

**Identifizierung und funktionelle
Charakterisierung phagosomaler Proteine aus
*Tetrahymena thermophila***



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät der Mathematik und Naturwissenschaften

der Bergischen Universität Wuppertal

angefertigt am

Lehrstuhl für Zoologie und Biologiedidaktik

vorgelegt von

Viktoria Wittich

Wuppertal, im Juni 2014

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20140805-093607-8

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20140805-093607-8>]

Erstgutachter: Prof. Dr. A. Preisfeld

Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Tiedtke

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	XI
2. Einleitung.....	1
2.1. Endozytose	1
2.1.1. Phagozytose.....	2
2.2. <i>Tetrahymena thermophila</i>	7
2.2.1. Genetische Besonderheiten	9
2.2.2. <i>T. thermophila</i> als Modellorganismus.....	10
2.2.3. Phagozytose bei <i>T. thermophila</i>	11
2.3. Phagosomenreifung.....	14
2.4. <i>T. thermophila</i> als Modell für Phagozytose-Studie.....	20
2.5. Zielsetzung der Arbeit	22
3. Material und Methoden.....	24
3.1. Materialien	24
3.1.1. Verwendete Stämme	24
3.1.2. Medien für <i>E. coli</i>	24
3.1.3. Medien für <i>T. thermophila</i>	25
3.1.4. Verwendete Puffer und Lösungen.....	26
3.1.5. Stammlösungen	30
3.1.6. Verwendete Antibiotika	31
3.1.7. Verwendete Chemikalien	31
3.1.8. Verwendete Enzyme	32
3.1.9. Verwendete Protein/DNA Größenstandards	33
3.1.10. Verwendete Kits.....	33
3.1.11. Versuchsmaterialien.....	34
3.1.12. Geräte	34

3.1.13.	Zentrifugen	35
3.1.14.	Datenbanken und Computerprogramme	36
3.1.15.	Verwendete DNA-Sequenzen und <i>Primer</i>	36
3.1.16.	Vektoren	39
3.2.	Methoden.....	40
3.2.1.	Stammhaltung.....	40
3.2.1.1.	Stammkultur (<i>E.coli</i>); dauerhafte Stammhaltung	40
3.2.1.2.	Stammhaltung von <i>Tetrahymena thermophila</i>	40
3.2.1.3.	Bestimmung der Zelldichte bei <i>T. thermophila</i>	41
3.2.2.	Isolierung stadienspezifischer phagosomaler Proteine.....	41
3.2.2.1.	Herstellung von Magneto-Beads	41
3.2.2.2.	Die „pulse-chase“ Markierung von Phagosomen bei <i>T. thermophila</i> -	43
3.2.2.3.	Solubilisierung phagosomaler Proteine	44
3.2.2.4.	Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA).....	45
3.2.2.5.	Bicinchoninsäure (BCA)- Test	45
3.2.3.	Zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese	46
3.2.3.1.	Isoelektrische Fokussierung.....	46
3.2.3.2.	Äquilibrierung und zweite Dimension (SDS-PAGE).....	47
3.2.3.3.	Coomassie-Färbung	48
3.2.4.	<i>Automated Multidimensional Protein Identification Technology</i> : MudPIT	48
3.2.5.	Relative Quantifizierung der mRNA.....	50
3.2.5.1.	RNA-Extraktion und Reverse Transkriptase	50
3.2.5.2.	Quantitative <i>real time PCR</i> (qPCR).....	50
3.2.6.	Grün fluoreszierendes-Protein (GFP)-Fusionsprodukte.....	55
3.2.6.2.	Ausgangsvektor	56
3.2.6.3.	Verwendeter <i>T. thermophila</i> Stamm.....	57

3.2.6.4.	GFP-Fusionsproteine	57
3.2.6.5.	Klonierung von DNA.....	58
3.2.6.6.	Transformation von Bakterien	60
3.2.6.7.	Die <i>biolistic</i> transformation von <i>T. thermophila</i>	61
3.2.6.7.	Selektion und Analyse der transformierten <i>T. thermophila</i> Zellen	63
3.2.6.8.	Lokalisation des GFP-Fusionsproteins	64
4.	Ergebnisse	65
4.1.	Markierung und Isolierung von stadienspezifischen Phagosomen	65
4.2.	MudPIT-Analyse der stadienspezifischen phagosomalen Proteine.....	70
4.2.1.	Klassifizierung von stadienspezifischen Gesamtproteinen	71
4.2.1.1.	Stoffwechsel (Metabolismus)	74
4.2.1.2.	Signaltransduktion	78
4.2.1.3.	Transport	81
4.2.1.4.	Unbekannte biologische Prozesse.....	86
4.2.1.5.	Proteinfaltung.....	88
4.2.1.6.	Diverse Proteine.....	89
4.2.1.7.	Cytoskelett	90
4.2.1.8.	Klassifizierung der stadienspezifischen, hypothetischen Proteine	92
4.3.	Relative Quantifizierung ausgewählter stadienspezifischer Proteine des Phagosoms von <i>T. thermophila</i>	97
4.4.	GFP-Fusionsproteine.....	101
4.4.1.	Erstellung und Überprüfung der GFP-Fusionskonstrukte.....	101
4.4.2.	Transformation von GFP-Fusionsprodukten in <i>E.coli</i>	104
4.4.3.	Transformation von GFP-Fusionsprodukten in <i>T. thermophila</i>	106
4.4.4.	Molekularbiologische Charakterisierung der Transformanten.....	106
4.4.5.	Nachweis der GFP-Fusionskonstrukte via Fluoreszenzmikroskopie.....	108
5.	Diskussion.....	119

5.1.	GFP-Fusionsproteine.....	120
5.2.	Relative Quantifizierung ausgewählter Proteine mittels qPCR	131
5.3.	MudPIT-Analyse	135
5.3.1.	Stadienspezifische phagosomale Proteine.....	140
5.3.1.1.	Metabolismus.....	140
5.3.1.2.	Signaltransduktion	142
5.3.1.3.	Unbekannte biologische Prozesse.....	143
5.3.1.4.	Transport.....	145
5.3.1.5.	Chaperone	147
5.3.1.6.	Diverse Proteine.....	148
5.3.1.7.	Cytoskelett	148
5.3.1.8.	Hypothetische Proteine	149
5.3.1.9.	Nicht phagosomale Proteine	150
5.4.	2 D-Gelelektrophorese	151
6.	Ausblick	154
7.	Literaturverzeichnis	156
8.	Anhang.....	187
8.1.	Ergebnisse der MudPIT-Untersuchung.....	187
8.1.	Verwendete DNA-Sequenzen	216
9.	Danksagung.....	219
	Erklärung.....	221

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Rezeptor-vermittelte Endozytose beispielhaft für LDL	2
Abb. 2: Phagozytose.....	4
Abb. 3: Überlebensstrategien einiger Erreger.	6
Abb. 4: <i>Tetrahymena thermophila</i>	8
Abb. 5: Phagozytoseprozess bei <i>T. thermophila</i>	12
Abb. 6: Ausgangsvektor pMTT1-GPF.....	39
Abb. 7: Detergenz Triton X-114	44
Abb. 8: Separationsmatrix in MudPIT.	48
Abb. 9: Schematische Darstellung der Vorgehensweise mittels MudPIT	49
Abb. 10: konstruktion und Nachweis der GFP-Fusionsproteine in <i>T. thermophila</i>	55
Abb. 11: Ausgangsvektor pMTT1-GFP mit <i>Bluescript backbone</i>	56
Abb. 12: Photographische Darstellung der “Goldkanone”.	61
Abb. 13: Schematische Darstellung der “Goldkanone”.	63
Abb. 14: <i>T. thermophila</i> Zellen nach 30 sek „pulse“ und 5 min „chase“	66
Abb. 15: 30-sek-alten (nascente) Phagosomen	66
Abb. 16: Nascente phagosomale Proteine zum Zeitpunkt 30 sek	68
Abb. 17: Kondensierte phagosomale Proteine zum Zeitpunkt 5 min.....	69
Abb. 18: Klassifizierung von 707 identifizierten, stadienspezifischen Gesamtproteinen.....	72
Abb. 19: SNARE-Mechanismus der Membran- und Vesikelfusion.....	85
Abb. 20:Hypothetische Proteine zu den Zeitpunkten 30 sek und 5 min	92
Abb. 21: Expressionsprofil der Gene VPS 13, SNARE, PHP 1 und PHP 2	99
Abb. 22: Ausgangvektor pMTT 1-GFP: Restriktion MluI und BamHI.....	102
Abb. 23: Konstruktion des finalen Vektors pMTT 1-GFP-PHP 2.....	103
Abb. 24: Konstruktion und Nachweis der Vektoren für GFP-Fusionskonstrukt.....	105
Abb. 25: Nachweis der Integration der Zielgenkassette.....	107
Abb. 26: Lokalisation des GFP-Fusionskonstruktes in lebenden <i>T. thermophila</i> Zellen.	109
Abb. 27: Parentaler Wildtyp CU 522	111
Abb. 28: Nachweis des GFP-Fusionskonstruktes PHP 1	113
Abb. 29: Nachweis des GFP-Fusionskonstruktes PHP 2	114
Abb. 30: Nachweis des GFP-Fusionskonstruktes 14-3-3.....	116
Abb. 31: Nachweis des GFP-Fusionskonstruktes SNARE	117
Abb. 32: Hypothetisches Modell der GFP-Fusionsprotein-Analyse.....	122
Abb. 33: Zuordnung von bekannten Proteinen.	136

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Schema für isoelektrische Fokussierung der IPG-Streifen.....	46
Tab. 2: 12,5% Acrylamidgel nach Laemmli	47
Tab. 3: Pipettierschema für einen Standard-qPCR-Ansatz	54
Tab. 4: PCR-Reaktionsansatz beispielhaft für <i>SNARE domain containing Protein</i>	58
Tab. 5: Pipettierschema für einen Standard-Restriktionsverdau	59
Tab. 7: MudPIT-Ergebnisse	71
Tab. 8: Proteasen und weitere metabolische Protein.....	75
Tab. 9: Ubiquitine und Ubiquitin-Modifikationsproteine	77
Tab. 10: Signaltransduktionsproteine	79
Tab. 11: <i>Second messenger</i> Proteine	80
Tab. 12: Vakuoläre ATPasen	82
Tab. 13: Ionenpumpen, P-Typ-ATPasen und Transport-Proteine.....	83
Tab. 14: Membran-Transport-Proteine	84
Tab. 15: Unbekannte Proteine	86
Tab. 16: Chaperone und Co-Chaperone	89
Tab. 17: Diverse Proteine	90
Tab. 18: Cytoskelettproteine.....	91
Tab. 19: Hypothetische Proteine	94
Tab. 20: Hypothetische Proteine	96
Tab. 21: Bestimmung der Primereffizienzen.	98
Tab. 22: Anhang: Metabolismus und Energiestoffwechsel	187
Tab. 23: Anhang: Signaltransduktion.....	194
Tab. 24: Anhang: Transport	196
Tab. 25: Anahng: Cytoskelett.....	198
Tab. 26: Anhang: Unbekannt biologische Prozesse.....	198
Tab. 27: Anhang: Diverse biologische Prozesse.....	200
Tab. 28: Anahng: Proteinfaltung	201
Tab. 29: Anhang: Hypothetische metabolische Proteine	201
Tab. 30: Anhang: Hypothetische Signaltransduktionsproteine.....	203
Tab. 31: Anhang: Hypothetische Transport-Proteine	204
Tab. 32: Anhang: Hypothetische multiregulatorische Proteine.	205
Tab. 33: Anhang: Hypothetische Cytoskelett Proteine	206
Tab. 34: Anhang: Hypothetische Chaperone	206
Tab. 35: Anhang: Hypothetische ribosomale Proteine.....	206
Tab. 36: Anhang: Hypothetische Proteine mit Homologien zu hypothetischen Proteinen....	207
Tab. 37: Anhang: Hypothetische Proteine ohne bekannten Homologien	216

Abkürzungsverzeichnis

“	Sekunden
‘	Minuten
Abb.	Abbildung
Abs.	absolut
ad	bis
AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Aqua dest.	Aqua destillata
ARP	<i>autonomously replicating piece</i> (autonom replizierende Einheit)
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
ATU	α -Tubulin
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (engl.): Rinderserumalbumin
BTU	β -Tubulin
BTU2	Beta-Tubulin-Gen 2
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa (lat.): ungefähr
cDNA	<i>complementary DNA</i> (engl.): komplementäre DNA
ct	<i>cycle threshold</i> (engl.): Schwellenwert-Zyklus
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	2'-Desoxiribonukleotid-5'-Triphosphate
EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat
EEA 1	<i>early endosomal antigen 1</i>
engl.	englisch

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii/ae/a</i> (und andere)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
EE	frühe endozytotische Vesikel
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GRAS	<i>generally regarded as safe</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (engl.): Hochleistungs- flüssigkeitschromatographie
HSP	<i>heat shock protein</i>
ID	Identifikationsnummer
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
lat.	latein/lateinisch
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LAM	Lipoarabinomannan
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC	<i>liquid chromatography</i> (engl.): Flüssigchromatographie
LE	späte endozytotische Vesikel
LLR	<i>leucine rich repeat</i>
LY	Lysosomen
M	Molar
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

MAC	Makronukleus
MIC	Mikronukleus
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimol
µM	Mikromolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT1	Metallothionein-Gen <i>T1</i>
MudPIT	<i>Multidimensional Protein Identification Technology</i> (engl.): Multidimensionale Proteinidentifikationstechnologie
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar (nmol/L)
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i> (lat.): für die Analyse
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. tetraurelia</i>	<i>Paramecium tetraurelia</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration
PI	Phosphatidylinositol
PI(3)P	PI-3-Phosphat
PI(4,5)P ₂	PI-4,5-bisphosphat
PLA 1	Phospholipase A 1
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rRNA	ribosomale RNA

rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
s.	siehe
SapM	saure Phosphatase <i>M. tuberculosis</i>
SCX	<i>strong cation exchange</i> (engl.): starker Kationen-Austauscher
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (engl.): Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunden
SigD/SopB	Phosphoinosid-Phosphatase <i>S. enterica</i>
SNARE	<i>soluble-N-ethylmaleimide-sensitiv factor-attachment protein receptor</i>
SSU rRNA	18 S rRNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethyldiamin
TfR	Transferrin-Rezeptor
TGD	<i>Tetrahymena</i> Genome Database
TPR	<i>tetracopeptide repeat</i>
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
U	Unit
u. a.	unter anderem
V	Volt
VF	Verdünnungsfaktor
VPS	<i>vacuolar protein sorting</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
z. B.	zum Beispiel
Z/ml	Zellen pro ml

1. Zusammenfassung

Mit Hilfe der 2 D-Gelelektrophorese konnten aus zwei stadienspezifischen Proteinisolierungen aus dem Organismus *T. thermophila* 70 Proteinspots (30 sek) und 30 Proteinspots (5 min) nachgewiesen werden. Eine genauere Überprüfung dieser stadienspezifischen Proteine mit einer MudPIT-Analyse lieferte insgesamt **707** phagosomale Proteine. Nach einer Zuordnung der bekannten Proteine in die funktionellen Gruppen, konnten **335** Proteine als zumindest von der Funktion her bekannte Phagozytose-relevante Proteine bewertet werden. **140** Proteine waren charakteristisch ausschließlich für den Zeitpunkt **30 Sekunden nach Induktion der Phagozytose** und **15** Proteine repräsentierten den Zeitpunkt **5 Minuten** nach Induktion. 118 der insgesamt 372 hypothetischen Proteine des Phagosoms konnten entsprechende biologische Prozesse zugeordnet werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass über 38% der nachgewiesenen Proteine eine entscheidende Rolle im Phagozytoseprozess von *Tetrahymena* spielen könnten, deren Funktion an ausgewählten Proteinen, bzw. deren mRNAs, durch weitere Methoden überprüft werden sollte.

Die Quantifizierung von ausgewählten Proteinen der MudPIT-Analysen mittels der quantitativen PCR (qPCR) erforderte zunächst die Etablierung eines geeigneten qPCR-Systems. Die Analysen bestätigten die Phagozytose-Relevanz in Form von erhöhter mRNA-Expression für die stadienspezifischen Proteine VPS 13 und SNARE, zeigten jedoch eine im Vergleich zur MudPIT-Analyse abweichende Stadien-Zuordnung. Die Resultate der qPCR-Analyse der beiden phagosomalen Proteine PHP 1 und PHP 2 wiesen keine Phagozytose-abhängige erhöhte mRNA-Expression auf. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass keine direkte Korrelation der qPCR- und MudPIT-Ergebnisse besteht. Eine Möglichkeit wäre, dass diese Proteine bereits in der Zelle in einem Vesikel verpackt vorliegen und erst bei initiiertem Phagozytose zu den bestimmten Zellkompartimenten wie Phagosom transportiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sie so schnell translatiert werden, dass sie zwar in der MudPIT-Analyse als Protein erscheinen, aber in der qPCR als mRNA nicht erhöht nachweisbar sind. Insgesamt zeigten die mRNA-qPCR-Ergebnisse bzgl. der Stadienspezifität und der Phagozytose-Relevanz eine umgekehrte Korrelation mit den Protein-MudPIT-Resultaten bei allen untersuchten Proteinen. Zusätzlich deuten die qPCR-Resultate darauf hin, dass diese Proteine nicht ausschließlich phagosomale Funktionen in der Zelle ausüben.

Um die Lokalisation und zeitliche Abhängigkeit zu überprüfen, wurde das *tagging* mittels GFP etabliert. Ein entsprechendes GFP-Fusionsprotein-Konstrukt konnte hergestellt, in die Zellen injiziert und fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden.

Als Zielproteine wurden die vier stadienspezifischen Proteine SNARE, 14-3-3, PHP 1 und PHP 2 mittels *GFP-tagging* ausgewählt. Die Phagosomen-Assoziation zum Zeitpunkt 30 Sekunden nach Induktion der Phagozytose konnte für alle untersuchten Proteine gezeigt werden. Zusätzlich konnten wie Phagosomen-Assoziation in weiteren Zeitstadien im Verlauf der Cyclose (30 Sekunden bis 120 Minuten) nachgewiesen werden. Auf dieser Grundlage wurde ein Modell entwickelt, welches die stadienspezifischen Funktionen der vier ausgewählten Proteine im Prozess Phagozytose darstellt. So konnte gezeigt werden, dass das SNARE-Protein für die Fusionsprozesse am Phagosom zu Beginn (30 Sekunden) und gegen Ende der Cyclose (120 Minuten) verantwortlich ist. Die Bereitstellung der Mikrotubuli, die den Transport des Phagosoms vom Cytostom zum Cytoproct gewährleisten, wird möglicherweise vom 14-3-3-Protein reguliert. Dem PHP 1-Protein wurde eine mögliche Funktion als Protein-Prozessierungs-Enzym bei der Bildung und Reifung des Phagosoms zugeschrieben. Weitere Reifungsprozesse könnten ebenso vom PHP 2-Protein reguliert werden. Die Ergebnisse der Untersuchung zu den Zeitpunkten 30 Sekunden bis 120 min ergaben zusätzlich, dass alle Proteine zu den untersuchten Zeitpunkten auch in anderen Bereichen der Zelle (Nukleus, ER, Cytoproct und Oralapparat) nachweisbar sind. Diese Proteine könnten möglicherweise in verschiedene Aspekte der Phagozytose involviert sein und/oder auch andere Phagozytose-unabhängige zelluläre Funktionen erfüllen.

Mit dem GFP-Fusionsprotein-Nachweis konnten die Ergebnisse der MudPIT-Untersuchung sowie die umgekehrte Korrelation mit den qPCR-Resultaten weitestgehend bestätigt werden.

2. Einleitung

Wie erfolgt die Nahrungsaufnahme bei heterotrophen Organismen? Bei den meisten vielzelligen Tieren ist diese Frage relativ einfach zu beantworten, erfolgt sie doch vorwiegend über einen mehr oder weniger modifizierten Mund. Doch wie funktioniert die Nahrungsaufnahme bei einzelligen Eukaryoten (Protisten)? Welche Mechanismen gibt es und welche Strukturen sind daran beteiligt? Diese Einleitung wird zunächst über die allgemeinen Mechanismen der zellulären Nahrungsaufnahme berichten und dann intensiver auf die Phagozytose in Immunzellen und Einzellern eingehen. Es erfolgt eine Beschreibung des Modellorganismus *Tetrahymena thermophila* (*T. thermophila*) mit besonderer Berücksichtigung seines Phagosoms.

2.1. Endozytose

Die Protisten ernähren sich vorwiegend von Bakterien; diese werden mit Hilfe der Cilien zum Mundfeld befördert (eingestrudelt). Über das Mundfeld gelangen die Bakterien zum Zellmund, wo sie anschließend im Zellschlund durch das Einstülpen der Plasmamembran in eine Nahrungsvakuole verpackt werden. Diesen Stoff- bzw. Flüssigkeitentransport bezeichnet man als Endozytose.

Die entstandene Nahrungsvakuole wird mit Hilfe von verschiedenen Membranbläschen (Endosomen, multivesikuläre Vesikel), die auf den bandartigen Strukturen (Mikrotubuli-Bündel) zur Nahrungsvakuole transportiert werden, vergrößert. Schließlich wird diese vom Zellinneren abgeschnürt und es beginnt der eigentliche Verdauungsprozess. In Folge dessen wird das Innere der Nahrungsvakuole durch Fusionen mit verschiedenen Zellorganellen nach und nach degradiert. Im Zuge einer Fusion mit den Lysosomen, gelangen die lysosomalen Enzyme in das Innere der Vakuole und zersetzen die Nahrung (meist Bakterien). Die verwertbaren Nahrungsstoffe werden resorbiert, während die unverdaulichen Bestandteile über den Zellafter (Cytopyge) ausgeschieden werden. Da die Nahrungsvakuole während des Verdauungsprozesses auf einer elliptischen Bahn durch die Zelle transportiert wird, bezeichnet man den Vorgang als Cyclose.

Es gibt verschiedene Strategien der Endozytose. Besonders gut untersucht ist die **Rezeptor-vermittelte Endozytose** (Goldstein *et al.*, 1985). Dieser Prozess beschreibt die Bewegung der Makromoleküle (Proteine oder Lipide), die an spezifische Rezeptoren gebundenen werden,

von der Zelloberfläche ins Zellinnere. In den Zellen von Mammalia werden auf diese Weise z.B. Komplexe aus Transferrin oder mit Cholesterin beladene Lipoproteine geringer Dichte (LDL) in die Zelle transportiert (Schmid, 1997; Brodsky *et al.*, 2001).

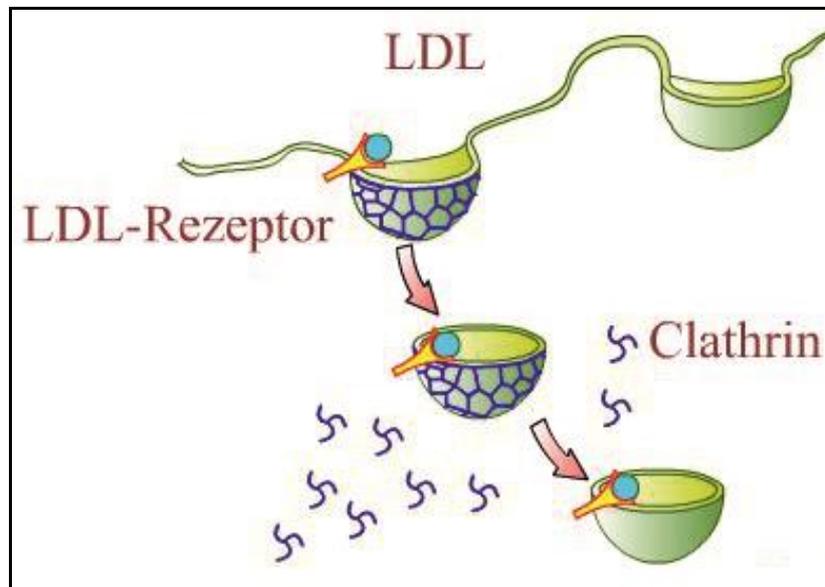


Abb. 1: Rezeptor-vermittelte Endozytose beispielhaft für LDL (<http://www.chemgapedia.de/>). Beschreibung s. Text.

Wie in der Abb. 1 zu erkennen ist, befinden sich die Ligand-Rezeptor-Komplexe in bestimmten Regionen der Zellemembran – Vertiefungen (*pits*). Diese Vertiefungen sind von einer Proteinhülle, welche aus dem Polypeptid Clathrin besteht, umgeben (Pearse & Crowther, 1987). Deshalb werden diese Vertiefungen auch als *clathrin-coated-pits* bezeichnet. Diese Art der Verpackung in die *clathrin-coated-pits* dient einerseits zum Transport in die Zelle und andererseits zum Schutz vor Verunreinigungen durch andere Plasmamembran-Proteine (Bretscher *et al.*, 1980; Bretscher, 1983). Auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose wird genauer im folgenden Kapitel eingegangen.

2.1.1. Phagozytose

Phagozytose stellt einen Spezialfall der Endozytose der eukaryotischen Zellen dar. Dabei werden große Partikel, Bakterien oder Protisten (über 100 nm) in die Zelle eingeschleust und in die Vesikel (Phagosomen) aufgenommen (Silverstein *et al.*, 1989, 1977). Kleinere Partikel sowie gelöste Substanzen werden dagegen durch Pinozytose in die Zelle aufgenommen (Kruth, 2011).

Phagozytose spielt nicht nur bei der Nahrungsaufnahme von eukaryotischen Einzellern wie z. B. beim phagotrophen Ciliaten *Tetrahymena* eine wichtige Rolle (Elliot & Clemmons, 1966; Holz, 1973; Ricketts & Rappit, 1975), sondern ganz besonders auch in dem Immunsystem der Wirbeltiere. Sie setzen Phagozytose in erster Linie als Schutzmechanismus gegen Krankheitserreger und zur Eliminierung von beschädigten Zellmaterialien ein (Aderem & Underhill, 1999). Auf die gleiche Weise werden z. B. mit Hilfe von Leukozyten (Granulozyten und Makrophagen) alte und funktionsuntüchtige Erythrozyten beseitigt.

Der Prozess der Phagozytose auf zellulärer Basis wurde erstmals von Elie Metchnikoff (1882) beschrieben. Seine Ergebnisse (lichtmikroskopische Aufnahme von Seestern-Larven) zeigten, dass die Plasmamembran sich um die Partikel einstülpt und so als einziger „Membranlieferant“ für die Phagosomen gilt (Stossel, 1999). Diese Vorstellung an die Plasmamembran als einzigen Nachschub bestand noch bis zum letzten Jahrhundert, obwohl einige Befunde gegen diese Hypothese sprachen, da für die Phagosomen die benötigte Membranmenge in manchen Fällen die Menge an Plasmamembran überschritten hätte (Desjardins, 2003).

Die Ingestion bzw. Phagozytose gehört zu den Rezeptor-vermittelten, Aktin-abhängigen Prozessen. In diesen aktiven und höchstregulierten Prozess sind viele spezielle Zell-Oberflächen-Rezeptoren und Signalkaskaden involviert, welche die Phagosomenbildung initiieren.

Im Verlauf der Phagozytose unterliegt das Phagosom einigen Veränderungen - auch als **Reifung** bezeichnet. Es handelt sich um ein Ergebnis von zahlreichen Fusions- und Teilungsreaktionen des Phagosoms mit den endozytischen Vesikeln. In der folgenden Abb. 2 ist die Phagosomenbildung und -reifung dargestellt. Durch Fusion mit den frühen endozytischen Vesikeln (EE) bilden sich **frühe Phagosomen**. Anschließend fusionieren diese mit den späten endozytischen Vesikeln (LE) und es entstehen **späte Phagosomen**. Im letzten Schritt erfolgt die Fusion mit den Lysosomen (LY) und es bilden sich die **Phagolysosomen**. Im Laufe dieses Prozesses werden die aufgenommenen Partikel vollständig degradiert und die Rezeptoren an die Plasmamembran weitergegeben und recycelt (Mellman *et al.*, 1986).

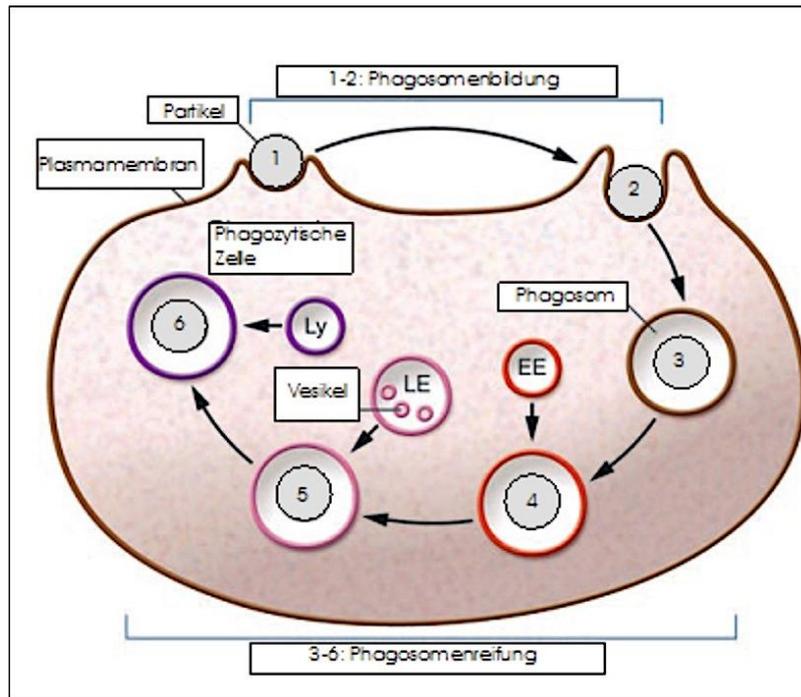


Abb. 2: Phagozytose (nach Steinberg & Grinstein, 2008). Die Bildung und Reifung eines Phagosoms kann in sechs Stadien unterteilt werden: 1. Partikelumhüllung, 2. Bildung der phagozytotischen Hülle/Schale, 3. nascentes Phagosom (45 sek nach der Abschnürung), 4. frühe Phagosomen (2-10 min nach der Abschnürung), 5. späte Phagosomen (10-30 min nach der Abschnürung), 6. Phagolysosomen (> 30 min nach der Abschnürung). Im Laufe der Reifung unterliegt das Phagosom vielen sequenziellen Interaktionen mit den frühen- und späten Endosomen und Lysosomen.

Bedeutung der Phagozytose

Ein großer Schwerpunkt in zahlreichen Untersuchungen des Phagozytoseprozesses liegt im Zusammenhang mit der **Immunität** und der Wirt-Erreger-Interaktion. In Mammalia-Zellen spielt Phagozytose eine Schlüsselrolle in der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Die angeborene Immunantwort zeichnet sich durch das Erkennen von fremden, mikrobiellen Mustern und deren Abbau in den Phagosomen aus (Schütt & Bröker, 2011). Gleichzeitig werden Zytokine (Boten des Immunsystems) wie Interferone (IFN) und Interleukine (IL) sekretiert und dadurch die Immunantwort in Gang gesetzt. Interferone aktivieren umliegende Zellen, welche darauffolgend Proteine bilden, um die Proteinbiosynthese des Erregers zu hemmen. Interleukine dienen der Kommunikation der Leukozyten untereinander, um so die Krankheitserreger effektiver zu bekämpfen.

Wenn Erreger das saure Milieu des Magens ($\text{pH} = 1,5$) lebend passiert haben und den Darm besiedeln wollen, so werden von spezialisierten Zellen des Dünndarms antimykotische bzw. bakteriostatische oder bakterizide Peptide wie Kryptidine und α -Defensine sezerniert (Wilson, 1999; Salzman *et al.*, 2003). Eine andere Familie der Defensine – β -Defensine – wird von der Haut oder der Lunge sezerniert. Mit Hilfe von kationischen und hydrophoben Peptiden

interagieren diese mit der Erregermembran und zerstören sie (Schneider *et al.*, 2005). Andere spezielle Zellen wie Surfactant-Proteine A und D wirken in der Lunge und binden an die Bakterienoberfläche, um diese für die Makrophagen zu markieren (Hawgood & Clements, 1990). So werden die Erreger opsoniert („für das Mahl zubereitet“) und damit besser zugänglich gemacht (Schütt & Bröcker, 2011).

Im Vergleich zur angeborenen Immunantwort sind die Zellen der adaptiven Immunantwort in der Lage, spezifische Strukturen (Antigene) zu erkennen und gezielt Antikörper zu bilden. Die B-Zellen sind für die Bildung von Antikörpern (humorale Immunantwort) zuständig, während die T-Zellen die zelluläre Immunantwort gewährleisten, indem sie die B-Zellen zur Antikörperproduktion aktivieren. Zusammen machen sie den entscheidenden Bestandteil des adaptiven Immunsystems aus (Schütt & Bröcker, 2011).

Während in multizellulären Organismen Phagozytose eine Schlüsselrolle in der Homöostase, Beseitigung abgestorbener (apoptotischer) Zellen und Umgestaltung von Geweben spielt, dient Phagozytose überwiegend zur Nahrungsaufnahme verschiedener Organismen. Der im Boden lebende einzellige Organismus *Dictyostelium discoideum* (*D. discoideum*) und der einzellige Parasit *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) nehmen die Nährstoffe in die Phagosomen auf. Dieses ist überwiegend *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*), aber auch andere Mikroorganismen. Mit Hilfe von Hydrolasen werden die Nährstoffe verdaut und die unverdaulichen Materialien egestiert (Padh, 1993; Rezabek *et al.*, 1997; Okada & Nozaki, 2006).

Infektionskrankheiten und Phagozytose

Die Klärung der phagosomalen Vorgänge ist von besonderer medizinischen Relevanz, da einige Mikroorganismen über Phagozytose in das Innere der Zelle gelangen und mit Hilfe spezieller Mechanismen der Degradation entgehen und somit die pathogene Wirkung entfalten können. Da die Lipide als Schlüssel für die Phagosomenbildung gelten, haben einige Pathogene Wege entwickelt, den phagosomalen Lipid-Metabolismus zu umgehen. Das *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) kann die Phagolysosom-Biogenese umgehen, indem die Fusion zwischen dem Phagosom und Lysosom unterbrochen wird (Deretic & Fratti, 1999; Armstrong & Hart, 1971). So wird die Antigen-Prozessierung und Bereitstellung in den Makrophagen gestoppt (Clemens & Horwitz, 1995; Strugill-Koszycki *et al.*, 1996). Die Überlebensstrategie des *M. tuberculosis* besteht in der Sekretion eines glykosylierten Phosphatidylinositol (PI) -Analoges: Lipoarabinomannan (LAM, s. Abb.3). LAM inhibiert

die Aktivierung des *vacuolar protein sorting* (VPS)-Proteins 34 und es wird zusätzlich die saure Phosphatase SapM sekretiert, welche Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI(3)P) dephosphoryliert (Vergne *et al.*, 2003; Vergne *et al.*, 2005). VPS 34 ist eine am besten charakterisierte PI(3)-Kinase, welche essentiell für die Produktion der PI(3)P auf der Membran der frühen Phagosomen ist (Christoforidis *et al.*, 1999).

Ein weiteres Beispiel bildet der Erreger *Salmonella enterica* (*S. enterica*), welcher die Phosphoinosid-Phosphatase SigD (auch bekannt als SopB) in die Wirtszelle injiziert (s. Abb. 3). Das Enzym kann sehr schnell das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) in der Membran der Wirtszelle zu PI(3)P degradieren; auf diese Weise fehlen der Vakuole lytische Eigenschaften und der Erreger kann ungestört in die Zelle gelangen. Der Abbau von Inositid geht mit der Dissoziation des Aktins in der Zelle einher. Aktin-Abbau ist zum Schließen der Invasions-Vakuole und ihrer Entwicklung zur Replikationsnische und somit zum bakteriellen Überleben notwendig. Das Verschwinden von PI(4,5)P₂ und die gleichzeitig durch SigD generierten Produkte wie PI(5)P beeinflussen die Richtung der Membran-Bewegung und dies führt zur Bildung von ausgedehnten replikativen Vakuolen in welchen der Erreger geschützt vor bakteriziden Faktoren des Wirtes vorliegt (Hilbi, 2006).

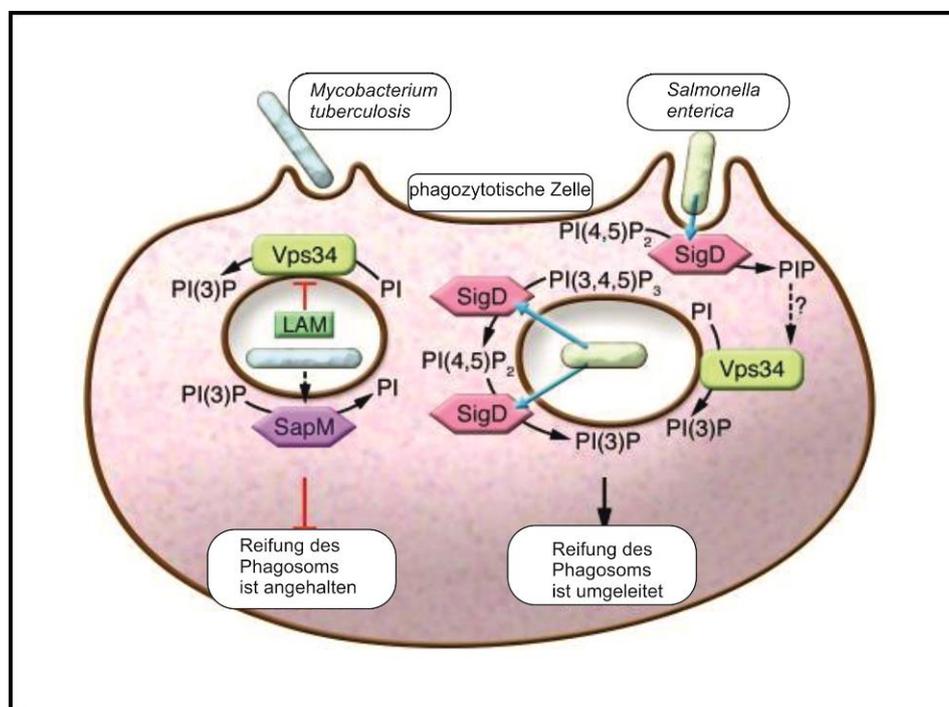


Abb. 3: Überlebensstrategien einiger Erreger. *M. tuberculosis* sekretiert LAM und inhibiert dadurch die Produktion von PI(3)P durch VPS 34. Zusätzlich dazu dephosphoryliert sekretiertes SapM PI(3)P-Verbindungen. *S. enterica* injiziert SigD, welche PI(4,5)P₂-Verbindungen abbaut und PI(3,4,5)P₃-Verbindungen zu PI(3)P dephosphoryliert (Steinberg & Grinstein, 2008).

Auf eine ähnliche Weise umgeht der Erreger der Legionärskrankheit *L. pneumophila* den Abbau durch Phagosomen, indem die invasive Vakuole keinen Kontakt mit den lysosomalen Kompartiment einget (Horwitz, 1983). Die Pseudopodien des Phagozyten winden sich um das Bakterium und es entsteht zunächst eine schneckenhausartige Struktur des Phagosoms. Kurze Zeit später entstehen morphologisch normale Phagosomen, die jedoch kurze Zeit später ihre typische, endozytotische Markerproteine wie Transferrin-Rezeptor oder lysosomale Glycoproteine verlieren (Sinai & Joiner, 1997). Anders als bei *S. enterica*, wird bei *L. pneumophila* der intrazelluläre Verkehr umgeleitet und die *Legionella*-enthaltende Vakuole fusioniert mit den „gutartigen“ sekretorischen Komponenten zu Bildung von eigenen phagozytotischen Vesikeln (Hilbi, 2006).

Eine andere Überlebensstrategie in Phagozyten der Mikroorganismen wurde von den Bakterien *Listeria monocytogenes* und *Shigella flexneri* entwickelt. Diese Bakterien sind in der Lage die phagosomale Membran des Wirtes zu lysieren (Sansonetti, 1991; Kuhn & Goebel, 1995). *Leishmania mexicana* Zellen sind an ein stark saures phagolysosomales Kompartiment etabliert und können daher nicht degradiert werden (Russel *et al.*, 1992).

In dem zur Phagozytose befähigten Einzeller *T. thermophila* dient dieser Prozess primär der Nahrungsaufnahme.

2.2. *Tetrahymena thermophila*

Der einzellige, 30-60 µm große Eukaryot *T. thermophila* (Ciliophora, Alveolata) ist ein hochdifferenzierter freischwimmender Organismus in Süßwasser-Habitaten. Charakteristisch für diesen Organismus, wie für andere Ciliaten auch, ist seine Bewimperung (Ciliatur), welche die gesamte Zelle bedeckt und primär der Fortbewegung dient (Mehlhorn & Ruthmann, 1992).

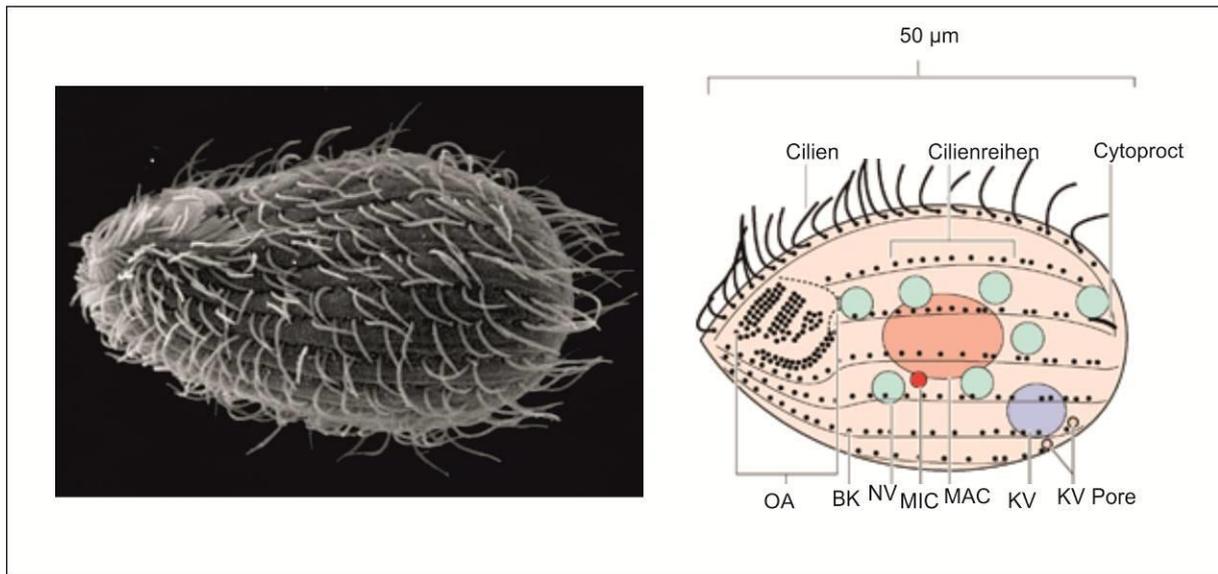


Abb. 4: Elektronenmikroskopische (<http://wordpress.com/2006/08/30>) und schematische (Bell, 2010) Darstellung von *Tetrahymena thermophila*. Das schematische Diagramm zeigt den Oralapparat (OA), Basalkörper (BK), Nahrungsvakuole (NV), Mikro- und Makronukleus (MIC, MAC), kontraktile Vakuole (KV) und ihre Mikropore (KV Pore). Man erkennt sieben von insgesamt 18-21 Cilienreihen mit den basalen Körpern, welche sich punktförmig nahe den longitudinal angeordneten Mikrotubuli-Bündeln befinden.

Die Nahrungsaufnahme erfolgt durch den Oralapparat, auch Cytostom genannt (s. Abb. 4). Dieser zeichnet sich durch vier spezielle Cilienreihen aus. Der Name *Tetrahymena* geht auf diese Cilienreihen zurück, die in einem mikroskopischen Bild vier Häutchen gleichen (Levine *et al.*, 1980).

Die Exkretion der Abfallstoffe erfolgt über den Cytoproct. Auf dem Weg vom Cytostom zum Cytoproct durchläuft das Phagosom mitsamt seiner zu verdauenden Füllung einem sehr genau geregelten Verdauungsprozess. Die Cytokinese erfolgt bei *T. thermophila* durch die Querteilung der Zelle und die sexuelle Fortpflanzung mittels Konjugation (Mehlhorn & Ruthmann, 1992).

2.2.1. Genetische Besonderheiten

Eine Besonderheit der Ciliaten ist der Kerndimorphismus, eine Kompartimentierung der Keimbahn und Somafunktion durch die Ausbildung eines Mikro- und Makronukleus (Orias & Flacks, 1975). Aufgrund dieser Besonderheit, die zahlreiche Vorteile bei Transformationen oder bei Einsatz als Expressionsorganismus bieten, hat sich *T. thermophila* zu einem geeigneten molekularbiologischen Modellorganismus entwickelt.

Der polyploide Makronukleus (MAC) ist der somatische Zellkern (Mehlhorn & Ruthmann, 1992). Er enthält 200-300 autonom replizierende Einheiten (ARP), welche in bis zu 45 Kopien vorliegen können. Die Bezeichnung ARP wurde gewählt, da diese im Gegensatz zu Chromosomen keine Centromere besitzen. Im Zuge des vegetativen Wachstums teilt sich der transkriptions**aktive** MAC amitotisch und bestimmt dabei den Phänotyp der Zelle (Mehlhorn & Ruthmann, 1992; Collins & Gorovsky, 2005).

Der diploide Mikronukleus (MIC) stellt die Keimbahn dar und ist während des vegetativen Wachstums transkriptions**inaktiv**. Der generative Mikronukleus enthält fünf Chromosomenpaare und teilt sich mitotisch. Die einzige bisher bekannte Aufgabe des MIC besteht in der Speicherung der genetischen Information zur Ausbildung je eines neuen MIC und MAC bei den sexuellen Nachkommen einer Konjugation (Turkewitz *et al.*, 2002).

Der Prozess Konjugation beschreibt die sexuelle Reorganisation des genetischen Materials. Sie tritt zwischen zwei sexuell reifen Zellen unterschiedlichen Paarungstyps auf, nachdem sie eine Phase unter spezifischen Stressbedingungen (z. B. Hunger) durchlaufen haben (Collins & Gorovsky, 2005). Die Zellpaarung führt zu einer Reihe von Veränderungen in dem Mikronukleus. Er durchläuft ein Programm aus mitotischen Teilungen und Differenzierungsprozessen, in dessen Verlauf durch eine reziproke Fertilisation ein diploider Zygotenkern entsteht. Aus seinen Teilungsprodukten werden schließlich neue Mikro- und Makronuklei generiert (Blackburn & Karrer, 1986).

Eine weitere genetische Besonderheit bei *T. thermophila* sind der hohe AT-Gehalt des Genoms und die Kodonpräferenz. Während der AT-Gehalt in kodierenden Regionen ~ 54% beträgt, weisen die nicht kodierenden Bereiche einen AT-Gehalt von ~ 85% auf (Prescott, 1994; Horowitz & Gorovsky, 1985). Zudem ergaben Analysen von kodierenden Bereichen, dass ausschließlich das Triplett TGA (UGA) als Stopp-Signal bei der Translation erkannt wird (Horowitz & Gorovsky, 1985; Wuitschick & Karrer, 1999).

2.2.2. *T. thermophila* als Modellorganismus

T. thermophila gewann eine große Bedeutung als Modellorganismus in der Grundlagenforschung und der biotechnologischen Anwendung.

T. thermophila ist ein apathogener eukaryotischer Mikroorganismus und wird in der wissenschaftlichen Literatur als GRAS-Organismus (*genetically recognized as safe*) bezeichnet (Wheatley *et al.*, 1994).

Die Bekanntheit von *T. thermophila* basiert vor allem auf der weiten, natürlichen Verbreitung und der einfachen Kultivierbarkeit. Durch die hohe Teilungsrate (Generationszeit von ~ 1,4 h) und dem unproblematischen Wachstum auf preiswertem axenischem Medium wurde die Hochzelldichte-Fermentation möglich. Durch den Einsatz des Perfusion-Bioreaktors konnte weiterhin eine 30-40 fach höhere Zelldichte im Vergleich zur Standard-Batch-Fermentation erreicht werden (Kiy & Tiedtke, 1992; Kiy *et al.*, 1996).

Außerdem konnten einige fundamentale biologische Prozesse durch die wissenschaftlichen Forschungen an *T. thermophila* aufgeklärt werden, wie z.B. der Aufbau und die Biogenese der Cilien, die Funktion des Dynein-Motors sowie die Funktion der Histon Acetyltransferase A bei der Transkription (Pennock *et al.*, 1988; Gibbons & Rowe, 1965; Brownell *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurden erstmalig Ribozyme, katalytisch aktive RNAs, die als wichtige Werkzeuge in der Molekularbiologie betrachtet werden, sowie Telomere und Telomerasen in *T. thermophila* beschrieben (Cech, 1989; Blackburn, 1990).

T. thermophila produziert eine große Anzahl an intrazellulären biogenen Molekülen wie die Diisopropylfluorophosphatase (DFPase), die sehr effizient toxische Organofluorophosphate wie das Nervengift Soman (O-1,2,2 Trimethylpropylmethylphosphofluoridat) abbaut, sowie die L-Asparaginase, welche eine hohe antitumorale Wirkung gegenüber Brustkrebszelllinien aufweist (Landis *et al.*, 1987; Kyriakidis *et al.*, 1990).

Ein bedeutsames wirtschaftliches Potential liegt in der Produktion extrazellulärer biologischer Wertstoffe. Dazu zählen viele saure Hydrolasen wie z.B. Phospholipase A₁, die direkt ins Medium sezerniert wird und somit in reiner Form gewonnen werden kann (Kiy & Tiedtke, 1992; Greninngloh, 2001; Hartmann, 1999).

T. thermophila findet zudem immer häufiger Einsatz in der Industrie, z.B. zur industriellen Abwasserreinigung von Bakterien in Kläranalgen oder zur Veredelung von Milch. Bei der Verwendung von Ciliaten in der Milch-Industrie verspricht man sich den Abbau von Laktose und Casein sowie den Umbau von Cholesterin zu Provitamin D 1 (Valcarce *et al.*, 2001).

Weiterhin kann *T. thermophila* als Indikatororganismus eingesetzt werden, wie der von Huber *et al.* entwickelte Ciliatentest zur Toxizitätsbestimmung der Umweltchemikalien zeigt (Huber *et al.*, 1990).

2.2.3. Phagozytose bei *T. thermophila*

Der Ablauf der Phagozytose bei *T. thermophila* (s. Abb. 5) und anderen Ciliaten wie *Paramecium tetraurelia* (*P. tetraurelia*) wird im Folgenden beschrieben. Die Nahrung wird mit Hilfe der drei Membranellen und der undulierenden Membran in das Cytostom eingestrudelt, an dessen Basis sich das Cytopharynx befindet. Dort werden so genannte Phagosomen abgeschnürt (Nilsson, 1979; Chapman-Andersen & Nilsson, 1968; Ricketts, 1972b; Rasmussen & Modeweg-Hansen, 1973). Im Gegensatz zu Amöben oder Makrophagen werden die Phagosomen bei *T. thermophila* nur an einer definierten Region der Zellen gebildet, nämlich am Cytostom. Das verbleibende Material wird wiederum nur am Cytoproct ausgeschleust. Diese beiden Orte befinden sich im Unterscheid zum *Paramecium* an entgegengesetzten Polen der Zelle.

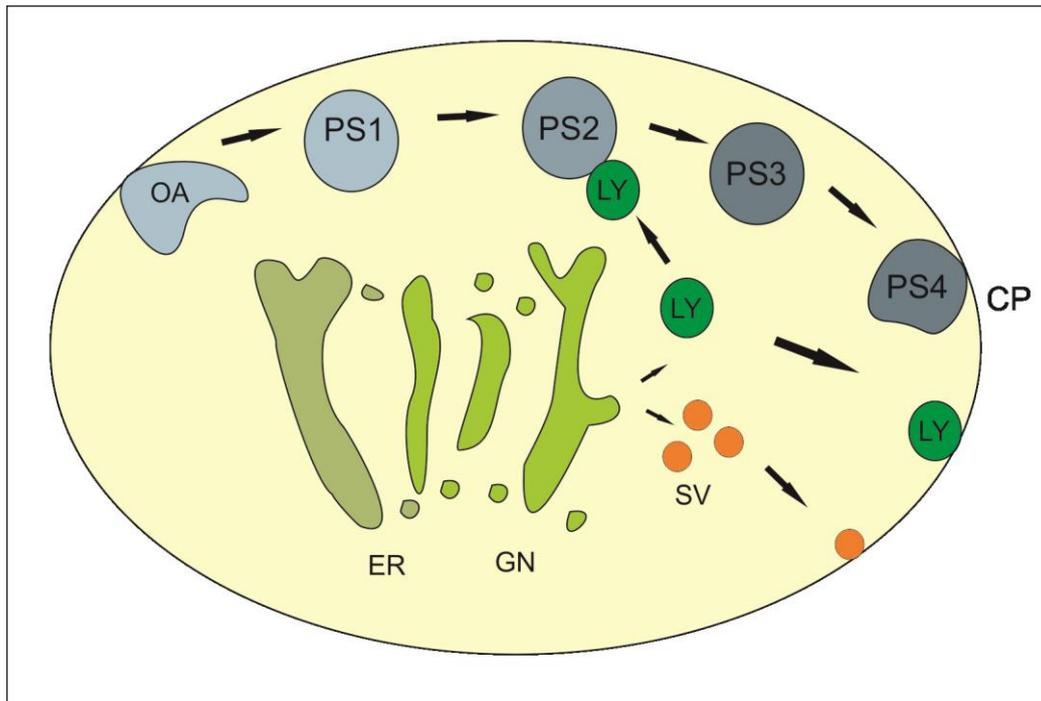


Abb. 5: Vereinfachte schematische Darstellung des Phagozytoseprozesses bei *T. thermophila* (Abbildung verändert nach Vosskübler, 1994). Nach der Ausbildung des nascenten Phagosoms (PS1) „reift“ dieses zum kondensierten Phagosom (PS2) und fusioniert schließlich mit den Lysosomen (LY) zum Phagolysosom (PS3). Im letzten Schritt erfolgt die Egestion der aufgenommenen Stoffe (PS4) durch Fusion des Phagolysosoms mit dem Cytoproct (CP). Die in den Lysosomen enthaltene lysosomalen Enzyme werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und passieren den Golgi Apparat (GN) bevor sie in Vesikel (entweder Lysosomen oder sekretorische Vesikel (SV)) verpackt werden. Alternativ zur Fusion mit den Phagosomen, können die Vesikel auch mit der Plasmamembran fusionieren und so den Inhalt ins Kulturmedium geben.

Da Phagosomenbildung und -reifung ein Aktin-abhängiger dynamischer Prozess ist, befinden sich am Cytoproct und Cytostom viele Mikrotubuli-Bündel und Aktinfilamente (Wilkes & Otto, 2003; Williams *et al.*, 2006; Allen, 1988). Während der Phagosomenbildung wird das dynamische Aktin und für die Bewegung des Phagosoms vom Oralapparat zum Cytoproct ein Aktin-basierter Myosin-Motor benötigt (Wilkes & Otto, 2003; Williams *et al.*, 2006; Hosein *et al.*, 2005). Darüber hinaus ist auch ein Mikrotubuli-basierter Dynein-Motor DYH1 für die Phagosomenbildung notwendig (Lee *et al.*, 1999). *Deep fiber* sind cytoskelettale Strukturen, welche sich von der Basis des Oralapparats bis zum Cytoplasma erstrecken und so als Vesikel-Bahn fungieren. In diesen „*deep fiber*“ wurden das Protein Calmodulin und andere Calmodulin-bindende Proteine nachgewiesen, die essentiell für die Phagosomenbildung sind (Gonda *et al.*, 2000; Moya & Jacobs, 2006).

Die Phagosomen-Größe sowie die Dauer der Phagosomenbildung sind von der Art der aufgenommenen Partikel abhängig. So beträgt die Größe der reifen Phagosomen nach Aufnahme von 2 μm -Partikel z. B. 7 μm , oder 15 μm nach Aufnahme von Hefezellen

(Ricketts, 1972b; Nilsson, 1977). Für die Bildung und Abschnürung eines Phagosoms werden zwischen 45 sek bis 3 min benötigt (Nilsson, 1972; Rasmussen & Modeweg-Hansen, 1973).

Die Herkunft der für die Phagosomenbildung benötigten Membranzmenge ist noch nicht vollständig geklärt. Hinweise deuten darauf, dass discoidale Vesikel, die nach ihrer abgeflachten, diskusähnlichen Form benannt sind, diesen Membran-Pool bilden. Eine genaue Analyse der Lipidzusammensetzung in nascenten Phagosomen und discoidalen Vesikel sowie zusätzliche elektronenmikroskopische Untersuchungen können diese Annahme bestätigen (Baumert *et al.*, 1998). Der Ort ihrer Entstehung in *T. thermophila* ist noch ungeklärt.

Das neu gebildete, nascente Phagosom unterliegt noch keinen Veränderungen und weist einen neutralen pH-Wert von 7 auf, was dem umgebenden Medium entspricht (Nilsson 1977; Smith-Somerville, 1989).

Im weiteren Verlauf fusionieren bei *Paramecium* und einigen Amöben sogenannte Acidosomen mit frühen Phagosomen. Diese enthalten vakuoläre Protonen-pumpenden ATPasen, die nach einer Fusion mit den Phagosomen seine Ansäuerung bewirken (Allen & Fok, 1983). Bei *T. thermophila* wird im Laufe der „Phagosomenreifung“ ebenfalls der Inhalt des Phagosoms angesäuert, dabei sinkt der pH-Wert auf 5,0-6,5 ab und das Material wird im Inneren konzentriert. Dies führt dazu, dass die kondensierten Phagosomen (5 min) durch die daraus resultierende Volumenabnahme deutlich kleiner gegenüber den nascenten Phagosomen erscheinen (Nilsson, 1977; Smith-Somerville, 1989).

Dann erfolgt die Fusion mit den Lysosomen (ab 30 min), welche lysosomale Enzyme wie z. B. Phospholipase A₁ und C, β -Hexosaminidase, α -Glukosidase enthalten, und es bilden sich Phagolysosomen (Nilsson, 1977; Smith-Somerville, 1989; Elliot & Clemmons, 1966; Nilsson, 1976; Vosskühler, 1994). Mit Hilfe von lysosomalen Enzymen werden die ingestierten Partikel abgebaut und die Nährstoffe resorbiert. Die Phagolysosomen weisen in diesem Stadium den niedrigsten pH-Wert (zwischen 3,5-5,0) im gesamten Phagosomenzyklus auf (Vosskühler, 1994).

Nach ca. 60 bis 120 min befindet sich das Phagosom am Cytoproct und hat wieder einen neutralen pH-Wert erreicht. Nach einer Fusion mit dem Cytoproct wird der Phagosomen-Inhalt in das umgebende Medium abgegeben (Nilsson, 1979; Elliot & Clemmons, 1966). Die Membran wird in Form kleiner Vesikel ins Cytoplasma zurück geführt (Allen & Wolf, 1979).

2.3. Phagosomenreifung

Organismen wie *P. tetraurelia*, *D. discoideum*, *E. histolytica* sowie bereits erwähnt *T. thermophila* phagozytieren feste Partikel aus ihrer Umgebung und schließen diese in Phagosomen ein, welche definierten Reifungs- und Modifikationsprozessen unterliegen. Unter Phagosomenreifung versteht man die Veränderung der Zusammensetzung der phagosomalen Proteine im Verlauf der Cyclose, die dazu führt, dass die ingestierten Nährstoffe vollständig verdaut werden. Da während einer 145 minütigen Phagozytose in *T. thermophila* 1200 μm^2 phagosomaler Membran aufgebaut werden können, sollte die Herkunft der Membrankomponenten für diesen enormen Bedarf geklärt werden (Batz & Wunderlich, 1976). In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass einige Organellen wie recycelte Endosomen, späte Endosomen und Lysosomen während des Phagozytoseprozesses mit der Plasmamembran der Phagosomen fusionieren können und somit mehr Material für die Phagosomenbildung bereitstellen können (Desjardins, 2003). Im Phagosom des murinen Makrophagen wurden viele ER-Proteine identifiziert, was zur Annahme führt, dass das ER die ursprüngliche Komponente der phagosomalen Membran zu sein scheint (Garin *et al.*, 2001; Gagnon *et al.* 2002).

Bei Paramecium wurde gezeigt, dass die discoidalen Vesikel für die Bildung von nascenten Phagosomen zuständig sind. Diese entstehen als Recyclingprodukte aus der Membran egestierter Phagosomen und werden entlang der Mikrotubuli vom Cytoproct zum Cytostom zurück transportiert (Allen & Fok, 1980; Allen & Fok, 1984).

Bei den Mammalia-Zellen wird im Laufe der Phagozytose die phagosomale Membran durch cytosolische Faktoren remodelliert (Huynh *et al.*, 2007). Nascente Phagosomen fusionieren zuerst mit den frühen Endosomen (Mayorga *et al.*, 1991; Pitt *et al.*, 1992a), gefolgt von den späten Endosomen (Rabinowitz *et al.*, 1992; Desjardins *et al.*, 1994a) und schließlich mit den Lysosomen (Jahraus *et al.*, 1994).

So werden einige endosomale Markerproteine wie Transferrin-Rezeptor (TfR), frühes endosomales Antigen (*early endosomal antigen 1*, EEA1) und Rab5 in frühen Phagosomen nachgewiesen (Pitt *et al.*, 1992b; Scianinmanico *et al.*, 1999; Duclos *et al.*, 2000). Auf die stadienspezifischen Markerproteine wird im folgenden Kapiteln intensiver eingegangen.

Man unterscheidet bei den Endosomen zwischen frühen und späten Endosomen. Späte Endosomen weisen einen sauren pH-Wert von 5,5 auf. Im Vergleich dazu weist das Lumen der frühen Endosomen einen pH-Wert von 6 auf. Bezüglich ihrer „Reifung“ gibt es zwei

unterschiedliche Modelle. Das Vesikel-Shuttle-Modell besagt, dass die frühen Endosomen stabile Organellen sind, welche anschließend zu späten Endosomen umgebildet werden. Das Reifungsmodell besagt, dass die frühen Endosomen transiente Organellen sind, welche im Laufe des Reifungsprozesses durch eine Reihe Fusions- und Teilungsprozessen zu multivesikulären Organellen werden und schließlich zu späten Endosomen reifen (Thilo, 1995; Gruenberg, 2001; Gu & Gruenberg 1999).

Im weiteren Schritt fusionieren die frühen Phagosomen mit den späten Endosomen (10 bis 30 min, nach der Bildung), dabei wird der Phagosomeninhalt modifiziert, indem es mit späten-endosomalen Komponenten wie Rab7 angereichert wird (Pitt *et al.*, 1992b; Via *et al.*, 1997).

Schließlich fusionieren die späten Phagosomen mit den Lysosomen und werden so in Phagolysosomen überführt. Sie enthalten die typischen lysosomalen Marker wie Cathepsin D und weisen einen sauren pH-Wert von 4,5 auf (Jahraus *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2001; Via *et al.*, 1997; Clemens & Horwitz, 1995).

Die Fusionsprozesse von Phagosomen mit den frühen und späten Endosomen wurden von Desjardins und seinen Kollegen genauer untersucht. Sie haben eine „*kiss and run*“ – Hypothese aufgestellt, welche besagt, dass die Phagosomen nicht mit den Endosomen/Lysosomen fusionieren und somit ein einziges Organell bilden (Desjardins *et al.*, 1994a; Desjardins, 1995). Die Phagosomen unterziehen sich vielmehr einer transienten und partiellen Fusion mit den endosomatischen Organellen („*kiss*“), in Folge dessen werden ausgewählte Membran- und Lumen- Bestandteile des Endosoms in das Phagosom transferiert. Nach diesem Prozess folgt sofort ein Teilungsprozess („*run*“), welcher die vollständige Durchmischung der beiden Komponenten verhindert. (Desjardins *et al.*, 1994a; Desjardins, 1995; Desjardins *et al.*, 1997; Wang & Goren, 1987).

Die im Verlauf der Phagozytose entstandenen Abfallstoffe bzw. defektes Zellmaterial können direkt zu den Recycling-Endosomen geleitet werden, diese fusionieren im Verlauf der Exozytose (Stofftransport aus der Zelle) mit der Plasmamembran und geben die Abfallstoffe frei. Außerdem wird durch diese Fusion die Plasmamembran erneuert. Diese Endosomen unterscheiden sich im Vergleich zu den frühen Phagosomen morphologisch und biochemisch; sie befinden sich in der Nähe des Mikrotubuli-Organisationszentrums und weisen einen pH-Wert von ca. 6,5 auf. Außerdem können diese durch das Markerprotein Rab11 nachgewiesen werden (Lemmon & Traub, 2000; Alvarez-Dominguez *et al.*, 1996; Mukherjee *et al.*, 1997; McMahon 1999; Riezman *et al.*, 1997; Woodman 2000; Mohrmann & van der Sluijs 1999).

Phagosomale Membran

Die Plasmamembran bildet die erste Barriere für Pathogene und ist auch der Ort für die Phagosomen-Biogenese. Die sich in der Membran befindenden Lipid-gebundenen Phosphoinositole sind die Schlüsselemente der Membran-Bewegung; sie unterliegen der Bildung von metastabilen nanometer-großen Mikrodomänen innerhalb der Plasmamembran, wo vermutlich die Signal-Plattformen zusammengesetzt werden, um den Phagozytoseprozess zu initiieren (Hanzal-Bayer & Hancock, 2007; Kwiatkowska *et al.*, 2003; Barnes *et al.*, 2006; Garcia-Garcia *et al.*, 2007). Außerdem wurde bewiesen, dass sie auch Ziel- und Bewegungs-Ereignisse in Phagosomenbildungs- und -reifungsprozessen koordinieren können (Yeung & Grinstein, 2007). Ihre Aktivität beruht auf der Phosphorylierung des Inositol-Ringes in spezifischen Kombinationen (3., 4. oder 5. Position des Ringes), dadurch werden die Inositole von einer Reihe spezifischer Proteine erkannt, welche dadurch wiederum aktiviert bzw. rekrutiert werden können (Di Paolo & De Camilli, 2006).

So besitzen viele Aktin-regulierende Proteine polykationische Motive, welche elektrostatisch an die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) gebunden werden, die sich in der Plasmamembran der nascenten Phagosomen befinden (Sechi & Wehland, 2000). Nachdem das PI(4,5)P₂, zusammen mit dem Aktin-Abbau, von dem nascenten Phagosom entfernt wurde, akkumulieren PI(3,4,5)P₃ und fungieren als Bindungsziele für die PH-Domänen (Plekstrin-Homologie) der Adaptor-Proteine wie die GAB 1 und GAB 2 Proteine (*growth factor receptor-bound protein 2-associated binder protein1*). Diese Adaptor-Proteine sind in die Phagozytoseprozesse der Makrophagen involviert (Gu *et al.*, 2003).

Phosphoinositol-3-Phosphate PI(3)P, die kurz nach der phagosomalen Abschnürung erscheinen, haben wichtige Aufgaben bezüglich der Phagosomenreifung. Sie sind mit vielen verschiedenen Affektoren assoziiert (durch das Erkennen der Kopfgruppen der Phosphatidylinositol-Phosphate), welche zu den Phagosomen geleitet werden, um die Fusionsprozesse mit den späten Endosomen einzugehen (Vieira *et al.*, 2001). EEA 1 akkumuliert in den frühen Phagosomen teilweise durch die Bindung an das PI(3)P durch seine FYVE-Domäne; außerdem geht man davon aus, dass EEA 1 und PI(3)P durch ihre Bindung eine Brücke schaffen und somit die Fusion der Rab 5 und Rab 4-enthaltenden Membranen an die phagosomale Membran ermöglichen (Fratti *et al.*, 2001). Rab 5 und Rab 4, sowie EEA 1 gehören zu den stadienspezifischen phagosomalen Proteinen, die im folgenden Kapitel intensiver erläutert werden.

Phagosomale Proteine

Phagozytose ist ein dynamischer Prozess und unterliegt vielen Fusions- und Teilungsprozessen. Damit der Prozess aufrechterhalten bleibt, bedarf es vieler Komponenten, welche diese Maschinerie steuern. So erfordert die Reifung von nascenten Phagosomen zu Phagolysosomen, unter Beteiligung von Lysosomen (Jahraus *et al.*, 1994) und wahrscheinlich auch frühen (Mayorga *et al.*, 1991; Pitt *et al.*, 1992a) und späten Endosomen (Rabinowitz *et al.*, 1992; Desjardins *et al.*, 1995), zahlreiche und komplexe Mechanismen, die bisher kaum verstanden sind.

In früheren Studien konnten bereits einige phagosomale Proteine in unterschiedlichen Organismen wie murinen Makrophagen (Desjardins *et al.*, 1994b), *Entamoeba histolytica* (Okada *et al.*, 2005), *Dictyostelium discoideum* (Gotthardt *et al.*, 2006) und *T. thermophila* (Jacobs *et al.*, 2006) unter Einsatz verschiedener Methoden identifiziert werden.

So wurden z.B. in murinen Makrophagen so genannte Lysosomen-assoziierte-Membranproteine – LAMPs - (*lysosomal associated-membrane proteins*) und Rezeptoren wie Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Pitt *et al.*, 1992a), Anexine sowie kleine GTP-bindende-Proteine (Desjardins *et al.*, 1994b, Pizon *et al.*, 1994) nachgewiesen.

Im Laufe der Phagosomenreifung, durch Fusion mit frühen und späten Endosomen sowie Lysosomen, kommt es zu einer Veränderung in der Proteinzusammensetzung. In einigen *in vitro* und *in vivo* Assays wurde gezeigt, dass frühe Phagosomen (< 30 min nach Bildung), neben den charakteristischen Komponenten der Plasmamembran, Markerproteine der frühen Endosomen wie Transferrin-Rezeptoren (**TfRs**), *early-endosomal-antigen-1* (**EEA 1**) und **Rab 5** (Pitt *et al.*, 1992b; Scianimanico *et al.*, 1999; Duclos *et al.*, 2000) enthalten. Die integralen und peripheren Proteine werden im Verlauf der Phagosomenreifung aus der phagosomalen Membran eliminiert (Pitt *et al.*, 1992b; Scianimanico *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2001) und zur Plasmamembran zurückgeführt bzw. neu in eine phagosomale Membran integriert (Pitt *et al.*, 1992a; Muller *et al.*, 1980).

In späten Phagosomen bzw. Phagolysosomen, wurden charakteristische spät-endosomale und lysosomale Markerproteine wie Rab 7, Rab 9; LAMPs, Mannose-6-Phosphatrezeptor und Lysobisphosphat-Säure (*lysobisphosphatidic acid*) nachgewiesen, welche im Zuge der Fusion mit den späten Endosomen bzw. Lysosomen in die phagosomale Membran integrieren. (Pitt *et al.*, 1992b; Lombardi *et al.*, 1993; Desjardins *et al.*, 1994a,b; Fratti *et al.*, 2001; Via *et al.*, 1997).

Die Phagolysosomen weisen eine hohe Aktivität an hydrolytischen Enzymen wie Cathepsin D und β -Glucuronidase und demzufolge einen extrem niedrigen pH-Wert von ca. pH 4,5-5,5 auf (Jahraus *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2001; Via *et al.*, 1997; Clemens & Horwitz, 1995).

Die exocytotische Fusion zwischen Phagosomen und Endosomen wird durch sogenannte SNARE-Komplexe (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) reguliert. Zahlreiche biochemische Studien haben bewiesen, dass die auf der Vesikel-Membran befindenden SNARE-Komplexe die verwandten SNARE-Komplexe auf der phagosomalen Membran erkennen und mit ihnen interagieren können (Götte & von Mollard, 1998; Chen & Scheller, 2001). Die Bindung erfolgt spezifisch, da die SNARE-Proteine der Vesikel (v-SNARE) nur mit verwandten Rezeptor-Proteinen der Ziel-Membran (t-SNARE) gepaart werden (Söllner *et al.*, 1993; Rothman, 1994). Die sich an der Plasmamembranseite befindenden Proteine Syntaxin und SNAP-25 gehören zu den t - SNARE Proteinen, während die integralen v-SNARE Proteine sekretorischer Vesikel, wie Sec 22b, zur Synaptobrevin Familie gehören (Hohl *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1999).

Kleine GTPasen der Rab-Familie üben ebenfalls einen Einfluss auf den Membrantransport aus, indem sie die selektive Anbindung der Vesikel mit den Zielorganellen regulieren (Zerial & McBride, 2001). In *T. thermophila* ist ein Netzwerk aus Rab-GTPasen für die Aufrechterhaltung der Membran-Bewegung und für die phagosomale Reifungsprozesse zuständig (Meyer *et al.*, 1998; Bright *et al.*, 2010). Nachdem die Rab- GTPasen mit Hilfe des GDP/GTP *exchange factor* (GEFs) in die aktive Form überführt werden, interagieren diese mit den Effektoren, welche in den vesikulären Transport und in die Anbindungs- und Fusionsprozesse involviert sind (Goody *et al.*, 2005; Markgraf *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2007).

Rab 5 ist die am besten charakterisierte kleine GTPase; sie reguliert u. a. die Bildung der Clathrin-ummantelten Vesikel, das Anbinden und die Fusion dieser mit frühen Endosomen und die Bewegung entlang der Mikrotubuli (McLauchlan *et al.*, 1998; Bucci *et al.*, 1992; Nielsen *et al.*, 1999; Rodman & Wandinger-Ness, 2000). Mit Hilfe von spezifischen Effektoren wie EEA 1 und Rabenosyn-5, welche einen ausgeprägten N-terminalen C₂H₂-Zink-Finger aufweisen, kontrolliert Rab 5 die Biogenese, Reifung und die Fusion der Endosomen (Gorvel *et al.*, 1991; Stenmark *et al.*, 1995; Rink *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2010). Untersuchungen von Zell-freien Systemen zeigten eine essentielle Rolle des Rab 5 in der Fusion der isolierten frühen-Endosomen mit den aufgereinigten nascenten Phagosomen (Jahraus *et al.*, 1998; Funato *et al.*, 1997; Alvarez-Dominguez *et al.*, 1996).

Weiterhin scheinen die Produkte der PI(3)-Kinasen eine entscheidende Rolle bei der Phagosomenreifung zu spielen (Vieira *et al.*, 2001). Zur Klasse III der *PI 3-Kinasen* gehört beispielsweise die Mammalia-homologe Kinase zu dem Hefe-VPS 34, auch bekannt als VPS 34 (Backer, 2000; Volinia *et al.*, 1995). In den Hefen ist diese Kinase für das Sortieren und Liefern der Proteine zur Vakuole verantwortlich (Wurmser *et al.*, 1999). Zusätzlich zu seiner Funktion in früh-endosomaler Dynamik wirkt PI(3)P in der Biogenese der multivesikulären Körpern (Odorizzi *et al.*, 1998).

Das Protein Flottilin-1, welches ursprünglich in den Lipid-Rafts an der Zelloberfläche diverser Zellen identifiziert wurde, ist auch in den Mikrodomänen der phagosomalen Membran zu finden (Bickel *et al.*, 1997; Lang *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2004; Dermine *et al.*, 2001). Dieses Protein ist in viele Prozesse involviert und reguliert u. a. die Myosin II a-Aktivität während der Phagozytose, welche für die Bewegung des Phagosoms verantwortlich ist (Ludwig *et al.*, 2010).

In *T. thermophila* findet man einige Calcium-bindende Proteine in frühen Stadien der Phagosomen (Maicher & Tiedtke, 1999; Vosskübler & Tiedtke, 1993). Gonda *et al.* zeigten sogar, dass Ca^{2+} und Calmodulin-bindende Proteine eine signifikante Rolle bei der Phagosomenbildung spielen können (Gonda *et al.*, 1999; Gonda *et al.*, 2000).

Weiterhin sind Proteine wie das Myosin (MYO1), welches die Bewegung des Phagosoms vom Oralapparat zum Cytostom steuert (Hosein *et al.*, 2005) und das Dynein (DYH1), welches in die Phagosomenbildung involviert ist (Lee *et al.*, 1999) bekannt.

Wie die Analysen von Elde & Turkewitz zeigen, scheint das Dynamin (Drp1p), welches in die Clathrin-vermittelten Endozytoseprozesse (Elde *et al.*, 2005) involviert ist, ebenfalls die Phagozytose, insbesondere die Phagosomenbildung, zu regulieren (Elde & Turkewitz, unveröffentlicht).

2.4. *T. thermophila* als Modell für Phagozytose-Studie

T. thermophila bringt, als wissenschaftlich bereits umfassend bearbeiteter Organismus, viele grundlegende Voraussetzungen für diese Studie mit. Das gesamte MAC-Genom liegt sequenziert vor (Eisen *et al.*, 2006). Es wurde eine Reihe von genetischen und molekular-genetischen Ansätzen wie Gen-Überexpression (Yu & Blackburn, 1991), Antisense-Inhibierung (Sweeney *et al.*, 1996) sowie Gen-*knock-out/in* (Gaertig *et al.*, 1994; Kahn *et al.*, 1993) für diesen Organismus entwickelt. Zusätzlich ist Phagozytose für *T. thermophila* nicht essentiell, daher sind verschiedenste Manipulationen des Prozesses erlaubt (Orias & Rasmussen, 1976).

Die Arbeitsgruppe von Jacobs hat die phagosomale Proteinzusammensetzung von *T. thermophila* nach einer Fütterung mit den Latex-Beads (2 µm) mit Hilfe des multidimensionalen Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Es wurden insgesamt 453 Peptide und daraus 73 resultierende putative phagosomale Proteine in allen Stadien der Phagozytose identifiziert (Jacobs *et al.*, 2006). 28 dieser phagosomalen Proteine sind in die Phagozytoseprozesse anderer Organismen involviert. Einige neue phagosomale Proteine wie das phagosomale Protein1 (PHP 1) soll sich am nascenten Phagosom befinden (Maicher & Tiedtke, 1999; Jacobs *et al.*, 2006). Dieses Protein scheint jedoch andere, Phagozytose-unabhängige Aufgaben zu erfüllen, da es auch in den Kulturen im Hungermedium identifiziert wurde (Madinger *et al.*, 2010).

Daraufhin hat die Arbeitsgruppe von Samaranayake anhand dieser Ergebnisse das Protein VPS 13 durch GFP-*knock-out* untersucht und festgestellt, dass es essentiell für einen intakten Phagozytoseprozess ist (Samaranayake *et al.*, 2011).

Obwohl bisher in vielen Phagozytose-Studien charakteristische phagosomale Markerproteine identifiziert wurden, sind Hinweise auf eine frühe stadienspezifische Untersuchung der Proteinzusammensetzung der phagosomalen Membran, insbesondere in den nascenten Phagosomen (30 sek) bis heute in der Fachliteratur nicht zu finden. Die stadienspezifische Analyse der phagosomalen Proteine in *T. thermophila* könnte neue Befunde in die Aufklärung der genauen Vorgänge bei der Phagosomenbildung und –prozessierung liefern.

Aufgrund vieler Gemeinsamkeiten mit höheren Organismen, inklusive Phagozytose, wurde *T. thermophila* für viele Studien, die direkte Relevanz zur humanen Gesundheit bilden, eingesetzt (Allen & Wolf, 1979; Kitajima & Thompson, 1977). Auf dieser Grundlage wurden

diverse Vakzine wie z. B. gegen den Malaria-Erreger *P. falciparum* und Grippeviren (Cowan *et al.*, 2014; Sachse, 2010) produziert.

Makrophagen werden in Mammalia als professionelle Phagozyten bezeichnet. Durch ihre Interaktionen mit den Pathogenen werden Phagosomen gebildet und die Pathogene eliminiert. Die Aufklärung der genauen Vorgänge ist von besonderem Interesse. Bei den Untersuchungen von Makrophagen werden meist homogene (oft murine) Zelllinien verwendet. Der erhebliche Nachteil dieser Analysen ist, dass die Zelllinien nach längerer *in vitro* Kultivierung einen Teil ihrer physiologischen und biochemischen Charakteristika verlieren (Minuth *et al.*, 1996) oder in andere spezialisierte Zellarten differenzieren können (Santini *et al.*, 2000; Obermaier *et al.*, 2003). Aus diesem Grund lassen sich die gewonnenen Ergebnisse nur bedingt auf die Situation im Gesamtorganismus übertragen. Eine einfache Phagosomen-Isolierung in *T. thermophila* und deren Analyse könnten parallele Vorgänge in Makrophagen offen legen.

2.5. Zielsetzung der Arbeit

Aus der großen Anzahl von Proteinen aus dem Phagosom in *Tetrahymena* sind bisher nur wenige identifiziert worden, die direkt an der Bildung der phagosomalen Membran, also in den ersten Sekunden der Abschnürung, beteiligt sind. Dementsprechend sind daher auch die Mechanismen der Phagosomenbildung und die daran beteiligten Komponenten nicht vollständig aufgeklärt. Da sich die neu gebildeten Phagosomen von den späteren, kondensierten Phagosomen anhand ihrer Größe und der Proteinzusammensetzung unterscheiden, ist anzunehmen, dass auch die exprimierten Proteine in Abhängigkeit von der Zeit differieren. Proteine aus nascenten Phagosomen sind verantwortlich für die Bildungs- sowie frühen Reifungsprozesse und leiten die später einsetzenden zellulären Prozesse ein, die eine vollständige Verdauung der Nahrung ermöglichen.

- Ein Ziel dieser Arbeit ist es, neue Erkenntnisse über die beteiligten Proteine in diesen frühen Prozessen zu gewinnen und sich dabei auf die phagosomale Membran zu konzentrieren. Daher sollen zunächst die an der frühen Prozessierung involvierten stadienspezifischen Proteine identifiziert werden.
- Für die Aufklärung der frühen Vorgänge des Phagozytoseprozesses sollen gezielt nascente Phagosomen zum Zeitpunkt 30 Sekunden nach Induktion isoliert werden. Die phagosomalen Proteine dieser nascenten Phagosomen werden dann mit den isolierten kondensierten Phagosomen zum Zeitpunkt fünf Minuten nach Induktion mit Hilfe der 2 D-Gelelektrophorese verglichen, um zu überprüfen, ob sich unterschiedliche Proteinprofile innerhalb von 4,5 Minuten ergeben und weiterhin einen Überblick über die Menge stadienspezifischen Proteine der beiden Stadien zu erhalten.
- Anschließend sollten die **nascenten** und **kondensierten** Phagosomen erstmalig mit der sensitiven, massenspektrometrischen MudPIT-Methode und anschließender Datenbankanalyse bestimmt werden.
- Auf der Grundlage der MudPIT-Untersuchung werden phagosomale Proteine ausgewählt, deren relative Menge an mRNA in einer quantitativen PCR (qPCR)-Analyse in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt werden soll. Dazu soll zunächst ein passendes qPCR-System etabliert werden. Anhand der mRNA-Menge zu spezifischen Zeitpunkten der Cyclose sollen darüber Informationen über das Auftreten der Genprodukte hauptsächlich in nascenten oder kondensierten Phagosomen gewonnen

werden. Diese Daten sollen dann mit den Ergebnissen der MudPIT-Untersuchung verglichen werden.

- Eine Überprüfung der Hypothese, dass die ausgewählten Proteine tatsächlich an der frühen Phase der Phagosomenbildung beteiligt sind, soll mit Hilfe des *GFP-tagging* nach initiiertem Phagozytose erfolgen. Dieses ermöglicht über das Einbauen eines fluoreszierenden Proteins die Lokalisation und das zeitliche Auftreten der Proteine am Phagosom.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Verwendete Stämme

Eingesetzte *Escherichia coli* Stämme

NEB-5 α -Competent *E. coli* (*High efficiency*), New England Biolabs, Ipswich, USA

Genotyp: *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

Eingesetzte *Tetrahymena thermophila* Stämme

T. thermophila SB 281 Genotyp: Wildtyp; Paarungstyp: IV

T. thermophila CU522 Genotyp: *mpr1-1/mpr1-1* (*mpr1-1*; mp-r, ory-r, tax-s, IV)

T. thermophila transformiert mit dem Vektor pMTT1-GFP-SNARE

T. thermophila transformiert mit dem Vektor pMTT1-GFP-PHP1

T. thermophila transformiert mit dem Vektor pMTT1-GFP-PHP2

T. thermophila transformiert mit dem Vektor pMTT1-GFP-14-3-3

3.1.2. Medien für *E. coli*

LB-Medium

LB-Medium 25 g/l LB Broth
in Aqua dest.

SOC-Medium, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

LB-Agar-Platten

15 g/l Agar

in LB-Medium

3.1.3. Medien für *T. thermophila*Neff's Medium

2,5 g/l Proteosepepton (PP)

2,5 g/l Hefeextrakt (YE)

1 ml/l Ferrous-Sulphate/Chelate Solution

10 g/l Glucosemonohydrat

in Aqua dest., pH 7,0

Die Glucose wurde separat autoklaviert und nach dem Abkühlen dem Medium steril hinzugegeben.

Magermilchmedium (MMM)

20 g/l Magermilchpulver

5 g/l Hefeextrakt

1 ml/l Ferrous-Sulphate/Chelate Solution

10 g/l Glucosemonohydrat

in Aqua dest., pH 7,0

Die Glucose wurde separat autoklaviert und nach dem Abkühlen dem Medium steril hinzugegeben.

Hungermedium (Konjugationsmedium)

10 mM Tris/HCl, pH 7,4

3.1.4. Verwendete Puffer und Lösungen

Dryl's Puffer (Cole & Bruns, 1992)

1,5 mM Natriumcitrat

1 mM NaH₂PO₄

1 mM Na₂HPO₄

1,5 mM CaCl₂

in Aqua dest.

Die CaCl₂-Lösung wurde separat autoklaviert und nach dem Abkühlen dem Medium steril hinzugegeben.

PBS

2,7 mM KCl

1,5 mM KH₂PO₄

137 mM NaCl

8 mM Na₂HPO₄

in Aqua dest.

SDS-Elektrophoresepuffer

25 mM Tris-HCl, pH 6,8

192 mM Glycin

0,1% (w/v) SDS

in Aqua dest.

TAE-Puffer (50x), pH 8,9

40 mM Tris

0,114% (v/v) Essigsäure p.A.

1 mM EDTA

in Aqua dest.

Tris/HCl (1 M, 500 ml Ansatz) pH 7,4

60,55 g Tris-Base

405 ml Aqua dest.

34,5 ml conc. HCl (37%)

anschließend steril filtrieren

7,5% ige Ammoniak-LösungPBS 10x (phosphate-buffered-saline)

8% NaCl (w/v)

0,2% KCl (w/v)

1,44% Na₂HPO₄ (w/v)

0,24% KH₂PO₄ (w/v)

auf 1,5 l mit Aqua dest. auffüllen

Eisen-Lösung

9,06 g FeCl₃

3,84 g FeCl₂

60 ml Aqua bidest.

Stärke-Lösung

8 g Kartoffelstärke (hydrolysiert)

60 ml Aqua bidest.

EDTA (100 mM)

100 ml EDTA Lösung herstellen

Homogenisationspuffer (HG) 2x

20 ml 1M Tris/HCl, pH 7,4

20 ml 100 mM EDTA, Dinatriumsalz

136 g Saccharose (= 400 mM)

auf 1 L mit Aqua bidest. auffüllen

Homogenisationspuffer (HG) + Inhibitor-Cocktail

50 ml 2x Homogenisationspuffer

10 ml 10x Inhibitor-Cocktail

40 ml Aqua bidest.

Lysispuffer

1% (w/v) Triton X-114

1x Inhibitor-Cocktail

ad 1 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,4

CdCl₂-Lösung

5 mg/ml (1000x) in Aqua bidest.

Sanchezpuffer

5 M Harnstoff

2 M Thioharnstoff

4% CHAPS

0,8% Ampholine (pH 3 – 10)

65 mM DTT

ad 10 ml mit A. bidest.

Reagenz A (BCA-Test)

1 mg Bicinchoninsäure

2 mg Natriumcarbonat

0,16 mg Natriumtartrat

0,4 g NaOH

0,95 mg Natriumbicarbonat

ad 100 ml mit Aqua bidest., pH 11,25, 4°C

Reagenz B (BCA-Test)

0,4 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 10 ml H_2O , 4°C

Arbeitsreagenz (BCA-Test)

A:B (50:1), eine Woche haltbar

(Rezepte und Protokoll aus <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bca.html>)

3.1.5. Stammlösungen

Inhibitor-Cocktail 10x

3,8 mg Leupeptin

4,8 mg Pefablock

1 ml 100 mM EDTA-Lösung

ad 10 ml mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 auffüllen und
mit 2 Tropfen NaOH (2N) neutralisieren.

Ampicillin-Stammlösung

100 mg/ml Ampicillin in Aqua dest

Arbeitskonzentration: 100 µg/ml

Penicillin/Streptomycin-Stammlösung

2,5 mg/ml Penicillin in Aqua dest.

2,5 mg/ml Streptomycin in Aqua dest.

Arbeitskonzentration: 250 µg/ml

Paclitaxel-Stammlösung

20 M Paclitaxel (1000x) in DMSO

Arbeitskonzentration: 20 µM

3.1.6. Verwendete Antibiotika

Ampicillin	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Paclitaxel	AppliChem GmbH, Darmstadt
Penicillin G	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf

3.1.7. Verwendete Chemikalien

Loading Dye (6x)	Fermentas GmbH
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose TopVision™	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot
<i>Acrylamide Bis Solution 37,5:1</i>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
dNTP Mix (2 mM)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Eisen (III) Chlorid	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Eisen (II) Chlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ferrous-Sulphate/ Chelate-Solution	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
Glutardialdehyd (0,5%)	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Hydrolysierte Kartoffelstärke	Biomol GmbH, Hamburg
Proteosepepton	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Cadmiumchlorid	ACROS ORGANICS; New Jersey, USA
Ampholine SERVALYT™ 3-10	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DNA Stain Clear G	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Roti® - Blue kolloidale	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Difco™ LB	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Paraffin Oil Ph. Eur.	AppliChem GmbH, Darmstadt
Pefablock	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Leupeptin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
SOC-Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
DTT	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
CHAPS	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Iodacetamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
TCA	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ammoniak 25%	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumtartrat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
Triton X-114	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
Magermilchpulver	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Alkaline Phosphatase	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich

3.1.8. Verwendete Enzyme

DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot
ExpressLink™ T4 DNA Ligase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.1.9. Verwendete Protein/DNA Größenstandards

GeneRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
GeneRuler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot
Unstained SDS PAGE Protein Marker	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Prestained SDS PAGE Protein Marker	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
IEF Marker 3-10, Liquid Mix	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Proteome Markers	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

3.1.10. Verwendete Kits

DNeasy™ Plant Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy™ Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden
E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit II	Omega Bio-Tek, Norcross, USA
innuPrepDoublePure Kit	Analytik Jena, Jena
SensiMix™ SYBR Low-ROX Kit	Bioline GmbH, Luckenwalde
DNadel™ Goldpartikel-Kit	Seashell Technology, La Jolla, CA, USA

3.1.11. Versuchsmaterialien

Berstscheiben (900 psi)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Makroträger	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Stoppgitter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zellkultur-Platten (24 wells)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkultur-Platten (96 wells)	Sarstedt AG & Co. , Nümbrecht
IPG <i>BlueStrip</i> 3-10, 18 cm	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
qPCR-Platten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
qPCR Folien	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

3.1.12. Geräte

2 D-Gelelektrophorese-Apparatur:

1. Dimension Elektrophoresesystem	Pharmacia LKB Multiphor II(Uppsala, Schweden)
1. Dimension Power Supply	Pharmacia LKB Multidrive XL (Uppsala, Schweden)
2. Dimension Elektrophoresesystem	Biorad Protean [®] II xi Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
2. Dimension Power Supply	LKB Bromma 2297 Macrodrive 5 Constant Power Supply (Bromma, Schweden)
Geldokumentationsanlage	Gel iX Imager, INTAS Science Imaging (Instruments GmbH, Göttingen)
Agarosegelelektrophorese-Apparatur	MIDI 1 (Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)
Electrophoresis Power Supply	EV231 Consort bvba (Turnhout, Belgien)
Goldkanone	PDS1000/Helium (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

Inkubationsschüttler	Innova [®] 44 (New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ)
Konzentrator	Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg)
Fluoreszenzmikroskop	Biozero (KEYENCE GmbH, Neu-Isenburg)
Mikroskop	PrimoStar (Carl-Zeiss AG, Oberkochen)
PCR-Gerät	Mastercycler [®] gradient (Eppendorf, Hamburg)
Spektralphotometer	GENESYS 10S UV-Vis Bio (Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
Thermomixer	ThermoShaker TS1 (Biometra GmbH, Göttingen)
Thermoblock	ThermoBlock TB2 (Biometra GmbH, Göttingen)
Homogenisator	Ultra-Turrax (IKA-Werke GmbH, Staufen)
qPCR-Gerät	Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies GmbH, Böblingen)
Peristaltikpumpe	Minipuls 2 (Abimed GmbH, Langenfeld)
Mikroküvette	Implen (Omnilab Laborzentrum GmbH & Co KG, Bremen)

3.1.13. Zentrifugen

Zentrifuge, 5804R mit Swing-bucket-Rotor A-4-44	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, 5804 mit Standard-Rotor F45-30-11	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, 5424 mit Standard-Rotor F45-24-11	Eppendorf, Hamburg

3.1.14. Datenbanken und Computerprogramme

Datenbanken

Tetrahymena Genom Datenbank (TGD) (<http://www.ciliate.org>)

PubMed des National Centers of Biotechnology (NCBI)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

TMHMM Server, Version 2.0. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)

Pfam, Version 27.0 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)

Uniprot (www.uniprot.org)

SMART (www.smart.embl.de)

Computerprogramme

CorelDrawX7; 2013 Corel Corporation

MxPro 3005P, Version 4.10; 2007 Stratagene

3.1.15. Verwendete DNA-Sequenzen und *Primer*

pMTT1-GFP	Brown <i>et al.</i> , 2003
SNARE containing Protein (SNARE)	Accession# XM001017557
PHP1	Accession# XM001007272
PHP2	Accession# XM001019921
14-3-3 Protein	Accession#XM_001020471.2
17S rRNA (SSU rRNA)	Accession#XM10932

Primer

Primer wurden von der Firma MWG Biotech GmbH Ebersberg bezogen und in Aqua dest. auf 1 µg/ml eingestellt. Die *forward-Primer* werden mit F und die *reverse-Primer* mit R gekennzeichnet. Die Kleinbuchstaben geben die Restriktionsstellen an.

Primer für die quantitative Echtzeit PCR

Die Primer für die quantitative Echtzeit-PCR wurden so gewählt, dass nur 70 bis 200 bp große Fragmente der Zielgen-Regionen amplifiziert wurden.

Primer zur Amplifikation der Region der cDNA der SSU rRNA

17S F 5'-CCTGGGAAGGTACGGGTAAT-3' **20 bp**

17S R 5'-AAGG TTCACCAGACCATT CG-3' **20 bp**

Primer zur Amplifikation der Region der cDNA des SNARE-Gens

SNARE F 5'-ACTCTTAAGCTACCAGATCAGCT-3' **23 bp**

SNARE R 5'-TGCTTGCTTGACATCTAAACCA-3' **22 bp**

Primer zur Amplifikation der Region der cDNA des PHP1-Gens

PHP1 F 5'-TGCTCTTCCTATCTTGGCTCT-3' **21 bp**

PHP1 R 5'-ACAACGTGAGCCTTCTTGTG-3' **20 bp**

Primer zur Amplifikation der Region der cDNA des PHP2- Gens

PHP2 F 5'-ATTCTTCTGGACTGACGG-3' **20 bp**

PHP2 R 5'-TCTTCCATCAGCCCATGTGT-3' **20 bp**

Primer zur Amplifikation der Region der cDNA des VPS13- Gens

VPS13 F 5'- GCTACTCAAGAGGCTGCTGT-3' **20 bp**

VPS13 R 5'- GGTCTGATAATGGAAGGGGCA-3' **21 bp**

Primer zur Amplifikation der genomischen DNA für die GFP-Fusionskonstrukte

Mittels der *Primer F* wird in die Amplifikate eine MluI-Schnittstelle inseriert.

Mittels der *Primer R* wird in die Amplifikate eine BamHI-Schnittstelle inseriert.

Primer zur Amplifikation der genomischen DNA des SNARE-Gens

SNARE-MluI F 5'-AATTacgctCATGAATGATAGACTTAAGGAATT-3' **34 bp**

SNARE- BamHI R 5'-AATTg gatccTCATTTTAAAGTAGTTCCTAAGATA-3' **35 bp**

Primer zur Amplifikation der genomischen DNA des PHP1 Gens

PHP1-MluI F 5'- AATTacgctCATGAACACTAAGTTATTAATTGCTC-3' **25 bp**

PHP1-BamHI R 5'- AATTg gatccTCAGAAACCAGCGCAGGTG-3' **19 bp**

Primer zur Amplifikation der genomischen DNA des PHP2 Gens

PHP2-MluI F 5'- AATTacgctCATGGGTTGCTGTTAATCTGAACA-3' **22 bp**

PHP2-BamHI R 5'- AATTg gatccTCAATTTTCACCGTCTTCGTTTGTC-3' **25 bp**

Primer zur Amplifikation der genomischen DNA des 14-3-3- Gens

14-3-3-MluI F 5'- AATTacgctCATGTCTTTATCTAGAGAAGAAAATAT-3' **26 bp**

14-3-3-BamHI R 5'- AATTg gatccTCATTCTTATTATTCTTCAGCATCG-3' **25 bp**

Sequenzierprimer zur Analyse der Zielgen-Integration in die GFP –und 3′-BTU-Regionen

Seq-GFP	5′- GAGAGACCACATGGTCCTTCTTG-3′ 23 bp
Seq-BTU	5′- GCGGGTGAGTGCAGAATACGTAT-3′ 23 bp

3.1.16. VektorenAusgangsvektoren

Der Ausgangsvektor pMTT1-GFP wurde freundlicherweise von Dorota Wloga, Nencki University, Poland zur Verfügung gestellt (s. Abb. 6). Als Basis für alle Plasmidkonstrukte diente die *Tetrahymena* Genom Datenbank (*Tetrahymena* Genome Database, TGD), welche die makronukleäre Genomsequenzen von *T. Thermophila* enthält (Eisen *et al.*, 2006). Ausgehend von der genomischen DNA wurden die Sequenzen für die Gene mit den zusätzlichen MluI und BamHI Restriktionserkennungsstellen amplifiziert und in den Vektor pMTT1-GFP (s. **Abb. 6**) kloniert. Dieser episomale Vektor enthält einen pBlueScript (SK+) backbone zur autonomen Replikation in *E.coli* und eine Erkennungsstelle für die Ampicillin Resistenz. Außerdem enthält dieser die Sequenz für das grün-fluoreszierende Protein (GFP), welche sich C - terminal zum Zielgen befinden wird.

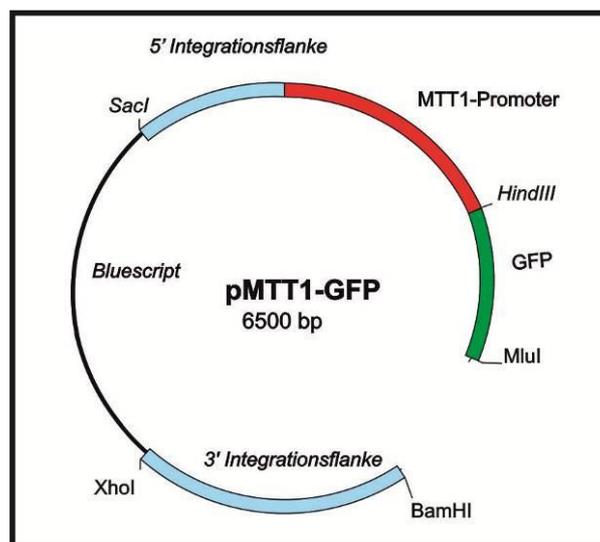


Abb. 6: Ausgangsvektor pMTT1-GFP. Beschreibung s. Text.

Hergestellte Plasmidkonstrukte

In dieser Arbeit wurden folgende Plasmide hergestellt:

pMTT1-GFP-SNARE	pMTT1-GFP mit integrierter SNARE-Sequenz
pMTT1-GFP-PHP1	pMTT1-GFP mit integrierter PHP1-Sequenz
pMTT1-GFP-PHP2	pMTT1-GFP mit integrierter PHP2-Sequenz
pMTT1-GFP-14-3-3	pMTT1-GFP mit integrierter 14-3-3-Sequenz

3.2. Methoden

3.2.1. Stammhaltung

3.2.1.1. Stammkultur (*E.coli*); dauerhafte Stammhaltung

Glycerin-Kultur: 500 µl von gut gewachsenen *E. coli* Kulturen (s. Kap. 2.2.1.) wurden mit 500 µl (v/v) Glycerin vermengt und bei -80°C gelagert.

3.2.1.2. Stammhaltung von *Tetrahymena thermophila*

Dauerkultivierung als Standkultur

Die Dauerkultivierung von *T. thermophila* wurde in autoklavierten Reagenzgläsern; mit 10-20 ml Aqua dest. und einer Kichererbse durchgeführt. In diese Reagenzgläser wurden 10-20 µl einer Neff's-Standkultur gegeben und bei RT inkubiert. Das Überimpfen der Dauerkultur erfolgte halbjährlich.

Kultivierung von *Tetrahymena thermophila*

Für die Kultivierung von Vorkulturen wurden 5 ml steriles Medium mit 50 µl einer *T. thermophila* Standkultur angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C als Standkultur oder bei 30°C und 80 rpm als Schüttelkultur. Das Medium der Transformanten enthielt 20 µM Paclitaxel und bei Bedarf 5 µg/ml CdCl₂ (Piccinni *et al.*, 1987). Zusätzlich wurden 250 µg/ml Penicillin und Streptomycin hinzugegeben, um eine bakterielle Kontamination im Voraus zu vermeiden.

3.2.1.3. Bestimmung der Zelldichte bei *T. thermophila*

Mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Kammer wurde die Zelldichte der *T. thermophila* Kulturen bestimmt. Zuerst erfolgte die Verdünnung der Zellsuspension mit 0,5% (v/v) Glutardialdehyd, nach einer gründlichen Durchmischung wurde die Lösung in die Kammer pipetiert. Pro Kammerfüllung wurden diagonal vier Großquadrate ausgezählt. Mit der angegebenen Formel wurde anschließend die Zellzahl bestimmt.

$$\text{Zelltiter (Zellen/ml)} = (M/64) \times 8 \times VF \times 10.000$$

M = Mittelwert aus den vier Großquadraten der oberen und der unteren Kammer

VF = Verdünnungsfaktor

3.2.2. Isolierung stadienspezifischer phagosomaler Proteine

3.2.2.1. Herstellung von Magneto-Beads

Die magnetischen Partikeln gemäß dem „pulse-chase“ Protokoll nach Vosskühler & Tiedtke (1993) hergestellt (s. Kap. 3.2.2.2). Die Methode zur Herstellung von magnetischen Partikeln mit einem Durchmesser zwischen 0,2 und 1 mm stammt ursprünglich von Molday und Mackenzie (1982) und wurde von Vosskühler und Tiedtke (1993) weiterentwickelt und wesentlich verbessert. Für die Herstellung von magnetischen Partikeln zur Phagosomenmarkierung verwendete man eine Eisen-Lösung, 7,5%ige Ammoniak-Lösung und hydrolysierte Stärkelösung (s. verwendete Lösungen im Kap. 2.1.4.).

Die Stärke-Lösung wurde unter Rühren auf 65°C erhitzt, bis eine viskose, klare Lösung entstanden war. Nun erfolgte die Zugabe von 20 ml Aqua bidest., dabei wurde die Lösung auf 40°C abgekühlt. Unter Rühren wurde die Eisenlösung zugegeben, eventuell auftretende Verklumpungen wurden mit Hilfe eines Glasstabes entfernt.

Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Pumpeneinstellung: 340,5) wurden unter Rühren bei 40°C 120 ml 7,5%iges NH₃ zugetropft, dabei bildeten sich Partikel mit einem Magnet-Kern (Fe₃O₄), der von einer Stärkeschicht umgeben war. Durch die basische Lösung fiel Eisenhydroxid aus, welches im Anschluss in Reaktion mit Wasser unter der Reduktion von Wasserstoff (H₂↑) zu dem Spinell Magnetit (Fe₃O₄ (=Fe(III)₂Fe(II))) gebildet wurde. Anschließend wurde die entstandene schwarz-braune Suspension auf 65°C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt. Die Suspension wurde bei 400 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand über Nacht (üN) in einer Glas-Petrischale bei RT auf einem Permanentmagneten inkubiert.

Durch den Permanentmagneten wurden die magnetischen Partikel herausgezogen. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Partikel in 20 ml 10x PBS resuspendiert. Nach einer erneuten Inkubation auf dem Permanentmagneten wurde der Überstand wieder abgesaugt. Dieser Vorgang wurde dann mit 20 ml 1x PBS wiederholt. Anschließend wurden die Partikel in 40 ml 1x PBS aufgenommen und bei 400 g 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand mit den darin verbleibenden Partikeln bei 8°C gelagert.

Die Haltbarkeit der so hergestellten magnetischen Partikeln betrug ca. 1-2 Wochen.

Zur Phagosomenisolation wurden die Partikeln auf einem Permanentmagneten inkubiert; der Überstand verworfen und das Sediment in ca. 40 ml Neff's Medium aufgenommen.

3.2.2.2. Die „pulse-chase“ Markierung von Phagosomen bei *T. thermophila* - magnetische Separation

Zur Charakterisierung von Phagosomen eines definierten phagosomalen Reifungsstadiums wurden die Zellen von *T. thermophila* nach einem „pulse-chase“ Verfahren (Vosskühler & Tiedtke, 1993) mit magnetischen Mikropartikeln gefüttert und die so magnetisch markierten Phagosomen isoliert.

Vier Kolben a^c 400 ml Kultur wurden auf 100 ml je Kolben eingengt (Zentrifugation: 1100 * g, 5 min). Der resultierende Inhalt der vier Koben wurde in einem Kolben vereinigt.

400 ml Zellen wurden mit 40-80 ml Magneto-Beads gefüttert. Die Magneto-Beads wurden zu den Zellen (Fernbachkolben) auf einmal gegeben und bei RT, 80 rpm für 30 sek inkubiert („pulse“). Unter dem Mikroskop wurden die Zellen auf die Bildung von Phagosomen analysiert. Die so gefütterten Zellen wurden direkt in einem Eis/Kochsalzgemisch (-15°C) auf eine Temperatur von unter 8°C abgekühlt. Bei der Temperatur unter 10°C wird die Membranfluidität so weit herabgesetzt, dass eine weitere Abschnürung von Phagosomen oder Prozessierung des gerade gebildeten nascenten Phagosoms nicht mehr möglich ist. Die Zellen wurden anschließend bei 1100 * g, RT für eine Minute abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und das Zellpellet mit frischem 4°C kaltem Medium gewaschen; dadurch wurden die nicht ingestierten magnetischen Partikeln entfernt. Zur Erlangung von Phagosomen des 5 min-alten Reifungsstadiums (kondensierte Phagosomen) wurde die Kultur mit 37°C warmen frischem Medium in einem „chase“ für weitere 4,5 min unter Schütteln (80 rpm, 30°C) inkubiert. Es erfolgte anschließend die Sedimentation.

Es wurden 10 ml des gekühlten Inhibitor-Cocktail-Homogenisationspuffers hinzugegeben und das Zellpellet resuspendiert. Der Inhalt wurde in ein Zentrifugenglas gegeben. Unter mikroskopischer Kontrolle erfolgte nun die Homogenisation auf Eis.

Nach erfolgreichem Aufschluss wurde die Suspension in ein 600 ml Becherglas gegeben, welches sich in einer Glasschale (gefüllt mit Wasser und Eis) befand. Die Sedimentation der Phagosomen erfolgte mit Hilfe von einem Permanentmagneten, welcher sich unterhalb der Glasschale befand. Dadurch konnten die magnetisch markierten Phagosomen von den übrigen Zellbestandteilen in reiner Form isoliert werden. Nach etwa 10 min wurde der Überstand auf Phagosomen mikroskopisch untersucht und abgesaugt. Nun erfolgten eine Zugabe von dem restlichen HG-Puffer-Inhibitor-Cocktail-Gemisches und eine erneute Sedimentation und

Abtrennung. Zum Schluss wurde die sedimentierten Phagosomen drei Mal mit je 100 ml des HG-Puffers gewaschen, in 2 ml des Puffers aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.2.2.3. Solubilisierung phagosomaler Proteine

Um die phagosomalen Membranproteine fällen zu können, müssen diese vorher in Lösung gebracht werden. Dazu verwendete man, nach der Methode von Bordier (Bordier 1981), ein geeignetes Detergenz wie z. B. Triton X-114: $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})^{7-8}$ (s. Abb. 7), dieses lagert sich mit den hydrophoben Phenyl-Resten an die hydrophoben Bereiche (vor allem Transmembrandomänen) des Proteins an und verdrängt dabei die Phospholipide (Bordier, 1981). Das Protein geht erst dann in Lösung, wenn sich genügend Seifenmoleküle an die Membran angelagert haben - also das ideale Verhältnis zwischen der Detergenz und dem Protein herrschen. Auf eine Separation von Detergenz- und wässriger Phase, die im Protokoll beschrieben wird, wurde verzichtet.

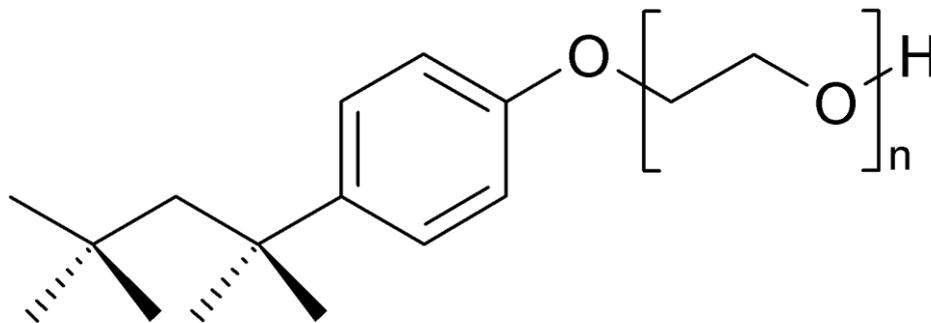


Abb. 7: Strukturformel des Detergenz Triton X-114. n gibt die Anzahl der Polyethylenoxid-Ketten an.

Zuerst erfolgte die Zugabe von 1,5 ml des Lysepuffers (enthält Inhibitor-Cocktail und 1% (w/v) Triton X-114) zu 100 mg ($\approx 100\ \mu\text{l}$) isolierten Phagosomen. Anschließend, nach drei Frier-Tau-Schritten (N_2 und 50°C), folgte eine 30-min Inkubation auf Eis. Die magnetischen Kerne wurden für 50 min bei 4°C und 20.000 g sedimentiert; der daraus resultierende Überstand wurde in einem Röhrchen gesammelt und es erfolgte die Protein Fällung mit der Trichloressigsäure (TCA).

3.2.2.4. Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Die zu fällende Probe wurde mit einem Viertel Volumen eiskalter 50%iger TCA versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nun erfolgte die Zentrifugation für 15 min, bei 2°C und 14.000 rpm; auf das entstandene Sediment wurden 500 µl eiskaltes Aceton gegeben, um TCA-Reste zu entfernen. Die Probe wurde gevortext und anschließend erneut für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Konzentrator getrocknet und für die SDS-PAGE in entsprechender Menge Sanchez-Puffer aufgenommen bzw. für die MudPIT-Analyse bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2.5. Bicinchoninsäure (BCA)- Test

Die Methode stellt eine Modifikation der Methode von Lowry und Mitarbeitern (Lowry *et al.*, 1951). Sie beruht auf der Kombination aus Biuret- und einer Komplexbildungsreaktion mit BCA und wird zur Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt. Diese Methode zeichnet sich besonders durch die Stabilität gegenüber der Detergenzien. Sie eignet sich, um die Proteinmengen für die weiteren Versuchsschritte abzuschätzen bzw. sicher zu stellen, dass genügend Material für die MudPIT-Analyse vorhanden ist.

Im ersten Schritt (Biuret-Reaktion) wird Cu (II) in einer alkalischen Lösung zu Cu (I) reduziert. Im zweiten Schritt wird ein Chelatkomplex aus einem Cu (I)-Ion und zwei BCA-Molekülen gebildet. BSA wurde zur Erstellung der Kalibriergeraden verwendet.

Die Proben wurden in einem linearen Bereich zwischen 0,2 und 50 mg/µl Gesamtprotein im Ansatz gemessen. Es wurden 20 µl des Reagens A mit 980 µl des Reagens B versetzt und mit 20 µl der Probe vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 60 °C erfolgte die spektralphotometrische Analyse bei 562 nm. Als Leerwert diente die Arbeitslösung ohne Proteine. Mit Hilfe des BCA-Tests wurde die Ausbeute für phagosomale Proteine vor der Fällung mit TCA bestimmt; sie betrug zwischen 0,2 und 0,5 mg Protein pro $3,2 \cdot 10^6$ Zellen.

3.2.3. Zweidimensionale (2 D)-Gelelektrophorese

Die mit TCA gefällten phagosomalen Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Nettoladung (pI) in der ersten Dimension und ihrem Molekulargewicht in der Gelelektrophorese-Apparatur (zweite Dimension) aufgetrennt. Die Auftrennungen erfolgten stets unter Kühlung bei einer Temperatur von 4°C.

3.2.3.1. Isoelektrische Fokussierung

Zunächst erfolgte die isoelektrische Fokussierung (IEF, 1.Dimension); hier wurden die phagosomalen Proteine in Proteingemischen in einem gewählten pH-Bereich von 3-10 nach ihrer Nettoladung aufgetrennt. Dazu wurde ein immobilisierter pH-Gradient: IPG-Streifen pH 3-10, 18 cm Länge verwendet. Der IPG-Streifen wurde nach dem Protokoll: *Principles & Methods von Amersham Pharmacia Biotech* vorbereitet und verwendet. Die IPG-Streifen wurden im beigefügtem *Reswelling Tray* mit dem Proteingemisch (15-30 µg) in 350 µl des nach Rabilloud modifizierten Sanchez Puffers über Nacht (üN) rehydratisiert (Sanchez *et al.*, 1997; Rabilloud *et al.*, 1997). Am nächsten Tag erfolgte die erste Dimension in der Multiphor II Elektrophorese-Einheit. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte nach folgendem Schema:

Tab. 1: Schema für isoelektrische Fokussierung der IPG-Streifen.

Phase	Volt	Ampere	Watt	Dauer (h : min)
1	500	2	5	0:01
2	3500	2	5	1:30
3	3500	2	5	4:50 – 6:20

Anschließend wurden die IPG-Streifen für die 2. Dimension vorbereitet bzw. üN bei -20°C gelagert.

3.2.3.2. Äquilibration und zweite Dimension (SDS-PAGE)

Für die zweite Dimension wurden die IPG-Streifen mit zwei unterschiedlichen Äquilibrationpuffer behandelt. Zunächst erfolgte die Äquilibration in einem DTT-haltigen Puffer und anschließend wurden die IPG-Streifen mit einem Iodacetamid-haltigen Äquilibrationpuffer behandelt. Durch die Äquilibration werden die Trägerampholyte herausgewaschen, die bei der 2. Dimension stören würden. Durch Äquilibration mit dem DTT-haltigen Puffer werden die Disulfidbrücken der Proteine gespalten und mit Hilfe des Iodacetamid-haltigen Puffers die entstandenen SH-Gruppen irreversibel alkyliert.

Die IPG-Streifen wurden mit je 12 ml des DTT-haltigen Äquilibrationpuffers für 15 min bei RT unter Schütteln (40 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgegossen und durch 12 ml des Iodacetamid-haltigen Puffers ersetzt und weitere 6 min inkubiert.

Das Acrylamid-Gel (12,5%) wurde nach folgendem Protokoll nach Laemmli (1970) gegossen:

Tab. 2: 12,5% Acrylamidgel nach Laemmli

22,5 ml Acryl/Bisacrylamid 30%
28,1 ml Tris 1,5 M, pH 8,8
5,6 ml Aqua dest.
283 µl 20% SDS
27,5 µl TEMED
395 µl 10% APS

Zum Vermeiden der vorzeitigen Polymerisation wurden die Agenzien APS und TEMED erst zum Schluss zugegeben.

Anschließend wurde etwas Agarose (angesetzt im Laufpuffer) auf die polymersisierten Gele drauf gegeben und die vorbereiteten IPG-Strips auf die Gele aufgelegt.

Es wurde ein Proteingrößenstandard zur Abschätzung des Molekulargewichtes verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter Kühlung (8°C) bei 25 mA für 8 h (pro Gel).

3.2.3.3. Coomassie-Färbung

Anschließend wurden die 2D-Gele mit kolloidaler Coomassie-Färbung nach Angaben des Herstellers markiert. Die Nachweisgrenze bei dieser Färbung liegt bei < 30 ng Protein.

3.2.4. Multidimensionale Protein-Identifizierungstechnik (*Automated Multidimensional Protein Identification Technology: MudPIT*)

Diese automatisierte Methode für *shotgun proteomics* kombiniert multidimensionale Flüssigchromatographie mit der Elektrospray-Ionisierungs Tandem-Massenspektrometrie (Wolters *et al.*, 2001; Washburn *et al.*, 2001). Eine automatische multidimensionale Protein-Identifikations-Technologie erlaubt eine Protein/Peptid-Analyse der Probe ohne dass diese vorher gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Dafür werden die zu untersuchenden Proteine gefällt und anschließend mit geeigneten Peptidasen behandelt, i. d. R. Trypsin und Chymotrypsin.

In der Abb. 8 ist der Aufbau der Separationsmatrix dargestellt. Die multidimensionale Flüssigchromatographie Methode integriert einen starken Kationentauscher-Harz (*strong cation-exchange SCX*) mit dem Umkehrphasen-Harz in einer biphasischen Säule. Die Peptidgemische werden zunächst mit der Endoprotease Chymotrypsin verdaut (speziell für membrangebundene Proteine) und fraktionsweise und auf die biphasische Säule geladen. Nach der Äquilibrierung der Säule mit dem Acetonitril-haltigen Puffer werden die Peptide schrittweise durch Erhöhung der Salzkonzentration (KCl) von dem Kationentauscher-Harz auf den Umkehrphasen-Harz (*reverse phase: RP*) gewaschen.

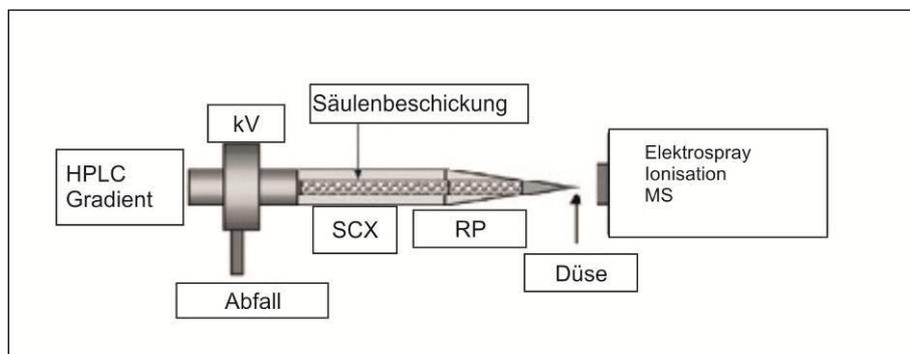


Abb. 8: Schematische Darstellung der Separationsmatrix in MudPIT. kV: Kilovolt, SCX: Kationentauscher-Harz, RP: Umkehrphasenharz. (http://www.nature.com/labinvest/journal/v84/n10/fig_tab/3700167f2.html).

Die stadienspezifischen Proteinpellets wurden freundlicherweise von Dr. Wolters und seinen Mitarbeitern (Ruhr-Universität Bochum) mittels der MudPIT-Methode untersucht. Dazu wurden mit Hilfe von 90%iger Ameisensäure Membranproteine gelöst und mit Bromcyan die Loops zwischen den Transmembrandomänen geschnitten. Anschließend wurden die löslichen Bestandteile mit geeigneten Proteasen behandelt. Im Protokoll, speziell für Membranproteine, wurde die Endopeptidase Chymotrypsin verwendet. Der Ablauf der MudPIT-Analyse ist schematisch in der Abb. 9 dargestellt.

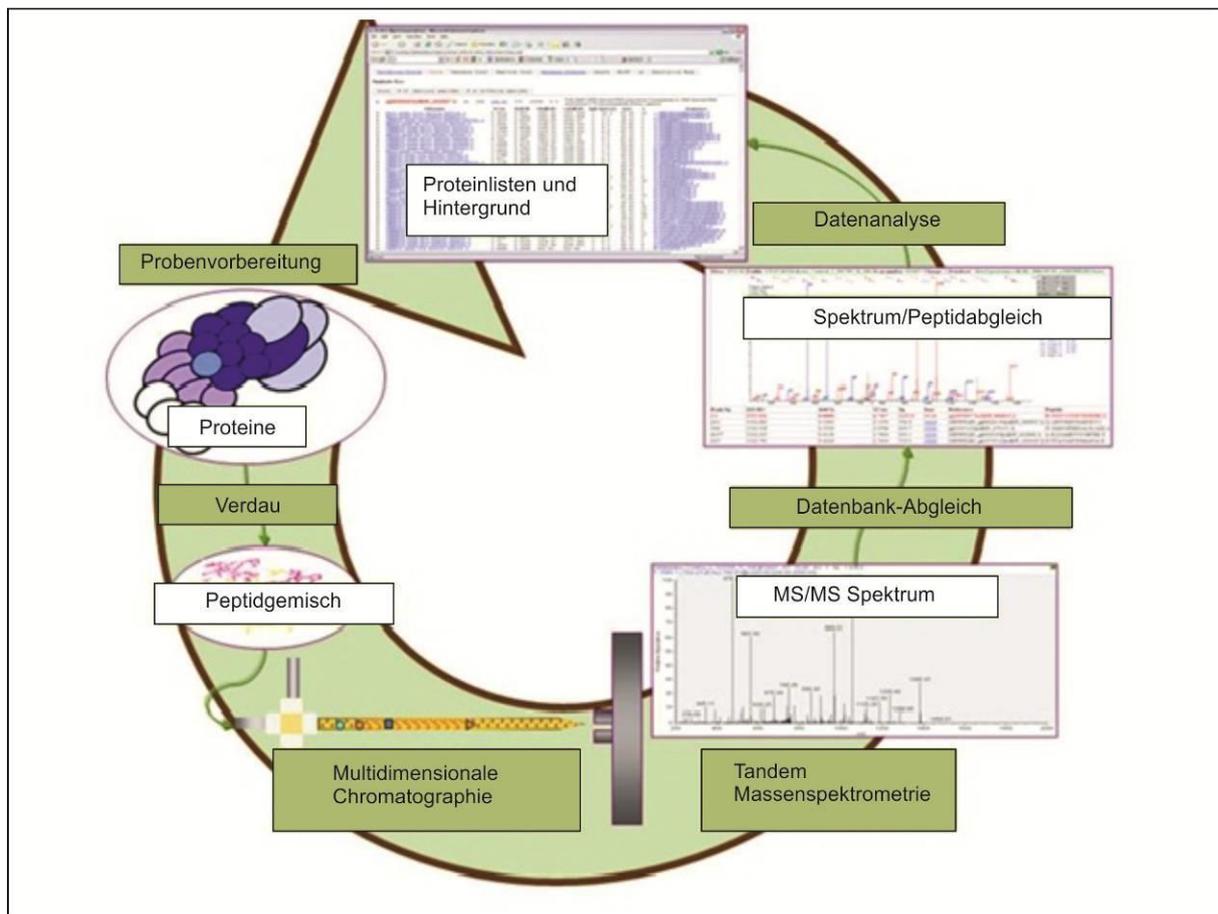


Abb. 9: Schematische Darstellung der Vorgehensweise mittels MudPIT-Technologie. (verändert nach <http://research.stowers.org/proteomics/mudpit.html>). Die isolierten Proteine werden mit Proteasen verdaut und die dabei gebildeten Peptide werden in der *fused silica* Kapillarsäule zweidimensional aufgetrennt. Anschließend folgt eine Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) und der Datenbank-Abgleich. Die Datenanalyse kann bis zu 1500 Proteine/24 h ermöglichen (Washburn *et al.*, 2001).

Anschließend werden die Peptide durch die Erhöhung des linearen Gradienten in das Massenspektrometer eluiert. Für die Gesamtanalyse werden ca. 15 Zyklen benötigt. Die MS/MS Daten werden mit Hilfe von SEQUEST in der *T. thermophila* Datenbank (www.ciliate.org und BLAST) gesucht. Die Ergebnisse resultieren in 707 Proteinen und

Peptiden (Liste s. Anhang). Zur besseren Übersicht wurden die resultierenden Proteine nach bekannten und vorhergesagten Funktionen in biologische Prozesse eingeteilt.

3.2.5. Relative Quantifizierung der mRNA

3.2.5.1. RNA-Extraktion und Reverse Transkriptase

Einige ausgewählte stadienspezifische phagosomale Proteine sollen mittels qPCR bzgl. ihrer Expression zu bestimmten Zeitpunkten in Bezug zu einem konstitutiv exprimierten Gen (Haushaltsgen) untersucht werden. Um diese Analyse zu ermöglichen, werden mit Hilfe des „pulse-chase“-Verfahren *T. thermophila* Kulturen mit Magneto beads gefüttert und ihre stadienspezifische RNA isoliert.

Die reverse Transkriptase bildet aus doppelsträngiger RNA eine singuläre komplementäre DNA Kopie (cDNA), die für die PCR eingesetzt wird. Die Qualität der isolierten RNA ist daher ganz entscheidend für die weiteren Arbeiten. Die zelluläre Gesamt-RNA darf keinerlei Verunreinigungen durch DNA aufweisen und degradiert sein.

Es wurden stadienspezifische (30 sek, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min und 120 min) Proben aus einer gut gewachsenen *T. thermophila* Kultur entnommen und daraus die RNA mit dem RNeasy-Kit nach Protokoll isoliert und aufgearbeitet. Anschließend wurden diese Proben bei -80 °C kryokonserviert.

3.2.5.2. Quantitative *real time* PCR (qPCR)

Reverse transcriptase (RT) und die darauf folgende *polymerase chain reaction* (PCR) ermöglichen die mRNA zu amplifizieren und in Echtzeit zu detektieren. Die quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) ermöglicht die Nukleinsäuren zu amplifizieren und in Echtzeit quantifizieren. Diese Methode ist hoch sensitiv und gut reproduzierbar und eignet sich daher besonders gut für die in geringen Kopienzahlen vorhandene Transkripte in Geweben von niedrigkonzentrierten RNA Proben sowie die kleinen Mengen von Gewebeproben und um die geringen Änderungen im mRNA Expressionslevel nachzuweisen (Pfaffl, 2001; Schmittgen *et al.*, 2000; Wittwer & Garling, 1991).

Für die Quantifizierung von ausgewählten DNA Sequenzen wurde ein fluoreszierender mit der DNA-interkalierender Marker SYBR[®] Green verwendet (Morrison *et al.*, 1998). Dieser

Fluoreszenzfarbstoff wird im Verlauf der PCR-Zyklen proportional zur Menge des PCR-Produktes eingebaut und am Ende wird die gemessene Fluoreszenz bei 520 nm in der exponentiellen Phase ermittelt. Als Referenzfarbstoff wird ROX eingesetzt, dessen emittierte Fluoreszenz bei 612 nm gemessen wird. Das SYBR[®] Green Fluoreszenzsignal wird gegen das ROX Referenzsignal normalisiert. Am Anfang wird eine Primer-Titration durchgeführt, um sicher zu stellen, dass alle eingesetzten Primer mit der identischen Effektivität arbeiten. Zum Schluss einer qPCR Reaktion erfolgt eine Schmelzkurvenanalyse; der Schmelzpunkt stellt das spezifische Produkt dar. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der MxPro qPCR Software.

SYBR[®] Green Assays liefern im Vergleich zu dem TaqMan Assay sehr sensitive vergleichbare dynamische Bereiche und hochauflösende lineare Plots (Schmittgen *et al.*, 2000). Grundsätzlich gibt es zwei Quantifizierungsstrategien: der Expressionslevel des Gens kann entweder über die absolute oder die relative quantitative *real-time* PCR gemessen werden. Während die absolute Quantifizierungsmethode das PCR Signal auf die eingesetzte Kopienzahl unter Verwendung einer Kalibriergeraden bezieht, gibt die relative Quantifizierung die relativen Änderungen im RNA Expressionslevel an. Relative Quantifizierung beruht auf dem Vergleich zwischen dem Expressionslevel des Zielgens mit dem des Haushaltsgens als Referenz (Souaze *et al.*, 1996; Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002a).

In dieser Arbeit wurde die relative Quantifizierungsmethode verwendet, genauer die $\Delta\Delta C_t$ -Methode nach Livak & Schmittgen. (2001). Der C_t -Wert (*cycle threshold*) ist der Schwellenwertzyklus einer PCR Reaktion, bei dem die eigebaute Fluoreszenz erstmalig über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Als ein gut untersuchtes Haushaltsgen eignete sich das 17 S rRNA Gen von *T. thermophila*, das laut TGD (*Tetrahymena Genome Database*) weder durch Cytokinese noch durch Hungerperioden auf einem unveränderten Expressionslevel bleibt. R gibt das Verhältnis an (*ratio*) und 2 steht für die theoretische Effizienz, was einer Verdopplung der DNA Menge mit jedem Zyklus entspricht.

$$R = 2^{-[\Delta C_t \text{ Probe} - \Delta C_t \text{ Kontrolle}]}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Die Effizienz des Zielgens wird mit Hilfe von Standardkurve nach folgender Formel berechnet (Rasmussen et al, 2001; Livak & Schmittgen, 2001) und variiert normalerweise zwischen den Werten $E = 1,60$ bis $E = 2,10$ bei den cDNA Mengen von einigen pg bis 75 ng (Wittwer & Garling, 1991; Pfaffl *et al.*, 2002a (A); Pfaffl *et al.*, 2002 (B); Pfaffl, 2001).

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Als Probe wird der Ct-Wert des Gens von Interesse und als Kontrolle der Ct-Wert des Haushaltgens eingesetzt. 18 S rRNA, in *T. thermophila* das 17 S rRNA (im weiteren Verlauf als **SSU rRNA** bezeichnet), repräsentiert die Gesamt RNA der Probe (Suzuki *et al.*, 2000) und wird oft als bevorzugtes Referenz genutzt (Thellin *et al.*, 1999; Schmittgen *et al.*, 2000). Die SSU rRNA-Menge ist stets gleich und bietet daher gute Vergleichbarkeit zwischen den Proben. Als Zielgene wurden laut MudPIT-Analyse vier stadienspezifische Proteine und Proteine, die ausschließlich zu einem Zeitpunkt identifiziert wurden, unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Kathrin Czora ausgewählt (Czora, 2014).

Als erster Kandidat für die quantitative Untersuchung wurde das Protein **PHP2**, auch als **p 38** bezeichnet (81.m00185), welches in beiden Stadien (30 sek und 5 min) der phagosomalen Proteine vorkommt. Dieses Protein wurde bereits als in die Stress-Antwort involvierte **Mitogen-aktivierte Protein-Kinase** (MAPK) von Nakashima *et al.* (1999) und als phagosomales Protein in frühen Phagosomen nachgewiesen (Maicher & Tiedtke, 1999), und ist laut der TGD (www.ciliate.org) in den neu gebildeten Phagosomen lokalisiert. Bei Vergleich der AS-Sequenzen der Proteine PHP 2 und p 38 in der Proteindatenbank Uniprot (www.uniprot.org) und *Tetrahymena* Datenbank TGD (www.ciliate.org) fällt überraschenderweise auf, dass die AS-Sequenz des p 38 nur 232 AS enthält und vollständig in der 376 AS-Sequenz des PHP 2-Proteins enthalten ist. Es handelt sich höchstwahrscheinlich um das gleiche Protein, welches von Maicher & Tiedtke (1999) unvollständig nachgewiesen werden könnte.

Ein weiteres gut untersuchtes Protein ist das **VPS 13** (Jacobs *et al.*, 2006; Samaranyake *et al.*, 2011), welches für die **Sortierprozesse** im Vesikelverkehr verantwortlich ist und nicht stadienspezifisch ist, wurde ebenfalls mittels qPCR relativ quantifiziert (Czora, 2014).

Das *SNARE domain containing Protein* (34.m00271), welches in die **Membranfusionsprozesse** involviert ist und ausschließlich in den nascenten Phagosomen nachgewiesen wurde, eignet sich als Kandidat für diese Untersuchung.

Als viertes hypothetisches Protein **PHP1**, (45.m00225), welches homolog zum hypothetischen Protein von *T. borealis* ist und eine PEF-C-Domäne enthält, wurde ebenfalls untersucht. Das PEF-C-Domäne-Protein ist laut der Proteindatenbank (www.uniprot.org) und GO Annotation als integrale Komponente der Membran im Bakterium *Campylobacter gracilis* beschrieben. Dieses Protein befindet sich laut der MudPIT Untersuchung in den nascenten und 10 min alten Phagosomen (Czora, 2014) und wurde bereits als **p 28** von Maicher & Tiedtke (1999) als phagosomales Protein in frühen Stadien nachgewiesen sowie von der Arbeitsgruppe Jacobs im Phagosomen-Proteom bestimmt (Jacobs *et al.*, 2006). Die AS-Sequenz des p 28 unterscheidet sich nur um zwei AS im Vergleich zur AS-Sequenz des PHP 1 und führt zur Annahme, dass es sich um das identische Protein handelt. Die geringe Abweichung in der AS-Sequenz wird den Artefakten bei den Protein-Analysen zugeschrieben.

Die Primerkonstruktion der zu untersuchenden Proteine erfolgte mit dem Programm Primer 3 und ihre Überprüfung mittels Primer-BLAST.

Für die Kalibrierung wurde die cDNA zum Zeitpunkt 0 (je 2 µl) verwendet (keine Phagozytose-Initiierung). Zur Erstellung von Standardkurven wurde eine cDNA-Mischung zu sieben unterschiedlichen Zeitpunkten (0 min, 30 sek, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min) in den Mengen: 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng, 3,125 ng eingesetzt.

Um die Veränderungen in der Genexpression der gewünschten Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu erfassen, wurden die entsprechenden Gene als Triplikate mit den Primerpaaren und stadienspezifischen cDNA Proben als Template (Zeitpunkte von 0 bis 120 min, je 100 ng) in einem qPCR Lauf untersucht (s. Tab. 3). Außerdem wurde die Reproduzierbarkeit des Standards durch drei-maligen Einsatz in einem PCR-Lauf und in den PCR-Läufen untereinander überprüft. Mit Hilfe der Software MxPro erfolgte eine automatische Normierung auf das Haushaltsgen SSU rRNA im selben Lauf sowie die Erstellung der Standardkurven. Zum Schluss diente die Schmelzkurve als Kontrolle für die Probenreinheit.

Als Negativkontrolle wurde Wasser eingesetzt: *no template control* (NTC) und die Schmelzkurve diente als Qualitätskontrolle für die Reinheit der gebildeten PCR-Produkte.

Tab. 3: Pipettierschema für einen Standard-qPCR-Ansatz

DNA	100 ng
Primer F	500 nmol
Primer R	250 nmol
SYBR [®] Green	100 ml
H ₂ O	ad 20 µl

Die Ergebnisse der einzelnen Gene werden auf das Haushaltsgen SSU rRNA normalisiert und als Expressionsprofile in Form von Balkendiagrammen dargestellt.

3.2.6. Grün fluoreszierendes-Protein (GFP)-Fusionsprodukte

Um die räumliche Lokalisation der zu untersuchenden phagosomalen Proteine nachweisen zu können, eignet sich besonders die Methode der GFP-Fusionsproteine. Es werden C-terminale GFP-Gen-Konstrukte hergestellt, die in die Zelle mittels einer Gen-Kanone eingebracht werden. Anschließend kann man mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops die gewünschten Proteine nachweisen. Die folgende Abb. 10 zeigt vereinfacht die Schritte zum Nachweis der GFP-Fusionsproteine in *T. thermophila* Zellen.

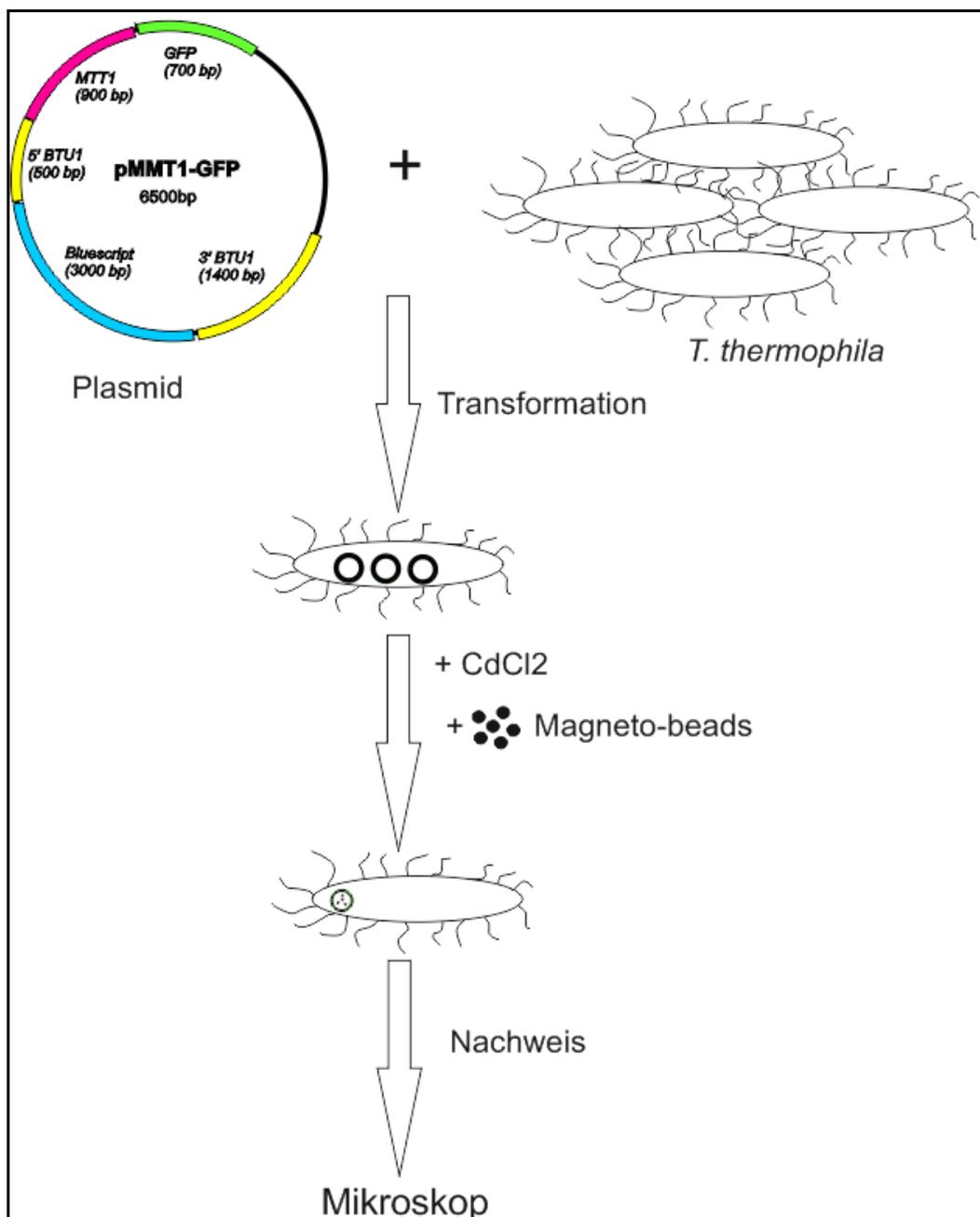


Abb. 10: Schematische Darstellung der Konstruktion und Nachweis der GFP-Fusionsproteine in *T. thermophila* Zellen.

3.2.6.2. Ausgangsvektor

Die GFP-Fusionsprodukte wurden mit Hilfe des *high copy number* Vektors pMTT1-GFP, welcher freundlicherweise von Dorota Wloga (Nencki Universität, Warschau, Polen) zur Verfügung gestellt wurde, konstruiert (s. Abb. 11 A). Dieser enthält neben dem pBlueScript *backbone*, der zur autonomen Replikation in *E.coli* führt, einen mit CdCl₂ induzierbaren Metallothionein Promoter (MTT1, Shang *et al.*, 2002a) und die GFP-Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins. Diese Regionen sind von den 3' und 5' untranslatierten Regionen von β -Tubulin 1 (BTU1) zwecks homologer Rekombination flankiert.

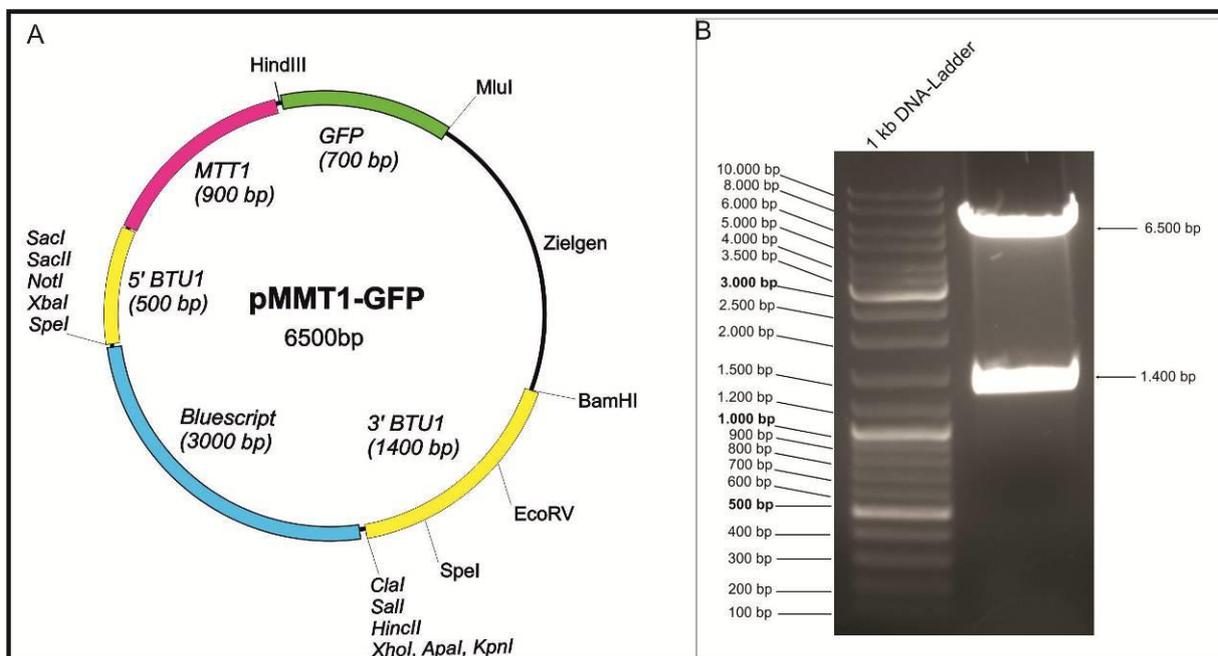


Abb. 11: A: Ausgangsvektor pMTT1-GFP mit *Bluescript backbone*. B: Ausgangsvektor pMTT1-GFP-restringiert mit den Restriktionsendonukleasen MluI/BamHI

Am Ausgangsvektor befinden sich zwei Restriktionsschnittstellen (MluI und BamHI), sodass das Zielgen auf diese Weise mit Hilfe der ExpressLink Ligase von Invitrogen N-terminal zur GFP-Sequenz eingebaut werden kann.

Der Vektor wurde zunächst mit den Restriktionsendonukleasen MluI und BamHI bei 37°C für 3 h restringiert und zum Überprüfen im 1,5%-igen analytischem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 11 B). Die Aufreinigung des Restriktionsgemisches erfolgte mit dem *innuPrepDoublePure* Kit gefolgt von der Behandlung mit der alkalischen Phosphatase. Anschließend wurde die vorbereitete Zielgen-DNA in den Vektor ligiert.

3.2.6.3. Verwendeter *T. thermophila* Stamm

T. thermophila exprimiert zwei wichtige β -Tubulin Gene: BTU1 und BTU2, welche das identische β -Tubulin Protein kodieren (Gaertig *et al.*, 1993). Eine Substitution von Lysin 350 durch Methionin in BTU1-Gen (*btu-1-1K350M*) führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber der Mikrotubuli-depolimerisierenden Drogen wie Oryzalin, Colchicin und Vinblastin. Außerdem wird gleichzeitig die Sensitivität gegenüber dem Mikrotubuli-stabilisierenden Mittel **Paclitaxel** erhöht (Gaertig *et al.*, 1994). Der Phänotyp des *btu-1-1K350M*-Allels wird in Gegenwart von den Wildtyp-Kopien des zweiten β -Tubulin Gens BTU2 exprimiert. Durch die Transformation des Vektors mit den BTU1 Flanken wird es möglich exogene Gene durch homologe Rekombination im BTU-Lokus zu exprimieren und so die Transformanten durch Paclitaxel-Zugabe zu selektieren (Gaertig *et al.*, 1999).

3.2.6.4. GFP-Fusionsproteine

Als Template für die GFP-Fusionsproteine wurde die genomische DNA der ausgewählten Proteine (SNARE, PHP1, PHP2 und 14-3-3-Protein) verwendet. Das Protein SNARE (34.m00271) kommt ausschließlich in den nascenten Phagosomen vor. Es wurden PHP 1 und PHP 2, welche bereits mittels qPCR quantifiziert wurden, für den Lokalisationsnachweis eingesetzt. Das 14-3-3 Protein – auch als **FTT18** (18.m00476) in der TGD bekannt, welches laut der MudPIT-Analyse in den beiden untersuchten Zeitpunkten vorkommt, wurde für den räumlichen und zeitlichen Nachweis mittels GFP-Markierung verwendet. Dieses Protein ist in der Lage an verschiedene Signalproteine sowie Kinasen, Phosphatasen und Transmembran-Rezeptoren zu binden.

Für die PCR Reaktionen wurden spezifische Primer konstruiert (s. Kap. 3.1.15.), welche jeweils den kodierenden Bereich, angefangen mit dem Start Codon und entsprechend endend mit dem Stopp Codon, amplifizieren. Die Gene wurden durch die Restriktionserkennungsstellen, welche ebenfalls in den Primer-Sequenzen enthalten waren, für MluI und BamHI flankiert, um diese in den Klonierungsvektor pMTT1-GFP (s. Kap. 3.2.6.5) (Dorota Wloga, Nencki Universität, Warschau) zu übertragen.

Nach einer erfolgten Ligation wurden die fertigen GFP-Fusionskonstrukte in die kompetenten NEB 5 α Zellen von Biolabs transformiert, selektiert, sequenziert und für die Transformation in CU 522 Zellen vorbereitet (s. Kap. 3.2.6.7.).

3.2.6.5. Klonierung von DNA

Isolierung der genomischen DNA aus *T. thermophila*

Die genomische DNA wurde mit Hilfe des DNeasyTM Plant Tissue Kits isoliert und diente als *template* für die PCR-Reaktionen.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde zur Amplifizierung von DNA-Fragmente definierter Länge und Sequenz unter Verwendung spezifischer *Primer* verwendet. Die Reaktion fand in einem *Mastercycler*[®] *Personal* bzw. *Gradient* mit dem unten aufgeführten Programm statt:

Tab. 4: PCR-Reaktionsansatz beispielhaft für *SNARE domain containing Protein*.

PCR-Programm		Pipettierschema	
1. 95°C	3-5 min	DNA-template	3-5 µg
2. 95°C	30 sec	<i>Primer F</i>	1 µl
3. 59°C	1 min	<i>Primer R</i>	1 µl
4. 72°C	1:30 min	dNTP's (2 mM)	5 µl
<i>repeat 2-4</i>	39 x	Polymerase-Puffer (10x)	5 µl
5. 72°C	10 min	Polymerase: <i>DreamTaq</i> (5U/µl)	0,5 µl
6. 4°C	∞	Aqua dest.	ad 50 µl

Die Denaturierung erfolgte bei 95°C. Die Annealing Temperatur wurde bei 59°C gewählt. Dies erfolgte abhängig von der Länge und Basenzusammensetzung der *Primer*, um eine optimale und spezifische Anlagerung der *Primer* zu erzielen.

Die Elongation erfolgte bei 72°C und ist abhängig von gewünschter Fragmentgröße. Dieses Programm und das Pipettierschema wurden für die Amplifikation der Sequenz des *SNARE domain containing Proteins* verwendet.

Als *template*-DNA diente die genomische DNA von *T. thermophila*; als *Primer* für das Protein dienten SNAREMluI F und SNAREBamHI R.

Aufreinigung

Die Aufreinigung von PCR-Produkten, Ligationsansätzen und DNA-Restriktionen erfolgte mit Hilfe des innuPrepDoublePure Kits, dabei wurden die Enzyme, Salze und Oligonukleotide entfernt.

Restriktion

Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen (Biolabs) und den spezifischen Restriktionspuffer wurden die DNA-Moleküle gespalten. Die Ansätze 3 bis 5 µg DNA mit 1 U Enzym, wurden 3 h bei 37°C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch überprüft (s. Tab. 5). Anschließend wurden die Ansätze mittels InnuPrepDoublePure Kit von Analytik Jena aufgereinigt und zur Ligation eingesetzt.

Tab. 5: Pipettierschema für einen Standard-Restriktionsverdau

Template	3 - 5 µg
10 x BamHI Puffer	5 µl
BamHI	1,5 µl
MluI	1,5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Dephosphorylieren mit alkalischer Phosphatase

Der Ausgangsvektor wurde vor der Ligation mit dem *insert* mit alkalischer Phosphatase gemäß dem Herstellerprotokoll behandelt, um die 5'-Phosphat-Enden des Vektors zu entfernen.

Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe der Mikroküvette (Implen) nach Angaben des Herstellers.

Ligation

Zur Ligation von *insert*-DNA und Vektor wurde die ExpressLink T4-DNA-Ligase (5 U/ μ l) unter Verwendung des spezifischen Puffers eingesetzt. Es wurden 100 ng des dephosphorylierten Vektors eingesetzt. Die *insert*-DNA wurde im molaren Überschuss zum Vektor (1:3) hinzugegeben, um eine effiziente Ligation zu erreichen. Das Reaktionsgemisch (Gesamtvolumen von 20 μ l) wurde 5 min bei RT inkubiert.

3.2.6.6. Transformation von Bakterien

Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Man verwendete für die Transformation 5 μ l des Ligationsansatzes (DNA Menge zwischen 1 pg und 100 ng) und versetzt diese mit 50 μ l der kompetenten NEB 5 α Zellen. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 30 sek Hitzeschock bei 42°C erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis (5 min). Schließlich wurden die transformierten Zellen in 950 μ l SOC-Medium für 1 h bei 37°C und 250 rpm regeneriert. Die Selektion der positiven Transformanten erfolgte auf Selektivnährböden (Amp), bei 37°C im Wärmeschrank.

Plasmid-DNA-Isolation mit E.Z.N.A. Kit

DNA-Präparation im kleinen Maßstab aus *E. coli* Transformanten erfolgte mit Hilfe des E.Z.N.A. Mini-Kits. Dazu wurde eine Einzelkolonie in 5 ml des Antibiotika-haltigen LB-Mediums überführt und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 5 ml dieser Kultur geerntet, nach Anleitung des Herstellers präpariert und bei -20°C gelagert.

Sequenzierung

Die Überprüfung der DNA-Sequenzen der Plasmid-Präparationen wurde durch MWG Biotech AG, Martinsried durchgeführt.

3.2.6.7. Die *biolistic* transformation von *T. thermophila*

Unter dem Prozess *biolistic transformation* versteht man den Beschuss von Zellen mit der Plasmid-DNA durch den Einsatz einer „Goldkanone“ (s. Abb. 12). Die isolierte Plasmid-DNA wird hierbei auf spezifische Mikroträger (Goldpartikel) geladen und mit Hilfe komprimierten Helium in die Zellen geschossen. Auch *T. thermophila* kann erfolgreich mit dieser Methode transformiert werden. Es kommen sowohl konjugierende *T. thermophila* Kulturen als auch vegetative Zellen zum Einsatz.



Abb. 12: Photographische Darstellung der „Goldkanone“ PDS1000/Helium von Bio-Rad.

DNA-Vorbereitung

Die Vektor-DNA wurde vor der Transformation mittels E.Z.N.A. Kit isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und SacI restringiert, um das *backbone* zu entfernen. Anschließend wurde die DNA auf die gewünschten Konzentration von $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingengt.

Vorbereitung vegetativer Zellen

Die Zellen (CU 522) wurden im Kulturkolben mit 200 ml Neff's Medium bei 30°C und 80 rpm bis zum Erreichen der logarithmischen oder stationären Wachstumsphase inkubiert. Anschließend wurden 20-40 ml Zellen geerntet, in 10 mM Dryl's Puffer pH 7,4 gewaschen und das Zellpellet in 1 ml Dryl's Puffer resuspendiert. Anschließend wurde diese Zellsuspension auf einen sich in der Petrischale befindendes Filterpapier verteilt.

Vorbereitung der Goldpartikel

Die Goldpartikel wurde wie im Protokoll von *Seashell Technology* beschrieben vorbereitet. DNadelTM Goldpartikel (Durchmesser 0,6 µm) wurden in *binding* Puffer (im Kit enthalten) bei einer Konzentration von 50 mg/ml gelagert. Zuerst wurden die Goldpartikeln auf eine Konzentration von 30 mg/ml mit dem *binding* Puffer eingestellt und es erfolgte die Zugabe von der Plasmid DNA in einem Verhältnis von 2-5 µg pro mg Gold. Nach einem gründlichen Durchmischen der Probe wurde im gleichen Volumen Präzipitationspuffer (im Kit enthalten) hinzugegeben und die Probe erneut gründlich durchmischt. Nach einer Inkubation bei RT für 3 min wurde die Probe für 10 sek bei 9,3 * g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl eiskaltem (100%) Ethanol resuspendiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei RT, 10 sek, 9,3 * g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 µl eiskaltem (100%) Ethanol resuspendiert. Das Gold wurde für 1-2 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend pipettierte man die mit der DNA beladenen Goldpartikel in die Mitte eines Makroträgers und trocknete diese auf CaCl₂ liegenden Filterpapieren.

Transformation

Die Transformation erfolgte mittels des PDS-1000/He Biolistic[®] Particle Delivery Systems. Eine schematische Darstellung der *Gene Gun* ist in der Abb. 13 dargestellt. Hier dient ein angelegter Helium-Druck zur Beschleunigung der Goldpartikel. Der Aufbau des Systems sah folgendermaßen aus: mit Hilfe einer sterilen Pinzette wurde zunächst eine Berstscheibe in die entsprechende Vorrichtung gelegt und im Gerät verschraubt. Dann legte man ein Stoppgitter auf eine Halterung der Makroträger-Plattform; die Makroträger wurden mit der DNA-beladenen Seite in Richtung zum Stoppgitter platziert. Man stellte die Petrischale mit den vorbereiteten Zellen in die Mitte der Ziel-Plattform und schloss die Kammertür. Die

Berstscheibe zersprang bei einem Druck von 900 psi. Nach dem Beschuss wurde die Kammer belüftet und die transformierten Zellen sofort in 100 ml Magermilch-Medium überführt und bei 30°C regeneriert.

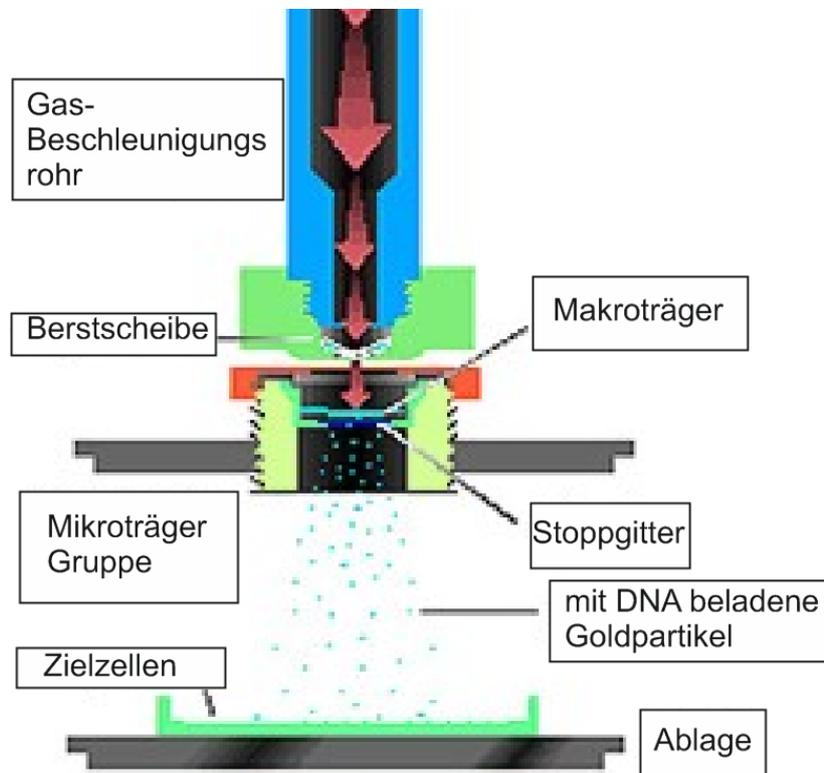


Abb. 13: Schematische Darstellung des PDS-1000/He Biolistic® Particle Delivery Systems. Bei einem Heliumdruck von 900 psi zerspringt die Berstscheibe und dadurch beschleunigt sich der Makroträger mit den sich darauf befindenden DNA-Goldpartikeln. Der Makroträger wird von dem Stoppgitter zurückgehalten, während die mit der DNA beladenen Goldpartikel zu den Zellen transportiert werden.

3.2.6.7. Selektion und Analyse der transformierten *T. thermophila* Zellen

Für die Selektion wurden die regenerierenden Kulturen zuerst für 3 min bei 2100 rpm und RT geerntet und anschließend in 50 ml Magermilchmedium unter Zugabe von 5 μ M Paclitaxel aufgenommen. Die Zellen wurden in 96 well-Platten verteilt und nach einer Inkubationsperiode von ca. 2-3 Tagen lichtmikroskopisch untersucht. Putative Transformanten wurden unter einem Selektionsdruck von 10 μ M Paclitaxel im Magermilchmedium kultiviert. Nach ca. 7 Tagen wurde der Selektionsdruck auf 15-20 μ M Paclitaxel im Magermilchmedium erhöht. Anschließend wurden die Transformanten im Neff's Medium unter Zugabe von 20 μ M Paclitaxel kultiviert.

DNA-Isolation aus *T. thermophila*

Zur Überprüfung der korrekten Integration der Plasmidkonstrukte in die genomische DNA von *T. thermophila* Kulturen mittels der Kontroll-PCR wurde die Gesamt-DNA aus *T. thermophila* Kulturen mit Hilfe des DNeasyTM Plant Tissue Kit gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert.

Kontroll-PCR

Zur Überprüfung, ob die gesamte Expressionskassette in das Genom von *T. thermophila* integriert war, wurden PCR-Reaktionen mit spezifischen *Primern* unter Einsatz der isolierten Gesamt-DNA durchgeführt. Die Zykluszahl wurde auf 29 Zyklen reduziert, die anderen Einstellungen entsprechen dem oben beschriebenen Programm.

3.2.6.8. Lokalisation des GFP-Fusionsproteins

Zum Überprüfen des GFP-Fusionsproteins wurde eine üN-Kultur der Transformanten mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml in Neff's Medium verwendet (abgewandeltes Protokoll nach Jacobs *et al.*, 2006). Durch Zugabe von $0,5 \mu\text{g CdCl}_2$ wurde der MTT1-Promoter und somit die Synthese des GFP-Fusionsproteins aktiviert. Nach ca. 16-24 h wurde die Zellkultur ins Hungermedium (10 mM Tris/HCl, pH 7,4) hinein gewaschen und in 100 ml des gleichen Hungermediums resuspendiert. Anschließend erfolgten die Fütterung der Zellen mit den magnetischen Partikeln und ihre Isolierung zu bestimmten Zeitpunkten („pulse-chase“, Vosskühler & Tiedtke, 1993). Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet im Tris/HCl aufgenommen und im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4. Ergebnisse

Wie in der Einleitung beschrieben, ist die Phagozytose ein dynamischer Prozess bestehend aus zahlreichen Fusions- und Teilungsprozessen, welcher die Zusammensetzung der phagosomalen Membran verändert. Dieser Reifungsprozess wird von vielen bekannten, sowie von zurzeit noch unbekanntem Markerproteinen begleitet, die an zahlreichen Schlüsselreaktionen beteiligt sind. Um die phagosomalen Proteine dieses Prozesses greifen zu können, wurden zu Beginn die Phagosomen markiert und isoliert. Die weiteren Schritte zielten ausschließlich auf die in den Phagosomen enthaltenen Proteine (sowie deren Gene, bzw. mRNA-Transkripte) ab, sie wurden quantifiziert und klassifiziert. Ausgewählte Proteine wurden molekularbiologisch relativ quantifiziert und final über den Einbau eines fluoreszierenden Proteins in *T. thermophila* lokalisiert.

4.1. Markierung und Isolierung von stadienspezifischen Phagosomen

Um die Phagosomen isolieren zu können, wurden sie mit Hilfe von magnetischen Partikeln markiert und durch den Einsatz eines Permanentmagneten isoliert (s. Kap. 3.2.2.2.) Mit der „pulse-chase“ Markierungsmethode lassen sich Phagosomen definierter Zeitstadien isolieren. So kann man sowohl nascente Phagosomen, die gerade entstanden sind (30 sek: „pulse“), als auch fünf Minuten später alte (gereifte = kondensierte) Phagosomen (5 min: „chase“) in großen Mengen gewinnen. Die Zeiten sind dabei so gewählt, dass genau ein einzelnes Phagosom entsteht. Die so gewonnenen, stadienspezifischen Phagosomen wurden nach einer Fütterung mit magnetischen Partikeln lichtmikroskopisch untersucht, um die Bildung der Phagosomen zu überprüfen (Abb. 14). Der Proteingehalt (BCA-Test) der isolierten Phagosomen liegt zwischen 0,2 und 0,5 mg Protein pro $3,2 \times 10^6$ Zellen.



Abb. 14: *T. thermophila* Zellen nach 30 sek „pulse“ und 5 min „chase“ mit magnetischen Partikeln.

Qualität der isolierten Phagosomen

Mit Hilfe der magnetischen Markierung nach Protokoll von Vosskühler & Tiedtke (1993, (s. Kap. 3.2.2.2.) konnten stadienspezifische Phagosomen in großen Mengen isoliert werden. Da die Reinheit und die Unversehrtheit der Phagosomen für die späteren Reaktionsschritte von größerer Bedeutung sind, wurden die Phagosomen im Lichtmikroskop untersucht. Die hier angewandte Isolierungsmethode liefert ausreichend Material intakter Phagosomen (Abb. 15), so dass die in geringem Maße noch vorhandenen Zellbestandteile für alle folgenden Schritte zu vernachlässigen sind.

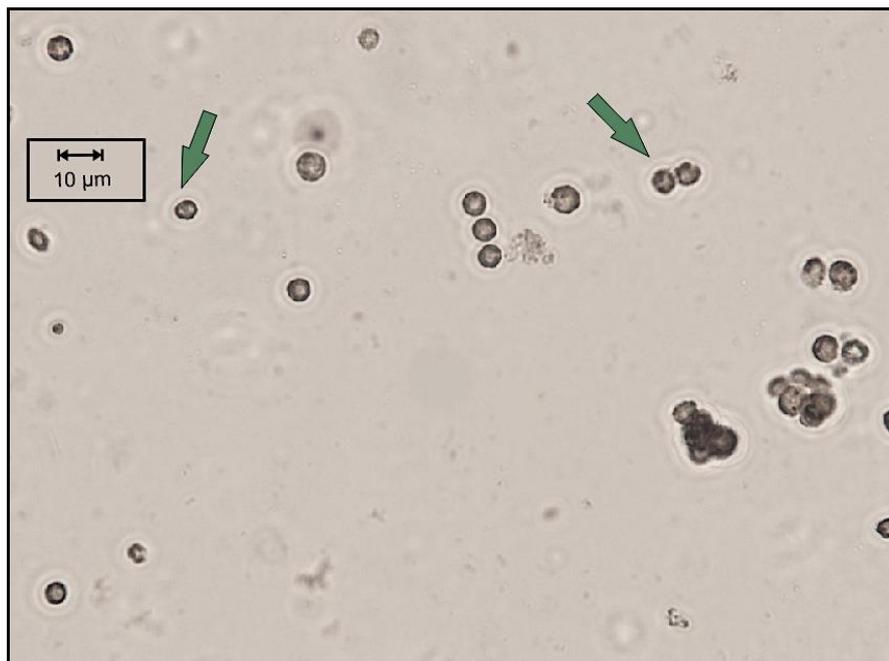


Abb. 15: Die grünen Pfeile markieren eine Auswahl der 30-sek-alten (nascente) Phagosomen (Isolierung direkt nach magnetischer Markierung).

4.2. Quantitative Bestimmung stadienspezifischer Proteine

Um zu untersuchen, ob sich die Anzahl an Proteinen zu den beiden Stadien (30 sek, 5 min) unterscheidet, wurde zunächst eine 2 D-Gelelektrophorese durchgeführt. Die theoretische Trennleistung der Proteine in der 2 D-Gelelektrophorese beträgt ca. 10.000 Proteine /Gel (Corbett *et al.*, 1994). Auf diese Weise kann man kobandierende stadienspezifische phagosomale Proteine aufspalten und ihre Zusammensetzung zu den beiden Zeitpunkten vergleichen. Die beiden folgenden Abbildungen (Abb. 16 und Abb. 17) zeigen die mit dem kolloidalen Coomassie gefärbten 2 D-Gele. Auf den Abbildungen sind viele komplexe Proteinmuster erkennbar. In der Abb. 16 handelt es sich um etwa 70 Proteine im Molekulargewichtsbereich zwischen 150 kDa und 10 kDa. Die meisten von ihnen befinden sich im sauren bis neutralen pH-Bereich des Gels (pH 4,5 – 7). Die Abb. 17 zeigt zum Zeitpunkt 5 min ca. 20 Proteinspots zwischen 170 kDa und >6 kDa, die sich in einem pI-Bereich zwischen 3 und 6,5 befinden.

Wie man in den Abb. 16 und Abb. 17 erkennen kann, befinden sich in den nascenten Phagosomen deutlich mehr Proteine, die auch wiederum über ein großes Spektrum an Molekulargewicht und pI-Wert verteilt sind. Es gibt jedoch auch Proteine, die in beiden Stadien vorkommen wie z. B. das Proteinmuster (s. Markierung in den Abb. 16 und Abb. 17) im Molekulargewichtsbereich zwischen 29 und 60 kDa und im pI-Bereich von 5,5 und 7,0.

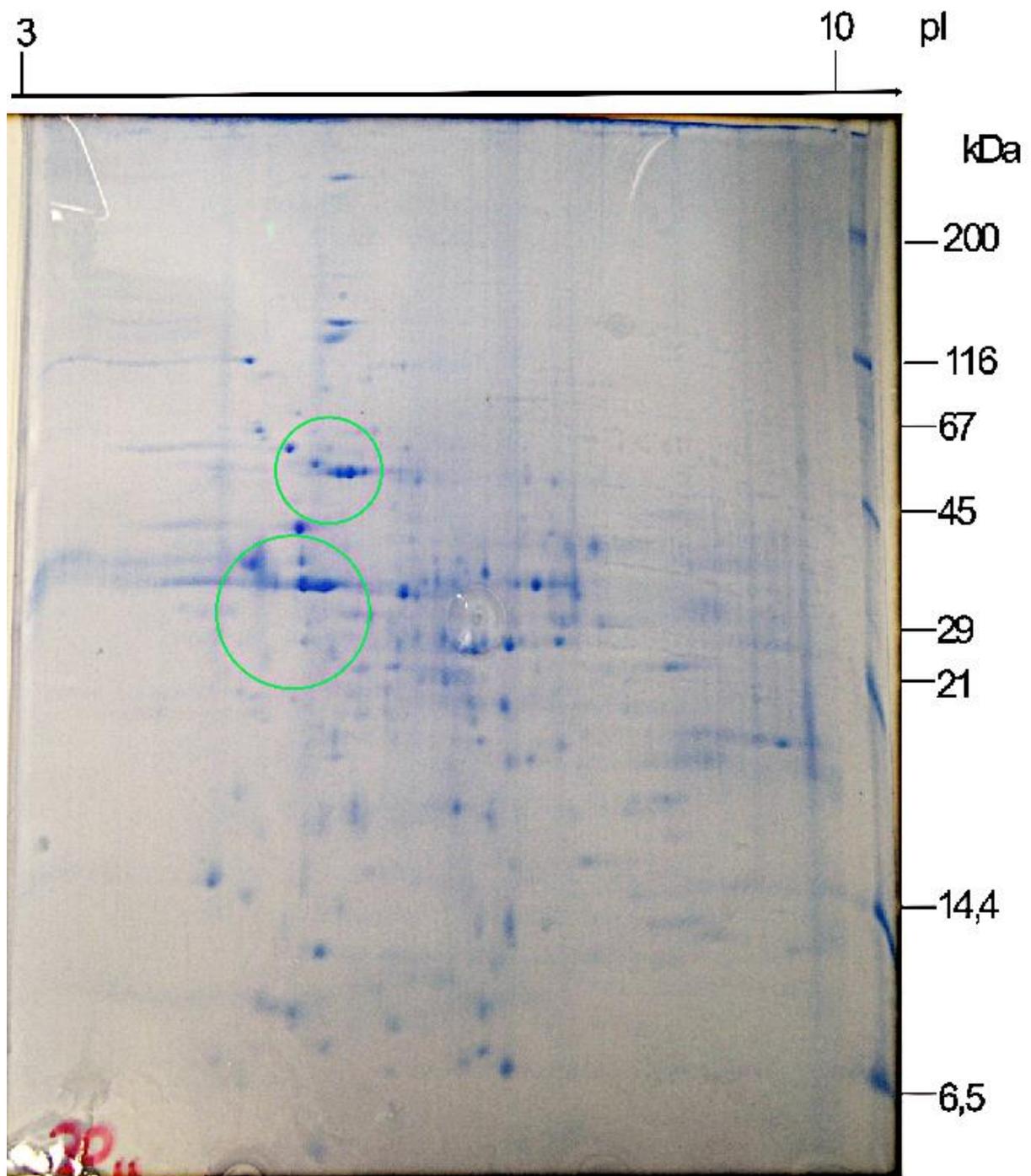


Abb. 16: Nascente phagosomale Proteine zum Zeitpunkt 30 sek. pI= isoelektrischer Punkt; kDa= kiloDalton; grüne Kreise markieren identische Proteine mit den 5 min alten Phagosomen

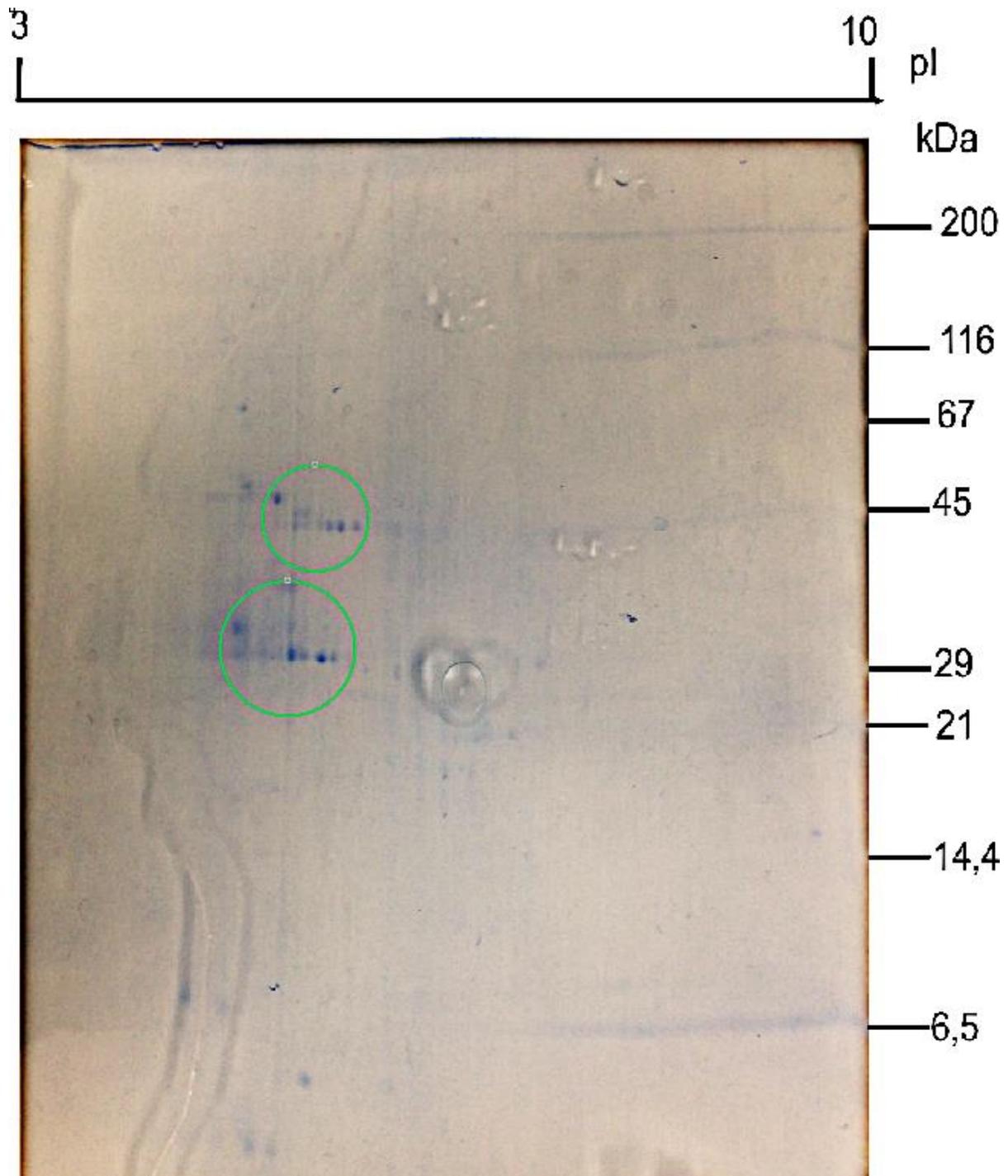


Abb. 17: Kondensierte phagosomale Proteine zum Zeitpunkt 5 min. pI= isoelektrischer Punkt; kDa= kiloDalton; grüne Kreise markieren identische Proteine mit den 30 sek alten Phagosomen

4.2. MudPIT-Analyse der stadienspezifischen phagosomalen Proteine

Durch die 2 D-Gelelektrophorese konnte bestätigt werden, dass sich die beiden Stadien hinsichtlich ihrer Proteine bereits deutlich unterscheiden, so dass weitere Untersuchungen möglich sind. Um möglichst viele Proteine aus der Probe zu erfassen und zu identifizieren, bedarf es einer sensitiveren Methode, welche in der Lage ist, auch Proteine mit extremen Eigenschaften, die für die meisten Membranproteine gelten, zu erfassen. Zu diesen zählen sowohl große, kleine, saure, basische oder auch hydrophobe Proteine (Santoni *et al.*, 2000). Zur Erweiterung des identifizierbaren Proteinrasters wurde im Weiteren eine besondere Methode der Massenspektrometrie verwendet: die Multidimensionale Protein-Identifizierungstechnologie (multidimensional protein identification technology = MudPIT). MudPIT ist eine nicht Gel-basierende mehrdimensionale nano-LC Methode direkt gekoppelt mit dem Tandem MS/MS und wird vorwiegend zur Analyse von Membranproteinen eingesetzt (Washburn, 2001; Wolters *et al.*, 2001; Wu & Yates, 2003). Es können damit Proteine aus hoch-komplexen Gemischen, wie wir sie in einem Phagosomen-Isolat offensichtlich vorliegen haben (Abb. 16 und Abb. 17), identifiziert werden. Aus der Vielzahl dieser identifizierten Proteine werden anschließend einige zur relativen Quantifizierung und zur Lokalisierung ausgewählt.

Jeweils vier Proben der beiden Zeitpunkte (30 sek, 5 min) wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dr. Wolters in Bochum mittels MudPIT analysiert. Nach einigen Modifikationen zur Probenvorbereitung, z.B. Spaltung der Proteine in Peptid-Fragmente mit Trypsin oder Chymotrypsin, konnten in einem Abgleich mit der Datenbank aus den acht Proben **312 bekannte** Proteine und **345 hypothetische** Proteine in den **nascenten** Phagosomen sowie **151 bekannte** und **101 hypothetische** Proteine in den **kondensierten** Phagosomen nachgewiesen werden (Tab. 6, ribosomale Proteine sowie DNA-regulierende Proteine wurden aus den Tabellen herausgenommen). Bei den hypothetischen Proteinen handelt es sich um **mögliche** – hypothetische – Proteine, die anhand der bekannten DNA – Sequenz (hier MAC-Sequenz) als hypothetische Proteine postuliert wurden, aber bisher nicht auf Proteinebene nachgewiesen wurden. Die detaillierten Ergebnisse der MudPIT-Analyse befinden sich im Anhang (ab S. 183). Die Übersicht zeigt, dass sich einige Proteine ausschließlich in dem jeweils isolierten Stadium befinden, die meisten aber auch in anderen Stadien nachweisbar sind, d.h. diese werden nicht stadienspezifisch exprimiert. Dieses trifft sowohl auf die nascenten als auch auf die 5 min-Stadien zu. Die Abnahme der Proteine in den

nascenten Phagosomen, die in der 2 D-Gelelektrophorese beobachtet wurde, konnte mit der MudPIT-Analyse bestätigt werden.

Tab. 6: MudPIT-Ergebnisse: Übersicht der Gesamt- und stadienspezifischen Proteine. Nur 30 sek/5 min: ausschließlich in dem entsprechenden Stadium vorkommende Proteine; 30 sek/5 min gesamt: alle in dem Stadium vorkommenden Proteine (einzelne Proteine können auch in anderen Stadien gefunden werden). Die Zahlen geben die Anzahl der hier identifizierten Proteine an.

Insgesamt: 707 (335 bekannte +372 hyp.) verschiedene Proteine in 30 sek und 5 min Stadien					
	nur 30 sek	30 sek gesamt	nur 5 min	5 min gesamt	identisch
bekannt	140	312	15	151	122
hypothetisch	230	345	7	101	53
Σ	370	657	22	252	175

Beim näheren Betrachten der Proteine wurden in beiden Stadien insgesamt 175 übereinstimmende Proteine nachgewiesen. Es handelt sich hier um 122 bekannte und 53 hypothetische Proteine. Unter den Proteinen, die ausschließlich in einem Zeitstadium nachgewiesen wurden befinden sich 370 Proteine nur zum Zeitpunkt 30 sek; davon sind 140 bekannte und 230 hypothetische Proteine. Auf die gleiche Weise wurden insgesamt 22 unterschiedliche und ausschließlich zum Zeitpunkt 5 min vorkommende Proteine nachgewiesen werden. Es sind 15 bekannte und 7 hypothetische Proteine. Aus beiden Zeitstadien konnten insgesamt 707 unterschiedliche phagosomale Proteine identifiziert werden, die sich aus 335 bekannten und 372 hypothetischen Proteinen zusammensetzen (s. Tab. 6). Diese 707 verschiedenen Proteine werden dann mit Hilfe der Datenbanken identifiziert und ihren bekannten oder vorhergesagten Funktionen zugeordnet.

4.2.1. Klassifizierung von stadienspezifischen Gesamtproteinen

Die Zuordnung von insgesamt 335 unterschiedlichen, bekannten stadienspezifischen Proteinen in die in Hinblick auf ihre Funktion bekannten biologischen Prozesse erfolgt unter Berücksichtigung ihrer Beteiligung am Phagozytoseprozess (Abb. 18).

Zunächst wurden die bekannten phagosomalen Proteine unter Zuhilfenahme der Datenbanken TGD (*tetrahymena genome database*, www.ciliate.org), MEROPS (*database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*, <http://merops.sanger.ac.uk/index.shtml>) sowie GO

(<http://www.geneontology.org/>) klassifiziert, Dabei wurden zwar bekannte Proteine, aber mit bisher unbekannt Funktionen gefunden. Es handelt sich um Proteine, die bestimmte Domänen bzw. Aminosäure-Motive in ihrer Struktur aufweisen, die ebenfalls in verschiedenen bekannten Proteinen erfasst wurden. Aufgrund dieser gemeinsamen Motive bzw. Domänen werden sie hier als **unbekannte Proteine** zusammengefasst, die diverse Funktionen in biologischen Prozessen steuern könnten und somit keine eindeutige Zuordnung zu einer funktionellen Proteingruppe erlauben. Diese unbekannt Proteine werden folglich den unbekannt biologischen Prozessen zugeordnet. Die bekannten Proteine (mit bekannten Funktionen) werden dagegen den bekannten biologischen Prozessen Stoffwechsel, Signaltransduktion, Transport, Proteinfaltung, Cytoskelett und Diverse zugeordnet. Diese Art der Einteilung in die biologischen Prozesse ist oft in der Literatur zu finden. So wurden z. B. auch die Ergebnisse der Phagosomen-Proteom Untersuchung des *Dictyostelium discoideum* den biologische Prozessen zugeordnet (Gotthardt *et al.*, 2006).

Die hypothetischen Proteine werden aufgrund ihrer Homologien zu anderen Organismen und damit bekannten Funktion ebenfalls nach dem oben genannten Proteinschema klassifiziert. Einzelne hypothetische Proteine werden gesondert dargestellt.

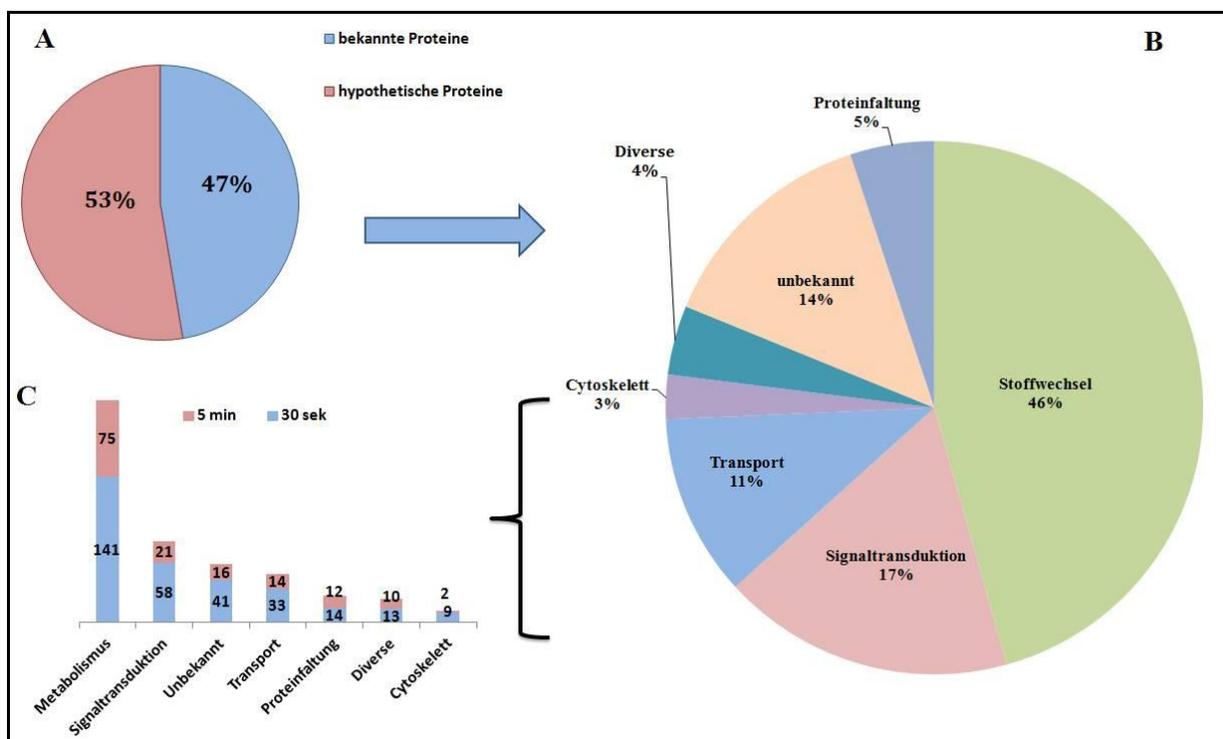


Abb. 18: Klassifizierung von den 707 hier identifizierten, stadienspezifischen Gesamtproteinen nach ihren bekannten Funktionen. A: Gesamtproteine des Phagosoms. B: Klassifizierung von 335 bekannten Proteinen in biologische Prozesse. C: 30 sek und 5 min Proteine in den einzelnen Proteingruppen.

In der Abb. 18 sind die Ergebnisse der MudPIT-Untersuchung zusammengefasst. Die größte Gruppe mit 53% der Proteine stellen die hypothetischen Proteine dar und werden gesondert im Abschnitt (4.3.1.9.) erläutert. Die bekannten Proteine betragen 47% und werden nach bekannten Funktionen in biologische Prozesse zugeordnet (Abb. 18 A). Teilt man die bekannten Proteine nach ihren Funktionen ein, wird deutlich, dass die in den Stoffwechsel involvierten Proteine die größte Proteingruppe (46%) gefolgt von den Signaltransduktionsproteinen (17%) darstellen (Abb. 18 B). Eine weitere große Proteingruppe mit 14% bildet die Gruppe der Proteine, deren Funktion bisher unbekannt ist, die aber Domänen bzw. Motive besitzen, deren Funktion in anderen Proteinen bereits bekannt ist. Eine eindeutige Zuordnung in die bekannten biologischen Prozesse ist allerdings bisher nicht möglich. Transportproteine bilden mit einem Anteil an 11% die dritte Proteingruppe. Die Gruppen mit 5% - 3% bilden die an der Proteinfaltung beteiligten Proteine, Diverse sowie Cytoskelettproteine. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Proteingruppen näher mit entsprechenden Beispielen beschrieben. Die Darstellung der beiden untersuchten Zeitstadien jeweils einzeln und bezogen auf die Funktion zeigt, dass sich die Beteiligung der identifizierten Proteine in beiden Stadien nur unwesentlich verschiebt (Abb. 18 C). Relativ gleichbleibend ist der Anteil der phagosomalen Proteine in den nascenten Phagosomen nach funktioneller Zuordnung aufgeschlüsselt meistens doppelt so hoch wie der der kondensierten Proteine.

Um die Bedeutung der mit MudPIT identifizierten Proteine besser einschätzen zu können, werden die Ergebnisse der einzelnen Proteingruppen in Tabellen dargestellt, welche zusätzlich zu den Proteinbeispielen die *Tetrahymena Gene ID* (TGD; www.ciliate.org) und die NCBI-Sequenz-Identifikationsnummer *gi* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) angeben. Die Tabellen beinhalten noch die Summe der Peptide, die zur Identifikation des Proteins führten sowie die Wahrscheinlichkeit der erwarteten Treffer bei Eingabe der vorgegebenen Peptidsequenzen – *E-Value* („*expect*“-*Value*). In den Tabellen werden auch nach Möglichkeiten die Homologien zu den bekannten Organismen sowie (sofern bekannt) die biologischen Prozesse, zelluläre Komponente und die molekulare Funktion mit *GO* (<http://www.geneontology.org/>) angezeigt. Es erfolgte eine zusätzliche Untersuchung der phagosomalen Proteine bzgl. ihrer Assoziation mit der phagosomalen Membran mit Hilfe des TMHMM-Servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), welcher auf der Grundlage der Aminosäuresequenzen die Anzahl der Transmembran-Helices vorhersagt. Sofern Transmembran-Helices erkannt werden konnten, wurde ihre Anzahl in arabischen Ziffern über

dem Proteinnamen angegeben. Die Buchstaben (A-C) bzw. J über den Proteinnamen kennzeichnen die Zeitstadien bzw. übereinstimmende Ergebnisse mit Jacobs *et al.* (2006).

4.2.1.1. Stoffwechsel (Metabolismus)

Energieumwandlung (Metabolismus) ist eine zentrale Aufgabe der Zellen. Metabolische Prozesse sind im Grunde viele biochemische Reaktionen, die miteinander vernetzt sind. Die Umwandlung der Moleküle wird wie viele andere zelluläre Prozesse auch durch Signaltransduktions-Vorgänge koordiniert. Metabolismus wird generell in zwei große Klassen unterteilt; die erste Klasse bildet der Katabolismus, bei dem die aufgenommenen Stoffe in zelluläre Energie –ATP- umgewandelt werden. Mit Hilfe der erzeugten Energie, werden in anabolischen Prozessen (zweite Klasse) aus einfachen komplexe Moleküle gebildet.

Alle an den Stoffwechselreaktionen beteiligten Proteine lassen sich in sechs bekannte Enzymklassen unterteilen, wobei die Hydrolasen/Proteasen in Bezug auf den digestiven Charakter der Phagosomen eine besondere Rolle spielen.

Wie in der Abb. 18 dargestellt, gehören die metabolischen Proteine mit 46% (**153 Proteine**) zu der größten Gruppe der phagosomalen Proteine. In der folgenden Tab. 7 werden ausgewählte Proteine aus dieser Gruppe dargestellt. Bei der Auswahl wurden die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Jacobs (markiert mit J über den Namen; Jacobs *et al.*, 2006), Stadiencharakteristische Proteine (kommen ausschließlich in einem bestimmte Stadium vor) sowie die Ergebnisse der phagosomalen Protein-Untersuchung eines parallel erstellten Forschungsprojektes (markiert mit dem Buchstaben C, Phagosomen nach 10 min, Kathrin Czora, 2014) berücksichtigt.

Tab. 7: Proteasen und weitere metabolische Proteine zu den Zeitpunkten 30 sek (A) und 5 min (B), sowie z.T. 10 min (C; Czora, 2014). J: übereinstimmend mit Jacobs *et al.*, (2006). PLA 1: lysosomale Phospholipase A 1. CTH: Cathepsine (Papain-Familie Proteasen). CIT 1: Citratsynthase. PUP 1: *20 S proteasome core beta subunit 2*. *Tetrahymena Gene ID*: Tetrahymena Genomdatenbank (TGD); *gi*: NCBI Sequenzidentifikationsnummer; *E-Value*: Expected Value. *T. borealis*, P: *P. tetraurelia*, O: *Oxytricha*, H: Human, GO: Gene Ontology. Die Ziffern neben den Buchstaben über den Proteinnamen geben die Anzahl der Transmembranhelices an.

<i>Tetrahymena</i> <i>a Gene ID</i>	Anzahl der Peptide	TGD und BLASTp Ergebnisse			Homologie
		Proteinname/Beschreibung	<i>gi</i> :	<i>E</i> <i>Value</i>	
4.m00497	10	Calpain Familie Cystein Protease ^{A,B,C}	118348342	0	T, P, O, H; GO
54.m00196	23	Eukaryotische Aspartat Protease- Familie Protein ^{A,B,C,2}	229595292	0	T, O
4.m00445	2	Cytosol-Aminopeptidase- Familie-Protein ^{A,B,C}	118348238	0	T, P, O, H; GO
103.m00129	2	PLA 1 ^{A,C,J,1}	118388480	0	T, P, O, H; GO
125.m00080	2	Papain-Familie-Cystein- Protease ^{A,C,J,1}	229594208	0	T, P, O, H; GO
88.m00155	2	CTH 34 ^{A,C,J}	229595148	0	T, P, O, H; GO
4.m00578	4	Peptidase C13 ^{A,C,1}	118348504	0	T, P, O, H; GO
94.m00144	2	ATP-abhängige Protease La ^A	118399965	0	T, P, O, H; GO
41.m00277	2	Protease sohB-related ^A	146174461	0	T, P, O; GO
90.m00186	1	PUP1 ^B	146162799	0	T, P, O, H; GO
31.m00252	2	Pectinacetylerase ^A	118376298	0	T, P, O, H
53.m00242	4	Glykosidase 31 ^A	118382115	0	T, P, O, H; GO
19.m00401	4	Glykosidase 38 ^{A,J,1}	118362205	0	T, P, O, H; GO
123.m00091	2	CTH72 ^{A,1}	118398794	0	T, P, O, H; GO
13.m00464	2	CTH90 ^{A,1}	229596403	0	T, P, O, H; GO

Es wurden hier insgesamt zehn unterschiedliche Cystein-Proteasen der Calpain- und Papain-Familien in den beiden Stadien nachgewiesen, die innerhalb von Polypeptidketten an einem Cysteinrest spalten und somit zu den Endopeptidasen gehören (s. Tab. 7 und Tab. 21, Anhang). Sechs dieser Cysteinproteasen wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe Jacobs nachgewiesen. Weitere Hydrolasen wie die Aminopeptidase, welche N-terminale Peptidbindungen spaltet und zu den Exopeptidasen gehört, sowie Glykosidasen, C 13-

Peptidase, Aspartat-Protease und Bestandteile des Proteasoms wurden überwiegend in den nascenten Phagosomen identifiziert (s. Tab. 7 und Tab. 21, Anhang).

Die **Phospholipase A 1** wird hier beispielhaft für die metabolischen Proteine dargestellt. Diese lysosomale Phospholipase ist ein extrazelluläres Enzym, welches zu proteolytischen Zwecken sezerniert wird. Es wurde sowohl zu den Zeitpunkten 30 sek und 10 min (Czora, 2014) als auch von Jacobs *et al.* (Jacobs *et al.*, 2006) nachgewiesen. Die beiden **Proteasen**: ATP-abhängige Protease La und Protease *sohB-related* sind spezifisch für 30 sek alte Phagosomen, wohingegen PUP 1 (*20 S proteasome core beta subunit 2*) nur zum Zeitpunkt 5 min nachgewiesen wurde. Die ATP-abhängige Protease La ist eine Serin-Endopeptidase, welche Chaperon-ähnliche Funktionen aufweist und unabhängig von Proteolyseprozessen agieren kann (Suzuki *et al.*, 1997). Laut der MEROPS-Datenbank ist die *sohB-related*-Protease eine Signalpeptid-Peptidase und kann die freigesetzten Signalpeptide der Lipoproteine degradieren. Lipoproteine könnten eine Rolle spielen bei Reifung von Phagosomen. Beim PUP 1 Protein handelt sich um eine 20S-Untereinheit des 26S-Proteasoms. Das Proteasom ist ein Proteinkomplex aus 20S- und 19S-Untereinheiten und ist ein Bestandteil der Proteinqualitätskontrolle in der Zelle. Eine weitere für den Zeitpunkt 30 sek charakteristische Protease ist die Pectinacetylerase, welche eine Carboxylesterase-Aktivität aufweist und Aktin binden kann und somit in die Cytoskelett-Organisationsprozesse involviert ist, die ebenfalls an der Cyclose beteiligt sind.

Ubiquitine sind ebenfalls an der Proteinqualitätskontrolle sowie Signaltransduktion beteiligt und wurden bereits als Phagosomen-assoziierte Proteine in der Makrophagen - RAW264.7 (*Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line*) - identifiziert (Lee *et al.*, 2005). Ihre Aufgabe besteht darin, die abzubauenen Proteine mit Polyubiquitin-Ketten zu markieren, damit sie vom Proteasom-System erkannt und abgebaut werden. In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt **19** unterschiedliche Ubiquitine sowie Ubiquitin-Modifikationsproteine identifiziert (s. Tab. 21, Anhang). Die folgende Tab. 8 zeigt exemplarisch sieben Ubiquitine bzw. Ubiquitin-Modifikationsproteine, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten und einige, die ausschließlich in einem Zeitstadium identifiziert wurden.

Tab. 8: Ubiquitine und Ubiquitin-Modifikationsproteine in den nascenten (A) sowie kondensierten (B) Phagosomen. J: übereinstimmend mit Jacobs *et al.*, (2006). *Tetrahymena Gene ID*: Tetrahymena Genomdatenbank (TGD); *gi*: NCBI Sequenzidentifikationsnummer; *E-Value*: Expected Value. T: *T. borealis*, P: *P. tetraurelia*, O: *Oxytricha*, H: Human, GO: Gene Ontology.

<i>Tetrahymena Gene ID</i>	Anzahl der Peptide	TGD und BLASTp Ergebnisse			Homologie
		Proteinname/Beschreibung	<i>gi</i> :	<i>E Value</i>	
12.m00352	3	UBA14, E1^A	118376746	0	T, P, O, H; GO
2.m02165	4	UBA12, E1^A	118346309	0	T, P, O, H; GO
100.m00144	5	UCV2, E2^A	586725478	1e-103	T, P, O, H; GO
13.m00531	2	Ubiquitin-Transferase E3^A	118353277	0	T, P, O, H; GO
1.m00883	4	RAD23 , UBA/TS-N Domäne ^A	146161955	0	T, P, O, H; GO
3.m01719	2	Ubiquitin-Hydrolase ^A	118362860	0	T, P, O, H; GO
35.m00294	9	Ubiquitin ^{A,J}	118370596	5e-164	T, P, O, H

Es ist bekannt, dass an der Anheftung von Ubiquitin an die Proteine drei Enzyme beteiligt sind. Alle drei von ihnen – Ubiquitin-aktivierendes Enzym E 1 (zwei UBA 1-Orthologe), Ubiquitin-konjugierendes Enzym E 2 sowie E 3-Ubiquitin-Protein-Ligase – wurden in den nascenten Phagosomen identifiziert (s. Tab. 8). Das E 1 ist ein Modifikation-aktivierendes proteinspezifisches Enzym, welches Energie in Form von ATP-Hydrolyse für die Aktivierungsprozesse nutzt. Nach einer Bindung des Ubiquitins an das E 1 Protein erfolgt die Übertragung an das E 2 Protein und im letzten Schritt mit Hilfe des E 3 Proteins an das Zielprotein. Eine Beteiligung am Phagosom ist also durchaus denkbar.

Das RAD 23 ist ebenfalls ein Ubiquitin-assoziiertes Protein. Es ist für die Limitierung der Ubiquitin-Kette und für das Anbinden des polyubiquitinierten Proteins an das 26S-Proteasom zuständig. Die in den nascenten Phagosomen identifizierte Ubiquitin-Hydrolase ist in die Ubiquitin-Recycling-Schritte in Ubiquitin-abhängigen Proteolyseprozessen involviert.

4.2.1.2. Signaltransduktion

Signalübertragung hat in jedem Organismus eine essentielle Bedeutung. Alle zellulären Prozesse wie Genexpression oder der gesamte Stoffwechsel werden von den Signaltransduktionsproteinen gesteuert. So sind auch bestimmte Signaltransduktionsproteine, die die Vesikelbildung sowie seine Abschnürung regulieren, Phagozytose-relevant. Durch Signalübertragungsreaktionen werden sowohl die Membran-Rekrutierungsprozesse, als auch die für die Phagosomenreifungsprozesse notwendigen Enzyme gesteuert. Extrazelluläre Signale werden durch spezielle Rezeptoren wie membranständige Rezeptoren, Ionenkanäle und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GTP-bindende Proteine) aufgenommen und ins Zellinnere durch sogenannte *second messenger* transportiert. Als Mittel der Signalübertragung dient dabei oft der Transfer von Phosphatgruppen auf Zielproteine. Dabei gehen die kleinen GTPasen von einer inaktiven, GDP-gebundenen Form im Cytosol, in eine aktive, GTP-gebundene Form an der Plasma- oder einer anderen Membran über. Dann wird das entsprechende G-Protein freigesetzt und bewirkt somit die Aktivierung der Adenylat-Cyclase, die wiederum die Bildung des cyclischen Botenstoffes cAMP aus ATP steuert.

Insgesamt wurden **59 verschiedene Signal-übertragende Proteine** identifiziert; 32 von ihnen traten ausschließlich zum Zeitpunkt 30 sek auf. Die MudPIT-Ergebnisse beinhalten 21 verschiedene Protein-Kinasen, die u. a. von cyclischem AMP (cAMP), welches als *second messenger* bei der zellulären Signaltransduktion fungiert, aktiviert werden (s. Tab. 29, Anhang und Tab. 10). **Protein-Kinasen** sind Phosphoryltransferasen und übertragen Phosphatgruppen auf Proteine, was zu Ladungs- und Konformationsänderungen führt. Sie können somit Proteine entweder aktivieren oder inhibieren. Das cAMP bindet an die regulatorischen Ketten der Proteinkinase und setzt dabei die katalytischen Ketten frei, die selbständig als Enzyme wirken. So aktivierte Proteinkinase kann spezifisch Serin- und Threoninreste der Zielproteine phosphorylieren und auf diese Weise ihre Aktivität verändern. Die meisten der cAMP-bindenden Proteine weisen neben den cAMP-bindenden Domänen auch ABC-Transporter- und Ionenkanal- Domänen auf. Als Resultat dieser Adenylat-Cyclase-Kaskade können die aktivierten Proteinkinasen zahlreiche Prozesse wie Enzymaktivität, Erregbarkeit der Membranen, Stoffwechselforgänge und Genexpressionsmuster beeinflussen (Kandel *et al.*, 2000). In der folgenden Tab. 9 werden beispielhaft einige Protein-Kinasen bzw. Proteine, die diese Domäne enthalten, sowie mit übereinstimmenden Proteine der AG Jacobs dargestellt.

Tab. 9: Signaltransduktionsproteine zu den Zeitpunkten 30 sek (A), 5 min (B), 10 min (C; Czora, 2014), übereinstimmend mit Jacobs *et al.* (J). RSK 3: *Fusion of MAPK ser/thr kinase and radial spoke protein. Tetrahymena Gene ID*: Tetrahymena Genomdatenbank (TGD); *gi*: NCBI Sequenzidentifikationsnummer; *E-Value*: Expected Value. *T. borealis*, *P*: *P. tetraurelia*, *O*: *Oxytricha*, *H*: Human, *GO*: Gene Ontology. Die Ziffern über den Proteinnamen geben die Anzahl der Transmembranhelices an.

<i>Tetrahymena</i> <i>Gene ID</i>	Anzahl der Peptide	BLASTp Ergebnisse			Homologie
		Proteinname/Beschreibung	gi:	E Value	
337.m00014	2	Protein Kinase ^A	229593912	0	T, P, O, H; GO
87.m00251	2	Guanylat-Kinase ^A	118378872	3e-173	T, P, O, H
131.m00144	2	ATP-Histidin-Kinase ^A	118356538	0	T, P, O; GO
191.m00071	2	Response Regulator ^{A, 1}	118397108	0	T, P, O; GO
12.m00322	2	RSK 3 ^A	118376686	0	T, P, O, H; GO
81.m00185	2	PHP 2 (p38) ^{A,B,C}	118373455	0	T, P, O, H
93.m00144	2	cAMP-bindend ^{A, 13}	118388710	0	T, P, O, H
57.m00142	5	cAMP/cGMP-bindend. Protein ^A	146182056	0	T, P, O, H

Von insgesamt 59 verschiedenen Signaltransduktionsproteinen wurden 23 unterschiedliche Proteinkinasen nachgewiesen. 15 Protein-Kinasen kommen ausschließlich zum Zeitpunkt 30 sek vor, während nur eine Guanylat-Kinase (*Tetrahymena Gene ID*: 215.m00064) in den 5 min, sowie 10 min (Czora, 2014) alten Phagosomen identifiziert wurde.

Die Guanylat-Kinase ist an der ATP-abhängigen Phosphorylierung des GMP (Guanosinmonophosphat) zum GDP (Guanosindiphosphat) beteiligt. Die Histidin-Kinasen (auch der Response-Regulator, welches eine Sequenzähnlichkeit zur Histidin-Kinase aufweist) phosphorylieren die Histidinreste der Proteine und lösen damit eine Signaltransduktionskaskade aus. Beim RSK 3 und PHP 2 handelt es sich um Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen, welche in eine direkte zelluläre Antwort, ausgelöst durch bestimmte Stimuli, involviert sind. Bei den cAMP und cAMP/cGMP bindenden Proteinen handelt es sich um Rezeptoren und Ionenkanäle.

Die nächste weit verbreitete Signaltransduktionskaskade ist die **Phosphoinositidkaskade**, die wie die Adenylat-Cyclase-Kaskade die Signale aus der Umgebung ins Zellinnere überträgt. Die Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin entstehen durch eine

Spaltung des Phospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), welches ein Bestandteil der zellulären Membran ist. Der entstandene *second messenger* IP₃ ist in der Lage, die Calciumkanäle in den Membranen von ER und sarcoplasmatischen Retikulum (SR) zu öffnen und bewirkt auf diese Weise einen Anstieg der Ca²⁺-Konzentration im Cytosol. Die steigende Ca²⁺-Konzentration in der Zelle kann u. a. die Öffnung der Chlorid-Kanäle und den Abbau von gespeicherten Stoffen verstärken. Der zweite Botenstoff Diacylglycerin aktiviert die Proteinkinase C, die Serin- und Threoninreste in Zielproteinen phosphoryliert.

Tab. 10: *Second messenger* Proteine zu den Zeitpunkten 30 sek (A), 5 min (B), 10 min (C; Czora, 2014), übereinstimmend mit Jacobs *et al.* (J). DPK 1: Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase. CaM 1: Calmodulin. CMB 1: Calmodulin-bindendes Protein. BBC 18: EF-Hand-Protein. *Tetrahymena Gene ID*: Tetrahymena Genomdatenbank (TGD); *gi*: NCBI Sequenzidentifikationsnummer; *E-Value*: Expected Value. *T. borealis*, P: *P. tetraurelia*, O: *Oxytricha*, H: Human, GO: Gene Ontology.

<i>Tetrahymena</i> <i>Gene ID</i>	Anzahl der Peptide	TGD und BLASTp Ergebnisse			Homologie
		Proteinname/Beschreibung	<i>gi</i> :	<i>E Value</i>	
6.m00433	2	Phosphatidylinositol- spezifische Phospholipase C ^{A,C}	118358834	0	T, P, O, H; GO
17.m00380	3	DPK 1 ^A	118347218	0	T, P, O, H
89.m00157	2	CAM 1 ^A	146181449	1e-103	T, P, O, H; GO
81.m00181	2	CMB 1 ^{A,B,C}	118373447	0	T; GO
104.m00139	3	IQ-Calmodulin Motiv ^A	118384084	0	T, P, O, H
46.m00259	2	EF-Hand Motiv ^A	229594649	0	T, P, O, H
43.m00325	2	BBC 118 ^A	118361816	0	T, P, O, H

Das Enzym, welches die PIP₂-Hydrolyse katalysiert, ist die Phospholipase C und wurde in den nascenten Phagosomen nachgewiesen (s. Tab. 10). Die Hydroxylgruppe des Inositolrings im PIP₂ wurde vor der Spaltung mit Phospholipase C mit Hilfe des Enzyms Phosphatidylinositol-3-Kinase (PKC 1) phosphoryliert. Dieses Enzym befindet sich laut der MudPIT-Analyse ausschließlich in den nascenten Phagosomen (s. Tab. 10).

Calcium-Ionen sind weit verbreitete Signalmoleküle und ebenfalls ein Bestandteil der Phosphoinositidkaskade. Darüber hinaus wirken die Ca²⁺-Ionen in vielen anderen Signaltransduktionswegen als *second messenger*. Durch die Bindung an das zu den EF-Hand-

Proteinen gehörende Calmodulin (CaM) oder andere Calcium-bindende Proteine wird ihre Wirkung entfaltet. Im CaM sind vier dieser EF-Hand-Motive vorhanden. Der Komplex aus Ca^{2+} und CaM aktiviert eine große Anzahl an Enzymen, Ionenpumpen und anderen Zielproteinen. Mit Hilfe der MudPIT-Analyse wurden insgesamt vier CaM und 13 EF-Hand-Proteine identifiziert, die im Anhang und beispielhaft in der Tab. 10 dargestellt sind. Das IQ-Calmodulin-Motiv-Protein, welches ebenfalls mit MudPIT nachgewiesen wurde, hat im Gegensatz zum CaM zwei statt vier Calcium-bindende Stellen und kann mit anderen Proteinen interagieren. Für die Ausbildung und Reifung eines Phagosoms sind zahlreiche Signalproteine von wichtiger Bedeutung. Es ist allerdings sehr wahrscheinlich, dass viele dieser Proteine zwar im Proteom des Phagosoms nachzuweisen, aber nicht ausschließlich an der Phagozytose beteiligt sind.

4.2.1.3. Transport

Die MudPIT-Analysen lieferten **37 verschiedene Transport-Proteine**; unter ihnen befinden sich Ionentransport sowie weitere Membrantransportproteine wie ABC-Transporter oder kleine Rab GTPasen, die den Membrantransport zwischen verschiedenen Zellkompartimenten steuern. Der Transport von gewissen Stoffen über die Phospholipid-Doppelschicht der phagosomalen Membran erfordert diverse Membrantransport-Proteine und/oder Kanalproteine. Dies geschieht entweder passiv, entlang des Konzentrationsgradienten, oder aktiv mit Hilfe von ATP-Hydrolyse (Symporter und Antiporter).

ATPasen sind Ionenpumpen, die aktiv H^+ -Ionen in die Zelle zwecks Ansäuerung hinein transportieren. Vakuoläre ATPasen (V-ATPase), die ebenfalls mit der MudPIT-Analyse in den phagosomalen Proteinen nachgewiesen wurden, stellen solche H^+ -Pumpen dar. Sie sind aus einem Komplex aus 12-14 Untereinheiten aufgebaut. Unter ATP-Hydrolyse wird eine Untereinheit dieser Komplexe - V0 - zur Rotation gebracht, was zur Translokation der Protonen in die Membran führt. Es wurden insgesamt **17 verschiedene V-ATPasen** identifiziert und beispielhaft in der folgenden Tab. 11 dargestellt.

Tab. 11: Vakuoläre ATPasen zu den Zeitpunkten 30 sek (A), 5 min (B), 10 min (C; Czora, 2014), mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine (J; Jacobs *et al.*, 2006). VMA: *vacuolar membrane ATPase*. *Tetrahymena Gene ID*: Tetrahymena Genomdatenbank (TGD); *gi*: NCBI Sequenzidentifikationsnummer; *E-Value*: Expected Value. *T. borealis*, *P*: *P. tetraurelia*, *O*: *Oxytricha*, *H*: Human, *GO*: Gene Ontology. Die Ziffern über den Proteinamen geben die Anzahl der Transmembranhelices an.

<i>Tetrahymena</i> <i>Gene ID</i>	Anzahl der Peptide	TGD und BLASTp Ergebnisse			Homologie
		Proteinname/Beschreibung	<i>gi</i> :	<i>E Value</i>	
39.m00240	2	V-Typ-ATPase 116kDa Untereinheit ^{A,6}	118352620	0	T, P, O, H; GO
95.m00161	2	V-Typ-ATPase, C Untereinheit ^{A,4}	118361371	3e-06	T, O; GO
8.m00321	3	VMA 11 ^{A,4}	118354762	1e-102	T, P, O, H; GO
7.m00481	3	VMA 5 ^A	118358079	4e-116	T
34.m00342	8	VMA 1 ^{A,B,C,J}	146170652	0	T, P, O, H; GO
67.m00170	11	VMA 2 ^{A,B,C,J}	118400751	0	T, P, O, H; GO
140.m00061	3	VMA 8 ^{A,B,C}	146185304	0	T, P, O, H; GO
3.m01792	15	VMA 10 ^{A,B,C}	146165408	7e-116	T, P, O; GO
20.m00360	2	ATPase, AAA Familie ^B	118383455	0	T, P, O, H

In der vorliegenden Arbeit wurden vier spezifische Ionenkanalproteine identifiziert, die den Ioneneinstrom durch die hydrophobe Membran entlang des Konzentrationsgradienten ermöglichen (s. Tab. 29, Anhang und Tab. 11). Diese Transporter bzw. Ionenpumpen sind transmembrane Proteine, d. h. sie sind in der Membran verankert und weisen deshalb mehrere Transmembrandomänen auf. Die Öffnung dieser Kanäle wird durch Liganden bzw. Spannung reguliert. Der aktive Transport wird u. a. mit Hilfe von den P-Typ-ATPasen ermöglicht. Darunter befinden sich Ca^{2+} -ATPase des SR und die Na^+/K^+ -ATPase mit konservierten Strukturen und konserviertem katalytischem Mechanismus. Als Zwischenprodukt der P-Typ-ATPasen-Reaktionen wird eine Phosphorylgruppe aus der ATP-Hydrolyse an die Seitenkette eines speziellen Aspartatrestes der ATPase gebunden. In der folgenden Tab. 11 sind beispielhaft einige P-Typ-ATPasen dargestellt, unter ihnen eine E1-E2 ATPase (Konformationsbezeichnung für P-Typ-ATPasen) und eine spezielle *Tetrahymena* P-Typ-ATPase – TPA 8. TPA 8 ist eine putative Calciumpumpe (*Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*, SERCA), die ebenfalls in den isolierten Phagosomen von Jacobs *et al.* vorkommt (Jacobs *et al.*, 2006).

Tab. 12: Ionenpumpen, P-Typ-ATPasen und Transport-Proteine zu den Zeitpunkten 30 sek (A), 5 min (B), 10 min (C; Czora, 2014), mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine (J; Jacobs *et al.*, 2006). TPA 8: *Tetrahymena P-type ATPase* (SERCA). *Tetrahymena Gene ID*: *Tetrahymena* Genomdatenbank (TGD); *gi*: NCBI Sequenzidentifikationsnummer; *E-Value*: Expected Value. T: *T. borealis*, P: *P. tetraurelia*, O: *Oxytricha*, H: Human, GO: Gene Ontology. Die Ziffern über den Proteinnamen geben die Anzahl der Transmembranhelices an.

<i>Tetrahymena Gene ID</i>	Anzahl der Peptide	TGD und BLASTp Ergebnisse			Homologie
		Proteinname/Beschreibung	<i>gi</i> :	<i>E Value</i>	
30.m00280	2	Kationen-Kanal-Protein ^{A,10}	118349177	0	T, P, O, H; GO
92.m00163	6	Liganden-Ionenkanal ^{A,3}	118364296	0	P; GO
162.m00071	2	E1-E2 ATPase ^{A,C,10}	118374024	0	T, P, O, H; GO
225.m00058	4	TPA 8 ^{A,C,J,8}	118396179	0	T, P, O, H; GO
38.m00298	2	Na ⁺ ,H ⁺ /K ⁺ -Antiporter ^{A,8}	586745810	0	T, O, P, H; GO
63.m00214	2	Ammonium Transporter ^{A,8}	146181155	0	T, P, O, H; GO
112.m00133	5	ABC-Transporter ^{A,C,7}	118385520	0	T, P, O, H; GO

P-Typ-ATPasen erzeugen unter ATP-Hydrolyse Na⁺ bzw. H⁺-Gradienten über der Membran, welcher als Energiequelle für die sekundären Transportern wie Na⁺, H⁺/K⁺-Antiporter (s. Tab. 12) für den Transport von Ionen in der Zelle genutzt wird.

Ein spezielles Ammonium-Transporter-Protein (*Tetrahymena Gene ID*: 63.m00214), welches unter ATP-Verbrauch NH₄⁺-Ionen in die Zelle hinein transportieren kann, wurde ausschließlich in den nascenten Phagosomen nachgewiesen (s. Tab. 12).

Das in den 30 sek alten Phagosomen nachgewiesene Membranprotein mit ATP-bindenden Kassetten (ABC-Domänen), ist eine komplexe ATP-abhängige Pumpe, die aus je zwei Membran-durchspannenden und zwei P-Schleifen-ATPase-Strukturen aufgebaut ist (s. Tab. 12). Unter ATP-Bindung und seiner Hydrolyse machen die ABC-Domäne-Proteine eine Konformationsänderung durch und bewirken entweder eine Aufnahme oder einen Austritt von bestimmten Stoffen oder sie fungieren als Schranken für offene Membrankanäle.

Dass mehr Transportproteine in den nascenten als in den kondensierten Phagosomen auftreten, lässt sich mit der Bildung der Phagosomen zu einem funktionellen Organell mit allen entsprechenden Enzymen und regulatorischen Substanzen gut nachvollziehbar darstellen.

Viele Proteine mit modulatorischen auxiliären (helfenden) Funktionen steuern die Vesikelfusion und den Membran-Transport. So gehören auch kleine monomere GTPasen der Rab-Familie (Rab 62 und Rab 6 C, s. Tab. 13) zu den regulierenden Komponenten der Vesikel- und Membran-Fusionsprozessen. Diese mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren befinden sich an der inneren Membran der Phagosomen und fungieren als An/Aus-Schalter bei den Signalen zur Regulierung der Vesikelbewegung, -fusion- und -abschnürung.

Viele dieser Rab-Proteine sind bekannte Markerproteine, die bestimmte Zeitstadien der zellulären Prozesse markieren und Funktionen der einzelnen Rab-Proteine wiedergeben.

Dazu gehören, wie in der Tab. 13 aufgelistet, die Proteine wie SNARE und VPS –Proteine. Die SNARE-Proteine gehören zu den Transmembran-Proteinen und steuern die Fusion der Vesikel mit der Ziel-Membran.

Tab. 13: Membran-Transport-Proteine zu den Zeitpunkten 30 sek (A), 5 min (B), 10 min (C; Czora, 2014). Übereinstimmende Ergebnisse mit Jacobs *et al.* (J, Jacobs *et al.*, 2006). SNARE: *N*-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor, Rab: kleine GTPase, VPS: *vacuolar protein sorting*. DRP 2: Dynamin-related protein 2. *Tetrahymena* Gene ID: Tetrahymena Genomdatenbank (TGD); *gi*: NCBI Sequenzidentifikationsnummer; *E*-Value: Expected Value. T: *T. borealis*, P: *P. tetraurelia*, O: *Oxytricha*, H: Human, GO: Gene Ontology. Die Ziffern über den Proteinnamen geben die Anzahl der Transmembranhelices an.

<i>Tetrahymena</i> Gene ID	Anzahl der Peptide	TGD und BLASTp Ergebnisse			Homologie
		Proteinname/Beschreibung	<i>gi</i> :	<i>E</i> Value	
34.m00271	2	SNARE ^{A,1}	118368702	0	T, P, O, H
247.m00044	2	Rab 62 ^A	229593818	1e-166	T, P, O, H; GO
5.m00586	2	Rab 6C ^A	118365218	2e-167	T, P, O, H; GO
8.m00549	2	VPS 13 ^{A,C,J}	118355218	0	T, P, O, H
13.m00284	3	VPS 36 ^A	146162530	0	T, P, O, H
15.m00352	2	DRP 2 ^A	118366703	0	T, P, O, H; GO

Die Fusion der Vesikel- und Zielmembran findet durch das Aneinanderbinden der *target* (*t*)-SNARE- und des vesikulären (*v*)-SNARE statt (Brunger, 2005; Fukuda *et al.*, 2000; Fasshauer *et al.*, 1998). Dabei werden die Membran-Andockungsschritte durch das Sec 1/Munc 18 (SM)-Protein reguliert (Rizo & Sudhof, 2002). In der folgenden Abb. 19 sind die einzelnen Fusionsmechanismen vereinfacht dargestellt.

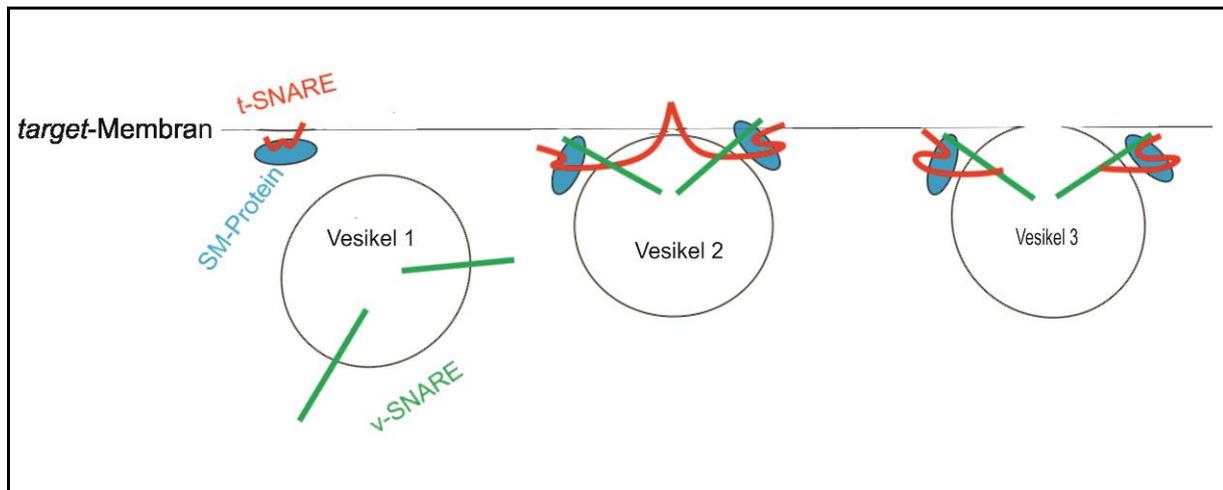


Abb. 19: SNARE-Mechanismus der Membran- und Vesikelfusion (verändert nach Rizo & Sudhof, 2002; Brunger, 2005; Fukuda *et al.*, 2000; Fasshauer *et al.*, 1998). *target*- (*t*)-SNARE ist zusammen mit dem Sec 1/Munc 18 (SM)-Protein in der Membran verankert, während das Vesikel (1) vesikuläre (*v*) SNARE-Komplexe enthält. Die SM-Komponente führt zur Interaktion des *t*-SNAREs mit dem *v*-SNARE (Vesikel 2) und führt zum Andocken der Membranen – Hemifusion. Schließlich bildet sich der SNARE-Komplex aus *t*- und *v*-SNARE und führt so zur Fusion des Vesikels (Vesikel 3) mit der Zielmembran.

VPS 13 und VPS 36 Proteine (*vacuolar protein sorting*) spielen eine Rolle in den Sortierungsprozessen sowie dem Transport der Proteine von Golgi Apparat zu den Endosomen und gehören somit zu den Phagozytose-regulierenden Proteinen. Das VPS 13 wurde bereits als phagosomales Protein von Jacobs *et al.* (2006) nachgewiesen und anschließend von Samaranyake *et al.* (2011) als ein Phagozytose-relevantes Protein postuliert.

Das ausschließlich in den nascenten Phagosomen identifizierte Dynamin (DRP 2) ist laut *Tetrahymena* Genom Datenbank eine Dynamin GTPase, die genauso wie DRP 1 an der Phagosomenbildung, genauer an der Regulierung des Aktins, beteiligt sein könnte (Elde, N. & Turkewitz, A. P. unveröffentlicht).

4.2.1.4. Unbekannte biologische Prozesse

In dieser Gruppe wurden Proteine zusammengefasst, die anhand ihrer vorhergesagten Funktion (Struktur der Domäne) vermutlich in zahlreiche biologische Prozesse wie Signaltransduktion oder Vesikeltransport involviert sind. Aufgrund ihrer zumeist multiregulatorischen Funktionen können diese Proteine eine entscheidende Rolle an verschiedenen Stellen im Phagozytoseprozess übernehmen.

Tab. 14: Unbekannte Proteine zu den Zeitpunkten 30 sek (A), 5 min (B), 10 min (C; Czora, 2014). Übereinstimmende Ergebnisse mit Jacobs *et al.* (J, Jacobs *et al.*, 2006). TPR: *tetracoptide repeat*, CPOMP: *chlamydial polymorphic outermembrane protein*. DFB 1: *deep fibre bundle protein*. FTT 18: 14-3-3-Protein T: *T. borealis*, P: *P. tetraurelia*, O: *Oxytricha*, H: Human, GO: Gene Ontology. *Tetrahymena Gene ID*: Tetrahymena Genomdatenbank (TGD); *gi*: NCBI Sequenzidentifikationsnummer; *E-Value*: Expected Value. *T. borealis*, P: *P. tetraurelia*, O: *Oxytricha*, H: Human, GO: Gene Ontology. Die Ziffern über den Proteinnamen geben die Anzahl der Transmembranhelices an.

<i>Tetrahymena Gene ID</i>	Anzahl der Peptide	TGD und BLASTp Ergebnisse			Homologie
		Proteinname	<i>gi</i> :	<i>E Value</i>	
187.m00073	3	Leucine Rich Repeat ^{A,4}	118382258	0	T, P, O
80.m00189	2	TPR-Domäne ^B	118400640	0	T, P, O, H
87.m00171	2	TPR-Domäne ^A	118378710	0	T, P, O, H
20.m00361	2	LIM-Domäne ^A	118383457	0	T, P, O, H
140.m00087	2	CPOMP Repeat ^{A,8}	118398427	0	T, P, O
51.m00203	2	Sec 61- β ^{A,B,C,1}	586729805	5e-51	T, P, O
9.m00413	2	DFB1 ^A	118366181	0	T, P, O, H
18.m00476	2	FTT 18 ^{A,B,C,J}	118374567	0	T, O
9.m00538	2	GRAM Domäne-Protein ^A	118366431	0	T, P, O, H

Unter diesen unbekannt Proteinen in der Tab. 14 findet man einige Membranproteine. Zu dieser Gruppe gehören z. B. viele Calcium-Ionen-abhängige-, TPR-(*tetracoptide repeat*)-Domäne- sowie die LRR-(*Leucine Rich Domains*)-Proteine. Zwei dieser **LRR**-Proteine wurden ausschließlich in den nascenten Phagosomen nachgewiesen. Sie besitzen mehrere transmembrane Helices, was zeigt, dass diese in der phagosomalen Membran verankert sein

müssen. Leucin-reiche-Domänen werden überwiegend in den Proteinen gefunden, die in Protein-Protein-Interaktionen involviert sind. Durch Kristallstrukturanalyse wurden α und β -Struktureinheiten in LRR festgestellt, die dazu führen, dass das Protein dabei eine ungewöhnliche, nicht-globuläre, Form annimmt und folglich Proteine binden kann (Kobe & Deisenhofer, 1994).

Sowohl in den nascenten als auch in kondensierten Phagosomen wurden insgesamt sieben verschiedene **TPR**-Domäne-Proteine identifiziert. Dreidimensionale Analyse der Struktur der TPR-Domäne zeigte zwei antiparallele α -Helices. Eine Assoziation der TPR-Domäne Proteine mit diversen Multiproteinkomplexen wird diesem TRP-Motiv zugeschrieben (Blatch & Lässle, 1999).

Das in den nascenten Phagosomen enthaltendes **LIM**-Domäne-Protein reguliert ebenfalls diverse Protein-Protein-Interaktionen in Zellwachstums- und Differenzierungs- sowie Apoptoseprozessen (Zhang *et al.*, 2014; Manetti, 2012, Lo et al, 2012).

Insgesamt wurden mit Hilfe der MudPIT-Analyse vier unterschiedliche **CPOMP**-Repeat-Proteine identifiziert, die ausschließlich in den nascenten Phagosomen vorkommen. Sie weisen eine Homologie zu den transmembranen Proteinen des *D. discoideum* und besitzen laut der Analyse des TMHMM-Servers bis zu acht Transmembran-Helices.

Das **sec61 β** -Protein, welches ebenfalls von Jacobs *et al.* (2006) und in 10 min alten Phagosomen von Kathrin Czora (2014) nachgewiesen wurde, ist eine Komponente des Sec61/SecYEG Archaea-Protein-Sekretionssystems. Der Sec61p/SecYEG spielt eine Rolle bei der Proteintranslokation in der Membran (Kinch *et al.*, 2002).

Mit Hilfe von MudPIT wurde ein in den Oralapparat involviertes Protein identifiziert; es handelt sich um das **DFB 1** (*Deep fibre bundle protein 1*)-Protein. Das DFB 1-Protein ist laut der *Tetrahymena* Datenbank TGD in den tiefen Faserbündeln des Oralapparates lokalisiert und bildet filamentöse Strukturen. Desweiteren ist das DFB 1 Protein mit den longitudinalen Mikrotubuli und Basalkörpern assoziiert.

Das 14-3-3-Protein (FTT 18) ist ein konserviertes, regulatorisches Molekül, das im Rahmen der Phagosomen- und Basalkörper-Proteom-Analyse in *T. thermophila* nachgewiesen wurde (Jacobs *et al.*, 2006; Kilburn *et al.*, 2007). Das gemeinsame Erkennungsmotiv der 14-3-3-

Proteine ist der phosphorylierte Serin- oder Theronin-Rest. Die Proteine weisen zahlreiche modifizierte Domänen mit Regionen für diverse Interaktionen wie Phosphorylierung oder Acetylierung auf (Obsil *et al.*, 2001). Das humane 14-3-3-Protein ist ein wichtiger Regulator für Proteine, die in Autophagie, metabolische Prozesse sowie in Vesikel- und Proteintransporte involviert sind und damit auch in *Tetrahymena* eine hohe Phagozytose-Relevanz besitzen können (Pozuelo-Rubio, 2011; Pozuelo-Rubio *et al.*, 2004).

Das GRAM-Domäne Protein, dessen Domäne eine Strukturähnlichkeit zu den PH-Domänen (in VPS-Komplexen) aufweist, befindet sich in den Membran-assoziierten Proteinen (Begley *et al.*, 2003; Doerks *et al.*, 2000). Diese PH-Domäne spielt eine wichtige Rolle beim Rekrutieren der Proteine zu den jeweiligen Membranen.

4.2.1.5. Proteinfaltung

Eine Gruppe der Hitze-Schock-Proteine (HSP) sowie weitere Chaperon-ähnliche Proteine – Co-Chaperone – konnten sowohl in nascenten als auch in kondensierten Phagosomen nachgewiesen werden. Chaperone sind bekanntlich in die Proteinfaltungsprozesse involviert, einige von ihnen können jedoch zusätzliche, Phagozytose-relevante Aufgaben erfüllen. So führte eine Inaktivierung des HSP 90-Proteins in murinen Makrophagen zu einer verminderten Sekretion des Tumornekrose-Faktors α (TNF- α) und somit zur Beeinträchtigung der Phagozytose (Vega & De Maio, 2005). In der folgenden Tab. 15. sind exemplarisch einige Chaperone dargestellt.

Tab. 15: Chaperone und Co-Chaperone zu den Zeitpunkten 30 sek (A), 5 min (B), 10 min (C; Czora, 2014). Übereinstimmende Ergebnisse mit Jacobs *et al.* (J, Jacobs *et al.*, 2006). SSA: HSP-Paralog; CCT: TCP-1/cpn60 Chaperonin Familie Protein; SFR 11: *Sfil repeat* Protein. *T. borealis*, *Tetrahymena Gene ID*: Tetrahymena Genomdatenbank (TGD); *gi*: NCBI Sequenzidentifikationsnummer; *E-Value*: Expected Value. *T. borealis*, P: *P. tetraurelia*, O: *Oxytricha*, H: Human, GO: Gene Ontology

<i>Tetrahymena</i> <i>Gene ID</i>	Anzahl der Peptide	TGD und BLASTp Ergebnisse			Homologie
		Proteinname	<i>gi</i> :	<i>E Value</i>	
73.m00185	2	SSA5 ^A	586731587	0	T, P, O, H
9.m00347	5	SSA3 ^A	118366049	0	T, P, O, H
20.m00331	2	CCT3 ^A	146182577	0	T, P, O, H; GO
46.m00298	2	SFR11 ^A	118402107	0	T
16.m00424	6	Konserv. Hypoth. Coiled-coil ^A	146169671	2e-107	T, P, O, H; GO
7.m00462	17	HSP 70 ^{A,B,C,J}	118358030	0	T, P, O, H
51.m00201	38	HSP 90 ^{A,B,C,J}	118380332	0	T, P, O, H
105.m00096	6	BBC 39 ^{A,B,C}	118387667	0	T, P, O

Chaperone wie HSP 60, speziell CCT-Chaperone, sind an der *de novo* Faltung von Aktin und Tubulin beteiligt (Vainberg *et al.*, 1998; Geißler *et al.*, 1998). Das konservierte *Coiled-coil* Protein (*Tetrahymena Gene ID*: 16.m00424) weist eine Homologie zur Prefoldin-Untereinheit α in *Tetrahymena borealis* auf, die ebenfalls in die *de novo* Faltung von Aktin und Tubulin involviert ist (Gu *et al.*, 2008).

4.2.1.6. Diverse Proteine

In diesem Kapitel werden exemplarisch Proteine vorgestellt, deren biologische Funktion sich nicht in das hier verwendete Schema einteilen lässt, die jedoch auch in vorausgehenden Studien als potentielle Kandidaten für phagosomale Proteine identifiziert wurden. Beispiele sind der Translation-Elongationsfaktor EF-1, welcher an der Regulation des Aktin-Cytoskeletts beteiligt ist (Rasmussen & Wiebe, 1999; Gross & Kinzy, 2005) und von Jacobs *et al.* am Phagosom nachgewiesen wurde (Jacobs *et al.*, 2006). In der folgende Tab. 16 sind einige dieser Proteine dargestellt.

Tab. 16: Beispielhafte Proteine zu den Zeitpunkten 30 sek (A), 5 min (B), 10 min (C; Czora, 2014). Übereinstimmende Ergebnisse mit Jacobs *et al.* (J, Jacobs *et al.*, 2006). *T. borealis*, P: *P. tetraurelia*, O: *Oxytricha*, H: Human, GO: Gene Ontology. *Tetrahymena Gene ID*: Tetrahymena Genomdatenbank (TGD); *gi*: NCBI Sequenzidentifikationsnummer; *E-Value*: Expected Value. *T. borealis*, P: *P. tetraurelia*, O: *Oxytricha*, H: Human, GO: Gene Ontology.

<i>Tetrahymena Gene ID</i>	Anzahl der Peptide	TGD und BLASTp Ergebnisse			Homologie
		Proteinname	<i>gi</i> :	<i>E Value</i>	
96.m00145	7	Translation Elongation Faktor EF-1 ^{A,B,C,J}	118399778	0	P, O, H
164.m00073	2	Variant-SH3-Domäne ^A	118375996	0	T, P

Das Variant-SH3 (*Src homology*) Domäne-Protein ist ein Membran-assoziiertes Protein und in der Lage, an die hydrophoben AS zu binden. Diese SH3-Domäne wurde in zahlreichen, an der Signalübertragung beteiligten, Proteinen wie PI₃ oder Ras-GTPase-aktivierenden Proteinen nachgewiesen (Musacchio *et al.*, 1992; Mayer & Baltimore, 1994).

4.2.1.7. Cytoskelett

Eine weitere Klasse der untersuchten Proteine stellen mit einem Anteil von 3% die Cytoskelettproteine dar. Das Cytoskelett ist in die Gestaltänderung und Fortbewegung der Zelle involviert und sorgt zusätzlich für den Vesikeltransport innerhalb der Zelle. Es ist aus Aktin- und Mikrotubuli-Filamenten aufgebaut. Die Bewegung entlang der Mikrofilamente wird durch Motorproteine Myosin, Kinesin und Dynein ermöglicht. Diese Proteine wandern entlang der Aktin- und Mikrotubulifilamente des Cytoskeletts und tragen so zur Bewegung und Transport von Vesikeln und Proteinen bei. Obwohl diese Motorproteine unterschiedliche Größen aufweisen, sind sie untereinander, und zu den bereits erwähnten G-Proteinen, aufgrund ihrer Core-Struktur homolog. Diese Core-Struktur ist Merkmal der Familie der P-Schleifen-NTPasen und kann durch die Bindung bzw. Hydrolyse der Nukleosidtriphosphate ihre Konformation verändern. In der folgenden Tab. 17 sind einige der Cytoskelettproteine zusammengefasst.

Tab. 17: Cytoskelettproteine zu den Zeitpunkten 30 sek (A), 5 min (B), 10 min (C; Czora, 2014). Übereinstimmende Ergebnisse mit Jacobs *et al.* (J, Jacobs *et al.*, 2006). DYH: Dynein Heavy Chain, TTLL 14 H: Tubulin-Tyrosin-like-Ligase, BTU 1: β -Tubulin; ATU 1: α -Tubulin; ACT 1: Aktin. *Tetrahymena Gene ID*: Tetrahymena Genomdatenbank (TGD); *gi*: NCBI Sequenzidentifikationsnummer; *E-Value*: Expected Value. *T. borealis*, P: *P. tetraurelia*, O: *Oxytricha*, H: Human, GO: Gene Ontology.

<i>Tetrahymena Gene ID</i>	Anzahl der Peptide	TGD und BLASTp Ergebnisse			Homologie
		Proteinname	<i>gi</i> :	<i>E Value</i>	
235.m00033	2	DYH 13 ^A	118385676	0	T, P, O, H; GO
68.m00136	2	DYH 8 ^A	118382309	0	T, P, O, H; GO
46.m00214	3	DYH 10 ^A	118401939	0	T, P, O, H; GO
2.m02053	4	Dynein ^A	118346085	0	T, P, O, H; GO
28.m00345	2	Kinesin ^A	118382924	0	T, P, O, H; GO
50.m00185	2	Kinesin ^{A,C}	118401618	0	T, P, O, H; GO
36.m00227	62	BTU 1 ^{A,B,C,J}	118379681	0	T, P, O, H; GO
73.m00202	45	ATU 1 ^{A,B,C,J}	118378497	0	T, P, O, H; GO
225.m00052	2	TTLL 14 H ^A	118396167	0	T, P, O, H; GO
15.m00457	3	ACT 1 ^{A,C}	118366913	0	T, P, O, H; GO

Es wurden insgesamt drei verschiedene Dynein-Untereinheiten (DYH 13, DYH 8 und DYH 10) sowie die schwere Kette des Dynein-Komplexes (Dynein) in den nascenten Phagosomen identifiziert. BTU 1 und ATU 1 sind die beiden Untereinheiten des Tubulin-Komplexes. Diese sowie das Aktin (ACT 1), welches zusammen mit Myosin zu F-Aktin (Aktinfilamente) polymerisiert und somit die gerichtete Bewegung des Phagosoms steuert, wurden in allen Stadien des Phagozytoseprozesses identifiziert. Ein weiteres Protein TTLL 14 H reguliert unter ATP-Hydrolyse die Übertragung der Tyrosin-Gruppe auf das modifizierte α -Tubulin.

4.2.1.8. Klassifizierung der stadienspezifischen, hypothetischen Proteine

Wie bereits erwähnt wurden insgesamt **372 stadienspezifische, hypothetische Proteine**, überwiegend zum Zeitpunkt 30 sek, in den Phagosomen von *T. thermophila* gefunden. Bei den meisten dieser hypothetischen Proteine sind die Domänen und somit ihre Funktion durch Vergleich mit anderen Proteinen bekannt. Einige wenige darunter weisen jedoch Domänen mit unbekanntem Funktionen (DUF = *domain of unknown function*) auf. Es wurden einige hypothetische Proteine anhand ihrer bekannten Domänen und Homologien den möglichen Funktionen, die diese Domänen in anderen Organismen besitzen, zugeordnet.

Die folgende Abb. 20 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der insgesamt 372 hypothetischen Proteine, wovon der größte Anteil dieser Proteine – **232 Proteine** - Homologien zu weiteren **hypothetischen** Proteinen in den Organismen wie *T. borealis*, *P. tetraurelia* und *Oxytricha* aufweisen (Abb. 20 A). **118** der Gesamtproteine konnten nach dem oben beschriebenen Schema aufgrund ihrer **Homologie** in mögliche Funktionsgruppen eingeordnet werden, wobei für **22** phagosomale Proteine keine Homologien entdeckt werden konnten und sie somit **unbekannt** bleiben (s. Abb. 20 A und B). Bei der Einordnung in die biologischen Prozesse ist zu beachten, dass hier als **Multiregulatorische** Proteine diejenigen bezeichnet wurden, die mehrere hypothetische Funktionen ausüben können. Als zusätzliche Information bei der Darstellung dieser Ergebnisse werden die Anzahl der Protein-Domänen sowie die entsprechende Homologie angegeben.

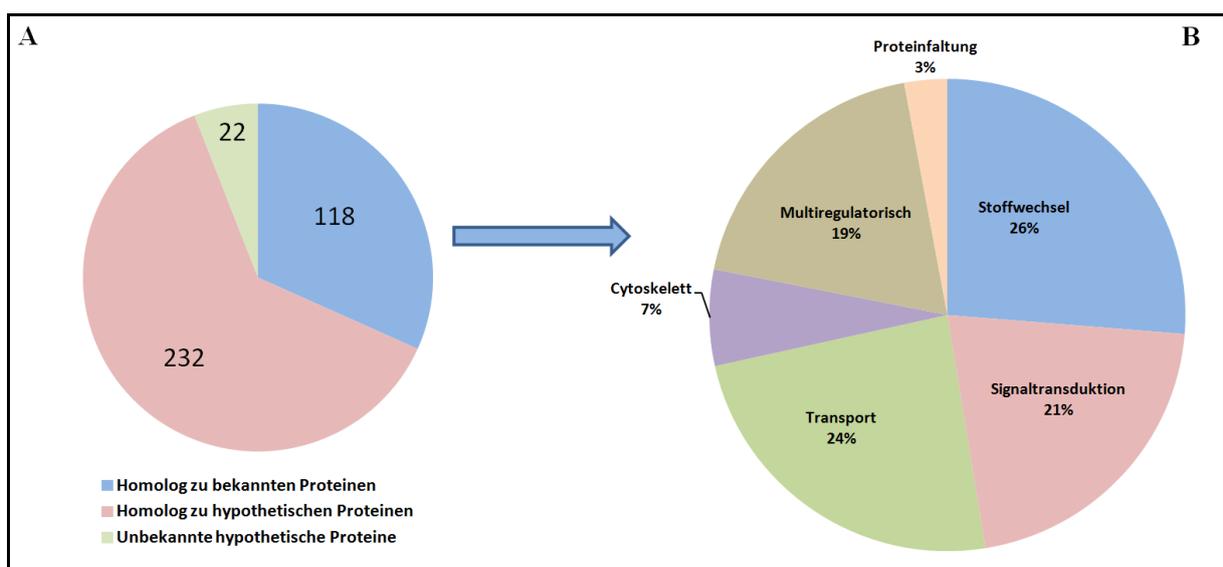


Abb. 20: Hypothetische Proteine zu den Zeitpunkten 30 sek und 5 min: A. Hypothetische Proteine mit Homologien zu bekannten Proteinen; B.

Zuerst werden hypothetische Proteine der beiden untersuchten Stadien mit Hilfe der Datenbanken *Tetrahymena* Genom Datenbank TGD (www.ciliate.org) und gegebenenfalls mit Uniprot (www.uniprot.org) und SMART (smart.embl.de) bezüglich ihrer Homologien zu den anderen Organismen untersucht. Von insgesamt **118 stadienspezifischen, hypothetischen Proteinen** (mit bekannten Homologien) waren **109** charakteristisch für den Zeitpunkt **30 sek** und **30** charakteristisch für **5 min** Stadium.

In der Abb. 20 B stellen mit 26% die Proteine, die an den Stoffwechselprozessen beteiligt sind, die größte Gruppe dar. Es handelt sich wie bei den bekannten Proteinen um metabolische Proteine. Die nächsten großen Gruppen bilden die **Transportproteine** (24%), **Signaltransduktionsproteine** (21%) und in **Multiregulatorische**, aufgrund von bestimmten Sequenzen/Motiven, biologische Prozesse involvierte Proteine (19%). Weitere Proteinklassen mit 7% bzw. 3% bilden die Gruppen Cytoskelett und Proteinfaltung.

Die Tab. 18 stellt beispielhaft einige Phagozytose-relevante, hypothetische Proteine in den zugeordneten funktionellen Gruppen dar. Im Anhang befinden sich alle Ergebnisse dieser Untersuchung.

Tab. 18: Hypothetische Proteine zu den Zeitpunkten 30 sek (A), 5 min (B), 10 min (C; Czora, 2014). Übereinstimmende Ergebnisse mit Jacobs *et al.* (J, Jacobs *et al.*, 2006). MDR: *Multidrug-Resistenz*. *Tetrahymena Gene ID*: Tetrahymena Genomdatenbank (TGD); *gi*: NCBI Sequenzidentifikationsnummer; *E-Value*: Expected Value. Die Ziffern über den Proteinnamen geben die Anzahl der Transmembranhelices an.

<i>Tetrahymena Gene ID</i>	Anzahl der Peptide	TGD und BLASTp Ergebnisse			Anzahl der Domäne/n
		Homologie	<i>gi</i> :	<i>E Value</i>	
8.m00474	2	Human: Melanom-assoziertes Antigen E 1 ^{A,1}	118355068	0	0
1.m00691	4	Human: CITRON ^A	118349670	0	25
67.m00243	2	Oxytricha: MDR efflux transporter ^{A,2}	146185942	5e-159	0
133.m00110	4	Human: Splice Isoform 1 of DLG 5 ^A	146183436	0	12
149.m00072	5	Human: Myosin 18A Isoform b ^A	118372100	0	0
54.m00225	2	Human: <i>vacuolar protein sorting 13C protein isoform 2</i> ^A	118371229	0	0

Das erste Protein in der Tab. 18 ist homolog zum humanen Melanom-assozierten Antigen E 1, welches laut Uniprot-Information (www.uniprot.org) die Ubiquitin-Ligase-Aktivität des RING-Typ-Zinkfingers des E 3 (Ubiquitin-Ligase) Proteins erhöhen kann. Das Protein könnte für die Stabilisierung des E 2 und E 3 Komplexes zuständig sein. Dieses Protein wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe Jacobs als Sialidase bezeichnet und als ein starker Kandidat für phagosomale Proteine mit unbekannter Funktion nachgewiesen (Jacobs *et al.*, 2006).

Das nächste Protein mit der *T. thermophila Gene ID* 1.m00691 ist homolog zur humanen Citron-Rho-interacting-Kinase und gehört zu den **Signaltransduktionsproteinen** (Kamijo *et al.*, 2006). Diese Kinase ist für die Autophosphorylierung und Phosphorylierung von exogenen Substraten an Serin/Threonin und Tyrosin-Resten zuständig (Olsen *et al.*, 2010). Das Protein weist mehrere Domänen auf, die unterschiedliche Funktionen ausführen können. So hat es u. a. eine Domäne (*outer membrane efflux proteins*), die für die Ausbildung des trimeren Kanals in der Membran zuständig ist und somit den Export von diversen Substraten ermöglicht. Außerdem befinden sich noch weitere interessante Domänen wie der Polycystin Kationen-Kanal oder schwere Kette des Dyneins (*dynein-heavy-chain*), die neben der Kinase-Funktion noch weitere mögliche Funktionen als Motor- und Transport-Proteine ausführen könnten.

Das mögliche **Transportprotein**: MDR- *efflux transporter* ist ein Glykoprotein, welches bestimmte, für die Zelle toxische, Stoffe aus der Zelle heraus transportieren kann, bevor sie ihre toxische Wirkung erzielen (Lin *et al.*, 2005). Das zum humanen VPS 13 C homologe hypothetische Protein *Tetrahymena Gene ID: 54.m00225*, welches ausschließlich in den nascenten Phagosomen nachgewiesen wurde, gehört ebenfalls zur Klasse der Transportproteine.

Das Hypothetische Protein *Tetrahymena Gene ID:133.m00110* ist homolog zum humanen DLG5 Protein. Es weist mehrere potentiell regulatorische Domänen auf, wie die Myosin-Ende-Domäne, welche eine kontraktile Funktion ausübt und die *Vps5 C terminal like*-Domäne, welche in vielen Gruppen von Proteinen vorkommt, die eine Membranbindung durch Lipid-Bindung oder Protein-Protein-Interaktionen mit dem Proteinkomplex ermöglichen (Nakamura *et al.*, 1998). Aufgrund seiner multiregulatorischen Funktionen wurde das hypothetische Protein zur Gruppe der **Multiregulatorischen** Proteine gezählt.

In den nascenten Phagosomen findet man ebenfalls das Protein *Tetrahymena Gene ID: 149.m00072*, welches eine Homologie zur humanen Myosin-18A-Isoform-b aufweist. Diese Myosin-Isoform, auch als unkonventionelles Myosin bezeichnet, gehört zu **Motorproteinen** und ist in viele biologische Prozesse, wie den Transport der Golgi-Membran zum Cytoskelett oder in die Zell-Migration involviert.

Sowohl in den nascenten als auch in kondensierten Phagosomen wurden viele hypothetische Proteine identifiziert, die aufgrund ihrer interessanten Domänen eine wichtige Rolle beim Phagozytoseprozess spielen können, die jedoch aufgrund fehlenden Homologien zu den bekannten Proteinen nicht in diese Kategorien eingeteilt werden können. Diese sind beispielhaft in der folgenden Tab. 19 sowie im Tab. 36, Anhang dargestellt. Die Auswahl der hypothetischen Beispiele begrenzte sich auf die Ergebnisse von Jacobs *et al.* (2006), die massenspektrometrisch als phagosomale Proteine bestimmt wurden. Die Bezeichnung **Tpp** steht für *Tetrahymena phagosomal protein*.

Tab. 19: Hypothetische Proteine mit interessanten Domänen zu den Zeitpunkten 30 sek (A), 5 min (B), 10 min (C; Czora, 2014). Übereinstimmende Ergebnisse mit Jacobs *et al.* (J, Jacobs *et al.*, 2006). *Tetrahymena Gene ID*: Tetrahymena Genomdatenbank (TGD); *gi*: NCBI Sequenzidentifikationsnummer; *E-Value*: Expected Value. Die Ziffern über den Proteinamen geben die Anzahl der Transmembranhelices an.

<i>Tetrahymena Gene ID</i>	Anzahl der Peptide	Name	TGD und BLASTp Ergebnisse		
			Domänen	<i>gi</i> :	<i>E Value</i>
45.m00225	5	PHP 1 ^{A,C,J,1}	<i>PEF-C-terminal archaeal-protein sorting domain</i> ^{A,C,J}	229596729	4e-122
130.m00077	4	Cpp2p ^{A,J,1}	Flagellar-Protein <i>FliS</i> und Cytochrom C-Oxidase IIA-Untereinheit	229593884	2e-179
129.m00110	8	Cpp5p ^{A,C,J}	0	229594893	0
50.m00189	2	Cpp3p ^{B,C,J}	Di-trans,poly-cis-Decaprenylcistransferase	118401626	0

Das PHP 1 (Jacobs *et al.*, 2006) entspricht dem **p 28**-Protein (Maicher & Tiedtke, 1999). Die in dem PHP 1-Protein enthaltene PEF-C-terminale (Archaea-Protein)-Domäne ist in den Proteinen enthalten, die als integrale Komponente in der Membran lokalisiert sind. Die weiteren Cpp-Proteine wurden von der Arbeitsgruppe Jacobs als starke Kandidaten für phagosomale Proteine ohne bekannte Funktion nach einer Phagosomen-Isolation massenspektrometrisch bestimmt (Jacobs *et al.*, 2006). Ihre Lokalisation wurde als GFP-Fusionsprotein an der phagosomalen Membran nachgewiesen (Jacobs *et al.*, 2006). Diese Cpp-Proteine wurden in unserer Arbeitsgruppe von Kathrin Czora relativ quantifiziert (Czora, 2014).

Das Cpp2p ist homolog zum hypothetischen Protein von *T. borealis* und ist laut NCBI ein putatives Transmembranprotein. Das Cpp3p könnte aufgrund der Di-trans,poly-cis-Decaprenylcistransferase-Domäne in die metabolischen Prozesse im Phagosom involviert sein.

Mit den hier vorliegenden Daten wurde eine ausführliche Untersuchung des *T. thermophila* Proteoms bei nascenten und 5 min Phagosomen durchgeführt, auf deren Grundlage nun weitere Analysen möglich sind.

Für die weiteren Analysen wurden **vier** Proteine ausgewählt, um sie mit der Methode der qPCR zunächst zu quantifizieren. Dann sollte über ein GFP-*tagging* die Stadienspezifität im Phagozytoseprozess und die Lokalisation in den Zellen näher untersucht werden.

Die Auswahl für die relative Quantifizierung beinhaltet die zwei in den Transportprozess involvierten Proteine **VPS 13** und **SNARE**. Das VPS 13 kommt laut MudPIT-Analyse in den beiden untersuchten Zeitstadien vor und wurde bereits als GFP-Fusionskonstrukt als ein wichtiger Bestandteil im Phagozytoseprozess von Samaranayake *et al.* (2011) nachgewiesen. Das SNARE-Protein, welches Fusionsprozesse zwischen Membranen und Vesikeln steuert, wurde ausschließlich in den nascenten Phagosomen identifiziert. Als dritter Kandidat wurde das hypothetische Protein mit der *Tetrahymena Gene ID: 45.m00225* (von Jacobs *et al.* als PHP 1 bezeichnet) ausgewählt, welches zum Zeitpunkt 30 sek nachgewiesen wurde. Das **PHP 2**, welches zu allen untersuchten Zeitpunkten identifiziert und auch als p38 (Nakashima *et al.*, 1999; Maicher & Tiedtke, 1999) beschrieben wurde, befindet sich nur in den neu gebildeten Phagosomen und wurde ebenfalls für die relative Quantifizierung ausgewählt.

4.3. Relative Quantifizierung ausgewählter stadienspezifischer Proteine des Phagosoms von *T. thermophila*

Mittels der sensitiven Methode der quantitativen PCR werden die bereits ausgewählten Proteine weiter untersucht, indem ihre Expressionsmuster über den gesamten Verlauf der Cyclose (0-120 min) jetzt auf dem mRNA-Level betrachtet werden. Nach einer Initiierung der Phagozytose soll die entsprechende mRNA der Gene in Abhängigkeit vom Verlauf des Phagozytoseprozesses analysiert werden. Durch die Überprüfung der mRNA-Expression könnte auch festgestellt werden, ob die Zielgene ausschließlich für die Phagozytose exprimiert werden oder ob auch Phagozytose-unabhängige Funktionen der Proteine im Organismus eine Rolle spielen könnten. Die resultierenden Expressionsprofile der phagosomalen Proteine werden auf ein Haushaltsgen, welches konstitutiv exprimiert wird, normiert. Dazu wurde das nicht in die Phagozytoseprozesse involvierte Haushaltsgen **SSU rRNA** eingesetzt.

Um die Genprodukte tatsächlich quantifizieren zu können, müssen zunächst die entsprechenden Bedingungen für die neu zu entwickelnden Primer sowie ihre Effizienzen ermittelt werden. Nach der Konstruktion zielführender Primer wurden mit Hilfe von Standardkurven die Primer-Effizienzen für die jeweiligen Primer-Paare ermittelt. Dazu

wurden die entsprechenden Primerpaare in unterschiedlichen molaren Verhältnissen zueinander in den qPCR-Läufen untersucht. Als optimales Verhältnis eigneten sich für alle verwendeten Primerpaare folgende Primer-Konzentrationen: 500 nM Primer F (forward) und 250 nM Primer R (reverse). Aus der Steigung der Geraden wurden die entsprechenden Primereffizienzen für die Gene bzw. die RNA berechnet. Diese sowie die ct-Werte, welche in den Standardkurven als Funktion des dekadischen Logarithmus für die cDNA-Menge angegeben werden, sind in der folgenden Tab. 20 dargestellt. Ein Vergleich der ct-Werte zeigt, dass die notwendige Voraussetzung für einen quantitativen Vergleich, nämlich die gleiche Menge eingesetzter cDNA, in allen qPCR-Läufen gegeben war.

Tab. 20: Bestimmung der Primereffizienzen.

Gen	ct-Wert	Effizienz
SSU rRNA	21	1,91
VPS13	22	2,02
PHP1	21-22	1,93
PHP2	22	1,97
SNARE	21-22	1,93

Die ermittelten Effizienzen der Proben liegen nah an der Effizienz des Standards SSU rRNA und sind somit ebenfalls geeignet, miteinander verglichen zu werden. Die Normierung erfolgte zum Zeitpunkt 0 auf den Wert 1. Zu diesem Zeitpunkt wurde keine Phagozytose initiiert. Im weiteren Verlauf werden die hier ermittelten Expressionprofile der untersuchten Gene bezogen auf das Referenzgen SSU rRNA gezeigt (s. Abb. 21).

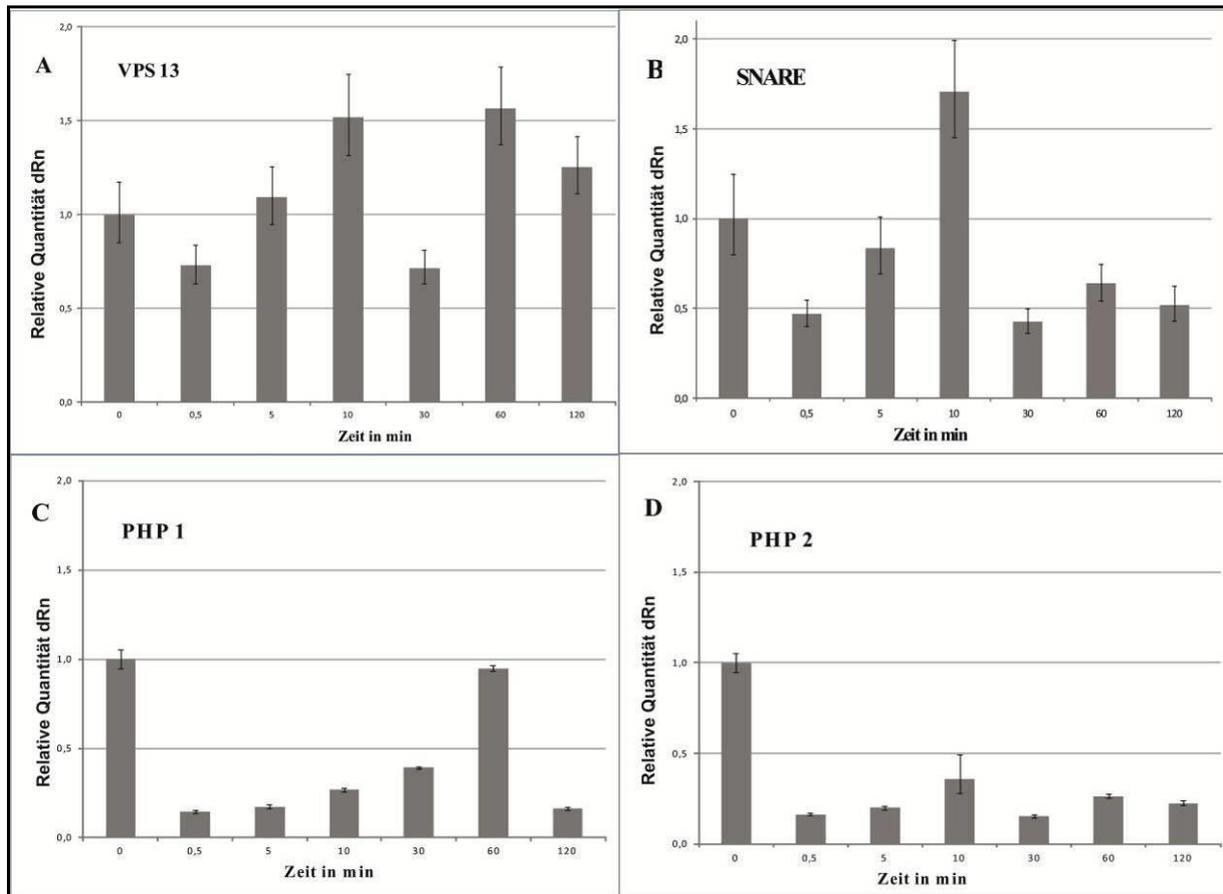


Abb. 21: Expressionsprofil der Gene VPS 13 (A), SNARE (B), PHP 1 (C) und PHP 2 (D) normiert gegen das Haushaltsgen SSU rRNA zu den Zeitpunkten 0 min, 30 sek, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min und 120 min. Die Nullprobe (0 min) bezieht sich auf den mRNA-Level der Zelle vor Phagozytose-Induktion und dient als Referenz für die anderen Proben. Die Y-Achse zeigt die Relative Quantität (dRn: delta Rn; Rn: normalisiertes Reportersignal). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der vier Proben und die Standardabweichungen.

Abb. 21 A zeigt das Expressionsprofil des Gens VPS 13 zu sieben untersuchten Zeitpunkten normiert auf die Referenz SSU rRNA. Der Zeitpunkt 0 stellt den Zustand **vor** der Induktion der Phagozytose dar. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von magnetischen Partikeln. Man erkennt zum Zeitpunkt 5 min den ersten Anstieg der Genexpression (1,2 fach), gefolgt von 10 min (1,51 fach) vergleichbar zum Zeitpunkt 0 sowie zwei weitere Expressionsmaxima von 1,53 und 1,38 in den 60 und 120 min Proben. Zum Zeitpunkt 30 sek hat das Gen VPS 13 sein Expressionsminimum und beträgt nur das 0,7 fache des Ausgangswertes. Die relative Quantifizierung von VPS 13 zeigt, dass die mRNA nach einer initiierten Phagozytose nur zu den Zeitpunkten 10 min, 60 min und 120 min vermehrt exprimiert wird.

Im Vergleich zum VPS13 zeigt das Expressionsprofil der SNARE-mRNA (Abb. 21 B) auch ein Maximum der Expression zum Zeitpunkt 10 min, wobei das Verhältnis zum Zeitpunkt 0 min das 1,7 fache beträgt. Zum Zeitpunkt 30 sek beträgt das Verhältnis im Vergleich zum Zeitpunkt 0 min nur das 0,4 fache. Das Expressionsmuster bleibt nach 10 min nahezu konstant auf einem Level von 0,5-0,65 fach im Vergleich zum Zeitpunkt 0.

Abb. 21 C und D stellen die Expressionsprofile der Gene PHP 1(C) und PHP 2 (D) dar. Diese Gene zeigen bis zum Zeitpunkt 30 min einen stetigen Anstieg der Genexpression (0,2 – 0,4 fach), jeweils ein Maximum zum Zeitpunkt 60 min (beide 0,9 fach) und zum Zeitpunkt 120 min wieder den **30 sek-Ausgangswert** zu Beginn der Induktion (0,2 – 0,4 fach). Während der gesamten Cyclose konnte mit der relativen Quantifizierung keine erhöhte (Phagozytose-abhängige) mRNA-Expression von PHP 1 und PHP 2 nachgewiesen werden.

Nach Induktion der Phagozytose zeigen zwei (VPS 13 und SNARE) der vier untersuchten Gene eine vermutlich rein Phagozytose-abhängige Expression zu den Zeitpunkten 5 min, 10 min, 60 min und 120 min. Die beiden anderen mRNAs (PHP 1 und PHP 2) sind laut dieser Untersuchung offensichtlich nicht ausschließlich an der Phagozytose beteiligt, da nach Induktion der Phagozytose kein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression beobachtet werden konnte.

4.4. GFP-Fusionsproteine

Um die Assoziation der mit der MudPIT-Analyse ermittelten phagosomalen Proteine am Phagosom nachweisen zu können, wurde die Lokalisation dieser GFP-Fusionsproteine in der Zelle überprüft. Mit dieser Methode lassen sich über den Einbau eines fluoreszierenden Gens in das Zielgen und dessen anschließende Cotranslation die bei der qPCR- und MudPIT-Analysen gewonnenen Ergebnisse zeitlich und räumlich überprüfen.

4.4.1. Erstellung und Überprüfung der GFP-Fusionskonstrukte

Als Kandidaten für diese Untersuchungen wurden vier phagosomale Proteine ausgewählt. Das laut der MudPIT-Analyse sich ausschließlich in den nascenten Phagosomen befindende Protein **SNARE**, welches in der relativen Quantifizierung mittels qPCR ebenfalls als ein Phagozytose-relevantes Protein nachgewiesen wurde, wird als erfolgversprechendes GFP-Fusionsprotein ausgesucht. Als weiterer Kandidat wurde das **14-3-3-Protein** (FTT 18) ausgewählt, welches in diverse zelluläre Prozesse involviert ist und der Gruppe **unbekannte biologische Prozesse** zugeordnet wurde. Das Protein wurde bereits von Jacobs *et al.* als phagosomales Protein identifiziert (Jacobs *et al.*, 2006) und wurde in der vorliegenden Arbeit laut MudPIT-Analyse sowohl in nascenten als auch in kondensierten Phagosomen nachgewiesen. Die beiden Proteine **PHP 1** und **PHP 2**, deren phagosomale Assoziation in der Literatur angedeutet wird, wurden ausgewählt, weil die Analysen einen Widerspruch zwischen den MudPIT-Daten, nach denen es in allen Stadien nachzuweisen war, und den qPCR-Untersuchungen zur Quantifizierung ergeben haben. Alle vier ausgewählten Proteine sollen nun mit der GFP-tagging-Methode bzgl. ihrer zeitlichen und räumlichen Lokalisation im Phagozytoseprozess überprüft werden.

Als Ausgangvektor diente **pMTT 1-GFP** (Wloga, 2010), welcher **5'- und 3'- untranslatierte Regionen von β -Tubulin 1 (BTU 1) – Integrationsflanken** - zur homologen Rekombination enthält (s. Abb. 22 A). Bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht fluoreszieren die exprimierten GFP-Fusionsproteine grün. Durch die Fluoreszenz kann die räumliche und zeitliche Lokalisation des Proteins in der Zelle beobachtet werden. Die Expression der GFP-Fusionsproteine unterliegt der Regulation des MTT 1-Promoters, welcher sich N-terminal zur GFP-Sequenz befindet und durch Zugabe von CdCl_2 induziert wird (Shang *et al.*, 2002a).

Das Insert (1.400 bp) im Ausgangsvektor wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen MluI/BamHI entfernt, damit die Sequenz des Zielgens in den Vektor (6.500 bp) inseriert werden kann (s. Abb. 22 B).

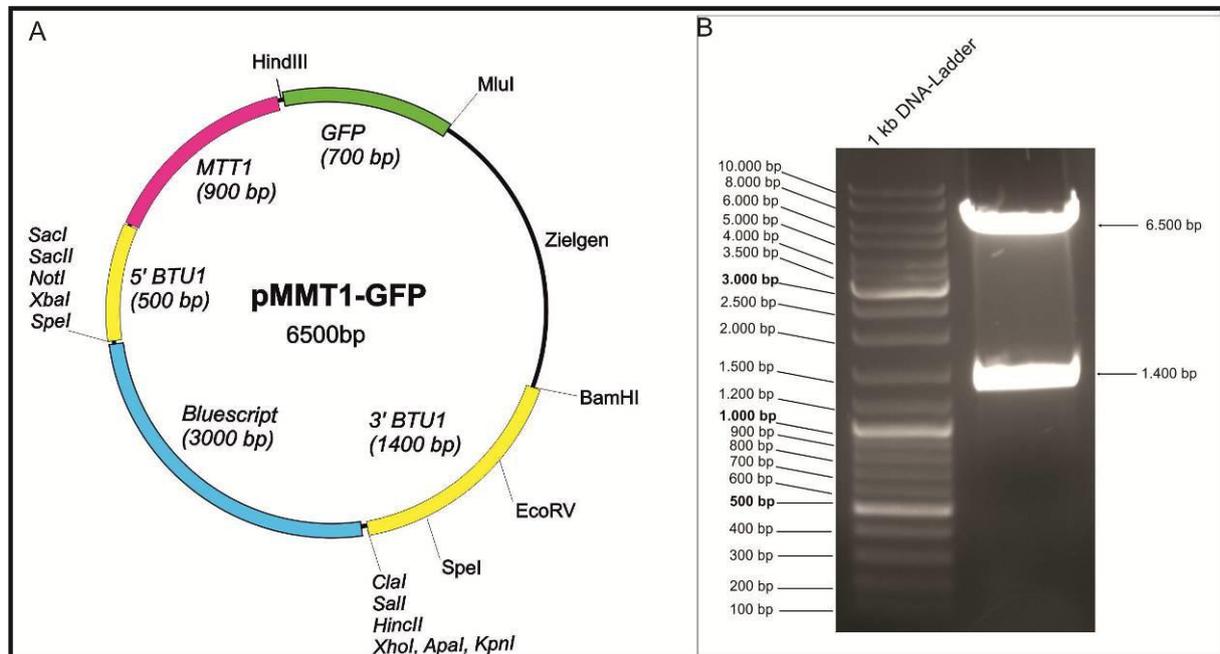


Abb. 22: Ausgangsvektor pMTT 1-GFP: A..Restriktion des Ausgangsvektors pMTT 1-GFP mit den Restriktionsendonukleasen MluI und BamHI: - 6500 bp: Vektor; 1400 bp: Ausgangs-Insert: B.

Die Sequenzen der vier Zielgene, die Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen MluI und BamHI enthielten, wurden mit spezifischen Primerpaaren in PCR-Reaktionen amplifiziert und jeweils in den restringierten Ausgangsvektor pMTT 1-GFP ligiert. So wurden die vier verschiedenen GFP-Fusionsprodukte pMTT 1-GFP-PHP 1, pMTT 1-GFP-PHP 2, pMTT 1-GFP-SNARE und pMTT 1-GFP-14-3-3 konstruiert. Als Kontrolle diente der parentale *T. thermophila* Stamm CU 522, welcher eine schwache Autofluoreszenz aufweist. In der folgenden Abb. 23 ist die Plasmidkonstruktion exemplarisch für das Konstrukt pMTT 1-GFP-PHP 2 dargestellt.

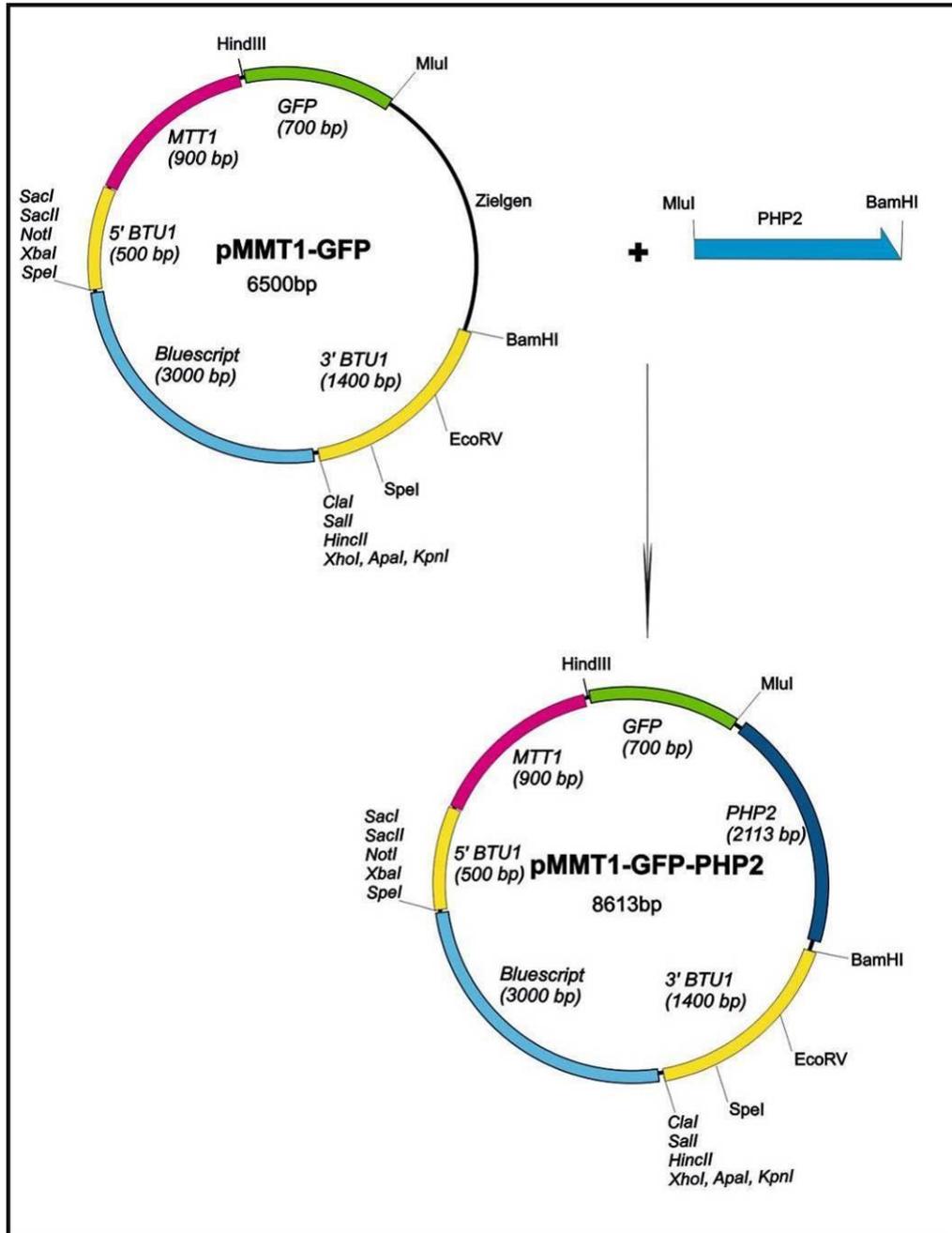


Abb. 23: Schematische Darstellung der Konstruktion des finalen Vektors pMTT 1-GFP-PHP 2.

Die PHP 2-Sequenz, die Erkennungssequenzen für die Endonukleasen MluI und BamHI enthält, wurde in den mit den Endonukleasen MluI/BamHI restringierten Vektor pMTT 1-GFP ligiert und es entstand pMTT 1-GFP-PHP 2. Die Konstruktion für die weiteren GFP-Vektoren erfolgte nach diesem Schema.

4.4.2. Transformation von GFP-Fusionsprodukten in *E.coli*

Die konstruierten Plasmide wurden in die kompetenten *E. coli* DH5 α -Zellen (New England Biolabs) chemisch transformiert und über einen Ampicillin-haltigen Agar selektiert. Um zu überprüfen, ob die hergestellten Plasmide korrekt konstruiert waren und die erwartete Größe aufwiesen, wurden sie nach einem spezifischen Restriktionsverdau gelelektrophoretisch untersucht (Abb. 24 A: Vektoren pMTT 1-GFP-PHP 1, pMTT 1-GFP-PHP 2, pMTT 1-GFP-SNARE, pMTT 1-GFP-14-3-3). In Abb. 24 B ist exemplarisch die Zielgenkassette des Vektors pMTT 1-GFP-PHP 1 dargestellt.

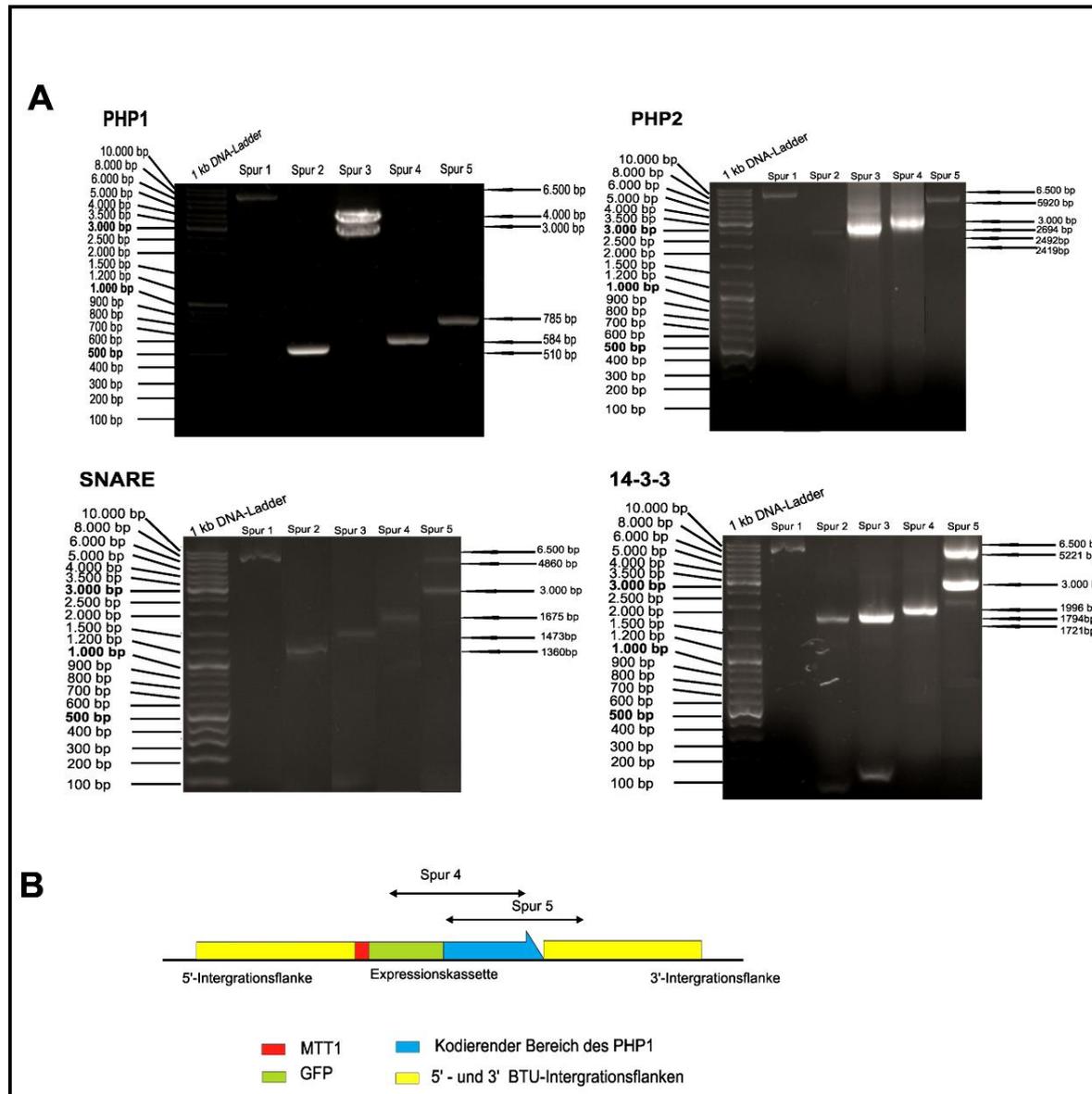


Abb. 24: Die Abbildung zeigt die Konstruktion und den Nachweis der Vektoren für GFP-Fusionskonstrukte.

- A. Spur 1:** Ausgangsvektor restringiert mit den Restriktionsendonukleasen MluI/BamHI und dephosphoryliert mit alkalischer Phosphatase – Größe 6.500 bp.
- Spur 2:** PCR Produkt von PHP 1 – Größe 510 bp (Primerpaare: PHP 1-MluI-F und PHP 1-BamHI-R). PCR-Produkt PHP 2 – Größe 2420 bp (Primerpaare: PHP 2-MluI-F und PHP 2-BamHI-R). PCR-Produkt SNARE – Größe 1360 bp (Primerpaare: SNARE-MluI-F und SNARE-BamHI-R). PCR-Produkt 14-3-3 – Größe 1721 bp (Primerpaare: 14-3-3-MluI-F und 14-3-3-BamHI-R).
- Spur 3:** Restriktion der finalen Vektoren mit den Restriktionsendonukleasen XhoI/SacI. pMTT 1-GFP-PHP1: Größen: 4.000 bp und 3.000 bp (*backbone*). pMTT 1-GFP-PHP2: Größen: 5919 bp und 3.000 bp. pMTT 1-GFP-SNARE: Größen: 4860 bp und 3.000 bp. pMTT 1-GFP-14-3-3: Größen: 5221 bp und 3.000 bp. Die Fragmente: 4.000 bp, 5919 bp, 4860 bp und 5221 bp wurden anschließend zur Transformation mittels *biolistic bombardment* in *T. thermophila* eingesetzt.
- Spur 4:** Überprüfung der Vektoren durch Amplifikation der Bereiche GFP-Gen. GFP-PHP1 – Größe 584 bp (Primerpaare: Seq-GFP und PHP 1-BamHI-R). GFP-PHP2 – Größe 2492 bp (Primerpaare: Seq-GFP und PHP2-BamHI-R). GFP-SNARE – Größe 1473 bp (Primerpaare: Seq-GFP und SNARE-BamHI-R). GFP-14-3-3 – Größe 1794 bp (Primerpaare: Seq-GFP und 14-3-3-BamHI-R).
- Spur 5:** Überprüfung der Vektoren durch Amplifikation der Bereiche Gen-BTU. PHP 1-BTU – Größe 785 bp (Primerpaare: PHP 1-MluI-F und Seq-BTU). PHP 2BTU – Größe 2694 bp (Primerpaare: PHP 2-MluI-F und Seq-BTU). SNARE-BTU – Größe 1675 bp (Primerpaare: SNARE-MluI-F und Seq-BTU). 14-3-3-BTU – Größe 1996 bp (Primerpaare: 14-3-3-MluI-F und Seq-BTU).
- B.** Exemplarische schematische Darstellung der Zielgenkassette pMTT1-GFP-PHP1. Die Pfeile markieren die Positionen der eingesetzten Primer in den Spuren 4 und 5.

Die Plasmide von allen vier *E. coli*-Transformanten zeigten bei den gelelektrophoretischen Überprüfungen korrekte Größen und somit ihre erfolgreiche Konstruktion. Die hier konstruierten finalen Plasmide dienten zur Transformation in *T. thermophila*-Zellen.

4.4.3. Transformation von GFP-Fusionsprodukten in *T. thermophila*

Vor der Transformation in die vegetative *T. thermophila* CU522 Kultur wurden die finalen Vektoren sequenziert (MWG Biotech), um die Sicherheit zu haben, dass alle notwendigen Bestandteile vorhanden und an der richtigen Stelle lokalisiert sind. Alle Vektoren konnten erfolgreich überprüft werden.

Nach der Überprüfung der Vektoren wurden diese zum Restriktionsverdau mit den Endonukleasen XhoI/SacI inkubiert, um das *Bluescript backbone* herauszuschneiden und nur das entsprechende Fragment zur homologen Rekombination in die *T. thermophila* Zellen zu erhalten. Der jeweilige Vektor wurde auf die gewünschte Konzentration von $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingengt und mit den Goldpartikeln nach dem Protokoll von *Seashell Technology* versetzt. Die zur Transformation eingesetzten vegetativen Zellen CU 522 wurden bis zu einer logarithmischen oder stationären Wachstumsphase inkubiert und wie unter Punkt 3.2.6.7. beschrieben für die anschließende Transformation mit der „Goldkanone“ vorbereitet.

4.4.4. Molekularbiologische Charakterisierung der Transformanten

Die erfolgreiche Integration des Vektors in die *Tetrahymena*-Zellen wird über eine Paclitaxel-Resistenz der Transformanten validiert. Dieses Resistenzgen ist Bestandteil des Vektors und garantiert somit, dass nur solche Zellen überleben, die tatsächlich mit dem hergestellten Konstrukt transformiert worden sind **ODER** das Konstrukt eingebaut haben. Die Zellen wurden kultiviert und nach ca. 3 - 4 Wochen wurde genomische DNA der Transformanten isoliert und mittels PCR analysiert.

In Abb. 25 ist die gelelektrophoretische Analyse der Vektoren pMTT1-GFP-PHP1, pMTT1-GFP-PHP2, pMTT1-GFP-SNARE und pMTT1-GFP-14-3-3 dargestellt. Dazu wurden die Sequenzierprimer Seq-GFP und Seq-BTU1 in Kombination mit den genspezifischen R - bzw. F-Primern verwendet, um die Bereiche im Übergang zwischen dem zu markierenden Zielgen und der Sequenz für GFP bzw. 3'-BTU zu amplifizieren. Die Banden sind mit der erwarteten Größe zu sehen, so dass eine erfolgreiche Transformation vorliegt.

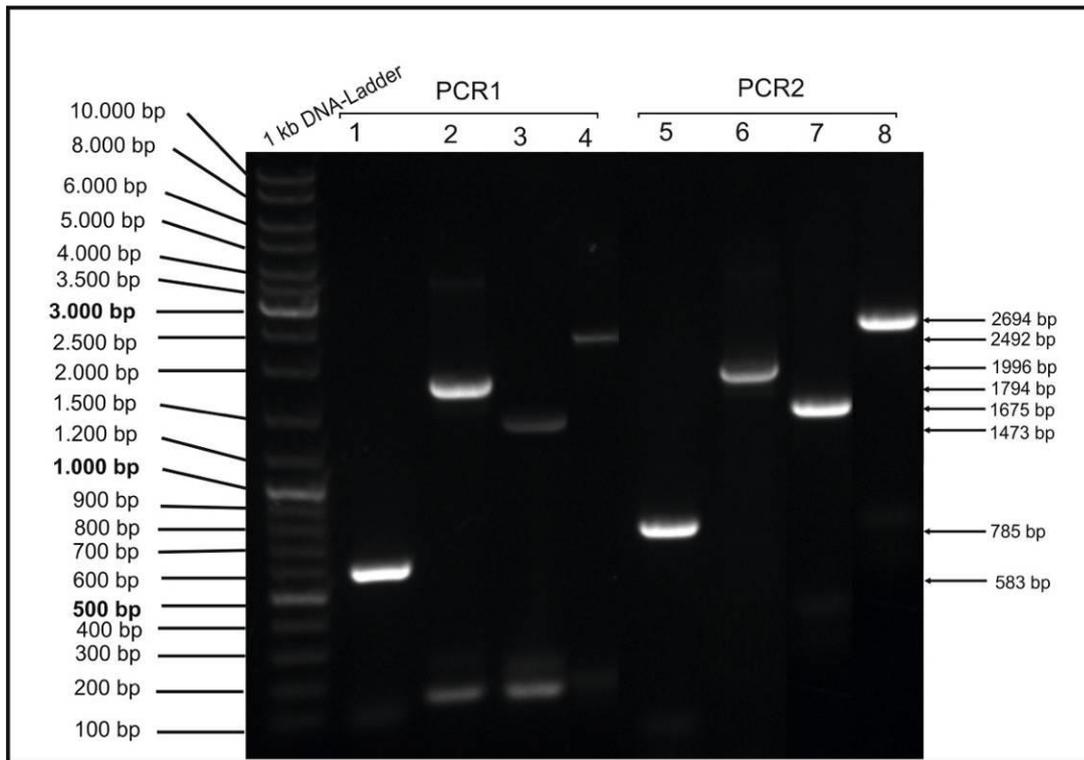


Abb. 25: Nachweis der Integration der Zielgenkassette.

PCR 1: Untersuchung des Übergangsbereiches der GFP-Sequenz und der Zielgensequenz.

PCR 2: Untersuchung des Übergangsbereiches der Zielgensequenz und der 3'-BTU1 Integrationsflanke.

Spuren: 1 + 5: pMTT1-GFP-PHP1 → 583 bp und 785 bp

Spuren: 2 + 6: pMTT1-GFP-14-3-3 → 1794 bp und 1996 bp

Spuren: 3 + 7: pMTT1-GFP-SNARE → 1473 bp und 1675 bp

Spuren: 4 + 8: pMTT1-GFP-PHP2 → 2492 bp und 2694 bp

4.4.5. Nachweis der GFP-Fusionskonstrukte via Fluoreszenzmikroskopie

Die Erstellung der Konstrukte sollte die Lokalisation der vier Zielgene in der Zelle ermöglichen. Dazu ist es notwendig, das GFP mit einem Fluoreszenzmikroskop anzuregen und sichtbar zu machen. In Abb. 26 wird die Lokalisation des GFP-Konstrukts zum Zeitpunkt 30 sek mit vier verschiedenen Genen (14-3-3, SNARE, PHP 1 und PHP 2) im Vergleich zum parentalen Wildtyp (WT) Cu 522 ohne GFP-tagging, welcher eine schwache Autofluoreszenz im Bereich des MACs aufweist, dargestellt.

Das GFP-14-3-3-Fusionsprotein zeigt eine intensive Fluoreszenz im Bereich des Oralapparates, während das Phagosom deutlich erkennbar ist. Im Vergleich dazu zeigt das GFP-PHP1-Fusionsprotein neben der intensiven Fluoreszenz im Bereich des MACs wie der WT auch eine schwach erhöhte Fluoreszenz um die phagosomale Membran und um die kontraktile Vakuole. Das PHP 2- Protein zeigt eine vergleichbare Fluoreszenz wie das PHP 1- Protein; die Intensität ist etwas geringer, aber erkennbar am Phagosom. Eine intensive Fluoreszenz beobachtet man in den GFP-SNARE-Fusionskonstrukten; diese Akkumulation des fluoreszierenden GFP-SNARE-Konstrukts ist besonders intensiv um die phagosomale Membran festzustellen.

Alle vier untersuchten GFP-Fusionsproteine wurden zum Zeitpunkt 30 sek an der phagosomalen Membran nachgewiesen, wobei zwei von ihnen – 14-3-3 und PHP 1 – aufgrund der Lokalisation im Oralapparat und im MAC nicht ausschließlich phagosomale Funktionen ausüben könnten.

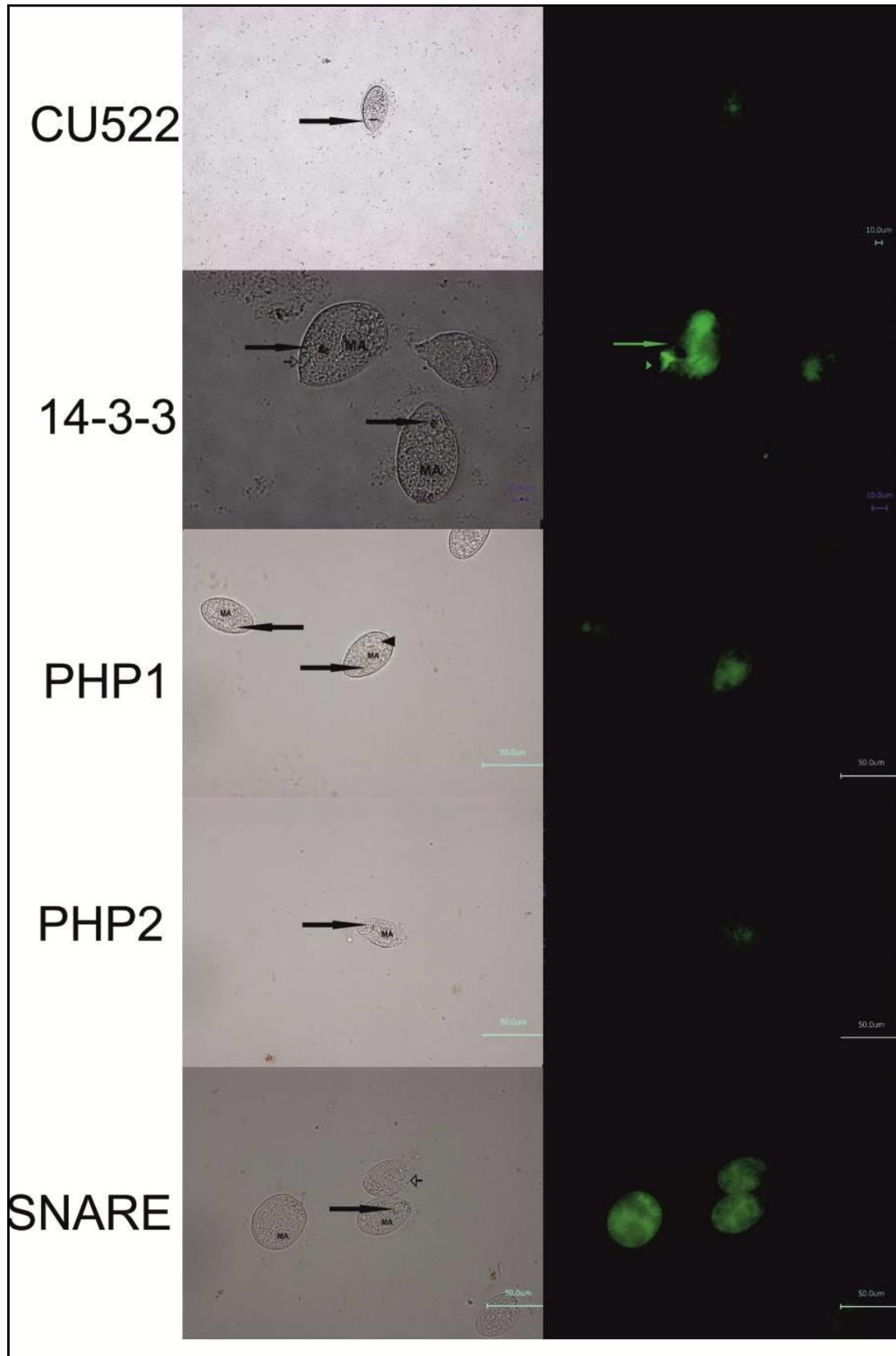


Abb. 26: Lokalisation des GFP-Fusionskonstruktes in lebenden *T. thermophila* Zellen. Die Analyse erfolgte im Hellfeld- und Fluoreszenz-Modus. Dargestellt sind die *T. thermophila* Zellen nach einer 30 sek Fütterung mit magnetischen Partikeln. **Lange Pfeile:** Magneto-beads enthaltende Phagosomen; **kurze Pfeile:** Oral-Apparat; **Dreieck** (PHP 1): Kontraktile Vakuole; **MAC:** Makronukleus. Die Bilder wurden überwiegend bei den identischen Bedingungen (Vergrößerung: 60 x), bis auf den parentalen Wildtyp CU 522 und das GFP-14-3-3: 20 x

Zeitlicher und räumlicher Verlauf der Cyclose durch „pulse-chase“-Markierung der GFP-Transformanten

Die hergestellten GFP-Fusionsproteine wurden ebenfalls im Laufe des Phagozytoseprozesses in der *T. thermophila* Zelle zeitlich und räumlich lokalisiert. Dazu wurden die Phagosomen der *T. thermophila* Transformanten mit dem „pulse-chase“-Verfahren markiert und zu definierten Zeitpunkten vergleichend mit der Kontrolle (parentaler WT CU 522) im Fluoreszenzmikroskop visualisiert.

In Abb. 27 ist zunächst die Autofluoreszenz des Wildtyps CU 522 im Verlauf der Phagozytose zu den Zeitpunkten 30 sek bis 120 min als Kontrolle dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen zu Beginn der Cyclose kaum fluoreszieren (vgl. Abb. 27, CU 522). Mit fortschreitender Phagozytose kann man in Abb. 27 eine leichte, aber unspezifische Zunahme der Fluoreszenz im Cytosol der gesamten Zelle beobachten. Dabei können keine definierten fluoreszierenden Zellkompartimente erkannt werden.

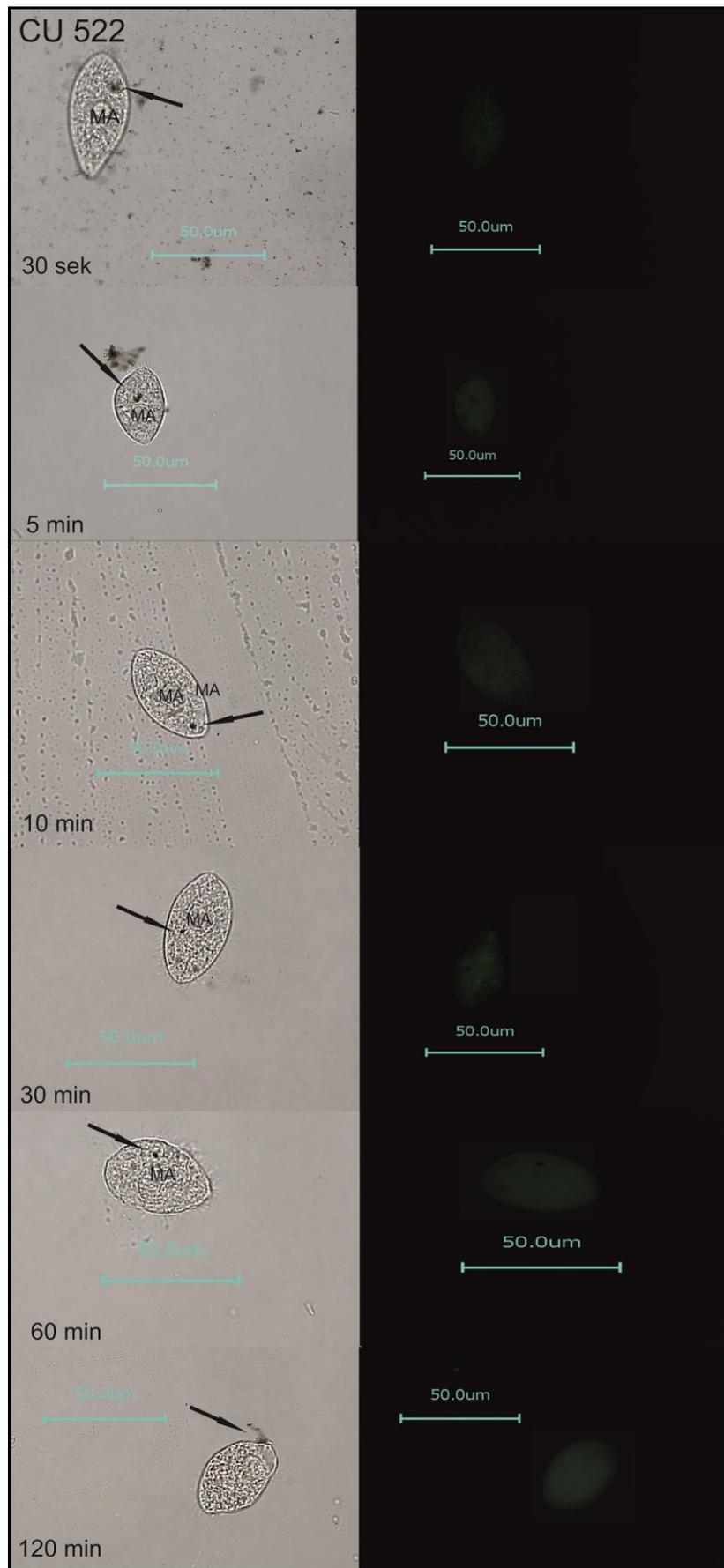


Abb. 27: Parentaler Wildtyp CU 522 als Kontrolle nach einem *Pulse-Chase*-Verfahren. Die Fütterung erfolgte mit magnetischen Partikeln. Lange Pfeile symbolisieren Magneto-beads enthaltende Phagosomen. Vergrößerung 60-fach.

Abb. 28 zeigt das **GFP-PHP 1**-Fusionsprotein zu den Zeitpunkten 30 sek bis 120 min. Die Phagosomen zeigen eine unterschiedlich intensive Fluoreszenz in verschiedenen Bereichen der Zelle. Zu Beginn (30 sek) erkennt man eine schwache Fluoreszenz im Bereich der phagosomalen Membran und des ER. Die Intensität dieser Fluoreszenz nimmt zu den Zeitpunkten 5 und 10 min im Bereich der phagosomalen Membran und des MACs zu. Der MAC und die Zellmembran sind zu diesen Zeitpunkten im Vergleich zum WT deutlich intensiver zu erkennen. Die Fluoreszenz nimmt zum Zeitpunkt 30 min vergleichbar zu 30 sek ab, wird deutlich schwächer im Bereich des Phagosoms und begrenzt sich auf MAC und ER. Zum Zeitpunkt 60 min wird die Fluoreszenz wieder intensiver im Bereich des Phagosoms und des MACs und besitzt zum Zeitpunkt 120 min kaum noch Intensität, vergleichbar mit dem WT.

Die Untersuchung des GFP-PHP 1-Fusionsproteins zeigt seine stark stadienspezifische Assoziation mit dem Phagosom im Verlauf der Cyclose (Zeitpunkte 30 sek bis 60 min). Die Ergebnisse zeigen zusätzlich zur Phagosomen-Assoziation noch weitere Lokalisationen des Proteins im ER und MAC, was zur Annahme führt, dass es in weitere spezifische Aufgaben im Phagozytoseprozess involviert sein kann.

Die Fluoreszenz des **GFP-PHP 2**-Fusionsproteins ist zum Zeitpunkt 30 sek im Vergleich zum WT besonders im Bereich der phagosomalen Membran und des MACs intensiv zu erkennen (Abb. 29). Im weiteren Verlauf ändert die Fluoreszenz ihre Intensität und den Ort. So kann man zum Zeitpunkt 5 min keine deutliche Fluoreszenz um das Phagosom und nur eine schwache Fluoreszenz um den MAC beobachten. Ab dem Zeitpunkt 10 min erreicht die Fluoreszenz die maximale Intensität: die phagosomale Membran, MAC, ER und die Zellmembran sind deutlich zu erkennen. Ab dem Zeitpunkt 30 min wird die Fluoreszenz im äußeren Bereich der Zellmembran, des MACs, ER und der Phagosomen schwächer, wobei sie wieder intensiver in der Nähe des Cytoprocts (60 und 120 min) und des Oralapparates (120 min) wird.

Das Protein PHP 2 ist laut dieser Analyse zusätzlich zur Phagosomen-Assoziation (30 sek bis 30 min) im Verlauf der Cyclose noch in weiteren Zellkompartimenten wie dem MAC und in der Zellmembran lokalisiert. Somit könnte das Protein parallel zur Phagozytose weitere Phagozytose-(un)abhängige Funktionen in der Zelle ausführen.

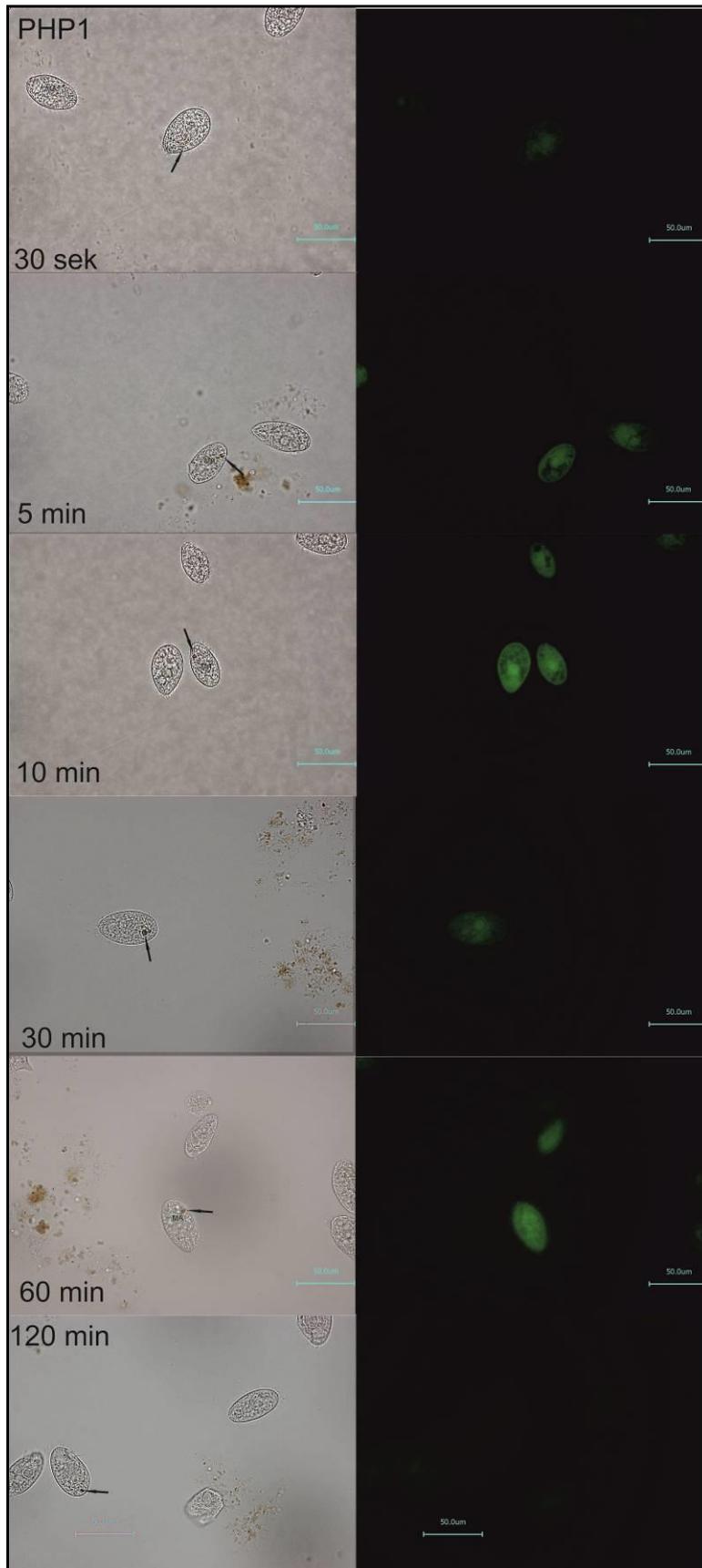


Abb. 28: Nachweis des GFP-Fusionskonstruktes PHP 1 in lebenden *T. thermophila* Zellen nach einem *Pulse-Chase*-Verfahren. Die Fütterung erfolgte mit magnetischen Partikeln. Lange Pfeile symbolisieren Magneto-beads enthaltende Phagosomen. Vergrößerung 60-fach.

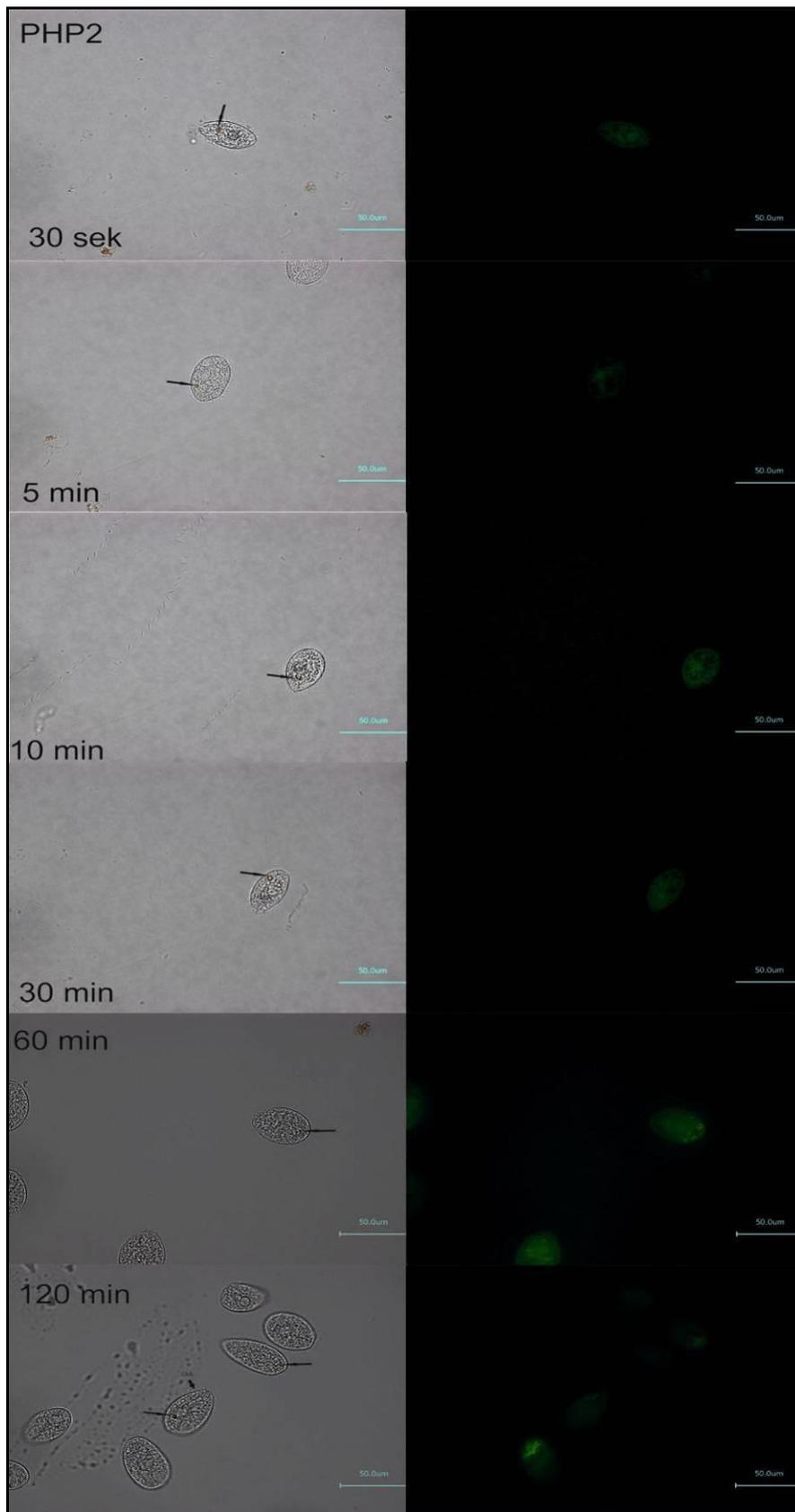


Abb. 29: Nachweis des GFP-Fusionskonstruktes PHP 2 in lebenden *T. thermophila* Zellen nach einem *Pulse-Chase*-Verfahren. Die Fütterung erfolgte mit magnetischen Partikeln. Lange Pfeile symbolisieren Magneto-beads enthaltende Phagosomen und kurze Pfeile den Oral-Apparat (OA). Vergrößerung 60-fach.

Abb. 30 zeigt das **GFP-14-3-3**-Fusionsprotein zu den untersuchten Zeitpunkten (30 sek bis 120 min). Die Fluoreszenzintensität ist zu Beginn der Phagozytose (30 sek bis 30 min) sehr stark, wobei sie zum Zeitpunkt 60 min etwas schwächer und zum Schluss (120 min) wieder etwas intensiver wird. Am Anfang (30 sek) ist die Fluoreszenz im MAC und um die phagosomale Membran zu erkennen, wobei zum Zeitpunkt 5 min die Intensität am Phagosom abnimmt. Zusätzlich sind hier der Oralapparat und die kontraktile Vakuole deutlich erkennbar. Die Intensität um die Phagosomen sowie in MAC nimmt zum Zeitpunkt 10 min etwas ab und erreicht im 30 min Stadium ihr Maximum, wobei eine deutliche Fluoreszenz in den Bereichen um den Oralapparat und den Cytoproct festzustellen ist. Zum Zeitpunkt 60 min kann man eine Abnahme der Fluoreszenz beobachten, wobei nur der Bereich um den Cytoproct, in Basalkörper zu erkennen ist. Eine intensive Fluoreszenz kann zum Zeitpunkt 120 min im Oralapparat beobachtet werden, wobei das Phagosom nur eine schwache Fluoreszenz aufweist.

Das Protein 14-3-3 konnte zu den Zeitpunkten 30 sek, 5 min sowie 120 min eindeutig an der phagosomalen Membran nachgewiesen werden. Seine zusätzliche Assoziation am Oralapparat und am Cytoproct deutet auf mögliche Phagosomen-unabhängige Aufgaben im Phagozytoseprozess hin.

Die Untersuchung des **GFP-SNARE**-Fusionsproteins kann in Abb. 31 betrachtet werden. Man erkennt, dass die Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten eine intensivere Fluoreszenz im Vergleich zum parentalen Wildtyp aufweisen. Zu Beginn (30 sek) ist die Fluoreszenz im mittleren Bereich der Zelle sowie um das Phagosom zu beobachten und wird mit fortschreitender Phagosomenreifung (Zeitpunkte 5 und 10 min) intensiver im MAC und ER, wobei keine Fluoreszenz um die phagosomale Membran zu erkennen ist. Das Maximum der Fluoreszenz kann zum Zeitpunkt 30 min im Bereich des MACs beobachtet werden. Zum Zeitpunkt 60 min nimmt die Intensität der Fluoreszenz ab und man erkennt MAC und ER nur schwach. Diese wird zum Zeitpunkt 120 min erneut, vor allem im Bereich der Zellmembran, des MACs sowie um die phagosomale Membran in der Nähe des Cytoprocts, intensiver.

Die Ergebnisse der GFP-Untersuchung des SNARE-Proteins zeigen seine Phagosomen-Assoziation nur zu den Zeitpunkten 30 sek und 120 min, während es im Verlauf der Cyclose in weiteren Bereichen wie ER und MAC nachgewiesen wurde.

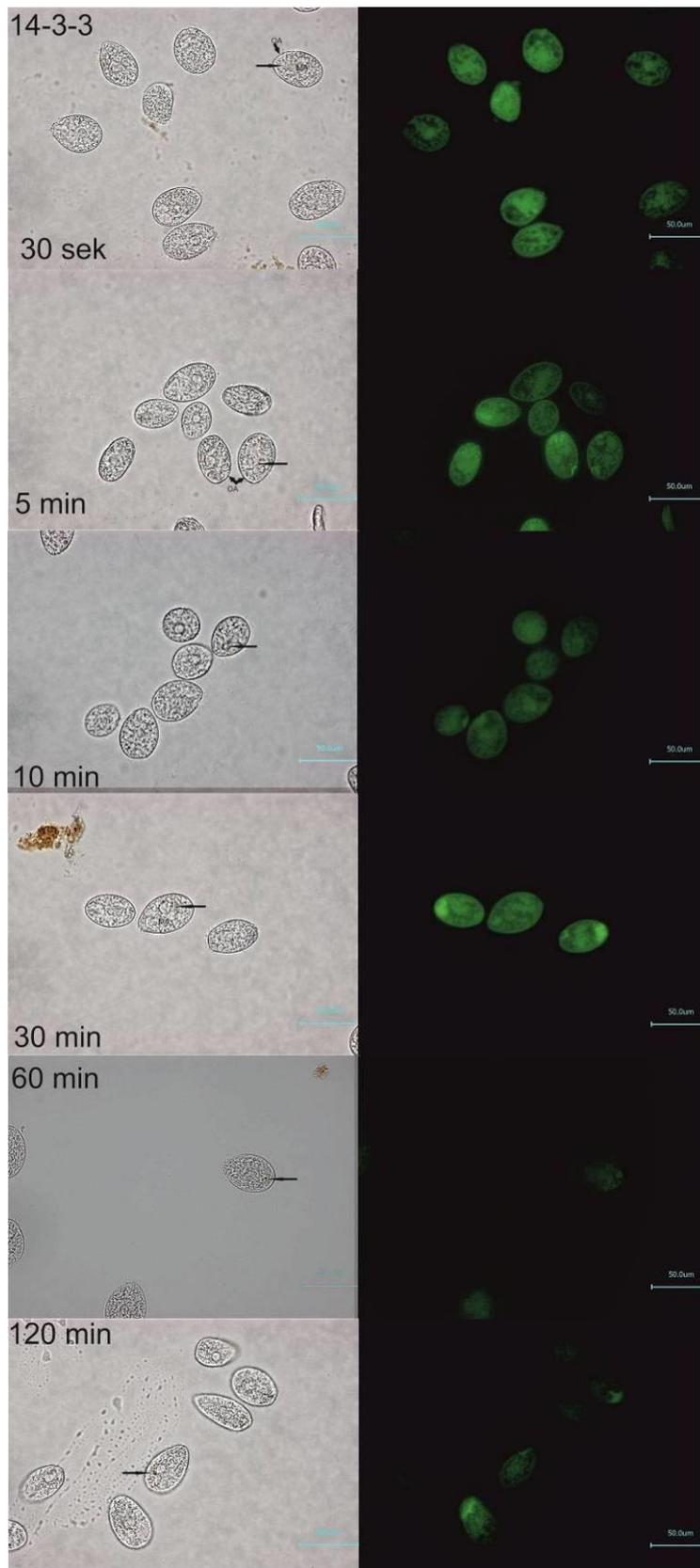


Abb. 30: Nachweis des GFP-Fusionskonstruktes 14-3-3 in lebenden *T. thermophila* Zellen nach einem *Pulse-chase-Verfahren*. Die Fütterung erfolgte mit magnetischen Partikeln. Lange Pfeile symbolisieren Magneto-beads enthaltende Phagosomen und kurze Pfeile den Oral-Apparat (OA). Die Bildaufnahmen erfolgten bei einer 60x-Vergrößerung.

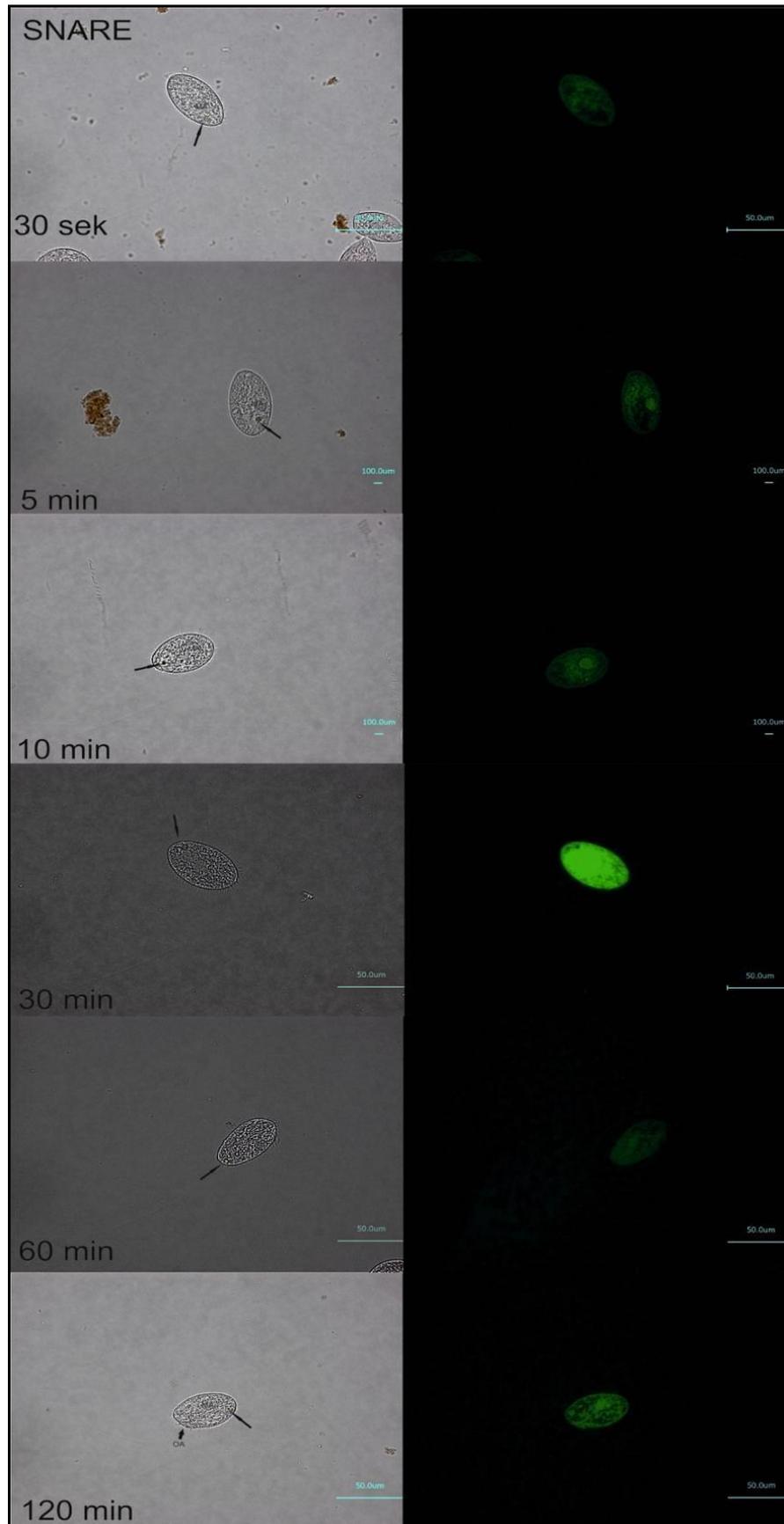


Abb. 31: Nachweis des GFP-Fusionskonstruktes SNARE in lebenden *T. thermophila* Zellen nach einem *Pulse-chase-Verfahren*. Die Fütterung erfolgte mit magnetischen Partikeln. Lange Pfeile symbolisieren Magneto-beads enthaltende Phagosomen und kurze Pfeile den Oral-Apparat (OA). Die Bildaufnahmen erfolgten bei einer 60x-Vergrößerung.

Mit Hilfe des GFP-tagging konnte die zeitliche und räumliche Lokalisation der vier ausgewählten phagosomalen Proteine untersucht werden. Die Untersuchungen zeigen, dass alle GFP-Fusionsproteine stadienspezifisch mit dem Phagosom assoziiert sind. Einige üben parallel dazu weitere eventuell auch Phagosomen-unabhängige Aufgaben im Verlauf der Phagozytose aus. Diese Proteine können während der Cyclose Phagosomenreifungsprozesse indirekt koordinieren, eine direkte Assoziation mit dem Phagosom erfolgt nur stadienspezifisch.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der 2 D-Gelelektrophorese ein Überblick über die Anzahl der phagosomalen Proteine in den Stadien 30 sek und 5 min im Organismus *T. thermophila* gewonnen werden. Anschließend wurden mit der MudPIT-Analyse in beiden untersuchten Zeitstadien insgesamt 707 verschiedene, stadienspezifische phagosomale Proteine identifiziert. 335 der phagosomalen Proteine konnten funktionellen Gruppen zugeordnet werden, während die Funktion der 372 hypothetischen Proteine unbekannt blieb. In der nachfolgenden relativen Quantifizierung mittels qPCR wurden vier ausgewählte Proteine in Hinblick auf die mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Phagozytose untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten für zwei Gene (VPS 13 und SNARE) eine Phagozytose-abhängige Expression, während für die beiden anderen phagosomalen Proteine (PHP 1 und PHP 2) keine Phagozytose-abhängige erhöhte mRNA-Expression festgestellt werden konnte. Zusätzlich wiesen die qPCR-Ergebnisse (mRNA-Level) bzgl. der Stadienspezifität und der Phagozytose-Relevanz eine umgekehrte Korrelation mit den MudPIT-Resultaten (Protein-Level) von allen untersuchten Proteinen auf.

Ein anknüpfendes GFP-tagging lieferte einen zeitlichen und örtlichen Nachweis der vier Proteine in *T. thermophila* während der gesamten Cyclose. Für alle vier untersuchten GFP-Fusionsproteine konnte die Assoziation mit der phagosomalen Membran zu dem Zeitpunkt 30 sek gezeigt werden. Die Analyse der Proteine im Verlauf der Cyclose zeigte zusätzlich, dass die Proteine teilweise auch in weiteren Bereichen der Zelle lokalisiert waren und somit weitere Funktionen im Prozess der Phagozytose außerhalb des Phagosoms erfüllen könnten.

5. Diskussion

Phagozytose spielt eine kritische Rolle im Immunsystem bei der Beseitigung von Krankheitserregern. Dabei werden die Pathogene eliminiert, indem sie von den Makrophagen, auch als professionelle Phagozyten des Immunsystems bezeichnet, „aktiv“ umflossen und in Phagosomen eingeschlossen werden. Damit es zur Phagosomenbildung kommt, müssen die Rezeptoren die an der Oberfläche der Pathogene befindlichen spezifischen Strukturen (Liganden) erkennen. Die Untersuchung der Immun-Mechanismen, die innerhalb der Wirtszelle ablaufen, sowie ihr Einfluss auf bestimmte Pathogene (Pathogen-Wirts-Interaktionen), führen zu einem besseren Verständnis ebensolcher Vorgänge auf zellulärem und molekularem Level und eröffnen neue Therapieansätze gegen diverse Infektionen. Mit Hilfe von tierischen Modellen und Zelllinien (murine Makrophagen) werden die Abwehrfunktionen von infizierten Zellen untersucht. Die dabei gewonnenen Ergebnisse lassen sich natürlich nur bedingt auf die Situation im komplexen Immunsystem höherer Tiere übertragen, obwohl zahlreiche identische Moleküle sowohl in Einzellern als auch in Menschen identifiziert worden sind, die auf ähnliche Reaktionsmechanismen schließen lassen.

Daher stellt sich berechtigter Weise die Frage, warum *Tetrahymena* als Modellorganismus zur weiteren Untersuchung der Phagozytose ausgewählt wurde. Zusammen mit anderen Ciliophora gehört *Tetrahymena* zu den Alveolata und weist somit eine nur sehr entfernte Verwandtschaft mit den Menschen auf; die Proteine und Regulationsfaktoren bzw. deren Gene sind dementsprechend grundsätzlich divergent. Allerdings findet man in *Tetrahymena* die komplexesten zellulären Strukturen vor, da u.a. mit deren Hilfe alle molekularen und physiologischen Prozesse in nur einer Zelle ablaufen müssen. Aber auch verglichen mit anderen Einzellern und selbst mit den Modellorganismen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* präsentiert *Tetrahymena* weitaus mehr und komplexere molekulare Regulationsmechanismen (Eisen *et al.*, 2006). Da *T. thermophila* viele Gemeinsamkeiten mit dem Proteinfaltungsapparat (Ellgaard & Helenius, 2003). bei höheren Tieren (inkl. Menschen) und der einheitlichen und einfachen Core-Glykosylierungsstruktur aufweist (Helenius & Aebi, 2004), die eine Basis-Struktur für eine spätere *in vitro* Modifikation der rekombinanten Proteine bietet, eignet sich *T. thermophila* sehr gut als ein aktiver Modellorganismus für viele Studien mit direkter Relevanz zur humanen Gesundheit. Weiterhin treten zahlreiche Orthologien mit höheren Tieren und dem Menschen auf. So sind **874** von insgesamt **2280** zu *T. thermophila* orthologen, humanen Genen den Loci, die mit

humanen Krankheiten assoziiert sind, zugeordnet (Eisen *et al.*, 2006). Darüberhinaus ist *T. thermophila* bekannt für die Expression von Vakzinen gegen den Erreger der Ichthyophthiriose (Grießkörnchenkrankheit), die Gattung *Ichthyophthirius*, bei Fischen, den humanen Erreger der Malaria tropica *Plasmodium falciparum* sowie gegen weitere humane Krankheiten, wie z.B. Grippeviren (Cowan *et al.*, 2014; Wang & Dickerson, 2002; Sachse, 2010). Das Unternehmen Cilian AG nutzt beispielsweise das auf Ciliaten-basierende Expressionssystem (CIPEX-System) speziell mit der Gattung *Tetrahymena* zur Herstellung von therapeutischen Proteinen wie dem Wirkstoff **Cilase**[®], welcher bei einer exokrinen Bauchspeicheldrüsen-Insuffizienz (EPI) erfolgreich eingesetzt wird (Cilian AG, Münster, NRW).

Die genaueren Mechanismen der Phagosomenbildung und die daran beteiligten zellulären Prozesse bleiben bei den bisher veröffentlichten Studien, trotz ihrer Bedeutung, weitestgehend unbekannt. In vorliegender Arbeit wurden neu gebildete Phagosomen aus *T. thermophila* isoliert und mit prozessierten (gereiften) Phagosomen in Bezug auf die phagosomale Proteinzusammensetzung verglichen. Dabei wurden neue Ergebnisse zu Phagosomenbildung und Prozessierung bei *T. thermophila* gewonnen, die im Folgenden in die bisherigen Erkenntnisse eingeordnet und diskutiert werden. Zur Aufklärung der Forschungsfragen mussten zuerst die geeigneten Methoden ermittelt und dann etabliert werden, diese werden auf der Grundlage bestehender Literatur später besprochen. Zunächst werden die Ergebnisse der Markierungsexperimente mit dem Grün-fluoreszierenden Protein (GFP) und der qPCR - Analysen zur relativen Quantifizierung dargestellt. Die untersuchten Proteine/Gene sind auf der Grundlage der 2-D-Untersuchungen sowie der MudPIT-Analysen ausgewählt worden. Auf die weiteren dabei identifizierten Gene/Proteine wird später noch intensiv eingegangen.

5.1. GFP-Fusionsproteine

Die Auswahl der hier untersuchten Proteine wurde aufgrund von vorausgehenden Ergebnissen von qPCR und MudPIT-Analyse getroffen. Die Proteine stammen aus vier verschiedenen Proteingruppen und spielen in Hinblick auf ihre Funktionen somit unterschiedliche Rollen bei der Phagosomenreifung. Die drei zuvor mit der qPCR-Methode untersuchten Proteine **PHP 1** (*Tetrahymena Gene ID: 45.m00225*), **PHP 2** (*Tetrahymena Gene ID: 81.m00185*) und **SNARE** (*Tetrahymena Gene ID: 34.m00271*) sollten mit der GFP-tagging-Technik analysiert

werden. Das **14-3-3**-Protein (*Tetrahymena Gene ID: 18.m00476*) ist ein regulatorisches, in einige Prozesse wie Metabolismus oder Signaltransduktion involviertes, Protein (Zhao *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2004; Madinger *et al.*, 2010; Kilburn *et al.* 2007; Jacobs *et al.*, 2006) und wurde anstelle des VPS 13 zur weiteren Analyse ausgewählt, da für dieses bereits ein positiver Nachweis als GFP-Fusionsprotein erbracht wurde (Samaranayake *et al.*, 2011).

Die mikroskopische Analyse von **allen vier** untersuchten GFP-Fusionsproteinen bestätigte die **Phagosomen**-Assoziation zum Zeitpunkt **30 sek** nach Induktion sowie die vorausgehenden MudPIT-Analysen und führt zur Annahme, dass diese an Phagosomenbildung beteiligt sind. Zusätzliche Nachweise des Proteins 14-3-3 im Bereich der undulierenden Membran sowie des PHP 1 im Bereich des ER deuten auf weitere, bisher noch unbekannte Phagozytose-abhängige Funktionen in der Zelle (Abb. 32).

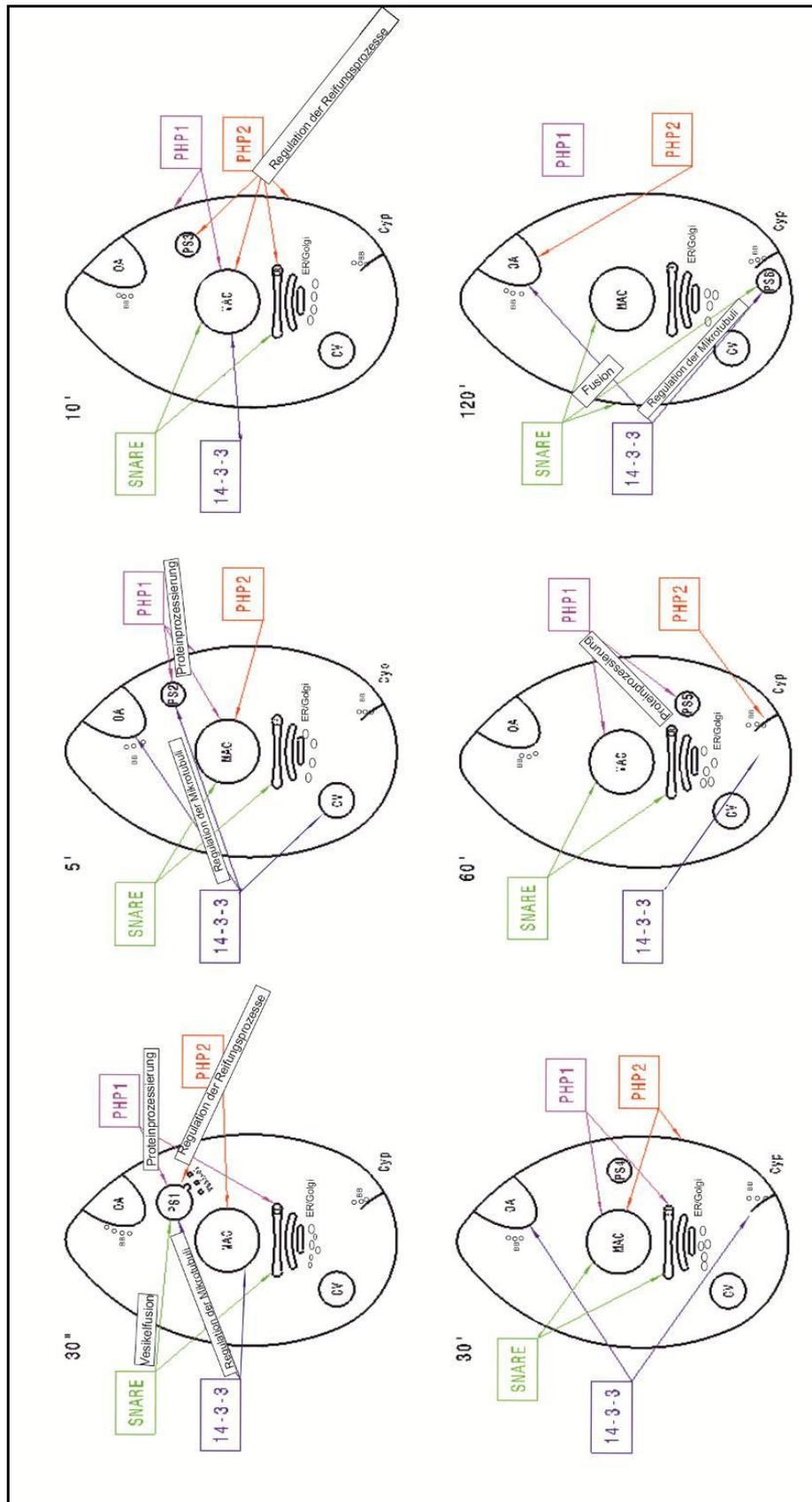


Abb. 32: Hypothetisches Modell der GFP-Fusionsprotein-Analyse für die Proteine SNARE, PHP1, PHP2, und 14-3-3. Dargestellt sind die einzelnen Zeitstadien (30''-120': 30 sek., 5, 10, 30 60 und 120 min) sowie die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine in den jeweiligen Zellkompartimenten. Abkürzungen: OA – Oralapparat, PS – Phagosom, MAC – Makronukleus, ER/Golgi – Endoplasmatisches Retikulum/Golgi , CV – Kontraktile Vakuole, Cyp – Cytoproct, BB – Basalkörper. Beschreibung s. Text.

Die Abb. 32 zeigt ein Modell der Lokalisationen und Funktionen der einzelnen GFP-Fusionsproteine im Verlauf der Cyclose. Die vier untersuchten GFP-Fusionsproteine sind nicht nur direkt am Phagosom, sondern auch in drei weiteren Zellkompartimenten nachweisbar. Parallel zur Assoziation mit der phagosomalen Membran wurden die Proteine auch im Makronukleus oder Oralapparat identifiziert. In dem Modell sind den Proteinen bekannte und hypothetische Funktionen zugeordnet, die eine Rolle in der Phagozytose spielen und später ausführlich dargestellt werden. Die Funktion des SNARE-Proteins ist zu Beginn der Cyclose eindeutig den Fusionsprozessen zum Zeitpunkt 30 sek zuzuordnen. Auch nach 120 min spielt es wieder eine Rolle, wenn das Phagosom mit der Zellmembran zur Exocytose verschmelzen muss. Das 14-3-3-Protein kann an der Regulation der Mikrotubuli und somit am Transport der frühen Vesikel sowie des nascenten und kondensierten Phagosoms vom Cytostom zum Cytoproct beteiligt sein. Neben den Transport- und Fusionsprozessen, die eine wesentliche Rolle in der Ausbildung der Phagosomen spielen, tritt in unterschiedlichen Stadien der Cyclose das PHP 1-Protein auf, das die Proteinprozessierung am Phagosom regulieren und somit die Reifung des Phagosoms steuern kann. Werden Proteinkomponenten oder Membranbestandteile zur „Phagosomenprozessierung“ nicht mehr benötigt, kann das PHP 2-Protein, welchem eine Funktion in Autophagieprozessen zugeschrieben werden könnte, die Phagosomenreifung durch Degradierung nicht mehr benötigter Komponenten steuern.

Im Folgenden werden die einzelnen Proteine bezüglich ihrer möglichen stadienspezifischen Funktion in der Phagozytose diskutiert, mit entsprechender Literatur verglichen und den vorausgehenden Resultaten der qPCR und MudPIT-Analysen gegenübergestellt.

Nach der sorgfältigen molekularbiologischen Herstellung und Charakterisierung der GFP-Fusionskonstrukte sowie der *E. coli*- und *T. thermophila*-Transformanten erfolgte ihr Lokalisationsnachweis in *T. thermophila*. Die Untersuchungen im Fluoreszenzmikroskop führten zu unterschiedlichen zeitlichen und räumlichen Nachweisen der Proteine (vgl. Abb. 28, Abb. 29, Abb. 30, Abb. 31). Als Kontrolle für diese Untersuchungen diente der parentale Wildtyp CU 522, der selbst eine schwache Fluoreszenz am MAC aufweist (s. Abb. 27).

Die Untersuchung des **GFP-SNARE**-Fusionsproteins zeigt eine variierende stadienspezifische Fluoreszenz in verschiedenen Zellkompartimenten. Eine eindeutige Assoziation des SNARE-Proteins mit dem **Phagosom** ist bereits zum Zeitpunkt **30 sek** in Form von einer Akkumulation der fluoreszierenden Vesikel um das neu gebildete Phagosom

zu erkennen (Abb. 31). Dieses stimmt mit der Funktion von SNARE-Proteinen in Hinblick auf die Membranfusionsprozesse sehr gut überein. Zahlreiche Studien in verschiedenen Organismen zeigen, dass SNAREs die Membran- und Vesikelfusionsprozesse steuern (Tooze *et al.*, 2001; Jacobs *et al.*, 2006; Kienle *et al.*, 2009; Plattner, 2010). Bei der frühen Bildung der Phagosomen in *Tetrahymena* nach 30 sek fusionieren einzelne Vesikel („discoidale“) mit dem wachsenden Phagosom (s. Abb.32). Dabei spielen die SNARE-Proteine eine entscheidende Rolle. Die in der *target*-Membran verankerten SNARE-Proteine (t-SNARE) paaren mit den in den Transportvesikeln-befindlichen SNARE-Proteinen (v-SNARE) (Jahn & Scheller, 2006; Jahn *et al.*, 2003; Martens & McMahon, 2008). Dabei werden die Membran-Andockungsschritte durch das Sec 1/Munc 18 (SM)-Protein reguliert, welches mit dem t-SNARE Protein verknüpft ist (Rizo & Sudhof, 2002). Die Anbindung der Membranen aneinander funktioniert nach einem sogenannten „Zipper“-Modell, welches weltweit akzeptiert wird, es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die Mechanismen erheblich komplizierter sind (Hanson *et al.*, 1997; Hay & Scheller, 1997). Die Verschmelzung einzelner Vesikel wird in der Regel durch ein molekulares Signal ausgelöst. Dabei werden die Vesikel durch Verdrängung der hydrophilen Oberfläche auf die Fusion mit der *target*-Membran vorbereitet. Somit erhält das Phagosom sowohl die Inhaltsstoffe des Vesikels, wie Nahrungsbestandteile, Proteine und Peptide als auch seine Membran (Fasshauer, 2003). Da in jeder der beiden fusionierenden Membranen ein entsprechendes SNARE-Protein vorkommen muss, damit die Verschmelzung stattfinden kann, erscheint die erfolgreiche Markierung in den nascenten Phagosomen durchaus sinnvoll und relevant.

Die Lokalisation des GFP-SNARE-Proteins am Phagosom bei **120 min** zeigt, dass **auch** zu diesem Zeitpunkt eine SNARE-vermittelte Phagosomen-Fusion stattfindet (s. Abb. 32). Aber hier nicht mit „discoidalen“ Vesikeln wie zu Beginn der Phagozytose (30 sek), sondern zum Ende der Cyclose bei der Fusion des Phagosoms mit dem Cytoproct. Auch hier werden sowohl die Zellmembran als auch die Phagosomenmembran markiert, was wieder für das Vorhandensein des entsprechenden SNARE-Proteins spricht. An dieser Stelle wird die phagosomale Membran recycelt und in Form von zahlreichen Vesikeln zurück zum Oralapparat transportiert.

Mit fortschreitender Phagosomenreifung (5 min bis 60 min) nimmt die Fluoreszenz des GFP-SNARE-Proteins in der Nähe des MACs und ER/Golgi zu, wobei keine deutliche Assoziation mit dem Phagosom erkennbar ist. Dies könnte darauf hindeuten, dass für den Ablauf der Phagozytose weitere SNARE-Proteine benötigt werden und während der Cyclose synthetisiert und letztlich aus dem ER abgeschnürt werden.

Die Markierung der Vesikel und Phagosomen und später auch der Zellmembran mit dem GFP-SNARE-Fusionsprodukt können die vorausgehenden MudPIT-Ergebnisse der SNARE-Untersuchung in Hinblick auf die Stadienspezifität bestätigen. Bei einem Vergleich mit den mRNA-Expressionsprofilen werden die GFP-Ergebnisse ebenfalls teilweise bestätigt. Ab ca. 5 min nach Induktion wird vermehrt SNARE produziert. Dieses ist über den GFP-Nachweis in Form einer Markierung in der Nähe von ER und MAC, besonders intensiv zum Zeitpunkt 30 min, zu sehen. Die mRNA, die bei der Transkription gebildet wird und sogleich am rauen ER translatiert wird, wird als Protein über GFP-tagging sowie über die qPCR in Form von erhöhten Expressionsprofilen der mRNA nachgewiesen. Eine umgekehrte Korrelation zeigt dagegen das SNARE-Protein zum Zeitpunkt 30 sek. Hier konnte das Protein über den GFP-Nachweis am Phagosom identifiziert werden, das entsprechende Expressionsprofil über qPCR zeigte im Gegensatz dazu verminderte mRNA-Expression. Das bedeutet, dass die mRNA, die bei der Transkription gebildet wird, sofort vollständig am rauen ER translatiert wird und somit als Protein über GFP-tagging, aber nicht als mRNA über die qPCR nachweisbar ist. Zusammenfassend zeigt das erfolgreiche Markieren des SNARE-Proteins mit GFP, dass das hier zunächst biochemisch über MudPIT identifizierte Protein daraufhin auch molekular nachgewiesen werden konnte und als exprimiertes Protein am erwarteten Zielort lokalisiert ist.

Das hypothetische **PHP 1-GFP**-Fusionsprotein ist bei den Markierungsexperimenten schwach an der **phagosomalen** Membran zu den Zeitpunkten **30 sek, 5 und 10 min** sowie sehr deutlich zum Zeitpunkt **60 min** zu erkennen (s. Abb. 28). Dieses Protein wurde erstmalig als **p28** von Maicher & Tiedtke (1999) als phagosomale Komponente in frühen Stadien der Phagozytose und von Jacobs *et al.* (2006) als phagosomales Protein nachgewiesen, weitere Untersuchungen in Hinblick auf seine genauen Funktion sowie die Stadienspezifität in den Phagosomen im Verlauf der Phagozytose haben bisher nicht stattgefunden.

Bei Recherchen zu dem Protein ergab sich, dass p28 von manchen Autoren und in Datenbanken fälschlicherweise auch als Synonym für die Gene des Dyneins (leichte Ketten) benutzt wird, obwohl deren genaue Bezeichnung p28A-C lauten müsste (Eisen *et al.*, 2006). Um sicher zu gehen, dass es sich nicht um Dyneine handelt, wurden die p28A-C Sequenzen gegen die Sequenz des PHP 1-Proteins aligniert. Sie zeigen allerdings keine signifikanten Übereinstimmungen. Daher wird dieses als uneinheitliche und unsaubere Bezeichnung betrachtet und nicht weiter thematisiert. Die Sequenzanalyse des von Maicher & Tiedtke (1999) identifizierten p28 und PHP 1 liefern hingegen eine 100%ige Übereinstimmung der

Gensequenzen. Aufgrund dieser Resultate wird auf die Verwendung des Synonyms verzichtet und nur einheitliche Bezeichnung PHP 1 verwendet.

Das PHP 1-Protein besitzt eine PEF-C-Archaea-Domäne, die bereits bei einigen prokaryotischen C-terminalen Protein-*sorting*-Signalproteinen gefunden wurde (Francoleon *et al.*, 2009; Haft *et al.*, 2012) und gehört somit zu der gut differenzierten Superfamilie der tief in die Membran eingebetteten Protein-Prozessierungs-Enzymen (*deeply membrane-embedded protein-processing enzymes*), die bisher aber nur in Archebakterien nachgewiesen worden sind (Haft *et al.*, 2012). Eine plausible Funktion eines homologen Proteins in *Tetrahymena* könnte sein, dass dieses mit einer Transmembran-Domäne ausgestattete Protein als Protein-Prozessierungs-Enzym an der Bildung und Reifung sowie weiteren Veränderung der Phagosomen beteiligt ist und somit auch eine Rolle in der Proteinqualitätskontrolle spielen kann. Konkret scheinen diese Enzyme in Bakterien Proteinen zu helfen, die eine Membran durchqueren und dazu erst prozessiert werden müssen (Haft *et al.*, 2012, s. Abb. 32). In den GFP-Analysen ist es zu Beginn der Cyclose nur schwach exprimiert. Dieses könnte daran liegen, dass zunächst vorwiegend die Fusion mit den Vesikeln von wesentlicher Bedeutung für die Reifung ist, um erst einmal ein funktionelles Phagosom zu erhalten. Damit wäre auch der schwächere Nachweis der Proteine in der Nähe des **ER** und des **MAC** zu den Zeitpunkten (5 min, 10 min) und eine stärkere Fluoreszenz nach 60 min erklärt (s. Abb. 32). Allerdings wurde PHP 1 von Madinger *et al.* (2010) bei *T. thermophila* auch im Hungermedium detektiert, was darauf hindeutet, dass es bei nicht ablaufender Phagozytose entweder eine andere Funktion übernimmt oder in anderen Membranen „zwischengelagert“ wird bis erneut phagozytiert wird. Zur Klärung seiner genauen Funktionen in *T. thermophila* sind weiterführende Analysen notwendig.

Zusammenfassend bestätigen die GFP-Ergebnisse des PHP 1-Proteins die bisherigen Studien in Hinblick auf die stadienspezifische Lokalisation in der phagosomalen Membran (Jacobs *et al.*, 2006; Maicher *et al.*, 1999). Die Überprüfung mit den MudPIT-Ergebnissen zeigt überraschenderweise einige Unstimmigkeiten bezüglich der stadienspezifischen Lokalisation im Phagosom. Das Protein ist laut **MudPIT** nur zu den Zeitpunkten 30 sek und 10 min (Czora, 2014) in der phagosomalen Membran nachweisbar. Eine mögliche Erklärung dieser Nachweise wäre, dass das Protein zum Zeitpunkt 5 min nur eine **transiente Bindung** mit der phagosomalen Membran eingeht bzw. von der Membran dissoziiert, in der Nähe des Phagosoms im Cytosol verbleibt und dann zum Zeitpunkt 10 min wieder fusioniert. Es ist natürlich, dass das Protein trotz der hohen Sensitivität der verwendeten Methode unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Beim Vergleichen der GFP-Ergebnisse mit den qPCR-Resultaten wird

deutlich, dass der mRNA-Level nicht immer mit dem Protein-Level korreliert. Das Expressionsprofil der PHP 1-mRNA zeigt zu den Zeitpunkten 30 sek bis 10 min keine erhöhte Genexpression, wohingegen die Ergebnisse des GFP-taggings in gleichen Zeitstadien eine Assoziation des PHP 1-Proteins mit der phagosomalen Membran aufweisen. Auch hier könnte es wieder zutreffen, dass die mRNA so schnell translatiert wird, dass kein qPCR-Nachweis möglich ist. So wurden auch keine Veränderungen in Genexpressionsprofilen trotz variierenden Wachstumsbedingungen im Organismus *Anophryoides haemophila*, welcher eine Ähnlichkeit zu *Tetrahymena* und *Paramecium* aufweist, festgestellt (Acorn *et al.*, 2011). Ähnliche Unterschiede zwischen Protein- und mRNA-Level sind bereits von Vogel & Marcotte (2012) und Crews & Pearson (2009) beschrieben worden und deuten auf eine mögliche posttranskriptionale und -translationale Regulation der mRNA sowie eine Autoregulation der Genexpression hin.

Die beobachtete intensive Fluoreszenz im Nukleus und ER zum Zeitpunkt 60 min hingegen stimmt mit den Ergebnissen der relativen Quantifizierung überein. Dabei zeigt das Expressionsprofil des Gens zum Zeitpunkt 60 min die höchste Expressionsrate während des Phagozytoseprozesses und beträgt das 0,9 fache des Ausgangswertes (vor Phagozytose-Induktion, s. Abb. 21 C). Zu diesem Zeitpunkt müssen also genügend Protein als auch mRNA zur Quantifizierung vorliegen, was durchaus der Fall sein kann, wenn genügend Genprodukte in der Transkription hergestellt wurden.

Das **GFP-PHP 2**-Fusionsprotein zeigt zu den Zeitpunkten 30 sek und 10 min, eine unterschiedlich intensive Fluoreszenz um die phagosomale Membran (s. Abb. 29 und Abb. 32) sowie eine sehr schwache Fluoreszenz zum Zeitpunkt 5 min. PHP 2 wurde bereits biochemisch als p38 nachgewiesen (Maicher *et al.*, 2001). Es handelt sich um ein Mitogen-aktiviertes-Protein-Kinase-Protein, genauer: Stress-aktiviertes-Protein-Kinase-Protein (MAPK, Nakashima *et al.*, 1999) in *T. thermophila*. Es ist zwar als Komponente der phagosomalen Membran beschrieben, über seine Funktion sowie den zeitlichen Verlauf der Expression in *Tetrahymena* ist noch nichts bekannt. MAPK-Proteine werden im Allgemeinen bei diversen zellulären Stresssituationen wie Temperatur- und Osmolarität-Schwankungen aktiviert und regulieren zusammen mit anderen spezifischen Kinasen (z. B. Phosphatidyl-Inositol-Kinasen) u. a. auch Zellteilungs- und Autophagieprozesse (Li *et al.*, 2009; Kaneda *et al.*, 2009; Akematsu *et al.*, 2014) als Folge dieser Stressfaktoren. Zwischen Autophagie und Phagozytose könnte es durchaus einen Zusammenhang geben und zwar in Form einer

Regulationskontrolle von bestimmten, für die Phagosomenbildung bzw. -reifung, notwendigen Rezeptoren. Bonilla *et al.* (2013) konnten erfolgreich einen Beweis dieser Regulation in den murinen Makrophagen erzielen. Die MAPK-Proteine könnten in *Tetrahymena* direkt am Phagosom assoziiert bestimmte Autophagieprozesse als Folge von Phagosomenreifung regulieren, dabei könnten nicht mehr benötigte Proteine abgebaut und recycelt werden. So ist beispielsweise das Protein VPS 13 sowohl in Autophagie- als in Phagozytoseprozesse involviert (Shui *et al.*, 2008; Samaranayake *et al.*, 2011). MAPK ist u.a. für die Induktion des Phagozytose-Gen-Programms zuständig, welches die *Toll like* Rezeptoren bei der bakteriellen Phagozytose in den murinen und humanen Makrophagen aktiviert (Doyle *et al.*, 2004). MAPK wurde ebenfalls als ein notwendiges Protein für die Phagozytose und Phagosomenreifung bei der Untersuchung von dem gram-negativen Bakterium *Brucella abortus* festgestellt (Zhang *et al.*, 2012).

PHP 2 wurde zusätzlich in weiteren Zellkompartimenten wie MAC und Cytoproct während der gesamten Cyclose nachgewiesen (s. Abb. 32). Dieses kann ein Hinweis darauf sein, dass PHP 2 nicht ausschließlich an der Phagozytose beteiligt ist, sondern evtl. auch diverse Phagozytose-abhängige bzw. mögliche Autophagieprozesse reguliert.

Um zu einer eindeutigen Aussage zu kommen, müssten die entsprechenden Gene herunterreguliert oder ausgeschaltet werden, um über die Suche nach entsprechenden Mutanten einen veränderten Phänotypen zu identifizieren. Auch hier stimmen die Ergebnisse der GFP-tagging Methode nur teilweise mit den MudPIT-Analysen überein. Eine intensive Fluoreszenz zum Zeitpunkt **60 min** im Bereich des **MACs** und **ER**, die ebenfalls beim Protein PHP 1 beobachtet wurde, korreliert sehr gut mit den Ergebnissen der qPCR-Analyse. Hier wurde ebenfalls die höchste Expressionsrate zum Zeitpunkt 60 min beobachtet. Bei allen weiteren untersuchten Zeitpunkten besteht wie bei PHP 1 keine direkte Korrelation zwischen mRNA-Menge und Protein. Es besteht zusätzlich zu oben beschriebenen Faktoren auch die Möglichkeit, dass PHP 1 und PHP 2 posttranslational reguliert werden und daher keine Korrelation zum Protein aufweisen (Vogel & Marcotte, 2012). Weitere Analysen sollten diese Annahme überprüfen.

Die Ergebnisse der GFP Untersuchung vom **14-3-3-Protein** zeigen seine Assoziation mit verschiedenen Zellkompartimenten im Verlauf der Phagozytose (s. Abb. 30 und Abb. 32). Die Anwesenheit des Proteins am Phagosom während der Zeitpunkte 30 sek und 5 min (weniger intensiv) sowie 120 min spiegelt seine regulatorische Rolle beim Phagosomenreifungsprozess wieder. Das Protein wurde bereits von Jacobs *et al.* (2006) bei der Phagosomen-Proteom-

Untersuchung als phagosomales Protein identifiziert. Die Aufgabe solcher Proteine ist es, zahlreiche Prozesse wie Signaltransduktion- und andere metabolische Prozesse sowie die Funktion der Ionenkanäle zu regulieren (Wurtele *et al.*, 2003; Moorhead *et al.*, 1999; Bunney *et al.*, 2001; Roberts, 2000; Zhao *et al.*, 1999; Madinger *et al.*, 2010;). Hier sollte die genaue Lokalisation von 14-3-3 in Abhängigkeit von den Stadien festgestellt werden.

Das 14-3-3-Protein wurde im Rahmen der Basalkörper-Proteom-Untersuchung von Kilburn *et al.* (2007) als ein neues Basalkörperprotein nachgewiesen. Basalkörper weisen eine hochkonservierte Struktur auf. Sie besteht aus einer Core-Struktur, die aus neun symmetrisch angeordneten Triplets von Mikrotubuli aufgebaut werden. In *T. thermophila* befinden sich die Basalkörper in kortikalen Reihen an der Pellicula und im Oralapparat. Der Nachweis des Proteins in den Bereichen wie Oralapparat, Cytoproct (in Basalkörper) und am Phagosom (zu den Zeitpunkten 30 sek, 5 min und 120 min), welches entlang der Mikrotubuli zum Cytoproct transportiert wird, spiegelt seine multiregulatorische Phagozytose-abhängige Aufgabe im gesamten Cyclose-Verlauf sehr gut wieder. Eine Funktion von 14-3-3 könnte demnach Regulation der Mikrotubuli sein und somit der Transport von Zellorganellen, hier Phagosom, anhand von Mikrotubuli in der Zelle (s. Abb. 32). Da auch das Phagosom während der Cyclose seine Position in relativ vorgegebener Bahn verändert, um vom Oralapparat zum Cytoproct zu gelangen, ist die Ausbildung bzw. Aufrechterhaltung der notwendigen Cytoskelett-Elemente eine Bedingung. Das γ -Tubulin-Gen im Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) in *T. thermophila* spielt eine essentielle Rolle in den Nukleationsprozessen der Mikrotubuli (Shang *et al.*, 2002b), die einem ständigem Auf- und Abbau (dynamische Instabilität) ausgesetzt sind (Cassimeris *et al.*, 1994). Damit also der Transport des Phagosoms oder von Vesikeln, die mit dem Phagosom verschmelzen, während der Cyclose gewährleistet wird, müssen die Mikrotubuli ständig aufgebaut werden, was möglicherweise durch das 14-3-3-Protein im MTOC reguliert wird. Diese Annahme wird bestätigt durch die Fluoreszenz in den Basalkörpern, von denen aus ebenfalls ständig Mikrotubuli gerichtet gebildet werden. Hier findet man zunächst eine Markierung in den nascenten Phagosomen. Nach 5 min kann die Fluoreszenz sowohl am kondensierten Phagosom als auch im Oralapparat, welcher ebenfalls Basalkörper enthält, beobachtet werden. Im weiteren Verlauf (10 bis 60 min) verschwindet die Markierung am Phagosom und kann erst wieder nach 120 min, zum Ende der Cyclose, am Cytoproct beobachtet werden.

Die Untersuchung des 14-3-3-GFP-Fusionsproteins **bestätigt, mit einer Ausnahme zum Zeitpunkt 10 min (Czora, 2014)**, die **MudPIT-Ergebnisse** in Hinblick auf **stadienspezifische** Phagosomen-Assoziation zu den Zeitpunkten 30 sek und 5 min. Es sei darauf hingewiesen, dass zum Zeitpunkt 10 min keine eindeutige Fluoreszenz um die phagosomale Membran festgestellt werden konnte, was vermutlich daran liegt, dass das Protein in geringen Mengen vorliegt und sich nicht von den anderen Zellkompartimenten (die gesamte Zelle zeigt intensive Fluoreszenz) abgrenzen lässt.

Ebenso ist zu beachten, dass die bei einigen GFP-Fusionsproteinnachweisen festgestellte Hintergrundfluoreszenz auf ein unspezifisches Rauschen deutet, was bei zahlreichen Analysen bekannt ist, aber zurzeit methodisch nur schwer zu verhindern ist.

Durch GFP-Fusionsproteinkonstrukte konnte bereits für einige phagosomale Proteine wie VPS 13, Cathepsine, Tpp-Proteine, Rabs die Phagosomen-Assoziation gezeigt werden (Samaranayake *et al.*, 2011; Jacobs *et al.*, 2006; Bright *et al.*, 2010). Die Phagosomen-Assoziation konnte ebenfalls in der vorliegenden Arbeit für alle vier untersuchten Proteine erfolgreich nachgewiesen werden.

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der vorausgehenden qPCR-Analyse diskutiert.

5.2. Relative Quantifizierung ausgewählter Proteine mittels qPCR

Aufgrund der vorausgehenden MudPIT-Untersuchung wurden ausgewählte Proteine mittels der qPCR-Methode in Hinblick auf die stadienspezifische, Phagozytose-abhängige Genexpression untersucht. Die dabei erlangten Ergebnisse sollten ergänzend zum auf der Proteinebene gewonnenen MudPIT-Nachweis Phagozytose-relevante Prozesse auf dem mRNA-Level aufzeigen.

Insgesamt konnte beim mRNA-basierten Nachweisverfahren eine **Phagozytose-abhängige Expression** für die Proteine **VPS 13** und **SNARE** bestätigt werden, wohingegen die Gene der Proteine **PHP 1** und **PHP 2** zwar exprimiert wurden, aber erstaunlicherweise nach induzierter Phagozytose keine erhöhte Genexpression messbar war. Eine Beurteilung der qPCR-Ergebnisse für die Gene PHP 1, PHP 2 sowie SNARE wurde bereits im vorausgehenden Abschnitt im Vergleich zu dem GFP-Nachweis durchgeführt (s. Kap. 5.1.). Im Folgenden werden die Kriterien der Auswahl des VPS 13-Gens diskutiert, um anschließend auf die Ergebnisse der qPCR-Untersuchung zur Stadienspezifität mit den vorausgehenden Resultaten der MudPIT-Analyse einzugehen.

Die Auswahl der Proteine für eine weitere Überprüfung mittels relativer Quantifizierung erfolgte nach sorgfältiger Überlegung unter Einbezug der Ergebnisse von Kathrin Czora (2014) sowie der Arbeitsgruppe Jacobs (2006). Aufgrund der vorausgehenden Untersuchung mittels MudPIT und der anschließenden funktionellen Zuordnung zu den Proteingruppen wurde das Protein VPS 13, welches bereits durch GFP-*knock-out*-Untersuchungen von Samaranyake *et al.* (2011) als Phagozytose-relevantes Protein gezeigt wurde, ausgewählt. Da dieses Protein auch in vorliegender Arbeit identifiziert werden konnte, eine relative Quantifizierung der entsprechenden mRNA nach Phagozytose-Induktion bisher aber nicht erfolgt war, erschien die quantitative Bestimmung vielversprechend. Das Expressionsprofil des **VPS 13**-Gens zeigt eine variierende, **erhöhte mRNA-Expression** zu den Zeitpunkten 5, 10, 60 und 120 min, normiert auf das Haushaltsgen SSU rRNA (s. Abb. 21 A). Die maximale mRNA-Expression wurde dabei zu den Zeitpunkten 10 min (1,51 fach) und 120 min (1,53 fach) beobachtet. Die erhöhte Expression der mRNA zu den Zeitpunkten 5 min und 10 min korreliert sehr gut mit dem Prozess der Phagosomenreifung ab dem 5 min-Stadium. In diesem Stadium wird der Phagosomeninhalt angesäuert (pH=5,5-6) (Nilsson, 1977; Smith-Sommerville, 1989) - vermutlich durch vakuoläre ATPasen, die vesikulär in der Zelle vorliegen. Das VPS 13-Protein könnte dabei die Fusion der vakuolären ATPasen mit der

phagosomalen Membran regulieren. Außerdem konnten in vorausgehenden Studien durch ultrastrukturelle Untersuchungen eine Vielzahl von Vesikeln um das Phagosom sowie Ausstülpungen der phagosomalen Membran im 5 min Stadium festgestellt werden (Nilsson, 1972), die auf eine dynamische Vesikelfusion deuten. Vermutlich zeigen die hohen Expressionsprofile (**5 min** und **10 min**) ebenfalls, dass vermehrt VPS 13-Proteine für das nächste „Reifungsstadium“ translatiert werden, damit sie Fusionsprozesse zwischen Phagosom und Lysosomen regulieren können.

Das niedrige mRNA Expressionsprofil zum Zeitpunkt **30 min** könnte darauf deuten, dass in diesem Stadium vermehrt VPS 13 benötigt wird; daher wird es schnell im rauen ER translatiert und ist als Protein am Phagosom und nicht wie in den hier vorliegenden Ergebnissen als mRNA über qPCR nachweisbar (s. Abb. 21 A). In diesem Stadium des Phagozytosezyklus, als Halo-Stadium bezeichnet, wurde eine morphologische Veränderung im Phagosom festgestellt. Das ingestierte Material ist stark konzentriert und liegt im Zentrum des Phagosoms vor. Zusätzlich ist es durch einen deutlich erkennbaren Hof von der umgebenden phagosomalen Membran abgegrenzt (Elliot & Clemmons, 1966; Baumert *et al.*, 1998). Nach ca. **30 min** nimmt die Aktivität der lysosomalen Enzyme stark zu (Elliot & Clemmons, 1966; Nilsson, 1976; Vosskübler, 1994). Durch Fusionsprozesse mit Lysosomen bildet sich das Phagolysosom, dessen Inhalt die niedrigsten pH-Werte (pH: 3,5-5,0) im gesamten Phagozytoseprozess zeigt (Nilsson, 1977; Smith-Sommerville, 1989). Zahlreiche Ausstülpungen der phagosomalen Membran konnten in vorausgehenden Studien zu diesem Zeitpunkt beobachtet werden (Elliot & Clemmons, 1966; Nilsson, 1979; Baumert, 1992), die auf eine mögliche Resorption der verdauten Makromoleküle deuten.

Das Expressionsprofil zum Zeitpunkt **60 min** zeigt die maximale Expression (1,53 fach; s. Abb. 21 A) im gesamten Ansatz. Wahrscheinlich deutet die hohe mRNA-Menge auf die noch stattfindenden Fusionsprozesse mit den Lysosomen bzw. die Resorption der Nährstoffe, die vesikulär ins Cytoplasma abgegeben werden.

Phagosomen, die kurz vor der Fusion mit dem Cytoproct stehen (Zeitpunkt: ab 90 min), weisen wieder einen neutralen pH-Wert auf (Smith-Sommerville, 1989; Vosskübler, 1994; Baumert *et al.*, 1998). Das entsprechende mRNA-Expressionsprofil zum Zeitpunkt **120 min** (1,3 fach) ist vermutlich auf die Fusionsprozesse zurückzuführen, die kurz vor der Exozytose am Phagosom stattfinden.

Vorausgehende Studien in Organismen wie *Saccharomyces cerevisiae* und *T. thermophila* zeigen, dass VPS 13 die Vesikeltransportprozesse im Verlauf der Phagozytose steuert und somit direkt an der Bildung und Reifung des Phagosoms beteiligt ist (Brickner & Fuller, 1997; Luo & Chang, 1997; Park & Neiman, 2012; Samaranyake *et al.*, 2011). In *S. cerevisiae* reguliert VPS 13 den Proteintransport vom Golgi-Apparat zur Vakuole sowie die Membranamorphogenese während des Sporulationsprozesses, indem es mit den Phosphatidyl-Inositol-Phosphaten in der Membran interagiert (Park & Neiman, 2012).

Samaranyake *et al.* (2011), deren Fokus auf der Analyse des Phagosomenreifungsprozesses (Zeitstadien 20 bis 120 min) in *T. thermophila* lag, konnten das VPS 13-Protein in der phagosomalen Membran während der Phagolysosomen-Biogenese nachweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte über MudPIT die Beteiligung bereits in der frühen Bildung bei 30 sek alten Phagosomen nachgewiesen werden. Anscheinend spielt VPS 13 bereits bei der Ausbildung der Phagosomen eine Rolle im Vesikeltransport. In weiteren Untersuchungen mit GFP-*knock-out*-Techniken zeigten die Mutanten teilweise einen Defekt in der Phagosomenbildung und –reifung sowie einen zeitverzögerten Phagozytose-Verlauf, was zur Annahme führt, dass noch weitere VPS-Proteine in *T. thermophila* anwesend sind (Samaranyake *et al.*, 2011). Die Anwesenheit des VPS 13-Proteins in den nascenten Phagosomen, dessen Funktion in der Regulation von richtiger Verteilung und Verschmelzung der Vesikel besteht, würde bedeuten, dass das Protein in die Phagosomenbildung für den Vesikeltransport, speziell Transport der „discoidalen“ Vesikel zum Cytostom, involviert ist. Neben den „discoidalen“ Vesikeln, die teilweise den recycelten Phagosomenmembranen entstammen, gilt auch das ER als die ursprüngliche Komponente der phagosomalen Membran (Baumert *et al.*, 1998, Garin *et al.*, 2001). Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung des ER an der Prozessierung des Phagosoms liefern die Ergebnisse der Isotopenmarkierung von murinen Makrophagen-Zellen RAW 264.7 (Rogers & Foster, 2007). In den aufgearbeiteten Latexbeads-enthaltenden Vakuolen (LBV) der murinen Makrophagen wurden nur 0,3% der gesamten zellulären ER-Markerproteine nachgewiesen, was gegen das Modell der ER-vermittelten Phagozytose mit einer Beteiligung von 20% (Gagnon *et al.*, 2002) spricht. Das bedeutet, dass das ER zwar an der Phagozytose beteiligt ist, aber nicht die Hauptmembranquelle für nascente Phagosomen sein kann.

Mit den vorausgehenden MudPIT-Ergebnissen können die Resultate der relativen Quantifizierung der VPS-Untersuchung in Hinblick auf die Stadienspezifität nur teilweise bestätigt werden. Die Phagosomen-Assoziation, die mittels der MudPIT-Analyse zum

Zeitpunkt 30 sek festgestellt wurde, konnte nicht in erhöhter Genexpression über qPCR nachgewiesen werden. Andersherum konnte keine Phagosomen-Assoziation des Proteins zum Zeitpunkt 5 min über MudPIT gezeigt werden, wohingegen eine erhöhte mRNA über qPCR festgestellt wurde. Eine mögliche Erklärung für die divergierenden Ergebnisse könnte sein, dass zu Beginn der Phagosomenbildung zwar vermehrt VPS 13 exprimiert, die mRNA aber sofort translatiert wird. Somit kann das VPS 13-Protein am Phagosom über MudPIT zwar nachgewiesen, aber nicht als mRNA über die qPCR gezeigt werden.

Das VPS 13 wurde ebenfalls von Kathrin Czora (2014) in 10 min alten Phagosomen nachgewiesen. Das in der vorliegenden Arbeit gezeigte Expressionsprofil zum Zeitpunkt 10 min korreliert wiederum sehr gut mit den MudPIT-Ergebnissen, was insgesamt zu keiner eindeutigen Aussage führt. Diese Ergebnisse sollten dementsprechend ergänzend zu den MudPIT-Nachweisen betrachtet werden.

Die Assoziation des Proteins mit dem Phagosom (Zeitpunkte 30 sek und 10 min (Czora, 2014)) bestätigt ebenfalls die Ergebnisse der vorausgehenden Untersuchungen in Hinblick auf seine Lokalisation (Jacobs *et al.*, 2006; Samaranayake *et al.*, 2011) und spiegelt seine Aufgabe als Vesikeltransport-regulierendes Protein bei der Phagosomenbildung sehr gut wider.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des VPS 13-Gens, bis auf eine Ausnahme, eine stimmige Analyse in Bezug auf die stadienspezifische, Phagozytose-abhängige Genexpression. Eine unterschiedliche Korrelation der Gene und Proteine wurde bereits in mehreren Studien und verschiedenen Organismen beschrieben und kann auf weitere regulatorische Prozesse bezüglich der mRNA hindeuten (Vogel & Marcotte, 2012). Zusätzlich könnte eine Autoregulation der Genexpression stattfinden (Haber & Adhya, 1987). Dabei wird bei genügend vorhandenem Protein die eigene Expression reprimiert. Abgesehen von den bereits beschriebenen Abweichungen in der Korrelation zwischen Gen- und Proteinlevel, stellt die quantitative *Real Time* –PCR somit eine geeignete und präzise Methode zur Analyse der Genexpression in Bezug auf den Phagozytoseprozess dar.

5.3. MudPIT-Analyse

Die MudPIT-Analyse diente als **Basis** für die weiteren Untersuchungen der phagosomalen Proteine über GFP-*tagging* und qPCR. Die Phagosomen-Assoziation zum Zeitpunkt 30 sek konnte für alle ausgewählten Proteine: PHP 1, PHP 2, SNARE und 14-3-3 über GFP-Nachweis bestätigt werden. Weiterhin konnten im Verlauf der Cyclose die bekannten und hypothetischen Funktionen der vier Proteine anhand ihrer Lokalisation in den Zellkompartimenten ermittelt bzw. bestätigt werden.

Die relative Quantifizierung der Proteine PHP 1, PHP 2, SNARE und VPS 13 mit qPCR-Methode zeigten im Cyclose-Verlauf eine teilweise Phagozytose-abhängige mRNA-Expression, die jedoch nur zum Teil mit den MudPIT-Ergebnissen in Hinblick auf die Stadienspezifität übereinstimmten. Diese Nachweise führten zur Vermutung, dass die mRNA unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen könnte und somit nicht immer direkt mit dem Proteinlevel vergleichbar, was ebenfalls in den vorausgehenden Studien bestätigt wurde.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der MudPIT-Analyse in Hinblick auf den Phagozytoseprozess diskutiert.

Mit Hilfe der sensitiven und vollautomatischen Methode MudPIT (Washburn *et al.*, 2001; s. Kap. 4.3.) wurden in der vorliegenden Arbeit 707 phagosomale Proteine in *T. thermophila* identifiziert. Im Vergleich zur vorausgehenden Phagosomen-Proteom Studie von Jacobs *et al.* (2006), die 73 phagosomale Proteine nachgewiesen haben, wird die Anzahl der Proteine deutlich überschritten, was offensichtlich an der verbesserten Methode liegt. 335 der bekannten und 372 hypothetischen Proteine konnten in Hinblick auf ihre Funktionen und - unter Berücksichtigung der Phagozytose - in ausgewählte biologische Prozesse zugeordnet werden.

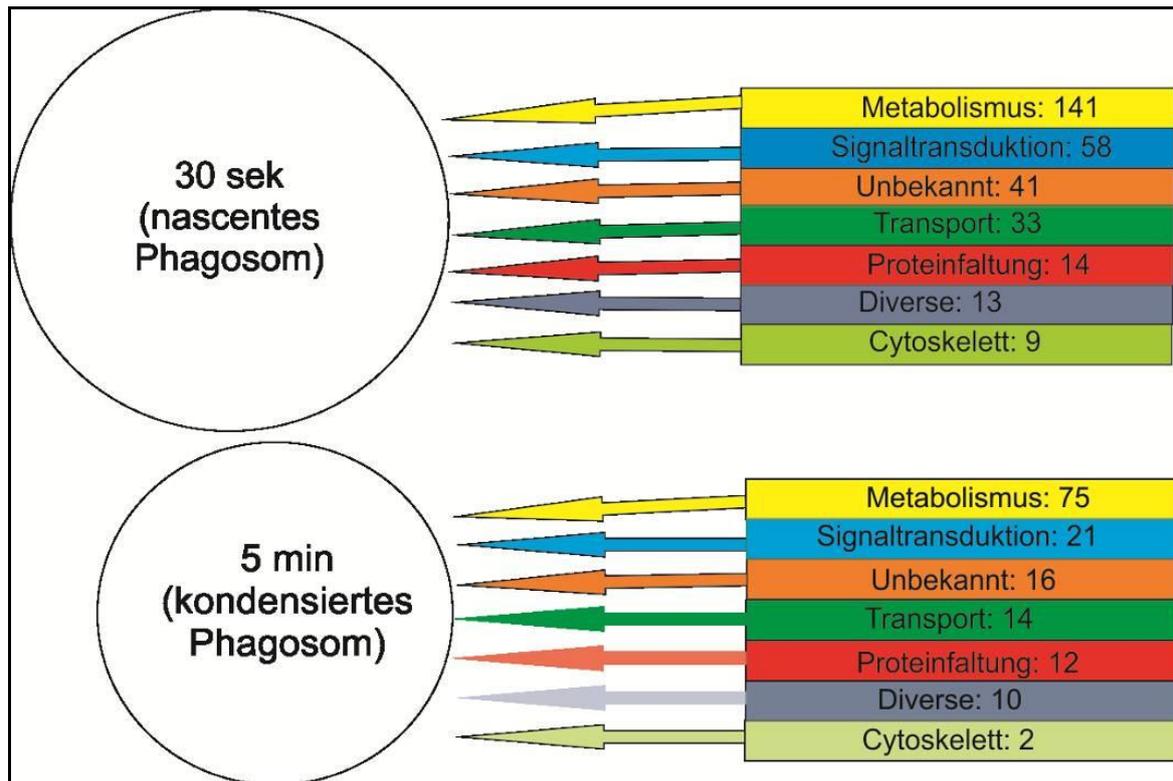


Abb. 33: Zuordnung von bekannten Proteinen in Hinblick auf die funktionelle Gruppen und Zeitstadien. Die Tabelle stellt die sieben funktionellen Gruppen (unterschiedliche Farben) sowie die Summe der identifizierten Proteine dar. Die Pfeile zeigen beispielhaft die in den jeweiligen Zeitstadien (nascent und kondensiert) identifizierten Proteine in den jeweiligen funktionellen Gruppen. Die Erklärung der einzelnen Proteingruppen im Zusammenhang zu den jeweiligen Zeitstadien in Hinblick auf den Phagozytoseprozess erfolgt im Text.

In Abb. 33 sind jeweils die **sieben** ausgewählten funktionellen Proteingruppen –bezogen auf ihre biologischen Prozesse - sowie Anzahl der Proteine in den jeweiligen Stadien in Bezug auf den Phagozytoseprozess dargestellt. Eine Beschreibung der funktionellen Gruppen, anhand ausgewählter Proteine, findet im Kap. 4.6. statt. In der Abb. 33 ist zu erkennen, dass sich die nascenten von den kondensierten Phagosomen erheblich in der **Anzahl** und **Zusammensetzung** der Proteine unterscheiden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Phagosomenbildung ein sehr komplexer Vorgang ist. So werden auch unterschiedliche Funktionen dieser Proteingruppen im Prozess der Phagosomenbildung und –reifung, der beispielhaft im folgenden Abschnitt, unter Einbezug der intensiver untersuchten phagosomalen Proteine, beschrieben wird, gezeigt.

Die Nahrung wird mit Hilfe der drei Membranellen und der undulierenden Membran in den **Cytopharynx** eingestrudelt und an dessen Ende im **Cytostom** in Form eines Phagosoms abgeschnürt. Bei *Tetrahymena* ist bisher umstritten, ob die Phagozytose durch Partikel oder unter einer Beteiligung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen ausgelöst wird. So konnte

gezeigt werden, dass Induktion durch unterschiedliche organische Stoffe (z. B. Bakterien oder magnetische Partikel) erfolgen kann (Ricketts, 1972a). Eine Inhibierung der Phagozytose durch β -Endorphin-ähnliche Substanzen (Renaud *et al.*, 1995), könnte jedoch für die Beteiligung von Rezeptoren sprechen.

Das in der vorliegenden Arbeit sowie in vorausgehenden Studien (Maicher & Tiedtke, 1999; Jacobs *et al.*, 2006) identifizierte Protein **PHP 2 (p38)**, welches zu den Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK, Proteingruppe: **Signaltransduktion**) gehört und sich in den nascenten Phagosomen befindet, ist sehr wahrscheinlich an der Initiierung der Phagosomenbildung beteiligt. Das Protein konnte bereits in murinen Makrophagen als ein Phagozytose-Gen-Programm-induzierendes Enzym nachgewiesen werden und spielt auch in *Tetrahymena* beim sehr basalen Prozess der Phagozytose vermutlich eine ähnliche Rolle (Doyle *et al.*, 2004). Auch wenn murine Makrophagen und *Tetrahymena* auf den ersten Blick nicht viel gemeinsam haben, da letzterer als Einzeller zu den Alveolaten gehört, während Makrophagen aus den Opisthokonta entnommen wurden (Adl *et al.* 2012), so ist doch der Ablauf der Phagozytose wahrscheinlich bereits früh in der Entwicklung der Eukaryoten etabliert worden. In seinen, die Initiierung der Phagosomenbildung auslösenden Proteinen, sind offensichtlich konservierte Strukturen vorhanden, sodass hier mutmaßlich homologe Proteine vorliegen.

Im Oralapparat befinden sich cytoskelettale Filamente, sogenannte *deep fiber*, welche sich von der Basis des Oralapparats bis zum Cytoplasma erstrecken und so als Vesikel-Bahn fungieren. In diesen *deep fibers* befinden sich **Aktin**, **Calmodulin** und **Ca²⁺/Calmodulin**-bindende Enzyme, welche zusammen eine signifikante Rolle in der Phagosomenbiogenese spielen (Maicher & Tiedtke, 1999; Vosskübler & Tiedtke, 1993; Gonda *et al.*, 1999, 2000). Diese Proteine wurden in der vorliegenden Arbeit überwiegend in nascenten Phagosomen nachgewiesen und sind sehr wahrscheinlich in die Phagosomenbildung involviert.

Das in allen Stadien identifizierte und aufgrund seiner **möglichen**, multiregulatorischen Aufgaben zu den **unbekannten** Proteinen (wieder in Bezug auf die biologischen Prozesse) zugeordnete, **14-3-3**-Protein wurde bereits als ein Phagozytose notwendiges Protein im Rahmen einer Untersuchung mit *Drosophila melanogaster* erkannt (Shandala *et al.*, 2013). Dabei wurde festgestellt, dass eine Inaktivierung des Proteins unter Verwendung von 14-3-3-e-Mutanten, nach einer Fütterung mit *E. coli*, teilweise zu keiner Abschnürung und Prozessierung (zu Phagolysosom) des Phagosoms führte. Eine unvollständige Inaktivierung

der Phagosomenbildung und -reifung zeigt auch, dass weitere Isoformen des 14-3-3-Proteins in die Phagozytose involviert sein könnten. Das 14-3-3 scheint somit ein „altes, konserviertes“ Protein zu sein, das auch in höheren Organismen vorkommt und dort, wie auch in *Tetrahymena*, an der Phagosomenbildung und auch -reifung beteiligt ist. In den GFP-Nachweisen zu den Zeitpunkten 30 sek bis 10 min konnte das Protein am Phagosom nachgewiesen werden.

Da die Bildung des Phagosoms eine große Menge an Membran benötigt, die vermutlich aus discoidalen Vesikeln sowie aus dem ER stammen, werden die Vesikel im Zuge der Phagosomenbildung zum Cytostom transportiert und fusionieren dort mit „wachsendem“ Phagosom. Dabei könnte das in den 30 sek alten Phagosomen nachgewiesene **SNARE**-Protein diese Fusionsprozesse am Cytostom regulieren (Tooze *et al.*, 2001; Jacobs *et al.*, 2006; Kienle *et al.*, 2009; Plattner, 2010). Das **VPS 13**-Protein, welches ebenfalls in den nascenten Phagosomen nachgewiesen wurde, ist vermutlich an Vesikeltransportprozessen bei der Phagosomenbildung regulierend tätig. Dieser Membrantransport könnte durch die Rab-Proteine (Rab 62 und Rab 6 C) bewerkstelligt werden, die hier über MudPIT ausschließlich in nascenten Phagosomen nachgewiesen wurden.

Die überwiegend in den nascenten Phagosomen identifizierten Proteine Rabs, VPS 13 und SNARE zeigen sehr gut ihre mögliche Rolle in der Phagosomenbildung und zahlreichen Membran- und Vesikelfusionsprozessen, die in diesem Phagosomenstadium stattfinden.

Das in den nascenten Phagosomen befindende Protein **PHP 1**, welches eine PEF-C-Archaea-Domäne besitzt, die bei einigen prokaryotischen C-terminalen Protein-*sorting*-Signalproteinen (Francoleon *et al.*, 2009; Haft *et al.*, 2012) identifiziert wurde, könnte als Prozessierungs-Enzym ebenfalls an der Bildung und Reifung des Phagosoms beteiligt sein.

Die Bewegung der Phagosomen erfolgt entlang der **Mikrotubuli**-Bündel und Aktinfilamente, die sich vom Cytostom zum Cytoproct erstrecken (Allen, 1988) unter Beteiligung von einem Aktin-basierten Myosin-Motor (Wilkes & Otto, 2003; Williams *et al.*, 2006; Hosein *et al.*, 2005). Die Mikrotubuli und Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) Dynein sowie sein Cofaktor Dynaktin sind mit der phagosomalen Membran assoziiert (Habermann *et al.*, 2001). Aus diesem Grund sind die Tubuline **ATU 1** (α -Tubulin) und **BTU 1** (β -Tubulin) am Phagosom nachweisbar.

Viele, in dieser Arbeit, bereits beschriebenen Signaltransduktions-, Membrantransport- sowie multiregulatorischen (unbekannten zugeordnete) Proteine, die mittels MudPIT identifiziert wurden, sind vermutlich an der weiteren Phagosomenprozessierung beteiligt. Die Phagosomen werden im weiteren Verlauf der Cyclose (von nascenten zu kondensierten Phagosomen) vielfach modifiziert, dabei wird der Phagosomeninhalt zunächst angesäuert (Nilsson, 1972b; Smith-Somerville, 1989). Die in der vorliegenden Arbeit sowie in der Jacobs-Studie (Jacobs *et al.*, 2006) nachgewiesenen vakuolären ATPasen VMA 8 und VMA 10 sind höchstwahrscheinlich an der Ansäuerung des Phagosomeninhalts beteiligt. In der Abb. 33 ist deutlich zu erkennen, dass für die anschließenden Prozessierungsschritte (30 sek bis 5 min) insgesamt erheblich weniger Proteine benötigt werden. So ist der Anteil der Transportproteine wie **v-ATPasen** oder **ABC-Transporter** im Vergleich zu den nascenten Phagosomen ebenfalls geringer.

Das **PHP 2**-Protein, welches zusätzlich zu den nascenten auch in kondensierten Phagosomen nachgewiesen wurde, könnte in diesem Stadium bestimmte, parallel zur Phagozytose stattfindende, Autophagieprozesse regulieren. Dabei könnte das **PHP 2**-Protein die Phagosomenreifung steuern, indem nicht mehr benötigte Proteine an der phagosomalen Membran abgebaut werden. Der geringe Anteil an metabolischen sowie Signaltransduktionsproteinen im kondensierten Phagosom zeigt, dass das kondensierte – im Gegensatz zum nascenten Phagosom - nur noch wenigen Veränderungen ausgesetzt wird und dass vermutlich überwiegend die Degradation des Phagosomeninhalts sowie Phagosomentransport zum Cytoproct stattfinden. Im weiteren Verlauf der Cyclose fusionieren die Phagosomen mit den Lysosomen (Elliott & Clemmons, 1966; Nilsson, 1976; Voßkübler, 1994). Anschließend erfolgt die Fusion der Phagosomenmembran mit der Plasmamembran des Cytoprocts, dabei wird eine Fusionspore gebildet, die durch ihre Vergrößerung den Inhalt des Phagosoms freisetzt (Tiedtke *et al.*, 1988). Am Ende wird die phagosomale Membran recycelt (Allen & Wolf, 1979).

5.3.1. Stadienspezifische phagosomale Proteine

Der Reifungsprozess der Phagosomen lässt sich bekanntlich in einzelne Zeitstadien gliedern. So ist die Funktion der identifizierten, stadienspezifischen, phagosomalen Proteine von diesen Reifungsprozessen abhängig. Im Folgenden werden einzelnen, den biologischen Prozessen zugeordneten, Proteingruppen in Bezug auf die Phagozytose diskutiert und mit vorausgehenden Studien verglichen.

5.3.1.1. Metabolismus

Bei der Proteom-Analyse in vorliegender Arbeit fällt der größte Anteil an Stoffwechselbeteiligten Proteinen auf, die ebenfalls in großen Mengen in vorausgehenden Studien an diversen Organismen wie *Leptospira interrogans* (Malmstrom *et al.*, 2009), *Plasmodium berghei* (Lal *et al.*, 2009), *S. cerevisiae* (Picotti *et al.*, 2009), Maus (Schwanhausser *et al.*, 2011) und Menschen (Beck *et al.*, 2011) nachgewiesen wurden. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei anderen Studien um das gesamte Proteom handelt und nicht wie in der vorliegenden Arbeit eine stadienspezifische Untersuchung des Phagosoms stattgefunden hat. Es wurden insgesamt 153 metabolische Proteine nachgewiesen. Der Anteil setzt sich aus 141 Proteinen der nascenten und 75 Proteinen der kondensierten Phagosomen zusammen. Das bedeutet, dass nach der Phagosomenbildung (von 30 sek bis 5 min) ungefähr die Hälfte der ursprünglichen Stoffwechsel-Proteine in der phagosomalen Membran bzw. im Phagosom verbleiben und in weitere Phagosomenprozessierungsschritte involviert sein können.

Überraschenderweise findet man einige lysosomale Enzyme in nascenten Phagosomen, insbesondere Cathepsine und Phospholipase A1 (Turk *et al.*, 2001; Eskelinen *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2000), die erst in späteren Stadien des Phagozytoseprozesses zu erwarten wären. Diese lysosomalen Enzyme befinden sich in kleinen Vesikeln, werden konstitutiv sekretiert und dienen u. a. der intrazellulären Verdauung. Der hier erfolgte Nachweis von mindestens elf verschiedenen lysosomalen Cystein- und Serin-Proteasen zeigt eine mögliche Rolle dieser Enzyme in der Degradation der nicht mehr benötigten Proteine bzw. Peptide an, nachdem das Phagosom abgeschnürt wurde. Die ausschließlich in den nascenten Phagosomen identifizierten Cystein-Proteasen (Papain-Familie: **CTH 72**, **CTH 90** und **Peptidase C 13**), sowie weitere, auch in 10 min alten Phagosomen identifizierte (Czora, 2014) Proteasen mit

der *Tetrahymena* Gene ID: 103.m00129, 125.m00080, 88.m00155, 5.m00542, 92.m00126, 13.m00464 stimmen mit den Ergebnissen der Jacobs-Studie überein (Jacobs *et al.*, 2006). Diese Proteasen könnten an der Beseitigung bzw. Inaktivierung von nicht mehr benötigten Proteinen im Zuge der Phagosomenprozessierung beteiligt sein. Weitere Cystein-Proteasen der Calpain-Familie, die in beiden phagosomalen Stadien nachgewiesen wurden, könnten ebenfalls diese Prozesseiraufgaben an der phagosomalen Membran und im Phagosom übernehmen.

Signalpeptid-Peptidasen wie die *sohB-related-Protease*, die zur Familie der Signalpeptid-Peptidasen gehört, regulieren die Spaltung und das Beseitigen der Signalpeptide bei Präproproteinen in *E. coli* (Ichihara *et al.*, 1984; Novak & Dev, 1988). Sie könnten hier an der Verschmelzung von (mit Signalpeptiden ausgerüsteten) Vesikeln und frühen Phagosomen beteiligt sein, indem sie nach erfolgter Fusion die Signalpeptide abspalten.

Unter den elf charakteristischen Ubiquitin-Proteinen im 30 sek Stadium stimmt ein Protein (*Tetrahymena* Gene ID:35.m00294) mit den Ergebnissen von Jacobs *et al.* (2006) überein. Weiterhin konnte ebenfalls in vorausgehenden Studien eine Phagosomen-Assoziation der Ubiquitine und Ubiquitin-ähnlicher Proteine gezeigt werden (Garin *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005). Somit scheinen die Ubiquitine eine wichtige Rolle in Bildungs – und -reifungsprozessen der Phagosomen zu spielen.

Die beiden Untereinheiten des 26 S-Proteasoms, welches sich im Cytoplasma befindet, wurden in unterschiedlichen Stadien der Phagozytose nachgewiesen. Dieses spricht dafür, dass der Abbau von nicht mehr benötigten Proteinen direkt am Phagosom stattfinden könnte, indem die Untereinheiten des Proteasom eine transiente Assoziation mit dem Phagosom bilden, die Proteine abbauen und dann wieder dissoziieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier identifizierten metabolischen Proteine, eine wichtige Rolle bei der Prozessierung des Phagosoms spielen können. Dabei könnten die auf der Phagosomenmembran befindenden Proteine durch die im Cytoplasma vorhandenen lysosomalen Enzyme abgebaut und somit deaktiviert werden. Die überwiegend in den nascenten Phagosomen identifizierten Ubiquitine, deren phagosomale Assoziation bereits in den murinen Makrophagen nachgewiesen wurde (Lee *et al.*, 2005), könnten ebenfalls die Prozesse der Phagosomenbildung und –reifung durch Degradation nicht mehr benötigter Proteine steuern.

5.3.1.2. Signaltransduktion

Die zweite große Gruppe der identifizierten Proteine bilden die **Signalproteine**, die hier ca. **17%** aller identifizierten Proteine ausmachen, während Gotthardt *et al.* (2006), über 2D + ESI-Q-TOF/MS mit 9%, nur einen geringeren Anteil ausmachen konnten. Eine gute Erklärungsmöglichkeit liegt darin, dass sich unter den hier identifizierten Proteinen viele bekannte *second messenger* wie cAMP bzw. Calcium-abhängige Proteine sowie zahlreiche Protein-Kinasen finden, die nur in geringen Mengen vorkommen und daher erst mit sensitiveren Methoden wie MudPIT nachweisbar waren.

Viele *Pathways* der phagozytotischen Signaltransduktion, inklusive der Aktivierung von Tyrosin-Kinasen oder Serin/Threonin-Kinase C sowie monomere GTPasen der Rho und ARF Familien, die durch diverse Modellierungsprozesse die Ingestion der Partikel beeinflussen, sind bisher bekannt (Kwiatkowska & Sobota, 1999). So bestätigen auch die hier über MudPIT-Analysen identifizierten **59 unterschiedlichen** Signaltransduktionsproteine (**58** in **nascenten** und **21** in **kondensierten** Phagosomen) die Komplexität und die Vielfalt des Phagozytoseprozesses, insbesondere die Phagosomenbildung. In diesem ersten Schritt der Phagozytose müssen viele Proteine aktiviert werden. Ihre Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung unter ATP-Hydrolyse, was ein sehr wichtiger posttranslatiionaler Mechanismus zur Kontrolle der Signaltransduktion ist. Möglicherweise werden dabei die Proteine für die Abschnürung des Phagosoms aktiviert. Unter den **32 ausschließlich** in den nascenten Phagosomen nachgewiesenen Signaltransduktionsproteinen konnten 16 stadienspezifische Protein-Kinasen ermittelt werden. Diese könnten durch 15 spezifische *second messenger* wie cAMP und Ca²⁺-Ionen/Calmodulin, die eine Schlüsselrolle bei der Phagosomenbildung spielen (Gonda *et al.*, 2000), während der Cyclose reguliert werden.

Beim **PHP 2**-Protein, welches bereits von Maicher & Tiedtke (1999) sowie Jacobs *et al.* (2006) am Phagosom über 2 D-Gelelektrophorese bzw. nano-LC-MS/MS nachgewiesen wurde, handelt es sich um eine Mitogen-aktivierte Protein-Kinase, die u. a. Autophagieprozesse in der Zelle steuert (Akematsu *et al.*, 2014). Ein Zusammenhang zwischen Phagozytose und Autophagie ist durchaus möglich wie bereits in murinen Makrophagen gezeigt werden konnte (Bonilla *et al.*, 2013). Da die stadienspezifische Rolle des PHP 2-Proteins im Phagozytoseprozess bisher unbekannt ist, eignet sich das Protein sehr gut für weitere molekularbiologische Untersuchungen.

5.3.1.3. Unbekannte biologische Prozesse

Einen relativ großen Anteil von 14% (46 Proteine) bilden Proteine, die sich aufgrund der unbekanntem bzw. vielschichtigen möglichen Funktionen nicht in das hier verwendete Schema eingliedern ließen. Dazu gehören einige, die bereits in vorausgehenden Analysen als phagosomale Proteine postuliert wurden (Jacobs *et al.*, 2006) und durch die hier vorliegenden, erstmalig auch stadienspezifischen, Ergebnisse bestätigt wurden. Weiterhin wurden **neue** Proteine identifiziert, die eine wichtige Funktion im Phagozytoseprozess einnehmen könnten.

Von insgesamt 46 Proteinen dieser Gruppe wurden 41 in nascenten und 16 in kondensierten Phagosomen nachgewiesen.

Das 14-3-3-Protein, dessen genaue Rolle im Phagozytoseprozess bisher unbekannt ist, konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl in nascenten als auch kondensierten Phagosomen identifiziert werden. Dieses Protein wurde ebenfalls in vorausgehenden Studien in *T. thermophila* Phagosom (Jacobs *et al.*, 2006) sowie murinen Makrophagen (Garin *et al.*, 2001) nachgewiesen. Kilburn *et al.* (2007) konnte im Rahmen der Basalkörperproteom-Analyse ebenfalls das 14-3-3-Protein identifizieren, was seine multiregulatorische Rolle unterstreicht. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass das 14-3-3-Protein die Exozytose von sekretorischen Vesikeln, durch Reorganisation von kortikalem Aktin und unter Einfluss von Annexin II, reguliert (Roth *et al.*, 1993). Eine weitere hypothetische Funktion des Proteins kann durch die hier erfolgte GFP-Markierung des Proteins nach Phagozytose-Induktion aufgestellt werden. Demnach könnte das 14-3-3-Protein in die Regulierung der Tubuline involviert sein und somit den Transport des Phagosoms vom Cytostom zum Cytoproct gewährleisten (ausführliche Beschreibung, s. Kap. 5.1.).

Es wurden drei LRR-Domäne-Proteine sowohl in nascenten als auch kondensierten Phagosomen nachgewiesen, die bekannt für Protein-Protein-Interaktionen sind. Bei den LRR-Domäne-Proteinen handelt es sich um eine evolutionär konservierte Gen-Familie, die eine wichtige Rolle in der Funktion des tierischen Immunsystems spielt (Martinon *et al.*, 2009; Ogura *et al.*, 2006; Ting & Davis, 2005; Jha & Ting, 2009). LRR-Domäne-Proteine sind für das schnelle Aufspüren der Pathogen-assoziierten molekularen Muster (*pathogen-associated molecular patterns* = **PAMPs**) wie Bakterienwand-Komponenten, Lipoproteine, Flagellin oder bakterielle und virale Nukleinsäuren zuständig (Amer *et al.*, 2006; Franchi *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2007; Kanneganti *et al.*, 2006; Muruve *et al.*, 2008). In Bezug auf *Tetrahymena* erscheint das Vorkommen recht ungewöhnlich, da diese Einzeller relativ

unspezifisch alles phagozytieren, was man ihnen anbietet und somit keine molekulare Muster-Erkennung zur Phagozytose zu benötigen scheinen. Aufgrund ihrer Bedeutung im Immunsystem sollten diese Proteine in nachfolgenden Arbeiten noch einmal stärker auf ihre Funktion hin untersucht werden.

Die konservierte Region der hier gefundenen **SPFH/Band 7**-Proteine (in nascenten und kondensierten Phagosomen) gleicht der Proteinfamilie der **Stomatine**, welche auf der Zellmembran der Erythrozyten lokalisiert sind und dort Ionenkanäle und Transport-Proteine regulieren (Lapatsina *et al.*, 2012). Diese Region gleicht ebenfalls den **Flotillin**-Proteinen, die Calveolae-assoziierte Membranproteine kodieren und deren genaue Funktion bisher unbekannt bleibt (Bickel *et al.*, 1997). Aus diesem Grund sollten die genauen Aufgaben der SPFH/Band 7-Domäne-Proteine in weiteren Studien gezielt in Bezug auf die Phagozytose analysiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt neun TPR-Domäne-Proteine nachgewiesen werden. Davon waren sechs in nascenten und drei in kondensierten Phagosomen zu finden. Aufgrund von zwei antiparallelen α -Helices im TRP Sequenzmotiv (Das *et al.*, 1998) sind die **TPR**-Domäne-Proteine in der Lage, Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln (Blatch & Lassel, 1999), was als eine für Phagosomen, während der Verschmelzung, sinnvolle Funktion erscheint. Möglicherweise sind Interaktionen dieser Proteine mit anderen endozytotischen Vesikeln für die Phagosomenreifung verantwortlich.

Der große Anteil an unbekanntem, phagosomalen Proteinen, die überwiegend in nascenten Phagosomen nachgewiesen wurden, zeigt, dass viele verschiedene Proteine an der Phagosomenbildung beteiligt sind und weitere – zahlenmäßig weniger - Proteine der kondensierten Phagosomen in Reifungsprozessen involviert sind. Weiterführende Analysen der hier vorliegenden Proteine könnten neue Einblicke in die Phagozytose eröffnen.

5.3.1.4. Transport

Die **Transportproteine** weisen mit in der vorliegenden Arbeit 11% und bei Gotthardt *et al.* (2006) mit 9% vergleichbare Mengenanteile der Gesamtproteine auf. Sie reflektieren die Fähigkeit der Proteine, bestimmte Moleküle in bzw. aus dem Phagosom zu transportieren und somit bei Regulationen und Ernährungsprozessen eine wichtige Rolle zu erfüllen. Dazu gehören H^+ -ATPasen, deren Aufgabe es ist, den phagosomalen pH-Wert herabzusetzen sowie andere Ionenporter wie das mit Jacobs *et al.* (2006) übereinstimmende Protein TPA 8. Es handelt sich um eine Calcium-transportierende P-ATPase des SERCA Typs, die in nascentem (und 10 min; Czora, 2014) Phagosom nachgewiesen wurde. So ist sie sehr wahrscheinlich an der Prozessierung der Phagosomen beteiligt.

Im Vergleich zum *Paramecium multimucronucleatum* (Allen & Fok, 1983) sind keine Acidosomen bei *T. thermophila* bekannt. Dafür konnten kleine Vesikel mit Saure-Phosphatase-Aktivität in frühen Stadien beobachtet werden (Elliott, 1965; Nilsson, 1970). Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten **34** Transportproteine (**31** Proteine in **nascenten** und **14** Proteine in **kondensierten** Phagosomen), darunter v-ATPasen, P-Typ-ATPasen sowie andere Transportproteine wie ABC-Transporter, wurden teilweise in beiden Stadien nachgewiesen. **16 Transportproteine** kommen ausschließlich in den nascenten und **zwei** in kondensierten Phagosomen vor. Das phagosomale Milieu der nascenten Phagosomen könnte mit Hilfe von **fünf stadienspezifischen v-ATPasen**, wie z. B. von VMA 8 (Eisen *et al.*, 2006) oder VMA 2 (Jacobs *et al.*, 2006) angesäuert werden, deren Aufgabe es ist, Protonen ins Phagosomeninnere zu transportieren. Die in den nascenten Phagosomen identifizierten **neun P-Typ-ATPasen** sowie Ionenpumpen/Transporter modifizieren vermutlich ebenfalls das phagosomale Milieu und regeln dabei den Proteintransport in das Innere des neu gebildeten Phagosoms. Vergleichend mit der vorausgehenden Arbeit von Jacobs *et al.* (2006) konnten **vier** übereinstimmende Proteine (**34.m00342**, **48.m00253**, **67.m00170** und **120.m00116**) sowie **29 neue** und erstmals stadienspezifische Phagosomen-assoziierte Transportproteine nachgewiesen werden. Unter ihnen befindet sich der **ABC-Transporter 1**, welcher in manchen Organismen die Rekrutierung des Phosphatidylserins (Phospholipid-Komponente der Membran) steuert und somit Phagozytose-essentiell ist (Marguet *et al.*, 1999; Hamon *et al.*, 2000, Jacobs *et al.*, 2006).

Der überaus große Anteil der Transportproteine in den nascenten Phagosomen zeigt ihre Bedeutung im Prozess der Phagosomenbildung. Die Anwesenheit von deutlich weniger

Transportproteinen in den kondensierten Phagosomen führt zur Vermutung, dass im weiteren Verlauf der Phagozytose (5 min) nur noch wenige Transportproteine benötigt werden und dass der Fokus auf der Modifikation des Phagosomeninhalts liegt.

Unter den identifizierten Transportproteinen befinden sich ebenfalls die bekannten GTPasen, VPS und SNARE Proteine, die bereits in *D. discoideum*, murinen Makrophagen, *E. histolytica* und *T. thermophila* nachgewiesen wurden (Gotthardt *et al.*, 2006, Okada *et al.*, 2005; Garin *et al.*, 2001; Jacobs *et al.*, 2006; Samaranayake *et al.*, 2011).

Die Dynamik und Struktur der Zellen werden mit Hilfe von Membranfusionsprozessen aufrechterhalten. Beim intrazellulären Transport fusionieren diverse Moleküle wie Hormone, vesikulär verpackt, mit den Zielorganellen und geben dabei den Inhalt frei. Viele Aspekte dieser Membran/Vesikel-Fusionen, vor allem in Bezug auf die Phagozytose, sind bislang nicht vollständig aufgeklärt. Die am besten untersuchten Proteine in *Tetrahymena* und anderen Organismen bilden u. a. die Sortier-Proteine **VPS** (Samaranayake *et al.*, 2011; Linhart *et al.*, 2014) sowie die Fusionsprozesse regulierenden oder vermittelnden Proteine **SNARE** und **Rab** (Plattner, 2010 & 2013; Ko *et al.*, 2014; Bright *et al.*, 2010; Turkewitz & Bright, 2011). **14** dieser Proteine wurden in den nascenten und **vier** in den kondensierten Phagosomen identifiziert. VPS-Proteine (PH-Domäne-enhaltende Proteine) regulieren den Transport der Proteine von Golgi-Apparat zum Phagosom und sind somit entscheidende Komponenten im Phagozytoseprozess (Samaranayake *et al.*, 2011). Eine ähnliche Rolle könnte das in den nascenten Phagosomen identifizierte Membran-assoziierte-GRAM-Domäne-Protein spielen, welches die Rekrutierung von Proteinen zu diversen Membranen, in diesem Fall zur phagosomalen Membran, reguliert (Begley *et al.*, 2003; Doerks *et al.*, 2000). Möglicherweise werden so Vesikel-gebundene Protein-Kinasen oder metabolische Proteine im Zuge der Phagosomenmodifikation gesteuert. Ihre Bindung an die phagosomale Membran wird eventuell mit Hilfe der Rab-GTPasen wie Rab 6 C und Rab 62 geregelt, welche dafür bekannt sind, die Zielorganellen mit den Vesikeln selektiv zu verbinden und somit diverse Transport-Mechanismen in der Zelle zu regulieren (Markgraf *et al.*, 2007; Bright *et al.*, 2010). Das identifizierte SNARE-Protein steuert vermutlich nur in den nascenten Phagosomen die Vesikelfusion, was schließlich zu seiner Bildung bzw. Modifikation führt. Die Anwesenheit der gut untersuchten SNARE-, Rab- und VPS-Proteine in den nascenten Phagosomen zeigt, dass diese intrazelluläre Fusionsmaschinerie überwiegend in die Bildung der nascenten Phagosomen involviert sein könnte. Ihr Nachweis spiegelt sehr gut die Bedeutung der Vesikelfusionen bei der Phagosomenbildung wider. Da die Frühstadien bei der Abschnürung

des Phagosoms immer noch sehr unklar sind, liefern diese Studien weitere Hinweise auf stadienspezifische Proteine, die an der Fusion der Vesikel im Zuge der Phagosomenbildung beteiligt sein könnten.

5.3.1.5. Chaperone

Chaperone, die ebenfalls in der phagosomalen Fraktion gefunden wurden, konnten bereits in humanen Neutrophil-Phagosomen (Burlak *et al.*, 2006) identifiziert werden. Zwei in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene HSP 70-Proteine mit der *Tetrahymena Gene ID*: 14.m00361 und 7.m00462 stimmen mit den Ergebnisse der Jacobs-Studie überein (Jacobs *et al.*, 2006). Neben den Chaperonen konnten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls **zwei HSP70-Paraloge SSA3** und **SSA5** identifiziert werden, die wie Chaperone, neben der Proteinfaltung auch eine spezifische Immunantwort gegen diverse Tumore und Viren in Mammalia-Zellen vermitteln sowie Ubiquitinierungsprozesse anregen können (Srivastava *et al.*, 1986; Nieland *et al.*, 1996; Lüders *et al.*, 2000). In *Tetrahymena* könnten sie eine ähnliche Rolle bei der Erkennung von Nahrungspartikeln über mögliche Rezeptoren spielen, was, wie oben beschrieben, immer noch umstritten ist (Renaud *et al.*, 1995). Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten CCT-3 und CCT 5-Chaperone sind sehr wahrscheinlich an der *de novo* Faltung von Aktin und Tubulin beteiligt (Vainberg *et al.*, 1998; Geißler *et al.*, 1998), die beide im Phagozytoseprozess eine essentielle Rolle spielen.

5.3.1.6. Diverse Proteine

Übereinstimmend zur Jacobs-Studie wurden Proteine wie der **Elongationsfaktor Tu** (30 sek), welcher neben einer GTP-Domäne auch eine Dynamin-Domäne enthält, sowie der Calmodulin-bindende **Translations-Elongationsfaktor EF-1 α** identifiziert (Jacobs *et al.*, 2006). Der EF-1 α könnte u. a. an der Regulierung des Aktin-Cytoskeletts im Oralapparat und somit an der Bildung des Phagosoms beteiligt sein (Gross & Kinzy, 2005; Rasmussen & Wiebe, 1999; Gonda *et al.*, 1999; Jacobs *et al.*, 2006). Analysen dieser Proteine in Bezug auf die Phagozytose könnten ihre genaue Funktion aufzeigen.

5.3.1.7. Cytoskelett

Weiterhin konnten **Cytoskelettproteine**, mit einem Anteil von 3%, bezogen auf die bekannten Proteine, identifiziert werden, während 7% von Gotthardt *et al.* (2006) im Rahmen der murinen Phagosomen-Proteom-Analyse gefunden wurden. Diese sind bereits zahlreich als phagosomale Komponenten in ihrer Funktion beschrieben worden. So sind sie für den Vesikeltransport unerlässlich und können in Makrophagen die Phagozytose regulieren (Vega & Maio, 2005).

Die Bewegung der Phagosomen vom Cytostom zum Cytoproct wird mit Hilfe der Motorproteine gesteuert, deren Motilität und Struktur durch spezielle Gerüstproteine stabilisiert werden. Die essentiellen Bestandteile dieses Vesikeltransports sind die bekannten **α - und β -Tubuline** (ATU und BTU), die sich vom Oralapparat zum Cytoproct erstrecken und deren Anwesenheit in der Phagosomenfraktion zu erwarten war. Zusammen mit Myosin steuert Aktin die gerichtete Bewegung der Vesikel und des Phagosoms (Hosein *et al.*, 2005). **Zehn** von insgesamt **elf** Motorproteinen befinden sich in den nascenten Phagosomen, während nur **zwei** Proteine, α - und β -Tubuline (die in beiden Stadien nachgewiesen wurden) in kondensierten Phagosomen zu finden sind. In nascenten Phagosomen befinden sich Proteine wie Kinesin und Dyneine (**zwei Kinesin-Motor-Domäne-Proteine, DYH 13, DYH 8 und DYH 10**), die u. a. für den anterograden und retrograden Vesikel-Transport entlang der Mikrotubuli verantwortlich sind (Hirokawa & Takemura, 2005; Vallee *et al.*, 2004). Über Kinesin und seine potentielle Mitwirkung am Vesikeltransport gibt es im Vergleich zu Dynein nur wenige Informationen. In *T. thermophila* kodiert das DYH1-Gen eine zytoplasmatische

Form des Motorproteins, welches für die Phagozytose benötigt wird (Lee *et al.*, 1999). Das Silencing dieses Gens in *P. bursaria* führte zur Inhibierung der Formation der Nahrungsvakuole (Schroeder *et al.*, 1990). Ausschließlich in den nascenten Phagosomen wurde das Protein TTLL 14 H identifiziert, welches unter ATP-Hydrolyse die Übertragung der Tyrosin-Gruppe auf das modifizierte α -Tubulin reguliert. Diese Art der Tyrosinierung der Tubuline bewirkt die Rekrutierung der mit Mikrotubuli-interagierenden Proteine (Szyk *et al.*, 2011), was möglicherweise zur „Aktivierung“ der Tubuline führt und den Phagosomen-Transport ermöglicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegenden Ergebnisse die entscheidende Bedeutung der Motor-und Gerüstproteine während der Phagozytose, insbesondere die dynamische Bildung und Bewegung des Phagosoms, bestätigen. Desweiteren wird hier noch einmal erhärtet, dass die Motorproteine ATU und BTU während des Phagozytoseprozesses mit dem Phagosom assoziiert sind.

5.3.1.8. Hypothetische Proteine

Neben den bekannten und unbekannt, stadienspezifischen, phagosomalen Proteinen wurden **372** hypothetische Proteine identifiziert (**345** Proteine in **nascenten** und **101** Proteine in **kondensierten** Phagosomen), die nur durch zusätzliche Studien als phagosomale Proteine postuliert werden können. 118 hypothetische Proteine wurden aufgrund ihrer Homologie zu bekannten Proteinen in anderen Organismen nach bereits bekanntem Schema in funktionelle Proteingruppen zugeordnet.

Diese hypothetischen Proteine könnten eine entscheidende, wenn nicht sogar essentielle Rolle bei den Phagosomenbildungs- und reifungsprozessen spielen. Unter ihnen befinden sich überraschenderweise viele mögliche Membrantransportproteine mit **VPS-, Prefoldin-, SNARE- und Rab-Homologien**. Mindestens **13 Kinasen-** und **elf Transportproteine-** Homologe wurden überwiegend in den nascenten Phagosomen nachgewiesen. 16 homologe Proteine zu Oberflächenproteinen wie das humane Glykoprotein **Laminin** und neun Motor- und Gerüstproteine könnten in die zugeordneten Prozesse involviert sein. Der größte Anteil der hypothetischen Proteine (**254 Proteine**) bleibt aufgrund der fehlenden Homologien zu bekannten Proteinen vorerst unbekannt. Dieses ist bei Betrachtung der geringen Anzahl an Studien, die es zu *Tetrahymena* und der Bildung der Phagosomen gibt, nicht verwunderlich.

Möglicherweise liegt der Schlüssel zu den in *T. thermophila* bisher unentdeckten Acidosomen sowie weiteren Membrantransportproteinen in den unbekannt (hypothetischen) Proteinen und würde durch ihre ausführliche Untersuchung neue Einsichten bzgl. der Phagosomenbildung und -reifung ermöglichen. Dieses konnte in der vorliegenden Studie nicht mehr geleistet werden.

Daher scheint es vielversprechend zu sein, diese hypothetischen Proteine in Bezug auf den Phagozytoseprozess intensiver hinsichtlich der Funktionen zu charakterisieren. Eines der hypothetischen Proteine ist das von Maicher & Tiedtke (1999), sowie von Jacobs *et al.* (2006) identifizierte **PHP 1**-Protein. Wie bereits beschrieben, weist das Protein keine Homologie zu bekannten Proteinen auf; es ist lediglich homolog zum hypothetischen Protein von *T. borealis*, besitzt jedoch eine PEF-C-terminale Archaea Sortier-Protein-Domäne (*PEF-C-terminal archaeal protein sorting domain*). Aus diesem Grund eignete sich das Protein gut für die weiteren molekularbiologischen Untersuchungen in Bezug auf den Phagozytoseprozess.

Es ist zu beachten, dass die Funktionen der hier identifizierten Proteine in Bezug auf Phagozytoseprozess nicht ausschließlich auf die Phagosomenbildung und -reifung reduziert werden dürfen. Ihre Aufgaben können vielschichtiger sein und sollten auch unter anderen Aspekten der Phagozytose betrachtet werden. So spielt das Erkennen von Makromolekülen vermutlich eine essentielle Rolle in diesem Prozess und führt letztlich zur Bildung des Phagosoms. Ebenso sind die Prozesse im Phagosom zu beachten, die der Degradation der aufgenommenen Makromoleküle sowie ihrer Absorption und dem Transport über die Membran und innerhalb der Zelle dienen. Daher müssen diese Ergebnisse im Zusammenhang zum „gesamten“ Phagozytoseprozess betrachtet werden, was im folgenden Abschnitt ebenfalls beschrieben wird.

5.3.1.9. Nicht phagosomale Proteine

Die ribosomalen Proteine, die meisten ER- und Golgi-Apparat-Proteine sowie weitere auf Verunreinigungen deutende Proteine wurden aus den Ergebnissen herausgenommen und bei den weiteren Analysen nicht betrachtet. Sie kommen nicht in erwähnenswerten Mengen vor und können zum größten Teil als Verunreinigungen betrachtet werden. Manche dieser Proteine könnten aber auch mit den Phagosomen zum Zeitpunkt der Isolierung assoziiert gewesen sein und somit doch an Phagosomen-abhängigen Prozessen beteiligt sein.

Die Phagosom-Proteom-Untersuchungen des gereiften Phagosoms im murinen Makrophagen (Garin *et al.*, 2001), *D. discoideum* (Gotthardt *et al.*, 2006; Dieckmann *et al.*, 2008) und *Drosophila* (Stuart *et al.*, 2007) lieferten ebenfalls einige ER-Komponenten. Dabei ist wichtig zu beachten, dass das Endoplasmatische Retikulum die Hauptkomponente der Membran der Autophagosomen ist, deren Aufgabe es ist, interzelluläre Bestandteile abzubauen. Hier könnte ein möglicher Zusammenhang zwischen Autophagie und der Phagosomenbildung und –reifung bestehen, wie er auch in den murinen Makrophagen bereits nachgewiesen wurde (Bonilla *et al.*, 2013).

Insgesamt liefern die MudPIT-Ergebnisse eine große Anzahl sowohl bekannter als auch unbekannter Proteine, die bezüglich ihrer Stadienspezifität und Phagosomen-Assoziation durch Funktion- und Lokalisationsnachweise überprüft werden müssen. Ihre umfangreichen Analysen könnten neue Ansätze in den Reifungsprozessen früher Phagosomen aufzeigen und viele bisher unbekannte bzw. vermutete Schritte erklären oder verifizieren. Da dieses die erste Untersuchung auch von frühen Phagosomen mit der sensitiven MudPIT-Analyse ist, konnten sehr viel mehr Proteine als bisher detektiert werden.

5.4. 2 D-Gelelektrophorese

Die mit der 2 D-Gelelektrophorese gewonnenen Ergebnisse sollten als Überblick über die Anzahl der phagosomalen Proteine gelten. Desweiteren dienten sie zur Bestätigung der Vermutung, dass sich in den nascenten Phagosomen deutlich mehr Proteine befinden, in den kondensierten Phagosomen die Anzahl aber immer noch ausreichend hoch für weitere Analysen ist. Mit dem „pulse-chase“-Verfahren (Vosskühler & Tiedtke, 1993) konnten stadienspezifische (30 sek und 5 min) Phagosomen markiert, isoliert, gelelektrophoretisch nach ihrem isoelektrischen Punkt und Molekulargewicht getrennt und schließlich mit dem kolloidalen Coomassie eingefärbt werden. Es wurden über **70 Spots in 30 sek Stadium**, vergleichbar zu ca. **30 Proteinspots zum Zeitpunkt 5 min** (s. Abb. 16 und Abb. 17) identifiziert. Diese Ergebnisse bestätigen, dass bei der Phagosomenbildung deutlich mehr Proteine beteiligt sind als bei seiner anschließenden Reifung. Die Initiierung und die Bildung des Phagosoms ist ein hochregulierter, Aktin-abhängiger Prozess, welcher Interaktionen zwischen spezifischen Vesikelfusionen und zahlreichen Signalkaskaden beinhaltet. Die

anschließende Phagosomenprozessierung dient lediglich der Verdauung der aufgenommenen Nährstoffe sowie dem Recycling der Vesikel.

In den vorausgegangenen Studien wurden bereits Gesamtzellextrakte aus *T. thermophila* gelelektrophoretisch auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht (Xanthopoulou *et al.*, 2010). Die hier gefundenen gemeinsamen Muster im Proteingel (pI 5-6,5 und Molekulargewicht: 25-67 kDa) in den 30 sek und 5 min alten Phagosomen (s. Abb. 16 und Abb. 17) sind in den Ergebnissen von Xanthopoulou *et al.* (2010) ebenfalls zu finden. Laut der angegebenen *Accession number* handelt es sich um Aktine, TCP-1 (Proteine der Chaperonin Familie), Aktin-verwandte Proteine und α - und β -Tubuline (beide ca. 49,6 kDa) und das 25 kDa Calcium-bindende Protein (Xanthopoulou *et al.*, 2010; Maicher & Tiedtke, 1999). Das Proteinmuster im pI-Bereich von 4-7 und Molekulargewichte zwischen 20 kDa und 27 kDa deuten auf kleine GTPasen hin, die bereits ausführlich von Meyer (1999) untersucht wurden.

Die Arbeitsgruppe von Gotthardt untersuchte die Dynamik phagosomaler Proteine in den frühen Stadien (5 bis 15 min) der Phagozytose in *D. discoideum* mit Hilfe der 2 D-Gelelektrophorese. Hier wurden insgesamt 179 Proteinspots nach einem Standardprotokoll (ohne vorherige Phasenseparation) identifiziert. Ein Fazit dieser Analysen war, dass die Kapazitäten der 2 D-Gelelektrophorese-Technik nicht ausreichen, um insbesondere hydrophobe und transmembrane Proteine zu analysieren (Gotthardt *et al.*, 2006). Zu gleichen Ergebnissen kommt es in dieser Arbeit nach der Überprüfung der 2 D-Gelelektrophorese Ergebnisse. Weitere Literaturrecherchen führten dazu, sich dem Problem mit sensitiveren Methoden – zunächst auf der Ebene der Proteine - zu nähern.

Die Arbeitsgruppe um Garin verwendete die sensitivere MALDI-TOF-Methode, um die Proteinzusammensetzung näher bestimmen zu können. Die Untersuchung der phagosomalen Proteinzusammensetzung der Zelllinie J774 (*mouse macrophage-like*) mittels 2 D-Gelelektrophorese zum Zeitpunkt 60 min resultierte in mehreren hundert Spots zwischen 15 und 100 kDa mit pI-Werten zwischen 3 und 9 (Garin *et al.*, 2001). Die anschließende MALDI-TOF Analyse lieferte dann 140 phagosomale Proteine.

Um die Ergebnisse der 2 D-Gelelektrophorese in vorliegender Arbeit einordnen zu können, konnte auf einen umfangreichen, bislang unbearbeiteten Datensatz von Prof. Dr. Arno Tiedtke (Universität Münster) mit Werten zur MALDI-TOF Untersuchung phagosomaler Proteine zurückgegriffen werden (Tiedtke, unveröffentlichte Daten). Nach intensiver Analyse dieser

Daten konnten zwar ebenfalls mehrere Hundert Proteine identifiziert werden, die sich aber bezüglich ihrer Funktion und Lokalisation nicht weiter eingrenzen ließen. Die angestrebte nähere Untersuchung der phagosomalen Proteine wurde daraufhin mit sensitiveren Methoden durchgeführt und dann auf molekularer Ebene fortgesetzt. Dabei konnten diese Analysen der stadienspezifischen Proteine den Trend der Abnahme der Proteine zwischen 30 sek und 5 min eindeutig bestätigen.

6. Ausblick

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass die etablierten Verfahren zum Nachweis der frühen phagosomalen Proteine in *T. thermophila* gut geeignet sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnten sowohl die stadienspezifische Phagozytose-abhängige, erhöhte Genexpression sowie die Phagosomen-Assoziation einiger ausgewählter Proteine nachgewiesen werden. Es bedarf jedoch vieler weiterführender Nachweise, um die genaue Funktion dieser phagosomalen Proteine im Phagozytoseprozess aufzuzeigen.

Um eine genaue Aussage bezüglich der MudPIT-Ergebnisse treffen zu können, müssen weitere Proteine, insbesondere eine Auswahl aus den hypothetischen 372 Proteinen, ebenfalls mit den hier verwendeten Methoden wie qPCR und GFP-*tagging* überprüft werden. Auf diese Weise könnte der Frage nachgegangen werden, inwieweit diese Proteine essentiell für die Phagosomenreifung sind und welche Rolle sie bei der Phagosomenprozessierung spielen.

Als weiterführende Analysen der vorliegenden Ergebnisse könnte die Funktion der Phagosomen-assoziierten Proteine mit unterschiedlichen Methoden untersucht werden. Diese Überprüfung kann mit Hilfe der Methode der **Gene-Silencing** (*knock-down*, RNAi) erfolgen. Dabei kann die Expression bestimmter Gene von Interesse gezielt durch ihre „Stilllegung“ reguliert werden, indem die Gene teilweise ausgeschaltet werden. Die Steuerung der Genstilllegung kann mit Hilfe der gut etablierten induzierbaren Promotoren wie MTT 1 erfolgen (Shang *et al.*, 2002a). Auf diese Weise konnten fünf phagosomale Proteine von Kathrin Czora erfolgreich in ihrer Synthese inhibiert werden (Czora, 2014). Eine alternative Methode zu RNAi bietet die konventionelle **Gen-knock-out**-Methode. Diese Technik ermöglicht das vollständige Abschalten eines Gens. So konnten Phagozytose-essentielle Gene wie ADF/Cofilin (durch *knock-out*, Shiozaki *et al.*, 2013) und VPS 13 (durch GFP-*knock-out*, Samaranyake *et al.*, 2011) nachgewiesen werden.

Nach einer induzierten Phagozytose können mit Hilfe des Mikroskops die ersten Hinweise auf die Phagozytose-relevanten Funktionen geliefert werden. Falls das zu untersuchende Gen eine Motor- bzw. Gerüstproteinfunktion ausübt, so wird man vermutlich die Resultate in unvollständiger Phagosomenbildung und seiner Lokalisation in der Zelle beobachten können. Bei den Funktionen als Membrantransport und Fusionsprozesse-Regulation würde man keine weitere Prozessierung der Phagosomen anhand seiner Größe und Lokalisation in der Zelle

wahrnehmen. Die molekularbiologische Analyse der *knock-down/ knock-out* Stämme erlaubt eine weiterführende Charakterisierung der Zielgene.

Konstruktion von **Mutanten** mit einem Defekt in der Phagozytose stellt eine andere Herangehensweise zur Lösung der offenen Fragen dar. Dieser Defekt könnte zunächst mikroskopisch beobachtet werden und anschließend im Vergleich zu einem Wildtyp durch Untersuchungen der Genexpression das entsprechende Gen nachgewiesen werden.

Auf der Grundlage der vollständigen Genom-Analyse (MAC) können sogenannte DNA-Array (DNA-Chips) für die Transkriptomanalyse hergestellt werden. Die **Transkriptomanalyse** ermöglicht eine vollständige Analyse der in der Zelle vorhandenen RNA in Bezug auf die Phagozytose und eine quantitative und qualitative Aussage über die Rolle der entsprechenden Gene. Die Proteom- und Transkriptomanalysen können ergänzend (zusammengefasst als *functional genomics*) eine ausführliche Charakterisierung von Genexpressionsprofilen in Abhängigkeit von der Phagozytose liefern.

7. Literaturverzeichnis

Acorn, A. R., Clark, K. F., Jones, S., Després, B. M., Munro, S., Cawthorn, R. J. & Greenwood, S. J. (2011).

Analysis of expressed sequence tags (ESTs) and gene expression changes under different growth conditions for the ciliate *Anophryoides haemophila*, the causative agent of bumper car disease in the American lobster (*Homarus americanus*).

J Invertebr Pathol. 107 (2), 146-54.

Aderem, A. & Underhill, D. M. (1999).

Mechanisms of phagocytosis in macrophages.

Annu. Rev. Immunol. 17, 593–623.

Adl, S. M. et al., (2012).

The Revised Classification of Eukaryotes

Journal of Eukaryotic Microbiology 59 (5), 429-514.

Akematsu, T., Fukuda, Y., Attiq, R. & Pearlman, R. (2014).

Role of class III phosphatidylinositol 3-kinase during programmed nuclear death of *Tetrahymena thermophila*.

Autophagy 10 (2), 209–225.

Allen, R. D. (Hg.) (1988).

Cytology. In: Paramecium (Görtz, H.-D.). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Allen, R. D. & Fok, A. K. (1984).

Retrieval of lysosomal membrane and acid Phosphatase from phagolysosomes of *Paramecium caudatum*.

J. Cell Biol. 99, 1955-1965.

Allen, R. D. & Fok, A. K. (1980).

Membrane recycling and endocytosis in *Paramecium* confirmed by horseradish Peroxidase pulse-chase studies.

J. Cell Sci., 45, 131-145.

Allen, R. D. & Fok, A. K. (1983).

Nonlysosomal vesicles (acidisomes) are involved in phagosome acidification in *Paramecium*.

J. Cell Biol. 97, 566-570.

Allen, R. D. & Wolf, R. W. (1979).

Membrane recycling at the cytoproct of *Tetrahymena*.

Journal of Cell Science 35, S. 217–227.

Alvarez-Dominguez, C.; Barbieri, A. M.; Berón, W.; Wandinger-Ness, A. & Stahl, P. D. (1996).

Phagocytosed live *Listeria monocytogenes* influences Rab5-regulated in vitro phagosome-endosome fusion.

J. Biol. Chem. 271 (23), 13834–13843.

- Amer, A., Franchi, L., Kanneganti, T. D., Body-Malapel, M., Ozoren, N. & Brady, G.** Meshinchi, S., Jagirdar, R., Gewirtz, A., Akira, S. & Nunez, G. (2006). Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J. Biol. Chem.* 281, 35217–35223.
- Armstrong, J. A. & Hart, P. D. (1971).** Response of cultured macrophages to *M. tuberculosis* with observations of fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* 134,713–740.
- Backer, J. M. (2000).** Phosphoinositide 3-kinases and the regulation of vesicular trafficking. *Cell Biol. Res. Commun.* 3 (4), 193–204.
- Batz, W. & Wunderlich, F. (1976).** Structural transformation of the phagosomal membrane in *Tetrahymena* cells endocytosing latex beads. *Archives of Microbiology* 109; Jg. 1976 (3), S. 215–250.
- Baumert, U. (1992).** Ultrastrukturelle Untersuchungen zum Phagosomenzyklus von *Tetrahymena thermophila*. Diplomarbeit. Westfälische Wilhelms-Universität, Münster.
- Baumert, U.; Voßkübler, C. & Tiedtke, A. (1998).** Formation and maturation of phagosomes labeled by magnetic micro particles: an ultrastructural study in *Tetrahymena thermophila*. In: *European Journal of Protistology* 34; Jg. 1998-10-12 (3), S. 291–300.
- Barnes, N. C.; Powell, M. S.; Trist, H. M.; Gavin, A. L.; Wines, B. D. & Hogarth, P. M. (2006).** Raft localisation of FcγRIIIa and efficient signaling are dependent on palmitoylation of cysteine 208. *Immunol. Lett.* 104 (1-2), 118–123.
- Beck, M., Schmidt, A., Malmström, J., Claasen, M., Ori, A., Szymborska, A., Herzog, F., Rinner, O., Ellenberg, J. & Aebersold, R. (2011).** The quantitative proteome of a human cell line. *Mol Syst Biol.* 7, 549.
- Begley, M. J., Taylor, G. S., Kim, S. A., Veine, D. M., Dixon, J. E. & Stuckey, J. A. (2003).** Crystal structure of a phosphoinositide phosphatase, MTMR2: insights into myotubular myopathy and Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Mol. Cell* 12 (6), 1391–402.
- Bell, A.** <http://tet.jsd.claremont.edu/about.php> 2010

Bessonneau, P., Besson, V., Collinson, I. & Duong, F. (2002).

The SecYEG preprotein translocation channel is a conformationally dynamic and dimeric structure.

EMBO J. 21(5), 995–1003.

Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P. & Lodish, H. F. (1997).

Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of calveolate-associated integral membrane proteins.

J. Biol. Chem. 272, 13793-13802.

Blackburn, E. H. (1990).

Telomeres sans frontieres.

Nature 343, 122.

Blackburn, E. H. & Karrer, K. M. (1986).

Genomic reorganization in ciliated protozoans.

Annu. Rev. Genet. 20, 501-521.

Blatch, G. L. & Lassle, M. (1999).

The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions.

BIOESSAYS 21 (11), 932-939.

Bonilla, D. L., Bhattacharya, A., Sha, Y., Xu, Y., Xiang, Q., Jagannath, C., Komatsu, M. & Eissa, N. T. (2013).

Autophagy regulates phagocytosis by modulating the expression of scavenger receptors.

Immunity. 39 (3), 537-547.

Bordier, C. (1981).

Phase-separation of integral membrane-proteins in Triton X-114 solution.

Journal of Biological Chemistry 256; Jg. 1981 (4), S. 1604–1607.

Bretscher, M. S., Thomson, J. N. & Pearse, B. M. F. (1980).

Coated pits act as molecular filters.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (7), 4156-4159.

Bretscher, M. S. & Thomson, J. N. (1983).

Distribution of ferritin receptors and coated pits on giant HeLa cells.

EMBO Journal 2 (4), 599-603.

Brickner, J. H. & Fuller, R. S. (1997).

SOI1 encodes a novel, conserved protein that promotes TGN-endosomal cycling of Kex2p and other membrane proteins by modulating the function of two TGN localization signals.

J Cell Biol. 6, 139 (1), 23-36.

Bright, L. J., Kambesis, N., Nelson, S. B., Jeong, B. & Turkewitz, A. P. (2010).

Comprehensive analysis reveals dynamic and evolutionary plasticity of Rab GTPases and membrane traffic in *Tetrahymena thermophila*.

PLoS Genet. 14, 6 (10), e1001155.

- Brodsky, F. M., Chen, C.-Y., Kneuhl, C., Towler, M. C. & Wakeham, D. E. (2001).**
Biological basket weaving: Formation and function of clathrin-coated vesicles.
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17, 517–568.
- Brown, J. M., Fine, N. A., Pandiyan, G., Thazhath, R. & Gaertig, J. (2003).**
Hypoxia Regulates Assembly of Cilia in Suppressors of Tetrahymena Lacking an Intraflagellar Transport Subunit Gene
Mol Biol Cell. 14 (8), 3192–3207.
- Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y. & Allis, C. D. (1996)**
Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation.
Cell 84, 843-851.
- Brunger AT (2005)**
Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins.
Q Rev Biophys 38: 1–47.
- Bucci, C.; Parton, R. G.; Mather, I. H.; Stunnenberg, H.; Simons, K.; Hoflack, B. & Zerial, M. (1992).**
The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway.
Cell 70 (5), 715–728.
- Bunney, T. D., van Walraven, H. S. & de Boer, A. H. (2001).**
14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 4249–4254.
- Burlak, C., Whitnea, A. R., Meads, D. J., Hackstadt, T. & DeLeo, F. R. (2006).**
Maturation of Human Neutrophil Phagosomes Includes Incorporation of Molecular Chaperones and Endoplasmic Reticulum Quality Control Machinery.
Molecular & Cellular Proteomics 5, 620-634
- Cai, H., Reinisch, K. & Ferro-Novick, S., (2007).**
Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle.
Dev. Cell. 12, 671-682.
- Cassimeris, L., Rieder, C. L. & Salmon, E. D. (1994).**
Microtubule assembly and kinetochore directional instability in vertebrate monopolar spindles: implications for the mechanism of chromosome congression.
J Cell Sci. 107 (1), 285-97.
- Chapman-Andresen, C. & Nilsson, J. R. (1968).**
On vacuole formation in *Tetrahymena pyriformis* GL. *C. r. Trav. Lab. Carlsberg* 36, 405-432
- Cech, T. R. (1989)**
Editorial Comments., pp. 1-5 US Biochem. Corp, Cleveland, USA.

Chen, Y. A. & Scheller, R. H. (2001).

SNARE-mediated membrane fusion.

Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2, 98-106.

Crews, S. T. & Pearson, J. C. (2009)

Transcriptional autoregulation in development.

Curr Biol 19, 241–246.

Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S. C., Waterfield, M. D., Backer, J. M. & Zerial, M. (1999).

Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors.

Nat. Cell Biol. 1, 249–252

Clemens, D. L. & Horwitz, M. A. (1995).

Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited.

J. Exp. Med. 181 (1), 257–270.

Cole, E. S. & Bruns, P. J. (1992).

Uniparental cytogamy: a novel method for bringing micronuclear mutations of Tetrahymena into homozygous macronuclear expression with precocious sexual maturity.

Genetics 132 (4), 1017–1031.

Collins, K. & Gorovsky, M. A. (2005)

Tetrahymena thermophila.

Curr. Biol. 15, R317-R318.

Corbett, J. et al. (1994).

Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focussing in the first dimension: an interlaboratory comparison.

Electrophoresis 15, 1205-1211.

Cowan, G. J. M., Bockau, U., Eleni-Muus, J., Aldag, I., Samuel, K., et al. (2014).

A Novel Malaria Vaccine Candidate Antigen Expressed in *Tetrahymena thermophila*.

PLoS ONE 9(1): e87198.

Czora, K. (2014).

Charakterisierung ausgewählter Proteine des Phagosoms von *Tetrahymena thermophila* auf proteinbiochemischer und molekularbiologischer Ebene

Dissertation. Bergische Universität Wuppertal. Fakultät der Mathematik und Naturwissenschaften.

Das, A. K., Cohen; P. W. & Barford, D. (1998).

The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions.

EMBO J. 17(5), 1192–1199.

Deretic, V. & Fratti, R. A. (1999).

Mycobacterium tuberculosis phagosome
Mol Biol. 31 (6), 1603-1609.

Dermine, J. F. et al. (2001).

Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes.
J. Biol. Chem. 276, 18507-18512.

Desjardins, M., Huber, L. A., Patron, R. G. & Griffiths, G. (1994a).

Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus.

J. Cell Biol. 124, 677-688.

Desjardins, M.; Celis, J. E.; van Meer, G.; Dieplinger, H.; Jahraus, A.; Griffiths, G.; Huber, L. A. (1994b).

Molecular characterization of phagosomes.

Journal of Biological Chemistry 269 (51), 32194–32200.

Desjardins, M. (1995).

Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis.

Trends Cell Biol. 5 (5), 183–186.

Desjardins, M., Nzala, N. N., Corsini, R. & Rondeau, C. (1997).

Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes.

J. Cell Sci. 110, 2303-2314.

Desjardins, M. (2003).

ER-mediated phagocytosis: A new membrane for new functions. In: *Nature Reviews Immunology* 3; Jg. 2003-04 (4), S. 280–291.

Dieckmann, R., Gopaldass, N., Escalera, C. & Soldati, T. (2008).

Autophagosome and Phagosome: Maturation Changes in Purified Phagosomes
Methods in Molecular Biology 445, 327-337.

Di Paolo & De Camilli (2006).

Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics.

Nature 443(7112), 651-7.

Doerks, T., Strauss, M., Brendel, M. & Bork, P. (2000).

GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins.

Trends Biochem. Sci. 25 (10), 483–5.

Doyle, S. E., O'Connell, R. M., Miranda, G. A., Vaidya, S., Chow, E. K., Liu, P. T., Suzuki, S., Suzuki, N., Modlin, R. L., Yeh, W., Lane, T. F. & Cheng, G. (2004).

Toll-like Receptors Induce a Phagocytic Gene Program through p38.

JEM 199 (1), 81-90.

Duclos, S., Diez, R., Garin, J., Papadopoulou, B., Descoteaux, A., Stenmark, H. & Desjardins, M. (2000).

Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages.
J. Cell Sci. 113, 3531-3541.

Eisen *et al.*, 2006.

Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote.
Plos. Biol. 4 (9).

Elde, N. C.; Morgan, G.; Winey, M.; Sperling, L. & Turkewitz, A. P. (2005).

Elucidation of clathrin-mediated endocytosis in *Tetrahymena* reveals an evolutionarily convergent recruitment of dynamin.
PLOS Genetics 1 (5), 514–526.

Ellgaard, L. & A. Helenius (2003).

Quality control in the endoplasmic reticulum.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4, 181-191.

Elliott, A. M. (1965).

Primary lysosomes in *Tetrahymena pyriformis*.
Science 149, 640-641.

Elliott, A. M. & Clemmons, G. L. (1966).

An ultrastructural study of ingestion and digestion in *Tetrahymena pyriformis*.
Journal of Protozoology 13 (2), 311–323.

Eskelinen, E. L.; Tanaka, Y. & Saftig, P. (2003).

At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins.
Trends in Cell Biology 13 (3), 137–145.

Fasshauer, D. (2003).

Structural insights into the SNARE mechanism.
Biochimica et biophysica acta 1641 (2–3): 87–97

Fasshauer D.; Sutton R.B.; Brunger A.T. & Jahn R. (1998).

Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs.
Proc Natl Acad Sci U S A 95, 15781–15786.

Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Jagirdar, R., Inohara, N. & Vandenabeele, P. et. al. (2006).

Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 beta in salmonella-infected macrophages.
NATURE IMMUNOLOGY 7 (6), 576-582.

Francoleon, D. R. et al., (2009).

S-layer, surface-accessible, and concanavalin A binding proteins of *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei*.
J. Proteome Res. 8, 1972–1982.

- Fratti, R. A.; Backer, J. M.; Gruenberg, J.; Corvera, S. & Deretic, V. (2001).**
Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest.
J. Cell Biol. 154 (3), 631–644.
- Fukuda R.; McNew J. A.; Weber T.; Parlati F.; Engel T. et al. (2000).**
Functional architecture of an intracellular membrane t-SNARE.
Nature 407,198–202.
- Funato, K.; Beron, W.; Yang, C. Z.; Mukhopadhyay, A. & Stahl, P. D. (1997).**
Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells.
J. Biol. Chem. 272 (26), 16147–16151.
- Gaertig, J., Thatcher, T. H., Gu, L. & Gorovsky, M. A. (1994).**
Electroporation-mediated replacement of a positively and negatively selectable β -tubulin gene in *Tetrahymena thermophila*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4549-4553.
- Gaertig, J. et al. (1994).**
High frequency vector-mediated transformation and gene replacement in *Tetrahymena*.
Nucl. Acids. Res. 22, 5391-5398.
- Gaertig, J., Thatcher, T. H., McGrath, K. E., Callahan, R. C. & Gorovsky, M. A. (1993).**
Perspectives on tubulin isotypefunction and evolution based on the observations that *Tetrahymena thermophila* microtubules contain a single α - and β -tubulin.
Cell. Motil. Cytoskeleton 25, 243-253.
- Gaertig, J., Gao, Y., Tishgarten, T., Clark, T. G. & Dickerson, H. W. (1999).**
Surface display of a parasite antigen in the ciliate *Tetrahymena thermophila*.
Nature Biotechnology 17, 462-465.
- Gagnon, E.; Duclos, S.; Rondeau, C.; Chevet, E.; Cameron, P. H.; Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J. M. & Desjardins, M. (2002).**
Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages.
Cell 110 (1), 119–131.
- Garin, J.; Diez, R.; Kieffer, S.; Dermine, J. F.; Duclos, S.; Gagnon, E. et al. (2001).**
The phagosome proteome: Insight into phagosome functions.
Journal of Cell Biology 152; Jg. 2001-01-08 (1), S. 165–180.
- García-García, E.; Brown, E. J. & Rosales, C. (2007).**
Transmembrane mutations to Fc γ RIIA alter its association with lipid rafts: implications for receptor signaling.
J. Immunol. 178 (5), 3048–3058.
- Geißler, S., Siegers, K. & Schiebel, E. (1998).**
A novel protein complex promoting formation of functional α - and γ -tubulin.
EMBO J. 17, 952–966.

Gibbons I. & Rowe A. (1965)

Dynein: A protein with adenosine triphosphatase activity from cilia.
Science 149, 424-426.

Götte, M. & von Mollard, G F (1998).

A new beat for the SNARE drum.
Trends Cell Biol. 8 (6), 215–218.

Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G. W., Russell, D. W. & Schneider, W. J. (1985).

Receptor-Mediated Endocytosis: Concepts Emerging from the LDL Receptor System
Annual Review of Cell Biology 1, 1-39.

Gonda, K.; Katoh, M.; Hanyu, K.; Watanabe, Y.; Numata, O. (1999).

Ca²⁺/calmodulin and p85 cooperatively regulate an initiation of cytokinesis in *Tetrahymena*.
Journal of Cell Science 112 (21), 619–3626.

Gonda, K.; Komatsu, M.; Numata, O. (2000):

Calmodulin and Ca²⁺/calmodulin-binding proteins are involved in *Tetrahymena thermophila* phagocytosis.
Cell Structure and Function 25 (4), 243–251.

Goody, R. S., Rak, A., Alexandrov, K. (2005).

The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments.
Cell. Mol. Life. Sci. 62, 1657-1670.

Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M., Gruenberg, J. (1991).

Rab5 controls early endosome fusion in vitro.
Cell. 64, 915-925.

Gotthardt, D.; Blancheteau, V.; Bosserhoff, A.; Ruppert, T.; Delorenzi, M.; Soldati, T. (2006).

Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a G alpha during uptake. I
Molecular & Cellular Proteomics 5 (12), 2228–2243.

Grenningloh, M. (2001)

Phospholipase A1: molekulare Charakterisierung eines von *Tetrahymena thermophila* sezernierten lipolytischen Enzyms. Dissertation. Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für allgemeine Zoologie und Genetik.

Gross, S. R. & Kinzy, T. G. (2005).

Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology
Nature Structural & Molecular Biology 12, 772 – 778.

Gruenberg, J. (2001).

The endocytic pathway: a mosaic of domains.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2 (10), 721-30.

Gu, F. & Gruenberg, J. (1999).

Biogenesis of Transport intermediates in the endocytotic pathway.
FEBS Letts 452, 61-66.

Gu, H.; Botelho, R. J.; Yu, M.; Grinstein, S. & Neel, B. G. (2003).

Critical role for scaffolding adapter Gab2 in Fc gamma R-mediated phagocytosis. *J. Cell Biol.* 161 (6), 1151–1161.

Gu, Y., Deng, Z., Paradez, A. R., DeBolt, S., Wang, Z. & Somerville, C. (2008).

Prefoldin 6 is required for normal microtubule dynamics and organization in Arabidopsis.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105 (46), 18064–18069.

Haber, R. & Adhya, S. (1987).

Autoregulation of gene expression:rho
Journal of Biosciences 11 (1-4), 225-230.

Habermann, A.; Schroer, T. A.; Griffiths, G.; Burkhardt, J. K. (2001).

Immunolocalization of cytoplasmic dynein and dynactin subunits in cultured macrophages: enrichment on early endocytic organelles.
Journal of Cell Science 114 (1), 229–240.

Haft, D. H., Payne, S. H. & Selengut, J. D. (2012).

Archaeosortases and exosortases are widely distributed systems linking membrane transit with posttranslational modification.
J. Bacteriol. 194 (1), 36-48.

Hamon, Y.; Broccardo, C.; Chambenoit, O.; Luciani, M. F.; Toti, F.; Chaslin, S. *et al.* (2000).

ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine.
Cell Biol. 2 (7), 399–406.

Hartmann, M. W. W. (1999)

Gewinnung von Produktionsstämmen und Entwicklung eines Verfahrens zur Produktion von Phospholipase A1 aus *Tetrahymena thermophila*. Dissertation. Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik.

Hay, J. C. & Scheller, R. H. (1997).

SNAREs and NSF in targeted membrane fusion.
Curr. Opin. Cell Biol. 9 (4), 505 – 512.

Hanson, P. I., Heuser, J. E. & Jahn, R. (1997).

Neurotransmitter release—four years of SNARE complexes.
Curr. Opin. Neurobiol. 7 (3), 310 – 315.

Hanzal-Bayer, M. F. & Hancock, J. F. (2007).

Lipid rafts and membrane traffic.
FEBS Lett. 581 (11), 2098–2104.

Hawgood, S. & Clements, J. A. (1990).
Pulmonary Surfactant and Its Apoproteins
J Clin. Invest. 86, 1-6.

Helenius, A. & Aebi, M. (2004).
Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum.
Annu Rev Biochem. 73, 1019-49.

Hermesen, R., Ursem, B. & ten Wolde, P. R. (2010).
Combinatorial Gene Regulation Using Auto-Regulation.
PLoS Comput Biol 6(6): e1000813.

Hilbi, H. 2006.
Modulation of phosphoinositide
metabolism by pathogenic bacteria.
Cell. Microbiol. 8, 1697–1706.

Hirokawa, N. & Takemura, R. (2005).
Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons.
Nature Reviews Neuroscience 6, 201-214.

Hohl, T. M.; Parlati, F.; Wimmer, C.; Rothman, J. E.; Sollner, T. H. & Engelhardt, H. (1998).
Arrangement of subunits in 20 S particles consisting of NSF, SNAPs, and SNARE complexes.
Mol Cell. 2, 539–548.

Holz, G. G. Jr. (1973).
The nutrition of Tetrahymena: Essential nutrients, feeding, and digestion.
Biology of Tetrahymena (Elliot, A. M.), 89-98.

Horowitz, S. & Gorovsky, M. A. (1985)
An unusual genetic code in nuclear genes of *Tetrahymena*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 82, 2452-2455.

Horwitz, M. A. (1983).
The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes.
J. Exp. Med. 158, 2108-2126.

Hosein, R. E.; Williams, S. A.; Gavin, R. H. (2005).
Directed motility of phagosomes in *Tetrahymena thermophila* requires actin and Myo1p, a novel unconventional myosin.
Cell Motility and the Cytoskeleton 61 (1), 49–60.

Huber H.C., Huber W. & Ritter H. (1990).
Simple bioassays for evaluating toxicity of environmental chemicals using microcultures of human peripheral blood lymphocytes and monoaxenic cultures of the ciliate *Tetrahymena pyriformis*.
Zbl.Hyg.Umweltmed. 189, 511-526.

Huynh, K. K.; Kay, J. G.; Stow, J. L. & Grinstein, S. (2007).

Fusion, fission, and secretion during phagocytosis.

Physiology (Bethesda) 22, 366–372.

Ichihara, S., Beppu, N. & Mizushima, S. (1984).

Protease IV, a cytoplasmic membrane protein of *Escherichia coli*, has signal peptide peptidase activity.

J Biol Chem 259, 9853-9857.

Jacobs, M. E.; DeSouza, L. V.; Samaranayake, H.; Pearlman, R. E.; Siu, K. W. M. & Klobutcher, L. A. (2006).

The *Tetrahymena thermophila* phagosome proteome.

Eukaryotic Cell 5 (12), 1990–2000.

Jahn, R., Lang, T. & Sudhof, T. C. (2003).

Membrane fusion.

Cell 112, 519–533.

Jahn, R., & Scheller, R. H. (2006).

SNAREs—engines for membrane fusion.

Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7, 631–643.

Jahraus, A., Tjelle, T. E., Berg, T., Habermann, A., Storrie, B., Ullrich, O. & Griffiths, G. (1998).

In vitro fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J774 macrophages.

J. Biol. Chem. 273, 30379-30390.

Jha, S. & Ting, J. P. Y. (2009).

Inflammasome-Associated Nucleotide-Binding Domain, Leucine-Rich Repeat Proteins and Inflammatory Diseases.

JOURNAL OF IMMUNOLOGY 183 (12), 7623-7629.

Jimmy K. Eng, J. K., McCormack, A. L. & Yates, J. R. (1994).

An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database.

J Am Soc Mass Spectrom 5 (11), 976–989

Kahn, R. W. et al. (1993).

Transformation of *Tetrahymena thermophila* by microinjection of a foreign gene.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 9295-9299.

Kamijo, K., Ohara, N., Abe, M., Uchimura, T., Hosoya, H., Lee, J. S. & Miki, T. (2006).

Dissecting the role of Rho-mediated signaling in contractile ring formation.

Mol. Biol. Cell 17, 43-55.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M. (2000)

Principles of Neural Science, 4. Auflage, McGraw-Hill, New York.

Kaneda, T., Taga, Y., Takai, R., Iwano, M., Matsui, H., Takayama, S., Isogai, A. & Che, F. S. (2009).

The transcription factor OsNAC4 is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death. *EMBO J* 28, 926- 36.

Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J. H., Franchi, L., Whitfield, J., Barchet, W., Colonna, M., Vandenabeele, P. *et al.* (2006).

Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 440, 233–236.

Kienle, N., Kloepper, T. H., & Fasshauer, D. (2009).

Differences in the SNARE evolution of fungi and metazoa. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 787–791.

Kilburn, C. L., Pearson, C. G., Romijn, E. P., Meehl, J. B., Giddings, T. H. Jr., Culver, B. P., Yates, J. R. 3rd & Winey, M. (2007).

New *Tetrahymena* basal body protein components identify basal body domain structure. *J Cell Biol.* 178 (6), 905-912.

Kinch, L. N., Saier, M. H. Jr. & Grishin, N. V. (2002).

Sec61beta a component of the archaeal protein secretory system. *Trends Biochem Sci.* 27 (4), 170-1.

Kitajima, Y. & Thompson, G. A. (1977).

Differentiation of food vacuolar membranes during endocytosis in *Tetrahymena*. I *Journal of Cell Biology* 75; Jg. 1977 (2), S. 436–445.

Kiy, T., Scheidgen-Kleyboldt, G. & Tiedtke, A. (1996)

Production of lysosomal enzymes by continuous high-cell density fermentation of ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila* in a perfused bioreactor. *Enzyme Mikrob. Technol.* 18, 268-274.

Kiy, T. & Tiedtke, A. (1992)

Mass cultivation of *Tetrahymena thermophila* yielding high cell densities and short generation times. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 576-579.

Ko, Y. J., Lee, M., Kang, K., Song, W. K. & Jun, Y. (2014).

In vitro assay using engineered yeast vacuoles for neuronal SNARE-mediated membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (21), 7677-82.

Kobe, B & Deisenhofer, J. (1994).

The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci.* 19 (10), 415-21.

Kruth H. S. 2011.

Receptor-independent fluid-phase pinocytosis mechanisms for induction of foam cell formation with native low-density lipoprotein particles. *Curr. Opin. Lipidol.* 22: 386–393.

Kuhn, M. & Goebel, W. (1995).

Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*.
Genet. Eng. 17, 31-51.

Kwiatkowska, K.; Frey, J. & Sobota, A. (2003).

Phosphorylation of FcγRIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: the role of membrane rafts.
J. Cell. Sci. 116 (Pt 3), 537–550.

Kwiatkowska, K. & Sobota, A. (1999).

Signaling pathways in phagocytosis.
BioEssay 21, 422-431.

Kyriakidis, D. A., Tsirka, S. A., Tsavdaridis, I. K., Iliadis, S. N. & Kortsaris, A. H. (1990).

Antiproliferative activity of L-asparaginase of *Tetrahymena pyriformis* on human breast cancer cell lines.
Mol. Cell Biochem. 96, 137-142.

Laemmli U.K. (1970).

Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685.

Lal, K., Delves, M. J., Bromley, E., Wastling, J. M., Tomley, F. M. & Sinden, R. E. (2009).

Plasmodium male development gene-1 (mdv-1) is important for female sexual development and identifies a polarised plasma membrane during zygote development.
Int J Parasitol. 39 (7), 755-761.

Landis, W. G., Haley, D. M., Haley, M. V., Johnson, D. W., Durst, H. D. & Savage, R. E., Jr. (1987).

Discovery of multiple organofluorophosphate hydrolyzing activities in the protozoan *Tetrahymena thermophila*.
J. Appl. Toxicol. 7, 35-41.

Lang, D. M. et al. (1998).

Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons.
J. Neurobiol. 37, 502-523.

Lapatsina, L., Jira, J. A., Smith, E. S. J., Poole, K., Kozlenkov, A., Bilbao, D., Lewin, G. R., Heppenstall, P. A. et al. (2012).

Regulation of ASIC channels by a stomatin/STOML3 complex located in a mobile vesicle pool in sensory neurons.
Open Biol. 2 (6): 120096.

Lee, S.; Wisniewski, J. C.; Dentler, W. L. & Asai, D. J. (1999).

Gene knockouts reveal separate functions for two cytoplasmic dyneins in *Tetrahymena thermophila*. In: *Molecular Biology of the Cell* 10; Jg. 1999-03 (3), S. 771–784.

Lemmon, S. K. & Traub, L. M. (2000).

Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells.

Curr. Opin. Cell Biol. 12; 457-466.

Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., III, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F. G. (1980)

A newly revised classification of the protozoa.

J. Protozool. 27, 37-58.

Li, W, Zhang, S., Numata, O., Nozawa, Y. & Wang, S. (2009).

TpMRK regulates cell division of Tetrahymena in response to oxidative stress.

Cell Biochem Funct. 27(6), 364-9.

Lin, J., Akiba, M. & Zhang, Q. (2005).

Multidrug efflux systems in Campylobacter.

Herausgeber: Ketley, J. M. & Konkel, M. E.: Campylobacter: Molecular and Cell Biology, Horizon Bioscience, Norfolk, UK, 205–218.

Linhart, R., Wong, S. A., Cao, J., Tran, M., Huynh, A., Ardrey, C., Park, J. M., Hsu, C., Taha, S., Peterson, R., Shea, S., Kurian, J. & Venderova, K. (2014).

Vacuolar protein sorting 35 (Vps35) rescues locomotor deficits and shortened lifespan in Drosophila expressing a Parkinson's disease mutant of Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2).
Mol Neurodegener 11; 9 (1), 23.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).

Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta[\Delta C(T)]}$ Method.

Methods. 25(4): 402-408.

Lo, P. H., Ko, J. M., Yu, Z. Y., Law, S., Wang, L. D., Li, J. L., Srivastava, G., Tsao, S. W., Stanbridge, E. J. & Lung, M. L. (2012).

The LIM domain protein, CRIP2, promotes apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma.
Cancer Lett. 316 (1), 39-45.

Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M. A., Goda, Y., Zerial, M. & Pfeffer, S. R. (1993).

Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network.

The EMBO Journal 12(2), 677-682.

Lowry, O. H. et al. (1951).

Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. Band 193, Nr. 1, 265–275.

Ludwig, A., Otto, G. P., Riento, K., Hams, E., Fallon, P. G. & Nichols, B. J. (2010).

Flotillin microdomains interact with the cortical cytoskeleton to control uropod formation and neutrophil recruitment.

J. Cell Biol. 191 (4), 771–781.

Lüders, J., Demand, J. & Höfeld, J. (2000).

The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome.

J Biol Chem 275, 4613-4617.

Luo, W. & Chang, A. (1997).

Novel Genes Involved in Endosomal Traffic in

Yeast Revealed by Suppression of a Targeting-defective Plasma Membrane ATPase Mutant.

The Journal of Cell Biology, 138 (4), 1997 731–746

Madinger, C. L.; Collins, K.; Fields, L. G.; Taron, C. H. & Benner, J. S. 2010.

Constitutive Secretion in *Tetrahymena thermophila*

Eukaryotic Cell 9 (5), 674–681.

Maicher, M., Albermann, L. & Tiedtke, A. (2001).

Charakterisierung der Proteine früher Stadien des phagosomalen Kompartimentes von

Tetrahymena thermophila.

Dissertation, Institut für allgemeine Zoologie und Genetik, Münster (Westfalen), Deutschland.

Maicher, M. T. & Tiedtke, A. (1999).

Biochemical analysis of membrane proteins from an early maturation stage of phagosomes.

Electrophoresis 20; Jg. 1999-05 (4-5), S. 1011–1016.

Malmström, J., Beck, M., Schmidt, A., Lange, V., Deutsch, E. W. & Aebersold, R. (2009).

Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*.

Nature 460 (7256), 762-5.

Manetti, F. (2012).

LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators.

Med. Res. Rev. 32 (5), 968-98.

Markgraf, D. F., Peplowska, K., Ungermann, C. (2007).

Rab cascades and tethering factors in the endomembrane system.

FEBS. Lett. 581, 2125-2130.

Martens, S. & McMahon, H. T. (2008).

Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles.

Nature Reviews Molecular Cell Biology 9, 543-556.

Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. (2009).

The Inflammasomes: Guardians of the *Body*

ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY 27, 229-265

Mayer, B. J. & Baltimore, D. (1994).

Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the Abl tyrosine kinase.

Mol Cell Biol. 14 (5), 2883–2894.

Mayorga, L. S., Bertini, F & Stahl, P. D. (1991).

Fusion of newly formed phagosomes with endosomes in intact cells and in a cell-free system.
J. Biol. Chem. 266, 6511-6517.

McLauchlan, H.; Newell, J.; Morrice, N.; Osborne, A.; West, M. & Smythe, E. (1998).

A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits.
Curr. Biol. 8 (1), 34-45.

McMahon, H. T. (1999).

Endocytosis: an assembly protein for clathrin cages.
Curr. Biol. 9, R332-R335

Marguet, D.; Luciani, M. F.; Moynault, A.; Williamson, P. & Chimini, G. (1999).

Engulfment of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidylserine on phagocyte and prey.
Nat. Cell Biol. 1 (7), 454-456.

Mehlhorn H. & Ruthmann A. (1992)

Allgemeine Protozoologie. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.

Mellman, I., Fuchs, R. & Helenius, A. (1986).

Acidification of the Endocytic and Exocytic Pathways
Annual Review of Biochemistry 55, 663-700.

Meyer, M.; Mayer, T. & Tiedtke, A. (1998).

Maturation of phagosomes is accompanied by specific patterns of small GTPases. I
Electrophoresis 19 (14), 2528-2535.

Miao, E. A., Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I., & Aderem, A. (2006).

Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 beta via Ipaf.
NATURE IMMUNOLOGY 7 (6), 569-575.

Minuth, W. W., Kloth, S., Aigner, J., Sittinger, M. & Rockl, W. (1996).

Approach to an organo-typical environment for cultured cells and tissues.
Biotechniques 20:498-501.

Mishra, A., Eathiraj; S., Corvera, S. & Lambright; D. G. (2010).

Structural basis for Rab GTPase recognition and endosome tethering by the C₂H₂ zinc finger of Early Endosomal Autoantigen 1 (EEA1).
PNAS 107, 24, 10866-10871.

Mohrmann, K. & van der Sluijs, P. (1999).

Regulation of membrane transport through the endocytic pathway by rabGTPases.
Mol. Membr. Biol. 16, 81-87.

Molday, R. S. & MacKenzie, D. (1982).

Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells.
J Immunol Methods. 52 (3), 353-67.

Moorhead, G., Douglas, P., Cotelle, V., Harthill, J., Morrice, N., Meek, S., Deiting, U., Stitt, M., Scarabel, M., Aitken, A. & MacKintosh, C. (1999).

Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins.

Plant J. 18, 1–12.

Morrison, T. B.; Weis, J. J. & Wittwer, C. T. (1998).

Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification.

Biotechniques. 24 (6), 954-962.

Moya, C. E. & Jacobs, R. S. (2006).

Pseudopterosin A inhibits phagocytosis and alters intracellular calcium turnover in a pertussis toxin sensitive site in *Tetrahymena thermophila*. In: *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 143; Jg. 2006-08 (4), S. 436–443.

Mukherjee, S., Ghosh, R. N. & Maxfield, F. R. (1997).

Endocytosis.

Physiol. Rev. 77, 759-803.

Muller, W. A., Steinmann, R. M. & Cohn, Z. A. (1980).

The membrane proteins of the vacuolar system. II. Bidirectional flow between secondary lysosomes and plasma membrane.

J. Cell Biol. 86, 304-314.

Muruve, D. A., Petrilli, V., Zaiss, A. K., White, L. R., Clark, S. A., Ross, P. J., Parks, R. J. & Tschopp, J. (2008).

The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response.

Nature 452, 103–107.

Musacchio, A., Noble, M., Paupit, R., Wierenga, R. & Saraste, M. (1992).

Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain.

Nature. 359 (6398),851-5.

Nakamura, H., Sudo, T., Tsuiki, H., Miyake, H., Morisaki, T., Sasaki, J., Masuko, N., Kochi, M., Ushio, Y. & Saya, H. (1998).

Identification of a novel human homolog of the *Drosophila* dlg, P-dlg, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55.

FEBS Lett. 433, 63-67.

Nakashima, S., Wang, S., Hisamoto, N., Sakai, H., Andoh, M., Matsumoto, K. & Nozawa, Y. (1999).

Molecular cloning and expression of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase-related kinase from *Tetrahymena* cells.

The Journal of biological chemistry 274 (15), 9976-9983.

- Nieland, T. J., Tan, M. C., Monne-van Muijen, M., Koning, F., Kruisbeek, A. M. & van Bleek, G. M. (1996).**
Isolation of an immunodominant viral peptide that is endogenously bound to the stress protein GP96/GRP94.
Proc Natl Acad Sci USA. 93, 6135–6139.
- Nilsson, J. R. (1979).**
Phagotrophy in *Tetrahymena*. In: Levandowsky, M and Hunter, S. H. (ED.). *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, 2nd Edition, Vol. 2. XVI+509P. Academic Press, Inc.: New York, N.Y., USA; London, England. Illus. P339-380; Jg. 1979.
- Nilsson, J. R. (1970).**
Cytolysosomes in *Tetrahymena pyriformis* GL. I. Synchronized cells dividing in inorganic salt medium.
Compt. Rend. Tray. Lab. Carlsberg 38, 87-106.
- Nilsson, J. R. (1977).**
On food vacuoles in *Tetrahymena pyriformis* GL. I
Journal of Protozoology 241977 (4), 502–507.
- Nilsson, J. R. (1972).**
Further studies on vacuole formation in *Tetrahymena pyriformis* GL.
Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg 39 (6), 83-110.
- Nilsson, J. R. (1976).**
Physiological and structural studies on *Tetrahymena pyriformis* GL.
Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg 40 (18-1), 215-355.
- Nielsen, E.; Severin, F.; Backer, J. M.; Hyman, A. A. & Zerial, M. (1999).**
Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules.
Nat. Cell Biol. 1 (6), 376–382.
- Novak, P. & Dev, I. K. (1988).**
Degradation of a signal peptide by protease IV and oligopeptidase A.
J Bacteriol 170, 5067-5075.
- Obermaier B, Dauer M, Hertel J, Schad K, Endres S & Eigler A (2003).**
Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes.
Biol Proced Online 5:197-203
- Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D. C., Ganguly, S. & Dyda, F. (2001).**
Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation.
Cell 105 (2), 257–267.
- Odorizzi, G.; Babst, M. & Emr, S. D. (1998).**
Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body.
Cell 95 (6), 847–858.

- Ogura, Y., Sutterwala, F. S. & Flavell, R. A. (2006).**
The *inflammasome*: First line of the immune response to cell stress
CELL 126 (4), 659-662
- Okada, M.; Huston, C. D.; Mann, B. J.; Petri, W. A. Jr.; Kita, K. & Nozaki, T. (2005).**
Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*.
Eukaryotic Cell 4 (4), 827–831.
- Okada, M & Nozaki, T. (2006).**
New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis.
Arch Med Res. 37(2), 244-252.
- Olsen, J. V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M. L., Jensen, L. J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T. S., Nigg, E. A., Brunak, S. & Mann, M. (2010).**
Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis.
Sci. Signal. 3 (104), RA3.
- Orias, E. & Flacks, M. (1975)**
Macronuclear genetics of *Tetrahymena*. I. Random distribution of macronuclear genecopies in *T. pyriformis*, syngen 1.
Genetics, 79, 187-206.
- Orias, E. & Rasmussen, L. (1976).**
Dual capacity for nutrient uptake in *Tetrahymena* IV. Growth without food vacuoles.
Exp. Cell. Res. 102, 127-137.
- Padh, H., Ha, J., Lavasa, M. & Stecks, T. L. (1993).**
A Post-lysosomal Compartment in *Dictyostelium discoideum*.
J Biol Chem 268 (9), 6742-6747.
- Park, J-S. & Neiman, A. M. (2012).**
VPS13 regulates membrane morphogenesis during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*.
Journal of Cell Science 125, 3004-3011.
- Pearse, B. M. F. & Crowther, R. A. (1987).**
Structure and assembly of coated vesicles.
Annu. Rev. Biophys. Chem. 16, 49-68.
- Pennock, D. G., Thatcher, T., Bowen, J., Bruns, P. J. & Gorovsky, M. A. (1988).**
A conditional mutant having paralyzed cilia and a block in cytokinesis is rescued by cytoplasmic exchange in *Tetrahymena thermophila*.
Genetics 120, 697-705.
- Piccinni, E., Irato, P., Coppellotti, O. & Guidolin, L. (1987).**
Biochemical and ultrastructural data on *Tetrahymena pyriformis* treated with copper and cadmium.
J Cell Sci. (3), 283-93.

Pfaffl, M. W. (2001).

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
Nucleic Acids Res. 29 (9): 45.

Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W. & Dempfle, L. (2002b).

Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.
Nucleic Acids Res. 30(9): 36.

Pfaffl, M.W., Georgieva, T.M., Georgiev, I.P., Ontsouka, E., Hageleit, M. & Blum, J.W. (2002).

Realtime RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species.
Domest Anim Endocrinol. 22(2): 91-102 (a).

Picotti, P., Bodenmiller, B., Mueller, L. N., Domon, B. & Aebersold, R. (2009).

Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics.
Cell. 138 (4), 795-806.

Pitt, A.; Mayorga, L. S.; Schwartz, A. L. & Stahl, P. D. (1992a).

Transport of phagosomal components to an endosomal compartment.
Journal of Biological Chemistry 267 (1), 126–132.

Pitt, A.; Mayorga, L. S.; Stahl, P. D. & Schwartz, A. L. (1992b).

Alterations in the protein composition of maturing phagosomes.
Journal of Clinical Investigation 90; Jg. 1992 (5), S. 1978–1983.

Pizon, V., Desjardins, M., Bucci, C., Parton, R. G. & Zerial, M. (1994).

Association of rap1a and rap1b proteins with late endocytic/phagocytic compartments and rap2a with the Golgi complex.
J. Cell Sci. 107, 1661-1670

Plattner, H. (2013).

Contractile vacuole complex--its expanding protein inventory.
Int Rev Cell Mol Biol. 306, 371-416.

Plattner, H. (2010).

Membrane trafficking in protozoa SNARE proteins, H⁺-ATPase, actin, and other key players in ciliates.
Int Rev Cell Mol Biol. 280, 79-184.

Prescott, D. M. (1994)

The DNA of ciliated protozoa.
Microbiol. Rev. 58, 233-267

Pozuelo-Rubio, M. (2011).

Regulation of autophagic activity by 14-3-3 ζ proteins associated with class III phosphatidylinositol-3-kinase.
Cell Death Differ. 18 (3), 479–492.

Pozuelo-Rubio, M., Geraghty, K. M., Wong, B. H., Wood, N. T., Campell, D. G., Morrice, N. & Mackintosh, C. (2004).

14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking.

Biochem J. 379 (2), 395-408.

Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A. & Lunardi, J. (1997).

Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.

Electrophoresis. (3-4):307-16.

Rabinowitz, S., Horstmann, H., Gordon, S. & Griffiths, G. (1992).

Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages.

J. Cell Biol. 116,95-112.

Rasmussen, L. & Modeweg-Hansen, L. (1973).

Cell multiplication in *Tetrahymena* cultures after addition of particulate material. In: *Journal of Cell Science* 12; Jg. 1973 (1), S. 275–286

Rasmussen, R., Meuer, S, Wittwer, C, & Nakagawara, K. (2001).

Quantification on the LightCycler.

Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications Springer Press, Heidelberg.

Rasmussen, C. & Wiebe, C. (1999).

Cloning of a *Schizosaccharomyces pombe* homologue of elongation factor 1 alpha by two-hybrid selection of calmodulin-binding proteins. I

Biochemistry and Cellbiology-Biochimie et Biologie Cellulaire 77 (5), 421–430.

Rasmussen, R. (2001).

Quantification on the LightCycler.

Stefan Meuer, Carl Wittwer und Kan-Ichi Nakagawara (Hg.): Rapid Cycle Real-Time PCR: Springer Berlin Heidelberg, 21–34.

Renaud, F. L.; Colon, I.; Lebron, J.; Ortiz, N.; Rodriguez, F. & Cadilla, C. (1995).

A novel opioid mechanism seems to modulate phagocytosis in *Tetrahymena*.

Journal of Eukaryotic Microbiology 42 (3), 205–207.

Rezabek, B. L., Rodriguez-Paris, J. M., Cardelli, J. A. & Chia, C. P. (1997).

Phagosomal proteins of *Dictyostelium discoideum*.

J. Eukaryot. Microbiol. 44, 284 -292.

Ricketts, T. R. (1972a).

The interaction of particulate material and dissolved foodstuffs in food uptake by *Tetrahymena pyriformis*.

Archiv für Mikrobiologie 81, (4), 344.

Ricketts, T. R. (1972b).

The induction of endocytosis in starved *Tetrahymena pyriformis*.

Journal of Protozoology (2), 373–375.

Ricketts, T. R. & Rappitt, A. F. (1975).

A radioisotopic and morphological study of the uptake of materials into food vacuoles by *Tetrahymena pyriformis* GL-9.
Protoplasma 86 (4), 321-337.

Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M. (2005).

Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes.
Cell. 122, 735-749.

Riezman, H., Woodman, P. G., van Meer, G. & Marsh, M. (1997).

Molecular mechanisms of endocytosis.
Cell 91, 731-738.

Roberts, M. R. (2000).

Regulatory 14-3-3 protein-protein interactions in plant cells.
Curr. Opin. Plant Biol. 3, 400-405.

Rodman J. S. & Wandinger-Ness, A. (2000).

Rab GTPases coordinate endocytosis.
J Cell Sci. 113(2), 183-192.

Rogers, L. D. & Foster, L. J. (2007).

The dynamic phagosomal proteome and the contribution of the endoplasmic reticulum.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, (47), 18520-18525.

Roth, D., Morgan, A. & Burgoyne, R. D. (1993).

Identification of a key domain in annexin and 14-3-3 proteins that stimulate calcium-dependent exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells.
FEBS Lett. 320 (3), 207-210.

Rothman, J. E. (1994).

Mechanisms of intracellular protein transport. In: *Nature* 372; Jg. 1994 (6501)

Rubio, M. P., Geraghty, K. M., Wong, B. H. C., Wood, N., Campbell, D. G., Morrice, N. & Mackintosh, C. (2004).

14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking.
Biochem. J. 379, 395-408.

Russell, D. G., Xu, S & Charaborty, P. (1992).

Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages.
Cell Sci 103, 1193-1210

Sachse, C. (2010):

Tetrahymena thermophila: An expression platform for the production of viral antigens.
Dissertation. Bergische Universität Wuppertal. Fakultät der Mathematik und Naturwissenschaften.

Salzman, N. H.; Ghosh, Dipankar; Huttner, K. M.; Paterson, Y. & Bevens, C. L. (2003).
Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin.

Nature 422 (6931), 522–526.

Samaranayake, H. S.; Cowan, A. E. & Klobutcher, L. A. (2011).

Vacuolar Protein Sorting Protein 13A, TtVps13A, Localizes to the *Tetrahymena thermophila* Phagosome Membrane and Is Required for Efficient Phagocytosis. I

Eukaryotic Cell 10, (9), S. 1207–1218.

Sanchez, J., Rouge, V., Pisteur, M., Ravier, F., Tonella, L., Moosmayer, M., Wilkins, M. R. & Hochstrasser, D. F. (1997).

Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients.

Electrophoresis 18, 324-327.

Sansonetti, P. J. (1991).

Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by *Shigella* species.

Rev. Infect. Diseases 3, 285-292.

Santini, S. M., Lapenta, C., Logozzi, M., Parlato, S., Spada, M., Di Pucchio T. & Belardelli F (2000).

Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice.

J Exp Med 191:1777-1788.

Santoni, V., Molloy, M. & Rabilloud, T. (2000).

Membrane proteins and proteomics: un amour impossible?

Electrophoresis. Apr;21(6):1054-70.

Schmid, S. L. (1997).

Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: An integrated process.

Annu. Rev. Biochem. 66, 511–548.

Schmittgen, T. D., Zakrajsek, B. A., Mills, A. G., Gorn, V., Singer, M. J. & Reed, M. W. (2002).

Quantitative Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods1

Analytical Biochemistry 285, 194–204.

Schneider, J. J., Unholzer, A., Schaller, M., Schäfer-Korting, M. & Korting, H. C. (2005).

Human defensins.

J. Mol. Med. 83, 587–595.

Schroeder, C. C., Fok, A. K. & Allen, R. D.(1990).

Vesicle Transport along Microtubular Ribbons and Isolation of Cytoplasmic Dynein from Paramecium

The Journal of Cell Biology 111 (6), 2553-2562.

- Schütt, C. & Bröcker, B. (2011).**
Grundwissen Immunologie. 3. Aufl.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Schwanhäuser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J, Chen, W. & Selbach, M. (2011).**
Global quantification of mammalian gene expression control
Nature 473, 337-342.
- Scianimanico, S., Destrosiers, M., Dermine, J. F., Meresse, S., Descoteaux, A. & Desjardins, M. (1999).**
Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes.
Cell. Microbiol. 1, 19-32.
- Sechi, A. S. & Wehland, J. (2000).**
The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane.
J. Cell. Sci. 113 Pt 21, 3685–3695.
- Shandala, T., Lim, C., Sorvina, A. & Brooks, D. A. (2013).**
A *Drosophila* Model to Image Phagosome Maturation
Cells 2, 188-201.
- Shang, Y., Song, X., Bowen, J., Corstanje, R., Gao, Y., Gaertig, J. & Gorovsky, M. A. (2002a).**
A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockout, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in *Tetrahymena thermophila*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 3734-3739.
- Shang, Y., Li, B. & Gorovski, M. A. (2002b).**
Tetrahymena thermophila contains a conventional γ -Tubulin that is differentially required for the maintenance of different MTOCs.
J. Cell Biol. 158, 1195-1206.
- Shen, L., Sigal, L. J., Boes, M., & Rock, K. L. (2004).**
Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crossrepresentation in vivo.
Immunity 21, 155-165.
- Shiozaki, N., Nakano, K., Kushida, Y., Noguchi, T. Q., Uyeda, T. Q., Wloga, D., Dave, D., Vasudevan, K. K., Gaertig, J. & Numata, O. (2013).**
ADF/cofilin is not essential but is critically important for actin activities during phagocytosis in *Tetrahymena thermophila*.
Eukaryot Cell. 12 (8), 1080-1086.
- Shui W., Sheu, L., Liu, J., Smart, B., Petzold, C. J., Hsieh, T., Pitcher, A., Keasling, J. D. & Bertozzi, C. R. (2008).**
Membrane proteomics of phagosomes suggests a connection to autophagy.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 16952–16957

Silverstein, S. C. (1977).

Endocytic uptake of particles by mononuclear phagocytes and penetration of obligate intracellular parasites.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 26 (6), 161–169.

Silverstein, S. C., S. Greenberg, F. Di Virgilio, & T. H. Steinberg. 1989.

Phagocytosis.

Fundamental Immunology. W. F. Paul. Raven Press, New York, 703-720.

Sinai, A. P., & Joiner, K. A. (1997).

Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles.

Annu. Rev. Microbiol. 51, 415-462.

Smith-Somerville, H. E. (1989).

Correlation of digestive stage with changes in amphiphilic phagosomal proteins of *Tetrahymena vorax*.

European Journal of Cell Biology (1), 48–54.

Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. & Rothman, J. E. (1993).

SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion.

Nature 362 (6418), 318-24.

Souaze, F.; Ntodou-Thome, A.; Tran, C.Y.; Rostene, W. & Forgez, P.(1996).

Quantitative RT-PCR: limits and accuracy.

Biotechniques. 21(2), 280-285

Srivastava, P. K., DeLeo, A. B. & Old, L. J.(1986).

Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 83 (10),3407–3411.¶

Steinberg, B. E. & Grinstein, S. (2008).

Pathogen destruction versus intracellular survival: the role of lipids as phagosomal fate determinants.

J. Clin. Invest. 118 (6), 2002–2011.

Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O. & Zerial, M. (1995).

Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion.

Cell. 83, 423-432.

Stossel TP. 1999.

The early history of phagocytosis.

Advances in Cell and Molecular Biology of Membranes and Organelles, 5, Phagocytosis: The Host, ed. S Gordon, 5:3–18. JAI. 536.

Strugill-Koszycki, S., Schaible, U. E. & Russel, D. G. (1996).

Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state of normal phagosome biogenesis.

EMBO J. 15, 6960-6968.

Stuart, L. M., Boulais, J., Charriere, G. M., Hennessy, E. J., Brunet, S., Jutras, I., et al. (2007).

A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome.
Nature 445, 95–101.

Südhof, T. C. & Rizo, J. (2011).

Synaptic Vesicle Exocytosis
Cold Spring Harb Perspect Biol

Suzuki, T., Franchi, L., Toma, C., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Inohara, N. et al. (2007).

Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages.
PLOS PATHOGENS 3 (8), 1082-109.

Suzuki, T., Higgins, P. J. & Crawford, D. R. (2002).

Control selection for RNA quantitation.
Biotechniques. 29 (2), 332-7.

Sweeney, R. et al. (1996).

Antisense ribosomes: rRNA as a vehicle for antisense RNAs.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 8518-8523.

Szyk, A., Deaconescu, A. M., Piszczek, G. & Roll-Mecak, A. (2011).

Tubulin tyrosine ligase structure reveals adaptation of an ancient fold to bind and modify tubulin.
Nat. Struct. Mol. Biol. 18, 1250–1258.

Thilo, L., Stroud, E. & Haylett, T. (1995).

Maturation of early endosomes and vesicular traffic to lysosomes in relation to membrane recycling.
Journal of Cell Science 108, 1791-1803.

Tooze, S. A., Martens, G. J., & Huttner, W. B. (2001).

Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE.
Trends Cell Biol. 11, 116–122.

Tiedtke, A.; Hünseler, P.; Florin-Christensen, J. & Florin-Christensen, M. (1988).

Exocytosis, endocytosis and membrane recycling in *Tetrahymena thermophila*. In: *Journal of Cell Science* 89; Jg. 1988-04, S. 515–520.

Ting, J. P. Y. & Davis, B. K. (2005).

Caterpillar: A novel gene family important in immunity, cell death, and diseases.
ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY 23, 387-414.

Turk, V.; Turk, B. & Turk, D. (2001).

Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities.
The EMBO Journal 20 (17), 4629–4633.

- Turkewitz, A. P., Orias, E. & Kapler, G. (2002)**
Functional genomics: the coming of age for *Tetrahymena thermophila*.
Trends Genet. 18, 35-40.
- Turkewitz, A. P. & Bright, L. J. (2011).**
A Rab-based view of membrane traffic in the ciliate *Tetrahymena thermophila*.
Small GTPases 2 (4), 222-226.
- Thellin *et al.*, (1999).**
Housekeeping genes as internal standards: use and limits
Journal of Biotechnology 75, 291-295
- Vainberg, I. E., Lewis, S. A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vanderkerckhove, J., Klein, H. L., & Cowan, N. J. (1998).**
Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to the cytosolic chaperonin.
Cell 93, 863-873.
- Valcarce, G.; Munoz, L.; Nusblat, A.; Nudel, C. & Florin-Christensen, J. (2001).**
The improvement of milk by cultivation with ciliates.
Journal of Dairy Science 84 (10), 2136-2143.
- Vallee, R. B., Williams, J. C., Varma, D. & Barnhart, L. E. (2004).**
Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport.
J Neurobiol 58(2), 189-200.
- Vega, V. L. & De Maio, A. (2005).**
Increase in phagocytosis after geldanamycin treatment or heat shock: role of heat shock proteins.
J Immunol 175, 5280-5287.
- Vergne, I.; Chua, J. & Deretic, V. (2003).**
Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca²⁺/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade.
J. Exp. Med. 198:653-659.
- Vergne, I., *et al.* (2005).**
Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102:4033-4038
- Via, L. E.; Deretic, D.; Ulmer, R. J.; Hibler, N. S.; Huber, L. A. & Deretic, V. (1997).**
Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7.
J. Biol. Chem. 272 (20), 13326-13331.
- Vieira, O. V.; Botelho, R. J.; Rameh, L.; Brachmann, S. M.; Matsuo, T.; Davidson, H. W. *et al.* (2001).**
Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation.
J. Cell Biol. 155 (1), 19-25.

Vogel, C. & Marcotte, E. M. (2012).

Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses
Nature Reviews Genetics 13, 227-232.

Volinia, S.; Dhand, R.; Vanhaesebroeck, B.; MacDougall, L. K.; Stein, R.; Zvelebil, M. J. et al. (1995).

A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system.
EMBO J. 14 (14), 3339–3348.

Voßkühler, C. & Tiedtke, A. (1993).

Magnetic separation of phagosomes of defined age from *Tetrahymena thermophila*.
Journal of Eukaryotic Microbiology 401993 (5), S. 556–562.

Wang, X. & Dickerson, H. W. (2002).

Surface Immobilization Antigen of the Parasitic Ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* Elicits Protective Immunity in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*)
Clin Diagn Lab Immunol.; 9 (1), 176–181.

Wang, Y. L. & Goren, M. B. (1987).

Differential and sequential delivery of fluorescent lysosomal probes into phagosomes in mouse peritoneal macrophages.
J. Cell Biol. 104, 1749-1754.

Washburn, M. P., Wolters, D. & Yates III, J. R. (2001).

Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology.
Nat. Biotechnol. 19, 242–247.

Wheatley, D. N., Rasmussen, L. & Tiedtke, A. (1994)

Tetrahymena: a model for growth, cell cycle and nutritional studies, with biotechnological potential.
BioEssays 16, 367-372.

Wilkes, D. E. & Otto, J. J. (2003).

Profilin functions in cytokinesis, nuclear positioning, and stomatogenesis in *Tetrahymena thermophila*.
J. Eukaryot. Microbiol. 50 (4), 252–262.

Williams, N. E.; Tsao, C.; Bowen, J.; Hehman, G. L.; Williams, R. J. & Frankel, J. (2006).

The actin gene ACT1 is required for phagocytosis, motility, and cell separation of *Tetrahymena thermophila*.
Eukaryotic Cell 5 (3), 555–567.

Wilson, C. L. (1999).

Regulation of Intestinal -Defensin Activation by the Metalloproteinase Matrilysin in Innate Host Defense.
Science 286 (5437), 113–117.

Wittwer, C. T. & Garling, D. J. (1991)

Rapid cycle DNA amplification: Time and temperature optimization.
BioTechniques, 10: 76-83.

Wloga, D. & Gaertig, J. (2010).

Post-translational modifications of microtubules
Journal of Cell Science 124 154.

Wolters, D. A., Washburn, M. P. & Yates, J. R. (2001).

An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics.“
Anal Chem 73(23), 5683–5690

Wong, S. H., Xu, Y., Zhang, T., Griffith, G., Lowe, S. L., Subramaniam, V. N., Seow, K., T. & Hong, W. (1999).

GS32, a novel Golgi SNARE of 32 kDa, interacts preferentially with syntaxin 6.
Mol Biol Cell 10 (1), 119-134.

Woodman, P. G. (2000).

Biogenesis of the sorting endosome: the role of Rab5.
Traffic 1, 695-701.

Wu, C. C. & Yates, J. R. (2003).

The application of mass spectrometry to membrane proteomics.
Nat Biotechnol 21 (3), 262-7.

Wuitschick, J. D. & Karrer, K. M. (1999)

Analysis of genomic G +C content, codon usage, initiator codon context and translation termination sites in *Tetrahymena thermophila*.
J. Eukaryot. Microbiol. 46, 239-247.

Wurmser, A. E.; Gary, J. D. & Emr, S. D. (1999).

Phosphoinositide 3-kinases and their FYVE domain-containing effectors as regulators of vacuolar/lysosomal membrane trafficking pathways.
J. Biol. Chem. 274 (14), 9129–9132.

Wurtele, M., Jelich-Ottmann, C., Wittinghofer, A. & Oecking, C. (2003).

Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex.
EMBO J. 22, 987–994.

Xanthopoulou, A., Anagnostopoulos, D., Vougas, K., Anagnostopoulos, A. K., Alexandriou, A., Spyrou, G., Sifaka-Kapadal, A. & Tsangaris, G. T. (2010).

A Two-dimensional Proteomic Profile of *Tetrahymena thermophila* Whole Cell Lysate *in vivo* 24, 443-456.

Yeung, T. & Grinstein, S. (2007).

Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis.
Immunol. Rev. 219, 17–36.

Yu, G. L. & Blackburn, E. H. (1991).

Developmentally programmed healing of chromosomes by telomerase in *Tetrahymena*.
Cell 67, 823-832.

Zhang, H. S., Zhao, J. W., Wang, H., Zhang, H. Y., Ji, Q. Y., Meng, L. J., Xing, F. J., Yang, S. T. & Wang, Y. (2014).

LIM kinase 1 is required for insulin-dependent cell growth of osteosarcoma cell lines.
Mol Med Rep. (1), 103-8.

Zhang, C., Bai, N., Zhang, Z., Liang, N., Dong, L., Xiang, R. & Liu, C. (2012).

TLR2 Signaling subpathways regulate TLR9 signaling for the effective induction of IL-12 upon stimulation by heat-killed *Brucella abortus*.
Cellular & Molecular Immunology 9.

Zhang T.; Wong S. H.; Tang B. L.; Xu Y. & Hong W. (1999).

Morphological and functional association of Sec22b/ERS-24 with the pre-Golgi intermediate compartment.
Mol Biol Cell. 10, 435–453

Zhao, J. H., Reiske, H. & Guan, J. L. (2008).

Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase.
J Cell Biol. 143 (7), 1997-2008.

Zerial, M. & McBride, H. (2001).

Rab proteins as membrane organizers.
Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2, 107-117.

8. Anhang

8.1. Ergebnisse der MudPIT-Untersuchung

Die folgenden Tabellen stellen die MudPIT-Ergebnisse in zugeordneten funktionellen Proteinklassen (biologische Prozesse) dar. Identifiziert wurden Proteine aus nascenten (30 sek) und kondensierten (5 min) Phagosomen.

Tab. 21: Metabolismus und Energistoffwechsel. Die Zahlen in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t. gene ID*: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
76.m00142	Thioredoxin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253850 76 = Protein-disulfide-isomerase-related protein	1	2
193.m00049	Thioredoxin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254581 193	1	
35.m00176	Thioredoxin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254597 35	1	1
71.m00217	Thioredoxin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254823 71	1	
27.m00309	Proline dehydrogenase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254688 27	1	1
41.m00277	Protease sohB-related <i>T. thermophila</i> chr_0 8254587 41	1	
90.m00186	Proteasome A-type and B-type family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254764 90		1
57.m00252	Protein disulfide-isomerase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254403 57 = Prolyl-4-hydroxylase (thioredoxin domains)	3	4
192.m00071	Protein disulfide-isomerase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254757 192	2	2
48.m00237	Protein-tyrosine phosphatase containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	2	
59.m00263	Nitroreductase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254527 59	1	
191.m00040	Oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254167 191	1	
13.m00432	Oxidoreductase, FAD/FMN-binding family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	3	3
2.m02297	Oxidoreductase, FAD/FMN-binding family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	1	
226.m00055	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254433 226	1	
1.m01074	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	1	
62.m00188	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253815 62	1	

Tab. 21. fortlaufend

<i>T.t.</i> gene ID	Protein	30 sek	5 min
1.m00883	UBA/TS-N domain containing protein T. thermophila chr_0 8254803 1	2	
3.m01719	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family protein T. thermophila chr_0 8254659 3	1	
35.m00290	Ubiquitin family protein T. thermophila chr_0 8254597 35	3	2
35.m00291	Ubiquitin family protein T. thermophila chr_0 8254597 35	4	3
35.m00292	Ubiquitin family protein T. thermophila chr_0 8254597 35	2	
35.m00293	Ubiquitin family protein T. thermophila chr_0 8254597 35	3	2
35.m00294	Ubiquitin family protein T. thermophila chr_0 8254597 35	2	
35.m00295	Ubiquitin family protein T. thermophila chr_0 8254597 35	2	
35.m00296	Ubiquitin family protein T. thermophila chr_0 8254597 35	3	2
35.m00297	Ubiquitin family protein T. thermophila chr_0 8254597 35	2	
35.m00298	Ubiquitin family protein T. thermophila chr_0 8254597 35	2	
94.m00103	Ubiquitin family protein T. thermophila chr_0 8254644 94	3	3
6.m00442	Ubiquitin family protein T. thermophila chr_0 8254697 6	1	
136.m00074	Ubiquitin family protein T. thermophila chr_0 8254712 136	3	2
13.m00531	Ubiquitin transferase, HECT domain family protein T. thermophila chr_0 8254776 13	1	
12.m00352	Ubiquitin-activating enzyme E1 family protein T. thermophila chr_0 8254545 12	1	
2.m02165	Ubiquitin-activating enzyme E1 family protein T. thermophila chr_0 8254819 2	2	1
100.m00144	Ubiquitin-conjugating enzyme family protein T. thermophila chr_0 8254028 100	2	1
68.m00229	Ubiquitin-conjugating enzyme family protein T. thermophila chr_0 8254385 68	1	1
11.m00345	Thioredoxin and glutathione reductase family protein T. thermophila chr_0 8254747 11		2
20.m00376	Thioredoxin family protein T. thermophila chr_0 8254373 20	1	
76.m00142	Thioredoxin family protein T. thermophila chr_0 8253850 76 = Protein-disulfide-isomerase-related protein	1	2
193.m00049	Thioredoxin family protein T. thermophila chr_0 8254581 193	1	
35.m00176	Thioredoxin family protein T. thermophila chr_0 8254597 35	1	1
71.m00217	Thioredoxin family protein T. thermophila chr_0 8254823 71	1	
15.m00408	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein T. thermophila chr_0 8254638 15	1	
103.m00129	Papain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8253891 103 = Lysosomal phospholipase A1/cathepsin L	2	
123.m00091	Papain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8254367 123	1	
125.m00080	Papain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8254370 125 = Cathepsin L/tetrain	3	
88.m00155	Papain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8254584 88 = Cysteine-proteinase	1	

Tab. 21 fortlaufend

<i>T.t.</i> gene ID	Protein	30 sek	5 min
27.m00309	Proline dehydrogenase family protein T. thermophila chr_0 8254688 27	1	1
41.m00277	Protease sohB-related T. thermophila chr_0 8254587 41	1	
90.m00186	Proteasome A-type and B-type family protein T. thermophila chr_0 8254764 90		1
57.m00252	Protein disulfide-isomerase domain containing protein T. thermophila chr_0 8254403 57 = Prolyl-4-hydroxylase (thioredoxin domains)	3	4
192.m00071	Protein disulfide-isomerase domain containing protein T. thermophila chr_0 8254757 192	2	2
48.m00237	Protein-tyrosine phosphatase containing protein T. thermophila chr_0 8254745 48	2	
59.m00263	Nitroreductase family protein T. thermophila chr_0 8254527 59	1	
191.m00040	Oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein T. thermophila chr_0 8254167 191	1	
13.m00432	Oxidoreductase, FAD/FMN-binding family protein T. thermophila chr_0 8254776 13	3	3
2.m02297	Oxidoreductase, FAD/FMN-binding family protein T. thermophila chr_0 8254819 2	1	
226.m00055	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein T. thermophila chr_0 8254433 226	1	
1.m01074	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein T. thermophila chr_0 8254803 1	1	
62.m00188	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein T. thermophila chr_0 8253815 62	1	
15.m00408	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein T. thermophila chr_0 8254638 15	1	
103.m00129	Papain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8253891 103 = Lysosomal phospholipase A1/cathepsin L	2	
123.m00091	Papain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8254367 123	1	
125.m00080	Papain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8254370 125 = Cathepsin L/tetrain	3	
88.m00155	Papain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8254584 88 = Cysteine-proteinase	1	
5.m00542	Papain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8254650 5 = Cathepsin L-like protein	1	
92.m00126	Papain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8254653 92 = Cathepsin B	2	
13.m00464	Papain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8254776 13 = Cathepsin L	1	
4.m00578	Peptidase C13 family protein T. thermophila chr_0 8254811 4	2	
146.m00082	Peptidase M16 inactive domain containing protein T. thermophila chr_0 8254359 146	2	2
63.m00255	Peptidase M16 inactive domain T. thermophila chr_0 8254487 63	2	2

Tab. 21 fortlaufend

<i>T.t.</i> gene ID	Protein	30 sek	5 min
156.m00085	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type family protein T. thermophila chr_0 8254648 156	1	1
68.m00207	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type family protein T. thermophila chr_0 8254385 68	1	
10.m00322	Peroxidase family protein T. thermophila chr_0 8254582 10	1	
76.m00171	Malic enzyme, NAD binding domain containing protein T. thermophila chr_0 8253850 76		1
2.m02332	CRAL/TRIO domain containing protein T. thermophila chr_0 8254819 2	1	
12.m00531	BBC42 T. thermophila chr_0 8254545 12	1	
24.m00273	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component family protein T. thermophila chr_0 8254649 24	1	
7.m00494	2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase family protein T. thermophila chr_0 8254716 7	2	3
94.m00144	ATP-dependent protease La family protein T. thermophila chr_0 8254644 94	1	
67.m00163	Citrate synthase family protein T. thermophila chr_0 8254459 67	3	4
31.m00360	Citrate synthase T. thermophila chr_0 8254548 31	1	
12.m00283	Coenzyme A transferase family protein T. thermophila chr_0 8254545 12	2	3
50.m00187	Coenzyme A transferase family protein T. thermophila chr_0 8254609 50	1	
4.m00445	Cytosol aminopeptidase family, catalytic domain containing protein T. thermophila chr_0 8254811 4	1	1
134.m00090	Dehydrogenase, isocitrate/isopropylmalate family protein T. thermophila chr_0 8254552 134	1	1
3.m01838	Dihydrolipoamide dehydrogenase family protein T. thermophila chr_0 8254659 3	1	
5.m00524	Electron transfer flavoprotein, alpha subunit containing protein T. thermophila chr_0 8254650 5	2	2
51.m00219	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase containing protein T. thermophila chr_0 8254437 51	1	
59.m00278	Fructose-bisphosphate aldolase class-I family protein T. thermophila chr_0 8254527 59	2	
3.m02000	Fumarylacetoacetase family protein T. thermophila chr_0 8254659 3		1
37.m00230	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein T. thermophila chr_0 8254756 37	1	
2.m02347	Malate dehydrogenase family protein T. thermophila chr_0 8254819 2	1	2
67.m00253	Pyruvate dehydrogenase complex dihydrolipoamide acetyltransferase family protein T. thermophila chr_0 8254459 67	2	2
16.m00262	Pyruvate dehydrogenase E1 component T. thermophila chr_0 8254617 16	2	
3.m01828	Succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit containing protein T. thermophila chr_0 8254659 3	3	2
5.m00542	Papain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8254650 5 = Cathepsin L-like protein	1	
92.m00126	Papain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8254653 92 = Cathepsin B	2	

Tab. 21 fortlaufend

<i>T.t.</i> gene ID	Protein	30 sek	5 min
113.m00086	Calpain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8254377 113	1	2
16.m00506	Calpain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8254617 16	2	1
4.m00497	Calpain family cysteine protease containing protein T. thermophila chr_0 8254811 4	2	1
254.m00025	Catalase family protein T. thermophila chr_0 8254007 254		1
54.m00196	Eukaryotic aspartyl protease family protein T. thermophila chr_0 8254593 54	3	1
211.m00046	Glutamate/Leucine/Phenylalanine/Valine dehydrogenase family protein T. thermophila chr_0 8254199 211	2	2
33.m00180	Glutaredoxin family protein T. thermophila chr_0 8254010 33	1	
106.m00156	Glutaredoxin-related protein T. thermophila chr_0 8254422 106	1	
11.m00319	Glutathione peroxidase family protein T. thermophila chr_0 8254747 11	1	
76.m00152	Glutathione S-transferase, N-terminal domain containing protein T. thermophila chr_0 8253850 76	1	
43.m00274	Glutathione S-transferase, N-terminal domain containing protein T. thermophila chr_0 8254666 43	3	2
72.m00143	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I family protein T. thermophila chr_0 8254786 72	1	2
4.m00469	Glycine cleavage system H protein T. thermophila chr_0 8254811 4		1
134.m00081	Glycine dehydrogenase family protein T. thermophila chr_0 8254552 134	2	
53.m00242	Glycosyl hydrolases family 31 protein T. thermophila chr_0 8254395 53	2	
19.m00401	Glycosyl hydrolases family 38 protein T. thermophila chr_0 8254665 19 = α -Mannosidase	2	
6.m00433	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing protein T. thermophila chr_0 8254697 6	1	
46.m00183	Phosphoenolpyruvate carboxykinase T. thermophila chr_0 8254475 46	2	3
1.m01041	Phosphoenolpyruvate phosphomutase precursor T. thermophila chr_0 8254803 1	2	1
45.m00208	Phosphoesterase family protein T. thermophila chr_0 8254814 45	1	
45.m00209	Phosphoesterase family protein T. thermophila chr_0 8254814 45	1	
45.m00210	Phosphoesterase family protein T. thermophila chr_0 8254814 45	1	
1833.m00002	Phosphoesterase family protein T. thermophila chr_0 8255700 1833	1	
77.m00207	Phosphoglucomutase/phosphomannomutase, C-terminal domain containing protein T. thermophila chr_0 8254782 77		1
8.m00447	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type family protein T. thermophila chr_0 8254752 8		1
21.m00206	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type family protein T. thermophila chr_0 8254406 21	1	1

Tab. 21 fortlaufend

<i>T.t.</i> gene ID	Protein	30 sek	5 min
4.m00602	Succinyl-CoA synthetase, alpha subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	1	1
69.m00153	Succinyl-CoA synthetase, beta subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254428 69	1	1
49.m00188	Succinyl-CoA synthetase, beta subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254607 49	1	1
5.m00550	Succinyl-CoA synthetase, beta subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5	1	1
37.m00311	Superoxide dismutase , putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254756 37	2	2
37.m00310	Superoxide dismutase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254756 37	1	
131.m00134	Transketolase, C-terminal domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254737 131	2	
183.m00027	Transketolase, pyridine binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254634 183	1	
8.m00329	Transketolase, pyridine binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8	1	
99.m00158	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, NAD binding domain <i>T. thermophila</i> chr_0 8254579 99	1	1
244.m00024	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254423 244	1	
31.m00346	Acyl carrier protein reductase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31 = Peroxisomal multifunctional enzyme	3	3
12.m00482	Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254545 12	2	1
36.m00308	Adenosylhomocysteinase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254460 36		1
115.m00117	AhpC/TSA family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254515 115	1	
270.m00046	AhpC/TSA family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254622 270	2	1
118.m00154	Aldehyde dehydrogenase (NAD) family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254476 118		1
140.m00086	Aldehyde dehydrogenase (NAD) family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254483 140	2	2
67.m00209	Aldehyde dehydrogenase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67	1	
73.m00168	Carbonic anhydrase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254486 73	1	
160.m00088	Acetyl-CoA acyltransferases family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254543 160	1	3
166.m00059	Acetyl-CoA acyltransferases family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254682 166	2	2
2.m02109	Aconitate hydratase 1 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	1	2
16.m00260	ACR285Cp-related <i>T. thermophila</i> chr_0 8254617 16	1	
126.m00118	Branched-chain amino acid aminotransferase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254284 126	1	
13.m00464	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13 = Cathepsin L	1	

Tab. 21 fortlaufend

<i>T.t.</i> gene ID	Protein	30 sek	5 min
10.m00474	Conserved hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254582 10	3	2
3.m01633	Cystathionine beta-lyase T. thermophila chr_0 8254659 3	1	
48.m00289	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein T. thermophila chr_0 8254745 48	2	
4.m00381	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein T. thermophila chr_0 8254811 4	2	1
4.m00360	FAD binding domain containing protein T. thermophila chr_0 8254811 4	1	
251.m00042	Isocitrate lyase family protein T. thermophila chr_0 8254530 251	1	2
49.m00215	Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase, type 1 family protein T. thermophila chr_0 8254607 49	1	
44.m00211	MaoC like domain containing protein T. thermophila chr_0 8254555 44	2	
83.m00142	Methionine aminopeptidase, type I family protein T. thermophila chr_0 8254563 83	1	1
28.m00238	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase family protein T. thermophila chr_0 8254379 28	1	3
194.m00023	MYND finger family protein T. thermophila chr_0 8253992 194 = Squalene-hopene cyclase/terpenesynthase	1	
31.m00252	Pectinacetylerase family protein T. thermophila chr_0 8254548 31	1	
92.m00134	Phosphoglycerate mutase 1 family protein T. thermophila chr_0 8254653 92	2	2
87.m00138	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein T. thermophila chr_0 8254479 87	2	1
14.m00412	Triosephosphate isomerase T. thermophila chr_0 8254798 14	2	1
225.m00052	Tubulin-tyrosine ligase family protein T. thermophila chr_0 8254469 225	1	
269.m00022	Histidine acid phosphatase family protein T. thermophila chr_0 8254361 269		1
25.m00418	Histidine acid phosphatase family protein T. thermophila chr_0 8254600 25	1	
157.m00084	Histidine acid phosphatase family protein T. thermophila chr_0 8254673 157	2	
28.m00361	Aminotransferase, classes I and II family protein T. thermophila chr_0 8254379 28		1
132.m00110	Aminotransferase, class III family protein T. thermophila chr_0 8254491 132	2	
102.m00101	Aminotransferase, class V family protein T. thermophila chr_0 8253823 102	1	1
15.m00570	Aspartate aminotransferase T. thermophila chr_0 8254638 15	2	1
154.m00124	Dual specificity phosphatase, catalytic domain containing protein T. thermophila chr_0 8253984 154	1	
3.m01762	Enolase family protein T. thermophila chr_0 8254659 3	3	4
128.m00127	Cytochrome c family protein T. thermophila chr_0 8254449 128	2	1

Tab. 21 fortlaufend

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
24.m00269	Polyprenyl synthetase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254649 24	1	1
40.m00257	Squalene and phytoene synthases family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254652 40	1	
31.m00198	NAD transhydrogenase beta subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31	1	

Tab. 22: Signaltransduktion. Die Zahlen in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t. gene ID*: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
104.m00139	IQ calmodulin-binding motif family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254365 104	1	1
202.m00059	IQ calmodulin-binding motif family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254779 202	1	
337.m00014	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254072 337	1	
68.m00204	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254385 68	1	
197.m00050	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254457 197	1	
46.m00187	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254475 46	1	
12.m00322	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254545 12	1	
18.m00284	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254564 18	1	
56.m00207	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254565 56	1	
15.m00407	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254638 15	1	
92.m00173	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254653 92	2	
3.m01674	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	2	
95.m00123	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254667 95	3	2
38.m00314	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254813 38	1	
71.m00196	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254823 71	1	
80.m00124	Protein kinase domain <i>T. thermophila</i> chr_0 8254444 80	4	4
87.m00251	Guanylate kinase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254479 87	1	

Tab.22. fortlaufend

<i>T.t.</i> gene ID	Protein	30 sek	5 min
118.m00092	Adenylate kinases family protein T. thermophila chr_0 8254476 118	2	1
93.m00144	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein T. thermophila chr_0 8253887 93	1	
57.m00142	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein T. thermophila chr_0 8254403 57	2	1
21.m00264	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein T. thermophila chr_0 8254406 21	1	
29.m00202	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein T. thermophila chr_0 8254551 29	1	
3.m01706	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein T. thermophila chr_0 8254659 3	1	
1.m00576	cyclic nucleotide-binding domain containing protein T. thermophila chr_0 8254803 1	1	
4.m00668	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein T. thermophila chr_0 8254811 4	1	
105.m00148	EF hand family protein T. thermophila chr_0 8253915 105	2	
113.m00092	EF hand family protein T. thermophila chr_0 8254377 113	2	
51.m00221	EF hand family protein T. thermophila chr_0 8254437 51	2	2
89.m00157	EF hand family protein T. thermophila chr_0 8254470 89	1	
89.m00187	EF hand family protein T. thermophila chr_0 8254470 89	1	1
46.m00259	EF hand family protein T. thermophila chr_0 8254475 46	1	
87.m00239	EF hand family protein T. thermophila chr_0 8254479 87	1	
56.m00261	EF hand family protein T. thermophila chr_0 8254565 56	2	2
41.m00190	EF hand family protein T. thermophila chr_0 8254587 41	2	2
3.m01690	EF hand family protein T. thermophila chr_0 8254659 3	2	
43.m00325	EF hand family protein T. thermophila chr_0 8254666 43	1	
4.m00502	EF hand family protein T. thermophila chr_0 8254811 4	2	1
4.m00605	EF hand family protein T. thermophila chr_0 8254811 4	3	2
167.m00106	phosphoglycerate kinase family protein T. thermophila chr_0 8254181 167	2	2
108.m00113	AMP-binding enzyme family protein T. thermophila chr_0 8254187 108	3	1
20.m00264	AMP-binding enzyme family protein T. thermophila chr_0 8254373 20	2	
34.m00203	AMP-binding enzyme family protein T. thermophila chr_0 8254610 34	1	
3.m01823	AMP-binding enzyme family protein T. thermophila chr_0 8254659 3	1	
97.m00175	Acyl CoA binding protein T. thermophila chr_0 8254402 97	1	
32.m00160	Acyl CoA binding protein T. thermophila chr_0 8254691 32	2	2
82.m00112	Acyl CoA binding protein T. thermophila chr_0 8254731 82	2	1
17.m00380	Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein T. thermophila chr_0 8254815 17	1	

Tab. 22. fortlaufend

<i>T.t.</i> gene ID	Protein	30 sek	5 min
87.m00173	Ser/Thr protein phosphatase family protein T. thermophila chr_0 8254479 87	1	
164.m00073	Variant SH3 domain containing protein T. thermophila chr_0 8254550 164	1	
198.m00041	3'5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase family protein T. thermophila chr_0 8254410 198	1	
240.m00039	RAK1 T. thermophila chr_0 8254095 240	2	1
81.m00181	CMB1 T. thermophila chr_0 8254580 81	2	1
81.m00185	PHP2 T. thermophila chr_0 8254580 81	2	2
71.m00134	EPK1 T. thermophila chr_0 8254823 71	3	3
83.m00197	Conserved hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254563 83	2	2
48.m00245	Cyclin, N-terminal domain containing protein T. thermophila chr_0 8254745 48	1	
25.m00333	F-box domain containing protein T. thermophila chr_0 8254600 25	1	
215.m00064	Guanylate-binding protein, N-terminal domain containing protein T. thermophila chr_0 8253880 215		1
136.m00115	Guanylate-binding protein, N-terminal domain containing protein T. thermophila chr_0 8254712 136	2	
191.m00071	Response regulator receiver domain containing protein T. thermophila chr_0 8254167 191	1	

Tab. 23: Transport. Die Zahlen in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t.* gene ID: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t.</i> gene ID	Protein	30 sec	5 min
192.m00076	V-type ATPase 116kDa subunit family protein T. thermophila chr_0 8254757 192		2
39.m00240	V-type ATPase 116kDa subunit family protein T. thermophila chr_0 8254777 39	1	
34.m00342	V-type ATPase, A subunit family protein T. thermophila chr_0 8254610 34	1	2
67.m00170	V-type ATPase, B subunit family protein T. thermophila chr_0 8254459 67	1	1
95.m00161	V-type ATPase, C subunit family protein T. thermophila chr_0 8254667 95	1	
8.m00321	V-type ATPase, C subunit family protein T. thermophila chr_0 8254752 8	1	
140.m00061	V-type ATPase, D subunit family protein T. thermophila chr_0 8254483 140	1	2
3.m01792	V-type ATPase, G subunit family protein T. thermophila chr_0 8254659 3	3	3
16.m00305	Vacuolar ATP synthase T. thermophila chr_0 8254617 16		1
48.m00253	Vacuolar ATP synthase T. thermophila chr_0 8254745 48	1	1
38.m00298	Na,H/K antiporter P-type ATPase, alpha subunit family protein T. thermophila chr_0 8254813 38	1	

Tab. 23 fortlaufend

<i>T.t.</i> gene ID	Protein	30 sek	5 min
21.m00252	Major Facilitator Superfamily protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254406 21	1	
339.m00012	Major Facilitator Superfamily protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254481 339	1	
49.m00251	Major Facilitator Superfamily protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254607 49	1	
92.m00163	Ligand-gated ion channel family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254653 92	2	
112.m00133	ABC transporter family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254104 112	3	
63.m00214	Ammonium Transporter Family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254487 63	1	
105.m00112	Calcium-translocating P-type ATPase, PMCA-type family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253915 105	1	
225.m00058	Calcium-translocating P-type ATPase, SERCA-type family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254469 225	2	
30.m00280	Cation channel family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254431 30	1	
14.m00265	Cation channel family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254798 14	1	
109.m00108	Cation channel family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254820 109	1	
162.m00071	E1-E2 ATPase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254576 162	1	
80.m00178	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254444 80	4	2
76.m00218	ATP synthase F1, alpha subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253850 76	3	4
104.m00124	ATP synthase F1, delta subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254365 104	1	
8.m00440	ATP synthase F1, gamma subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8	1	1
20.m00360	ATPase, AAA family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254373 20		1
131.m00144	ATPase, histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254737 131	1	
120.m00116	Inorganic H⁺ pyrophosphatase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254736 120 = Vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase	1	
18.m00332	Inorganic pyrophosphatase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254564 18	3	4
38.m00287	AAA family ATPase, CDC48 subfamily protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254813 38	1	2
26.m00243	NAC domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254594 26	2	2
111.m00081	NAC domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254748 111	1	
247.m00044	Ras family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254002 247 = RAB 62	1	
5.m00586	Ras family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5 = RAB 6 C	1	
34.m00271	SNARE domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	1	
9.m00538	GRAM domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254645 9	1	
8.m00549	PH domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8 = VPS13 (vacuolar protein sorting)/chorein	1	
13.m00284	Vacuolar protein sorting 36 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	1	
102.m00110	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253823 102	1	

Tab. 23. fortlaufend

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
37.m00185	GAT domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254756 37	1	
15.m00352	Dynamamin central region family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254638 15		1

Tab. 24: Cytoskelett. Die Zahlen in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t. gene ID*: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
28.m00345	Kinesin motor domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254379 28	1	
50.m00185	Kinesin motor domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254609 50	1	
235.m00033	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254092 235	1	
68.m00136	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254385 68	1	
46.m00214	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254475 46	1	
2.m02053	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	2	
16.m00424	Conserved hypothetical coiled-coil protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254617 16	2	
36.m00227	Tubulin beta chain, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254460 36	3	4
73.m00202	Tubulin/FtsZ family, GTPase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254486 73	4	4
15.m00457	Actin, identical <i>T. thermophila</i> chr_0 8254638 15	1	

Tab. 25: Unbekannt biologische Prozesse. Die Zahlen in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t. gene ID*: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
62.m00176	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253815 62	1	
141.m00128	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254397 141	1	
80.m00189	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254444 80		1
87.m00171	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254479 87	1	
75.m00153	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254495 75	1	
31.m00268	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31	1	
19.m00283	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254665 19	2	
1.m00909	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	2	2
294.m00026	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254781 294		1

Tab. 25 fortlaufend

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
53.m00278	Viral A-type inclusion protein repeat containing protein T. thermophila chr_0 8254395 53	1	
78.m00117	Viral A-type inclusion protein repeat containing protein T. thermophila chr_0 8254464 78	2	2
91.m00119	Viral A-type inclusion protein repeat containing protein T. thermophila chr_0 8254528 91	1	1
9.m00395	Viral A-type inclusion protein repeat containing protein T. thermophila chr_0 8254645 9	1	
40.m00239	Viral A-type inclusion protein repeat containing protein T. thermophila chr_0 8254652 40	3	3
74.m00203	Viral A-type inclusion protein repeat containing protein T. thermophila chr_0 8254763 74	1	
62.m00225	SPFH domain / Band 7 family protein T. thermophila chr_0 8253815 62	1	1
42.m00234	SPFH domain / Band 7 family protein T. thermophila chr_0 8254719 42	1	
206.m00043	Leucine Rich Repeat family protein T. thermophila chr_0 8253843 206	1	
33.m00277	Leucine Rich Repeat family protein T. thermophila chr_0 8254010 33	1	1
187.m00073	Leucine Rich Repeat family protein T. thermophila chr_0 8254389 187	1	
20.m00361	LIM domain containing protein T. thermophila chr_0 8254373 20	1	
10.m00535	IPT/TIG domain containing protein T. thermophila chr_0 8254582 10	3	
10.m00536	IPT/TIG domain containing protein T. thermophila chr_0 8254582 10	3	1
10.m00537	IPT/TIG domain containing protein T. thermophila chr_0 8254582 10	2	
9.m00413	DFB 1 T. thermophila chr_0 8254645 9	1	
194.m00039	Chlamydial polymorphic outer membrane protein repeat containing protein T. thermophila chr_0 8253992 194	2	
194.m00027	Chlamydial polymorphic outer membrane protein repeat containing protein T. thermophila chr_0 8253992 194	1	
140.m00087	Chlamydial polymorphic outer membrane protein repeat containing protein T. thermophila chr_0 8254483 140	1	
127.m00059	Chlamydial polymorphic outer membrane protein repeat containing protein T. thermophila chr_0 8254670 127	1	
97.m00156	ENTH domain containing protein T. thermophila chr_0 8254402 97	2	2
138.m00118	Eukaryotic membrane protein (cytomegalovirus gH-receptor) family T. thermophila chr_0 8254799 138	1	
1.m00911	DHHC zinc finger domain containing protein T. thermophila chr_0 8254803 1	1	
84.m00112	Cell surface immobilization antigen SerH6, putative T. thermophila chr_0 8254754 84	1	
94.m00120	J immobilization antigen-related T. thermophila chr_0 8254644 94	1	
84.m00113	SerH3 immobilization antigen, putative T. thermophila chr_0 8254754 84	3	2
108.m00192	KOW motif family protein T. thermophila chr_0 8254187 108		1
31.m00209	Kelch motif family protein T. thermophila chr_0 8254548 31	2	

Tab 25 fortlaufend

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
51.m00203	Sec61beta family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254437 51	2	1

Tab. 26: Diverse biologische Prozesse. Die Zahlen in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t. gene ID*: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
173.m00039	Bowman-Birk serine protease inhibitor family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254006 173	1	1
73.m00161	Bowman-Birk serine protease inhibitor family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254486 73	1	
170.m00104	Elongation factor G, domain IV family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254436 170	3	2
11.m00468	Elongation factor TS family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254747 11	2	1
66.m00157	Elongation factor Tu GTP binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253811 66	1	
12.m00557	Elongation factor Tu, mitochondrial precursor, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254545 12		3
3.m01782	Conserved hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	1	1
110.m00107	conserved hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254391 110		1
152.m00108	EF-1 guanine nucleotide exchange domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254496 152	2	2
192.m00065	Phosphopantetheine attachment site family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254757 192		1
315.m00023	SCP-2 sterol transfer family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254332 315	3	1
205.m00042	TB2/DP1, HVA22 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254711 205	2	1
96.m00145	Translation elongation factor EF-1, subunit alpha <i>T. thermophila</i> chr_0 8254435 96	3	3
18.m00476	14-3-3 protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254564 18	2	2
19.m00308	FKBP12 binding protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254665 19	1	

Tab. 27: Proteinfaltung. Die Ziffern in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t. gene ID*: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
13.m00428	14-3-3 protein T. thermophila chr_0 8254776 13	1	
51.m00201	Hsp90 protein T. thermophila chr_0 8254437 51	4	3
5.m00599	Hsp90 protein T. thermophila chr_0 8254650 5	2	1
13.m00537	Hsp90 protein T. thermophila chr_0 8254776 13	1	2
127.m00074	Chaperonin, 10 kDa family protein T. thermophila chr_0 8254670 127	2	3
6.m00499	Co-chaperone GrpE family protein T. thermophila chr_0 8254697 6	2	
170.m00054	DnaJ domain containing protein T. thermophila chr_0 8254436 170	1	
14.m00361	Dnak protein BiP T. thermophila chr_0 8254798 14 = Hsp-70	3	3
222.m00042	DnaK protein T. thermophila chr_0 8254401 222	2	1
197.m00079	DnaK protein T. thermophila chr_0 8254457 197	3	4
73.m00185	DnaK protein T. thermophila chr_0 8254486 73	1	
56.m00217	DnaK protein T. thermophila chr_0 8254565 56	1	1
9.m00347	DnaK protein T. thermophila chr_0 8254645 9	2	
7.m00462	DnaK protein T. thermophila chr_0 8254716 7 = Hsp-70	3	3
10.m00370	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein T. thermophila chr_0 8254582 10		1
20.m00331	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein T. thermophila chr_0 8254373 20	1	
12.m00367	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein T. thermophila chr_0 8254545 12		1
16.m00478	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein T. thermophila chr_0 8254617 16		2

Tab. 28: Hypothetische metabolische Proteine. Die Ziffern in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t. gene ID*: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sec	5 min
76.m00197	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253850 76	1	
190.m00048	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253886 190	1	
206.m00045	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253843 206	1	
154.m00075	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253984 154	3	3
33.m00297	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254010 33	2	2

Tab. 28 fortlaufend

<i>T.t.</i> gene ID	Protein	30 sek	5 min
314.m00026	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254062 314	1	
85.m00125	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254378 85	1	
97.m00172	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254402 97		1
21.m00302	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254406 21	1	
88.m00106	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254584 88	1	
41.m00239	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254587 41	2	
16.m00414	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254617 16	1	
48.m00304	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254745 48	4	2
8.m00474	(Sialidase) hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254752 8	1	
4.m00462	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254811 4	1	
17.m00398	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254815 17	2	
78.m00167	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254464 78	1	
18.m00292	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254564 18	1	
259.m00038	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254599 259	2	1
40.m00201	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254652 40	1	
268.m00029	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254676 268	1	1
4.m00498	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254811 4	1	
17.m00257	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254815 17		1
190.m00048	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253886 190	1	
154.m00075	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253984 154	3	3
110.m00081	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254391 110	1	
97.m00172	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254402 97		1
41.m00264	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254587 41	1	
259.m00038	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254599 259	2	1
16.m00414	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254617 16	1	
15.m00359	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254638 15	1	
268.m00029	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254676 268	1	1
4.m00498	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254811 4	1	
17.m00398	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254815 17	2	
40.m00201	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254652 40	1	

Tab. 29: Hypothetische Signaltransduktionsproteine. Die Ziffern in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t. gene ID*: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
147.m00082	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253894 147	1	
276.m00027	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253914 276	1	
33.m00297	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254010 33	2	2
363.m00015	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254058 363	1	1
314.m00026	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254062 314	1	
126.m00140	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254284 126	1	
174.m00064	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254382 174	1	
110.m00081	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254391 110	1	
21.m00328	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254406 21	1	
54.m00285	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254593 54	2	
183.m00026	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254634 183	1	
3.m01942	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254659 3	1	
27.m00382	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254688 27		1
6.m00493	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254697 6	3	3
311.m00019	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254826 311	1	
155.m00087	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254822 155	1	
51.m00184	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254437 51	1	
25.m00390	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254600 25	1	
34.m00246	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254610 34	1	2
43.m00172	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254666 43	1	
48.m00235	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254745 48	1	
33.m00297	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254010 33	2	2
363.m00015	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254058 363	1	1
126.m00140	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254284 126	1	
183.m00026	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254634 183	1	
3.m01942	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254659 3	2	
6.m00493	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254697 6	3	3
48.m00235	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254745 48	1	
91.m00121	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254528 91	3	2

Tab. 30: Hypothetische Transport-Proteine. Die Ziffern in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t. gene ID*: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
66.m00230	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253811 66	1	
85.m00125	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254378 85	1	
24.m00225	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254649 24	1	
7.m00291	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254716 7	1	
231.m00035	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254749 231	2	
23.m00229	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254788 23	1	
1.m00759	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254803 1	1	
1.m01027	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254803 1	1	
17.m00398	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254815 17	2	
36.m00284	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254460 36	1	
183.m00025	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254634 183	1	
9.m00297	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254645 9	1	
8.m00437	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254752 8	3	1
67.m00243	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254459 67	1	
23.m00229	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254788 23	1	
116.m00107	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254362 116	1	1
29.m00321	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254551 29		1
15.m00436	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254638 15		1
9.m00410	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254645 9	2	2
54.m00288	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254593 54	1	
231.m00035	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254749 231	2	
13.m00307	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254776 13	1	2
314.m00026	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254062 314	1	
4.m00662	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254811 4	1	
164.m00075	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254550 164	2	
54.m00225	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254593 54	1	
54.m00288	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254593 54	1	
54.m00282	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254593 54	1	
143.m00087	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254637 143	1	
27.m00207	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254688 27		1
229.m00028	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254241 229		1
236.m00033	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254454 236	1	1
36.m00284	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254460 36	1	

Tab. 31: Hypothetische multiregulatorische Proteine. Die Ziffern in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t. gene ID*: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
117.m00117	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253904 117	2	
218.m00038	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253957 218	1	
314.m00026	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254062 314	1	
230.m00046	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254106 230	1	
245.m00028	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254380 245	1	
41.m00264	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254587 41	1	
10.m00394	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	1	
42.m00268	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254719 42	1	
382.m00007	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254729 382	2	
1.m00930	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1		1
148.m00063	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254783 148	1	
4.m00674	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	2	1
53.m00211	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254395 53	2	1
5.m00439	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5	1	
34.m00246	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	1	2
1.m00930	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1		1
193.m00052	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254581 193	1	
67.m00243	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67	1	
39.m00270	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254777 39	1	1
11.m00471	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254747 11	1	1
48.m00192	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	1	1
166.m00062	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254682 166	2	
3.m01657	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	1	2
10.m00418	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	1	
117.m00117	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253904 117	1	
116.m00106	hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254362 116	1	1

Tab. 32: Hypothetische Cytoskelett Proteine. Die Ziffern in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t. gene ID*: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
230.m00032	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254106 230	1	
107.m00102	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254420 107	1	
208.m00058	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254429 208	1	
69.m00270	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254428 69	1	
149.m00072	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254588 149	1	
197.m00078	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254457 197	2	3
236.m00033	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254454 236	1	1
56.m00250	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254565 56	1	
1.m00661	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254803 1	1	

Tab. 33: Hypothetische Chaperone. Die Ziffern in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t. gene ID*: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
197.m00078	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254457 197	2	3
236.m00033	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254454 236	1	1
56.m00250	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254565 56	1	
197.m00078	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254457 197	2	3

Tab. 34: Hypothetische ribosomale Proteine. Die Ziffern in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t. gene ID*: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
171.m00065	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253930 171	1	
112.m00123	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254104 112	1	
28.m00265	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254379 28	1	
28.m00324	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254379 28	1	
28.m00362	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254379 28		1
57.m00269	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254403 57	1	
128.m00104	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254449 128	2	1
59.m00283	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254527 59	2	
9.m00410	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254645 9	2	2
3.m01759	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254659 3	1	

Tab. 35: fortlaufend

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
3.m01821	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254659 3	3	1
13.m00447	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254776 13	1	
39.m00270	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254777 39	1	1
138.m00108	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254799 138	1	
1.m00867	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254803 1	1	
91.m00121	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254528 91	3	2
91.m00165	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254528 91	1	
44.m00200	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254555 44	1	
26.m00237	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254594 26	2	
9.m00472	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254645 9	2	
9.m00543	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254645 9	1	
5.m00439	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254650 5	1	
48.m00192	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254745 48	1	1
2.m02206	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254819 2	1	
13.m00447	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254776 13	1	
43.m00172	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254666 43	1	
3.m01821	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254659 3	3	1
26.m00237	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254594 26	2	
134.m00126	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254552 134	1	
128.m00104	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254449 128	1	1
28.m00362	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254379 28		1

Tab. 36: Hypothetische Proteine mit Homologien zu hypothetischen Proteinen. Die Ziffern in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t. gene ID*: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
66.m00152	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253811 66	1	
62.m00181	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253815 62	2	1
76.m00134	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253850 76	2	
76.m00178	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253850 76		2
335.m00015	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253864 335	2	1
190.m00052	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253886 190	2	2
103.m00121	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253891 103	2	
304.m00017	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253974 304	1	
130.m00087	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254043 130	2	1
314.m00030	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254062 314	3	
337.m00011	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254072 337	3	3
112.m00123	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254104 112	1	
230.m00032	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254106 230	1	

Tab 36 fortlaufend

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
167.m00073	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254181 167	3	2
108.m00123	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254187 108	2	1
445.m00008	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254305 445	3	1
113.m00089	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254377 113	3	
68.m00156	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254385 68	2	2
198.m00040	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254410 198	1	
119.m00127	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254417 119	1	
170.m00093	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254436 170		1
142.m00090	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254440 142		1
80.m00203	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254444 80	1	1
128.m00141	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254449 128	1	1
67.m00160	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254459 67	2	1
46.m00285	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254475 46	2	1
46.m00193	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254475 46		1
87.m00242	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254479 87	2	3
339.m00011	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254481 339	1	1
115.m00143	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254515 115	1	
59.m00200	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254527 59	2	2
91.m00185	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254528 91	2	1
91.m00156	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254528 91		1
12.m00359	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254545 12	1	
31.m00242	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254548 31	2	1
31.m00264	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254548 31	1	
129.m00110	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254549 129 = Tpp5p	2	
134.m00131	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254552 134	1	
18.m00337	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254564 18	1	
18.m00287	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254564 18	1	1
18.m00347	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254564 18	1	1
56.m00307	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254565 56	2	1
56.m00175	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254565 56		2
10.m00446	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254582 10	1	
22.m00256	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254590 22	1	
22.m00296	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254590 22	1	1
22.m00356	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254590 22	2	
26.m00322	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254594 26	2	2
25.m00322	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254600 25	1	1
72.m00142	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254786 72		1
86.m00160	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254605 86	2	1

Tab. 36 fortlaufend

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
50.m00189	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254609 50 = Tpp3p		1
34.m00306	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254610 34	1	
34.m00348	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254610 34	1	1
58.m00234	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254611 58	3	3
58.m00235	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254611 58	3	2
94.m00138	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254644 94	2	2
94.m00150	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254644 94	1	
94.m00140	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254644 94		1
40.m00275	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254652 40	2	3
92.m00135	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254653 92	2	
101.m00159	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254658 101	1	
101.m00161	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254658 101		1
3.m01834	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254659 3	1	
65.m00227	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254664 65	1	2
65.m00181	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254664 65	1	
43.m00198	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254666 43	2	
95.m00100	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254667 95	2	
47.m00256	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254671 47		1
52.m00214	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254686 52	1	2
7.m00490	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254716 7	3	1
7.m00507	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254716 7	1	1
120.m00092	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254736 120	2	1
48.m00255	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254745 48	2	
11.m00395	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254747 11	1	1
11.m00406	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254747 11	1	
8.m00356	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254752 8	2	
84.m00098	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254754 84	2	1
72.m00112	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254786 72	1	
23.m00292	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254788 23	1	
14.m00438	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254798 14	1	
14.m00445	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254798 14	3	1
14.m00484	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254798 14	1	1
1.m00668	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254803 1	2	
4.m00600	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254811 4	2	1
38.m00199	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254813 38	2	2
45.m00225	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254814 45 = Phagosome protein 1 (Php1p/P28p)	2	
17.m00473	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254815 17	3	1

Tab. 36 fortlaufend

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
2.m02456	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254819 2	1	3
66.m00152	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253811 66	1	
62.m00247	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253815 62	1	
76.m00134	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253850 76	2	
215.m00061	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253880 215	2	
190.m00052	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253886 190	2	2
103.m00121	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253891 103	2	
130.m00087	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254043 130	2	1
337.m00011	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254072 337	3	3
167.m00073	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254181 167	3	2
108.m00123	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254187 108	2	1
108.m00181	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254187 108	1	
445.m00008	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254305 445	3	1
186.m00042	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254369 186	1	
55.m00264	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254371 55	1	
113.m00130	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254377 113	2	
53.m00255	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254395 53	1	
198.m00040	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254410 198	1	
233.m00039	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254418 233	2	
107.m00115	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254420 107	1	
170.m00093	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254436 170		1
51.m00156	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254437 51	2	
142.m00090	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254440 142		1
67.m00160	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254459 67	2	1
67.m00206	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254459 67	1	
36.m00201	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254460 36	1	
36.m00280	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254460 36	1	
36.m00282	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254460 36	1	
78.m00120	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254464 78	1	
78.m00153	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254464 78	1	
87.m00242	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254479 87	2	3
115.m00143	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254515 115	1	
91.m00185	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254528 91	2	1
12.m00359	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254545 12	1	
31.m00242	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254548 31	2	1

Tab. 36 fortlaufend

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
129.m00111	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254549 129	2	
18.m00337	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254564 18	1	
18.m00287	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254564 18	1	1
18.m00347	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254564 18	1	1
56.m00307	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254565 56	2	1
56.m00276	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254565 56	1	
56.m00175	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254565 56		2
10.m00446	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254582 10	1	
22.m00356	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254590 22	2	
26.m00322	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254594 26	2	2
189.m00051	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254595 189	1	
25.m00322	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254600 25	1	1
86.m00160	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254605 86	2	1
34.m00306	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254610 34	1	
58.m00202	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254611 58	1	
58.m00234	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254611 58	3	3
58.m00235	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254611 58	3	2
143.m00086	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254637 143	1	
94.m00138	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254644 94	2	2
40.m00275	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254652 40	2	3
92.m00135	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254653 92	2	
101.m00159	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254658 101	1	
101.m00161	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254658 101		1
65.m00227	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254664 65	1	2
43.m00198	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254666 43	2	
43.m00269	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254666 43	1	
282.m00029	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254679 282	1	
7.m00525	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254716 7	1	
7.m00507	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254716 7	1	1
52.m00214	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254686 52	1	2
48.m00255	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254745 48	2	
48.m00305	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254745 48	2	3
48.m00286	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254745 48	1	

Tab. 36 fortlaufend

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
67.m00195	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254459 67	3	
46.m00176	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254475 46	2	
46.m00285	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254475 46	2	1
339.m00011	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254481 339	1	1
63.m00226	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254487 63	1	
489.m00004	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254546 489	1	
31.m00351	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254548 31	1	
31.m00350	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254548 31	1	
31.m00264	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254548 31	1	
129.m00114	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254549 129	1	
134.m00131	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254552 134	1	
18.m00305	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254564 18		1
10.m00523	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254582 10	1	
10.m00534	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254582 10	1	
22.m00222	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254590 22	1	
22.m00256	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254590 22	1	
22.m00296	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254590 22	1	1
22.m00249	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254590 22	1	
22.m00341	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254590 22	1	
86.m00166	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254605 86	2	
195.m00048	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254608 195	1	
50.m00189	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254609 50 = Tpp3p		1
34.m00343	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254610 34	1	
58.m00251	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254611 58	1	
58.m00189	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254611 58	1	
16.m00441	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254617 16	1	
94.m00150	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254644 94	1	
139.m00139	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254646 139	1	
24.m00279	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254649 24	1	
204.m00043	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254656 204	1	
101.m00178	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254658 101	1	
65.m00181	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254664 65	1	
19.m00219	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254665 19	1	
95.m00100	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254667 95	2	
95.m00138	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254667 95	1	
127.m00082	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254670 127	1	
47.m00223	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254671 47	1	
47.m00233	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254671 47	1	

Tab. 36 fortlaufend

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
8.m00356	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254752 8	2	
8.m00399	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254752 8	1	
8.m00366	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254752 8	1	
84.m00098	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254754 84	2	1
23.m00292	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254788 23	1	
14.m00445	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254798 14	3	1
14.m00484	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254798 14	1	1
1.m00668	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254803 1	2	
4.m00600	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254811 4	2	1
38.m00199	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254813 38	2	2
2.m02214	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254819 2	1	
2.m02456	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254819 2	1	3
303.m00016	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254825 303	1	
216.m00042	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254828 216		2
76.m00178	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253850 76		2
335.m00015	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253864 335	2	1
147.m00063	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253894 147	1	
445.m00008	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254305 445	3	1
62.m00181	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253815 62	2	1
103.m00160	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253891 103	1	
33.m00326	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254010 33	2	
297.m00020	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254122 297	2	
229.m00028	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254241 229		1
123.m00088	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254367 123	1	
20.m00261	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254373 20	1	
113.m00089	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254377 113	3	
85.m00208	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254378 85	1	
28.m00201	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254379 28	1	
28.m00235	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254379 28	1	
174.m00039	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254382 174	1	

Tab. 36 fortlaufend

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
463.m00003	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254727 463	1	
145.m00094	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254728 145	1	
120.m00092	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254736 120	2	1
11.m00395	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254747 11	1	1
11.m00424	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254747 11	1	
11.m00482	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254747 11	2	
11.m00406	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254747 11	1	
11.m00471	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254747 11	1	1
172.m00088	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254751 172	1	
74.m00187	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254763 74	2	
330.m00016	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254766 330	1	
13.m00471	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254776 13	1	
148.m00087	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254783 148	1	
148.m00098	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254783 148	1	
72.m00112	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254786 72	1	
23.m00259	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254788 23	1	
14.m00297	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254798 14	1	
14.m00438	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254798 14	1	
14.m00446	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254798 14	1	
45.m00225	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254814 45 = PHP 1	2	
17.m00473	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254815 17	3	1
314.m00022	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254062 314	1	
314.m00030	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254062 314	3	
20.m00254	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254373 20	1	
118.m00129	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254476 118	1	
53.m00211	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254395 53	2	1
53.m00202	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254395 53	1	
141.m00106	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254397 141	1	
69.m00255	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254428 69	1	
12.m00475	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254545 12	1	
29.m00255	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254551 29	1	
10.m00418	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254582 10	1	
10.m00427	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254582 10	1	
26.m00221	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254594 26	1	
34.m00269	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254610 34	1	
143.m00101	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254637 143	2	
15.m00359	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254638 15	1	

Tab. 36 fortlaufend

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
3.m01657	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254659 3	1	2
65.m00230	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254664 65	1	
166.m00062	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254682 166	2	
231.m00034	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254749 231	1	
13.m00307	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254776 13	1	2
1.m00661	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254803 1	1	
1.m00764	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254803 1	1	
70.m00176	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254807 70	1	
70.m00182	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254807 70	1	
4.m00674	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254811 4	2	1
2.m02358	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254819 2	1	
68.m00156	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254385 68	2	2
21.m00361	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254406 21	1	
142.m00070	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254440 142	1	
21.m00352	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254406 21	1	
53.m00169	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254395 53	1	
119.m00127	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254417 119	1	
233.m00035	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254418 233	1	
69.m00266	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254428 69	1	
80.m00203	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254444 80	1	1
61.m00162	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254446 61	1	
128.m00141	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254449 128	1	1
67.m00178	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254459 67	2	
6.m00589	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254697 6	1	
7.m00473	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254716 7	1	
7.m00490	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254716 7	3	1
184.m00063	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254717 184	1	
137.m00103	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254718 137	1	

Tab. 37: Hypothetische Proteine ohne bekannten Homologien. Die Ziffern in den beiden rechten Spalten geben die Anzahl der Treffer bei der MudPIT-Analyse der vier Proben. Die mit Jacobs *et al.* übereinstimmende Proteine sind durch Fettschreibung hervorgehoben. *T.t. gene ID*: *T. thermophila* Gen-ID (TGD: www.ciliate.org)

<i>T.t. gene ID</i>	Protein	30 sek	5 min
66.m00276	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253811 66	2	1
335.m00016	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8253864 335		1
33.m00325	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254010 33	2	1
445.m00009	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254305 445	3	3
146.m00107	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254359 146	1	1
26.m00274	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254594 26	2	1
34.m00343	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254610 34	1	
67.m00217	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254459 67		1
16.m00477	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254617 16	2	3
40.m00202	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254652 40	1	1
40.m00274	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254652 40	1	
48.m00304	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254745 48	4	2
48.m00305	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254745 48	2	3
48.m00286	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254745 48	1	
91.m00120	hypothetical protein T. thermophila chr_0 8254528 91	2	1

8.1. Verwendete DNA-Sequenzen

Mit Hilfe des TMHMM-Servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), erfolgte eine zusätzliche Untersuchung der phagosomalen Proteine bzgl. ihrer Assoziation mit der phagosomalen Membran welcher auf der Grundlage der Aminosäuresequenzen die Anzahl der Transmembran-Helices vorhersagt.

Die kodierende DNA-Sequenz der flankierten Regionen diente zum Nachweis der korrekten Integration des GFP-Fusionsproteinkonstrukts.

DNA-Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins

ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAG
ATGGTGTATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGC
AACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTT
CCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTTCGGTTATGGTGTTC AATGCTTTGCGAGATA
CCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCCGAAGGTTAT
GTACAGGAAAGA ACTATAATTTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCT
GAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTG
ATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGACACAAATTGGAATACA ACTATAACTC
ACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTT
CAA AATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCA
ACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTG
TCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCC
TTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAA
A

DNA-3'-BTU 1-Sequenz

AGCGAACTGAATCGGTCAGCTAAACCAACCAATCAACATAATAA ACTTTATTATT
TTTACTTAAGCATCTTACTGTTGTTGTAATAGTAGAGAAAGAAATACCCAATTAA
CTTCATTCACATAACATTAATATCTATAAACATCTTTTTTCTCACATATATACAAC
TCTCTAAATCAACAAATAACTTTTTAAAAATAATGGATATATATTAACAAAATAA
TATATCTCTTTTTACAAAATAGTTCTTATATAAATACGTATTCTGCACTCACCCGC
ATTTTTACAACAAAACATACCAAAAAAATTCTTACTTCTACATGTTTCCTTTCT
TATTATTACAAAATTATTTTATAAATAGCATACAAAAATAAATACAATAAAAAAA
TAAACAAAATCCTTTTTTATTTTGAATTATTTAAAACAAATATTTTCAATCAATCA
GTCAGTCAGCATAATATTAAGCAACAAAACAAACCCAAGTTGTTTTTATAGTTT
TTTAATTGCTTTTCAGTACTATAAATAAATTTGTTATTACTTCAAGATTGATAAAC
TTCTTTTTTAAATTAATATCTATGAATGAATAAATAAGTTGATATCTCTTTTTAA
CTTGTTTTCTCTCTTTTACTTACTTGCCAATTTTTTTTTTAAATTAAGAAATATC
TTTTTATTTTTCAAAAACAAAATTTATTTTCCCTTGTATACAAAACCCCTTTATTT
AAATAAAATCTTTATGCCCATCAATAGCCACATCTTTTTGAATTTTATTGCTTATA
CTGCCTTTCTTTTCTTTTCTTATGATAAATACTTCTTTTTTCTATGATTATTGGAATAT
CTTTTTTTTTCTTAATCGTTTTTAAATAAAATTAAGCGGCAACATATTTTATTTTCTT
AAAAATATAATATTTTATAAGTAATAAAATTA AAAATTTATATTCAATTGGTTTCTG
ATTTTATTTTATTCACTATTTCCAATAGATTGCTTTTTATTTTTAAA ACTAGTTTGTTT
ATTTATTTAATAAATTTTTAATACTTCTTTGAATTTTTATATCTTAGTTCTTTAAAA
AGCGACTTATAGCAAAAATAAAATGTATAACTAGGAATAGCTGAAAAAATCTTTA

ATATTTAAATTATTTAAATAGGAAATATTTAAAAAGTAATGTTTTGAATTTTCA
AAATTAACATAAATAATATGCTTCTTAAATTTAATTTAGACTATTTTTACTT
ATTAATTCAACTATTTAAATAAAAATAAAATGCTTTTTAAAAATCAA

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Professorin Dr. Gela Preisfeld für das Überlassen dieses hochinteressanten Themas, Ihre vorbildliche wissenschaftliche Betreuung und Begutachtung sowie Ihre Hilfsbereitschaft und aufbauenden Worte.

Bei Herrn Prof. Dr. Tiedtke möchte ich mich für die Erstellung des Zweitgutachtens und für die zahlreichen anregenden und konstruktiven Diskussionen bedanken. Ohne ihn wäre unser Projekt gar nicht erst zustande gekommen.

Insbesondere möchte ich mich bei Sabrina Bleidißel für das Korrekturlesen dieser Arbeit und ihre Verbesserungs- und Formulierungsvorschläge bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei unserem Kooperationspartner der Ruhr-Universität Bochum Dr. Dirk Wolters und seinen Mitarbeitern für die Durchführung der MudPIT-Analysen bedanken.

Bei Dorota Wloga von der Nencki Universität in Warschau möchte ich mich für die Überlassung des GFP-Vektors sowie stetige Unterstützungen bei Fragen zu molekularbiologischen Untersuchungsverfahren bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei der Cilian AG für die Möglichkeit zur Nutzung der *Gene Gun*. Mein besonderer Dank gilt dabei dem Vorstandsvorsitzenden Forschung & Entwicklung, Dr. Marcus Hartmann sowie Dr. Ulrike Bockau für ihre Hilfsbereitschaft bei Fragen zum Thema *Tetrahymena*-Genetik.

Ferner möchte ich mich bei Sabine Stratmann-Lettner für die zahlreichen konstruktiven Hinweise zur Lösung theoretischer und praktischer Probleme bedanken und natürlich bei Soner Öner, der mir aufgrund seines qPCR-Know-hows immer eine große Hilfe war. Ebenfalls möchte ich mich bei unseren verlässlichen Stickstoffquellen Andreas und Tim ganz herzlich bedanken.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an meine Kollegin Kathrin Czora für ihre fortwährende Unterstützung im Labor und eine tolle gemeinsame Zusammenarbeit.

Ich möchte mich weiterhin für das Korrekturlesen bei meinen lieben Kollegen bedanken. Dem gesamten Zoologie-Team danke ich für das hervorragende Arbeitsklima und die unvergesslichen Mittags- und Kaffeepausen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meiner Oma, meinen Brüdern und meinen Eltern sowie Schwiegereltern bedanken, die mir während der gesamten Jahre stets zur Seite gestanden und mich seelisch und moralisch unterstützt haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich

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

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

Wuppertal,

Viktoria Wittich