-Analyse Repeat-haltige Domänen detektiert werden, die Sequenzübereinstimmungen mit metazoischen Laminen beinhalteten (Bouchard et al., 2001).

Diese Befunde legen unverkennbar nahe, dass das ursprünglichste Lamin-Molekül, häufig als „Ur-Lamin“ bezeichnet und als Vorläufer aller heute bekannter metazoischer IF

Proteine angesehen (Dodemont et al., 1990; Herrmann und Strelkov, 2011; Peter und Stick, 2015), bereits vor der Entstehung multizellulärer Organismen und mutmaßlich sogar im letzten gemeinsamen Vorfahren aller Eukaryoten existiert hat. Ob tatsächlich sämtliche protozoische und metazoische IF Proteine aus einem Ur-Lamin hervorgegangen sind oder ob sich individuelle Proteinvorläufer in unterschiedlichen eukaryotischen Gruppen unabhängig und spezifisch entwickelt haben, kann aufgrund der hohen Sequenzvariabilität aktuell nur spekuliert werden. Unter Betrachtung der immensen Fülle Cytoskelett-assoziiierter Proteine die neben Vertretern der Trichomonadida in phylogenetisch entfernten Protisten beschrieben wurden (Tabelle 3.1) und funktionell den IF Proteinen entsprechen, erscheint eine Kombination aus homologer als auch konvergenter Evolution das greifbarste Szenario zu sein.

## 6.5 Erkenntnisse dieser Doktorarbeit

Spezies der Trichomonadidae zeichnen sich durch ein komplexes Cytoskelett mit spezifischen Komponenten aus (Kap. 3.3, 5.1). Während das ubiquitäre Cytoskelett-Protein Aktin primär den Zellkortex auskleidet und Tubulin den Hauptbestandteil des Axostyls und der Flagellen darstellt, existieren weitere filamentartige Strukturen, die sich auf eine bislang unbekannt Proteinkomposition stützen.

Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit wurde zum ersten Mal eine Cytoskelett-basierte Proteom-Analyse von Spezies der Trichomonadidae (*T. gallinarum* und *T. vaginalis*) publiziert. Mittels Massenspektrometrie konnten insgesamt 203 Cytoskelett-assoziierte Proteine identifiziert werden, die in beiden Spezies reziproke Homologie-Merkmale zeigten (Kap. 5.2). Für mehr als 50% der Proteine konnten in öffentlichen Datenbanken keine Homologe in anderen Organismen gefunden werden, womit diese als neuartig beziehungsweise Trichomonadidae spezifisch erscheinen. Durch bioinformatische Analysen konnte demonstriert werden, dass die 203 Proteine signifikant mehr und längere Coiled-Coil Segmente und andere repetitive Motive besitzen als zwei Proteom-Kontroll-Datensätze (Kap. 5.3). Mittels Immunfluoreszenz-gestützter Lokalisationsstudien konnten für fünf bislang unbekannt Kandidatenproteine, deren Präsenz neben Tubulin massenspektrometrisch am deutlichsten erfasst wurde und die alle repetitive Motive enthielten, eine Assoziation mit filamentösen Strukturen des Cytoskeletts von *T. gallinarum* und *T. vaginalis* nachgewiesen werden (Kap. 5.4). Ferner belegte die heterologe Expression für das Protein TVAG\_474360 in *T. gallinarum* eine essentielle Funktion bei der Formation gestreifter Filamente (Kap. 5.5).

Die ermittelten Ergebnisse zeigen auf, dass das Cytoskelett der Trichomonadidae über Proteine verfügt, die unabhängig von Aktin und Tubulin am Aufbau von filamentösen Strukturen beteiligt sind. Unter Berücksichtigung der drei Cytoskelett-Filamentklassen metazoischer Organismen (Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente) entsprechen diese Proteine biochemisch, strukturell und funktionell unverkennbar den Intermediärfilament Proteinen. Des Weiteren unterstützen und ergänzen die erarbeiteten Ergebnisse die Befunde vorhergegangener Cytoskelett-basierter Protein-Analysen. Hierzu zählen mitunter biochemische Analysen der gestreiften Filamente (engl. striated roots) von Spezies der Trichomonadidae (Brugerolle und Viscogliosi 1994), von dem Excavaten *Giardia lamblia* (Crossley und Holberton 1985), von diversen Grünalgen (Roberts 1981; Lechtreck und Melkonian 1991) sowie von Amoebo-Flagellaten und Ciliaten (Dingle und Larson, 1981); um nur einige zu nennen (siehe auch Kap. 3.2). Auch die repetitive Sequenzanordnung der identifizierten Cytoskelett-Proteine zeigt ein auffallend ähnliches Aminosäure-Profil wie dasjenige einiger Alveolata, insbesondere von Spezies der Gattung *Tetrahymena* (Bouchard et al., 2001; Gould et al. 2008; 2011; El-Haddad et al., 2013). Die in diesen Forschungsarbeiten charakterisierten Proteine und viele weitere Exemplare (Tab. 3.2) zeigen, analog zu denen der Trichomonadidae, eindeutige Charakteristika metazoischer IF Proteine. In diesem Zusammenhang stehen die vorliegenden Ergebnisse im Einklang mit aktuellen Forschungserkenntnissen die postulieren, dass Lamine, als ursprünglichste Vertreter der IF Proteinklasse, bereits vor der Abspaltung der Metazoa im Reich der Protisten und mutmaßlich sogar im letzten gemeinsamen Vorfahren aller Eukaryoten präsent waren (Kollmar 2015; Koreny und Field 2016).

## 6.6 Ausblick

Von den 203 massenspektrometrisch identifizierten Cytoskelett-assoziierten Proteinen der Trichomonadidae (*T. gallinarum*, *T. vaginalis*) sind über 50% (113) funktional unbekannt. Für fünf dieser Proteine konnte in der vorliegenden Dissertation eine Assoziation mit filamentösen Strukturen des Cytoskeletts nachgewiesen werden (Kap 5.4). Immunfluoreszenz-basierte Lokalisationsstudien und Lebendzellobservierungen der verbleibenden 108 Proteine könnten weiterhin erste Hinweise auf deren Funktion liefern. Um die Klonierung dieser Menge an Proteinen möglichst effektiv und zeiteffizient zu bewerkstelligen, könnte eine Ligations-unabhängige *high-throughput* Klonierungsmethode zum Einsatz kommen, wie sie beispielsweise zuvor für Proteine der Ventralen Disk von *Giardia lamblia* etabliert wurde (Hagen et al., 2011). Weiterhin könnten über Pulldown-

Assays potentielle Interaktionspartner und die mögliche Verknüpfung vereinzelter Kandidatenproteine mit dem Aktin- und Tubulin-basierten Cytoskelett ermittelt werden.

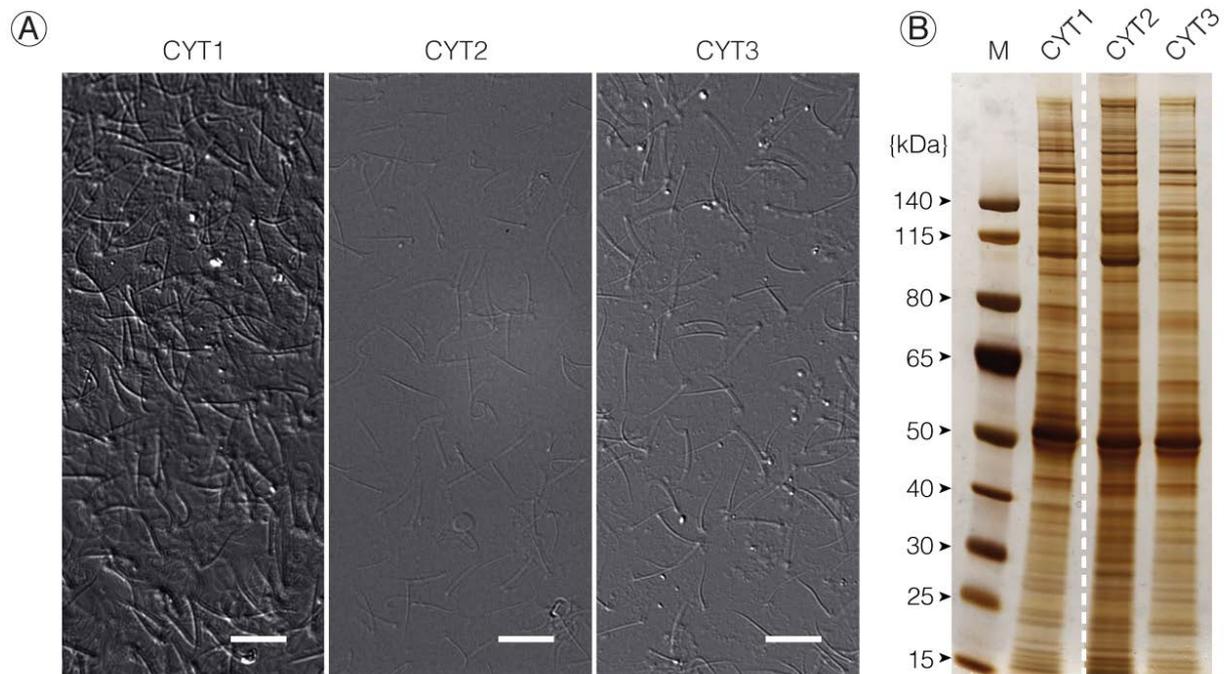
Ungeachtet dessen gilt es die fünf Kandidatenproteine (Tab. 5.1), die in den massenspektrometrisch analysierten Cytoskelett-Fraktionen neben Tubulin auffälligerweise am häufigsten detektiert wurden (Kap. 5.2), im Hinblick ihrer Charakteristik als IF- und Strukturproteine weiter zu erforschen. Um letztlich festzustellen, ob die drei Coiled-Coil Proteine TVAG\_339450, TVAG\_474360 und TVAG\_117060 *in vitro* jeweils selbständig zu Filamenten assemblieren, könnte die Durchführung der heterologen Expression aufbauend auf dieser Arbeit, modifiziert werden. Anstelle des Poly-Histidin-Tags könnte ein alternativer Tag (Strep II, FLAG oder HPC; Lichty et al., 2005) berücksichtigt und anstelle von *Saccharomyces cerevisiae* die Hefe *Pichia pastoris* als erfolgsversprechendes Expressionssystem eingesetzt werden (Ahmad et al., 2014). Durch eine anschließende Aufreinigung und Konzentrierung der Proteine per FPLC stünden weitere Analysemethoden zur Anwendung. Neben den *in vitro* Filament-Assemblierungs-Assays könnten Kristallstruktur-Analysen die Atomstruktur der Proteine aufklären. Auch wenn letztere Methodik herausfordernd und hierfür die Kristallisation der Proteine nötig ist, so wäre der Strukturvergleich zu Intermediärfilament Proteinen äußerst interessant, zumal die Kristallstruktur der alpha-helikalen Rod-Domäne des humanen Vimentins weitgehend aufgeklärt und ein Atommodell konstruiert werden konnte (Chernyatina et al., 2012). Über Kristallstruktur-Analysen konnte beispielsweise auch gezeigt werden, dass das bakterielle Protein FtsZ ein Strukturhomolog des eukaryotischen Tubulins darstellt; und dies obwohl sich deren Primärsequenz zu ~90% deutlich voneinander unterscheidet (Erickson et al., 1996; Lowe und Amos, 1998).

Die heterologe Expression der Coiled-Coil Proteine TVAG\_339450, TVAG\_474360 und TVAG\_117060 in anderen Protisten, die analog zu den Trichomonadidae ebenfalls gestreiften Filamenten ausbilden, könnte zeigen inwiefern die Struktur und Funktionalität dieser Proteine konserviert ist. Als Expressionssystem könnten Spezies der Gattungen *Chlamydomonas*, *Tetrahymena* und *Giardia* genutzt werden, zumal deren gestreifte Filamente bereits analysiert wurden und die Transfektion dieser Protisten etabliert ist (Bouchard et al., 2001; Galati et al., 2014; Lechtreck et al., 2002). Möglicherweise lokalisieren die artfremden Proteine in diesen Organismen ebenfalls in den gestreiften Filamenten oder stimulieren die Formation zusätzlicher Filamente, wie durch die heterologe Expression von TVAG\_474360 in *T. gallinarum* beobachtet werden konnte (Kap. 5.5). Vice versa könnten Strukturproteine

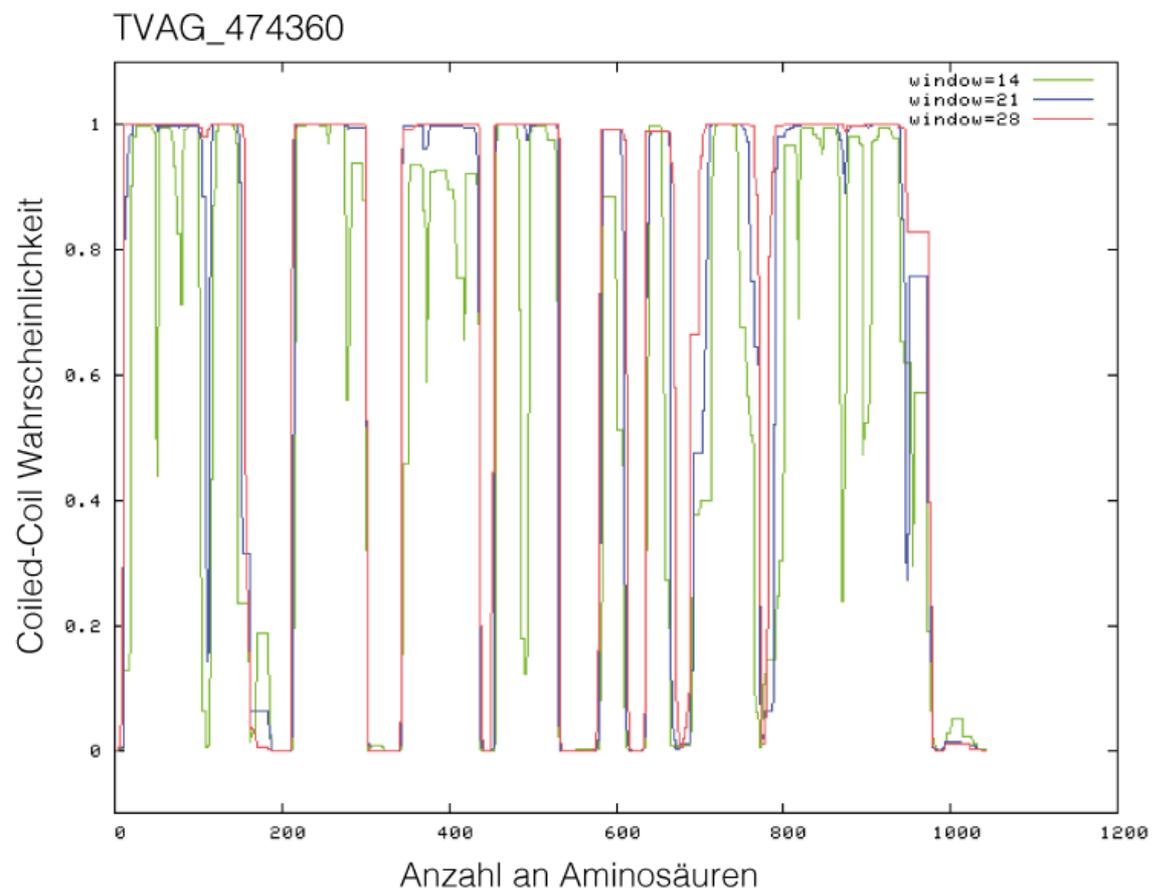
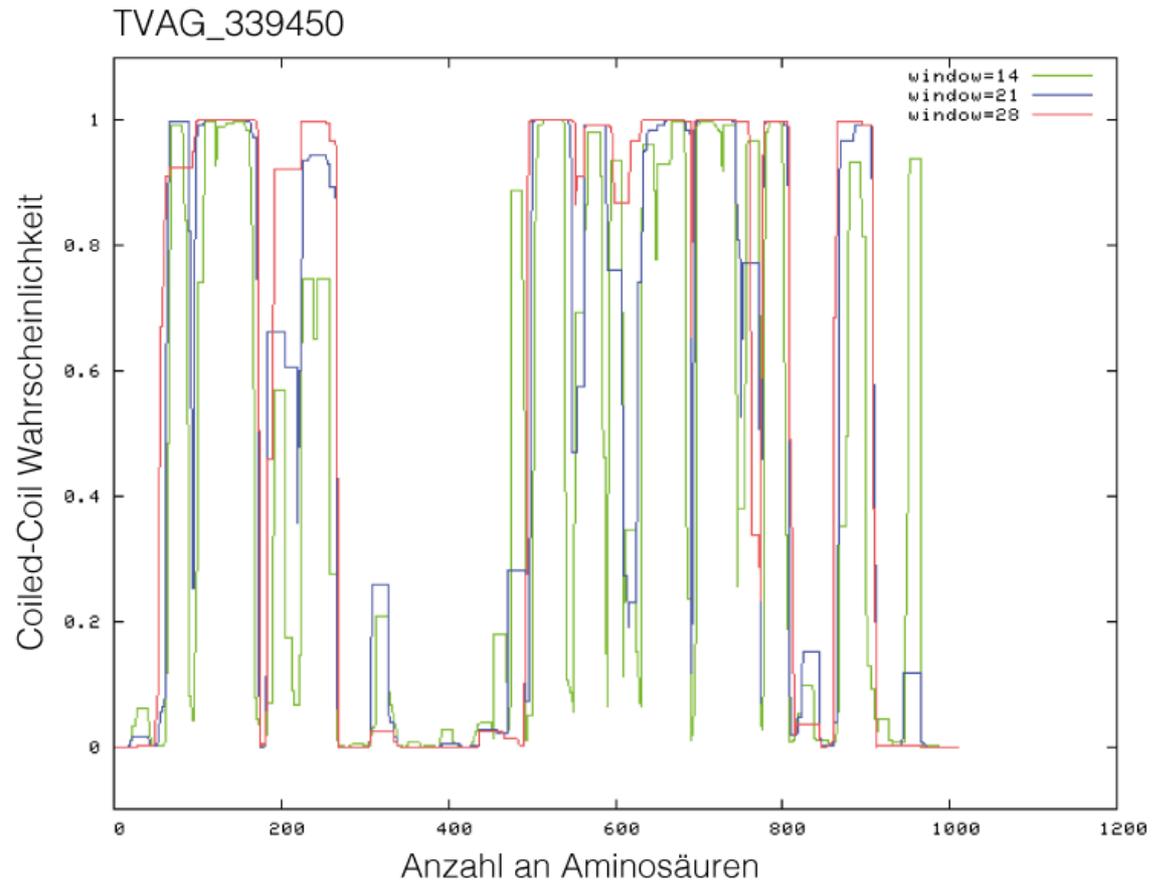
wie SF-Assemblin (*Chlamydomonas*), EpiC (*Tetrahymena*) und  $\beta$ -Giardin (*Giardia*) heterolog in Spezies der Trichomonadidae eingebracht und deren Lokalisation untersucht werden.

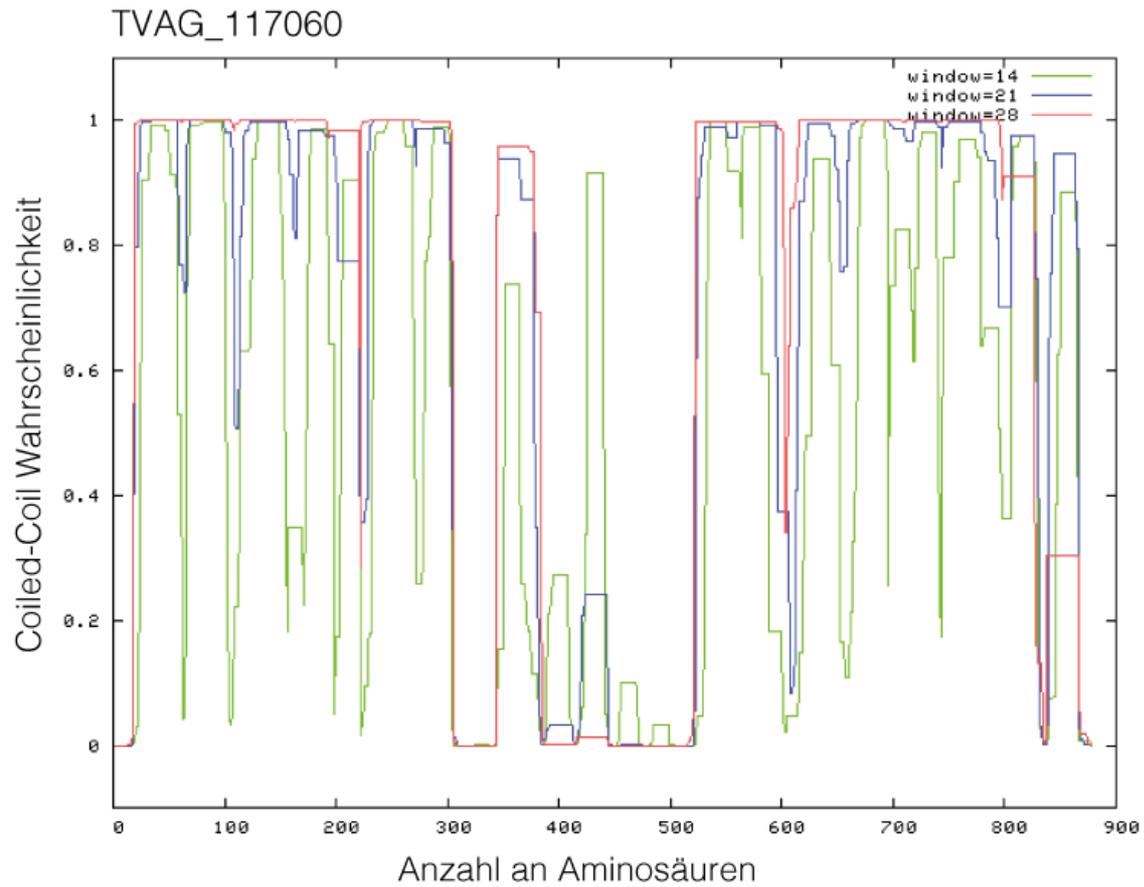
Weiterhin könnte die Hydrophobe Cluster-Analyse, wie einst für das Epiplasma-Protein EpiC von *Tetrahymena pyriformis* beschrieben (Bouchard et al., 2001), als auch vergleichende Genom- und Phylogenie-Studien auf Grundlage der Arbeiten von Kollmar 2015, Koreny und Field 2016, zur Identifizierung homologer IF Protein-Domänen der in dieser Arbeit massenspektrometrisch erfassten Cytoskelett-assoziierten Proteine aus *T. gallinarum* Anwendung finden.

## 7. Anhang

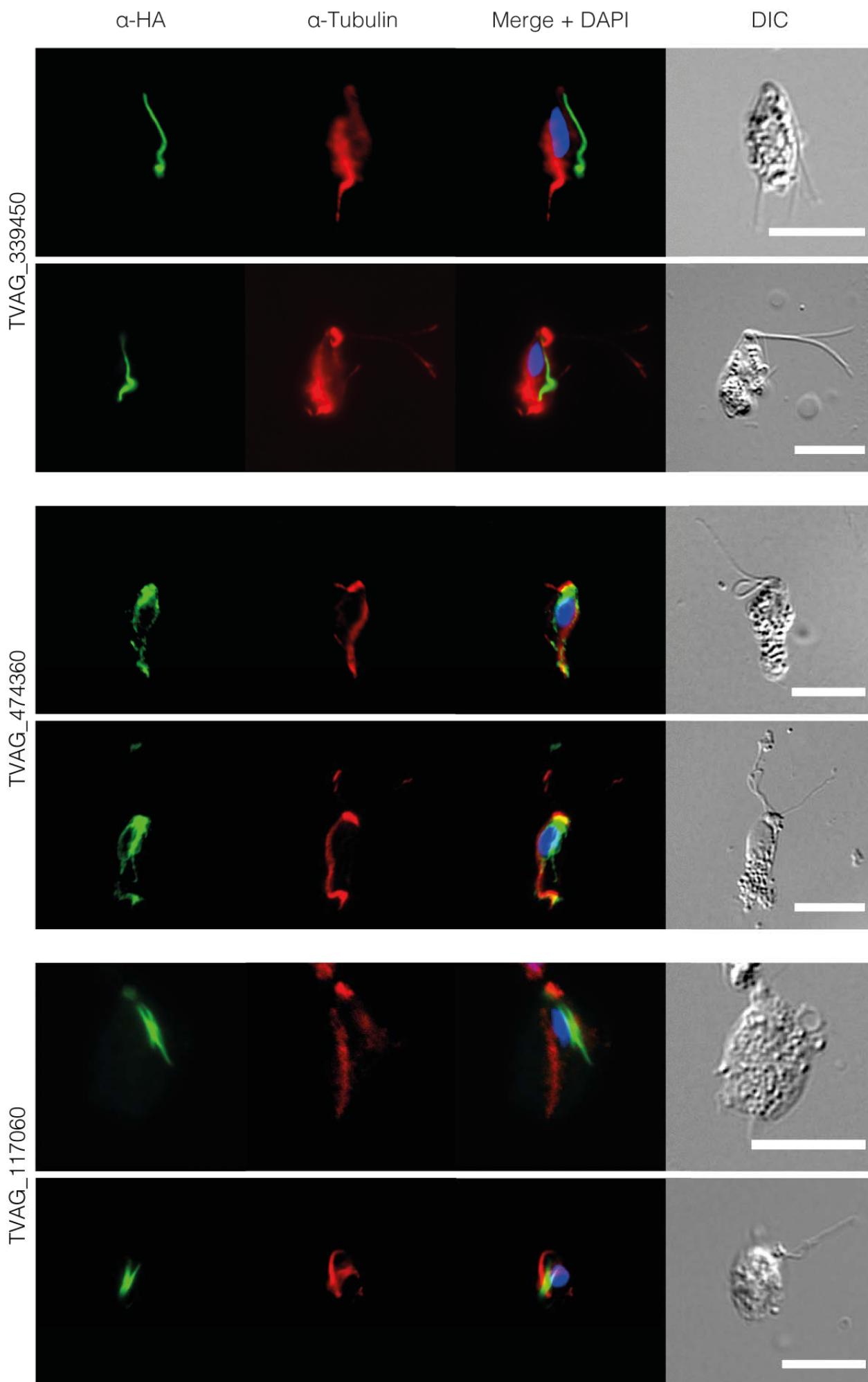


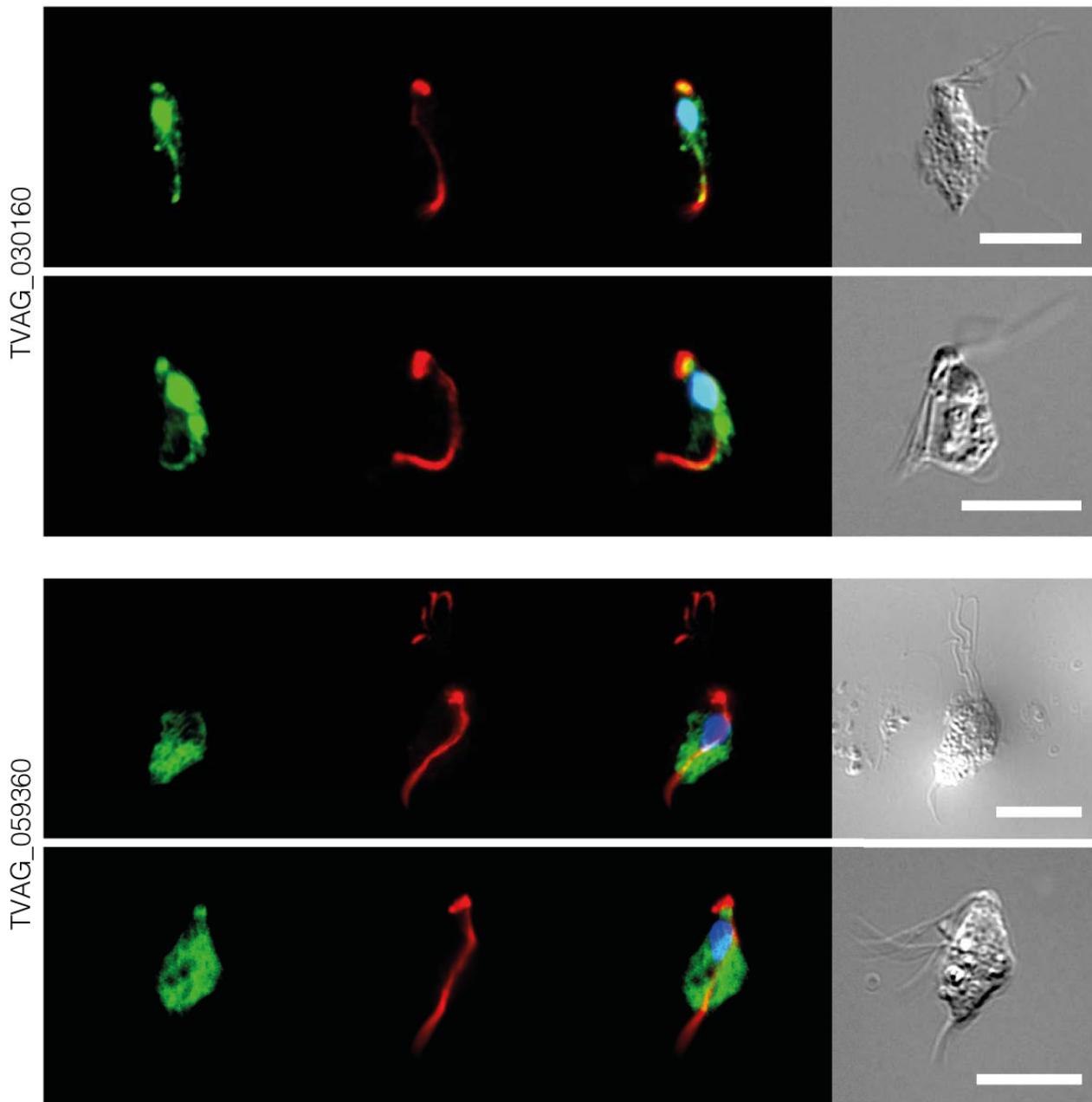
**Abbildung 7.1: Drei extrahierte Cytoskelett-Fractionen von *T. gallinarum*, welche zur massenspektrometrischen Analyse verwendet wurden. (A) Durchlicht-mikroskopische Aufnahmen der drei unabhängig voneinander extrahierten Cytoskelett-Fractionen (CYT1-3) zur Inspektion auf deren Reinheit und Ausbeute. Maßstableiste 10  $\mu\text{m}$ . (B) Die Fractionen der Aufnahmen aus (A) wurden über eine 8% SDS-PAGE aufgetrennt und silber gefärbt. Die gestrichelten Linien weisen darauf hin, dass die Fractionen CYT2 und CYT3 zwar im selben Polyacrylamid-Gel, jedoch nicht in Spur 2 und 3, aufgetrennt wurden. Marker, M; Kilodalton, kDa. Modifiziert nach Preisner et al. 2016.**



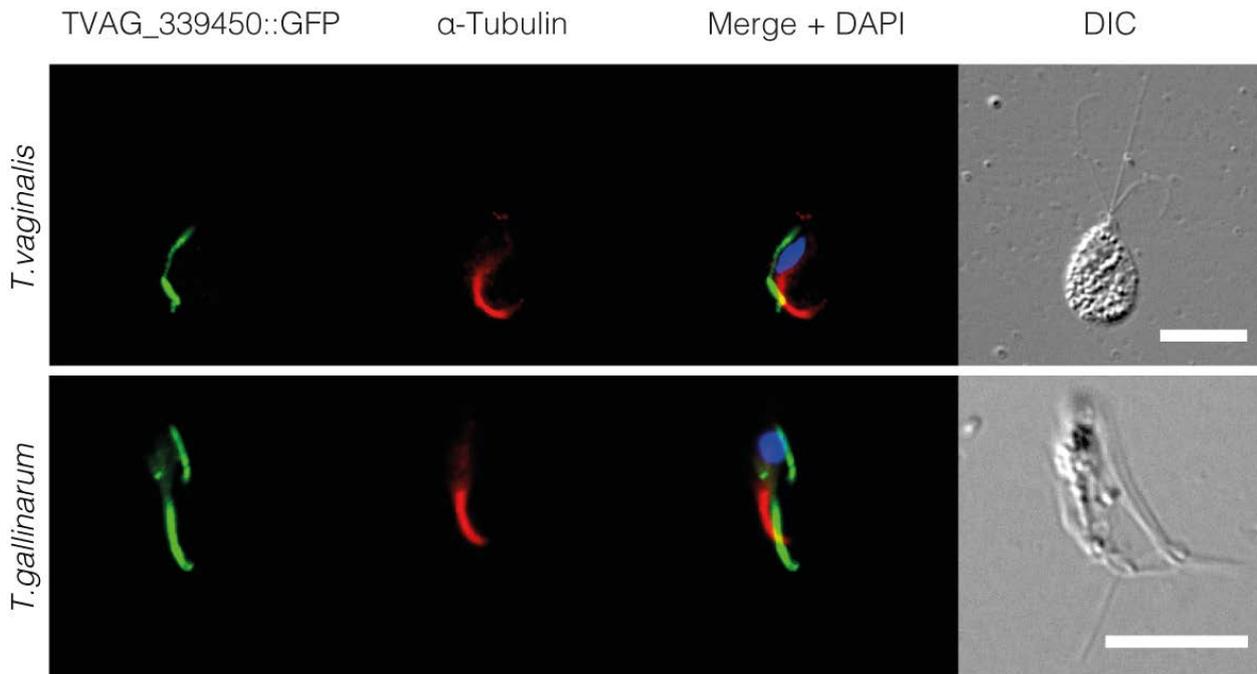


**Abbildung 7.2:** *COILS* vorhergesagte Coiled-Coil Verteilung der per Massenspektrometrie-Analyse identifizierten und *in vivo* lokalisierten Cytoskelett-Proteine: TVAG\_339450, TVAG\_474360 und TVAG\_117060. Die Peaks zeigen eine weitreichende Verteilung an Coiled-Coil Signalen entlang der jeweiligen Proteinsequenz. Modifiziert nach Preisner et al. 2016.

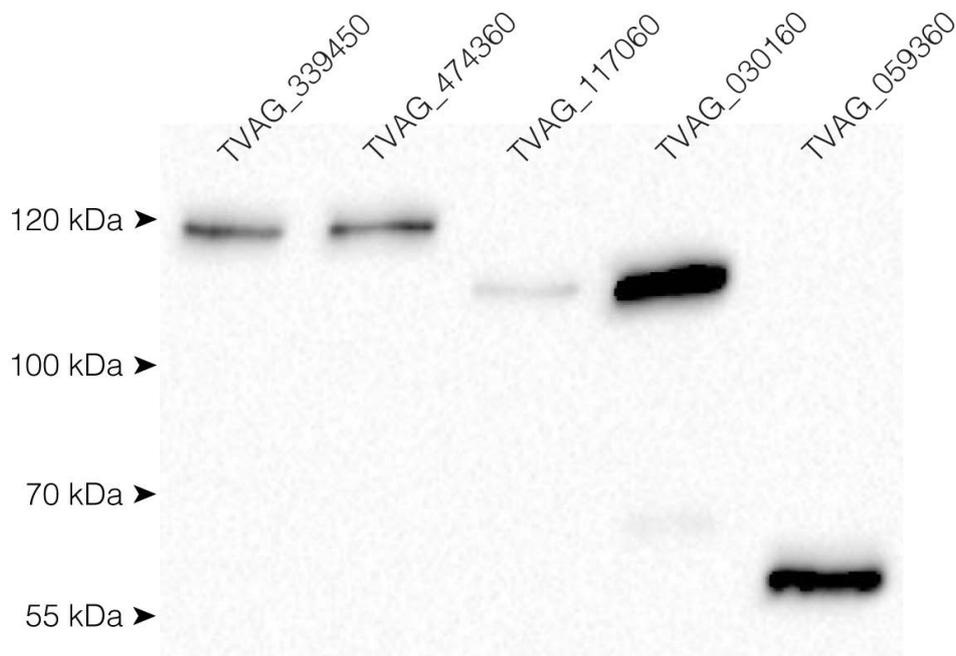




**Abbildung 7.3: Immunfluoreszenz-Mikroskopie-Aufnahmen zur Lokalisation der fünf selektierten Proteine in *T. vaginalis*.** Die Proteine die mit dem Präfix TVAG\_ in der Abbildung gekennzeichnet sind, wurden als Hämagglutinin-Fusionsproteine (anti-HA, grünes Signal) homolog in *T. vaginalis* exprimiert und *in vivo* lokalisiert. Tubulin (anti-Tubulin, rotes Signal) diente als Marker des Axostyls. DAPI (blaues Signal) visualisiert den Zellkern im Rahmen der Überlagerung (Merge) des grünen und roten Signals. Die Aufnahme im Differential-Interferenz-Kontrast (DIC) zeigt die gesamte Zellmorphologie. Maßstableiste: 10  $\mu$ m. Modifiziert nach Preisner et al. 2016.

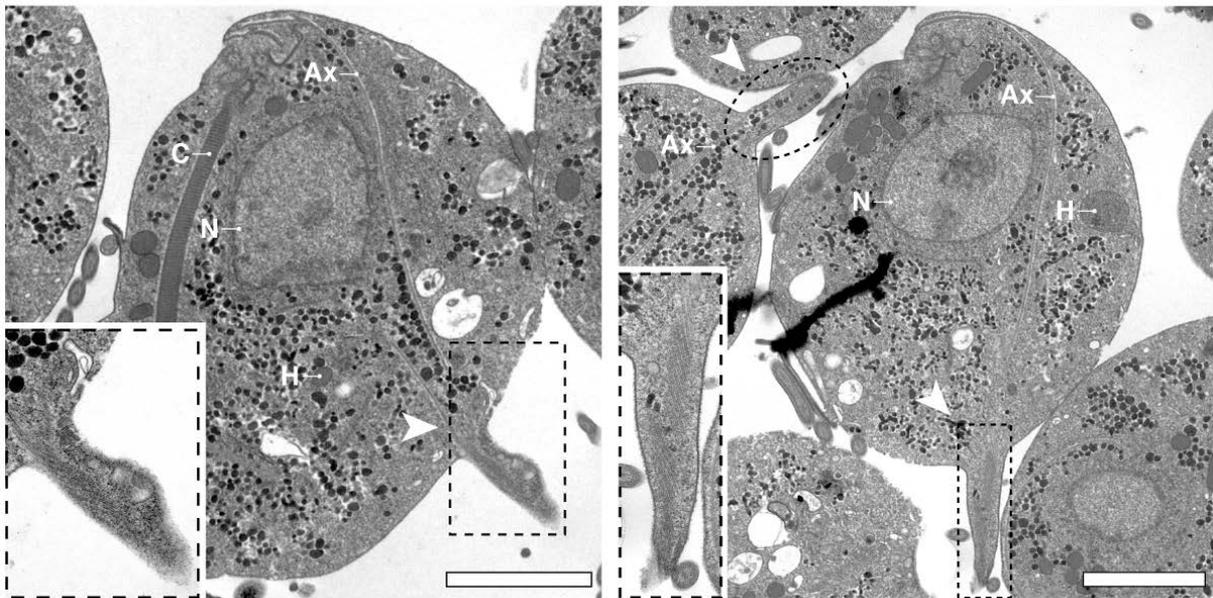


**Abbildung 7.4: Immunfluoreszenz-Mikroskopie-Aufnahmen des GFP-markierten Proteins TVAG\_339450 in *T. vaginalis* und *T. gallinarum*.** Das Protein wurde als GFP-Fusionskonstrukt (anti-GFP, grünes Signal) homolog in *T. vaginalis* und heterolog in *T. gallinarum* exprimiert und jeweils *in vivo* lokalisiert. Tubulin (anti-Tubulin, rotes Signal) diente als Marker des Axostyls. DAPI (blaues Signal) visualisiert den Zellkern im Rahmen der Überlagerung (Merge) des grünen und roten Signals. Die Aufnahme im Differential-Interferenz-Kontrast (DIC) illustriert die gesamte Zellmorphologie. Maßstableiste: 10  $\mu\text{m}$ .

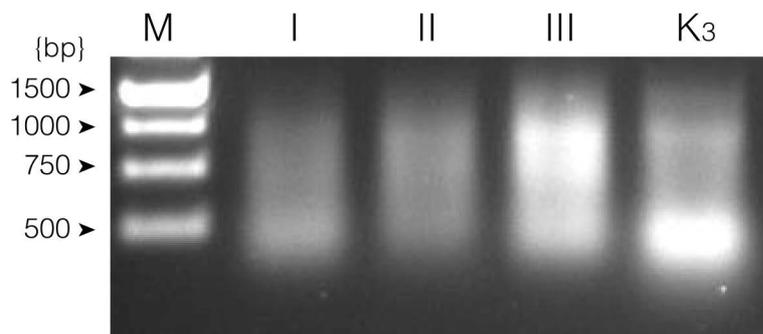


**Abbildung 7.5: Chemilumineszenz-basierte Immunodetektion der fünf Kandidatenproteine in Gesamtzelllysaten von *T. vaginalis*.** Die Detektion bestätigt das für die Proteine erwartete Molekulargewicht, mit Ausnahme von TVAG\_030160, für welches ein intensives Signal bei  $\sim 112$  kDa und ein schwaches bei  $\sim 60$  kDa erwartetes Signal dokumentiert wurde. Kilodalton, kDa. Übernommen aus Preisner et al. 2016.

Wildtyp



**Abbildung 7.6: Transmissionselektronen-Mikroskopie-Aufnahmen von wildtypischen *T. gallinarum*-Zellen zur Visualisierung des Axostyls und dessen Strukturmuster im posterioren Bereich.** Die beiden Aufnahmen verdeutlichen, dass die posteriore Zellausstülpung durch das Axostyl geformt wird (siehe gestrichelte Markierungen). Das Strukturmuster des Axostyls unterscheidet sich von dem der gestreiften Filamentbündel mutierter Zellen (siehe Kap. 5.5, Abb. 5.9 zum Vergleich). Axostyl, Ax; Costa, C; Hydrogenosomen, H; Nukleus, N. Maßstableiste: 1  $\mu$ m.



**Abbildung 7.7: Total-RNA-Extraktion aus denen mit pYES2/CT-Konstrukten transfizierten *S. cerevisiae*-Kulturen zur Expressions-Analyse mittels RT-PCR.** Das 1% Agarose-Gel zeigt die Auftragung der Total-RNA-Proben aus denen mit den pYES2/CT-Konstrukten transfizierten Hefekulturen: I (TVAG\_339450), II (TVAG\_474360), III (117060) und K3 (Malat-Enzym, Kontrolle) als Edukte der RT-PCR (Kap. 5.6, Abb. 5.10C) Marker, M; Basenpaare, bp.

**Tabelle 7.1: Zuordnung der 203 Cytoskelett-assoziierten Proteine in die funktionellen Unterkategorien der *EuKaryotic Orthologous Groups* (KOG) Datenbank.** Die in der Tabelle aufgeführten Werte korrespondieren mit Abbildung 5.2 (Kap. 5.2). Einige Proteine wurden aufgrund ihrer Eigenschaften zu mehr als nur einer Kategorie zugeordnet, zum Beispiel zu den Kategorien DN, MOT und OT.

<b>KOG-Unterkategorie</b>	<b>Anzahl der Proteine</b>
(na) keine Daten verfügbar	113
(A) RNA Prozessierung und Modifikation	4
(C) Energieproduktion und Konvertierung	5
(D) Zellzykluskontrolle, Zell- und Chromosomen-Teilung	1
(N) Zellmotilität	
(E) Aminosäure-Transport und Metabolismus	1
(F) Nukleotid-Transport und Metabolismus	1
(J) Translation, ribosomale Strukturierung und Biogenese	3
(L) Replikation, Rekombination und Reparatur	1
(M) Zellwand/-Membran/-Hülle Biogenese	2
(M) Zellwand/-Membran/-Hülle Biogenese	3
(O) Posttranslationale Modifikation, Protein turnover, Chaperone	
(T) Signaltransduktions-Mechanismen	
(N) Zellmotilität	2
(O) Posttranslationale Modifikation, Protein turnover, Chaperone	8
(O) Posttranslationale Modifikation, Protein turnover, Chaperone	1
(T) Signaltransduktions-Mechanismen	
(R) Nur generelle Funktionsvorhersage möglich	11
(S) Funktion unbekannt	19
(T) Signaltransduktions-Mechanismen	13
(U) Intrazellulärer Verkehr, Sekretion und Vesikel-Transport	5
(Z) Cytoskelett	12
	205

**Tabelle 7.2: Ermittelte Werte aus der Coiled-Coil Analyse der Cytoskelett-, hydrogenosomalen- und randomisierten Protein-Datensätze in Bezug zu Abbildung 5.4A und 5.5A (Kap. 5.4).**

Anzahl der Coiled-Coils	Cytoskelett-Proteine (CYT)	Hydrogenosomale Proteine (HYD)	Randomisierte Proteine (RDM)
0	113	216	172
1	25	51	23
2	22	19	2
3	8	5	4
4	6	2	0
5	2	3	1
6	7	1	0
7	5	0	1
8	5	0	0
9	4	0	0
10	2	1	0
11	1	0	0
12	1	1	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	1	0
20	0	0	0
21	1	1	0
22	0	0	0
23	0	0	0
24	0	0	0
25	0	0	0
26	1	0	0

Länge der Coiled-Coils (aa)	Cytoskelett-Proteine (CYT)	Hydrogenosomale Proteine (HYD)	Randomisierte Proteine (RDM)	Länge der Coiled-Coils (aa)	Cytoskelett-Proteine (CYT)	Hydrogenosomale Proteine (HYD)	Randomisierte Proteine (RDM)
6	0	0	1	66	2	0	0
21	113	98	20	67	1	1	1
22	2	1	0	70	5	0	1
23	0	0	1	71	1	1	0
24	4	3	0	72	1	1	0
25	5	4	1	74	0	0	1
26	3	1	0	77	2	1	0
27	2	1	0	78	2	1	0
28	54	23	10	84	3	0	0
29	6	2	0	86	1	0	0
30	1	0	0	87	2	0	0
31	5	4	0	88	1	1	0
32	7	2	1	92	1	0	0
33	0	1	0	94	1	0	0
34	1	0	0	95	0	0	1
35	41	5	4	96	0	1	0
36	1	2	1	98	1	0	1
37	1	1	0	99	0	1	0
38	4	2	0	106	2	0	0
39	2	0	1	112	1	0	0
40	2	0	0	119	3	0	0
42	14	3	2	122	1	1	0
43	4	0	0	123	1	1	1
44	1	1	0	124	1	0	0
45	3	5	0	125	1	1	0
46	5	4	0	127	0	1	0
48	1	0	0	134	1	0	0
49	9	0	0	146	1	0	0
50	3	2	0	151	1	0	0
51	0	1	0	156	1	0	0
52	2	0	0	161	1	1	0
53	3	2	0	171	0	1	0
54	1	0	0	186	1	0	0
55	0	1	0	189	1	0	0
56	9	1	0	255	1	0	0
58	3	0	0	267	0	1	0
59	1	0	0	270	1	1	0
60	1	2	0	288	0	1	0
61	1	1	0	293	1	1	0
62	1	0	0	318	0	1	0
63	5	0	0				
64	1	0	0				
65	3	1	0				

Tabelle 7.3: Ermittelte Daten aus der Coiled-Coil Analyse der Cytoskelett-, hydrogenosomalen- und randomisierten Protein-Datensätze in Bezug zu Abbildung 5.4B und 5.5B (Kap. 5.4). Aminosäuren; aa.

**Tabelle 7.4: Ermittelte Daten aus der Analyse repetitiver Motive der Cytoskelett-, hydrogenosomal- und randomisierten Protein-Datensätze in Bezug zu Abbildung 5.4C und 5.5C (Kap. 5.4).**

<b>Anzahl repetitiver Motive</b>	<b>Cytoskelett-Proteine (CYT)</b>	<b>Hydrogenosomale Proteine (HYD)</b>	<b>Randomisierte Proteine (RDM)</b>
0	108	210	148
1	66	63	39
2	20	18	12
3	7	6	3
4	2	1	1
5	0	1	0
6	0	1	0
7	0	1	0

## 8. Abkürzungsverzeichnis

~	Circa	NCBI	National Center of Biotechnology Information
Å	Angstroem	nm	Nanometer
Abb.	Abbildung	OD	Optische Dichte
ATP	Adenosintriophosphat	ORFs	Open Reading Frames
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	OsO <sub>4</sub>	Osmiumtetroxid
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum	PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
bp	Basenpaar	PEG	Polyethylenglycol
BSA	Bovine Serum Albumin	Pf	Parabasale Filamente
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid	PBS	Phosphate-buffered saline
Da	Dalton (Atomare Masseneinheit)	PCR	Polymerase Chain Reaction
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol	pH	-log <sub>10</sub> (H <sup>+</sup> )
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNA	Ribonucleic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphat	PSM	Peptide Spectrum Matches
dt.	Deutsch	P/S	Penicillin/Streptomycin
DTT	Dithiothreitol	ppm	parts per million
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Rpm	rounds per minute
engl.	Englisch	RT	Raumtemperatur
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
et al	Und andere	TBS-T	Tris-buffered saline + Tween20
Fd	Farad (Einheit, elektr. Kapazität)	TEMED	Tetramethylethylendiamin
g	Gramm	TrichDB	Trichomonas Genome Database
xg	Erdbeschleunigung [9,81 m x s <sup>-1</sup> ]	TYM	Trypton Yeast Extract
gr.	Griechisch		Maltose Medium
G418	Geneticin	sec	Sekunde
GFP	Green Fluorescence Protein	SCS	Succinyl-CoA-Synthetase
GTP	Guanosintriophosphat	syn.	Synonym
h	Stunde	Tab.	Tabelle
H <sub>2</sub> O	Wasser	TEM	Transmissionselektronen-Mikroskop
HCL	Salzäure	U	Units
IF	Intermediär Filamente	V	Volt (elektrische Spannung)
°C	Grad Celsius	v	Volumen
HA	Hämagglutinin	v/v	Volumenprozent
i.a.	Inter alia	w/v	Gewichtsprozent
K	Kilo	z.B.	Zum Beispiel
Kap.	Kapitel		
KCL	Kaliumchlorid		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat		
KOG	Eukaryotic Orthologous Groups database		
LB	Lysogeny broth, Bakterienmedium		
LECA	Last Eukaryotic Common Ancestor		
M	Mol pro Liter		
Mbp	Megabasenpaare		
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid		
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat		
min	Minute		
ml	Milliliter		
mM	Millimolar		
MFWB	Multiplex Fluorescence Western Blot		
mRNA	Messenger RNA		
MWt	Mann-Whitney test		
m/z	Mass to charge ratio (ESI-MS, Einheit)		
NaCl	Natriumchlorid		
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumphosphat		
NCM	Nitrocellulosemembran		

## 9. Literaturverzeichnis

**Adl SM, Leander BS, Simpson AGB, Archibald JM, Anderson OR, Bass D, Bowser SS, Brugerolle G, Farmer MA, Karpov S, Kolisko M, Lane CE, Lodge DJ, Mann DG, Meisterfeld R, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Smirnov AV, Spiegel F** (2007) Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst Biol* **56**:684–689.

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

**Aebi U, Cohn J, Buhle L, Gerace L** (1986) The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* **323**:560–564.

**Afzan MY, Suresh K** (2012) Pseudocyst forms of *Trichomonas vaginalis* from cervical neoplasia. *Parasitol Res* **111**:371–381.

**Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H** (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**:5301–5317.

**Akhmanova A, Steinmetz MO** (2015) Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Bio* **16**:711–726.

**Alonso RA, Peattie DA** (1992) Nucleotide sequence of a second alpha giardin gene and molecular analysis of the alpha giardin genes and transcripts in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* **50**:95–104.

**Alper JD, Decker F, Agana B, Howard J** (2014) The motility of axonemal dynein is regulated by the tubulin code. *Biophys J* **107**:2872–2880.

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

**Amin A, Liebhart D, Weissenbock H, Hess M** (2011) Experimental infection of turkeys and chickens with a clonal strain of *Tetratrichomonas gallinarum* induces a latent infection in the absence of clinical signs and lesions. *J Comp Pathol* **144**:55–62.

**Amos WB, Grimstone AV, Rothschild LJ, Allen RD** (1979) Structure, protein-composition and birefringence of the costa – motile flagellar root fiber in the flagellate *Trichomonas*. *J Cell Sci* **35**:139–164.

**Anderson-White BR, Ivey FD, Cheng K, Szatanek T, Lorestani A, Beckers CJ, Ferguson DJ, Sahoo N, Gubbels MJ** (2011) A family of intermediate filament-like proteins is sequentially assembled into the cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol* **13**:18–31.

**Andra K, Lassmann H, Bittner R, Shorny S, Fassler R, Propst F, Wiche G** (1997) Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes Dev* **11**:3143–3156.

- Arroyo R, González-Robles A, Martínez-Palomo A, Alderete JF** (1993) Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion. *Mol Microbiol* **7**:299–309.
- Asenjo AB, Chatterjee C, Tan DY, DePaoli V, Rice WJ, Diaz-Avalos R, Silvestry M, Sosa H** (2013) Structural model for tubulin recognition and deformation by kinesin-13 microtubule depolymerases. *Cell Rep* **3**:759–768.
- Aubusson-Fleury A, Bricheux G, Damaj R, Lemullois M, Coffe G, Donnadiou F, Koll F, Vignes B, Bouchard P** (2013) Epiplasmins and epiplasm in *Paramecium*: the building of a submembraneous cytoskeleton. *Protist* **164**:451–469.
- Aurrecoechea C, Brestelli J, Brunk BP, Carlton JM, Dommer J, Fischer S, Gajria B, Gao X, Gingle A, Grant G, Harb OS, Heiges M, Innamorato F, Iodice J, Kissinger JC, Kraemer E, Li W, Miller JA, Morrison HG, Nayak V, Pennington C, Pinney DF, Roos DS, Ross C, Stoeckert CJ, Jr., Sullivan S, Treatman C, Wang H** (2009) GiardiaDB and TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Nucl Acids Res* **37**:526–530.
- Bae SS, Kim J, Kim TS, Yong TS, Park SJ** (2009) *Giardia lamblia*: immunogenicity and intracellular distribution of GHSP-115, a member of the *Giardia* head-stalk family of proteins. *Exp Parasitol* **122**:11–16.
- Baines A, Gull K** (2008) WCB is a C2 domain protein defining the plasma membrane – sub-pellicular microtubule corset of kinetoplastid parasites. *Protist* **159**:115–125.
- Baldauf SL** (2008) An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *J Syst Evol* **46**:263–273.
- Baum J, Papenfuss AT, Baum B, Speed TP, Cowman AF** (2006) Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat Rev Microbiol* **4**:621–628.
- Ben-Harush K, Wiesel N, Frenkiel-Krispin D, Moeller D, Soreq E, Aebi U, Herrmann H, Gruenbaum Y, Medalia O** (2009) The supramolecular organization of the *C. elegans* nuclear lamin filament. *J Mol Biol* **386**:1392–1402.
- Benchimol M, Diniz JA, Ribeiro K** (2000) The fine structure of the axostyle and its associations with organelles in *Trichomonads*. *Tissue Cell* **32**:178–187.
- Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J** (2014) Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev* **94**:235–263.
- Boettcher B, Barral Y** (2013) The cell biology of open and closed mitosis. *Nucleus* **4**:160–165.
- Bouchard P, Chomilier J, Ravet V, Mornon JP, Vignes B** (2001) Molecular characterization of the major membrane skeletal protein in the ciliate *Tetrahymena pyriformis* suggests n-plication of an early evolutionary intermediate filament protein subdomain. *J Cell Sci* **114**:101–110.
- Bricheux G, Coffe G, Brugerolle G** (2007) Identification of a new protein in the centrosome-like "attractophore" of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* **153**:133–140.

- Brimmer A, Weber K** (2000) The cDNA sequences of three tetrins, the structural proteins of the *Tetrahymena* oral filaments, show that they are novel cytoskeletal proteins. *Protist* **151**:171–180.
- Brinkley BR** (1985) Microtubule Organizing Centers. *Annu Rev Cell Biol* **1**:145–172.
- Brown JH, Cohen C, Parry DAD** (1996) Heptad breaks in alpha-helical coiled coils: Stutters and stammers. *Proteins* **26**:134–145.
- Brugerolle G** (1991) Flagellar and cytoskeletal systems in amitochondrial flagellates: Archamoeba, Metamonada and Parabasala. *Protoplasma* **164**:70–90.
- Brugerolle G, Viscogliosi E** (1994) Organization and composition of the striated roots supporting the golgi-apparatus, the so-called parabasal apparatus, in parabasalid flagellates. *Biol Cell* **81**:277–285.
- Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UCM, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Muller S, Dessi D, Fiori PL, Ren QH, Paulsen I, Zhang HB, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M, Okumura CY, Schneider R, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Perteua M, Feldblyum TV, Utterback TR, Shu CL, Osoegawa K, de Jong PJ, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik SB, Logsdon JM, Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzberg SL, Tang P, Chiu CH, Lee YS, Embley TM, Coombs GH, Mottram JC, Tachezy J, Fraser-Liggett CM, Johnson PJ** (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* **315**:207–212.
- Carpenter K, Horak A, Chow L, Keeling P** (2011) Symbiosis, morphology, and phylogeny of Hoplonymphidae (Parabasalia) of the wood-feeding roach *Cryptocercus punctulatus*. *J Eukaryot Microbiol* **58**:426–436.
- Cepicka I, Hampl V, Kulda J** (2010) Critical taxonomic revision of parabasalids with description of one new genus and three new species. *Protist* **161**:400–433.
- Cepicka I, Kutigova K, Tachezy J, Kulda J, Flegr J** (2005) Cryptic species within the *Tetratrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism. *Vet Parasitol* **128**:11–21.
- Chang L, Goldman RD** (2004) Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Bio* **5**:601–613.
- Chernyatina AA, Nicolet S, Aebi U, Herrmann H, Strelkov SV** (2012) Atomic structure of the vimentin central alpha-helical domain and its implications for intermediate filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:13620–13625.
- Choi J, Ha CM, Choi EJ, Jeong CS, Park JW, Baik JH, Park JY, Costa ME, Ojeda SR, Lee BJ** (2008) Kinesin superfamily-associated protein 3 is preferentially expressed in glutamatergic neurons and contributes to the excitatory control of female puberty. *Endocrinology* **149**:6146–6156.
- Clark CG, Diamond LS** (2002) Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* **15**:329–341.

- Coffe G, Le Caer JP, Lima O, Adoutte A** (1996) Purification, in vitro reassembly, and preliminary sequence analysis of epiplasmins, the major constituent of the membrane skeleton of *Paramecium*. *Cell Motil Cytoskeleton* **34**:137–151.
- Coulombe PA, Wong P** (2004) Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol* **6**:699–706.
- Crossley R, Holberton D** (1985) Assembly of 2-5 nm filaments from giardin, a protein associated with cytoskeletal microtubules in *Giardia*. *J Cell Sci* **78**:205–231.
- Crossley R, Holberton DV** (1983) Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *J Cell Sci* **59**:81–103.
- Cudmore SL, Garber GE** (2010) Prevention or treatment: the benefits of *Trichomonas vaginalis* vaccine. *J Infect Public Health* **3**:47–53.
- Damaj R, Pomel S, Bricheux G, Coffe G, Vignes B, Ravet V, Bouchard P** (2009) Cross-study analysis of genomic data defines the ciliate multigenic epiplasmin family: strategies for functional analysis in *Paramecium tetraurelia*. *BMC Evol Biol* **9**:125.
- Dawson SC, Paredez AR** (2013) Alternative cytoskeletal landscapes: cytoskeletal novelty and evolution in basal excavate protists. *Curr Opin Cell Biol* **25**:134–141.
- de Souza W, da Cunha-e-Silva NL** (2003) Cell fractionation of parasitic protozoa: a review. *Mem Instit Oswaldo Cruz* **98**:151–170.
- Debeljak N, Feldman L, Davis KL, Komel R, Sytkowski AJ** (2006) Variability in the immunodetection of His-tagged recombinant proteins. *Anal Biochem* **359**:216–223.
- 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**:4716–4720.
- Desouza M, Gunning P, Stehn J** (2012) The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis. *Bioarchitecture* **2**:75–87.
- Diamond LS** (1957) The establishment of various *Trichomonads* of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol* **43**:488–490.
- Dingle AD, Larson DE** (1981) Structure and protein-composition of the striated flagellar rootlets of some protists. *Biosystems* **14**:345–358.
- Dodemont H, Riemer D, Weber K** (1990) Structure of an invertebrate gene encoding cytoplasmic intermediate filament (IF) proteins – implications for the origin and the diversification of IF proteins. *EMBO J* **9**:4083–4094.
- Dominguez R, Holmes KC** (2011) Actin structure and function. *Annu Rev Biophys* **40**:169–186.
- Dundr M, Ospina JK, Sung MH, John S, Upender M, Ried T, Hager GL, Matera AG** (2007) Actin-dependent intranuclear repositioning of an active gene locus in vivo. *J Cell Biol* **179**:1095–1103.

- El-Haddad H, Przyborski JM, Kraft LGK, 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**:932–940.
- Elmendorf HG, Dawson SC, McCaffery M** (2003) The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol* **33**:3–28.
- Elmendorf HG, Rohrer SC, Khoury RS, Bouttenot RE, Nash TE** (2005) Examination of a novel head-stalk protein family in *Giardia lamblia* characterised by the pairing of ankyrin repeats and coiled-coil domains. *Int J Parasitol* **35**:1001–1011.
- Embley TM, Martin W** (2006) Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* **440**:623–630.
- Engelhardt VA, Ljubimowa MN** (1939) Myosin and adenosine triphosphatase. *Nature* **144**:668–669.
- Erber A, Riemer D, Hofemeister H, Bovenschulte M, Stick R, Panopoulou G, Lehrach H, Weber K** (1999) Characterization of the *Hydra* lamin and its gene: a molecular phylogeny of metazoan lamins. *J Mol Evol* **49**:260–271.
- Erickson HP, Taylor DW, Taylor KA, Bramhill D** (1996) Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:519–523.
- Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, Goldman RD** (2009) Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest* **119**:1763–1771.
- Feliziani C, Merino MC, Rivero MR, Hellman U, Pistoiresi-Palencia MC, Ropolo AS** (2011) Immunodominant proteins alpha-1 giardin and beta-giardin are expressed in both assemblages A and B of *Giardia lamblia*. *BMC Microbiol* **11**:233.
- Fletcher DA, Mullins D** (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**:485–492.
- Foisner R, Wiche G** (1991) Intermediate filament-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* **3**:75–81.
- Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D** (2006) New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:3681–3686.
- Fuchs E, Weber K** (1994) Intermediate filaments – structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* **63**:345–382.
- Galati DF, Bonney S, Kronenberg Z, Clarissa C, Yandell M, Elde NC, Jerka-Dziadosz M, Giddings TH, Frankel J, Pearson CG** (2014) DisAp-dependent striated fiber elongation is required to organize ciliary arrays. *J Cell Biol* **207**:705–715.
- Garg S, Stoelting J, Zimorski V, Rada P, Tachezy J, Martin W, Gould S** (2015) Conservation of transit peptide-independent protein import into the mitochondrial and hydrogenosomal matrix. *Genome Biol Evol* **7**:2716–2726.

- Geimer S, Clees J, Melkonian M, Lechtreck KF** (1998a) A novel 95-kD protein is located in a linker between cytoplasmic microtubules and basal bodies in a green flagellate and forms striated filaments in vitro. *J Cell Biol* **140**:1149–1158.
- Geimer S, Lechtreck KF, Melkonian M** (1998b) A novel basal apparatus protein of 90 kD (BAp90) from the flagellate green alga *Spermatozopsis similis* is a component of the proximal plates and identifies the d-(dexter) surface of the basal body. *Protist* **149**:173–184.
- Goldman R, Goldman A, Green K, Jones J, Lieska N, Yang HY** (1985) Intermediate filaments: possible functions as cytoskeletal connecting links between the nucleus and the cell-surface. *Ann N Y Acad Sci* **455**:1–17.
- Goldman RD, Cleland MM, Murthy SNP, Mahammad S, Kuczmarski ER** (2012) Inroads into the structure and function of intermediate filament networks. *J Struct Biol* **177**:14–23.
- Goldman RD, Khuon S, Chou YH, Opal P, Steinert PM** (1996) The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol* **134**:971–983.
- Gould SB, Kraft LGK, van Dooren GG, Goodman CD, Ford KL, Cassin AM, Bacic A, McFadden GI, Waller RF** (2011) Ciliate pellicular proteome identifies novel protein families with characteristic repeat motifs that are common to alveolates. *Mol Biol Evol* **28**:1319–1331.
- Gould SB, 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**:1219–1230.
- Gould SB, Woehle C, Kusdian G, Landan G, Tachezy J, Zimorski V, Martin WF** (2013) Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *Int J Parasitol* **43**:707–719.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng QD, Chen ZH, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A** (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* **29**:644–652.
- Green KJ, Bohringer M, Gocken T, Jones JCR** (2005) Intermediate filament associated proteins. *Adv Protein Chem* **70**:143–202.
- Grosse R, Vartiainen M** (2013) To be or not to be assembled: progressing into nuclear actin filaments. *Nat Rev Moll Cell Biol* **14**:693–697.
- Gubbels MJ, Wieffer M, Striepen B** (2004) Fluorescent protein tagging in *Toxoplasma gondii*: identification of a novel inner membrane complex component conserved among Apicomplexa. *Mol Biochemical Parasitol* **137**:99–110.
- Guerette D, Khan PA, Savard PE, Vincent M** (2007) Molecular evolution of type VI intermediate filament proteins. *BMC Evol Biol* **7**:164.
- Guo LF, Degenstein L, Dowling J, Yu QC, Wollmann R, Perman B, Fuchs E** (1995) Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength and cell-migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. *Cell* **81**:233–243.

- Hagen KD, Hirakawa MP, House SA, Schwartz CL, Pham JK, Cipriano MJ, De la Torre MJ, Sek AC, Du G, Forsythe BM, Dawson SC** (2011) Novel structural components of the ventral disc and lateral crest in *Giardia intestinalis*. *PLoS Negl Trop Dis* **5**:e1442.
- Hampl V, Hug L, Leigh JW, Dacks JB, Lang BF, Simpson AGB, Roger AJ** (2009) Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:3859–3864.
- Hanson J, Lowy J** (1963) The structure of F-actin and the actin filaments isolated from muscle. *J Mol Biol* **6**:46–60.
- Hartman MA, Spudich JA** (2012) The myosin superfamily at a glance. *J Cell Sci* **125**:1627–1632.
- Hartwell LH** (1971) Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res* **69**:265–276.
- Hartwell LH, Hopfield JJ, Leibler S, Murray AW** (1999) From molecular to modular cell biology. *Nature* **402**:47–52.
- Hartwig S, Goeddeke S, Poschmann G, Dicken HD, Jacob S, Nitzgen U, Passlack W, Stuhler K, Ouwens DM, Al-Hasani H, Knebel B, Kotzka J, Lehr S** (2014) Identification of novel adipokines differential regulated in C57BL/Ks and C57BL/6. *Arch Physiol Biochem* **120**:208–215.
- Hatzfeld M, Weber K** (1990) The coiled coil of in vitro assembled keratin filaments is a heterodimer of type I and type II keratins: use of site-specific mutagenesis and recombinant protein expression. *J Cell Biol* **110**:1199–1210.
- Heger A, Holm L** (2000) Rapid automatic detection and alignment of repeats in protein sequences. *Proteins* **41**:224–237.
- Helfand BT, Mendez MG, Murthy SNP, Shumaker DK, Grin B, Mahammad S, Aebi U, Wedig T, Wu YI, Hahn KM, Inagaki M, Herrmann H, Goldman RD** (2011) Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia. *Mol Biol Cell* **22**:1274–1289.
- Herrmann H, Strelkov SV** (2011) History and phylogeny of intermediate filaments: now in insects. *BMC Biol* **9**:16.
- Herrmann H, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U** (2009) Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest* **119**:1772–1783.
- Hess M, McDougald L** (2013) Histomoniasis (Blackhead) and other protozoan diseases of the intestinal tract. In D.E. Swayne, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L. K. Nolan, D.L. Suarez and V.L. Nair. *Diseases of Poultry* 13th edn:1172–1182.
- Heukeshoven J, Dernick R** (1988) Increased sensitivity for coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem Development Unit. *Electrophoresis* **9**:60–61.
- Hicks MR, Holberton DV, Kowalczyk C, Woolfson DN** (1997) Coiled-coil assembly by peptides with non-heptad sequence motifs. *Fold Des* **2**:149–158.

- Hicks MR, Walshaw J, Woolfson DN** (2002) Investigating the tolerance of coiled-coil peptides to nonheptad sequence inserts. *J Struct Biol* **137**:73–81.
- Hirt RP** (2013) *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. *Sex Transm Infect* **89**:439–443.
- Hirt RP, Sherrard J** (2015) *Trichomonas vaginalis* origins, molecular pathobiology and clinical considerations. *Curr Opin Infect Dis* **28**:72–79.
- Hobbs MM, Kazembe P, Reed AW, Miller WC, Nkata E, Zimba D, Daly CC, Chakraborty H, Cohen MS, Hoffman I** (1999) *Trichomonas vaginalis* as a cause of urethritis in Malawian men. *Sex Transm Dis* **26**:381–387.
- Holberton D, Baker DA, Marshall J** (1988) Segmented alpha-helical coiled-coil structure of the protein giardin from the *giardia* cytoskeleton. *J Mol Biol* **204**:789–795.
- Honigberg BM** (1963) Evolutionary and systematic relationships in flagellate order Trichomonadida Kirby. *J Protozool* **10**:20–63.
- Honigberg BM, Brugerolle G** (1990) Trichomonads parasitic in humans, in: Honigberg BM (ed) Springer-Verlag, New York, pp. 2–35.
- Honigberg BM, Mattern CFT, Daniel WA.** (1971) Fine structure of the mastigont system in *Tritrichomonas foetus* (Riedmueller). *J Protozool* **18**:183–198.
- Hrdy I, Hirt RP, Dolezal P, Bardonova L, Foster PG, Tachezy J, Embley TM** (2004) *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* **432**:618–622.
- Hu K, Johnson J, Florens L, Fraunholz M, Suravajjala S, DiLullo C, Yates J, Roos DS, Murray JM** (2006) Cytoskeletal components of an invasion machine – the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* **2**:121–138.
- Huber F, Schnauss J, Ronicke S, Rauch P, Muller K, Futterer C, Kas J** (2013) Emergent complexity of the cytoskeleton: from single filaments to tissue. *Adv Phys* **62**:1–112.
- Hussein EM, Atwa MM** (2008) Infectivity of *Trichomonas vaginalis* pseudocysts inoculated intra-vaginally in mice. *J Egypt Soc Parasitol* **38**:749–762.
- Huttenlauch I, Geisler N, Plessmann U, Peck RK, Weber K, Stick R** (1995) Major epiplasmic proteins of ciliates are articulins: cloning, recombinant expression, and structural characterization. *J Cell Biol* **130**:1401–1412.
- Huttenlauch I, Peck RK, Stick R** (1998) Articulins and epiplasmins: two distinct classes of cytoskeletal proteins of the membrane skeleton in protists. *J Cell Sci* **111**:3367–3378.
- Ishikawa H, Bischoff R, Holtzer H** (1968) Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J Cell Biol* **38**:538–555.
- Jesus JB, Vannier-Santos MA, Britto C, Godefroy P, Silva FC, Pinheiro AAS, Rocha-Azevedo B, Lopes AHCS, 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**:369–377.

- Katris NJ, van Dooren GG, McMillan PJ, Hanssen E, Tilley L, Waller RF** (2014) The apical complex provides a regulated gateway for secretion of invasion factors in *Toxoplasma*. *PLoS Pathog* **10**:e1004074.
- Kemp RL, Reid WM** (1965) Pathogenicity studies on *Trichomonas gallinarum* in domestic poultry. *Poultry Sci* **44**:215–221.
- Kim S, Coulombe PA** (2007) Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev* **21**:1581–1597.
- Kirmse R, Portet S, Mucke N, Aebi U, Herrmann H, Langowski J** (2007) A quantitative kinetic model for the in vitro assembly of intermediate filaments from tetrameric vimentin. *J Biol Chem* **282**:18563–18572.
- Kissinger P** (2015) *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infect Dis* **15**:307.
- Kloetzel JA, Baroin-Tourancheau A, Miceli C, Barchetta S, Farmer J, Banerjee D, Fleury-Aubusson A** (2003) Plateins: a novel family of signal peptide-containing articulins in euplotid ciliates. *J Eukaryot Microbiol* **50**:19–33.
- Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA** (2011) Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Bio* **12**:709–721.
- Kollmar M** (2015) Polyphyly of nuclear lamin genes indicates an early eukaryotic origin of the metazoan-type intermediate filament proteins. *Sci Rep* **5**:10652.
- Koonin EV, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Krylov DM, Makarova KS, Mazumder R, Mekhedov SL, Nikolskaya AN, Rao BS, Rogozin IB, Smirnov S, Sorokin AV, Sverdlov AV, Vasudevan S, Wolf YI, Yin JJ, Natale DA** (2004) A comprehensive evolutionary classification of proteins encoded in complete eukaryotic genomes. *Genome Biol* **5**:R7.
- Koreny L, Field MC** (2016) Ancient eukaryotic origin and evolutionary plasticity of nuclear lamina. *Genome Biol Evol* **8**:2663–2671.
- Kreplak L, Herrmann H, Aebi U** (2008) Tensile properties of single desmin intermediate filaments. *Biophys J* **94**:2790–2799.
- Kress H, Stelzer EHK, Holzer D, Buss F, Griffiths G, Rohrbach A** (2007) Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:11633–11638.
- Krüger A, Batsios P, Baumann O, Luckert E, Schwarz H, Stick R, Meyer I, Graf R** (2012) Characterization of NE81, the first lamin-like nucleoskeleton protein in a unicellular organism. *Mol Biol Cell* **23**:360–370.
- Kühne W** (1859) Untersuchungen über Bewegungen und Veränderungen der contractilen Substanzen. *Arch Anat Physiol Wissensch Med* 748–835.
- Kulda J, Nohýnková E, Ludvík J** (1986) Basic structure and function of the *Trichomonad* cell. *Acta Univ Carol Biol* **30**:181–198.

- Kulda J, Suchánková E, Svoboda S** (1974) Studies on pathogenicity of *Tetratrichomonas gallinarum* in mice and turkey poults. *Acta Vet Brno* **43**:53–64.
- Kull FJ, Sablin EP, Lau R, Fletterick RJ, Vale RD** (1996) Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* **380**:550–555.
- Kusdian G, Gould SB** (2014) The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection. *Mol Biochemical Parasitol* **198**:92–99.
- Kusdian G, Woehle C, Martin WF, Gould SB** (2013) The actin-based machinery of *Trichomonas vaginalis* mediates flagellate-amoeboid transition and migration across host tissue. *Cell Microbiol* **15**:1707–1721.
- Lacroix B, van Dijk J, Gold ND, Guizetti J, Aldrian-Herrada G, Rogowski K, Gerlich DW, Janke C** (2010) Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol* **189**:945–954.
- Laemmli U** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
- Lechtreck KF, Melkonian M** (1991) Striated microtubule-associated fibers: identification of assemblin, a novel 34-kD protein that forms paracrystals of 2-nm filaments in vitro. *J Cell Biol* **115**:705–716.
- Lechtreck KF, Melkonian M** (1998) SF-assemblin, striated fibers, and segmented coiled coil proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* **41**:289–296.
- Lechtreck KF, Rostmann J, Grunow A** (2002) Analysis of Chlamydomonas SF-assemblin by GFP tagging and expression of antisense constructs. *J Cell Sci* **115**:1511–1522.
- Lee KE, Kim JH, Jung MK, Arai T, Ryu JS, Han SS** (2009) Three-dimensional structure of the cytoskeleton in *Trichomonas vaginalis* revealed new features. *J Electron Microsc* **58**:305–313.
- Letunic I, Doerks T, Bork P** (2015) SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res* **43**:D257–D260.
- Leung CL, Green KJ, Liem RKH** (2002) Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends Cell Biol* **12**:37–45.
- Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S** (2005) Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr Purif* **41**:98–105.
- Liebhart D, Neale S, Garcia-Rueda C, Wood AM, Bilic I, Wernsdorf P, Jaskulska B, Hess M** (2014) A single strain of *Tetratrichomonas gallinarum* causes fatal typhlohepatitis in red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to be distinguished from histomonosis. *Avian Pathol* **43**:473–480.
- Liu JF, Rost B** (2001) Comparing function and structure between entire proteomes. *Protein Sci* **10**:1970–1979.

- Lopes LC, Ribeiro KC, Benchimol M** (2001) Immunolocalization of tubulin isoforms and post-translational modifications in the protists *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Histochem Cell Biol* **116**:17–29.
- Lowe J, Amos LA** (1998) Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**:203–206.
- Lupas A, Vandyke M, Stock J** (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**:1162–1164.
- Lupas AN, Gruber M** (2005) The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv Protein Chem* **70**:37–78.
- Mann T, Beckers C** (2001) Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **115**:257–268.
- Mann T, Gaskins E, Beckers C** (2002) Proteolytic processing of TgIMC1 during maturation of the membrane skeleton *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* **277**:41240–41246.
- Marrs JA, Bouck GB** (1992) The two major membrane skeletal proteins (articulins) of *Euglena gracilis* define a novel class of cytoskeletal proteins. *J Cell Biol* **118**: 1465–1475.
- Marshall J, Holberton DV** (1993) Sequence and structure of a new coiled-coil protein from a microtubule bundle in *Giardia*. *J Mol Biol* **231**:521–530.
- Marshall J, Holberton DV** (1995) *Giardia* gene predicts a 183 kDa nucleotide-binding head-stalk protein. *J Cell Sci* **108**:2683–2692.
- Martin C, Robertson M** (1911) Further observations on the caecal parasites of fowls, with some reference to the rectal fauna of other vertebrates Part 1. *Q J Microsc Sci* **57**:53–81.
- Mason JM, Arndt KM** (2004) Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem* **5**:170–176.
- Mattern C, Honigberg B, Daniel W** (1967) The mastigont system of *Trichomonas gallinae* (Rivolta) as revealed by electron microscopy. *J Protozool* **14**: 320–339.
- Mattila PK, Lappalainen P** (2008) Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Bio* **9**:446–454.
- McClelland RS, Sangare L, Hassan WM, Lavreys L, Mandaliya K, Kiarie J, Ndinya-Achola J, Jaoko W, Baeten JM** (2007) Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *J Infect Dis* **195**:698–702.
- McConnell SJ, Yaffe MP** (1993) Intermediate filament formation by a yeast protein essential for organelle inheritance. *Science* **260**:687–689.
- Minguez A, Franca S, Delaespina SMD** (1994) Dinoflagellates have a eukaryotic nuclear matrix with lamin-like proteins and topoisomerase II. *J Cell Sci* **107**:2861–2873.
- Mohri H, Inaba K, Ishijima S, Baba SA** (2012) Tubulin-dynein system in flagellar and ciliary movement. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **88**:397–415.

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain-reaction. *Cold Spring Harb Sym* **51**:263–273.
- Nelsen EM, Williams NE, Yi H, Knaak J, Frankel J** (1994) Fenestrin and conjugation in *Tetrahymena thermophila*. *J Eukaryot Microbiol* **41**:483–495.
- Neradil J, Veselska R** (2015) Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci* **106**:803–811.
- Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, Stevens G, Gottlieb S, Kiarie J, Temmerman M** (2015) Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. *PLoS ONE* **10**:e0143304.
- Nielsen M, Ludvik J, Nielsen R**, (1966) On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis* Donn . *J Microsc (Paris)* **5**:229–250.
- Noda S, Mantini C, Meloni D, Inoue JI, Kitade O, Viscogliosi E, Ohkuma M** (2012) Molecular phylogeny and evolution of parabasalia with improved taxon sampling and new protein markers of actin and elongation factor-1 alpha. *PLoS ONE* **7**:e29938.
- Nohria A, Alonso RA, Peattie DA** (1992) Identification and characterization of gamma-giardin and the gamma-giardin gene from *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* **56**:27–38.
- Odronitz F, Kollmar M** (2007) Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol* **8**:R196.
- Oshima RG** (2007) Intermediate filaments: a historical perspective. *Exp Cell Res* **313**:1981–1994.
- Palm D, Weiland M, McArthur AG, Winiacka-Krusnell J, Cipriano MJ, Birkeland SR, Pacocha SE, Davids B, Gillin F, Linder E, Svard S** (2005) Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol Biochem Parasitol* **141**:199–207.
- Palm JED, Weiland MEL, Griffiths WJ, Ljungstrom I, Svard SG** (2003) Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *J Infect Dis* **187**:1849–1859.
- Paredes AR, Assaf ZJ, Sept D, Timofejeva L, Dawson SC, Wang CJR, Cande WZ** (2011) An actin cytoskeleton with evolutionarily conserved functions in the absence of canonical actin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:6151–6156.
- Pasha SN, Meenakshi I, Sowdhamini R** (2016) Revisiting myosin families through large-scale sequence searches leads to the discovery of new myosins. *Evol Bioinform* **12**:201–211.
- Patterson DJ** (1999) The diversity of eukaryotes. *Am Nat* **154**:S96–S124.
- Peattie DA, Alonso RA, Hein A, Caulfield JP** (1989) Ultrastructural localization of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein-sequence of alpha-giardin. *J Cell Biol* **109**:2323–2335.

- Pereira-Neves A, Ribeiro KC, Benchimol M** (2003) Pseudocysts in trichomonads – new insights. *Protist* **154**:313–329.
- Peter A, Stick R** (2012) Evolution of the lamin protein family: what introns can tell. *Nucleus* **3**:44–59.
- Peter A, Stick R** (2015) Evolutionary aspects in intermediate filament proteins. *Curr Opin Cell Biol* **32**:48–55.
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G** (1998) Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* **11**:300–317.
- Poschmann G, Seyfarth K, Agbo DB, Klafki HW, Rozman J, Wurst W, Wiltfang J, Meyer HE, Klingenspor M, Stuhler K** (2014) High-fat diet induced isoform changes of the Parkinson's disease protein DJ-1. *J Proteome Res* **13**:2339–2351.
- Preisner H, Karin EL, Poschmann G, Stühler K, Pupko T, Gould SB** (2016) The Cytoskeleton of parabasalian parasites comprises proteins that share properties common to intermediate filament proteins. *Protist* **167**:526–543.
- Ribeiro KC, Monteiro-Leal LH, Benchimol M** (2000) Contributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *J Eukaryot Microbiol* **47**:481–492.
- Rice P, Longden I, Bleasby A** (2000) EMBOSS: The European molecular biology open software suite. *Trends Genet* **16**:276–277.
- Roberts TM** (1987) Fine (2-5-nm) filaments: new types of cytoskeletal structures: invited review. *Cell Motil Cytoskel* **8**:130–142.
- Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ** (1992) Foreign gene-expression in yeast: a review. *Yeast* **8**:423–488.
- Rosa ID, de Souza W, Benchimol M** (2013) High-resolution scanning electron microscopy of the cytoskeleton of *Tritrichomonas foetus*. *J Struct Biol* **183**:412–418.
- Rose A, Schraegle SJ, Stahlberg EA, Meier I** (2005) Coiled-coil protein composition of 22 proteomes – differences and common themes in subcellular infrastructure and traffic control. *BMC Evol Biol* **5**:66–85.
- Routledge SJ, Mikaliunaite L, Patel A, Clare M, Cartwright SP, Bawa Z, Wilks MDB, Low F, Hardy D, Rothnie AJ, Bill RM** (2016) The synthesis of recombinant membrane proteins in yeast for structural studies. *Methods* **95**:26–37.
- Ryan CM, de Miguel N, Johnson PJ** (2011) *Trichomonas vaginalis*: current understanding of host-parasite interactions. *Essays Biochem* **51**:161–175.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 2<sup>nd</sup> edition.
- Sazer S, Lynch M, Needleman D** (2014) Deciphering the evolutionary history of open and closed mitosis. *Curr Biol* **24**:R1099–R1103.

- Schafer WR, Trueblood CE, Yang CC, Mayer MP, Rosenberg S, Poulter CD, Kim SH, Rine J** (1990) Enzymatic coupling of cholesterol intermediates to a mating pheromone precursor and to the ras protein. *Science* **249**:1133–1139.
- Sena AC, Miller WC, Hobbs MM, Schwebke JR, Leone PA, Swygard H, Atashili J, Cohen MS** (2007) *Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Infect Dis* **44**:13–22.
- Shiroishi M, Kobayashi T, Ogasawara S, Tsujimoto H, Ikeda-Suno C, Iwata S, Shimamura T** (2011) Production of the stable human histamine H1 receptor in *Pichia pastoris* for structural determination. *Methods* **55**:281–286.
- Silver BJ, Guy RJ, Kaldor JM, Jamil MS, Rumbold AR** (2014) *Trichomonas vaginalis* as a cause of perinatal morbidity: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Dis* **41**:369–376.
- Smith A, Johnson P** (2011) Gene expression in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Res Microbiol* **162**:646–654.
- Snider NT, Omary MB** (2014) Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Bio* **15**:163–177.
- Steinert PM, Chou YH, Prahlad V, Parry DAD, Marekov LN, Wu KC, Jang SI, Goldman RD** (1999) A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. Limited co-assembly in vitro to form heteropolymers with type III vimentin and type IV alpha-internexin. *J Biol Chem* **274**:9881–9890.
- Stirnimann CU, Petsalaki E, Russell RB, Muller CW** (2010) WD40 proteins propel cellular networks. *Trends Biochem Sci* **35**:565–574.
- Sutcliffe S, Giovannucci E, Alderete JF, Chang TH, Gaydos CA, Zenilman JM, de Marzo AM, Willett WC, Platz EA** (2006) Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**:939–945.
- Svitkina TM, Verkhovsky AB, Borisy GG** (1996) Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J Cell Biol* **135**:991–1007.
- Szeverenyi I, Cassidy AJ, Chung CW, Lee BT, Common JEA, Ogg SC, Chen H, Sim SY, Goh WLR, Ng KW, Simpson JA, Chee LL, Eng GH, Li B, Lunny DP, Chuon D, Venkatesh A, Khoo KH, McLean WHI, Lim YP, Lane EB** (2008) The human intermediate filament database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Hum Mutat* **29**:351–360.
- Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, Koonin EV, Krylov DM, Mazumder R, Mekhedov SL, Nikolskaya AN, Rao BS, Smirnov S, Sverdlov AV, Vasudevan S, Wolf YI, Yin JJ, Natale DA** (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* **4**:41.
- Teras J, Roigas E, Kazakova I, Ranne H, Trapido L, Sardis H, Kaal V** (1980) Finding of trichomonads in bronchii, sputum and oral cavity of patients with various lung pathologies. *Terapeut Arkhiv* **52**:123–125.

- Tewari R, Bailes E, Bunting KA, Coates JC** (2010) Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. *Trends Cell Biol* **20**:470–481.
- Tocher JH, Edwards DI** (1994) Evidence for the direct interaction of reduced metronidazole derivatives with DNA bases. *Biochem Pharmacol* **48**:1089–1094.
- Tran JQ, de Leon JC, Li C, Huynh MH, Beatty W, Morrissette NS** (2010) RNG1 is a late marker of the apical polar ring in *Toxoplasma gondii*. *Cytoskeleton* **67**:586–598.
- Trevor KT, Mcguire JG, Leonova EV** (1995) Association of vimentin intermediate filaments with the centrosome. *J Cell Sci* **108**:343–356.
- Tyzzar E** (1920) The flagellate character and reclassification of the parasite producing “blackhead” in turkeys-Histomonas (gen.nov.) *meleagridis* (Smith). *J Parasitol* **6**:124–131.
- Upcroft JA, Dunn LA, Wright JM, Benakli K, Upcroft P, Vanelle P** (2006) 5-Nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. *Antimicrob Agents Ch* **50**:344–347.
- Vallee RB, Williams JC, Varma D, Barnhart LE** (2004) Dynein: an ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol* **58**:189–200.
- van Hemert MJ, Lamers GEM, Klein DCG, Oosterkamp TH, Steensma HY, van Heusden GPH** (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* Fin1 protein forms cell cycle-specific filaments between spindle pole bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:5390–5393.
- Vaughan S, Kohl L, Ngai I, Wheeler RJ, Gull K** (2008) A repetitive protein essential for the flagellum attachment zone filament structure and function in *Trypanosoma brucei*. *Protist* **159**:127–136.
- Verbrugge S, Kapitein LC, Peterman EJG** (2007) Kinesin moving through the spotlight: single-motor fluorescence microscopy with submillisecond time resolution. *Biophys J* **92**:2536–2545.
- Viscogliosi E, Brugerolle G** (1994) Striated fibers in trichomonads: costa proteins represent a new class of proteins forming striated roots. *Cell Motil Cytoskeleton* **29**:82–93.
- Vizcaino JA, Deutsch EW, Wang R, Csordas A, Reisinger F, Rios D, Dianas JA, Sun Z, Farrah T, Bandeira N, Binz PA, Xenarios I, Eisenacher M, Mayer G, Gatto L, Campos A, Chalkley RJ, Kraus HJ, Albar JP, Martinez-Bartolome S, Apweiler R, Omenn GS, Martens L, Jones AR, Hermjakob H** (2014) ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat Biotechnol* **32**:223–226.
- Wade RH** (2009) On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol* **43**:177–191.
- Wang YQ, Zhang XL, Zhang H, Lu Y, Huang HL, Dong XX, Chen JA, Dong JH, Yang X, Hang HY, Jiang TJ** (2012) Coiled-coil networking shapes cell molecular machinery. *Mol Biol Cell* **23**:3911–3922.
- Wang YX, Catlett NL, Weisman LS** (1998) Vac8p, a vacuolar protein with armadillo repeats, functions in both vacuole inheritance and protein targeting from the cytoplasm to vacuole. *J Cell Biol* **140**:1063–1074.

- Weber K, Geisler N, Plessmann U, Bremerich A, Lechtreck KF, Melkonian M** (1993) SF-assemblin, the structural protein of the 2-nm filaments from striated microtubule-associated fibers of algal flagellar roots, forms a segmented coiled-coil. *J Cell Biol* **121**:837–845.
- Weiss HM, Haase W, Michel H, Reilander H** (1995) Expression of functional mouse 5-HT<sub>5A</sub> serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization. *FEBS Lett* **377**:451–456.
- WHO** (2012) Global incidence and prevalence of selected sexually transmitted infections – 2008. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wickstead B, Gull K** (2011) The evolution of the cytoskeleton. *J Cell Biol* **194**:513–525.
- Wloga D, Strzyzewska-Jowko I, Gaertig J, Jerka-Dziadosz M** (2008) Septins stabilize mitochondria in *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryot Cell* **7**:1373–1386.
- Woessner DJ, Dawson SC** (2012) The *Giardia* median body protein is a ventral disc protein that is critical for maintaining a domed disc conformation during attachment. *Eukaryot Cell* **11**:292–301.
- Woolfson DN** (2005) The design of coiled-coil structures and assemblies. *Adv Protein Chem* **70**:79–112.
- Zhang D, Grode KD, Stewman SF, Diaz-Valencia JD, Liebling E, Rath U, Riera T, Currie JD, Buster DW, Asenjo AB, Sosa HJ, Ross JL, Ma A, Rogers SL, Sharp DJ** (2011) *Drosophila* katanin is a microtubule depolymerase that regulates cortical-microtubule plus-end interactions and cell migration. *Nat Cell Biol* **13**:361–370.
- Zhang ZB, Sapiro R, Kapfhamer D, Bucan M, Bray J, Chennathukuzhi V, McNamara P, Curtis A, Zhang M, Blanchette-Mackie EJ, Strauss JF** (2002) A sperm-associated WD repeat protein orthologous to *Chlamydomonas* PF20 associates with Spag6, the mammalian orthologue of *Chlamydomonas* PF16. *Mol Cell Biol* **22**:7993–8004.

## Danksagung

Für die Realisierung dieser Dissertation möchte ich mich bei einigen Menschen bedanken.

An erster Stelle geht ein kräftiges Dankeschön an Herrn Prof. Dr. William F. Martin aka *Chef*. Ich bin froh, dass ich diese Doktorarbeit im Institut für Molekulare Evolution unter optimalen Arbeitsbedingungen absolvieren konnte.

Für die Zuteilung meines Projekts, der zuverlässigen und motivierenden Betreuung sowie das Vertrauen in meine Fähigkeiten gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. Sven B. Gould. Zugleich möchte ich mich auch herzlich bei Frau Dr. Verena Zimorski für ihre nachhaltige und zuverlässige Unterstützung bedanken.

Für eine angenehme Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich weiterhin bei allen Menschen, mit denen ich im Laufe meiner MolEvol-Ära zusammengearbeitet habe.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Mary und Romi danke ich von Herzen, nicht nur für ihre finanzielle und moralische Unterstützung sondern auch für die permanente Förderung meiner Talente. Entgegen der Empfehlung gewisser Lehrer während der Schulzeit, haben sie stets an mich geglaubt und mich zur Ausbildung an der Universität ermutigt und gefördert. Ein herzlicher Dankesgruß geht auch an die Familie Eiffler, an die Familien Preisner in Paris und Thun, an die Familie Roschwig und an die Familie Damschen aus NRW.

Zu guter Letzt grüße ich: Höark & Kerstin, Lokkah, Ardit, Adnan, Soza & Burak, Berhane, Sertac M, Ruthy, Joker & Fem, DanDuff, Alex LIAR, MaltEmpty, Andy H. & Manni, Barry, Gregor R., Faffa, Massi, Arielle, OptyRobert, MO 2.6 & BigB, RobARobert, Manuelly, Womse, Kern, Lüdo, Jörni & Tina, Gary & Hillärini, Eli LK, Nini, Sophie, Jani, Feres, Hoan, Nesli, Togo-Koffi, Eva B., Koplo, Calles, Sascha Grüni, Sabine & Klaus JAB, Lucas W., Keule, Jürgen B., Andy SFP & alle die ich gerade nicht im Kopf aber doch im Herzen habe, so schleimig das klingt...;~)

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich 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“ verfasst wurde. Meine Dissertation wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei anderen Instituten eingereicht. Bisher habe ich keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 12.12.2016

Harald Preisner