

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



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät der Mathematik und Naturwissenschaften
der Bergischen Universität Wuppertal

angefertigt am
Lehrstuhl für Zoologie und Biologiedidaktik

vorgelegt von
Kathrin Czora

Wuppertal, im Juni 2014

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20140805-153201-9

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20140805-153201-9>]

Erstgutachter: Prof. Dr. A. Preisfeld

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. E. Schmidt

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
Zusammenfassung	XV
1 Einleitung	1
1.1 Phagocytose	1
1.1.1 Phagocytose bei Fresszellen (Phagocyten)	3
1.2 <i>Tetrahymena thermophila</i>	5
1.2.1 <i>Tetrahymena thermophila</i> als Modellorganismus	5
1.2.2 Merkmale von <i>Tetrahymena thermophila</i>	7
1.2.3 Genetische Besonderheiten von <i>Tetrahymena thermophila</i>	11
1.3 Phagocytose bei <i>Tetrahymena thermophila</i>	15
1.4 Phagosomale Proteine	22
2 Zielsetzung	27
3 Material	29
3.1 Geräte	29
3.2 Verbrauchsmaterialien	30
3.3 Chemikalien	31
3.4 Enzyme	33
3.5 Proteaseinhibitoren	33
3.6 Reagenzienkits	34
3.7 DNA-Größenstandards	34
3.8 Organismen	35
3.8.1 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	35
3.8.2 <i>Tetrahymena thermophila</i>	35
3.9 Nährmedien	36
3.9.1 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	36
3.9.2 <i>Tetrahymena thermophila</i>	36
3.10 Puffer und Lösungen	37
3.11 Stammlösungen	40

3.12 Oligonukleotide	40
3.12.1 Oligonukleotide für cDNA-Analysen	41
3.12.2 Oligonukleotide für Klonierungen	42
3.12.3 Oligonukleotide für Sequenzierungen	43
3.13 Plasmide	43
3.14 Datenbanken und Computersoftware	43
4 Methoden.....	45
4.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien und Ciliaten	45
4.1.1 Langfristige Lagerung von Bakterien.....	45
4.1.2 Dauerkultivierung von <i>T. thermophila</i>	45
4.1.3 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	45
4.1.4 Kultivierung von <i>T. thermophila</i> -Stämmen	45
4.1.5 Bestimmung der Zelldichte von <i>T. thermophila</i> -Kulturen.....	46
4.2 DNA/RNA-Isolierung aus Bakterien und Ciliaten	47
4.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	47
4.2.2 Isolierung genomischer DNA aus <i>T. thermophila</i>	47
4.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	48
4.2.4 Isolierung von RNA aus <i>T. thermophila</i>	48
4.3 DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung	48
4.4 Agarose-Gelelektrophorese	49
4.5 Reverse Transkriptase-Reaktion.....	50
4.6 PCR-Methoden	50
4.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	50
4.6.2 Gradienten-PCR.....	52
4.6.3 Kolonie-PCR	52
4.6.4 One-Step RT-PCR	54
4.6.5 Quantitative Real-Time-PCR.....	54
4.6.5.1 SYBR Green.....	56
4.6.5.2 Eva Green	56
4.7 Reinigung von PCR-Produkten	57
4.8 DNA-Klonierung	58
4.8.1 Restriktionsverdau	58
4.8.2 DNA-Dephosphorylierung	58

4.8.3 Ligation	59
4.9 Transformation/Transfektion von Bakterien und Ciliaten	60
4.9.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	60
4.9.2 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	60
4.9.3 Transfektion von <i>T. thermophila</i> -Zellen.....	61
4.9.4 Selektion von <i>T. thermophila</i> -Transformanten	64
4.10 DNA-Sequenzierung	64
4.11 Herstellung von Magnetobeads	64
4.12 Phagosomenmarkierung und –Isolierung	65
4.13 Solubilisierung phagosomaler Proteine.....	66
4.14 BCA-Test	67
4.15 Proteinfällung mit Trichloressigsäure	68
4.16 MudPIT (<i>Multidimensional Protein Identification Technology</i>)	68
4.17 RNA-Interferenz-Experimente.....	70
4.18 Analyse von Phänotypen	72
5 Ergebnisse und Diskussion.....	73
5.1 Isolierung und Reinigung von Phagosomen aus <i>T. thermophila</i>	76
5.1.1 <i>Pulse-chase</i> Markierung von Phagosomen.....	76
5.1.2 Reinigung und Isolierung von Phagosomen.....	77
5.2 Gewinnung stadienspezifischer, phagosomaler Proteine	79
5.2.1 Wahl der Stadien.....	79
5.2.2 Präparation der phagosomalen Proteine.....	82
5.3 Proteinbiochemische Analyse phagosomaler Proteine	83
5.3.1 Ergebnisse der MudPIT-Analyse	85
5.3.2 Komponenten des <i>Tetrahymena</i> -Phagosomenproteoms.....	88
5.3.2.1 Hydrolasen	88
5.3.2.2 Membranproteine und Vesikeltransport.....	91
5.3.2.3 Calmodulin und Ca ²⁺ /Calmodulin-bindende Proteine	96
5.3.2.4 Weitere Phagosomenproteine	98
5.3.3 Vergleich der MudPIT-Ergebnisse mit der Jacobs-Studie.....	99
5.3.3.1 Jacobs-Studie.....	100
5.3.3.2 Vergleich der identifizierten Proteine	101
5.3.4 Datenbank-Abgleich der MudPIT-Ergebnisse	106

5.3.5 Fazit der MudPIT-Analysen.....	111
5.4 Analyse des mRNA-Levels phagozytischer Zellen	114
5.4.1 Etablierung des Systems	114
5.4.2 Untersuchte Gene	121
5.4.3 Ergebnisse der quantitativen Real-Time-PCR	122
5.4.3.1 Ermittlung der qPCR-Effizienz.....	123
5.4.3.2 Ermittlung von zeitlichen Änderungen des mRNA-Levels	125
5.4.4 Fazit der qPCR-Analysen.....	139
5.5 RNAi-Analyse ausgewählter Gene.....	142
5.5.1 RNAi-Methodik	142
5.5.2 Untersuchte Gene.....	147
5.5.3 Herstellung der Konstrukte.....	150
5.5.4 Ergebnisse der RNAi-Experimente.....	154
5.5.4.1 Analyse mittels One-Step RT-PCR	155
5.5.4.2 Analyse mittels quantitativer Real-Time-PCR.....	159
5.5.4.3 Optimierung der Versuchsbedingungen	165
5.5.4.4 Überprüfung des RNAi-Effekts	169
5.5.5 Mikroskopische Analyse von Phänotypen.....	172
5.5.6 Fazit der RNAi-Analysen.....	174
6 Fazit und Interpretationen.....	177
7 Literatur	182
8 Anhang	198
8.1 Ergebnisse der MudPIT-Analyse	198
8.2 Vektorkarte des dsRNA- <i>Hairpin</i> -Expressionsvektors.....	215
9 Danksagung	216
10 Erklärung.....	218

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Tetrahymena thermophila</i>	8
Abb. 2: Querschnitt der Buccalhöhle von <i>Tetrahymena thermophila</i>	9
Abb. 3: Querschnitt einer <i>T. thermophila</i> -Zelle	11
Abb. 4: Konjugation von <i>T. thermophila</i>	13
Abb. 5: Bildung einer Nahrungsvakuole bei <i>T. thermophila</i>	16
Abb. 6: Schematische Darstellung des Phagosomenzyklus von <i>Tetrahymena</i>	18
Abb. 7: Acidosomen-ähnliches Vesikel in <i>T. thermophila</i>	20
Abb. 8: Fotografische Darstellung des Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery Systems.....	61
Abb. 9: Schematische Darstellung des Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery Systems.....	63
Abb. 10: Vorgehensweise bei der Hochdurchsatz-Identifizierung von Proteinen mittels MudPIT-Technologie	69
Abb. 11: Mikroskopische Aufnahmen einer <i>T. thermophila</i> -Zelle.....	77
Abb. 12: Schematische Darstellung der Isolierung von Phagosomen definierten Alters aus <i>T. thermophila</i>	78
Abb. 13: Mikroskopische Aufnahme von nach dem <i>Pulse-chase</i> Verfahren isolierten Phagosomen	79
Abb. 14: Ergebnisse von 2D-Gelelektrophorese-Analysen von Proteinen aus naszenten und kondensierten Phagosomen.....	81
Abb. 15: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der durchgeführten proteinbiochemischen Analyse phagosomaler Proteine.	84
Abb. 16: <i>Amplification Plots</i> für das SSU rRNA Gen	117
Abb. 17: Schmelzkurven für das SSU rRNA Gen	118
Abb. 18: Gelelektrophoretische Analyse der qPCR-Ansätze zur Amplifikation eines 178 bp - Fragments des SSU rRNA Gens.....	119
Abb. 19: Standardkurve für das SSU rRNA Gen	120
Abb. 20: Gelelektrophoretische Analyse von qPCR-Ansätzen zur Amplifikation von Fragmenten von Tpp-Genen (Verdünnungen).....	123

Abb. 21: Gelelektrophoretische Analyse der qPCR-Ansätze zur Amplifikation von Fragmenten von Tpp-Genen (Zeitpunkte)	126
Abb. 22: Überprüfung des qPCR-Systems	127
Abb. 23: Darstellung der zeitlichen Änderungen des mRNA-Levels für Tpp2p	128
Abb. 24: Vorhersage von Transmembranhelices des Tpp2p-Proteins.....	131
Abb. 25: Darstellung der zeitlichen Änderungen des mRNA-Levels für Tpp3p	132
Abb. 26: Vorhersage von Transmembranhelices des Tpp3p-Proteins.....	133
Abb. 27: Vorhersage von Transmembranhelices des Tpp5p-Proteins.....	134
Abb. 28: Darstellung der zeitlichen Änderungen des mRNA-Levels für Tpp5p	135
Abb. 29: Darstellung der zeitlichen Änderungen des mRNA-Levels für Tpp9p	137
Abb. 30: Vorhersage von Transmembranhelices des Tpp9p-Proteins.....	138
Abb. 31: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten RNA _i -Analysen ausgewählter Gene	143
Abb. 32: Schematische Darstellung des verwendeten dsRNA- <i>Hairpin</i> -Expressionsvektors	150
Abb. 33: Überprüfung des Erfolgs der einzelnen Klonierungsschritte mittels Agarose-Gelelektrophorese am Beispiel von Drp1	153
Abb. 34: Überprüfung der RNA-Präparation aus <i>Tetrahymena</i> -Zellen durch Agarose-Gelelektrophorese	156
Abb. 35: Überprüfung der Produkte der One-Step RT-PCR am Bsp. von Vps13. .	158
Abb. 36: qPCR-Produkte sowie entsprechende Negativkontrollen ohne <i>Template</i> der sechs analysierten Gene	160
Abb. 37: Analyse von qPCR-Produkten mittels Agarose-Gelelektrophorese am Beispiel von Cth90.....	161
Abb. 38: Darstellung der im RNA _i -Experiment für Cth90 erhaltenen Ergebnisse....	163
Abb. 39: Darstellung der im RNA _i -Experiment für Snare, Prf1, Vps13, Cbp und Drp1 erhaltenen Ergebnisse.....	164
Abb. 40: Darstellung der im RNA _i -Experiment für Cth90-Transformanten mit abgeschlossenem <i>phenotypic assortment</i> erhaltenen Ergebnisse.....	167
Abb. 41: Darstellung der im RNA _i -Experiment für Snare-, Prf1-, Vps13-, Cbp- und Drp1-Transformanten nach abgeschlossenem <i>phenotypic assortment</i> erhaltenen Ergebnisse.....	168
Abb. 42: Ergebnisse der Überprüfung der Behandlungsmethoden.....	171

Abb. 43: Mikroskopische Aufnahmen zur Überprüfung von Phänotypen.....	173
Abb. 44: Vektorkarte des dsRNA- <i>Hairpin</i> -Expressionsvektors	215

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Geräte	29
Tab. 2: Verbrauchsmaterialien	31
Tab. 3: Verwendete Chemikalien	31
Tab. 4: Verwendete Enzyme	33
Tab. 5: Verwendete Proteaseinhibitoren und ihre Funktionsweise.....	34
Tab. 6: Verwendete Kit-Systeme.....	34
Tab. 7: Verwendete Größenstandards	35
Tab. 8: Verwendete Primer für cDNA-Analysen	41
Tab. 9: Verwendete Primer für Klonierungen	42
Tab. 10: Verwendete Primer für Sequenzierungen	43
Tab. 11: Verwendete Konstrukte.....	43
Tab. 12: Pipettierschema für einen Standard-PCR-Ansatz (präparative Reaktion)...	51
Tab. 13: Verwendetes PCR-Programm (präparative Reaktion)	52
Tab. 14: Pipettierschema für einen Kolonie-PCR-Ansatz (analytische Reaktion)	53
Tab. 15: Verwendetes PCR-Programm (analytische Reaktion)	53
Tab. 16: Verwendetes qPCR-Programm (SYBR Green).....	56
Tab. 17: Verwendetes qPCR-Programm (EVA Green)	57
Tab. 18: Zusammensetzung eines Desphosphorylierungs-Ansatzes.....	59
Tab. 19: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes	60
Tab. 20: Übersicht über die Proteine bzw. Gene, die mit der jeweils angegebenen Methode analysiert wurden.....	74
Tab. 21: Ergebnisse der MudPIT-Analyse.....	86
Tab. 22: Ergebnisse der proteinbiochemischen Analyse phagosomaler Proteine.....	87
Tab. 23: Mittels MudPIT-Analyse identifizierte Hydrolasen	88
Tab. 24: Mittels MudPIT-Analyse identifizierte Proteine, die wahrscheinlich mit der Phagosomenmembran assoziiert bzw. am Vesikeltransport beteiligt sind	92
Tab. 25: Mittels MudPIT-Analyse identifizierte Proteine der Kategorie „Calmodulin und Ca ²⁺ /Calmodulin-bindende Proteine“	97
Tab. 26: Weitere mittels MudPIT-Analyse identifizierte Proteine, die potentiell an der Phagozytose in <i>T. thermophila</i> beteiligt sind	99

Tab. 27: Identifizierte Proteine in 30 sek und 10 min alten Phagosomen, die in der vorliegenden Arbeit mittels MudPIT in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Jacobs <i>et al.</i> gefunden wurden.....	102
Tab. 28: In Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer NCBI-Datenbank-Suche gefundene Phagosomenproteine.....	107
Tab. 29: Hypothetische bzw. Tpp-Proteine, die mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert wurden	122
Tab. 30: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der quantitativen Real-Time-PCR von Proben, die der Ermittlung der Real-Time-PCR-Effizienz für die vier angegebenen Gene mittels einer Standardkurve dienten.....	124
Tab. 31: Proteine bzw. Gene, die mittels RNA _i -Analyse auf ihre Funktion hin untersucht wurden	148
Tab. 32: Übersicht über die Gene bzw. die Größe des jeweiligen Inserts, das durch Klonierung in den dsRNA- <i>Hairpin</i> -Expressionsvektor eingebracht wurde	152
Tab. 33: Übersicht über die PCR-Fragmentgrößen der Gene, deren Expression im Rahmen der RNA _i -Experimente untersucht wurde	157
Tab. 34: Übersicht über die qPCR-Effizienzen, die für die untersuchten Gene sowie für das SSU rRNA Gen mit Hilfe von Standardkurven ermittelt wurden	161
Tab. 35: Erhaltene mRNA-Level durch angegebene Behandlungsmethoden von Transformanten mit abgeschlossenem <i>phenotypic assortment</i>	169
Tab. 36: Übersicht über die Behandlungsmethoden, die für die sechs verschiedenen Transformanten überprüft werden sollten.....	170
Tab. 37: Erzielter RNA _i -Effekt	171

Abkürzungsverzeichnis

'	Minute(n)
''	Sekunde(n)
°C	Grad Celsius
A	Adenin
A ₂₆₀	Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ad	bis zu, bis nach, bis an (lat.): (auffüllen) auf
AG	Arbeitsgruppe
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (engl.): Bicinchoninsäure
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (engl.): Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	<i>circa</i> (lat.): ungefähr
Cbp	<i>IQ calmodulin-binding motif family protein</i> (engl.)
Cd	Cadmium
CdCl ₂	Cadmiumchlorid
cDNA	<i>complementary DNA</i> (engl.): komplementäre DNA
cfu	<i>colony forming unit</i> (engl.): Koloniebildende Einheit
CHX	Cycloheximid
Ct	<i>cycle threshold</i> (engl.): Schwellenwert-Zyklus
Cth	Cathepsin
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (engl.): Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Drp	<i>Dynamain Related Protein</i> (engl.)
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i> (engl.): doppelsträngige DNA
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i> (engl.): doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etylendiamintetraacetat
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Electrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii/ae/a</i> (lat.): und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FeCl ₂	Eisen(II)chlorid
FeCl ₃	Eisen(III)chlorid
G	Guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (engl.): Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (engl.): Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ID	Identifikationsnummer
Kap.	Kapitel
kb	Kilo-Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
lat.	latein/lateinisch
LB	Luria Bertani (Nährmedium)
LC	<i>liquid chromatography</i> (engl.): Flüssigchromatographie
M	Molar (mol/L)
Mac	Makronukleus
mg	Milligramm
Mic	Mikronukleus

min	Minute(n)
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar (mmol/L)
µM	Mikromolar (µmol/L)
mRNA	<i>messenger RNA</i> (engl.): Boten-RNA
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTT	Metallothionein
MudPIT	<i>Multidimensional Protein Identification Technology</i> (engl.): Multidimensionale Proteinidentifikationstechnologie
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (engl.): Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (nmol/L)
No.	<i>number</i> (engl.): Nummer
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein</i> (engl.)
nt	Nukleotid
NTC	<i>No-Template-Control</i> (engl.): qPCR-Kontrolle ohne <i>Template</i>
OD	Optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i> (lat.): für die Analyse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (engl.): Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (engl.): Polymerase-Kettenreaktion
Prf	Profilin
psi	<i>Pound-force per square inch</i> (engl.): Maßeinheit für den Druck
qPCR	quantitative Real-Time-PCR
rDNA	ribosomale DNA

RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> (engl.)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (engl.): Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROX	5-Carboxy-X-Rhodamin-N-Hydroxysuccinimid-Ester
RPL29	ribosomales Protein L29
rpm	<i>rounds per minute</i> (engl.): Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkriptase
s = sek	Sekunde(n)
s.	siehe
SCX	<i>strong cation exchange</i> (engl.): starker Kationen-Austauscher
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (engl.): Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>short hairpin RNA</i> (engl.)
siRNA	<i>small interfering RNA</i> (engl.)
Snare	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i> (engl.)
s.o.	siehe oben
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i> (engl.): einzelsträngige RNA
T	Thymin
<i>T.</i>	<i>Tetrahymena</i>
T _A	<i>annealing temperature</i> (engl.): Anlagerungstemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> (engl.): Trichloressigsäure
TGD	<i>Tetrahymena Genome Database</i> (engl.): <i>Tetrahymena</i> Genom-Datenbank
T _m	<i>melting temperature</i> (engl.): Schmelztemperatur
Tpp	<i>Tetrahymena phagosome proteome</i> (engl.): <i>Tetrahymena</i> Phagosomenproteom
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>T.t.</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>
vgl.	vergleiche

V	Volt
Vps	<i>Vacuolar Protein Sorting</i> (engl.)
v/v	Volumenprozent
w/v	Massenprozent
z.B.	zum Beispiel
Z/ml	Zellen pro Milliliter

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Phagocytose des Einzellers *Tetrahymena thermophila*.

Bei den Protozoa stellt die Phagocytose die häufigste Art der Nahrungsaufnahme (Phagotrophie) dar. Hierbei handelt es sich um die Aufnahme fester Partikel in eukaryotische Zellen, wo diese in Form einer durch die Plasmamembran gebildeten Nahrungsvakuole, dem Phagosom, der intrazellulären Verdauung zugeführt werden. In speziellen phagocytischen Zellen hingegen spielt der Prozess der Phagocytose vor allem als Schutzmechanismus gegen körperfremde Zellen (Krankheitserreger) eine fundamentale Rolle.

Die Phagocytose wurde 1892 erstmalig von dem russischen Wissenschaftler Elie Metchnikoff beschrieben und seitdem intensiv studiert. Dennoch sind die detaillierten Mechanismen längst nicht vollständig verstanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Informationen bezüglich der Mechanismen des Phagocytoseprozesses auf molekularer Ebene zu erhalten. Dazu wurde der Ciliat *Tetrahymena thermophila* eingesetzt. Dieser ernährt sich durch Phagocytose, wobei Partikel wie organisches Material oder Bakterien mit einer hohen Effizienz und Geschwindigkeit eingestrudelt und durch Bildung von Phagosomen aufgenommen werden. Der Verdau des Phagosomeninhalts findet während einer Reihe von Umgestaltungsschritten statt, welche als Phagosomenreifung bezeichnet wird (Cyclose), in der das neu gebildete (naszente) Phagosom mit Vesikeln fusioniert, die eine Ansäuerung des Phagosoms bewirken und hydrolytische Enzyme zur Verfügung stellen.

Durch Isolierung von Phagosomen bestimmter Reifungsstadien aus *T. thermophila* und Analyse ihrer Proteinzusammensetzung konnte ein erster Überblick über potentiell an der Phagocytose beteiligte Proteine erhalten werden. In neu gebildeten (naszenten) Phagosomen konnten 764 Proteine und in 10 min alten (kondensierten) Phagosomen 347 Proteine nachgewiesen werden. Demnach kommt es beim Übergang von

naszenten zu kondensierten Phagosomen zu einer Abnahme der Proteinanzahl. Eine Analyse der identifizierten Proteine macht deutlich, dass an der Zusammensetzung des Phagosoms von *T. thermophila* verschiedene Proteinklassen wie z.B. Proteine, die eine Rolle beim Transport von Vesikeln spielen, beteiligt sind.

Zu den identifizierten Proteinen gehören auch die Tpp (*Tetrahymena phagosomal proteome*) – Proteine Tpp2p, Tpp3p, Tpp5p und Tpp9p mit bisher unbekannter Funktion. Diese wurden hinsichtlich einer Beteiligung am Phagozytoseprozess näher untersucht. Die relative Quantifizierung des jeweiligen mRNA-Levels von phagozytierenden Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zeigte, dass die Tpp-Proteine neben ihrer Funktion in der Phagozytose noch eine oder mehrere weitere Funktionen in der Zelle besitzen müssen.

Die Analyse der stadienspezifischen Phagosomen sowie des mRNA-Levels der Zelle deutet darauf hin, dass **Tpp5p** vor allem an den ersten Schritten der Phagozytose (30 sek bis 10 min) beteiligt ist. Demnach ist es denkbar, dass das Protein an der Bildung und der Reifung des Phagosoms gleichermaßen beteiligt ist. Die Proteine **Tpp3p** und **Tpp9p** scheinen hingegen vorwiegend eine Rolle bei der Phagosomenreifung zu spielen. Beide Proteine kommen in naszenten Phagosomen nicht oder nur geringfügig vor. Quartärstrukturanalysen zeigen, dass Tpp9p drei Transmembranhelices besitzt. Dies deutet darauf hin, dass das Protein in die Phagosomenmembran eingelagert und für den Transport (z.B. Proteine, Ionen) oder die Signalübertragung durch die Membran zuständig bzw. an Membran-Fusionsprozessen beteiligt ist.

Für **Tpp2p** wurden die höchsten mRNA-Level nachgewiesen, so dass für dieses Protein im Vergleich zu den anderen Tpp-Proteinen eine stärkere Beteiligung an der Phagozytose angenommen werden kann. Zu welchen Zeitpunkten Tpp2p benötigt wird, kann anhand der erhaltenen Ergebnisse nicht festgestellt werden. Jedoch deutet die vorhergesagte Struktur des Proteins darauf hin, dass es sich hierbei um ein Transportprotein handelt. Der größte Teil des membrangebundenen Proteins befindet sich außerhalb des Phagosoms, so dass Tpp2p möglicherweise mit seinem cytoplasmatischen Bereich ein Substrat bindet und über die Membran in das Phagosomeninnere transportiert. Eine Funktion des Proteins könnte darin liegen, dass es an einem Vesikeltransport zwischen Phagosom und kontraktile Vakuole beteiligt ist.

Zur Analyse weiterer Proteine, die zuvor in Phagosomen nachgewiesen wurden, sollte ein *Silencing* der entsprechenden Gene basierend auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz durchgeführt werden. Untersucht wurden sechs weitere Proteine bzw. deren zugehörige Gene, die aufgrund ihrer mutmaßlichen Funktionen ausgewählt wurden:

Ein **Snare**-Protein ist an der Fusion von diskoidalen Vesikeln mit dem naszenten bzw. sich bildenden Phagosom beteiligt. **Vps13** soll dafür zuständig sein, dass diskoidale Vesikel in ausreichender Menge vorhanden sind und dass diese mit dem naszenten Phagosom fusionieren.

Von den Proteinen **Drp1** und **Prf1** wird angenommen, dass sie an der Reifung des Phagosoms beteiligt sind. Drp1 könnte für die Fusion des Phagosoms mit Lysosomen von Bedeutung sein, und für Prf1 wird eine Rolle bei der Bewegung des Phagosoms vom Cytostom zum Cytoprokt angenommen. Für das Calmodulin-bindende Protein **Cbp** wird eine Funktion bei der Bildung von Nahrungsvakuolen diskutiert. Das Cathepsin **Cth90** schließlich stellt ein hydrolytisches Enzym dar, welches zu den Komponenten des Phagolysosoms zählt.

Mit Hilfe des RNA_i-Ansatzes sollten die Funktionen der sechs genannten Proteine überprüft werden, indem Auswirkungen des *Silencings* auf die Phagozytose analysiert wurden. Hierzu wurde zunächst einmal die RNA_i-Methode im Labor etabliert. Anschließend wurden Konstrukte, die die Expression eines dsRNA-*Hairpins* durch Induktion mit Cadmium ermöglichen, erstellt und mit Hilfe einer Genkanone (*gene gun*) in *T. thermophila*-Zellen eingebracht. Nach Behandlung der Transformanten mit Cadmium konnte eine Abnahme des mRNA-Levels in einer quantitativen PCR nachgewiesen werden. Da diese Abnahme in gleichermaßen behandelten Kontroll-Zellen (Wildtyp CU427) nicht beobachtet wurde, konnte die abnehmende mRNA-Menge auf die Expression des *Hairpins* zurückgeführt und ein erzielter RNA_i-Effekt demnach bestätigt werden. Das zur Expression des dsRNA-*Hairpins* erstellte Konstrukt konnte somit erfolgreich ein *Silencing* der gesuchten Gene hervorrufen. Auswirkungen der verminderten Genexpression auf den Phänotyp der Zelle, d.h. auf die Phagosomenbildung, konnten im Rahmen dieser Arbeit mikroskopisch nicht beobachtet werden. Die Phagozytose schien in *Tetrahymena*-Transformanten genauso stattzufinden wie in Wildtyp-Zellen. Hier sollten zukünftig Methoden etabliert werden, mit denen sich beispielsweise die Phagosomenzahl quantifizieren oder die

Phagocytose zeitlich genauer verfolgen lässt. Denkbar wäre auch, dass die untersuchten Proteine/Gene nicht essentiell für eine funktionierende Phagocytose sind. Möglicherweise übernehmen andere Proteine die Aufgaben des Proteins, dessen Genexpression herunterreguliert wurde. Eventuell ist auch ein vollständiger *Knockout* nötig, um mikroskopisch sichtbare Auswirkungen auf den Phänotyp zu erzielen.

1 Einleitung

Was ist Phagocytose?

Welche Rolle spielt dieser Prozess im Menschen? Wie können die Vorgänge, die bei der Phagocytose ablaufen, entschlüsselt werden?

Diesen Fragen wird sich die Einleitung dieser Arbeit widmen. Zunächst wird eine allgemeine Einführung in den Prozess der Phagocytose gegeben. Außerdem wird die Funktion der Phagocytose in Fresszellen vorgestellt.

Anschließend wird darauf eingegangen, warum sich der Einzeller *Tetrahymena thermophila* eignet, um den Ablauf der Phagocytose aufzuklären. Neben der Erläuterung charakteristischer Merkmale sowie genetischer Besonderheiten des Organismus wird auf die Phagocytose in *Tetrahymena thermophila* näher eingegangen.

Ein weiteres Kapitel befasst sich mit Proteinen, die an der Phagocytose beteiligt sind.

1.1 Phagocytose

Phagocytose – die Einverleibung großer Partikel durch Zellen – findet zum einen in vielzelligen Tieren, bei denen spezielle phagocytische Zellen (s. Kap. 1.1.1) eine fundamentale Rolle bei Verteidigungsmechanismen spielen (Rosales 2005), und zum anderen bei einzelligen Organismen, die sich auf diese Weise ernähren (s. Kap. 1.3), statt.

Heterotrophe Protozoen können keine Photosynthese betreiben und sind daher auf organische Nährstoffe angewiesen. Liegen diese gelöst vor, so können sie auf verschiedene Weise aufgenommen werden. Neben der Permeation, d.h. dem Transport von Stoffen durch die Zellhülle, spielt die Pinocytose ("Zelltrinken") – die Abschnürung von Bläschen (Vesikeln) in das Zellinnere – eine große Rolle. Die Aufnahme vieler Nährstoffe durch Permeation stellt einen aktiven Transport dar, bei dem Energie verbraucht wird, und erfolgt nicht durch passiven Transport, der durch Diffusion und Osmose erklärt werden kann. Auch die Pinocytose-Aktivität wird von der Zelle selbst reguliert und ist kein bloßes Membran-Phänomen (Grell 1968).

Bei der Pinocytose können 50-150 nm große Vesikel (Clathrin-umhüllte Vesikel, Caveolin-umhüllte Vesikel und nicht-umhüllte Vesikel), welche durch Membraninvagination entstehen, von sogenannten Mikropinosomen unterschieden werden (Lamaze & Schmid 1995). Mikropinosomen sind mit 0,5-2 μm größer und bilden sich durch kleine Zellmembranüberlappungen am Vorderende einer Zelle (Lamaze & Schmid 1995). Die Bildung von Vesikeln durch Pinocytose gehört zur sogenannten Endocytose, die es eukaryotischen Zellen ermöglicht, Flüssigkeiten, Makromoleküle und größere Partikel aufzunehmen. Die Pinocytose ermöglicht z.B. die Aufnahme von Proteinen, die die Zellhülle nicht direkt passieren können.

Neben der Pinocytose (Aufnahme gelöster Stoffe) findet die Phagocytose (von griechisch *phagein* für "essen" und *kytos* für "Gefäß", womit die Zelle gemeint ist), also das "Zellfressen" (Aufnahme von partikulärem Material) statt. Die Aufnahme fester Nahrungspartikel durch Phagocytose ist die häufigste Art der Nahrungsaufnahme bei den Protozoa (Phagotrophie) und besteht im einfachsten Fall darin, dass Beuteorganismen von Pseudopodien (z.B. von Amöben) umschlossen werden (Gruner 1980). Die Zelle umschließt das Substratteilchen und bildet ein Substratvesikel. Dieses Substratvesikel vereinigt sich mit einem oder mehreren primären Lysosomen, deren hydrolytische Enzyme den Inhalt verdauen, zum sekundären Lysosom, bei Protisten Nahrungsvakuole genannt (Campbell & Reece 2003). Die Verdauungsprodukte wie einfache Zucker, Aminosäuren und andere Monomere gelangen anschließend in kleinen Exocytosevesikeln ins Cytosol und werden zu Nährstoffen für die Zelle (Campbell & Reece 2003). Die hydrolytischen Enzyme der Lysosomen dienen auch dazu, zelleigenes organisches Material wiederzuverwerten. Der als "Autophagie" bezeichnete Vorgang ermöglicht es der Zelle, sich ständig selbst zu erneuern. Außerdem ist der programmierte Tod von Zellen (Apoptose) durch ihre eigenen Lysosomenenzyme ein wichtiger Vorgang in der Entwicklung vieler Lebewesen (Campbell & Reece 2003). Bei einer ganzen Reihe erblicher Erkrankungen des Menschen, die zu den sogenannten Speicherkrankheiten gehören, ist der Lysosomenstoffwechsel gestört. Den Betroffenen fehlt eines der hydrolytischen Enzyme, die normalerweise in diesen Organellen aktiv sind. Deshalb häufen sich in den Lysosomen unverdaute Substanzen an, was schließlich andere Zellfunktionen in Mitleidenschaft zieht.

Eine weitere Form der Endocytose bei Tierzellen ist die rezeptorvermittelte Endocytose. Hierbei binden bestimmte Liganden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, woraufhin sich eine Membrangrube (*Coated Pit*) bildet, die auf ihrer cytoplasmatischen Seite mit einer Proteinschicht bedeckt ist. Diese Proteine tragen vermutlich dazu bei, dass sich die Grube vertieft und sich ein Vesikel (*Coated Vesicle*) abschnürt (Campbell & Reece 2003).

Die Phagocytose wurde erstmalig 1892 vom russischen Wissenschaftler Elie Metchnikoff beschrieben (Kokubun & Kobayashi 1979) und seitdem intensiv studiert. Metchnikow entdeckte die Immunabwehr-Mechanismen gegen Bakterien durch die weißen Blutkörperchen (Phagocytose) und entwickelte den Begriff „Makrophagen“ für solche Zellen, die den Abbau von eingedrungenen Fremdkörpern betreiben und bezeichnete mit „Mikrophage“ jene, die heute als neutrophile Granulozyten bekannt sind. Er ist damit der erste, der die Bedeutung dieser Zellen für die Immunabwehr beschrieb.

Auch wenn die Phagocytose seit ihrer Entdeckung unentwegt untersucht wurde, sind die detaillierten Mechanismen längst nicht vollständig aufgeklärt. Bei der Phagocytose handelt es sich um einen sehr komplexen Prozess, dessen molekulare Grundlage wir erst langsam zu verstehen beginnen (Rosales 2005).

1.1.1 Phagocytose bei Fresszellen (Phagocyten)

Manche Zelltypen des Menschen, die zum Abwehrsystem unseres Organismus gehören, sind in der Lage Phagocytose zu betreiben. Phagocytische Zellen wie Neutrophile, Eosinophile, Monocyten und Makrophagen spielen bei der Verteidigung gegen eindringende, pathogene Mikroorganismen eine wichtige Rolle. Sie erkennen und phagocytieren viele Krankheitserreger. Sind die Phagocyten an einem Entzündungsort angelangt, müssen sie den Infektionserreger erkennen. Sie können sich über nichtspezifische Zelloberflächenrezeptoren an Mikroorganismen anheften. Ist der Mikroorganismus durch eine Komponente des aktivierten Komplementsystems (C3b) opsonisiert, erfolgt jedoch eine ungleich stärkere Anlagerung (Roitt *et al.* 1987). Wird nun die Membran durch den angelagerten Infektionserreger aktiviert, umfließt sie

diesen mit Pseudopodien und schließt ihn so in einem Phagosom ein (Roitt *et al.* 1987).

Makrophagen sind die größten Phagocyten und besonders effizient und langlebig. Eindringene Keime werden im Inneren von Makrophagen in einer Vakuole eingeschlossen, die dann mit einem primären Lysosom verschmilzt. Das so gebildete sekundäre Lysosom kann den aufgenommenen Mikroorganismus zum einen durch toxische Sauerstoffmoleküle (z.B. Superoxid-Anion oder Stickoxid) abtöten oder zum anderen durch lytische Enzyme (z.B. Lysozym) verdauen (Campbell & Reece 2003).

Lysosomen, die dem intrazellulären Abbau von Makromolekülen dienen, kommen in allen tierischen Zellen vor allem in Leber, Niere und Milz und in Leukozyten vor. Sie sind von nur einer einfachen Biomembran umgeben und besitzen eine Matrix mit saurem Milieu. Lysosomen enthalten Hydrolasen aller Art, die ihr pH-Optimum im sauren Bereich (pH 4-5) besitzen. Membranproteine auf der luminalen Seite der Lysosomen sind stark glycosyliert, um vor einem Abbau durch lysosomale Hydrolasen geschützt zu sein. Beim Abbau der Makromoleküle durch Lysosomen wird zwischen Autophagie, bei der zelleigene Strukturen/Organeln hydrolysiert werden, und Heterophagie, bei der durch Endocytose aufgenommene Fremdpartikel lysiert werden, unterschieden.

Einige pathogene Mikroorganismen sind in der Lage, mit Hilfe verschiedenster Überlebensmechanismen der Phagocytose zu entgehen. Der Erreger *Mycobacterium tuberculosis* ist beispielsweise resistent gegen die lytischen Enzyme der Makrophagen und pflanzt sich in ihrem Inneren sogar fort. Eine andere Strategie wird von den Bakterien *Listeria monocytogenes* und *Shigella flexneri* genutzt (Sansonetti 1991; Kuhn & Goebel 1995). Diese können durch Lyse der phagosomalen Membran in Phagocyten überleben.

Für das Verständnis der genauen Mechanismen, die intrazelluläre Parasiten nutzen, um die Phagocytose zu umgehen, sind grundlegende Untersuchungen der Phagocytose unerlässlich. Die detaillierte Aufklärung des Verdauungszyklus sowie der daran beteiligten Proteine ist dabei von großer Bedeutung.

Erkenntnisse über die molekularen Zusammenhänge der Phagozytose sind demnach nicht nur für die Klärung zellbiologischer Fragestellungen interessant, sondern ebenso von medizinischer Relevanz.

Weshalb sich der Einzeller *Tetrahymena thermophila* in besonderer Weise zur Aufklärung von Prozessen, die während der Phagozytose stattfinden, eignet, wird nachfolgend erläutert (s. Kap. 1.2.1).

1.2 *Tetrahymena thermophila*

1.2.1 *Tetrahymena thermophila* als Modellorganismus

Tetrahymena thermophila (*T. thermophila*) stellt ein interessantes Objekt sowohl für die wissenschaftliche Forschung als auch für biotechnologische Anwendungen dar. Die Bekanntheit des Organismus basiert vor allem auf seiner weiten Verbreitung und der einfachen Kultivierbarkeit im Labormaßstab. *Tetrahymena* wird in vielen Laboratorien in sterilen Nährlösungen (axenisch) gezüchtet (Griner 1980). Neben dem Vorteil der preisgünstigen Medien gibt es eine Reihe weiterer Vorteile, die *Tetrahymena* zu einem geeigneten Modellorganismus für die Grundlagenforschung machen. *T. thermophila* weist beispielsweise eine relativ kurze Generationszeit von etwa 2-3 h (bei 30°C) auf, wodurch hohe Zelltitel erreicht werden können (Weide *et al.* 2006) und zeichnet sich durch Apathogenität aus. Weiterhin bestehen starke Ähnlichkeiten zellulärer Prozesse mit den entsprechenden Vorgängen bei höheren Eukaryoten, was die Forschung an grundlegenden Fragestellungen erleichtert. Darüber hinaus zeigt *T. thermophila* eine vergleichbare Sensibilität hinsichtlich äußerer Reize und eignet sich aufgrund seiner Größe für detaillierte morphologische Beobachtungen (Asai & Forney 2000).

Tetrahymena vereint eine biologische Komplexität, die vergleichbar mit der von Metazoa ist, mit der experimentellen Zugänglichkeit eines Protisten (Asai & Forney 2000). Aus diesem Grund konnten bereits einige fundamentale biologische Erkenntnisse wie die Funktion der Histon-Acetyltransferase A bei der Transkriptionsregulation (Pennock *et al.* 1988a; Brownell *et al.* 1996) mit Hilfe von *Tetrahymena* gewonnen werden. Außerdem gewährte der Organismus Einsicht in den

Aufbau und die Biogenese von Cilien (Pennock *et al.* 1988a; Pennock *et al.* 1988b) und in die Funktion des Dynein-Motors (Gibbons & Rowe 1965). Des Weiteren konnten Ribozyme (Cech 1989), Telomere (Blackburn & Gall 1978) und Telomerasen (Greider & Blackburn 1985) erstmalig bei *T. thermophila* beschrieben werden.

Ein großes wirtschaftliches Potenzial des Ciliaten liegt im Vorkommen intrazellulärer Enzyme, die als biologische Wertstoffe genutzt werden können. Beispielsweise zeigt L-Asparaginase eine antiproliferierende Aktivität bei Krebszellen, so dass eine chemotherapeutische Applikation des Enzyms diskutiert wird (Kyriakidis *et al.* 1990). Ein weiteres intrazelluläres Enzym mit wirtschaftlicher Bedeutung ist die Diisopropylfluorophosphatase (DFPase), die zum Abbau toxischer Organofluorophosphate (z.B. das Nervengift Soman) genutzt werden kann (Landis *et al.* 1987).

Neben intrazellulären Enzymen sind auch extrazelluläre Wertstoffe, bei denen es sich hauptsächlich um saure Hydrolasen handelt, von kommerziellem Interesse. Hierbei handelt es sich um lysosomale Enzyme, die bei *Tetrahymena* im Allgemeinen der intrazellulären Verdauung des endozytotisch aufgenommenen Materials dienen (Dingle & Dean 1984). Vor allem Phosphodiesterasen, Phosphatasen oder auch Proteasen werden sowohl in der Analytik als auch in der Waschmittel- und Lebensmittelindustrie eingesetzt. 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 D1 (Valcarce *et al.* 2001; Gentili *et al.* 2007). Da *Tetrahymena* sich von Bakterien ernährt, die sehr effizient aus dem Wasser gefiltert werden, spielt der Organismus außerdem eine Rolle bei der Abwasserreinigung.

Das extrazelluläre Auftreten saurer Hydrolasen zeigt, dass *Tetrahymena* einen leistungsfähigen Sekretionsapparat besitzt, was bei der biotechnologischen Produktion endogener oder rekombinanter Proteine einen großen Vorteil darstellt, da so eine einfache und kostengünstige Produktaufreinigung ermöglicht wird. Außerdem ist *T. thermophila* als eukaryotischer Organismus in der Lage, sekretorische Proteine posttranslational zu modifizieren (z.B. Acetylierung). Schließlich weist *Tetrahymena* biantennäre, mannosereiche N-Glykane und damit ein Glykosylierungsmuster auf, das einfache Modifikationen wie die Addition weiterer Zuckerstrukturen erlaubt. Dies ist hinsichtlich der Produktion heterolog exprimierter Proteine, die z.B. therapeutisch

eingesetzt werden sollen, von großer Bedeutung, da beispielsweise Glykosylierungen oder die Bildung von Disulfidbrücken einen wichtigen Einfluss auf die korrekte Form, die Löslichkeit und die Stabilität und somit auch auf die Funktionalität komplexer, rekombinanter Proteine haben (Jenkins & Curling 1994; Weide *et al.* 2006; Nettleship *et al.* 2010). Als Beispiel für die Nutzung von *T. thermophila* zur rekombinanten Proteinexpression sei die Produktion eines Grippe-Impfstoffs genannt (Sachse 2010).

Für die optimale Nutzung eines Modellorganismus ist es von großer Bedeutung, diesen genetisch manipulieren zu können. Von Vorteil ist hierbei, dass das makronukleäre Genom von *Tetrahymena* vollständig sequenziert ist (Eisen *et al.* 2006). Es sind sowohl klassische Kreuzungsversuche als auch Manipulationen durch molekularbiologische Verfahren wie die Mikroinjektion (Tondravi & Yao 1986), die Elektroporation (Gaertig & Gorovsky 1992) und die Transfektion durch *Biolistic Bombardment*, mit der sogar der Mikronukleus (s. Kap. 1.2.3) genetisch verändert werden kann (Cassidy-Hanley *et al.* 1997), möglich. Des Weiteren wurden *shuttle*-Vektoren entwickelt, die zur Generierung von Mutanten oder von Stämmen zur rekombinanten Proteinproduktion herangezogen werden können. Es sind episomale Plasmide, die auf rDNA-Replikons basieren (Larson *et al.* 1986) sowie *Knock out*- und *Knock in*-Techniken, die auf der Grundlage der homologen Rekombination beruhen (Hai *et al.* 2000; Gaertig & Kapler 2000), verfügbar. Die Expression endogener Proteine konnte durch eine neue *Antisense*-Technik (Sweeney *et al.* 1996) sowie durch Expression von *hairpin*-RNA (Howard-Till & Yao 2006) mittels *Gene Silencing* deutlich verringert werden.

Aus den o.g. Gründen ist *T. thermophila* ein geeigneter Modellorganismus, mit dem sich auch die Vorgänge, die bei der Phagozytose stattfinden, aufklären lassen. Bevor nachfolgend die Phagozytose bei *T. thermophila* erläutert wird (s. Kap. 1.3), soll zunächst der Organismus näher vorgestellt werden (s. Kap. 1.2.2 und 1.2.3).

1.2.2 Merkmale von *Tetrahymena thermophila*

Tetrahymena thermophila zählt als einzelliger, eukaryotischer Organismus zu den Protozoen. Zusammen mit den Dinoflagellaten und den Apicomplexa bilden Ciliaten,

zu denen *T. thermophila* gehört, den Stamm der Alveolaten (Saldarriaga *et al.* 2003). Namen gebendes Merkmal dieses Stamms sind sogenannte Alveolen (s. Abb. 3) – kleine Bläschen unter der Zelloberfläche (Campbell & Reece 2003), deren Funktion meistens unbekannt ist. In manchen Fällen verleihen sie dem Corticalplasma zusätzliche Stabilität. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Alveolen eine Rolle als Calcium-Depot spielen (Westheide & Rieger 2004).

Der Ciliat weist einen birnenförmigen (Gruner 1980), etwa 30 x 50 µm großen Zellkörper (Collins & Gorovsky 2005) auf (s. Abb. 1) und ist als hochdifferenzierter, freischwimmender Organismus überwiegend in nährstoffreichen Süßwasserhabitaten wie Bächen, Flüssen und Seen, aber auch in Teichen und Tümpeln zu finden.

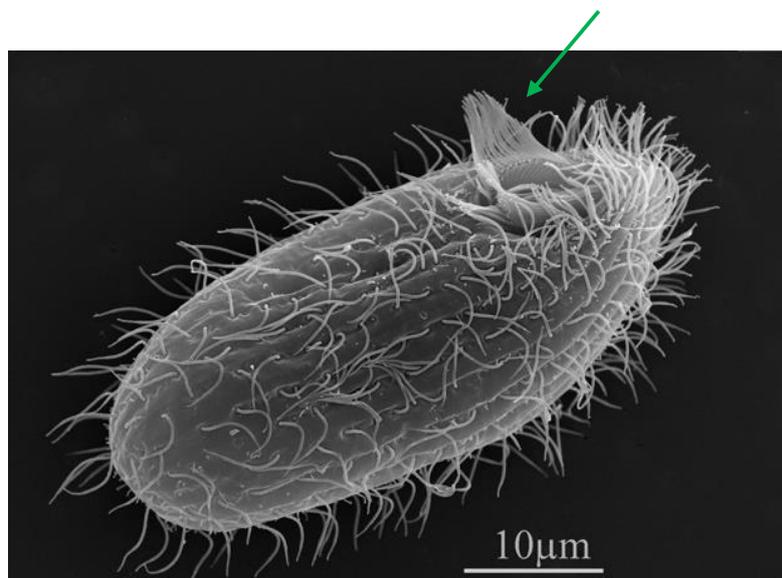


Abb. 1: *Tetrahymena thermophila*. Zu erkennen ist die sich über den gesamten Zellkörper erstreckende Ciliatur sowie das Mundfeld (Peristom) mit seinen charakteristischen Cilienreihen (Pfeil). Rasterelektronenmikroskopaufnahme mit freundlicher Genehmigung von Aswati Subramanian, Miami University, Oxford, Ohio, USA.

Tetrahymena gehört zur Ordnung der Holotricha, die sich dadurch auszeichnet, dass die Organismen Cilien von etwa gleicher Länge besitzen (Storch & Welsch 2009) und zur Unterordnung Hymenostomata (Grell 1968; Gruner 1980). Diese sind durch einen der Nahrungsaufnahme dienenden Oralapparat gekennzeichnet (s. Abb. 1, Pfeil).

Der Oralapparat, auch Cytostom genannt, ist eine komplexe Trichter-ähnliche Struktur, welche die ventrale Seite der Zelle definiert. Bei *Tetrahymena* weist er eine aus

Cilienreihen bestehende undulierende Membran, die dem Nahrungstransport dient, sowie drei Membranellen (s. Abb. 2) auf (Grell 1968; Gruner 1980). Der Name *Tetrahymena* geht auf diese Cilienreihen zurück, da diese mikroskopisch betrachtet vier kleine Häutchen darstellen (Levine *et al.* 1980).

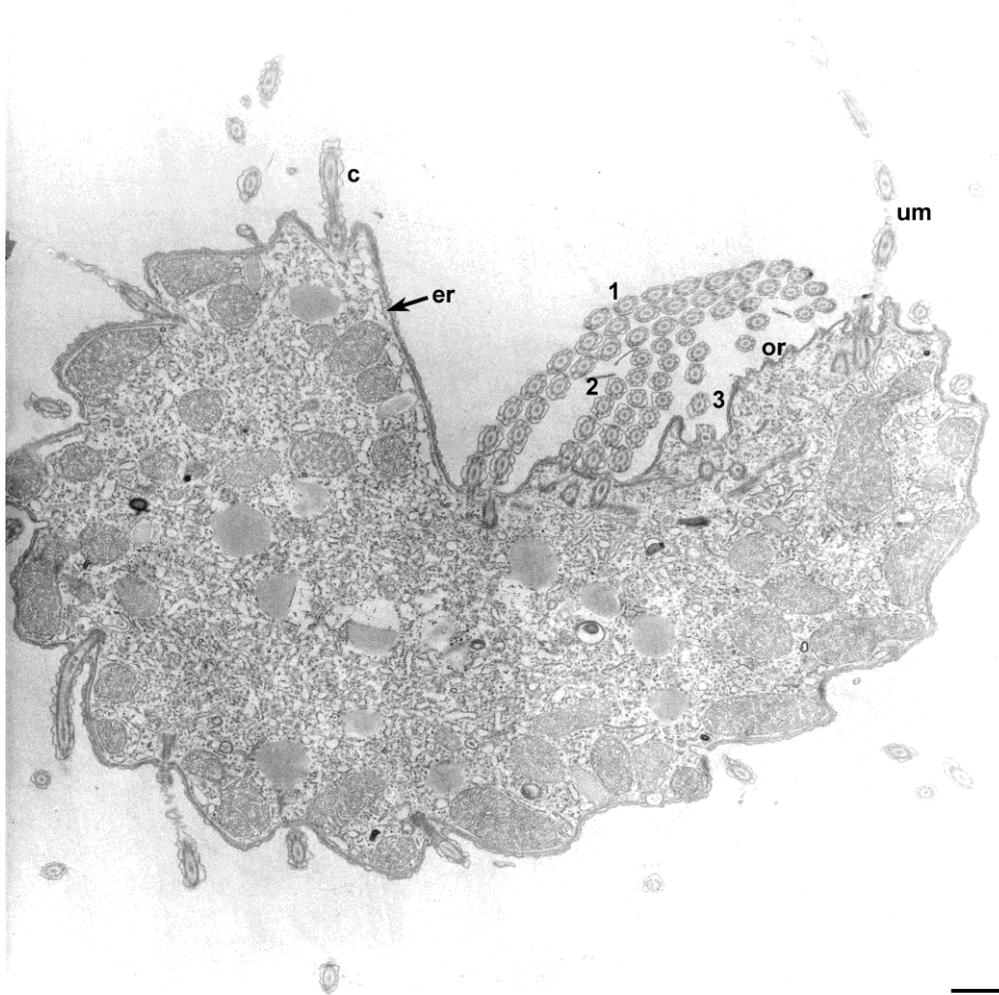


Abb. 2: Querschnitt der Buccalhöhle von *Tetrahymena thermophila* (ventrale Seite: oben). Zu erkennen sind die undulierende Membran (um) sowie die drei Membranellen (1, 2 und 3), die durch „oral rips“ (or) voneinander getrennt sind. Am Rand der linken Seite, die zum Cytosol hin mit dem Endoplasmatischen Retikulum (er) bedeckt ist, befinden sich Cilien (c). Elektronenmikroskopische Aufnahme von R. Allen, 1967, Quelle: <http://www5.pbrc.hawaii.edu/allen> (Balken: 1 µm).

Die Tätigkeit der zum Mundapparat gehörenden, deutlich längeren Cilien (Westheide & Rieger 2004) führt zur Erzeugung eines Wasserstroms, der die Nahrungspartikel zum Cytostom treibt (Gruner 1980). *T. thermophila* zählt zu den Strudlern: Die Membranellen strudeln Nahrungspartikel heran, die von der undulierenden Membran in die Cytostomregion geleitet werden (Westheide & Rieger 2004). Nach der

intrazellulären Verdauung der Nahrungspartikel erfolgt die Exkretion von Abfallstoffen, wofür der sogenannte Cytoprokt (Cytopyge) nahe dem posterioren Ende der Zelle verantwortlich ist.

Die charakteristische, allseitige Bewimperung (holotriche Ciliatur) des Ciliaten (s. Abb. 1), die aus Längsreihen von relativ kurzen Wimpern (Kineten) besteht, dient vor allem der Fortbewegung (Mehlhorn & Ruthmann 1992). Dabei schlagen aufeinander folgende Wimpern mit einer Phasendifferenz, wohingegen nebeneinander schlagende Wimpern in der gleichen Phase sind, so dass sich die Koordination der Wimperntätigkeit im Auftreten der sogenannten metachronen Wellen äußert (Gruner 1980).

Der heterotrophe Ciliat besitzt alle typischen Zellstrukturen wie Zellkern, Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum (ER), Lysosomen, Dictyosomen, Peroxisomen und Ribosomen (vgl. Abb. 3). Außerdem findet man bei *T. thermophila* Phagosomen (vgl. Kap. 1.3), Mucocysten (Tokuyasu & Scherbaum 1965) und eine kontraktile Vakuole.

Die Morphologie der Zelle wird weitgehend durch die Zellhülle (Pellicula) bestimmt, die zusammen mit den ihr zugeordneten Strukturen des Cytoplasmas die sogenannte Zellrinde (Cortex) bildet. Ihre Festigkeit verleiht der Zelle ihre spezifische Gestalt (Grell 1968).

Die Cytokinese erfolgt bei *T. thermophila* durch Querteilung (Mehlhorn & Ruthmann 1992). Hierbei laufen recht komplexe morphogenetische Vorgänge wie z.B. die Stomatogenese (Entstehung eines neuen Mundapparates), die Bildung einer zweiten Cytopyge, die Verdopplung der kontraktiven Vakuolen sowie die Vergrößerung des Corticalsystems ab (Westheide & Rieger 2004). Je nach Differenzierungsgrad der Mutterzelle sind die Tochterzellen voneinander verschieden. Die Regenerationsprozesse, welche eine Übereinstimmung herbeiführen, fallen ebenfalls sehr unterschiedlich aus (Gruner 1980).

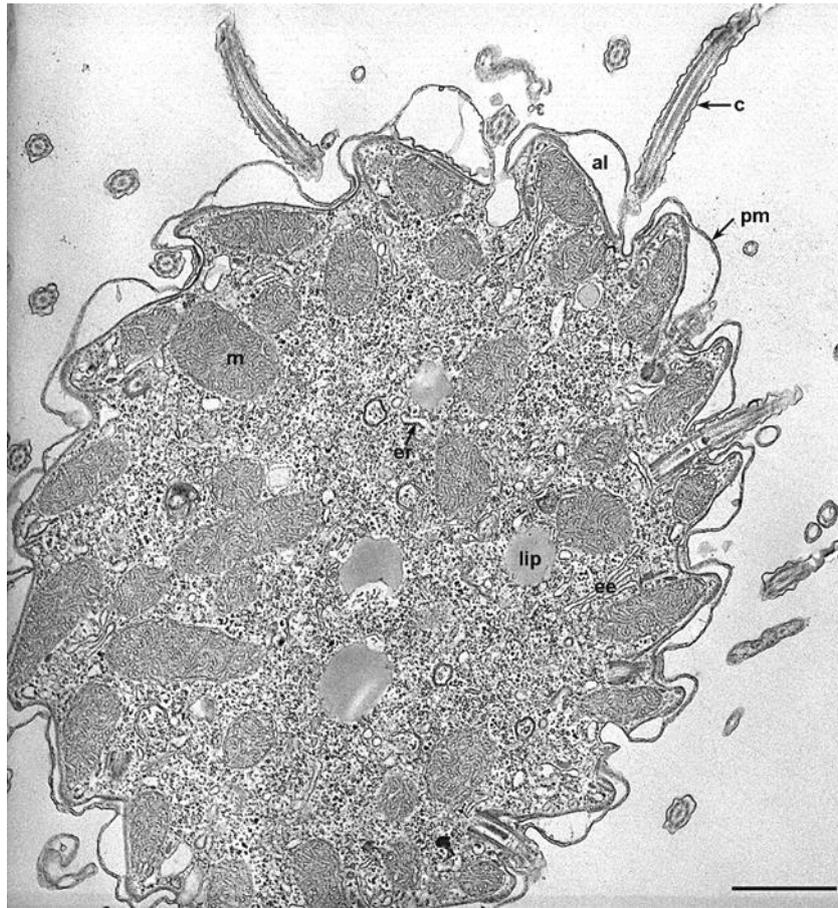


Abb. 3: Querschnitt einer *T. thermophila*-Zelle (elektronenmikroskopische Aufnahme, (Allen 1967)). Die Zelle ist von einer Plasmamembran (pm) mit einem darunter liegenden Mosaik aus Alveolen (al) umgeben. Die Oberfläche der Zelle ist durch Furchen gekennzeichnet, an denen sich die Cilien (c) befinden. Das Cytoplasma der Zelle beinhaltet strukturelle Elemente wie Ribosomen, Mitochondrien (m) und Lipidkörper (lip) sowie die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (er) und des Endosomensystems (ee).

Typische Merkmale von *Tetrahymena* sind der Kerndualismus sowie die sexuelle Fortpflanzung der Zelle durch Konjugation (Mehlhorn & Ruthmann 1992). Auf diese wird in Kap. 1.2.3 näher eingegangen.

1.2.3 Genetische Besonderheiten von *Tetrahymena thermophila*

T. thermophila weist den für Ciliaten typischen Kerndualismus, d.h. das gleichzeitige Vorkommen zweier Kerntypen und damit eine Kompartimentierung von Keimbahn und Somafunktion, auf. Einige Ciliaten wie z.B. *Paramecium*, verfügen über mehrere Mikro- oder Makronuklei, *T. thermophila* hingegen besitzt einen generativen Mikronukleus (Mic) und einen somatischen Makronukleus (Mac).

Der Mikronukleus ist mit einem Durchmesser von 2-5 μm relativ klein (Westheide & Rieger 2004). Das Genom des diploiden Mikronukleus beinhaltet fünf Chromosomen mit 120 Mb und 27.500 putativen offenen Leserahmen (Turkewitz *et al.* 2002; Collins & Gorovsky 2005).

Der Mikronukleus fungiert als Träger der genetischen Information. Seine Aufgabe besteht im Wesentlichen darin, sich fortzupflanzen und ein ständiges Reservoir für Makronuklei zu bilden (Grell 1968). Mikronuklei sind unbegrenzt fortpflanzungsfähig (Gruner 1980), sie teilen sich mitotisch und sind während des vegetativen Wachstums transkriptionsinaktiv.

Der polyploide Makronukleus (105 Mb) mit über 20.000 postulierten Genen (Eisen *et al.* 2006; Coyne *et al.* 2008) enthält etwa 275 Chromosomen, welche in bis zu 45 Kopien vorliegen können (Mayo & Orias 1981; Collins & Gorovsky 2005). Von den Mikronuklei lassen sich Makronuklei durch ihre Größe leicht unterscheiden. Sie weisen – entsprechend ihres hochamplifizierten Genbestands – meist eine vielfach größere Dimension auf. Makronuklei sind die Orte der RNA-Synthese, sie übernehmen die Aufgaben des normalen Zellmetabolismus (Westheide & Rieger 2004). Im Zuge des vegetativen Wachstums teilt sich der transkriptionsaktive Makronukleus amitotisch und bestimmt den Phänotyp der Zelle (Mehlhorn & Ruthmann 1992; Collins & Gorovsky 2005).

Während der sexuellen Fortpflanzung werden Makronuklei aus sich umdifferenzierenden Mikronuklei neugebildet.

Im Allgemeinen leben und teilen sich mikronukleuslose Formen normal, können aber nicht mehr konjugieren. Individuen ohne Makronukleus gehen zugrunde (Storch & Welsch 2009).

Tetrahymena reproduziert sich asexuell, solange sich die Zellen in reichhaltigem Medium befinden. Somit sind die Zellen theoretisch unsterblich. Allerdings kann der Ciliat altern, was sich durch die Abnahme der Fruchtbarkeit äußert. Diese Abnahme resultiert aus einer verminderten Fähigkeit zur Konjugation und aus der Zunahme von fehlgeschlagenen Vollendungen einer Konjugation.

Die sexuelle Reproduktion mittels Konjugation wird durch einen Nährstoffmangel ausgelöst und ereignet sich nur zwischen komplementären Paarungstypen (*mating types*), von denen bei *T. thermophila* sieben verschiedene existieren (Orias 1981;

Madinger *et al.* 2010). Der jeweilige Paarungstyp wird während der sexuellen Neuentwicklung des Makronukleus festgelegt und bleibt in der Zelle und in seinen asexuellen Nachkommen stabil (Orias 1981; Eisen *et al.* 2006).

Bei der Konjugation (s. Abb. 4) berühren sich zwei Zellen zunächst mit ihren Vorderenden und legen sich dann in ganzer Länge aneinander (Grell 1968).

Nach einer starken Volumenzunahme der Mikronuklei führt jeder Mic zwei aufeinanderfolgende meiotische Teilungen durch (1.), womit eine Chromosomenreduktion verbunden ist (Grell 1968). Drei der entstandenen haploiden Tochterkerne wandern zum posterioren Ende der Zelle und lösen sich auf. Nach einer postmeiotischen Mitose des vierten Kerns (2.) entstehen die beiden Gametenkerne (Pronuklei). Während der eine als Stationärkern bezeichnete Gametenkern im Konjuganten verbleibt, wandert der andere (Wanderkern) in den Partner hinüber (3.). In jeder Zelle verschmelzen schließlich Stationär- und Wanderkern zu einem Synkaryon (4.). Dieser teilt sich zweimal mitotisch und erzeugt vier diploide Produkte (5.).

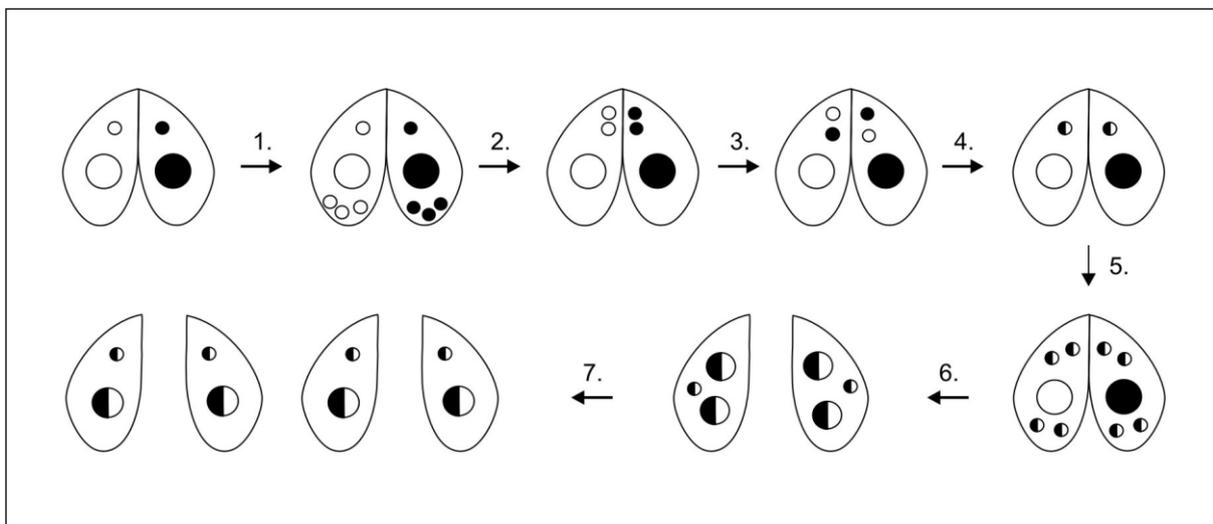


Abb. 4: Konjugation von *T. thermophila* (nach Bockau, 2006). Die Abbildung verdeutlicht schematisch, welche Schritte bei der Konjugation ablaufen. Nähere Erläuterungen: s. Text.

Bei der Konjugation findet also eine Wechselbefruchtung statt, nach der sich beide Partner wieder voneinander trennen (Grell 1968). In den Exkonjuganten teilt sich das Synkaryon in zwei Tochterkerne. Einer der neu entstandenen Nuklei stellt den Mikronukleus dar und der andere wird zum neuen Makronukleus ausdifferenziert,

wobei der alte Makronukleus apoptotisch zerstört wird (Turkewitz *et al.* 2002). Durch eine postzygotische Zellteilung der Exkonjuganten werden vier Zellen (Karyoniden) produziert (7.). Jedes genomisch identische Karyonid erhält einen unabhängig differenzierten Makronukleus und eine mitotische Kopie des funktionellen Mikronukleus.

Bei der Ausbildung des neuen Makronukleus werden die fünf Chromosomen des Mikronukleus zunächst zu 200-300 Chromosomen-Fragmenten, ARP (*autonomously replicating pieces*) genannt, abgebaut, wobei die Größen der Chromosomen-Fragmente von 21 kb bis zu 3000 kb variieren (Blackburn & Gall 1978; Altschuler & Yao 1985; Yao *et al.* 1990; Eisen *et al.* 2006; Hamilton *et al.* 2006). Anschließend werden diese Chromosomen – nachdem Telomere angefügt wurden – mehrfach amplifiziert, was aufgrund des fehlenden mitotischen Spindelapparats als autonome Replikation bezeichnet wird (Wong *et al.* 2000).

Ein weiteres besonderes Merkmal von *T. thermophila* ist der hohe AT-Gehalt des Genoms. Dieser liegt bei 76 %, wobei Exons einen AT-Gehalt von etwa 54 % und Introns einen mit 85 % deutlich höheren AT-Gehalt aufweisen (Csank *et al.* 1990; Prescott 1994).

Des Weiteren verfügt *Tetrahymena* über einen genetischen Code, der von dem anderer Organismen abweicht (Martindale 1989). Alle bisher untersuchten Ciliaten (*Tetrahymena*, *Paramecium*, *Stylonychia* und *Oxytricha*) nutzen die Triplets UAA und UAG nicht wie üblich als Stopp-Codons, sondern als Codons, die für die Aminosäure Glutamin codieren (Caron & Meyer 1985; Helftenbein 1985; Horowitz & Gorovsky 1985; Preer *et al.* 1985; Andreasen *et al.* 1987). Als Stopp-Codon wird ausschließlich das Triplett UGA genutzt (Eisen *et al.* 2006). Interessanterweise ergab die Sequenzierung des makronukleären Genoms von *Tetrahymena*, dass das Stopp-Codon UGA in manchen Genen auch die Aminosäure Selenocystein kodiert. Damit stellt *Tetrahymena* den ersten Organismus dar, der potentiell alle 64 Codons von nukleären Genen in Aminosäuren translatieren kann (Eisen *et al.* 2006).

Als letzte Besonderheit sei erwähnt, dass sich die Translationsinitiationsstelle von *Tetrahymena* (AAAAAAATGG) deutlich von der GC-reichen Kozak's Sequenz anderer Eukaryoten (GCCRCCATGG) unterscheidet (Kozak 1978; Wuitschick & Karrer 1999).

1.3 Phagozytose bei *Tetrahymena thermophila*

Grundlegende zellbiologische Erkenntnisse zur Phagozytose wurden mit Hilfe von Ciliaten der Gattungen *Paramecium* und *Tetrahymena* gewonnen. Diese ernähren sich durch Phagozytose, wobei Partikel wie organisches Material oder Bakterien mit einer hohen Effizienz und Geschwindigkeit eingestrudelt und durch Bildung von Phagosomen aufgenommen werden. Der Verdau des Phagosomeninhalts findet während einer Reihe von Umgestaltungsschritten statt, welche als Phagosomenreifung bezeichnet wird, in der das neu gebildete (naszente) Phagosom mit Vesikeln fusioniert, die eine Ansäuerung des Phagosoms bewirken und hydrolytische Enzyme zur Verfügung stellen, während andere Komponenten selektiv durch Vesikelknospung entfernt bzw. recycelt werden (Stuart & Ezekowitz 2005).

T. thermophila ist im Gegensatz zu Amöben und Makrophagen von einem rigiden Zellcortex umgeben, der aus der Plasmamembran, dem darunterliegenden Alveolarsystem und einem Netzwerk aus Mikrotubulibündeln und Aktinfilamenten sowie einer als Epiplasma bezeichneten Proteinschicht besteht (Allen 1988). Phagosomen können daher nicht an jeder beliebigen Stelle der Zelloberfläche gebildet werden. Vielmehr besitzt die Zelle mit dem Cytostom und dem Cytoprokt spezielle Strukturen, an denen Phagosomen entstehen bzw. unverdauliche Reste egestiert werden. An diesen spezialisierten Stellen ist das Alveolarsystem unterbrochen und die Zelle nur durch eine Membran nach außen abgegrenzt.

Ob die Phagozytose bei *T. thermophila* allein durch partikuläres Material ausgelöst wird oder ob sie von einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung abhängt, ist umstritten. Zwar kann sie durch unterschiedliche organische Stoffe induziert werden (Ricketts 1972), die Inhibierung durch Endorphin-ähnliche Substanzen (Renaud *et al.* 1995) ist jedoch ein Hinweis auf die Beteiligung von Rezeptoren.

Die Konzentration und Aufnahme von Partikeln erfolgt bei *Tetrahymena* am sogenannten Cytopharynx, einer trichterförmigen Öffnung, an dessen Basis das Cytostom liegt (s. Abb. 5). Hier befinden sich auch weitere für den Cytopharynx typische Strukturen wie die mit Mikrotubuli verstärkten „oral ribs“ und die sogenannte „oral deep fiber“. Die „oral ribs“ (s. Abb. 5) reichen von der undulierenden Membran bis kurz hinter das Cytostom, während sich die „oral deep fiber“ von den Membranellen bis weit ins Cytoplasma erstreckt. Beide Strukturen scheinen für die Bildung und Abschnürung des Phagosoms eine wichtige Rolle zu spielen (Miller & Stone 1963; Nilsson & Williams 1966; Nilsson 1979; Sattler & Staehelin 1979; Smith 1982a, 1982b).

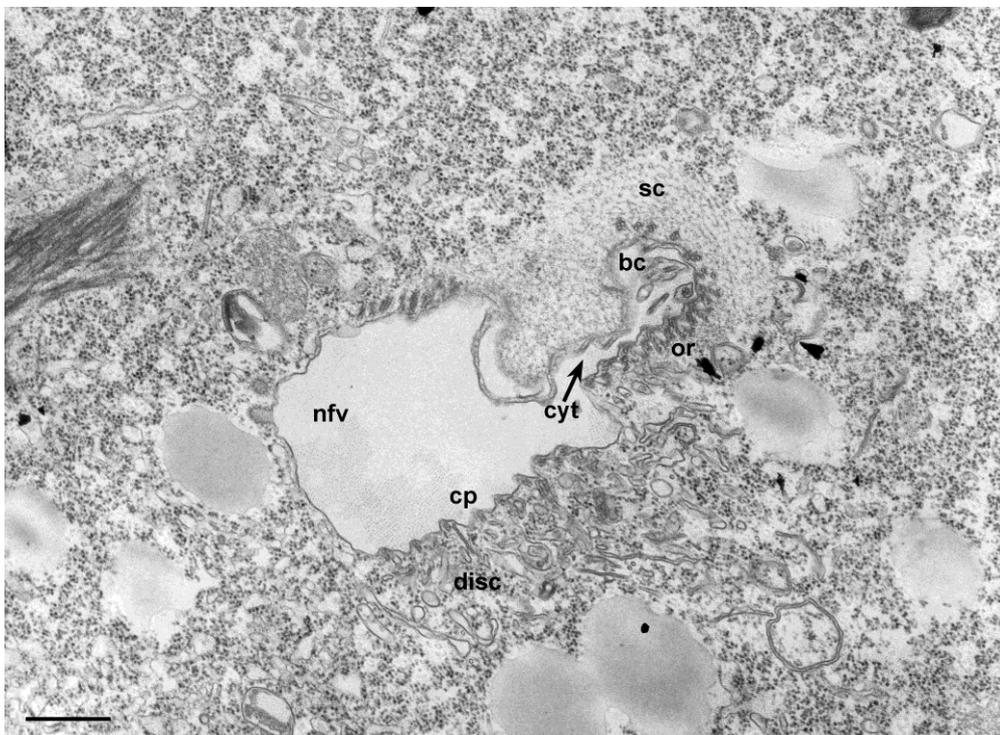


Abb. 5: Bildung einer Nahrungsvakuole bei *T. thermophila*. An der Basis der Buccalhöhle (bc), die von spezialisiertem Cytoplasma (sc) umgeben ist, befindet sich der von „oral ribs“ (or) umgebene Cytopharynx (cp), der in das Zellinnere führt und im Cytostom (cyt) endet. Hier akkumulieren diskoidale Vesikel (disc), um mit der Membran des Cytopharynx zu fusionieren, so dass eine Nahrungsvakuole (nfv) gebildet werden kann. Elektronenmikroskopische Aufnahme von R. Allen, 1967, Quelle: <http://www5.pbrc.hawaii.edu/allen> (Balken: 0,5 µm).

Die Bildung des Phagosoms kann bei *Tetrahymena* in vier Phasen unterteilt werden (Nilsson 1977b):

(1) In den ersten 5-10 Sekunden kommt es am Cytopharynx zur Bereitstellung der das Phagosom begrenzenden Membran.

- (2) In den nächsten 20-60 Sekunden wird das noch oval geformte Phagosom unter ständiger Vergrößerung mit Partikeln gefüllt.
- (3) Es folgt die sehr schnelle Abschnürung des naszenten Phagosoms, welche von einer leichten anterioren Bewegung des Phagosoms begleitet wird.
- (4) Schließlich wandert das nun rund geformte Phagosom in posteriorer Richtung durch die Zelle.

Die Dauer der Phagosomenbildung sowie die Größe reifer Phagosomen scheinen bei *T. thermophila* von der Art des aufgenommenen Materials sowie von dessen Konzentration beeinflusst zu werden. Der Zeitraum, der für die Bildung und Abschnürung eines Phagosoms benötigt wird, liegt zwischen 45 sek und 3 min (Nilsson 1972; Rasmussen & Modeweg-Hansen 1973). Nach Ingestion 2 µm großer Latex-Partikel weisen die Phagosomen beispielsweise eine Größe von 7 µm auf (Ricketts 1972), nach Aufnahme von Hefezellen wurde eine Phagosomengröße von bis zu 15 µm festgestellt (Nilsson 1977b). Die für die Abschnürung des Phagosoms notwendigen Faktoren sind noch unbekannt (Nilsson 1979). Versuche mit Cytochalasin B zeigten jedoch, dass Aktinfilamente eine Rolle spielen (Nilsson 1977a). Da inertes Material (Tuschepartikel, Latexbeads) ebenso ingestiert wird wie organische Partikel, scheint es keine speziellen Rezeptoren zum Erkennen verwertbarer Nahrung zu geben (Cox 1967; Batz & Wunderlich 1976; Nilsson 1979; Nilsson 1987).

Die Membran des entstehenden Phagosoms geht am Cytostom kontinuierlich in die Zellmembran über (Elliott & Clemmons 1966; Nilsson & Williams 1966). Die Phagosomenmembran scheint jedoch nicht wie bei Amöben und Makrophagen von der Plasmamembran, sondern aus einem Pool sogenannter diskoidaler Vesikel (s. Abb. 5) zu stammen, wie Untersuchungen der Lipidzusammensetzung (Weidenbach & Thompson 1974), der Phasentrennungstemperatur der Lipide (Kitajima & Thompson 1977), und elektronenmikroskopische Studien (Wunderlich & Speth 1972; Batz & Wunderlich 1976; Baumert 1992; Voßkühler 1994) naszenter Phagosomen und diskoidaler Vesikel zeigten. Diskoidale Vesikel, die nach ihrer abgeflachten, diskusähnlichen Form benannt sind, gelten als Quelle der enormen Membranmenge, welche für die hohe Anzahl an Phagosomen bei *T. thermophila* benötigt wird. Der Entstehungsort diskoidaler Vesikel ist bei *Tetrahymena*, wie bei anderen Ciliaten auch, ungeklärt.

Das nach der Abschnürung als Verdauungsvakuole bezeichnete Phagosom legt bei *T. thermophila* im Cytoplasma einen regelmäßigen Weg zurück, bevor die unverdaulichen Reste durch einen Zellafter (Cytoprokt) nach außen abgeschieden werden. Während dieser Wanderung, die als Cyclose bezeichnet wird, ändert sich in der Vakuole der pH-Wert, wie man mit Indikatorlösungen (z.B. Neutralrot) nachweisen kann. Die für den Abbau erforderlichen Enzyme werden von Lysosomen in die Verdauungsvakuole abgegeben – wahrscheinlich zum Zeitpunkt der für ihre Wirkung optimalen pH-Werte (Gruner 1980). Die Ursache für die schon lange bekannte Bewegung von Nahrungsvakuolen in Ciliaten ist im Grunde ungeklärt; man vermutet, dass Mikrofilamente eine Rolle spielen (Westheide & Rieger 2004).

Der Verdauungszyklus von *T. thermophila* lässt sich in fünf Stadien einteilen (s. Abb. 6).

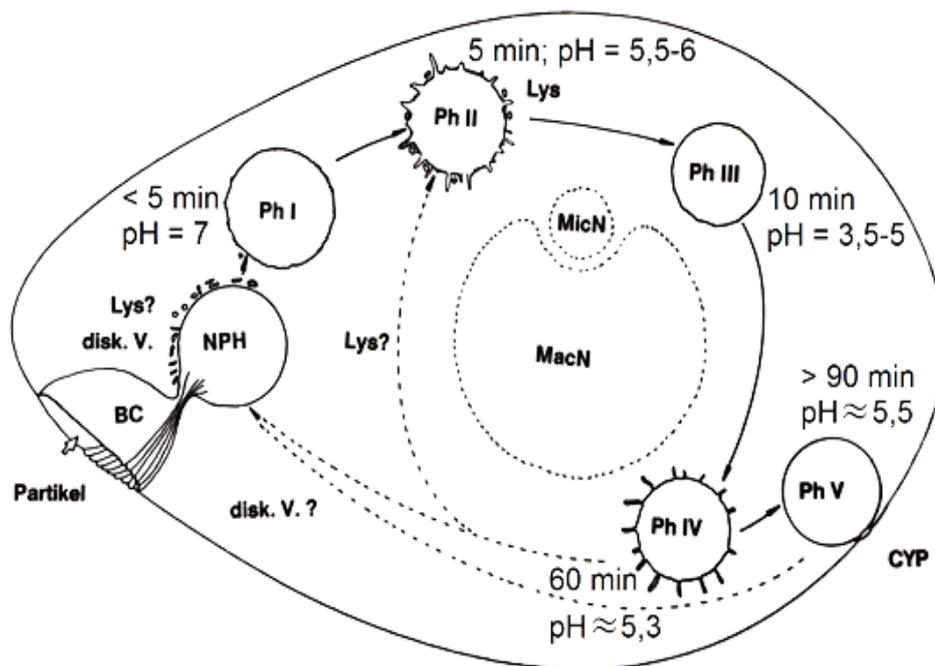


Abb. 6: Schematische Darstellung des Phagosomenzyklus von *Tetrahymena* (modifiziert nach Voßkübler 1994). Gezeigt ist die Bildung des naszenten Phagosoms sowie die sich anschließende Phagosomenreifung, die mit einer veränderten Zusammensetzung der phagosomalen Membran einhergeht. Das Alter sowie der pH-Wert des jeweiligen Stadiums sind angegeben. Nähere Erläuterungen: s. Text. BC: Buccal/Mundhöhle; NPH: naszentes Phagosom; Ph I-V: Phagosomenstadien; CYP: Cytoprokt; disk. V.: diskoidale Vesikel; Lys: Lysosomen; MacN: Makronukleus; MicN: Mikronukleus.

Phagosomenstadium I wird erreicht, wenn sich das neu gebildete, naszente Phagosom gerade vom Cytostom abgeschnürt hat (s. Abb. 6). Das endocytierte Material liegt gleichmäßig verteilt im Phagosom vor und wird durch eine ebene Membran zum Cytosol hin abgegrenzt. Der pH-Wert des jungen Phagosoms unterliegt noch keinen Veränderungen und entspricht mit pH 7 dem des Nährmediums (Nilsson 1977b; Smith-Somerville 1989).

Nach ca. 5 min wird Stadium II (kondensierte Phagosomen, s. Abb. 6) erreicht, in dem das Phagosom sich deutlich verkleinert und das ingestierte Material konzentriert wird. Der pH-Wert sinkt auf pH 5,5-6 (Nilsson 1977b; Smith-Somerville 1989). Die phagosomale Membran weist Ausstülpungen in das umgebende Cytosol auf. Außerdem sind eine Vielzahl von Vesikeln unmittelbar um das Phagosom herum angeordnet. Desweiteren ist das Phagosom von Lagen rauhen Endoplasmatischen Retikulums umgeben (Nilsson 1972; Baumert 1992), was auf eine intensive Proteinbiosynthese hindeutet.

Die Membran-Ausstülpungen und Vesikel zeigen rege Vesikelfusionen bzw. Abschnürungsereignisse des Phagosoms an. Ob es sich dabei um Recyclingprozesse der phagosomalen Membran oder um Fusionsprozesse mit Lysosomen und Endosomen handelt, konnte bisher nicht geklärt werden. Bei *Paramecium* und einigen Amöben wurde festgestellt, dass frühe Phagosomen mit sogenannten Acidosomen – einer speziellen Form von Vesikeln – fusionieren (Allen & Fok 1983). Diese transportieren vakuoläre Protonen-pumpende ATPasen, die nach der Fusion mit dem Phagosom dessen Ansäuerung bewirken. Acidosomen wurden bei *T. thermophila* bisher nicht nachgewiesen. Allerdings sind auch in *T. thermophila* V-ATPasen wie z.B. VMA8 (*vacuolar membrane ATPase*) bekannt (Eisen *et al.* 2006). Außerdem wurden Acidosomen-ähnliche Vesikel in *T. thermophila* (s. Abb. 7) beobachtet, die möglicherweise für die Ansäuerung des Phagosoms zuständig sind. Diese Vesikel sind nicht mit Lysosomen zu verwechseln, da Lysosomen eine dickere, mit einer Glykokalix bedeckte Membran besitzen. Vielmehr ähneln sie den in *Paramecium* vorkommenden Acidosomen, die ebenfalls Invaginationen aufweisen und - wie bereits erwähnt – für den Transport von V-ATPasen zum Phagosom verantwortlich sind.

In 5-10 min alten Phagosomen konnte mit Hilfe biochemischer Techniken die Aktivität des lysosomalen Markerenzym saure Phosphatase bestimmt werden (Smith-Somerville 1989; Voßküher 1990).

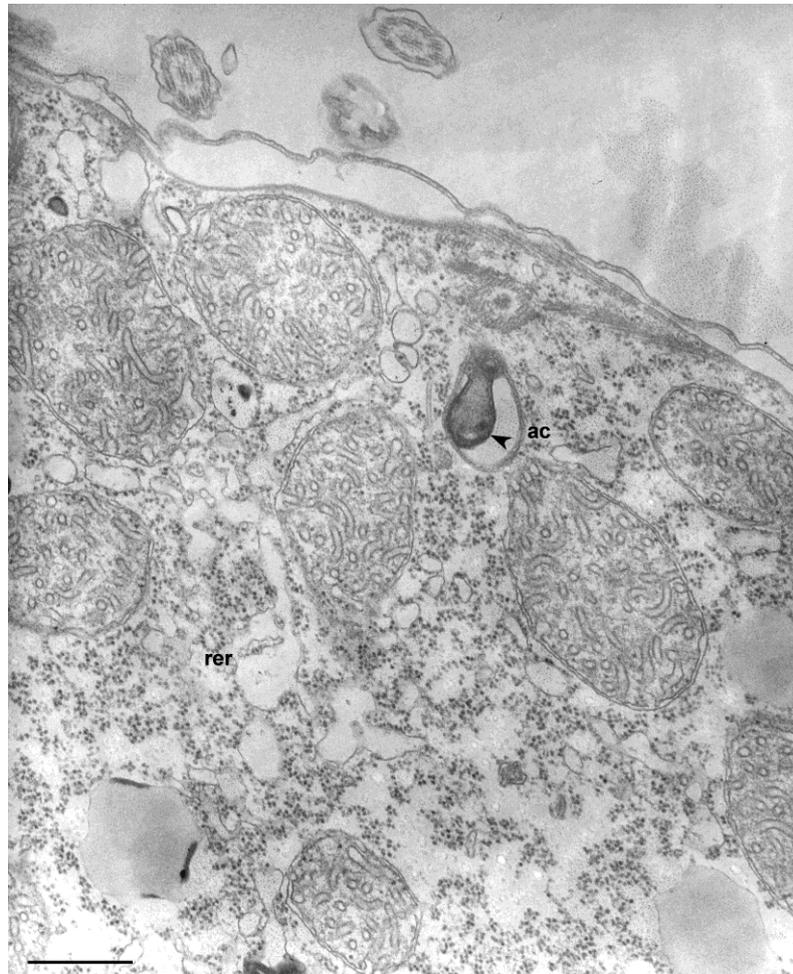


Abb. 7: Acidosomen-ähnliches Vesikel in *T. thermophila*. Das Vesikel (ac) besitzt mindestens zwei einkapselnde Membranen oder eine Membran, die in sich selbst gekerbt ist, sowie im Inneren einen elektronenopaken Tropfen (Pfeil). Dieser geht an einem Ende des Vesikels in die umgebende Membran über und könnte durch Einstülpung (Invagination) dieser Membran in das Vesikelinnere entstanden sein. rer: raues Endoplasmatisches Retikulum. Elektronenmikroskopische Aufnahme von R. Allen, 1967, Quelle: <http://www5.pbrc.hawaii.edu/allen> (Balken: 0,5 μm).

Nach ca. 10 min befindet sich das Phagosom in Stadium III (s. Abb. 6). Die Phagosomenmembran ist in diesem Stadium wieder sehr regelmäßig (Nilsson 1987; Smith-Somerville 1989; Voßküher 1994). Die Aktivität lysosomaler Markerenzyme nimmt stark zu (Elliott & Clemmons 1966; Nilsson 1976; Voßküher 1994). Zu Beginn des Stadiums III tritt eine morphologische Veränderung auf. Das aufgenommene

Material liegt konzentriert im Zentrum des Phagosoms vor und ist durch einen klaren Hof von der Phagosomenmembran abgegrenzt (Elliott & Clemmons 1966; Baumert *et al.* 1998). Dieses Stadium wird als Halo-Stadium bezeichnet. Die Ursache für die Strukturänderung konnte bisher nicht ermittelt werden. In Phagosomen des Stadiums III wurden mit pH 3,5-5 die niedrigsten pH-Werte des gesamten Phagosomenzyklus gefunden (Nilsson 1977b; Smith-Somerville 1989). Möglicherweise ist die Phagosomenstruktur des Halo-Stadiums auf bei den niedrigen pH-Werten denaturiert vorliegende Proteine zurückzuführen.

Nach etwa 30-60 min wird Stadium IV erreicht (s. Abb. 6). Phagosomen dieses Stadiums sind typische Phagolysosomen, was daran deutlich wird, dass die höchsten Aktivitäten typischer lysosomaler Enzyme während des gesamten Zyklus festgestellt wurden (Voßkübler 1994). Das Phagosom verliert seine regelmäßige Gestalt und von zahlreichen tubulären Ausstülpungen werden Vesikel ins umgebende Cytoplasma abgeschnürt. Möglicherweise handelt es sich um die Resorption von Hydrolyseprodukten organischer Makromoleküle (Elliott & Clemmons 1966; Nilsson 1979; Baumert 1992).

Phagosomen, deren Inhalt kurz vor der Ausscheidung steht, werden Phagosomenstadium V (> 90 min) zugeordnet (s. Abb. 6). Der pH-Wert nähert sich wieder dem neutralen Bereich; die Aktivität der sauren Phosphatase nimmt ab oder wird gar nicht mehr nachgewiesen (Elliott & Clemmons 1966; Nilsson 1979; Smith-Somerville 1989; Voßkübler 1990; Baumert 1992). Phagosomen des Stadiums V befinden sich bereits in der Nähe des hinteren Zellpols und können in der sich anschließenden Defäkation, bei der der Phagosomeninhalt in das umgebende Medium abgegeben wird, mit dem Cytoprokt fusionieren. Dieser Prozess, d.h. die Exocytose, wird in *Tetrahymena* Egestion genannt. Es wird davon ausgegangen, dass die Phagosomen während der Egestion die Lysosomen „verlassen“ und mit Hilfe von Mikrotubuli zum Cytoprokt geleitet werden (Tiedtke *et al.* 1988). Nähert sich ein Phagosom dem Cytoprokt, so verbleibt es einige Sekunden in einer festen Position, bevor sein Inhalt nach Fusion seiner Membran mit der des Cytoprochts innerhalb weniger Millisekunden ausgeschleust wird (Nilsson 1979). Welches Signal für die Fusion der Membranen verantwortlich ist, ist bisher unbekannt. Man vermutet, dass die Phagosomenmembran

Proteine besitzt, die Aktin-ähnliche Mikrofilamente binden und anschließend deren Polymerisation bewirken, wenn das Phagosom in die Nähe des Cytoprokts gelangt (Allen & Wolf 1979). Es wird angenommen, dass diese Polymerisation zur Fusion der beiden Membranen führt. Darüber hinaus scheinen Rab-Proteine – kleine GTPasen, die in ihrer GTP-gebundenen und Membran-verankerten Form eine Vielfalt an Effektoren rekrutieren – eine Rolle bei der Egestion in *T. thermophila* zu spielen. Für einige GFP-fusionierte Rab-Proteine konnte beobachtet werden, dass sie nur mit Phagosomen assoziieren, die sich am Cytoprokt befinden, und dass die Egestion zu einem transienten Transfer dieser Rabs zur Plasmamembran führt (Turkewitz & Bright 2011). Möglicherweise werden die Rabs von Proteinen wie GTP-Austauschfaktoren (*Guanosine triphosphate Exchange Factor*, GEF), die sich am Cytoprokt selbst befinden, aktiviert (Turkewitz & Bright 2011).

Bei der Fusion der Phagosomenmembran mit der Plasmamembran des Cytoprokts wird eine so genannte Fusionspore gebildet, die sich weitet und so den Inhalt des Phagosoms freisetzt (Tiedtke *et al.* 1988). Es konnte gezeigt werden, dass die Membran der Nahrungsvakuole *nicht* egestiert wird, da der ausgeschleuste „Fäkalball“ (*faecal ball*) keine Membran aufweist (Allen & Wolf 1979). Vielmehr wird die Membran des nun entleerten Phagosoms durch Endocytose in Form kleiner Vesikel ins Cytoplasma zurückgewonnen (Allen & Wolf 1979). Ob diese Vesikel als Recyclingprodukte in Form von diskoidalen Vesikeln (wie bei *Paramecium*) an Mikrotubuli entlang zum Cytostom zurücktransportiert und zur Bildung neuer Phagosomen wiederverwendet werden, ist für *T. thermophila* nicht bekannt.

Der Prozess der Phagocytose in freilebenden Protozoen hat grundlegende Mechanismen mit denen in humanen, phagocytischen Zellen gemeinsam; die Gegebenheiten innerhalb der Nahrungsvakuole von Protozoen überlappen mit denen des Makrophagen-Phagosoms (Lock *et al.* 1987; Jacobs *et al.* 2006; Cosson & Soldati 2008).

1.4 Phagosomale Proteine

Die Reifung von naszenten Phagosomen zu Phagolysosomen ist ein Prozess, der eine komplexe Abfolge von Interaktionen des Phagosoms mit 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.* 1994b) erfordert. Die Mechanismen, die Phagosomen nutzen, um diese Interaktionen zu vermitteln, sind jedoch kaum verstanden. Trotz des großen Interesses an der Aufklärung des Phagozytoseprozesses, sind bisher erstaunlich wenige der beteiligten Polypeptide identifiziert worden (Desjardins *et al.* 1994a).

Um phagosomale Proteine nachzuweisen, wurden Phagosomen z.B. mit Latex-Partikeln (Desjardins *et al.* 1994a; Desjardins *et al.* 1994b; Garin *et al.* 2001), modifizierten Latex-Partikeln (Pizarro-Cerda *et al.* 2002; Okada *et al.* 2005) oder magnetischen Partikeln (Marion *et al.* 2005) markiert und aufgereinigt. Die Identifizierung der phagosomalen Proteine erfolgte mittels 2D-Gelelektrophorese (Desjardins *et al.* 1994a; Desjardins *et al.* 1994b) und anschließender Massenspektrometrie (Garin *et al.* 2001; Gotthardt *et al.* 2006) oder durch LC-MS/MS (*liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry*; (Okada *et al.* 2005; Okada *et al.* 2006; Rogers & Foster 2007), wobei verschiedene Organismen und Zelltypen eingesetzt wurden. Zum einen wurden Maus-Makrophagen (Desjardins 1994b) und humane Makrophagen sowie Ratten- und Hamster-Makrophagen (Desjardins *et al.* 1994a) und zum anderen Phagosomen aus z.B. *Entamoeba histolytica* (Marion *et al.* 2005), *Dictyostelium discoideum* (Gotthardt *et al.* 2006) und *Tetrahymena thermophila* (Jacobs *et al.* 2006) auf ihre Proteinzusammensetzung hin analysiert.

Bei einem Großteil der identifizierten Proteine handelt es sich um Rezeptormoleküle und um stark glycosylierte Lysosomen-assoziierte Membranproteine, sogenannte LAMPs (*lysosomal-associated membrane proteins*; Pitt *et al.* 1992b) sowie um kleine GTP-bindende Proteine (Desjardins 1994b; Pizon *et al.* 1994) und Proteine der Annexin-Familie (Allen & Anderem 1996). Annexine sind cytoplasmatische Proteine, welche Calcium-abhängig an Phospholipide und Membranen binden und Membran-Interaktionen, z.B. in sekretorischen Zellen, vermitteln.

Während der Phagosomenreifung kommt es zu mengenmäßigen Veränderungen bestimmter Proteine. Die Menge verschiedener hydrolytischer Enzyme wie Cathepsin D und β -Glucuronidase nimmt beispielsweise mit der Zeit zu (Pitt *et al.* 1992b). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass Phagosomen während der

Transformation zu Phagolysosomen Markerproteine später Endosomen (Rab7, LAMP1 und LAMP2) erhalten und Markerproteine früher Endosomen (Rab5) verlieren (Desjardins *et al.* 1994b). Annexin II ist in frühen und späten Phagosomen vorhanden, während der Annexin VI-Anteil im Reifungsprozess zunimmt (Desjardins *et al.* 1994a). Da Snare-Proteine (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) bei Anheftungs- und Fusionsprozessen entlang des sekretorischen Weges und der Endocytose eine Schlüsselrolle spielen, könnten unterschiedliche Snare-Proteine auch an der Erkennung und Fusion von verschiedenen Vesikeln mit dem Phagosom während seiner Reifung beteiligt sein (Beron *et al.* 1995; Allen & Anderem 1996). Des Weiteren scheinen Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI 3-Kinasen) eine Rolle zu spielen (Vieira *et al.* 2002).

In Maus-Makrophagen, in denen über 140 Proteine gefunden wurden, konnten einige Proteine wie Calnexin und Calreticulin identifiziert werden, die normalerweise mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziiert sind (Garin *et al.* 2001). Weitere Untersuchungen müssen jedoch noch zeigen, ob das ER an der Entstehung von Phagosomen beteiligt ist oder ob es sich dabei um Kontaminationen handelt.

Jacobs *et al.* konnten aus Phagosomen aus *Tetrahymena thermophila* 73 potentielle phagosomale Proteine isolieren (Jacobs *et al.* 2006). *T. thermophila* ist zur Untersuchung der Phagozytose sehr gut geeignet, da bereits viele genetische und molekulargenetische Ansätze entwickelt wurden und das Mac-Genom vollständig sequenziert wurde. Außerdem ist die Phagozytose bei *Tetrahymena* nicht essentiell, was die Generierung und Untersuchung phagozytosedefizienter Mutanten möglich macht. Dennoch sind bezüglich der an der Phagozytose beteiligten Proteine auch bei *Tetrahymena* nur wenig Informationen vorhanden. Es wurde gezeigt, dass Dyh1 – ein Mikrotubuli-basiertes cytoplasmatisches Dynein-Motorprotein – an der Bildung von Phagosomen beteiligt ist (Lee *et al.* 1999). Außerdem fanden Hosein *et al.* heraus, dass die Bewegung des Phagosoms vom Cytostom zum Cytoprokt Aktin und Myo1, ein „neues“ Myosin, erfordert (Hosein *et al.* 2005). Des Weiteren weisen *Tetrahymena*-Zellen, denen das Aktin-bindende Protein Profilin fehlt, einen Phagozytosedefekt auf, der wahrscheinlich auf einer gestörten Stromatogenese (Ausbildung des Oralapparats) beruht, wodurch keine Phagosomen gebildet werden können (Wilkes & Otto 2003; Williams *et al.* 2006). Zellen mit verminderter Expression des Gens, das das Dynamin-

protein Drp1 codiert, zeigen keine erwähnenswerte Aufnahme von Partikeln (Elde *et al.* 2005). Ein Hinweis auf die Funktion von Drp1 könnte darin liegen, dass das GFP-markierte Protein entlang der „oral deep fiber“ (s. Kap. 1.3) nachgewiesen wurde, die als „Vesikel-Highway“ gilt (Nusblat *et al.* 2012).

In frühen *Tetrahymena*-Phagosomen wurden Calcium-bindende Proteine (Voßkühler & Tiedtke 1993; Maicher & Tiedtke 1999) und Ca²⁺/Calmodulin-bindende Proteine (Gonda *et al.* 1999; Gonda *et al.* 2000) gefunden. Calmodulin und eine Reihe Calmodulin-bindender Proteine befinden sich wie Drp1 entlang der „oral deep fiber“ sowie umgebender Strukturen und eine Inhibierung der Calmodulin-Aktivität sowie des Calcium-Signal-Wegs verhindern ebenfalls die Bildung von Phagosomen (Gonda *et al.* 2000; Moya & Jacobs 2006).

Von den 73 putativen Phagosomenproteinen in *T. thermophila* wurden 28 bereits in anderen Organismen als an der Phagozytose beteiligte Proteine identifiziert, was darauf schließen lässt, dass Schlüsselereignisse der Phagozytose evolutionär konserviert vorliegen (Jacobs *et al.* 2006). Bei den gefundenen Proteinen handelt es sich beispielsweise um hydrolytische Enzyme wie Cathepsine (Proteasen) und saure Phosphatasen, GTPasen, ABC-Transporterproteine und Untereinheiten vakuolärer ATPasen (*V-type ATPasen*), die für die Ansäuerung des Phagosoms verantwortlich sind. Außerdem wurde ein Snare-Protein (*Synaptobrevin/longin/-VAMP-related protein*, VAMP: Vesikel-assoziiertes Membranprotein) und ein Vps13 (*vacuolar protein sorting*)-Protein/Chorein identifiziert (Jacobs *et al.* 2006). Es wird angenommen, dass Vps13 eine vermittelnde Funktion beim Vesikel-„Trafficking“ zwischen dem *trans*-Golgi-Netzwerk und Lysosomen hat (Lemmon & Traub 2000). Mutationen des homologen Vps13A-Proteins des Menschen sind Ursache der neurodegenerativen Erkrankung Chorea-Acanthozytose (Rampoldi *et al.* 2001; Ueno *et al.* 2001; Velayos-Baeza *et al.* 2004).

Als zweites Beispiel für ein an der Phagozytose beteiligtes Protein, das mit einer Erbkrankheit in Verbindung steht, sei das Niemann-Pick C1 Protein erwähnt. Dieses Transmembranprotein wurde im *T. thermophila*-Phagosom nachgewiesen. Ihm wird eine Funktion beim Recycling von Endosomen zugesprochen (Jacobs *et al.* 2006). Bei der Niemann-Pick-Krankheit führt ein Enzymdefekt zur Speicherung von Sphingomyelin in Lysosomen von Leber, Milz, Knochenmark und Gehirn (lysosomale Speicherkrankheit).

Von den von Jacobs *et al.* gefundenen Proteinen sind 12 Proteine mit unbekannter Funktion, d.h. potentielle neue Phagozytose-Proteine, die als „Tpp“ (**T**etrahy**m**ena **p**hagosom**a**l **p**roteome)-Proteine bezeichnet werden. Drei von vier getesteten GFP-fusionierten Proteinen konnten mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie als mit Phagosomen assoziierte Proteine nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass die identifizierten Proteine tatsächlich an der Phagozytose beteiligt sind (Jacobs *et al.* 2006).

Die Ergebnisse von Jacobs *et al.* verdeutlichen, dass die Phagozytoseprozesse von einzelligen Eukaryoten große Ähnlichkeiten mit denen von Mammalia aufweisen. Dennoch scheint es auch einige Unterschiede zu geben. Beispielsweise wurden die bereits erwähnten LAMPs weder bei *T. thermophila* noch bei *E. histolytica*, *D. discoideum* und *S. cerevisiae* gefunden. Ob diese Organismen auf die Funktion von LAMPs, nämlich das „Targeting“ von Proteinen zum Lysosom, verzichten können oder ob sie alternative Proteine besitzen, die die Funktion von LAMPs übernehmen, ist unklar.

Da die Funktionen der meisten der konservierten Proteine – einschließlich einiger, die mit Krankheiten des Menschen assoziiert sind – nicht bekannt sind, stellt *Tetrahymena thermophila* ein attraktives System dar, um Fragen bezüglich des Phagosomen-Pathways von Mammalia zu klären.

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Informationen bezüglich der Mechanismen des Phagozytoseprozesses auf molekularer Ebene zu erhalten.

Obwohl die Abfolge der Vesikelinteraktionen, die an der Biogenese und Reifung von Phagosomen beteiligt sind, auf zellulärer Ebene hinreichend beschrieben wurde, sind weder die molekulare Zusammensetzung der Phagosomen und der interagierenden Vesikel noch die molekularen Mechanismen, die die Fusionsereignisse regulieren, bekannt (Maicher & Tiedtke 1999).

Zur Analyse von Phagosomen wird in der vorliegenden Arbeit der Ciliat *Tetrahymena thermophila* verwendet. Dieser häufig eingesetzte Modellorganismus ist hierzu besonders gut geeignet, da dessen Phagosomen im Gegensatz zu den sehr ähnlichen menschlichen Phagozyten als intakte Organellen isoliert und untersucht werden können. Außerdem ist die Phagozytose bei *T. thermophila* nicht essentiell, so dass phagozytosedefiziente Mutanten oder Kulturen mit herunterregulierten Genen hergestellt und analysiert werden können.

Zunächst sollen Phagosomen eines definierten Alters aus *T. thermophila* isoliert und in einem biochemischen Ansatz hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung analysiert werden. Ziel hierbei ist es, Änderungen des phagosomalen Proteoms in Abhängigkeit vom Reifungsgrad des Phagosoms zu verfolgen.

Neben der Charakterisierung von Phagosomen auf der Proteinebene sollen in einem molekularbiologischen Ansatz zeitliche Änderungen des Expressionslevels ausgewählter Gene nach Induktion der Phagozytose untersucht werden, um potentielle Gene für phagosomale Proteine zu erhalten. Hierzu müssen zunächst passende Primerkombinationen und qPCR-Bedingungen sowie ein geeignetes Haushaltsgen als Bezugswert ermittelt werden.

Des Weiteren soll ein *Silencing* bestimmter Gene basierend auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) durchgeführt werden. Dazu soll zunächst das System im Labor etabliert werden. Es werden passende Konstrukte hergestellt und erprobt, um

diese dann in *Tetrahymena* zur Expression zu bringen. Die RNA_i-Analysen sollen dazu dienen, ausgewählte Proteine hinsichtlich ihrer Funktion im Phagozytoseprozess von *Tetrahymena* zu untersuchen.

Konkret sollen mit Hilfe der durchgeführten Experimente die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Welche Proteine liegen in naszenten, welche in kondensierten Phagosomen vor?
- Welche Schlüsse bezüglich der Funktion lassen sich aus der stadienspezifischen Identifikation ausgewählter Proteine ziehen?
- Sind die Tpp (*Tetrahymena phagosomal proteome*) – Proteine **Tpp2p**, **Tpp3p**, **Tpp5p** und **Tpp9p** an Phagozytoseprozessen beteiligt? Besitzen sie darüber hinaus weitere Funktionen in der Zelle?
- Welche Rolle spielen die Proteine **Cbp**, **Cth90**, **Vps13**, **Snare**, **Drp1** und **Prf1** bei der Phagozytose in *Tetrahymena*? Sind diese Proteine essentiell für eine funktionierende Phagozytose?

3 Material

3.1 Geräte

Im Folgenden sind die wichtigsten in den Experimenten verwendeten Geräte aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Analysenwaage CP124S	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklav Systemc VX-120	Systemc GmbH Labor-Systemtechnik (Wettenberg)
Centrifuge 5424 (Rotor F45-24-11)	Eppendorf AG (Hamburg)
Centrifuge 5804 (Swing-bucket-Rotor A-4-44)	Eppendorf AG (Hamburg)
Centrifuge 5804 R (F45-30-11 bzw. Swing-bucket-Rotor A-4-44)	Eppendorf AG (Hamburg)
Concentrator 5301 (Speedvac)	Eppendorf AG (Hamburg)
Electrophoresis Power Supply EV231	Consort bvba (Turnhout, Belgien)
Fluoreszenz Lifetime Imaging Mikroskop	Keyence (Neu-Isenburg)
GENESYS 10S UV-Vis Photometer	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
HERAfreeze Ultra-low Temperature Freezer	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
HI 223 Calibration Check pH Meter	HANNA Instruments Deutschland GmbH (Kehl am Rhein)
Innova [®] 44 Incubator Shaker Series	New Brunswick Scientific (Enfield, CT, USA)
Label Guard [™] Microliter Cell	Implen GmbH (München)
Laborwaage 440-49N	Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
Mastercycler Gradient	Eppendorf AG (Hamburg)
Mastercycler Personal	Eppendorf AG (Hamburg)

Gerät	Hersteller
MIDI 1 Elektrophorese-Kammer	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Mikroskop BA300	Motic Deutschland GmbH (Wetzlar)
Mini Centrifuge MCF-2360	Laboratory & Medical Supplies (Tokyo, Japan)
Mini Plate Spinner MPS1000	Labnet International Inc. (Woodbridge, USA)
Minipuls 2 Peristaltikpumpe	Gilson Inc. (Middleton, USA)
Mx3005P™ qPCR System	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG (Waldbronn)
Rotator SB3	Stuart /VWR International GmbH (Langenfeld)
Sicherheitswerkbank MSC-ADVANTAGE	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Stereomikroskop Stemi CV4	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Göttingen)
Thermoblock TB2	Analytik Jena AG (Jena)
Thermoshaker TS1	Analytik Jena AG (Jena)
Trockenschrank UNB500	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach)
Ultra-Turrax	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
UV-System Digital Monochrome Printer	INTAS Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen)
Vortex-Schüttler VV 3	VWR International GmbH (Langenfeld)
Wasseraufbereitungssystem Synergy UV	Millipore (Schwalbach)

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2 gibt die wichtigsten verwendeten Verbrauchsmaterialien an.

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien.

Artikel	Hersteller
Biosphere® Filter Tips	Sarstedt (Nürnbrecht)
Fuchs-Rosenthal Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
My-Budget Adhäsive QPCR-Folie	Bio-Budget Technologies GmbH (Krefeld)
Objektträger	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Rotilabo® Spritzenfilter, steril	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Serologische Pipetten, 10 ml	Sarstedt (Nürnbrecht)
Tissue Culture Plate 24-Well/ 96 Well	Sarstedt (Nürnbrecht)

Weitere Verbrauchsmaterialien wurden von der Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) sowie von der Firma Sarstedt (Nürnbrecht) bezogen.

3.3 Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Chemikalien sind nachfolgend aufgelistet (s. Tab. 3).

Tab. 3: Verwendete Chemikalien.

Name	Hersteller
α -D(+)-Glucosemonohydrat, $\geq 99,5$ %	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Agar, technisch	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Ammoniak-Lösung, 25 %	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ampicillin Natriumsalz, 99 %	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Bicinchoninsäure Dinatriumsalz Hydrat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Steinheim)
Calciumchlorid Dihydrat, ≥ 99 %, p.a.	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Cadmiumchlorid Hemipentahydrat	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Steinheim)

Name	Hersteller
DNA <i>Stain Clear G</i>	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
dNTP Mix, je 2 mM	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
D(+)-Saccharose, $\geq 99,5\%$, p.a.	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, $\geq 99\%$, p.a.	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Eisen(II)chlorid Tetrahydrat, reinst	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Eisen(III)chlorid Hexahydrat, $\geq 97\%$, p.a.	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Eisensulfat/Chelatlösung (100 x)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Steinheim)
Glutardialdehyd, 25 %	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Kaliumchlorid, $\geq 99,5\%$, p.a.	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat, $\geq 99\%$, p.a.	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat, $> 98,5\%$	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
LB <i>Broth</i>	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Magermilchpulver	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Manganchlorid Tetrahydrat, $\geq 98\%$	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Natriumcarbonat Hydrat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Steinheim)
Natriumchlorid, $\geq 99,5\%$, p.a.	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat, p.a.	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumhydroxid, $\geq 99\%$, p.a.	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Natriumphosphat Dibasisch Dihydrat, $\geq 98\%$, p.a.	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Steinheim)
Natriumtartrat Tetrahydrat, p.a.	Merck KGaA (Darmstadt)
peqGOLD <i>Universal Agarose</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Proteosepepton	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Rinderserumalbumin (BSA), $\sim 99\%$	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Steinheim)
Rubidiumchlorid	AppliChem GmbH (Darmstadt)
SOB-Medium	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)

Name	Hersteller
Stärke aus Kartoffeln, reinst	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
TopVision™ Agarose	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Trichloressigsäure, ≥ 99 %, p.a.	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Tris Ultra Qualität, ≥ 99,9 %	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Triton® X-114	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Steinheim)

3.4 Enzyme

Tab. 4 gibt die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Enzyme sowie deren Aktivität und Hersteller an.

Tab. 4: Verwendete Enzyme. Die Enzymaktivität ist angegeben (U/μl).

Enzym	Hersteller
Apal, 10 U/μl	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Bpu1102I (B pl), 10 U/μl	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Dream Taq DNA-Polymerase, 5 U/μl	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, 1 U/μl	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Pmel, 10 U/μl	New England Biolabs GmbH (Frankfurt)
T4 DNA Ligase, 1 U/μl	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
XhoI, 10 U/μl	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
XmaI, 10 U/μl	New England Biolabs GmbH (Frankfurt)

3.5 Proteaseinhibitoren

In Tab. 5 sind die Inhibitoren, die bei der Phagosomenisolierung (s. Kap. 4.12) eingesetzt wurden, sowie deren Funktionsweise und Hersteller aufgeführt.

Tab. 5: Verwendete Proteaseinhibitoren und ihre Funktionsweise.

Inhibitor	Funktionsweise	Hersteller
Leupeptin Hemisulfat, ≥ 96,5 %	Kompetitive Inhibierung von Serin-Proteasen (z.B. Trypsin) und Cystein-Proteasen (z.B. Papain)	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Pefabloc® SC-Protease- Inhibitor, ≥ 95 %	Inhibierung von Serin-Proteasen (irreversibel)	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)

Leupeptin ist ein natürlich vorkommendes Tripeptidderivat (N-Acetyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Argininal), das von Actinomyceten produziert wird. Pefabloc wird als nicht-toxischer Ersatz für PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) verwendet. Ein weiterer Vorteil von Pefabloc ist seine längere Aktivität im Vergleich zu PMSF.

3.6 Reagenzienkits

Tab. 6: Verwendete Kit-Systeme.

Reagenzienkit	Hersteller
DNeasy® Plant Mini Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
E.Z.N.A.™ Plasmid Miniprep Kit II	OMEGA Bio-Tek Inc. (Norcross, USA)
innuPrep Double Pure Kit	Analytik Jena AG (Jena)
My-Budget 5x EvaGreen® QPCR- Mix II (ROX)	Bio-Budget Technologies GmbH (Krefeld)
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
RNeasy Plant Mini Kits	Qiagen GmbH (Hilden)
SensiMix™ SYBR Low-ROX Kit	Bioline GmbH (Luckenwalde)

3.7 DNA-Größenstandards

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende DNA-Standards verwendet:

Tab. 7: Verwendete Größenstandards.

Standard	Hersteller
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
GeneRuler™ Low Range DNA Ladder	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)

3.8 Organismen

3.8.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

NEB 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency), New England Biolabs GmbH (Frankfurt)

Genotyp: *fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

Transformationseffizienz: 1 - 3 x 10⁹ cfu/μg (pUC19-DNA)

One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Life Technologies GmbH (Darmstadt)

Genotyp: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*

Transformationseffizienz: 1 x 10⁹ cfu/μg (pUC19-DNA)

3.8.2 *Tetrahymena thermophila*

T. thermophila SB281

Genotyp: *exoB2/exoB2; gal1-1/gal1-1 (exoB2, gal1-1; exo-, gal-r)*

Paarungstyp: III

T. thermophila CU427

Genotyp: *chx1-1/chx1-1 (CHX1; cy-s)*

Paarungstyp: VI

Beide Stämme wurden freundlicherweise von A. Tiedtke (Münster) zur Verfügung gestellt.

3.9 Nährmedien

3.9.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

<u>LB-Medium</u>	25 g/L LB <i>Broth</i> in Aqua dest.
<u>LB-Agar-Platten</u>	15 g/L Agar in LB-Medium
<u>SOB-Medium</u>	26,64 g/L SOB-Medium in Aqua dest.
<u>SOC-Medium</u>	New England Biolabs GmbH (Frankfurt)

3.9.2 *Tetrahymena thermophila*

<u>Neff's Medium</u>	0,25 % (w/v) Proteosepepton 0,25 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) Glucosemonohydrat 0,1 % (v/v) Eisensulfat/Chelatlösung
----------------------	--

Die Glucose wurde als 20 %ige Stammlösung separat autoklaviert und nach dem Abkühlen dem Medium steril hinzugegeben.

<u>2 x Neff's Medium</u>	Doppelte Menge aller Komponenten, die für das Neff's Medium (s.o.) benötigt werden.
--------------------------	---

<u>Magermilchmedium</u>	2 % (w/v) Magermilchpulver
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	0,1 % (v/v) Eisensulfat/Chelatlösung
	0,5 % (w/v) Glucosemonohydrat

Die Glucose wurde als 20 %ige Stammlösung separat autoklaviert und nach dem Abkühlen dem Medium steril hinzugegeben.

3.10 Puffer und Lösungen

Nachfolgend werden die verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung bzw. Hersteller aufgelistet. Alle verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Aqua bidest. angesetzt.

<u>Ammoniak-Lösung</u>	30 % (v/v) Ammoniaklösung (25 %)
------------------------	----------------------------------

<u>BCA-Lösung (Lösung A)</u>	1 % (w/v) BCA
	2 % (w/v) Na ₂ CO ₃
	0,16 % (w/v) Natriumtartrat Dihydrat
	0,4 g (w/v) NaOH
	0,95 % (w/v) NaHCO ₃

Der pH-Wert wurde auf 11,25 eingestellt und die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

<u>BCA-Reagenz (Lösung C)</u>	50 Teile BCA-Lösung (Lösung A)
	1 Teil Kupfersulfatlösung (Lösung B)

Das Reagenz wurde frisch angesetzt und nur einen Tag lang verwendet.

<u>BSA (100 x)</u>	New England Biolabs GmbH (Frankfurt)
--------------------	--------------------------------------

<u>BSA-Lösung</u>	2 mg/ml BSA
-------------------	-------------

Buffer 4 (10 x) New England Biolabs GmbH (Frankfurt)

DNA Ligase Reaction Buffer (5 x) Life Technologies GmbH (Darmstadt)

DNA Loading Dye (6 x) Fisher Scientific GmbH (Schwerte)

Dream Taq Green Buffer (10 x) Fisher Scientific GmbH (Schwerte)

Dryl's-Lösung
(Dryl 1959)
1,5 mM Natriumcitrat
1 mM NaH₂PO₄
1 mM Na₂HPO₄
1,5 mM CaCl₂

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

EDTA-Lösung 0,1 M EDTA Dinatriumsalz Dihydrat

Die Lösung wurde vor der Verwendung autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

Eisen-Lösung
6,4 % (w/v) FeCl₂
15,1 % (w/v) FeCl₃

Fast AP Buffer (10 x) Fisher Scientific GmbH (Schwerte)

Homogenisationspuffer (2 x)
20 mM Tris/HCl, pH 7,4
2 mM EDTA
400 mM Saccharose

Inhibitor-Cocktail (10 x) 0,8 mM Leupeptin
2 mM Pefabloc
10 mM EDTA
in Tris/HCl, pH 7,4

Die Lösung wurde mit 2 M NaOH neutralisiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Kupfersulfat-Lösung (Lösung B) 4 % (w/v) CuSO₄

Die Lagerung der Lösung erfolgte bei 4°C.

Lysis-Puffer 1 % (w/v) Triton X-114
1 x Inhibitorcocktail
in 10 mM Tris, pH 7,4

PBS (10 x) 8 % (w/v) NaCl
0,2 % (w/v) KCl
1,44 % (w/v) Na₂HPO₄
0,24 % (w/v) KH₂PO₄

Stärke-Lösung 13,3 % (w/v) Kartoffelstärke

TAE-Puffer (50 x) 2 M Tris
5,71 % (v/v) Eisessig
50 mM EDTA
pH 8,3-8,5

Tango Buffer (10 x) New England Biolabs GmbH (Frankfurt)

TMFI-Puffer 100 mM CaCl₂ x 2 H₂O
50 mM RbCl
40 mM MnCl₂ x 4 H₂O

Die Lösung wurde vor der Verwendung autoklaviert.

Trichloressigsäure-Lösung 50 % (w/v) TCA

Tris/HCl-Lösung 1 M Tris
pH 7,4

Nach dem Einstellen des pH-Wertes mit konzentrierter HCl-Lösung wurde die Lösung autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

3.11 Stammlösungen

Ampicillin-Stammlösung 100 mg/ml Ampicillin in ddH₂O
Arbeitskonzentration: 100 µg/ml

Cadmiumchlorid-Stammlösung 0,5 mg/ml CdCl₂ in ddH₂O
Arbeitskonzentration: 0,02-1 µg/ml

Cycloheximid-Stammlösung 10 mg/ml Cycloheximid in ddH₂O
Arbeitskonzentration: 7,5-40 µg/ml

3.12 Oligonukleotide

Die von der Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg) bezogenen Oligonukleotide wurden nach Herstellerangaben in deionisiertem Wasser aufgenommen. Es wurde jeweils ein Arbeitsaliquot mit einer Konzentration von 10 µM vorbereitet. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Primer sind in Tab. 8 bis Tab. 10 angegeben. Die Vorwärtsprimer sind mit „F“ (*forward*), die Gegenprimer mit „R“ (*reverse*) bezeichnet. Primer, die in Kolonie-PCR-Reaktionen (s. Kap. 4.6.3) sowohl als Forward- als auch als Reverse-Primer eingesetzt wurden, sind durch „U“ (*universal*) gekennzeichnet. Vorhandene Restriktionsschnittstellen sind in den Sequenzen durch Kleinschreibung hervorgehoben.

3.12.1 Oligonukleotide für cDNA-Analysen

Tab. 8: Verwendete Primer für cDNA-Analysen.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
SSU rRNA-F	CCTGGGAAGGTACGGGTAAT
SSU rRNA-R	AAGG TTCACCAGACCATT CG
Cbp-F	GGCCTGCAAGACCTGAATTC
Cbp-R	TCTACTCCCTAGCCATGTTACT
Cth90-F	AGGAGTCTCTGTCTTGCTTCT
Cth90-R	GGAGCAACATCACCCCTCAA
Drp1-F	AGGCTATCTTGCTCACAGAACT
Drp1-R	TCTTTCTTCTGCGATGTTGGC
Prf1-F	TGCGAATCTGCCTACATCCT
Prf1-R	AGCGTCGAATCTGACAGTGT
Snare-F	ACTCTTAAGCTACCAGATCAGCT
Snare-R	TGCTTGCTTGACATCTAAACCA
Tpp2p-F	GCAGCAAAGTCACAAGAGTCT
Tpp2p-R	CTTTTCAGGAGATTCGATGCCA
Tpp3p-F	CTCAAGAAGAAGCTGCCACC
Tpp3p-R	GATGGAGACGGGATCAGTGT
Tpp5p-F	GGTCAAGCCCCAACACTACT
Tpp5p-R	GAAGCCGTCAATGAGCCAAG
Tpp9p-F	TTGCTTCCAACGTAGCTTGC
Tpp9p-R	GTCAGCCAAAGCAGAGACTT
Vps13-F	GCTACTCAAGAGGCTGCTGT
Vps13-R	GGTCTGATAATGGAAGGGGCA

3.12.2 Oligonukleotide für Klonierungen

Tab. 9: Verwendete Primer für Klonierungen.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Apa-Cbp-F	CgggcccAGTAACATGGCTAGGGAGTAGA
Apa-Cth90-F	CgggcccCTGGGCTTTCTCCACTGTTG
Apa-Drp1-F	CgggcccCGTTGGTATCGATTTCTTGCC
Apa-Prf1-F	CgggcccCCCACTGATCCTAATGTTGGTTT
Apa-Snare-F	CgggcccTGGTTTAGATGTCAAGCAAGCA
Apa-Vps13-F	CgggcccGCCATTACAAAGATCAAGCCA
Pme-Cbp-F	GGCggttaaacAGTAACATGGCTAGGGAGTAGA
Pme-Cth90-F	GGCggttaaacCTGGGCTTTCTCCACTGTTG
Pme-Drp1-F	GGCggttaaacCGTTGGTATCGATTTCTTGCC
Pme-Prf1-F	GGCggttaaacCCCACTGATCCTAATGTTGGTTT
Pme-Snare-F	GGCggttaaacTGGTTTAGATGTCAAGCAAGCA
Pme-Vps13-F	GGCggttaaacGCCATTACAAAGATCAAGCCA
Xho-Cbp-R	CCGctcgagTTGCCCTCTTCCCAGTAACC
Xho-Cth90-R	CCGctcgagTTAGTCGGGGCTGTTAGGAG
Xho-Drp1-R	CCGctcgagCTCTTACCTGCAACTTGGTCAG
Xho-Prf1-R	CCGctcgagCAGTAGTTAGCGGACTTTAAGGA
Xho-Snare-R	CCGctcgagGCATCATTTTGTGCAACTCCA
Xho-Vps13-R	CCGctcgagAGAGCACCACCCTTCTTAGC
Xma-Cbp-R	CCGcccgggTTGCCCTCTTCCCAGTAACC
Xma-Cth90-R	CCGcccgggTTAGTCGGGGCTGTTAGGAG
Xma-Drp1-R	CCGcccgggCTCTTACCTGCAACTTGGTCAG
Xma-Prf1-R	CCGcccgggCAGTAGTTAGCGGACTTTAAGGA
Xma-Snare-R	CCGcccgggGCATCATTTTGTGCAACTCCA
Xma-Vps13-R	CCGcccgggAGAGCACCACCCTTCTTAGC
Cbp-U	AGGCTTGATGGAAGGTAAGTGG
Cth90-U	ACGCCATCGCTACTGGTAAG
Drp1-U	GTTTCATGTGCCTCCCAGTAA
Prf1-U	AGATTCGACGCTGATGCTGG
Snare-U	AGCTGAAGATCCAAACGTAAGA
Vps13-U	AGGTATCATGTAGGGTGCTTCT

3.12.3 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Tab. 10: Verwendete Primer für Sequenzierungen. Die Primer binden in der Linker-Region des verwendeten dsRNA-*Hairpin*-Expressionsvektors.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
TTN2-F	GTAAGTAACGGATATGCAAAG
TTN2-R	CCTTTGAATTCTTCTTTTATCTA

3.13 Plasmide

Tab. 11 gibt die Vektoren an, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden. Eine Vektorkarte des Plasmids pRec8iCHX, die freundlicherweise von R. Howard-Till (Wien) zur Verfügung gestellt wurde, befindet sich exemplarisch im Anhang (s. Abb. 44).

Tab. 11: Verwendete Konstrukte.

Insert	Vektor	Schnittstellen	Quelle
Cbp (740-1192)	pCHX	Apa/Xho + Pme/Xma	Diese Arbeit
Cth90 (239-699)	pCHX	Apa/Xho + Pme/Xma	Diese Arbeit
Drp1 (1037-1507)	pCHX	Apa/Xho + Pme/Xma	Diese Arbeit
Prf1 (716-1169)	pCHX	Apa/Xho + Pme/Xma	Diese Arbeit
REC8 (536-988)	pCHX	Apa/Xho + Pme/Xma	R. Howard-Till, Wien
Snare (646-1185)	pCHX	Apa/Xho + Pme/Xma	Diese Arbeit
Vps13 (15244-15791)	pCHX	Apa/Xho + Pme/Xma	Diese Arbeit

3.14 Datenbanken und Computersoftware

Nachfolgend werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Datenbanken und Computerprogramme angegeben.

Datenbanken und Hilfsprogramme

- *Tetrahymena* Genome Database (TGD): <http://www.ciliate.org>
- PubMed des National Centers of Biotechnology Information (NCBI):
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- BLAST-Programm des National Centers of Biotechnology Information (NCBI):
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Primer3, Version 4.0.0: <http://bioinfo.ut.ee/primer3>
- *MEROPS - the Peptidase Database*: <http://merops.sanger.ac.uk/>
- TMHMM Server v. 2.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

Computerprogramme und -Software

- MS Office 2013 (Textverarbeitung und Tabellenkalkulation)
- Citavi 4 (Literaturverwaltung)
- CorelDRAW Graphics Suite X6 (Erstellung von Grafiken)
- MxPro qPCR Software (Auswertung von qPCR-Ergebnissen)

4 Methoden

4.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien und Ciliaten

4.1.1 Langfristige Lagerung von Bakterien

Zur dauerhaften Lagerung von *E. coli*-Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde zu einer Übernachtskultur 50 % (v/v) steriles Glycerin gegeben. Nach mehrfachem Invertieren und Überführen in flüssigen Stickstoff erfolgte schließlich die Lagerung bei -80°C. Mittels dieser Glycerinkulturen konnten zu beliebigen Zeitpunkten Flüssigkulturen angeimpft werden.

4.1.2 Dauerkultivierung von *T. thermophila*

Zur Dauerkultivierung von *T. thermophila*-Stämmen wurden sterile Reagenzgläser mit 10 ml Aqua dest. und einer Kichererbse verwendet. Nach Zugabe von 20 µl Neff's Medium wurden die Reagenzgläser mit 20 µl einer Neff's-Standkultur beimpft und bei Raumtemperatur inkubiert. Das Überimpfen der Dauerkulturen erfolgte viertel- bis halbjährlich.

4.1.3 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

E. coli-Stämme wurden in LB-Medium bei 37°C über Nacht angezogen. Die Kultivierung erfolgte auf Festagarplatten im Inkubator bzw. unter Rotation in Reagenzgläsern. Die Zusammensetzung der verwendeten Medien sowie der verwendeten Ampicillin-Stammlösung sind den Kapiteln 3.9.1 und 3.11 zu entnehmen. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 13500 x g für 1 min.

4.1.4 Kultivierung von *T. thermophila*-Stämmen

Zur Kultivierung von *T. thermophila*-Stämmen wurden 24-Well-Zellkulturplatten eingesetzt. In ein Well wurden 1,5 ml Neff's Medium und 300 µl einer *T. thermophila*-

Dauerkultur (s. Kap. 4.1.2) gegeben. Die Inkubation der Standkulturen erfolgte im Inkubator bei 30°C. Nach 3-7 Tagen wurde ein neues Well mit 20 µl des vorherigen Wells beimpft. Auf die Verwendung von Antibiotika sowie Antimykotika konnte bei der Kultivierung von *T. thermophila* verzichtet werden.

Für die Kultivierung von Vorkulturen wurden 10 ml Neff's Medium im Erlenmeyerkolben mit 50-100 µl einer Neff's-Standkultur beimpft. Die Vorkulturen wurden bei 30°C inkubiert und am nächsten Tag verwendet, um mit 500 µl 100 ml-Kulturen anzupfen. Die 100 ml-Kulturen wurden entweder im Inkubator bei 30°C oder im Schüttelinkubator bei 30°C und 80 rpm inkubiert.

Für die Phagosomenisolierung (s. Kap. 4.12) wurden 400 ml-Kulturen in Fernbachkolben angesetzt. Zum Beimpfen der Kolben wurden über Nacht gewachsene Zellen einer 100 ml-Kultur verwendet. Hierzu musste zunächst berechnet werden, welches Volumen benötigt wurde, um am nächsten Morgen den gewünschten Endtiter (E) von $2 \cdot 10^4$ Zellen/ml zu erhalten. Da sich der Endtiter E aus dem Produkt des Anfangstiters A und 2^n ergibt, gilt umgekehrt $A = E : 2^n$. Hierbei ist n die Generationszahl, wobei von einer Generationszeit von 3 h ausgegangen wurde und eine lag-Phase von 3 h nicht berücksichtigt wurde. Der Quotient aus der Zelldichte (s. Kap. 4.1.5) der 100 ml-Kultur und dem Anfangstiter A lieferte schließlich den Verdünnungsfaktor, mit dessen Hilfe das benötigte Volumen an Zellkultur für 400 ml Neff's Medium berechnet werden konnte. Die Fernbachkolben wurden bei 30°C und 80 rpm inkubiert und am nächsten Tag für die Phagosomenisolierung (s. Kap. 4.12) genutzt.

Die Ernte von *T. thermophila*-Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 1100 x g für 5 min.

4.1.5 Bestimmung der Zelldichte von *T. thermophila*-Kulturen

Die Bestimmung der Zelldichte von *T. thermophila*-Kulturen erfolgte mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Diese unterscheidet sich von den üblichen Zählkammern nicht nur durch ihren größeren Flächeninhalt (16 mm²), sondern auch durch ihren größeren Rauminhalt (3,2 µl) und die damit verbundene größere Kammertiefe von 0,2 mm (Marienfeld, Info Zählkammern).

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension mit Glutaraldehyd verdünnt, um die Zellen unbeweglich zu machen, und in die Kammer pipettiert. Pro Zählnetz wurden vier Großquadrate ausgezählt. Um Doppelzählungen zu vermeiden, wurden Zellen, die sich auf der rechten sowie auf der unteren Begrenzungslinie eines Kleinquadrates befanden, nicht mitgezählt.

Folgende Formel diente zur Bestimmung des Zelltiters:

$$\text{Zelltiter} \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{MW} * 8 * \text{VF} * 10^4 * \text{ml}^{-1}}{64}$$

Hierbei stehen „MW“ für den Mittelwert der beiden erhaltenen Zellzahlen (aus den vier Großquadraten des oberen und des unteren Zählnetzes) und „VF“ für den Verdünnungsfaktor.

4.2 DNARN-Isolierung aus Bakterien und Ciliaten

4.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen wurde ein Reagenzienkit der Firma OMEGA Bio-Tek Inc. (Norcross, USA) verwendet (s. Tab. 6). Die Präparation erfolgte ausgehend von 5 ml (Mini) bis 15 ml (Midi) Flüssigkultur nach dem Protokoll des Herstellers. Dieses basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und einer anschließenden Fällung der Proteine durch Kalium-Acetat/SDS (*sodium dodecyl sulfate*). Die Isolierung der Plasmid-DNA wird durch eine selektive Adhäsion der DNA an eine Silicagel-Matrix erreicht.

Die Elution der DNA erfolgte abweichend vom Protokoll in 50-100 µl ddH₂O. Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung (s. Kap. 4.3) wurde die DNA bei -20°C gelagert.

4.2.2 Isolierung genomischer DNA aus *T. thermophila*

Zur Isolierung der genomischen DNA aus *T. thermophila* wurde das DNeasy Plant Mini Kit (s. Tab. 6) genutzt. Die Präparation der durch Zentrifugation (1100 x g, 3 min)

geernteten Zellen einer spät-logarithmischen 10 ml-Kultur erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Abweichend erfolgte die Elution in 2 x 100 µl ddH₂O. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde photometrisch bestimmt (s. Kap. 4.3) und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde unter Verwendung des innuPrep Double Pure Kits (s. Tab. 6) nach Angaben des Herstellers extrahiert und gereinigt. Die Elution der DNA erfolgte abweichend in 10-20 µl ("Mini Elute"-Protokoll) sterilem ddH₂O. Nach der Konzentrationsbestimmung (s. Kap. 4.3) wurde die DNA-Lösung bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.4 Isolierung von RNA aus *T. thermophila*

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus *Tetrahymena*-Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits (s. Tab. 6). Die RNA wurde nach Herstellerangaben präpariert. Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung (s. Kap. 4.3) wurden die RNA-Proben in flüssigen Stickstoff überführt und bei -80°C gelagert.

4.3 DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch mit Hilfe der *Label Guard™ Microliter Cell* (Implen GmbH, München). Diese Methode basiert auf dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm, wobei die Absorption auf die aromatischen Ringe der Basen zurückzuführen ist. Nach Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm kann die Konzentration der Nukleinsäure-Lösung nach folgender Formel berechnet werden:

$$c \text{ (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \cdot \text{probenspezifischer Faktor} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der probenspezifische Faktor für doppelsträngige DNA (dsDNA) beträgt 50, der für RNA 40. Der Verdünnungsfaktor beträgt je nach verwendetem Aufsatz 10 bzw. 50 (*Lid factor*).

4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Diese Methode wurde z.B. zur Analyse von PCR-Ansätzen oder zur Überprüfung der Vollständigkeit eines Vektorverbaus eingesetzt.

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wandern negativ geladene DNA-Moleküle im elektrischen Feld durch eine Agarosematrix. Kleine Moleküle migrieren dabei schneller als große, so dass mit Hilfe eines DNA-Standards die Molekülgrößen ermittelt werden können. Je höher die Agarose-Konzentration des Gels ist, umso niedriger ist die Migrationsgeschwindigkeit. Höhere Agarose-Konzentrationen werden demnach zur Separation kleinerer Moleküle verwendet.

Bei Plasmid-DNA ist zu beachten, dass die Migrationsgeschwindigkeit von der Konformation des Moleküls abhängt: Plasmide mit einem Bruch (*nick*) in einem der beiden Stränge der Doppelhelix (*nicked* oder *open-circular*) weisen geringere Migrationsraten als linearisierte Plasmide auf. Superhelikale Plasmide (*supercoiled*) wandern hingegen schneller durch die Matrix.

Die DNA-Proben wurden mit 6 x DNA-Probenpuffer (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) versetzt und je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente in 0,5 – 3 % (w/v) Agarosegelen in 1 x TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 100 V aufgetrennt. Bei PCR-Ansätzen war kein Zusatz von 6 x Loading Dye nötig, da diese Proben bereits den Dream *Taq* Green Buffer (s. Kap. 4.6.1 bis 4.6.3) enthielten.

Die Gele konnten im Anschluss an die Elektrophorese direkt mit Hilfe eines UV-Illuminators dokumentiert werden, da bei der Verwendung von DNA *Stain Clear G* ein zusätzlicher Färbeschritt wie bei der Verwendung von Ethidiumbromid (EtBr) nicht nötig ist. DNA *Stain Clear G* wird direkt in die Agarose gegeben (1,5 µl pro 100 ml Agarose). Es bindet wie EtBr an Nukleinsäuren und ist mindestens genauso sensitiv wie EtBr. Außerdem ist *Stain G* im Gegensatz zu EtBr nicht karzinogen.

Als Größenstandard bei der Agarose-Gelelektrophorese dienten je nach Fragmentgröße ein 10 kb DNA-Leiter-Mix oder eine 700 bp *Low Range* DNA-Leiter (s. Tab. 7).

Da es nach einer Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (s. Kap. 4.2.3) – trotz der Verwendung von TopVision™ Agarose (s. Tab. 3) für präparative Gele – in den nachfolgenden Schritten einer Klonierung zu Problemen kam (s. Kap. 5.5.3), wurde die Agarose-Gelelektrophorese vor allem für analytische Zwecke genutzt.

4.5 Reverse Transkriptase-Reaktion

Zur Herstellung von cDNA aus RNA wurde eine Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) unter Verwendung des QuantiTect® Reverse Transcription Kits (s. Tab. 6) durchgeführt. Dieses enthält einen Puffer (*gDNA wipeout buffer*), mit dem effektiv genomische DNA-Kontaminationen entfernt werden können. Der Erfolg der RT-Reaktion konnte durch eine PCR (s. Kap. 4.6.1) überprüft werden, da die Produkte einer mit cDNA als *Template* durchgeführten PCR eine andere Größe aufwiesen als die einer mit genomischer DNA als *Template* durchgeführten (aufgrund enthaltener Intronbereiche). Die erhaltene cDNA wurde für die quantitative Real-Time-PCR verwendet (s. Kap. 4.6.5).

4.6 PCR-Methoden

4.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Standardmethode zur Amplifizierung eines spezifischen DNA-Bereichs, bei der hitzestabile DNA-Polymerasen eingesetzt werden (Mullis *et al.* 1986). Sie zeichnet sich durch eine sich zyklisch wiederholende Abfolge von Reaktionsschritten aus:

- 1.) Denaturierung der DNA-Doppelhelix durch einen Temperaturanstieg auf 90 bis 98°C

- 2.) Hybridisierung (Annealing) einzelsträngiger DNA mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primern) im Temperaturbereich von ca. 50 bis 60°C
- 3.) Kettenverlängerung (Elongation) der 3'-OH-Primer-Enden durch den Einbau von dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphaten) mit Hilfe der DNA-Polymerase

Die zu vermehrenden DNA-Abschnitte werden dabei durch eine gezielte Wahl von Primern festgelegt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dream *Taq* DNA-Polymerase (s. Tab. 4) mit einer Prozessivität von 1000 bp/min eingesetzt. Bei dieser handelt es sich um eine „verbesserte“ *Taq* DNA-Polymerase, die für Standard-PCR-Anwendungen optimiert wurde, so dass sie im Vergleich zur konventionellen *Taq* DNA-Polymerase sowohl eine höhere Sensitivität als auch höhere Ausbeuten gewährleistet. Außerdem ermöglicht die Dream *Taq* DNA-Polymerase die Amplifikation auch großer DNA-Abschnitte (bis zu 6 kb bei genomischer DNA). Die Reaktions- und PCR-Bedingungen unterscheiden sich jedoch nicht von denen der konventionellen *Taq*-Polymerase.

Die Zusammensetzung eines präparativen PCR-Ansatzes sowie das verwendete PCR-Programm sind Tab. 12 und Tab. 13 zu entnehmen.

Tab. 12: Pipettierschema für einen Standard-PCR-Ansatz (präparative Reaktion).

Komponente	Volumen	Endkonzentration
<i>Template</i> -DNA	1-2 µl	0,1-0,3 µg pro Ansatz
10 x Green Buffer	5 µl	1 x
dNTP Mix, 2 mM each	5 µl	800 µM
<i>Forward</i> -Primer (10 µM)	1 µl	200 nM
<i>Reverse</i> -Primer (10 µM)	1 µl	200 nM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl	2,5 U
Aqua dest.	ad 50 µl	

Tab. 13: Verwendetes PCR-Programm (präparative Reaktion).

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95°C	3 min	
2	95°C	30 sek	
3	5-10°C < T _m	30 sek	
4	72°C	30-45 sek	39 x zu Schritt 2
5	72°C	10 min	
6	4°C	∞	

Die Schmelztemperatur T_m kann entweder mit Hilfe der Formel $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ abgeschätzt werden, wobei die Buchstaben die Anzahl der jeweiligen Base angeben, oder den Angaben der Firma MWG entnommen werden.

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese (s. Kap. 4.4) überprüft.

4.6.2 Gradienten-PCR

Um eine geeignete Annealing-Temperatur einer PCR zu ermitteln bzw. um PCR-Nebenprodukte zu vermeiden, wurde eine Gradienten-PCR im Mastercycler Gradient (s. Tab. 1) durchgeführt. Dazu wurden wie bei der Kolonie-PCR (s. Kap. 4.6.3) analytische PCR-Ansätze (s. Tab. 14) vorbereitet, wobei genomische DNA oder cDNA als *Template* dienten. Die PCR-Reaktionen erfolgten wie in Tab. 15 angegeben, wobei jeder Ansatz eine andere Annealing-Temperatur aufwies. Der Temperaturbereich, der dabei abgedeckt werden soll, kann zuvor festgelegt werden.

Die Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte mittels Gelelektrophorese (s. Kap. 4.4).

4.6.3 Kolonie-PCR

Nach einer Transformation von Ligationsansätzen wurden mit Hilfe einer so genannten Kolonie-PCR positive Transformanten identifiziert. Dazu wurde der 50 µl-Ansatz der präparativen PCR (s. Tab. 12) auf 10 µl umgerechnet (s. Tab. 14).

Tab. 14: Pipettierschema für einen Kolonie-PCR-Ansatz (analytische Reaktion).

Komponente	Volumen	Endkonzentration
<i>Template</i> -DNA	Ausstrich	
10 x Green Buffer	1 µl	1 x
dNTP Mix, 2 mM each	1 µl	800 µM
<i>Forward</i> -Primer (10 µM)	0,2 µl	200 nM
<i>Reverse</i> -Primer (10 µM)	0,2 µl	200 nM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,1 µl	0,5 U
Aqua dest.	ad 10 µl	

Auch das PCR-Programm blieb annähernd gleich, wobei die Anzahl der Zyklen auf 30 verringert wurde, da der Ansatz zu analytischen und nicht zu präparativen Zwecken durchgeführt wurde (s. Tab. 15). Bei der Kolonie-PCR wurde Zellmaterial als DNA-*Template* verwendet, so dass der erste Denaturierungsschritt zur Lyse der Zellen länger durchgeführt wurde.

Mit einem sterilen Zahnstocher wurde eine Bakterienkolonie von der LB-Agar-Platte abgenommen und in einem PCR-Gefäß (Eppendorf, Hamburg) ausgestrichen. Der Zahnstocher mit der übrigen Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker gegeben und als Übernachtskultur angezogen.

Tab. 15: Verwendetes PCR-Programm (analytische Reaktion).

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95°C	5 min	
2	95°C	30 sek	
3	5-10°C < T _m	30 sek	
4	72°C	30-45 sek	29 x zu Schritt 2
5	72°C	10 min	
6	4°C	∞	

4.6.4 One-Step RT-PCR

Bei der One-Step RT (Reverse Transkriptase) – PCR erfolgen die Umschreibung von RNA in cDNA (Reverse-Transkriptase-Reaktion) und die Amplifikation eines Fragments durch eine PCR in einem Schritt. In der vorliegenden Arbeit wurde das OneStep RT-PCR Kit (s. Tab. 6), das eine hochempfindliche und spezifische RT-PCR mit beliebigem RNA-*Template* ermöglicht, verwendet. Dieses enthält optimierte Komponenten, so dass RT-Reaktion und PCR in einem Reaktionsansatz stattfinden können. Die Durchführung der One-Step RT-PCR erfolgte nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden).

Zu beachten ist, dass es sich bei dieser Methode um eine sogenannte *Endpoint*-PCR handelt, bei der – in Gegensatz zur Real-Time-PCR – keine Quantifizierung des PCR-Produkts in Echtzeit erfolgt. Nach der One-Step RT-PCR wurde eine gelelektrophoretische Analyse (s. Kap. 4.4) durchgeführt.

4.6.5 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR (qPCR) ist eine DNA-Amplifikationsmethode, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, und zusätzlich eine Quantifizierung der vervielfältigten DNA ermöglicht. Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung stellt die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen wie Ethidiumbromid oder SYBR Green, die in die DNA interkalieren und so eine Fluoreszenzzunahme bewirken, dar. Die Quantifizierung erfolgt durch Messung der Fluoreszenz, die während eines PCR-Zyklus proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt, in Echtzeit. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann. Dieses Problem kann jedoch durch eine sogenannte Schmelzkurvenanalyse umgangen werden. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt aufweist als unspezifisch entstehende Produkte, ist eine Unterscheidung und somit eine Überprüfung der Spezifität möglich.

Als Messgröße und indirektes Maß für die eingesetzte cDNA-Menge wird in der qPCR der Ct-Wert (*Cycle threshold*) bestimmt. Dieser entspricht der Anzahl an PCR-Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am Ct

befindet sich in allen Reaktionsgefäßen per Definition die gleiche Menge an neusynthetisierter DNA (Pfaffl 2006).

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde der Thermocycler Mx3005P™ der Firma Agilent Technologies (Waldbronn) eingesetzt. Die optimale Primer-Konzentration für einen qPCR-Ansatz wurde für jedes untersuchte Gen mit Hilfe einer Primer-Titration ermittelt. Alle Messungen bzw. die erhaltenen Ergebnisse wurden auf die Fluoreszenzwerte von entsprechenden Kontrollgruppen kalibriert.

Für jede Probe wurden Dreifach- oder Vierfach-Messungen (Tripletts bzw. Quartetts) durchgeführt. Außerdem wurden sogenannte *No-Template*-Kontrollen (NTC, „Wasserprobe“), mit der die Entstehung von Primerdimeren überprüft werden kann, sowie *No-RT*-Kontrollen, die zeigen sollten, dass ohne vorherige RT-Reaktion in der PCR kein Produkt entsteht, durchgeführt.

Die Berechnung von relativen Expressionsunterschieden wurde nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak & Schmittgen 2001) durchgeführt. Dabei wird die Expression des Zielgens mittels derer eines Referenzgens normalisiert (relative Quantifizierung). In einem zweiten Schritt werden die normalisierten Expressionsunterschiede (ΔC_t) der Behandlungsgruppe mit der Kontrollgruppe verglichen und man erhält den $\Delta\Delta C_t$ -Wert. Die ideale interne Kontrolle ist dabei leicht zu detektieren und dessen Expression sollte nicht während des Zellzyklus, zwischen verschiedenen Zelltypen oder als Antwort auf die experimentelle Behandlung (z.B. Stress, Medikamente, Krankheit) variieren. Häufig werden *Housekeeping*-Gene verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde das SSU rRNA Gen als Referenzgen eingesetzt.

Die $\Delta\Delta C_t$ -Methode setzt eine konstante Verdopplung der DNA-Menge in jedem Real-Time-PCR-Zyklus voraus (100 %ige PCR-Effizienz bzw. $E = 2$). Da die tatsächliche PCR-Effizienz jedoch abhängig von der Qualität des Assays in den unterschiedlichen PCR-Ansätzen ist, führen geringste Schwankungen in den PCR-Effizienzen zwischen Zielgen und Referenzgen zu verzerrten quantitativen Resultaten (Pfaffl & Riedmaier 2011). Die relative Quantifizierung lässt sich folglich weiter optimieren, indem die unterschiedlichen qPCR-Effizienzen der untersuchten Gene miteinbezogen werden. Dazu wurde eine Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen (-2x) erstellt, aus dessen Steigung die *real-time* PCR-Effizienz bestimmt werden kann

(Rasmussen 2001). Hierzu wurde ein Gemisch aus cDNA aller untersuchten Zeitpunkte verwendet.

Die Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung mittels qPCR stellt bis dato die eleganteste Form der Quantifizierung dar (Pfaffl 2001).

4.6.5.1 SYBR Green

Zur Ermittlung von während des Phagozytoseprozesses auftretenden Änderungen des mRNA-Levels ausgewählter Gene (s. Kap. 5.4), wurde die RNA aus *T. thermophila*-Zellen, die zuvor mit Magnetobeads (s. Kap. 4.11) gefüttert wurden, nach verschiedenen Inkubationszeiten (Nullprobe, 30 sek, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h und 2 h) isoliert (s. Kap. 4.2.4) und in cDNA umgeschrieben (s. Kap. 4.5). Die Proben wurden mittels des SensiMix™ SYBR Low-ROX Kits (s. Tab. 6), welches als internen Fluoreszenzstandard ROX (5-Carboxy-X-Rhodamin-N-Hydroxysuccinimid-Ester) nutzt, nach Angaben des Herstellers vorbereitet und in die qPCR eingesetzt. Die gemessenen Fluoreszenzen wurden auf den Wert der Nullprobe (s.o.) kalibriert. Das verwendete PCR-Programm ist Tab. 16 zu entnehmen.

Tab. 16: Verwendetes qPCR-Programm (SYBR Green).

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95°C	10 min	
2	95°C	30 sek	
3	5-10°C < T _m	1 min	39 x zu Schritt 2
4	95°C	1 min	
5	2°C < T _A	30 sek	
6	95°C	30 sek	

4.6.5.2 Eva Green

Die im Rahmen der RNA-Interferenz-Experimente (s. Kap. 4.17 und Kap. 5.5) durchgeführten qPCR-Analysen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Eva Green

durchgeführt. Dieser bietet gegenüber SYBR Green einige Vorteile: Eva Green weist eine niedrigere PCR-Inhibition auf, ist ein extrem stabiler Farbstoff und weder mutagen noch zytotoxisch. Zur Normalisierung des Fluoreszenz-Reportersignals während der qPCR dient wie bei SYBR Green der passive, interne Referenzfarbstoff ROX.

Es wurde RNA aus mit Cadmium behandelten *Tetrahymena*-Transformanten isoliert (s. Kap. 4.2.4) und in cDNA umgeschrieben (s. Kap. 4.5). Die Proben wurden unter Verwendung des Kits My-Budget 5x EvaGreen® QPCR-Mix II (ROX) nach Angaben des Herstellers (s. Tab. 6) vorbereitet und im Anschluss wurde die qPCR nach dem in Tab. 17 angegebenen Programm durchgeführt. Die Elongationszeit (Schritt 4, s. Tab. 17) betrug für 50-200 bp Fragmente 20 sek und wurde für größere Fragmente entsprechend erhöht.

Die gemessenen Fluoreszenzen wurden auf den Fluoreszenzwert entsprechender Kontrollgruppen (s. Kap. 5.5) kalibriert.

Tab. 17: Verwendetes qPCR-Programm (EVA Green).

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95°C	15 min	
2	95°C	15 sek	
3	5-10°C < T _m	20 sek	
4	72°C	20-35 sek	39-44 x zu Schritt 2
5	95°C	1 min	
6	2°C < T _A	30 sek	
7	95°C	30 sek	

4.7 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung amplifizierter DNA-Fragmente erfolgte unter Verwendung des innuPrep Double Pure Kits (s. Tab. 6) nach Angaben des Herstellers (Protokoll: *PCR-Purification*). Die PCR-Produkte wurden abweichend in 30-50 µl ddH₂O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Dieser Schritt erfolgte nach jeder präparativen PCR (s. Kap. 4.6.1), um Komponenten des PCR-Ansatzes wie z.B. die

Taq-Polymerase zu entfernen. Außerdem wurden auf diese Weise PCR-Fragmente oder Vektor-DNA-Proben nach einem Restriktionsverdau (s. Kap. 4.8.1) von z.B. Restriktionsenzymen befreit.

4.8 DNA-Klonierung

4.8.1 Restriktionsverdau

Die Spaltung von DNA-Molekülen erfolgte durch Restriktionsendonukleasen (s. Tab. 4) unter Verwendung des jeweils optimalen Restriktionspuffers (s. Kap. 3.10). Entweder erfolgte die Reaktion mit einem Enzym (z.B. zum Linearisieren eines Vektors) oder es wurde ein Doppel-Verdau (*double digest*) mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt, wodurch sichergestellt wurde, dass das Insert in der später folgenden Ligation (s. Kap. 4.8.3) die richtige Orientierung aufwies.

Die Restriktionsansätze wurden für 3 h (Vektor-DNA) oder über Nacht (PCR-Produkte) bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur von 37°C inkubiert und gegebenenfalls anschließend gelelektrophoretisch (s. Kap. 4.4) überprüft. Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die über Restriktionsschnittstellen in einen komplementär restringierten Vektor ligiert werden sollten, wurden Primer mit den entsprechenden Erkennungssequenzen (s. Tab. 9) verwendet. Einige Restriktionsenzyme besitzen eine sehr niedrige Aktivität, wenn die Erkennungssequenzen am 5'- oder 3'-Ende eines PCR-Produktes lokalisiert sind. Um die Aktivität dieser Restriktionsenzyme zu erhöhen, wurden die Erkennungssequenzen um einige Basen verlängert (s. Tab. 9). Außerdem wurden PCR-Fragmente aus diesem Grund über Nacht mit Restriktionsenzymen behandelt.

Restriktionsendonukleasen spalten sequenzspezifisch Phosphodiesterbindungen in DNA, wodurch je nach Enzym DNA-Fragmente mit glatten Enden (*blunt ends*) oder mit 5'- oder 3'-Überhang (*sticky ends*) entstehen.

4.8.2 DNA-Dephosphorylierung

Um während einer Ligation (s. Kap. 4.8.3) die Religation des Vektors (nach einem Restriktionsverdau mit *einem* Enzym) bzw. die Bildung von Multimeren (nach

Restriktionsverdau des Vektors mit zwei Enzymen) zu verhindern, wurde der linearisierte Vektor dephosphoryliert, d.h. die 5'-Phosphat-Enden des Vektors wurden entfernt. Dazu wurde eine thermosensitive alkalische Phosphatase (Fast AP, s. Tab. 4) verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist Tab. 18 zu entnehmen.

Tab. 18: Zusammensetzung eines Desphosphorylierungs-Ansatzes.

Komponente	Volumen/Masse
Vektor (nach Restriktionsverdau)	1 µg
10 x AP-Buffer	2 µl
Alkalische Phosphatase	1 µl
Aqua dest.	ad 20 µl

Die Reaktion erfolgte für 10 min bei 37°C. Im Anschluss wurde die alkalische Phosphatase durch eine 5-minütige Inkubation bei 75°C zerstört. Die Proben wurden bei -20°C gelagert bzw. direkt in die Ligationsreaktion (s. Kap. 4.8.3) eingesetzt.

4.8.3 Ligation

Die mit Restriktionsenzymen behandelte, dephosphorylierte Plasmid-DNA (s. Kap. 4.8.1 und 4.8.2) wurde mit dem komplementär restringierten DNA-Fragment bei 14°C über Nacht ligiert. Zur effizienten Ligation wurde die Insert-DNA wie vom Hersteller (Life Technologies GmbH, Darmstadt) angegeben im 3-fachen molaren Überschuss eingesetzt. Die Reaktion verlief unter Zugabe von T4-DNA-Ligase (s. Tab. 4), die DNA-Enden unter ATP-Verbrauch kovalent verknüpft. Die Zusammensetzung eines Ligationsansatzes ist Tab. 19 zu entnehmen.

Vor der Transformation (s. Kap. 4.9.2) wurde der Erfolg der Ligation mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 4.4) überprüft.

Tab. 19: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

Komponente	Volumen/Masse	
	<u>Kohäsive Enden</u> (<i>sticky ends</i>)	<u>Glatte Enden</u> (<i>blunt ends</i>)
5 x Ligasepuffer	4 µl	4 µl
Dephosphorylierter Vektor	20 fmol	40 fmol
DNA-Insert	60 fmol	120 fmol
T4-DNA-Ligase	1 U	1 U
Aqua dest.	ad 20 µl	ad 20 µl

4.9 Transformation/Transfektion von Bakterien und Ciliaten

4.9.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von DNA in *E. coli*-Zellen (s. Kap. 4.9.2) wurden chemisch kompetente Zellen nach einem Protokoll basierend auf der Rubidiumchlorid-Methode von Hanahan hergestellt (Hanahan 1983; Hanahan 1985). Dazu wurden 50 ml SOB-Medium (s. Kap. 3.9.1) mit einer Vorkultur zu einer OD₅₇₈ von 0,05 angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD von 0,5-0,7 inkubiert und anschließend für 5 min bei 2200 x g und 4°C sedimentiert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Pellet wurde in 25 ml eiskaltem TMFI-Puffer (s. Kap. 3.10) resuspendiert und die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert und danach geerntet (5 min, 2200 x g, 4°C). Das Zellsediment wurde vorsichtig in 5 ml eiskaltem TMFI-Puffer mit 20 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf Eis aliquotiert (200 µl Aliquots) und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.9.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von rekombinanter DNA wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen der Firma New England Biolabs (s. Kap. 3.8.1), bei denen es sich um ein DH5-alpha-Derivat handelt, oder selbst hergestellte kompetente Zellen (s. Kap. 4.9.1) verwendet. Dazu wurde ein Aliquot der auf Eis aufgetauten Zellen mit 1-5 µl des

Ligationsansatzes (1 pg bis 100 ng; s. Kap. 4.8.3) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mit Hilfe eines Hitzeschocks bei 42°C für 30 sek. Nach einer erneuten 5-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Regeneration der Zellen in 950 µl SOC-Medium (s. Kap. 3.9.1) für 1 h bei 37°C und 250 rpm im Thermoshaker. Zur Selektion positiver Transformanten wurden die Ansätze auf Selektivnährböden ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

Zur Retransformation von DNA wurden chemisch kompetente TOP10 *E. coli*-Zellen (s. Kap. 3.8.1) eingesetzt. Hierbei wurden die auf Eis aufgetauten Zellen mit 1 µl der 1:10 verdünnten Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgten bei 42°C für 30 sek der Hitzeschock und eine weitere Inkubation von 5 min auf Eis. Die Zellen wurden mit 250 µl SOC-Medium (s. Kap. 3.9.1) versetzt und 1 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Schließlich wurden die Transformanten auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsmarker (s. Kap. 3.11) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet.

4.9.3 Transfektion von *T. thermophila*-Zellen

Zur Transfektion von *T. thermophila*-Zellen wurde die sogenannte Genkanone (*gene gun*) der Cilian AG (Münster) benutzt (s. Abb. 8).



Abb. 8: Fotografische Darstellung des Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery Systems (Quelle: www.bio-rad.com).

Diese ermöglicht eine effektive Transfektion sowohl des Makronukleus von vegetativen Zellen, als auch des Makro- und Mikronukleus von konjugierenden Zellen (Cassidy-Hanley *et al.* 1997). Bei dem als *biolistic bombardment* bezeichneten Prozess wird die Plasmid-DNA an spezifische Mikroträger (Goldpartikel) immobilisiert, durch komprimiertes Gas beschleunigt und somit in die Zellen „geschossen“ (s. Abb. 9).

Vorbereitung der Zellen

Für die Transfektion mit Hilfe der Genkanone wurden in Neff's Medium gewachsene logarithmische bzw. früh-stationäre *T. thermophila*-Kulturen (CU427) verwendet. Pro Transfektion wurden etwa $1 \cdot 10^7$ Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet (1100 x g, 3 min, RT) und das Zellpellet wurde in 1 ml Dryl's-Puffer (s. Kap. 3.10) aufgenommen. Kurz vor der Transfektion wurde das resuspendierte Pellet auf einem sterilen, mit Dryl's-Puffer befeuchteten Filterpapier verteilt, welches schließlich in der Mitte einer sterilen Petrischale platziert wurde.

Vorbereitung der DNA

Die zu transfizierende Vektor-DNA wurde wie in Kap. 4.2.1 beschrieben ausgehend von 15 ml Flüssigkultur (Midi) präpariert und mit Hilfe eines Restriktionsenzym (BlnI) linearisiert (s. Kap. 4.8.1). Der verwendete Vektor (s. Abb. 44) besitzt zwei BlnI-Schnittstellen, so dass auf diese Weise das *E. coli*-Rückgrat (*backbone*) entfernt wurde. Nach der sich anschließenden Reinigung der DNA mittels des innuPrep Double Pure Kits (s. Tab. 6) wurde eine Konzentration von $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ angestrebt. Für eine Transfektion wurden etwa 4 μg DNA benötigt.

Vorbereitung der Gold-Partikel

Die Präparation der Goldpartikel erfolgte gemäß eines Protokolls der Firma Seashell Technology (Kalifornien, USA). Die Goldpartikel (DNA^{del}™ Gold Carrier Particles S550d) wurden zunächst mit Puffer (*binding buffer*) auf 30 mg/ml verdünnt und mit 4 μg DNA vermischt. Es folgte die Zugabe von 1 Volumen Präzipitationspuffer. Die Lösung wurde kurz durchmischt und nach einer 3-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die DNA-umhüllten Partikel pelletiert (10 sek, 9300 x g, RT). Die beladenen Goldpartikel wurden mit 500 μl eiskaltem Ethanol (abs.) gewaschen

und anschließend in 15 µl Ethanol aufgenommen. Um sie effizient zu lösen, wurde der Ansatz im Reaktionsgefäß für 20-30 sek mittels Ultraschall behandelt. Die DNA-immobilisierten Goldpartikel wurden auf einen Makroträger (s. Abb. 9) aufgetragen, welcher anschließend getrocknet wurde.

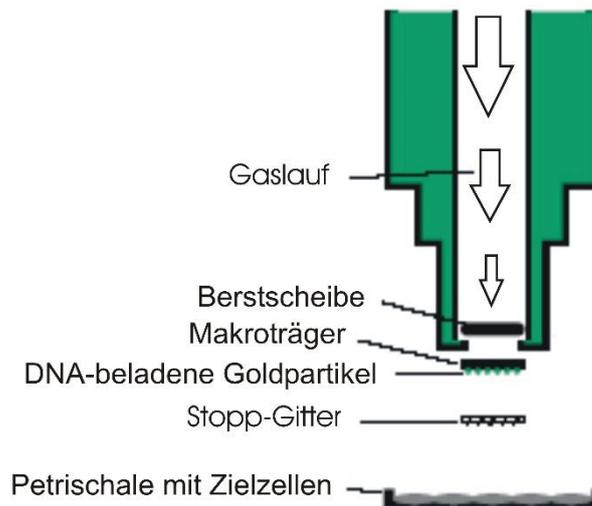


Abb. 9: Schematische Darstellung des Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery Systems (Abbildung verändert nach www.biocompare.com). Bei einem Helium-Druck von ~900 psi zerreißt die Berstscheibe und der Makroträger mit den DNA-beladenen Goldpartikeln wird beschleunigt bis er vom Stoppgitter zurückgehalten wird. Die Goldpartikel gelangen durch das Stopp-Gitter zu den Zielzellen, um sie schließlich zu penetrieren und zu transfizieren.

Transfektion

Die Transfektion erfolgte unter Verwendung eines Systems der Firma Bio-Rad (Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System), welches Helium-Druck zur Beschleunigung der Goldpartikel nutzt (s. Abb. 9). Dazu wurde zunächst eine Berstscheibe in die entsprechende Haltevorrichtung gelegt, welche dann in dem Gerät festgeschraubt wurde. Außerdem wurde ein Stoppgitter auf eine Halterung der Makroträger-Plattform gelegt und der trockene Makroträger mit der DNA-beladenen Seite zum Stoppgitter weisend darüber befestigt. Die Plattform wurde unterhalb des Berstscheibenhalters und die geöffnete Petrischale mit den präparierten Zellen unterhalb der Makroträger-Plattform platziert (s. Abb. 9).

Es wurde ein Vakuum hergestellt und der Auslöser gedrückt bis die Berstscheibe unter einem Druck von bis zu 900 psi zerriss, wodurch die Mikropartikel auf die Zielzellen „geschossen“ wurden. Nach dem Belüften wurden die transfizierten Zellen entnommen

und in 100 ml Magermilchmedium (s. Kap. 3.9.2) bei 30°C über Nacht regeneriert. Die Selektion der Transformanten erfolgte wie in Kap. 4.9.4 beschrieben.

4.9.4 Selektion von *T. thermophila*-Transformanten

Nach der Transfektion von *T. thermophila*-Zellen (s. Kap. 4.9.3) erfolgte die Selektion positiver Transformanten mit Cycloheximid (CHX). Dazu wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (1100 x g, 3 min) und in 50 ml Magermilchmedium (s. Kap. 3.9.2), das 7,5 µg/ml Cycloheximid enthielt, resuspendiert. Die Kultur wurde mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette auf 96 Well-Platten verteilt (150 µl je Well) und bei 30°C inkubiert. Nach ca. 1 Woche wurden 10 µl pro Well mit je 140 µl Magermilchmedium, das 15 µg/ml Cycloheximid enthielt, gemischt und wiederum bei 30°C inkubiert. Dieser Prozess wurde mit steigenden Antibiotika-Mengen bis zu einer Endkonzentration von 40 µg/ml wiederholt. Mit Hilfe eines Binokulars konnte das Wachstum der Zellen kontrolliert werden.

4.10 DNA-Sequenzierung

Sequenzanalytische Untersuchungen von Plasmid-Präparationen wurden von der Firma MWG (Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurden DNA-Proben mit einer Konzentration von 50-100 ng/µl sowie ein geeigneter Sequenzierprimer (s. Tab. 10) mit einer Konzentration von 2 pmol/µl zur Verfügung gestellt. Die Analyse der erhaltenen Sequenzen erfolgte durch Abgleich mit den entsprechenden Sequenzen der *Tetrahymena* Genom-Datenbank (s. Kap. 3.14).

4.11 Herstellung von Magnetobeads

Um Phagosomen aus *T. thermophila* zu gewinnen (s. Kap. 4.12), wurden die Zellen mit Stärke-umhüllten magnetischen Partikeln (Magnetobeads) gefüttert. Diese enthalten einen Magnet-Kern aus Magnetit (Fe₃O₄), welches eines der am stärksten (ferri)magnetischen Mineralien ist. Auf diese Weise wurden die Phagosomen, die sich

zur Verdauung der Beads bildeten, "magnetisch markiert" und konnten mit Hilfe eines Permanentmagneten aus den Zellen isoliert werden (s. Kap. 4.12).

Zur Herstellung der Magnetobeads wurden zunächst 120 ml Stärkelösung (s. Kap. 3.10) auf 65°C erhitzt bis eine viskose, klare Lösung entstand. Nach Zugabe von 40 ml Aqua dest. wurde die Lösung auf 40°C abgekühlt. Unter Rühren wurden bei konstanten 40°C 120 ml Eisenlösung (s. Kap. 3.10) und anschließend unter Verwendung einer Peristaltikpumpe tropfenweise (ca. 2 ml/min) 240 ml 7,5 %ige Ammoniaklösung (s. Kap. 3.10) zugegeben. Dabei bilden sich die von einer Stärkeschicht umgebenen Partikel mit Magnet-Kern. Durch die basische Lösung fällt Eisenhydroxid aus, welches im Anschluß mit Wasser unter Entstehung von Wasserstoff zu dem Spinell Magnetit reagiert.

Die entstandene schwarz-braune Suspension wurde anschließend auf 65°C erhitzt und schließlich auf RT abgekühlt. Der Überstand nach Zentrifugation bei 400 x g für 5 min wurde über Nacht bei RT in einer Glasschale auf einem Permanentmagneten inkubiert, so dass am nächsten Tag der Überstand mit einer Pipette entfernt werden konnte, während die Partikel auf dem Magneten verblieben. Die Partikel wurden in 40 ml 10 x PBS (s. Kap. 3.10) resuspendiert, wieder auf dem Magneten sedimentiert und der Überstand erneut abgenommen. Dieser Waschschrift wurde mit 40 ml 1 x PBS wiederholt. Anschließend wurden die Magnetobeads in 80 ml 1 x PBS aufgenommen und bei 400 x g für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen, der Überstand mit den darin verbliebenen Partikeln wurde direkt zur Phagosomenisolierung (s. Kap. 4.12) eingesetzt oder für bis zu 1 Woche bei 4°C gelagert.

Vor der Phagosomenisolierung (s. Kap. 4.12) wurden etwa 40 ml der Magnetobeads-Suspension auf dem Magneten inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die Partikel wurden in 40 ml Neff's Medium aufgenommen. Mit dieser Suspension wurden die *T. thermophila*-Zellen gefüttert (s. Kap. 4.12).

4.12 Phagosomenmarkierung und –Isolierung

Zur Herstellung von Phagosomen eines definierten phagosomalen Reifungsstadiums wurden Zellen von *T. thermophila* nach einem *Pulse-chase* Verfahren (Voßkühler &

Tiedtke 1993) mit magnetischen Mikropartikeln (s. Kap. 4.11) gefüttert und die so magnetisch markierten Phagosomen isoliert.

Dazu wurden 1,6 L Zellkultur mit einem Zelltiter von $2 \cdot 10^4$ Zellen/ml um den Faktor 4 eingeeengt, indem die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 1100 x g geerntet und anschließend in insgesamt 400 ml Neff's Medium resuspendiert wurden. Die Kultur wurde mit 40 ml Magnetobeads (s. Kap. 4.11) bei RT und 80 rpm für 30 sek inkubiert (*Pulse*). Die so gefütterten Zellen wurden sofort in einem Eis/Kochsalzgemisch (-15°C) auf eine Temperatur von unter 8°C abgekühlt, da bei einer Temperatur von unter 10°C die Membranfluidität so weit herabgesetzt wird, dass eine weitere Abschnürung von Phagosomen oder eine Prozessierung des gerade gebildeten naszenten Phagosoms nicht mehr möglich ist. Die Bildung von Phagosomen wurde mikroskopisch überprüft. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C für 1 min bei 1100 x g abzentrifugiert und das Zellpellet mit 50 ml 4°C kaltem Neff's Medium gewaschen, um nicht ingestierte magnetische Partikel zu entfernen. Zur Gewinnung von Phagosomen z.B. des 10 min alten Reifungsstadiums (kondensierte Phagosomen) wurde das Zellpellet schließlich für weitere 9,5 min mit 50 ml 37°C warmem Neff's Medium bei 30°C und 80 rpm inkubiert (*Chase*). Daraufhin wurden die Zellen erneut sedimentiert und in 20 ml eiskaltem Homogenisationspuffer (HG-Puffer) mit 1 x Inhibitorcocktail (s. Kap. 3.10) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Homogenisation der Zellen mit Hilfe des Ultra-Turrax (3-4 Mal für 1 min). Der Erfolg des Aufschlusses wurde mikroskopisch überprüft. Schließlich wurde die Suspension für 20-30 min auf einem Permanentmagneten inkubiert. Der Überstand mit zum einen Zelltrümmern und zum anderen Zellen ohne Phagosomen wurde (nach mikroskopischer Kontrolle) entfernt. Nach Zugabe von 5 ml 1 x Inhibitorcocktail in HG-Puffer erfolgte eine erneute Sedimentation auf dem Magneten. Nach drei Waschschrritten mit je 100 ml HG-Puffer wurden die Phagosomen in 1 ml HG-Puffer aufgenommen, in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C oder für längere Zeit bei -80°C gelagert.

4.13 Solubilisierung phagosomaler Proteine

Die Solubilisierung phagosomaler Proteine erfolgte mit Hilfe des nicht-ionischen Detergenz Triton X-114 nach der Methode von Bordier (Bordier 1981), wobei auf die Separation von Detergenz- und wässriger Phase verzichtet wurde. Auf diese Weise

lassen sich hydrophobe Proteine, zu denen viele Membranproteine gehören, anreichern (Bordier 1981).

Zunächst wurden 100 µl der isolierten Phagosomen (s. Kap. 4.12) mit 1,5 ml Lysispuffer (s. Kap. 3.10) versetzt. Es folgten drei Frier-Tau-Schritte. Dazu wurden die Reaktionsgefäße in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend auf 50°C erwärmt. Durch die starken Temperaturunterschiede erfolgt ein mechanischer Aufschluss der Phagosomen. Nach einer sich anschließenden 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Erfolg des Aufschlusses mikroskopisch überprüft. Schließlich wurden die magnetischen Kerne durch Zentrifugation entfernt (50 min, 20000 x g, 4°C) und der Überstand mit den gewonnenen Proteinen bei -80°C gelagert oder direkt nach der Konzentrationsbestimmung (s. Kap. 4.14) für die Proteinfällung (s. Kap. 4.15) genutzt.

4.14 BCA-Test

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde in der vorliegenden Arbeit der BCA-Test eingesetzt. Dieser zeichnet sich durch seine hohe Empfindlichkeit und geringe Störanfälligkeit aus und ist kompatibel mit vielen ionischen und nicht-ionischen Detergenzien. Der Nachweis beruht darauf, dass Proteine Cu^{2+} -Ionen in alkalischem Medium zu Cu^+ -Ionen reduzieren (Biuret-Reaktion). Das Cu^+ -Ion wird anschließend von zwei Molekülen Bicinchoninsäure (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure, *bicinchoninic acid*, BCA) komplexiert, wobei ein violetter Farbkomplex entsteht, dessen Absorption photometrisch bestimmt werden kann.

Zur Bestimmung der Konzentration der Proteinlösung wurde eine BSA-Eichgerade erstellt. Dazu wurde unter Verwendung der BSA-Stammlösung (2 mg/ml, s. Kap. 3.10) eine BSA-Lösung mit einer Konzentration von 250 µg/ml hergestellt.

Zu 100 µl von geeigneten Verdünnungen der BSA-Lösung bzw. der zu bestimmenden Proteinlösung wurden 900 µl BCA-Reagenz (Lösung C, s. Kap. 3.10) gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 60°C wurden die Proben auf Eis abgekühlt und anschließend sofort im UV-Vis Photometer (s. Tab. 1) bei einer Wellenlänge von 562 nm vermessen.

4.15 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Zur quantitativen Fällung von Proteinen wurden 400 µl Proteinlösung mit 1,5 ml 50 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 20000 x g (5 min, 4°C) wurde das entstandene Proteinpellet dreimal mit eiskaltem Diethylether gewaschen und schließlich in der Speedvac (s. Tab. 1) getrocknet. Die Proben wurden im Anschluss mittels MudPIT (s. Kap. 4.16) analysiert.

4.16 MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*)

Seit der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms wächst im Post-Genom-Zeitalter der Bedarf an Hochdurchsatz-Technologien für die Proteomanalytik. Standardmäßig werden recht komplexe Proteinmischungen über ein- oder zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D- oder 2D-PAGE) aufgetrennt und massenspektrometrisch charakterisiert (Wolters 2004). 2D-Gele zeigen jedoch in der täglichen Anwendung eine Reihe von Nachteilen: Es bedarf ein hohes Maß an handwerklichen Fähigkeiten, um gute und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (Wolters 2004). Weitere Schwierigkeiten liegen im Nachweis von Membranproteinen, sehr sauren oder sehr basischen Proteinen und *low-abundance* Proteinen (Wolters 2004).

Um diese Probleme zu umgehen, haben Yates *et al.* zur Analyse von Peptiden aus sehr komplexen Mischungen eine nicht Gel-basierende mehrdimensionale nano-LC (*liquid chromatography*)-Methode mit direkter MS-(Massenspektrometrie)-Kopplung entwickelt (Washburn *et al.* 2001; Wolters *et al.* 2001). Diese Methode ist heute unter dem Namen MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*) bekannt und erlaubt innerhalb von 24 h die Identifizierung von bis zu 1500 Proteinen (Washburn *et al.* 2001). Eine der wichtigsten Anwendungsgebiete für MudPIT ist die Analyse von Membranproteinen (Wu & Yates 2003). Die Trennung der Proteine erfolgt auf Peptidebene, wo Löslichkeitsprobleme, insbesondere von Membranproteinen, eine weitaus geringere Rolle spielen.

Alle Proteine eines interessierenden Proteoms werden isoliert und mit Proteasen wie Trypsin verdaut, wobei einige 100.000 Peptide entstehen können (s. Abb. 10). Diese komplexe Mischung wird anschließend zweidimensional mittels HPLC (*high*

performance liquid chromatography) aufgetrennt und die getrennten Peptide werden mittels Tandem-MS und Datenbank-Vergleich identifiziert.

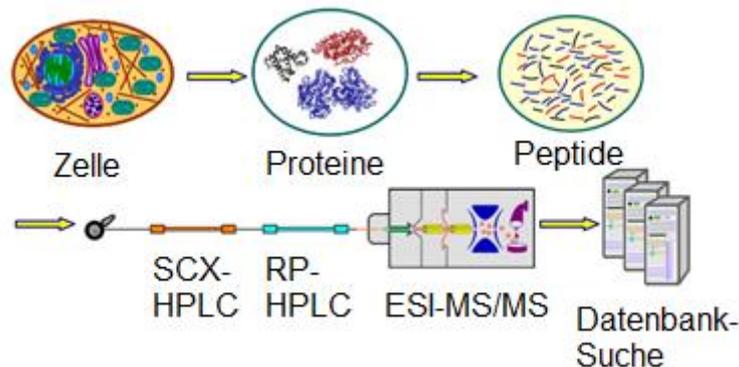


Abb. 10: Vorgehensweise bei der Hochdurchsatz-Identifizierung von Proteinen mittels MudPIT-Technologie (verändert nach http://www.uni-saarland.de/fak8/heinzle/de/teaching/Aufbaupraktikum_Bioinf/V8_Huber_Aufbau_Bioinfo_2008.pdf). Aus der Zelle isolierte Proteine werden mit Proteasen behandelt und die erhaltenen Peptide werden zweidimensional aufgetrennt. Die erste Dimension besteht aus einem Kationen-Austauscher (SCX-HPLC), die zweite aus einer Umkehrphasen (*reversed phase*)-Chromatographie (RP-HPLC). Es folgt eine *Electrospray*-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS), deren Ergebnisse mittels Datenbank-Abgleich die Identifizierung von bis zu 1500 Proteinen innerhalb von 24 h ermöglichen (Washburn *et al.* 2001).

Die erste Dimension der zweidimensionalen Chromatographie besteht aus einem starken Kationen-Austauscher (SCX-Säule) mit hohen Beladungskapazitäten. Im Anschluß findet in der zweiten Dimension eine Umkehrphasen (*reversed phase*)-Chromatographie statt, mit der effektiv Salze entfernt werden, so dass schließlich eine ESI-MS/MS (Electrospray-Ionisation Tandem-Massenspektrometrie) durchgeführt werden kann. Bei der Tandem-MS werden experimentell die Massen der erhaltenen Peptide bestimmt und diese mit Massen, die man durch *in silico*-Verdau aller in der DNA- oder Proteindatenbank enthaltenen Proteine erhält, verglichen. Da die verwendeten Enzyme die Proteine an spezifischen Stellen spalten, dient der für ein bestimmtes Protein charakteristische Satz an Peptiden als sogenannter *peptide fingerprint*. Um ein Protein mit hoher Genauigkeit identifizieren zu können, muss eine möglichst große Anzahl von Peptiden mit übereinstimmender Masse gefunden werden.

In der Arbeitsgruppe von Dirk Wolters (Biomolekulare Massenspektrometrie/Proteincenter, Ruhr-Universität Bochum), der die MudPIT-Technologie mitentwickelt

hat, wird ein sogenanntes Orbitrap-Massenspektrometer eingesetzt, das Proteine vollautomatisch identifiziert. Auch schwerlösliche Membranproteine, die als Markerproteine bei der Entstehung von Krebs und anderen Krankheiten gelten, kann das Gerät im Gegensatz zu älteren Modellen problemlos erkennen (s. <http://www.bionity.com/de/news/80609>).

Die gefällten und getrockneten Proteinpellets (s. Kap. 4.15) wurden von den Mitarbeitern der AG Wolters (Biomolekulare Massenspektrometrie/ Proteincenter, Ruhr-Universität Bochum) mittels MudPIT analysiert. Dabei wurde ein Protokoll verwendet, das sich für die Aufarbeitung von Membranproteinen eignet (B. Fränzel, AG Wolters, persönliche Mitteilung). Der Verdau erfolgte mit Trypsin/Chymotrypsin in Kombination in 60 % Methanol. Zuvor wurden die Proteine denaturiert und die Cysteinreste reduziert und alkyliert. Die erhaltene Peptid-Mischung wurde säulenchromatographisch (10 kDA *cut-off*) und schließlich mittels eines C18-Filter-Tips aufkonzentriert und gereinigt. Nach Ansäuerung der Proben wurden diese auf die SCX-Säule (Kationen-Austauscher, s. Abb. 10) geladen, wo geladene Peptide gebunden wurden, wohingegen ungeladene Peptide die Säule passierten und auf die zweite Säule (*reversed phase trap column*) gelangten. Von dieser Säule wurden die Peptide schließlich eluiert und auf eine analytische RP (*reversed phase*)-Säule (s. Abb. 10) geladen. Mittels eines RP-Gradienten erfolgte die Separation und Elution der Peptide, die direkt in das Tandem-Massenspektrometer geleitet wurden. Im nächsten Schritt wurde Salz einer bestimmten Konzentration auf die SCX-Säule injiziert, so dass weitere Peptide auf die RP *trap*-Säule gelangten, wo das Salz durch einen Waschschrift entfernt wurde. Die Peptide wurden ebenfalls mittels analytischer RP-Säule separiert, eluiert und durch MS analysiert. Die Salzkonzentration wurde schrittweise erhöht (Gradient von 0-200 mM), so dass mehrere Proteinidentifikationen aus jedem Salz-Schritt erhalten wurden.

4.17 RNA-Interferenz-Experimente

Als RNA-Interferenz (RNA_i) wird die gezielte Stilllegung von Genen (*gene silencing*) durch doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) bezeichnet (Hammond 2005). Dabei wird nicht nur die dsRNA selbst, sondern ebenso einzelsträngige RNA (ssRNA) mit

identischer Sequenz einschließlich endogener mRNA (*messenger RNA*) abgebaut (Shuey *et al.* 2002). Alternativ zu diesem spezifischen post-transkriptionellen Gen-*Silencing* (PTG) der homologen zellulären RNA kann es zur Stilllegung des Gens als Folge einer Inhibierung der Translation kommen (Hammond 2005).

RNA_i ist ein natürlicher, der Immunabwehr dienender Mechanismus in den Zellen von Eukaryoten. Der rasante Fortschritt in der Entwicklung neuer RNA_i-Methoden ermöglicht inzwischen die Stilllegung nahezu jeden Gens des menschlichen Genoms (Paddison & Hannon 2002). Für die Entdeckung des Mechanismus der RNA-Interferenz erhielten die US-Forscher Andrew Z. Fire und Craig C. Mello 2006 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten RNA_i-Experimente wurden 50 ml-Kulturen von *Tetrahymena*-Transformanten nach deren Selektion (s. Kap. 4.9.4) mit 10 ml-Vorkulturen in Neff's Medium, das 40 µg/ml Cycloheximid enthielt, angeimpft. Optional wurden die Zellen am nächsten Tag geerntet (1100 x g, 5 min) und in 10 mM Tris, pH 7.4 mit 40 µg/ml Cycloheximid erneut über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Neff's- bzw. Tris-Kultur optional auf eine Zellzahl von $2 \cdot 10^4$ Z/ml eingestellt, indem sie mit frischem Medium entsprechend verdünnt bzw. das Zellpellet nach der Ernte (1100 x g, 5 min) in einem entsprechenden Volumen aufgenommen wurde.

Anschließend erfolgte die Induktion des Cd-induzierbaren MTT1-Promotors (des Vektors, der in die Zellen transfiziert wurde, s. Kap. 4.9.3) durch Zugabe von Cadmiumchlorid (CdCl₂). Für Tris-Kulturen wurde eine Konzentration von 0,02-0,5 µg/ml CdCl₂ und für Neff's-Kulturen eine Konzentration von 0,1-1 µg/ml CdCl₂ eingesetzt (vgl. Kap. 5.5). Als Kontrolle diente je eine Kultur, der kein CdCl₂ zugesetzt wurde. Nach bestimmten Inkubationszeiten bei 30°C (0 min bzw. „vor Induktion“ bis zu 12 h, vgl. Kap. 5.5) wurden $2 \cdot 10^4$ Zellen entnommen, bei 14000 x g für 3 min bei 4°C pelletiert und die enthaltene RNA wie in Kap. 4.2.4 beschrieben isoliert, wobei die Elution in 30 µl RNase-freiem Wasser erfolgte.

Der darauffolgende Schritt bestand zunächst in einer One-Step RT-PCR (s. Kap. 4.6.4), wobei für jeden Ansatz 1 µl der eluierten RNA verwendet und das Ergebnis mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 4.4) analysiert wurde.

Alternativ zu diesem Schritt wurde eine RT-Reaktion (s. Kap. 4.5) und anschließend eine quantitative Real-Time-PCR (s. Kap. 4.6.5.2) durchgeführt.

Die RNAi-Experimente wurden zusätzlich mit dem Wildtyp CU427 (Negativkontrolle) durchgeführt (s. Kap. 5.5).

4.18 Analyse von Phänotypen

Die Analyse der Phänotypen von *Tetrahymena*-Transformanten erfolgte mikroskopisch. Kulturen der Transformanten bzw. des Wildtyps CU427 wurden mit geeigneten Cadmium-Mengen behandelt und nach einer bestimmten Inkubationszeit bei 30°C (vgl. Kap. 5.5) mit einem Tropfen Tusche (Pelikan; ca. 1:10 verdünnt mit Neff's Medium) versetzt. Nach einer Inkubation von 30 sek (vgl. *Pulse*, Kap. 4.12) wurden die Zellen mikroskopisch (Fluoreszenz Lifetime Imaging Mikroskop, s. Tab. 1) auf die Bildung von Phagosomen hin untersucht.

5 Ergebnisse und Diskussion

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Analysen, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, vorgestellt und diskutiert. Tab. 20 stellt eine Übersicht über alle untersuchten Proteine bzw. Gene dar und gibt an, mit welcher Methode die jeweilige Untersuchung erfolgte. Auf die Wahl der Proteine/Gene sowie die erhaltenen Ergebnisse wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

Zunächst wurden die notwendigen Methoden etabliert, um Phagosomen aus *T. thermophila* isolieren zu können (s. Kap. 5.1). Im Anschluss daran wurden die Gesamtproteine aus den stadienspezifischen Phagosomen gewonnen (s. Kap. 5.2).

Die Analyse des Gesamtproteoms naszenter (30 sek) und kondensierter (10 min) Phagosomen (s. Kap. 5.3) erfolgte mit Hilfe der multidimensionalen Protein-identifikationstechnologie (MudPIT: *Multidimensional Protein Identification Technology*). Hiermit sollte zunächst ein Überblick über die Proteine der phagosomalen Stadien gewonnen werden.

Einige der durch MudPIT identifizierten phagosomalen Proteine bzw. Gene (Tpp2/3/5/9p, s. Tab. 20) wurden anschließend mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR (qPCR) analysiert (s. Kap. 5.4). Dazu mussten zunächst die passenden, genspezifischen Primer sowie geeignete qPCR-Bedingungen entwickelt und getestet werden. Dann konnte im Anschluss das mRNA-Level von phagozytierenden Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (s. Tab. 20, Zeitpunkte RNA-Entnahme) betrachtet werden. Auf diese Weise konnte auf die Beteiligung der jeweiligen Proteine an der Phagozytose geschlossen werden.

Schließlich wurde die Funktion ausgewählter Gene (s. Tab. 20) untersucht, indem deren Expression durch RNA-Interferenz (RNA_i) herunterreguliert wurde. Auch hierbei galt es zunächst, die Methode zu etablieren und passende Konstrukte in die Zellen einzubringen. Die dabei erhaltenen Ergebnisse werden in Kap. 5.5 vorgestellt. Zuletzt wird auf die Auswirkungen der RNA-Interferenz auf den Phänotyp der Zelle eingegangen (s. Kap. 5.5.5).

Tab. 20: Übersicht über die Proteine bzw. Gene, die mit der jeweils angegebenen Methode analysiert wurden. Die Identifikationsnummer (*Tetrahymena thermophila* Gen-ID der Tetrahymena Genom Datenbank TGD) und die jeweils verwendete Bezeichnung sind angegeben. Außerdem sind der Tabelle die untersuchten Phagosomenstadien sowie die Zeitpunkte der RNA-Entnahme aus *T. thermophila*-Zellen (nach Induktion der Phagozytose) zu entnehmen.

Protein/Gen	T.t. Gen-ID	Bezeichnung	Analyse-methode	Phago-somen-stadium	Zeitpunkte RNA-Entnahme
Phagosomenproteom	-	-	MudPIT	30 sek	-
Phagosomenproteom	-	-	MudPIT	10 min	-
Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254043 130	130.m00077	Thpp2p	qPCR	-	0, 30 sek, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h
Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254609 50	50.m00189	Thpp3p	qPCR	-	0, 30 sek, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h
Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254549 129	129.m00110	Thpp5p	qPCR	-	0, 30 sek, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h
Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254707 159	159.m00051	Thpp9p	qPCR	-	0, 30 sek, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h

Tab. 20 – Fortsetzung:

Protein/Gen	T.t. Gen-ID	Bezeichnung	Analyse-methode	Phago-somen-stadium	Zeitpunkte RNA-Entnahme
Dynamamin central region family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254527 59	59.m00248	Drp1	RNAi	-	-
IQ calmodulin-binding motif family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254365 104	104.m00139	Cbp	RNAi	-	-
Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13 = Cathepsin L	13.m00464	Cth90	RNAi	-	-
PH domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8 = Vacuolar protein sorting/Chorein	8.m00549	Vps13	RNAi	-	-
Profilin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254716 7	7.m00567	Pff1	RNAi	-	-
Snare domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	34.m00271	Snare	RNAi	-	-

5.1 Isolierung und Reinigung von Phagosomen aus *T. thermophila*

Um Informationen bezüglich der Mechanismen des Phagozytoseprozesses auf molekularer Ebene zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit Änderungen des phagosomalen Proteoms in Abhängigkeit vom Reifungsgrad des Phagosoms untersucht. Dazu wurden Phagosomen eines definierten Alters aus *Tetrahymena thermophila* isoliert und hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung analysiert.

Die Isolierung von Phagosomen bestimmter Reifungsstadien (s. Kap. 4.12) erfolgte mit Hilfe der so genannten *Pulse-chase* Markierung, mit der reine Phagosomen mit einer Ausbeute von etwa 90 % erhalten werden (Voßkühler & Tiedtke 1993). Hierzu wurden zunächst magnetische, mit Stärke umhüllte Partikel – im Folgenden als Magnetobeads bezeichnet – hergestellt (s. Kap. 4.11). Diese etwa 1 µm großen Partikel besitzen einen Magnet-Kern aus Magnetit ($\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Fe}^{\text{III}})_2\text{O}_4$), welches zu den stärksten (ferri)magnetischen Mineralien zählt. Da *Tetrahymena* Partikel unspezifisch aufnimmt, können aus mit Magnetobeads gefütterten Zellen die neu gebildeten, nun magnetisch markierten Phagosomen mit Hilfe eines Permanentmagneten aus den aufgeschlossenen Zellen isoliert und von anderen (nicht-magnetischen) Zellbestandteilen gereinigt werden.

5.1.1 *Pulse-chase* Markierung von Phagosomen

Um Phagosomen eines definierten Reifungsstadiums zu isolieren (s. Kap. 5.1.2), wurden diese zunächst unter Verwendung eines von Voßkühler und Tiedtke etablierten Protokolls (Voßkühler & Tiedtke 1993) magnetisch markiert. Bei dieser so genannten *Pulse-chase* Markierung wird eine *Tetrahymena*-Kultur mit einer 10%igen Suspension magnetischer Partikel versetzt und für 30 Sekunden inkubiert. Während dieses kurzen Zeitraums (*Pulse*) bilden über 90 % der Zellen ein einzelnes magnetisch markiertes Phagosom, welches mikroskopisch deutlich zu erkennen ist (s. Abb. 11 A). Eine Prozessierung der gebildeten, naszenten Phagosomen bzw. die Abschnürung weiterer Phagosomen wird dadurch verhindert, dass die Kultur auf unter 8°C abgekühlt und somit die Membranfluidität herabgesetzt wird. Nicht-ingestierte Magnetobeads werden in einem Waschschrift entfernt. Um beispielsweise Phagosomen des 10 min

alten Reifungsstadiums (kondensierte Phagosomen, s. Abb. 11 B) zu erhalten, wird die Kultur für weitere 9,5 min in frischem Medium inkubiert (*Chase*). Da die Reifung der Phagosomen zeitlich synchron erfolgt, können je nach Inkubationszeit Phagosomen definierter Altersstadien in großer Menge und Reinheit gewonnen werden.

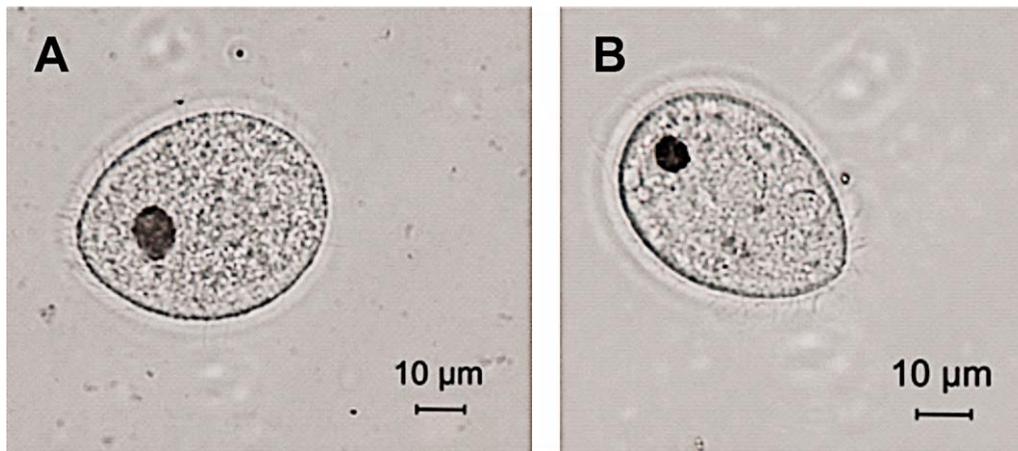


Abb. 11: Mikroskopische Aufnahmen einer *T. thermophila*-Zelle (Vergrößerung: 400 x). **A)** Zelle mit naszentem Phagosom (Stadium I). Die Abbildung zeigt exemplarisch, dass sich nach einer Inkubation der Kultur mit den Magnetobeads für 30 Sekunden (*Pulse*) in der Zelle genau ein naszentes Phagosom bildet, welches einen Durchmesser von fast 10 µm aufweist. **B)** Zelle mit kondensiertem Phagosom (Stadium III). Die Zellpopulation wurde nach dem *Pulse* für weitere 9,5 min inkubiert. Die 10 min alten, kondensierten Phagosomen weisen eine Größe von etwa 7 µm auf.

Ein Vergleich des naszenten Phagosoms (s. Abb. 11 A) mit dem kondensierten Phagosom (s. Abb. 11 B) zeigt, dass sich das kondensierte Phagosom bereits verkleinert hat, wodurch das ingestierte Material aufkonzentriert wird. Außerdem befindet sich das Phagosom bereits weiter am posterioren Ende der Zelle (vgl. Abb. 6). Es wird deutlich, dass mit Hilfe der *Pulse-chase* Markierung (Voßkühler & Tiedtke 1993) ein einzelnes, stadienspezifisches Phagosom pro Zelle erhalten werden konnte.

5.1.2 Reinigung und Isolierung von Phagosomen

In Abb. 12 ist schematisch das weitere Vorgehen bei der Phagosomenisolierung dargestellt. Nach der *Pulse-chase* Markierung (s. Kap. 5.1.1) wurden die Zellen mechanisch aufgeschlossen. Die stadienspezifischen Phagosomen konnten

anschließend mit Hilfe eines Permanentmagneten von Zelltrümmern und Zellen ohne Phagosomen abgetrennt werden.

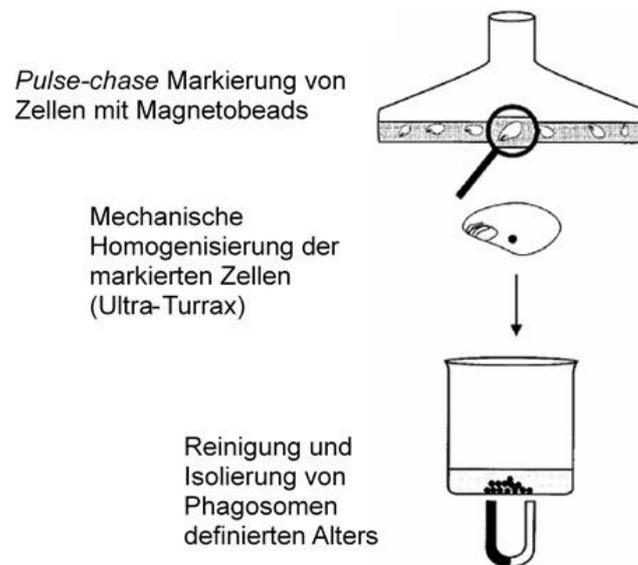


Abb. 12: Schematische Darstellung der Isolierung von Phagosomen definierten Alters aus *T. thermophila*. Die Zellen werden mit Magnetobeads gefüttert, was eine Isolierung der gebildeten, magnetisch markierten Phagosomen aus dem Zellhomogenisat mit Hilfe eines Permanentmagneten ermöglicht (Abbildung verändert nach Maicher & Tiedtke 1999).

Für die Phagosomenisolierung wurde der *Tetrahymena*-Stamm SB281 (s. Kap. 3.8.2) verwendet. Dieser weist eine defekte Exocytose von Mucocysten, die eine Kapselbildung bewirken und so die Zelllyse und Phagosomengewinnung erschweren würden, auf (Maihle 1985). Außerdem wurde zur Kultivierung der Zellen axenisches Neff's Medium (s. Kap. 3.9.2) eingesetzt, um zu gewährleisten, dass vor der Fütterung mit Magnetobeads keine Phagosomen gebildet werden. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass nur Phagosomen eines bestimmten Reifungsstadiums isoliert wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Isolierung von stadienspezifischen Phagosomen aus *T. thermophila* nach dem Verfahren der *Pulse-chase* Markierung (Voßkühler & Tiedtke 1993) erfolgreich durchgeführt werden konnte. Abb. 13 zeigt exemplarisch eine mikroskopische Aufnahme von präparierten, naszenten Phagosomen. Es wird deutlich, dass keine nennenswerten Kontaminationen durch z.B. intakte Zellen oder Zelltrümmer auftreten.

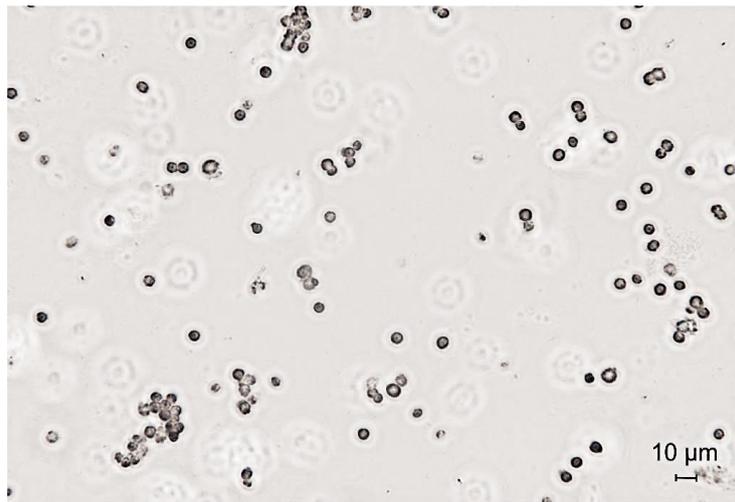


Abb. 13: Mikroskopische Aufnahme von nach dem *Pulse-chase* Verfahren isolierten Phagosomen (Vergrößerung: 200 x). Exemplarisch sind naszente Phagosomen gezeigt.

Die Phagosomenpräparationen wurden anschließend genutzt, um phagosomale Proteine zu gewinnen (s. Kap. 5.2), deren Analyse einen Überblick über die Proteinzusammensetzung von Phagosomen während der Cyclose geben sollte (s. Kap. 5.3).

5.2 Gewinnung stadienspezifischer, phagosomaler Proteine

Während in der als Cyclose bezeichneten Phase bis zur Auflösung des Phagosoms am Cytoprokt fusionieren phagosomale Vesikel mit anderen Vesikeln wie beispielsweise Lysosomen. In der Reifungsphase des Phagosoms werden viele unterschiedliche Proteine in die Vakuole sezerniert, um die aufgenommene Nahrung zu verdauen. Erstaunlicherweise sind nur sehr wenige dieser phagosomalen Proteine bekannt. Daher ist es von besonderem Interesse, die Proteinzusammensetzung in den verschiedenen Reifungsstadien nach Ausbildung des Phagosoms aus kleinen Membranvesikeln zu analysieren.

5.2.1 Wahl der Stadien

Um phagosomale Stadien festzulegen, deren Proteine in der vorliegenden Arbeit isoliert und charakterisiert werden sollten, wurde nach Stadien gesucht, deren

Proteinzusammensetzung von besonderem Interesse scheint. Da die Annahme nahe liegt, dass diese Stadien aufgrund ihrer regen Beteiligung an der Phagozytose starken Veränderungen hinsichtlich Proteingehalt und –zusammensetzung unterworfen sind, wurden die Ergebnisse anderer Studien herangezogen, um derartige Veränderungen und damit geeignete Stadien für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zu finden. Auf die Ergebnisse einer Studie von Maicher und Tiedtke (Maicher & Tiedtke 1999) sowie auf die Ergebnisse, die im Rahmen einer parallel in der Arbeitsgruppe durchgeführten Arbeit (V. Wittich, Dissertation, 2014) erhalten wurden, wird nachfolgend eingegangen.

Maicher und Tiedtke konnten mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese) und Silberfärbung zeigen, dass nach der Separation phagosomaler Membranproteine durch Triton X-114 in der Detergenzphase in naszenten und in 5 min alten kondensierten Phagosomen etwa 150 Proteine vorliegen, deren molekulare Masse einen Bereich von 10.000 bis 110.000 kDa abdeckt und deren isoelektrischer Punkt (pI) zwischen 4 und 7 liegt (Maicher & Tiedtke 1999). Der Vergleich der in naszenten und in kondensierten Phagosomen entdeckten Proteine (Maicher & Tiedtke 1999) zeigte, dass in kondensierten Phagosomen sowohl einige Spots bzw. Proteine hinzukommen als auch Proteine verlorengehen, wobei die Protein-Gesamtzahl in etwa gleich bleibt. Beispielsweise wurden drei Spots als spezifisch für kondensierte Phagosomen identifiziert (Maicher & Tiedtke 1999). Ähnliche Änderungen der Proteinzusammensetzung wurden auch in *Paramecium* beobachtet (Allen *et al.* 1995).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Maicher und Tiedtke ergab die von V. Wittich durchgeführte 2D-Gelelektrophorese-Analyse des phagosomalen Gesamtproteoms (s. Abb. 14) für naszente Phagosomen über 70 Spots, wohingegen in kondensierten Phagosomen (5 min) nur etwa 20 Spots verzeichnet wurden (V. Wittich, Dissertation, 2014). Diese deutlich geringere Anzahl an Spots im Vergleich zu den Ergebnissen von Maicher und Tiedtke ist möglicherweise auf die Nachweisgrenze der eingesetzten Färbemethode zurückzuführen. Zur Färbung der Proteine in den SDS-Gelen (V. Wittich, Dissertation, 2014) wurde kolloidales Coomassie-Brilliant-Blau (CBB) verwendet, welches mit ca. 5 ng Protein pro Bande (Kang *et al.* 2002) zwar eine

verbesserte Nachweisgrenze als das gewöhnliche CBB aufweist, welches im Vergleich zur Silberfärbung mit einer Nachweisgrenze von 0,1 ng bis 1 ng pro Bande (Rabilloud *et al.* 1988) jedoch weniger sensitiv ist. Dass die Proteinzahl den Ergebnissen von Maicher und Tiedtke nach in den beiden untersuchten Stadien etwa konstant bleibt, wohingegen sie den Ergebnissen von Wittich zufolge abnimmt, kann damit begründet werden, dass zum einen in der Detergenzphase angereicherte Membranproteine (Maicher & Tiedtke 1999) und zum anderen das gesamte phagosomale Proteom (V. Wittich, Dissertation, 2014) analysiert wurde, was einen Vergleich der Ergebnisse erschwert.

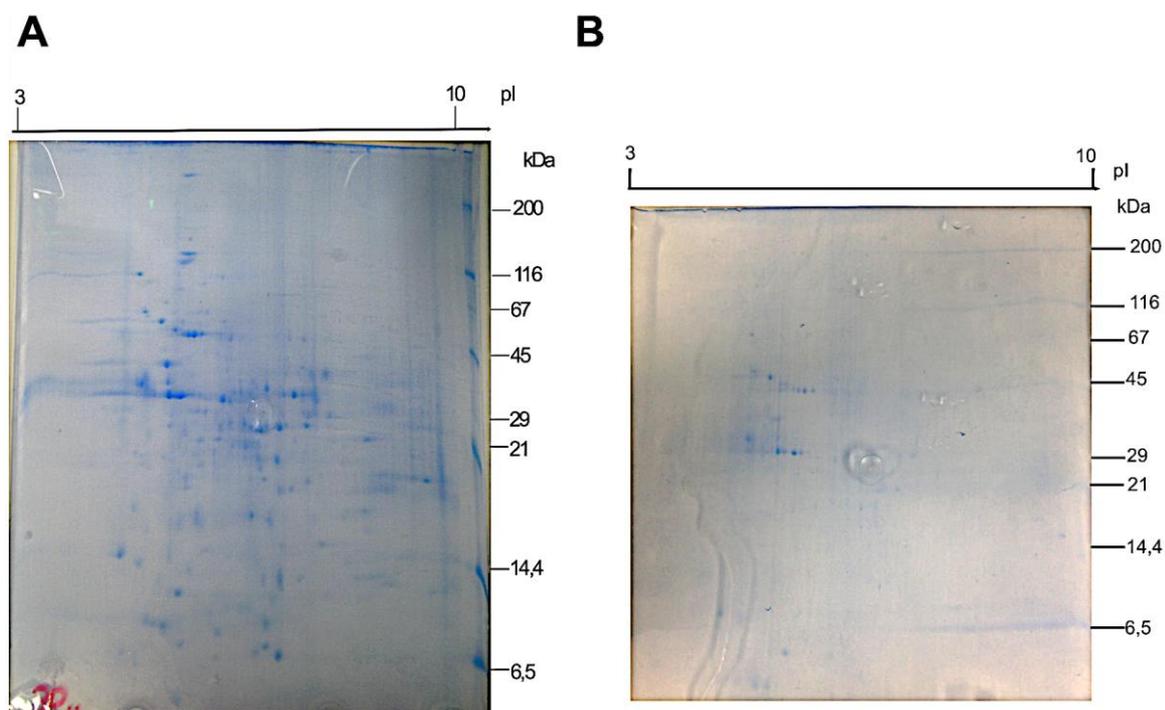


Abb. 14: Ergebnisse von 2D-Gelelektrophorese-Analysen von Proteinen aus **A)** naszenten Phagosomen (30 sek) und **B)** kondensierten Phagosomen (5 min). Die Analysen wurden von V. Wittich im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt (V. Wittich, Dissertation, 2014). Die erste Dimension bestand aus einer isoelektrischen Fokussierung unter Verwendung von IPG-Streifen, die pI-Werte von 3-10 abdeckten. Die zweite Dimension stellte eine weitere Auftrennung der Proteine durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese dar. Die Größe der Banden des verwendeten Markers ist angegeben. In naszenten Phagosomen wurden über 70 Spots (A), in kondensierten etwa 20 Spots (B) detektiert.

Es lässt sich festhalten, dass das sich ändernde Proteinmuster (Maicher & Tiedtke 1999) sowie die Abnahme der Proteinzahl beim Übergang von naszenten zu kondensierten Phagosomen (V. Wittich, Dissertation, 2014) einen Hinweis darauf

geben, dass der Zeitraum kurz nach der Abschnürung des Phagosoms mit Veränderungen der Proteinzusammensetzung einherzugehen scheint, deren nähere Analyse zum Verständnis des Phagozytoseprozesses beitragen können.

Aus diesem Grund wurde das Gesamtprotein zum einen aus naszenten Phagosomen und zum anderen von V. Wittich aus 5 min alten (V. Wittich, Dissertation, 2014) und im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus 10 min alten Phagosomen isoliert (s. Kap. 4.12) und charakterisiert (s. Kap. 5.3). Da sich die dabei angewandte Vorgehensweise von der von Maicher und Tiedtke (Maicher & Tiedtke 1999) unterscheidet, wird die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode nachfolgend im Zusammenhang mit den daraus resultierenden Ergebnissen dargestellt (s. Kap. 5.2.2).

5.2.2 Präparation der phagosomalen Proteine

Um sowohl lösliche als auch Membranproteine aus isolierten Phagosomen (s. Kap. 5.1) zu gewinnen, wurde das nicht-ionische Detergenz Triton X-114 verwendet. Dieses ermöglicht die Solubilisierung und Anreicherung hydrophober Proteine, zu denen viele Membranproteine gehören (Bordier 1981). Membranproteine scheinen im Hinblick auf Phagozytoseprozesse von besonderer Bedeutung zu sein, da diese beispielsweise Interaktionen mit anderen Vesikeln vermitteln. Auf eine Separation von Detergenzphase (hydrophobe Proteine) und wässriger Phase (Bordier 1981) wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da ein Überblick über die Gesamtheit der phagosomalen Proteine bestimmter Reifungsstadien gewonnen werden sollte.

Durch starke Temperaturunterschiede (Frier-Tau-Zyklen) wurden die Phagosomen mechanisch aufgeschlossen (s. Kap. 4.13) und die Konzentration der erhaltenen Proteinlösung wurde mit Hilfe des BCA-Tests (s. Kap. 4.14) bestimmt. Aus einer Phagosomenpräparation wurden etwa **0,3-0,5 mg Protein** erhalten.

Die stadienspezifischen, phagosomalen Proteine wurden mit Trichloressigsäure gefällt (s. Kap. 4.15), wobei ein Proteinpellet erhalten wurde, das einer Proteinmenge von etwa **100-200 µg** entsprach.

Um eine feinere Analyse als die 2D-Gelelektrophorese durchzuführen und auch Proteine mit geringer Abundanz detektieren zu können, wurden die Proteinpellets in Kooperation mit der Ruhr-Universität Bochum analysiert, worauf im folgenden Kapitel näher eingegangen wird (s. Kap. 5.3).

5.3 Proteinbiochemische Analyse phagosomaler Proteine

Bei der intrazellulären Verdauung in *T. thermophila* durch Phagozytose wird ein von einer Biomembran umgebenes Phagosom gebildet und nach seiner Abschnürung mit Säure und reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies angereichert. Die Entstehung und Reifung von Phagosomen geht mit der Interaktion des Phagosoms mit anderen Vesikeln einher (Smith-Somerville 1989). Die Veränderungen hinsichtlich des Proteingehalts und der Proteinzusammensetzung von Phagosomen, die mit diesen Interaktionen verbunden sind, sollten in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Um zunächst einen Überblick über die stadienspezifischen, phagosomalen Proteine zu erhalten, sollten die gewonnenen Proteine (s. Kap. 5.2) in einem proteinbiochemischen Ansatz analysiert werden. Hierzu wurde in Kooperation mit der Ruhr-Universität Bochum (AG Wolters, Biomolekulare Massenspektrometrie/ Proteincenter) eine im Jahr 2001 entwickelte Technik, die sogenannte *Multidimensional Protein Identification Technology* (MudPIT), angewandt (s. Kap. 4.16). Diese Technik ermöglicht durch die Kopplung von zweidimensionaler Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie die Identifizierung von Proteinen aus komplexen Mischungen, die zuvor mit Proteasen behandelt wurden, wobei auch Membranproteine, sehr saure oder sehr basische Proteine und *low-abundance* Proteine erfasst werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine aus Phagosomen zweier verschiedener Reifungsstadien untersucht. Zum einen handelte es sich um naszente Phagosomen (Phagosomenstadium I), also um Phagosomen, die direkt nach der Abschnürung vom Cytostom, d.h. nach dem *Pulse* von 30 sek (s. Kap. 4.12), isoliert wurden und zum anderen um kondensierte, 10 min alte Phagosomen (Phagosomenstadium III), die sich dadurch auszeichnen, dass das aufgenommene Material konzentriert im Zentrum des

Phagosoms vorliegt, was als Halo-Stadium bezeichnet wird (Elliott & Clemmons 1966; Baumert *et al.* 1998). Phagosomen des Stadiums III weisen eine hohe Aktivität lysosomaler Markerenzyme (Elliott & Clemmons 1966; Nilsson 1976; Voßkühler 1994) sowie mit pH 3,5-5 die niedrigsten pH-Werte des gesamten Phagosomenzyklus (Nilsson 1977b; Smith-Somerville 1989) auf.

Die einzelnen Schritte, die bei der in der vorliegenden Arbeit angewandten proteinbiochemischen Analyse der phagosomalen Proteine durchgeführt wurden, sind schematisch in Abb. 15 dargestellt. Das Pellet, das aus einer Phagosomenpräparation (s. Kap. 4.12) nach dem Phagosomenaufschluss und der Solubilisierung und TCA-Fällung (s. Kap. 4.13 und 4.15) erhalten wurde, wurde von den Mitarbeitern der AG Wolters nach einem Protokoll, das auch für Membranproteine geeignet ist, aufgearbeitet (B. Fränzel, AG Wolters, persönliche Mitteilung). Der Verdau der Proteine erfolgte mit einem Gemisch aus Trypsin und Chymotrypsin (s. Kap. 4.16).

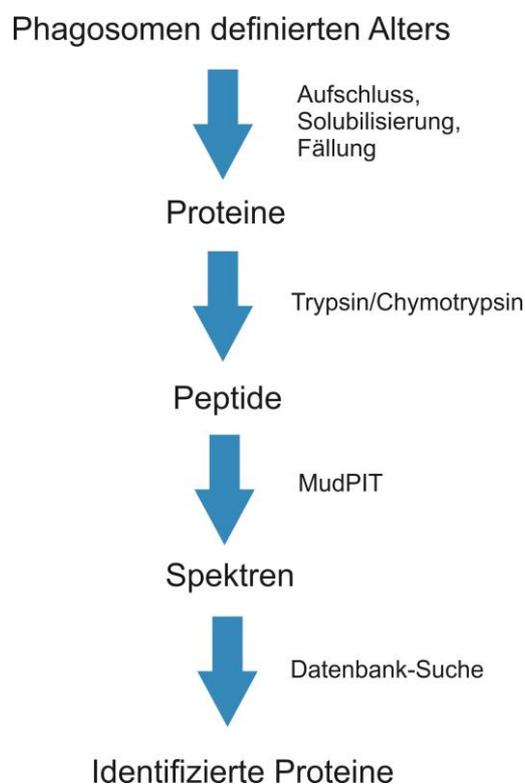


Abb. 15: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten proteinbiochemischen Analyse phagosomaler Proteine.

Pro untersuchtem phagosomalem Reifungsstadium wurden 3-4 MudPIT-Analysen durchgeführt, deren Ergebnisse nach einer Datenbank-Suche zur Identifikation der Proteine des jeweiligen Stadiums führten (s. Abb. 15).

Auf die Proteine, die im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten MudPIT-Analysen identifiziert wurden, wird im Folgenden ausführlich eingegangen (s. Kap. 5.3.1 bis 5.3.5).

5.3.1 Ergebnisse der MudPIT-Analyse

Um die bereits erhaltenen Ergebnisse anderer Studien zu verifizieren bzw. um weitere phagosomale Proteine zu identifizieren, wurden in der vorliegenden Arbeit naszente Phagosomen (30 sek) sowie Phagosomen des 10 min alten Reifungsstadiums mit Hilfe der multidimensionalen Proteinidentifikationstechnologie (MudPIT, s. Kap. 4.16) analysiert. Ziel hierbei war es außerdem, eine zeitliche Veränderung der phagosomalen Proteinzusammensetzung zu verfolgen, um so Aussagen über die Funktion der Proteine treffen zu können.

Die Identifikation der Proteine erfolgte durch einen Datenbankabgleich der durch MudPIT erhaltenen Peptid-Sequenzen. Hierbei wurden nur Proteine berücksichtigt, die durch mindestens zwei Peptide nachgewiesen wurden. Insgesamt wurden **888 Proteine** identifiziert, wobei diese entweder in nur einem Stadium oder in beiden Stadien nachgewiesen wurden.

Bei der MudPIT-Analyse wurden vier (30 sek alte Phagosomen) bzw. drei (10 min alte Phagosomen) unabhängig voneinander hergestellte Proben analysiert. Tab. 21 gibt einen Überblick über die Anzahl der erhaltenen Peptidsequenzen und der Proteinidentifikationen, die sich daraus ergaben.

Mit Hilfe der MudPIT-Analyse wurden in naszenten Phagosomen insgesamt, d.h. in den vier untersuchten Proben, 4023 Peptide gefunden, die zur Identifikation von **764 Proteinen** führten (s. Tab. 21, 30 sek). Hierbei wurden in einer der vier Proben durchschnittlich 290 Proteine nachgewiesen. Für Phagosomen des 10 min alten Reifungsstadiums wurden entsprechend durch den Datenbankabgleich von 3282

Peptiden **347 Proteine** identifiziert (s. Tab. 21, 10 min), wobei der Mittelwert der gefundenen Proteine pro Probe bei 218 liegt. Diese Zahlen machen deutlich, dass unterschiedliche Proben des gleichen Phagosomen-Stadiums voneinander abweichende Ergebnisse liefern. Aus diesem Grund wurden zum einen mehrere Proben analysiert und zum anderen wurde die Häufigkeit, mit der ein Protein in den drei bzw. vier Proben identifiziert wurde, überprüft und in den nachfolgenden Tabellen angegeben.

Tab. 21: Ergebnisse der MudPIT-Analyse. Nähere Erläuterungen: s. Text.

Stadium	Peptide	Proteine (alle Proben)	Proteine (1 Probe), Mittelwert
30 sek	4023	764	290
10 min	3282	347	218

Der Vergleich der MudPIT-Ergebnisse für naszente Phagosomen (764 Proteine) und für kondensierten Phagosomen (347 Proteine) zeigt, dass es beim Übergang von naszenten zu kondensierten Phagosomen zu einer deutlichen Abnahme der Proteinanzahl kommt. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der 2D-Gelelektrophorese (s. Abb. 14) überein und bestätigt die Annahme (s. Kap. 5.2.1), dass der Zeitraum kurz nach der Abschnürung des Phagosoms mit starken Veränderungen der Proteinzusammensetzung des Phagosoms verbunden ist.

Eine Auflistung aller durch MudPIT identifizierten Proteine stellt Tab. 38 dar. Diese befindet sich aufgrund der großen Datenmenge im Anhang.

Zur Verdeutlichung gibt Tab. 22 exemplarisch eine zufällige Auswahl der gefundenen Proteine (s. Tab. 38) an. Die Häufigkeit der Proteinidentifikation ist in Tab. 38 und Tab. 22 – wie auch in den nachfolgenden Tabellen – farblich dargestellt: Es wurden Proteine nachgewiesen, die in nur einer der untersuchten Proben (Rot), in zwei (Gelb), drei (Grün) oder sogar in vier Proben (Blau) vorkamen.

Die Ergebnisse der MudPIT-Untersuchungen (s. Tab. 38 bzw. Tab. 22) machen deutlich, dass an der Zusammensetzung des Phagosoms von *T. thermophila*

verschiedene Proteinklassen beteiligt sind. Zur Klasse der Hydrolasen zählen beispielsweise das Protein der Glycosylhydrolase-Familie 31 (53.m00242, Tab. 22) sowie das Protein der Papain-Familie (123.m00091, Tab. 22).

Tab. 22: Ergebnisse der proteinbiochemischen Analyse phagosomaler Proteine. Die Tabelle gibt exemplarisch eine zufällige Auswahl der identifizierten Proteine an. Die Proteinidentifikationen ergaben sich durch MudPIT-Analyse von naszenten (30 sek) und kondensierten (10 min) Phagosomen. Die Identifikationsnummer der Proteine bzw. der entsprechenden Gene (*Tetrahymena thermophila* Gen-ID) und die Häufigkeit, mit der die jeweiligen Proteine in den drei (10 min) bzw. vier Proben (30 sek) gefunden wurden, sind angegeben (Rot: 1 x, Gelb: 2 x, Grün: 3 x, Blau: 4 x).

<i>T.t.</i> Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
13.m00428	14-3-3 protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	√	
197.m00079	DnaK protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254457 197	√	√
56.m00261	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254565 56	√	√
53.m00242	Glycosyl hydrolases family 31 protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254395 53	√	
157.m00084	Histidine acid phosphatase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254673 157	√	√
154.m00075	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253984 154	√	√
48.m00304	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	√	√
18.m00332	Inorganic pyrophosphatase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254564 18	√	√
123.m00091	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254367 123	√	
80.m00124	Protein kinase domain <i>T. thermophila</i> chr_0 8254444 80	√	√
34.m00371	Ubiquitin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34		√

Proteine der einzelnen Komponenten des *Tetrahymena*-Phagosoms werden in Kap. 5.3.2 ausführlich vorgestellt.

5.3.2 Komponenten des *Tetrahymena*-Phagosomenproteoms

Die Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit durch MudPIT-Analysen identifizierten Proteine (s. Tab. 38) macht deutlich, dass das Phagosomenproteom von *T. thermophila* verschiedene Klassen von Proteinen beinhaltet. Hierzu gehören z.B. hydrolytische Enzyme oder Proteine, die eine Rolle beim Transport von Vesikeln spielen.

Nachfolgend werden Proteine der jeweiligen Klassen vorgestellt (s. Kap. 5.3.2.1 bis 5.3.2.4). Die Zahl der Peptide, die nach dem Trypsin/Chymotrypsin-Verdau (s. Kap. 4.16) erhalten wurde und zur Identifikation des jeweiligen Proteins führte, ist den jeweiligen Tabellen zu entnehmen (s. Tab. 23 bis Tab. 26).

Einige Proteine der jeweiligen Klassen wie beispielsweise Cathepsin L und Cathepsin B konnten bereits in anderen Studien als phagosomale Proteine identifiziert werden (Jacobs *et al.* 2006).

5.3.2.1 Hydrolasen

Tab. 23 gibt Proteine an, die in der vorliegenden Arbeit in 30 sek und in 10 min alten Phagosomen identifiziert wurden und die zur Klasse der Hydrolasen gehören.

Tab. 23: Mittels MudPIT-Analyse identifizierte Hydrolasen. Untersucht wurden naszente (30 sek) und kondensierte Phagosomen (10 min). Die Peptidzahl, die zur Identifikation des jeweiligen Proteins führte, sowie die Häufigkeit der Proteinidentifikation (Rot: 1 x, Gelb: 2 x, Grün: 3 x, Blau: 4 x) sind angegeben.

<i>T.t.</i> Gen-ID	Protein	30 sek (Peptidzahl)	10 min (Peptidzahl)
4.m00445	Cytosol aminopeptidase family, catalytic domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	4	
54.m00196	Eukaryotic aspartyl protease family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254593 54	15	16
53.m00242	Glycosyl hydrolases family 31 protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254395 53	3	
19.m00401	Glycosyl hydrolases family 38 protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254665 19 = α -Mannosidase	2	

T.t. Gen-ID	Protein	30 sek (Peptidzahl)	10 min (Peptidzahl)
157.m00084	Histidine acid phosphatase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254673 157	6	3
25.m00418	Histidine acid phosphatase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254600 25	2	
123.m00091	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254367 123 = Cth72 (Cathepsin 72)	2	
103.m00129	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253891 103 = Lysosomal phospholipase A1/Cathepsin L	4	
125.m00080	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254370 125 = Cathepsin L/Tetrain	3	
88.m00155	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254584 88 = Cysteine-proteinase	2	5
5.m00542	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5 = Cathepsin L-like protein	2	2
92.m00126	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254653 92 = Cathepsin B = Cth40	2	
13.m00464	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13 = Cathepsin L = Cth90	2	
4.m00578	Peptidase C13 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	3	
45.m00208	Phosphoesterase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254814 45	2	
45.m00209	Phosphoesterase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254814 45	2	
45.m00210	Phosphoesterase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254814 45	2	
1833.m00002	Phosphoesterase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8255700 1833	2	

Hierzu zählen vor allem die zur Papain-Familie gehörenden **Cathepsine** (123.m00091, 103.m00129, 125.m00080, 88.m00155, 5.m00542, 92.m00126, 13.m00464, s. Tab. 23), bei denen es sich um Endoproteasen handelt. Auffällig ist, dass die meisten durch die MudPIT-Analyse identifizierten Cathepsine in naszenten Phagosomen

nachgewiesen wurden (s. Tab. 23). Da es sich bei Cathepsinen aber um typische Komponenten von Phagolysosomen handelt (Turk *et al.* 2001; Eskelinen *et al.* 2003), deren höchste Aktivität während der Cyclose in Phagosomen des Stadiums IV (Phagolysosomen, s. Abb. 6), welches nach 30-60 min erreicht wird, festgestellt wurde (Voßkühler 1994), wäre die Identifikation von Cathepsinen vor allem in Phagosomen späterer Reifungsstadien zu erwarten gewesen.

Ebenfalls zu den Cathepsinen gehört die lysosomale **Phospholipase A₁** (103.m00129, s. Tab. 23). Es konnte bereits gezeigt werden, dass es sich hierbei um ein sekretorisches Protein von *Tetrahymena* handelt (Hartmann *et al.* 2000). Da es sehr unwahrscheinlich ist, dass bei der Phagosomenpräparation (s. Kap. 4.12) Proteine, die durch Sekretion in das Kulturmedium gelangten, gewonnen werden, deutet die Detektion dieses Proteins stark darauf hin, dass die lysosomale Phospholipase A₁ in Phagosomen lokalisiert ist.

Des Weiteren ist davon auszugehen, dass es sich bei der **Aspartatprotease** (54.m00196), die eindeutig in naszenten Phagosomen (15 Peptide) und 10 min alten Phagosomen (16 Peptide) nachgewiesen wurde (s. Tab. 23), um ein phagosomales Protein handelt, da zu den eukaryotischen Aspartatproteasen z.B. die saure Endopeptidase Pepsin sowie auch Cathepsine gehören.

Ein weiteres Enzym, das in 30 sek alten Phagosomen identifiziert wurde, ist das Protein der **Peptidasefamilie C13** (4.m00578, s. Tab. 23). Nach Angaben der Datenbank *MEROPS*, die Informationen über Peptidasen zur Verfügung stellt, gehört dieses Protein zur Legumain-Familie. Die Endopeptidase Legumain gehört zu den Cystein-Peptidasen und ist in Säugern in den Lysosomen aktiv (Deussing *et al.* 2002). Demnach ist anzunehmen, dass das in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Protein der Peptidasefamilie C13 ebenso eine Rolle bei der Phagozytose von *T. thermophila* spielt.

Schließlich ist die ebenfalls in naszenten Phagosomen gefundene **Amino-peptidase** (4.m00445, s. Tab. 23) als Protein des Phagosomenproteoms von *T. thermophila* anzusehen, da bereits gezeigt werden konnte, dass die Amino-peptidase N (CD13) in Phagozytoseprozesse in dendritischen Zellen und Makrophagen involviert ist (Villasenor-Cardoso *et al.* 2013).

Eine weitere Gruppe von an der Phagozytose beteiligten Hydrolasen bilden die **Protein-Histidin-Phosphatasen** (25.m00418 und 157.m00084, s. Tab. 23). Dass saure Phosphatasen – Phosphorsäureester-spaltende Hydrolasen, deren pH-Optimum im Sauren liegt – an Phagozytoseprozessen beteiligt sind, konnte bereits gezeigt werden (Eskelinen *et al.* 2003).

In naszenten Phagosomen konnten in der vorliegenden Arbeit außerdem einige Proteine der **Phosphoesterase-Familie** nachgewiesen werden (45.m00208/209/210 und 1833.m00002, s. Tab. 23). In Eukaryoten handelt es sich bei Vertretern dieser Proteinfamilie ebenfalls um saure Phosphatasen (vgl. <http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF04185>), die in Lysosomen vor allem bei der Apoptose eine entscheidende Rolle spielen. Den vorliegenden Ergebnissen nach scheinen diese Proteine in *Tetrahymena* jedoch lediglich im naszenten Phagosom vorhanden zu sein.

Schließlich wurden in naszenten Phagosomen zwei **Glycosidasen** (19.m00401 und 53.m00242, s. Tab. 23) gefunden. Diese dienen in Phagosomen dem Abbau von Polysacchariden, indem sie reversibel die Hydrolyse einer glycosidischen Bindung in einem Glycosid katalysieren. Von der α -Mannosidase (19.m00401) ist bekannt, dass ein Defekt des entsprechenden Gens zur lysosomalen Speicherkrankheit α -Mannosidose führt (Degasperi *et al.* 1991).

5.3.2.2 Membranproteine und Vesikeltransport

Mit Hilfe der durchgeführten MudPIT-Analyse (s. Kap. 4.16) von Proteinen aus naszenten und kondensierten *Tetrahymena*-Phagosomen konnte eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die wahrscheinlich mit der Phagosomenmembran assoziiert vorliegen bzw. die am Vesikeltransport beteiligt sind (s. Tab. 24).

Zu den membranassoziierten Proteinen zählen die in Tab. 24 angegebenen Untereinheiten der **V-ATPase** (Vacuolar-type H⁺-ATPase): Untereinheit A (34.m00342), B (67.m00170) und d (48.m00253) sowie die 116 kDA Untereinheit (39.m00240). V-ATPasen wurden in Membranen verschiedener Organellen wie Endosomen oder Lysosomen gefunden. Sie sind für die Entstehung und Aufrechterhaltung des sauren Milieus in Phagolysosomen verantwortlich (Kawasaki-Nishi *et al.* 2003).

Tab. 24: Mittels MudPIT-Analyse identifizierte Proteine, die wahrscheinlich mit der Phagosomenmembran assoziiert bzw. am Vesikeltransport beteiligt sind. Untersucht wurden naszente (30 sek) und kondensierte Phagosomen (10 min). Die Peptidzahl, die zur Identifikation des jeweiligen Proteins führte, sowie die Häufigkeit der Proteinidentifikation (Rot: 1 x, Gelb: 2 x, Grün: 3 x, Blau: 4 x) sind angegeben.

T.t. Gen-ID	Protein	30 sek (Peptidzahl)	10 min (Peptidzahl)
38.m00287	AAA family ATPase, CDC48 subfamily protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254813 38	3	10
112.m00133	ABC transporter family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254104 112	7	
162.m00063	ABC transporter family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254576 162		2
105.m00144	Beige/BEACH domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253915 105	2	
235.m00033	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254092 235	2	
68.m00136	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254385 68	2	
61.m00206	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254446 61		2
46.m00214	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254475 46	3	
73.m00204	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254486 73		2
203.m00051	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254505 203		2
2.m02053	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	2	
113.m00092	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254377 113	2	
66.m00157	Elongation factor Tu GTP binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253811 66	2	
37.m00185	GAT domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254756 37	3	7
136.m00115	Guanylate-binding protein, N-terminal domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254712 136	2	

T.t. Gen-ID	Protein	30 sek (Peptidzahl)	10 min (Peptidzahl)
8.m00549	PH domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8 = Vps13 (Vacuolar protein sorting)/ Chorein	2	
17.m00380	Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254815 17	3	
247.m00044	Ras family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254002 247 = Rab62	2	
5.m00586	Ras family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5 = Rab6C	2	
34.m00271	Snare domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	2	
13.m00284	Vacuolar protein sorting 36 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	3	
39.m00240	V-type ATPase 116kDa subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254777 39	2	
34.m00342	V-type ATPase, A subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	9	6
67.m00170	V-type ATPase, B subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67	12	
48.m00253	Vacuolar ATP synthase, subunit d (C/AC39) <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	2	

Die beiden **ABC-Transporter-Proteine** (112.m00133, 162.m00063, s. Tab. 24) stellen membranständige ATPasen dar und gehören demnach ebenso zu den membranassoziierten Proteinen. ABC-Transporter besitzen als gemeinsames Strukturelement eine ATP-bindende Kasette (ABC: *ATP Binding Cassette*) und transportieren spezifische Substrate aktiv über die Zellmembran. Eine Funktion von ABC-Transportern in der Phagozytose konnte für vielzellige Organismen bereits bestätigt werden (Bared *et al.* 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnten außerdem zwei Rab-Proteine identifiziert werden (Rab62 und Rab6C, s. Tab. 24). Diese gehören zu den Proteinen, die wahrscheinlich an der Reifung des Phagosoms beteiligt sind, indem sie Prozesse wie den

Vesikeltransport und die Fusion von Membranen vermitteln. Bei Rab-Proteinen handelt es sich um kleine **GTPasen**, die während der Entstehung von Phagolysosomen an der Interaktion naszenter Phagosomen mit frühen und späten Endosomen beteiligt sind (Stenmark & Olkkonen 2001; Scott *et al.* 2003).

Neben den beiden Rab-Proteinen, wurde ein weiteres Protein (*Elongation factor Tu GTP binding domain containing protein*, s. Tab. 24) identifiziert, das nach Angaben der *Tetrahymena* Genom-Datenbank (TGD) ebenfalls GTPase-Aktivität besitzt.

Des Weiteren gilt das *EF hand family*-Protein (113.m00092, s. Tab. 24) als GTPase-Aktivator (TGD). Schließlich stellt das Guanylat-bindende Protein (136.m00115, s. Tab. 24) eine Interferon-induzierte GTPase und damit eine Schlüsselkomponente der Immunabwehr mikrobieller und viraler Pathogene dar (Naschberger *et al.* 2006).

Neben den GTPasen sind auch **ATPasen** an Membranfusionsvorgängen beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde in naszenten, insbesondere aber auch in kondensierten Phagosomen, eine ATPase der AAA (*ATPases Associated to a variety of cellular Activities*)-Familie identifiziert, die zur Unterfamilie CDC48 gehört (38.m00287, s. Tab. 24). AAA-Proteine weisen eine große Diversität zellulärer Funktionen auf. Neben Aufgaben wie beispielsweise der Regulation des Zellzyklus erfüllen sie Funktionen beim Vesikel-vermittelten Transport (Confalonieri & Duguet 1995), wobei sie sowohl die heterotypische Fusion von Membranvesikeln mit der Zielmembran als auch die homotypische Fusion von Membranen, die aus denselben Kompartimenten stammen, vermitteln. Zur homotypischen Membranfusion zählen beispielsweise Fusionsvorgänge des Endoplasmatischen Retikulums (Latterich *et al.* 1995). CDC48 ist in bestimmte Membranfusionsvorgänge involviert und übernimmt eine Rolle, die der der AAA-ATPase NSF (*N-ethylmaleimide sensitive fusion protein*) ähnelt (Söllner *et al.* 1993; Rothman 1994).

Das Protein mit der Gen-Identifikationsnummer 105.m00144 (s. Tab. 24), das eine **BEACH** (*Beige and Chediak-Higashi syndrome*)-Domäne beinhaltet, ist vermutlich ebenfalls für den Transport von Vesikeln zuständig. Beim Chediak-Higashi-Syndrom (CHS) handelt es sich um eine seltene Erbkrankheit, die sich neben anderen Symptomen durch partiellen Albinismus und Immunstörungen auszeichnet (Introne *et al.* 1999). Charakteristisch ist in diesem Zusammenhang zum einen die Präsenz sehr

großer Lysosomen und zum anderen ein Defekt in der Sekretion lysosomaler Enzyme, was zu der Annahme führte, dass die BEACH-Domäne in die Regulation des Lysosomentransports involviert ist (Wang *et al.* 2002). Mittels einer Funktionsanalyse von sechs *Dictyostelium* BEACH-Proteinen (LvsA-F) konnte für LvsB eine Rolle beim Transport von Lysosomen nachgewiesen werden (Wang *et al.* 2002).

Ein weiteres Protein, welches zur Kategorie der am Vesikeltransport beteiligten Proteine gehört, ist das **Vps13**-Protein (*Vacuolar protein sorting*)/Chorein (8.m00549, s. Tab. 24). Dieses Protein ist für den Vesikeltransfer zwischen dem *trans*-Golgi-Netzwerk und dem Lysosom zuständig (Lemmon & Traub 2000).

Als weitere Komponenten des Phagosomenproteoms wurden einige Proteine der **Dynein heavy chain** – Familie (s. Tab. 24) gefunden. Auffällig hierbei ist, dass das jeweilige Protein entweder in naszenten oder in kondensierten Phagosomen, nicht jedoch in beiden Stadien gleichzeitig vorzukommen scheint (s. Tab. 24). Die schweren Proteinketten (*Dynein heavy chain*) bilden mit weiteren Bestandteilen das Dynein – ein Motorprotein eukaryotischer Zellen. Dyneine sind in Kooperation mit anderen Motorproteinen wie Myosin wesentlich am intrazellulären Transport von biologischen Lasten wie z.B. Biomakromolekülen, Vesikeln und Zellorganellen beteiligt. Zu den Vesikeln, die transportiert werden, zählen die des Endoplasmatischen Retikulums sowie die von Endosomen und Lysosomen (Karp 2005). Das Dynein-Protein selbst besteht aus einer Kopfregion, welche an Mikrotubuli binden kann, sowie einem Schwanzteil, der mit anderen Proteinen interagiert. Der Dyneinkomplex bindet ein zu transportierendes Molekül und “wandert” entlang eines Mikrotubulus (Campbell & Reece 2003).

Ebenfalls zur Kategorie der Proteine, die beim intrazellulären Membrantransport in eukaryotischen Zellen eine Rolle spielen, zählen **Snare** (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor*) – Proteine (Rossi *et al.* 2004). Von diesen konnte durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte MudPIT-Analyse eines in naszenten Phagosomen identifiziert werden (34.m00271, s. Tab. 24). Snare-Proteine sind integrale Membranproteine (v-Snares auf Vesikeln, t-Snares auf Zielorganellen), die die Spezifität des Fusionsprozesses sicherstellen (Söllner *et al.*

1993; Nichols *et al.* 1997). Ein Protein mit struktureller Homologie zur Snare-Familie stellt das in beiden Phagosomenstadien vorkommende Protein, das eine **GAT** (*GGA and Tom1*) – Domäne enthält, dar (37.m00185, s. Tab. 24). Die Tatsache, dass GAT-Domänen die gleiche Dreihelixbündel-Struktur wie Snare-Proteine aufweisen, lässt darauf schließen, dass sie ebenfalls an Membranfusionsprozessen beteiligt sind. Proteine der GGA (*Golgi-localized, γ -ear-containing and ARF-binding*) – Familie spielen eine entscheidende Rolle beim Transport von CCVs (*Clathrin-coated vesicles*) zwischen dem *trans*-Golgi-Netzwerk und den Endosomen (Boman *et al.* 2000) sowie wahrscheinlich bei der Endocytose, da gezeigt werden konnte, dass GGAs mit frühen Endosomen assoziieren (Puerollano & Bonifacino 2004). Puertollano und Bonifacino gehen davon aus, dass GGAs an der Sortierung von ubiquitinylierten Lasten beteiligt sind (Puerollano & Bonifacino 2004).

Zuletzt sei die Identifikation eines Proteins der **Phosphatidylinositol 3- und 4-Kinase** – Familie erwähnt (17.m00380, s. Tab. 24). Von den Produkten der Phosphatidylinositol 3-Kinasen wird angenommen, dass sie eine Rolle beim Membrantransport während der Endocytose sowie bei der Phagosomenreifung spielen (Vieira *et al.* 2002).

5.3.2.3 Calmodulin und Ca²⁺/Calmodulin-bindende Proteine

Die in dieser Arbeit identifizierten Proteine, die in die Kategorie „Calmodulin und Ca²⁺/Calmodulin-bindende Proteine“ gehören, sind Tab. 25 zu entnehmen.

Zu dieser Kategorie gehören die beiden **P-ATPasen** des SERCA- (225.m00058, s. Tab. 25) bzw. des PMCA-Typs (105.m00112, s. Tab. 25). Diese P-ATPasen transportieren Calcium von einer Seite der Zellmembran oder Organell-Membran zur anderen.

Weitere identifizierte Proteine, die der Kategorie „Calmodulin und Ca²⁺/Calmodulin-bindende Proteine“ zugeordnet werden können, stellen die beiden Proteine der **EF-Hand**-Familie – CAM1 (CAIModulin, 89.m00157) und TCB2 (*Tetrahymena Calcium-Binding protein*, 4.m00502) – dar (s. Tab. 25).

Tab. 25: Mittels MudPIT-Analyse identifizierte Proteine der Kategorie „Calmodulin und Ca²⁺/Calmodulin-bindende Proteine“. Untersucht wurden naszente (30 sek) und kondensierte Phagosomen (10 min). Die Peptidzahl, die zur Identifikation des jeweiligen Proteins führte, sowie die Häufigkeit der Proteinidentifikation (Rot: 1 x, Gelb: 2 x, Grün: 3 x, Blau: 4 x) sind angegeben.

T.t. Gen-ID	Protein	30 sek (Peptidzahl)	10 min (Peptidzahl)
105.m00112	Calcium-translocating P-type ATPase, PMCA-type family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253915 105	2	5
225.m00058	Calcium-translocating P-type ATPase, SERCA-type family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254469 225	5	
89.m00157	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254470 89 = CAM1 (CALModulin)	2	
4.m00502	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4 = TCB2 (<i>Tetrahymena</i> Calcium-Binding protein)	14	7
104.m00139	IQ calmodulin-binding motif family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254365 104	3	
202.m00059	IQ calmodulin-binding motif family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254779 202	2	
96.m00145	Translation elongation factor EF-1, subunit alpha <i>T. thermophila</i> chr_0 8254435 96	17	30

Des Weiteren wurde der eukaryotische Elongationsfaktor **EF-1 α** (96.m00145, s. Tab. 25) identifiziert, von dem bekannt ist, dass er Calmodulin bindet und dass diese Bindung für die Phagosomenbildung wichtig ist (Gonda *et al.* 2000). Neben seiner Rolle bei der Translation scheint er als Calmodulin-bindendes Protein ebenfalls eine Rolle bei der Regulation des Aktin-Cytoskeletts zu spielen (Rasmussen & Wiebe 1999; Gross & Kinzy 2005).

Schließlich konnten in naszenten Phagosomen zwei **Calmodulin-bindende Proteine** identifiziert werden (*IQ calmodulin-binding motif family proteins*, 104.m00139 und 202.m00059, s. Tab. 25).

Da die sogenannte „oral deep fiber“, die als „Vesikel-Highway“ gilt, und nahegelegene Strukturen Bereiche sind, in denen Calmodulin und Calmodulin-bindende Proteine lokalisiert sind und da eine Inhibierung der Calmodulin-Aktivität sowie des Calcium-Signal-Wegs die Bildung von Phagosomen blockiert, scheinen Calmodulin und

Ca²⁺/Calmodulin-bindende Proteine bei *T. thermophila* in den Phagozytoseprozess involviert zu sein (Voßkühler & Tiedtke 1993; Gonda *et al.* 1999; Maicher & Tiedtke 1999; Gonda *et al.* 2000; Moya & Jacobs 2006).

5.3.2.4 Weitere Phagosomenproteine

Weitere Proteine, die durch die proteinbiochemische Analyse in der vorliegenden Arbeit in naszenten und 10 min alten Phagosomen identifiziert werden konnten und die potentiell an der Phagozytose in *T. thermophila* beteiligt sind, sind in Tab. 26 angegeben.

Hierzu gehört das Protein mit der Gen-Identifikationsnummer 97.m00156 (s. Tab. 26), das eine **ENTH** (*Epsin NH2-Terminal Homology*) – Domäne, d.h. ein Modul, das aus einer Superhelix von α -Helices besteht und mit Membrankomponenten interagiert, besitzt (Camilli *et al.* 2002). Diese Domäne, die sich am N-Terminus von Proteinen befindet, fungiert unter anderem als Adapterprotein in der Endocytose und weist strukturelle Ähnlichkeiten zur VHS-Domäne auf, die am Transport von Membranen beteiligt ist, wobei die Membraninteraktion unter anderem durch Phosphoinositide reguliert wird (Camilli *et al.* 2002). Da sich ENTH-Domänen häufig in Proteinen befinden, die Komponenten der Clathrin-Hülle binden (Camilli *et al.* 2002), scheint das identifizierte ENTH-Domänen-Protein (97.m00156, s. Tab. 26) vor allem an der rezeptorvermittelten Endocytose, bei der Clathrin-umhüllte Vesikel gebildet werden, beteiligt zu sein.

Neben dem **Phagosomenprotein 1** (45.m00225, Php1), welches in beiden untersuchten Phagosomenstadien identifiziert wurde, wurde in naszenten Phagosomen außerdem das **Phagosomenprotein 2** (81.m00185, Php2) gefunden (s. Tab. 26). Dieses Protein ist nach Angaben der *Tetrahymena*-Datenbank (TGD) in neu gebildeten Phagosomen lokalisiert.

Weitere Kandidaten mit potentieller Funktion in der Phagozytose sind Proteine, die eine **SPFH** (Stromatin, Prohibitin, Flotillin, HfIK/C) – Domäne enthalten. In naszenten Phagosomen konnten zwei dieser Proteine nachgewiesen werden (42.m00234 und 62.m00225, s. Tab. 26). SPFH-Domänen-enthaltende Proteine wurden in Lipid Rafts –

Mikrodomänen in Zellmembranen mit bestimmter Lipid-Zusammensetzung – in diversen zellulären Membranen gefunden (Browman *et al.* 2007). Obwohl die Aufklärung der Aufgaben dieser Proteine noch nicht weit fortgeschritten ist, konnte kürzlich eine potentielle Funktion von SPFH-Domänen bei der Bildung von Membran-Mikrodomänen sowie bei Lipid Raft – assoziierten Prozessen wie der Endocytose nachgewiesen werden (Browman *et al.* 2007).

Tab. 26: Weitere mittels MudPIT-Analyse identifizierte Proteine, die potentiell an der Phagozytose in *T. thermophila* beteiligt sind. Untersucht wurden naszente (30 sek) und kondensierte Phagosomen (10 min). Die Peptidzahl, die zur Identifikation des jeweiligen Proteins führte, sowie die Häufigkeit der Proteinidentifikation (Rot: 1 x, Gelb: 2 x, Grün: 3 x, Blau: 4 x) sind angegeben.

T.t. Gen-ID	Protein	30 sek (Peptidzahl)	10 min (Peptidzahl)
97.m00156	ENTH domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254402 97	2	
45.m00225	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254814 45 = Phagosome protein 1 (Php1/P28p)	7	4
81.m00185	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254580 81 = Phagosome protein 2 (Php2)	9	
42.m00234	SPFH domain / Band 7 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254719 42	2	
62.m00225	SPFH domain / Band 7 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253815 62	2	

In den beiden nachfolgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der MudPIT-Analyse (s. Tab. 38) sowohl mit den Ergebnissen der Studie von Jacobs *et al.* (Jacobs *et al.* 2006) als auch mit den Ergebnissen einer Datenbank-Suche verglichen (s. Kap. 5.3.3 und 5.3.4).

5.3.3 Vergleich der MudPIT-Ergebnisse mit der Jacobs-Studie

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Phagosomen stadienspezifisch in Bezug auf ihren Proteingehalt zu untersuchen, um auf diese Weise Aussagen darüber treffen zu

können, welche Proteine zu welchem Zeitpunkt der Cyclose eine Funktion in der Phagozytose besitzen.

Das Phagosomenproteom von *Tetrahymena thermophila* wurde zum Teil bereits in einer Studie von Jacobs *et al.* mittels Nano-LC-MS/MS-Analyse untersucht (Jacobs *et al.* 2006). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit ging es hierbei vor allem darum, die Gesamtheit phagosomaler Proteine zu erfassen. Aus diesem Grund wurden in der Studie von Jacobs *et al.* Proteine analysiert, die mit Hilfe von vier verschiedenen Methoden behandelt wurden (Triton X-100 Extraktion, SDS-Extraktion, Frier-Tau-Zyklen sowie SDS-PAGE). Außerdem wurden Phagosomen aus Zellen, die für 15, 30 und 60 min mit Latex-Beads gefüttert wurden, präpariert und vor der Analyse vereint (Jacobs *et al.* 2006).

Um eine Bewertung der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen MudPIT-Ergebnisse vornehmen zu können, werden diese im Folgenden mit den zuvor vorgestellten Ergebnissen der Jacobs-Studie verglichen (s. Kap. 5.3.3.1 und 5.3.3.2).

5.3.3.1 Jacobs-Studie

Jacobs *et al.* fanden in *T. thermophila* 453 nicht-redundante Peptide, die durch einen Datenbankabgleich (*Tetrahymena* Genome Database, s. Kap. 3.14) 183 Proteine oder vorhergesagte Proteine (*predicted proteins*) lieferten (Jacobs *et al.* 2006). Mittels Blastp-Suche (GenBank, e-Wert: $< 10^{-7}$ als Grenze für signifikante Sequenzübereinstimmungen) wurden für 153 der 183 identifizierten Proteine in *Tetrahymena* Homologe in anderen Organismen gefunden. 73 Proteine wurden als "starke Kandidaten" für Komponenten des *Tetrahymena*-Phagosoms eingestuft. 52 % dieser Proteine wurden außerdem durch mindestens zwei der verschiedenen Ansätze erhalten. Insgesamt 25 Proteine blieben als ribosomale bzw. als DCG (*dense core granule*)-Proteine unberücksichtigt, da diese zu abundanten zellulären Proteinen der beiden jeweiligen Organellen zählen (Doudna & Rath 2002; Bowman *et al.* 2005) und somit als Kontaminationen angesehen werden.

Von den 73 von Jacobs *et al.* identifizierten Proteinen ergaben 61 Proteine signifikante Treffer in der Blastp-Analyse. Die übrigen 12 Proteine ohne größere Übereinstimmungen wurden als neue Proteine mit unbekannter Funktion von Jacobs *et al.* als Tpp (**T***etrahymena* **p**hagosomal **p**roteome)-Proteine bezeichnet (Jacobs *et al.* 2006).

Im Phagosomenproteom der Maus (Garin *et al.* 2001) und von *Entamoeba histolytica* (Okada *et al.* 2005) konnten Proteine nachgewiesen werden, die 34 % der in *Tetrahymena* (Jacobs *et al.* 2006) identifizierten Proteine ähneln, was dafür spricht, dass es sich bei den von Jacobs und Mitarbeitern identifizierten Proteinen um phagosomale Proteine handelt. Dennoch wurden auch einige vermutlich nicht-phagosomale Proteine wie das Oberflächenantigen SerH3p (Doerder & Hallberg 1989) und die nukleären Proteine H2B2 und H4 (Medzihradszky *et al.* 2004) gefunden (Jacobs *et al.* 2006). Es ist davon auszugehen, dass die Identifikation dieser Proteine vielmehr auf das vermehrte Vorkommen in der Zelle als auf eine Beteiligung an der Phagozytose zurückzuführen ist. Um dies eindeutig zu klären, sind weitere Analysen nötig, die entweder eine phagosomale Lokalisation der entsprechenden Proteine oder ihre Funktion im Phagozytoseprozess belegen.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die bisher untersuchten Phagosomenproteome sicherlich nicht vollständig aufgeklärt wurden. Zwar wurde in verschiedenen Organismen eine ähnliche Anzahl an phagosomalen Proteinen gefunden (Maus: ca. 140 [Garin *et al.* 2001], *Entamoeba histolytica*: 85 [Okada *et al.* 2005], *Tetrahymena*: 73 [Jacobs *et al.* 2006]) und viele der identifizierten Proteine wurden übereinstimmend in mehreren Organismen nachgewiesen, es wurden allerdings ebenso Proteine in nur einem der genannten Organismen gefunden.

5.3.3.2 Vergleich der identifizierten Proteine

Die folgende Tabelle gibt 43 Proteine an, die in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten MudPIT-Analysen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Studie von Jacobs *et al.* (Jacobs *et al.* 2006) gefunden wurden (s. Tab. 27). Dass demnach über die Hälfte der 73 von Jacobs *et al.* nachgewiesenen putativen

Phagosomenproteine in der vorliegenden Studie ebenfalls identifiziert wurden, deutet darauf hin, dass es sich bei den gefundenen Proteinen auch tatsächlich um phagosomale Proteine handelt.

Tab. 27: Identifizierte Proteine in 30 sek und 10 min alten Phagosomen, die in der vorliegenden Arbeit mittels MudPIT in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Jacobs *et al.* gefunden wurden (Rot: 1 x, Gelb: 2 x, Grün: 3 x, Blau: 4 x).

T.t. Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
18.m00476	14-3-3 protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254564 18	√	
57.m00235	60s Acidic ribosomal protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254403 57 = Tpp16p	√	√
160.m00088	Acetyl-CoA acyltransferases family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254543 160	√	√
31.m00346	Acyl carrier protein reductase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31 = Peroxisomal multifunctional enzyme	√	√
225.m00058	Calcium-translocating P-type ATPase, SERCA-type family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254469 225	√	
25.m00321	Core histone H2A/H2B/H3/H4 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254600 25	√	√
14.m00361	DnaK protein BiP <i>T. thermophila</i> chr_0 8254798 14 = Hsp-70	√	√
7.m00462	DnaK protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254716 7 = Hsp-70	√	√
152.m00108	EF-1 guanine nucleotide exchange domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254496 152	√	√
72.m00143	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254786 72	√	√
19.m00401	Glycosyl hydrolases family 38 protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254665 19 = α -Mannosidase	√	
25.m00418	Histidine acid phosphatase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254600 25	√	
15.m00378	Histone H4, minor, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254638 15	√	√
51.m00201	Hsp90 protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254437 51	√	√

T.t. Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
130.m00077	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254043 130 = Tpp2p	√	
104.m00169	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254365 104 = Tpp7p		√
129.m00110	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254549 129 = Tpp5p	√	√
50.m00189	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254609 50 = Tpp3p		√
159.m00051	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254707 159 = Tpp9p		√
8.m00474	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8 = Sialidase (Neuraminidase)	√	
45.m00225	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254814 45 = Phagosome protein 1 (Pph1/P28p)	√	√
120.m00116	Inorganic H ⁺ pyrophosphatase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254736 120 = Vacuolar H ⁺ -translocating inorganic pyrophosphatase	√	√
194.m00023	MYND finger family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253992 194 = Squalene-hopene cyclase/Terpenesynthase	√	
3.m01844	Na,H/K antiporter P-type ATPase, alpha subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3		√
103.m00129	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253891 103 = Lysosomal phospholipase A1/Cathepsin L	√	
125.m00080	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254370 125 = Cathepsin L/Tetrain	√	
88.m00155	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254584 88 = Cysteine-proteinase	√	√
5.m00542	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5 = Cathepsin L-like protein	√	√
92.m00126	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254653 92 = Cathepsin B = Cth40	√	
13.m00464	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13 = Cathepsin L = Cth90	√	
156.m00085	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254648 156	√	
8.m00549	PH domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8 = Vps13 (Vacuolar protein sorting)/Chorein	√	

T.t. Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
57.m00252	Protein disulfide-isomerase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254403 57 = Prolyl-4-hydroxylase (Thioredoxin domains)	√	√
192.m00071	Protein disulfide-isomerase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254757 192	√	√
84.m00113	SerH3 immobilization antigen, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254754 84	√	√
76.m00142	Thioredoxin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253850 76 = Protein-disulfide-isomerase-related protein	√	√
96.m00145	Translation elongation factor EF-1, subunit alpha <i>T. thermophila</i> chr_0 8254435 96	√	√
36.m00227	Tubulin beta chain, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254460 36	√	√
73.m00202	Tubulin/FtsZ family, GTPase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254486 73	√	√
35.m00294	Ubiquitin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254597 35	√	
34.m00342	V-type ATPase, A subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	√	√
67.m00170	V-type ATPase, B subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67	√	
48.m00253	Vacuolar ATP synthase, subunit d (C/AC39) <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	√	

Übereinstimmend wurden Proteine nachgewiesen, die alle der verschiedenen bereits vorgestellten Proteinklassen (s. Kap. 5.3.2) abdecken (s. Tab. 27). Cathepsin B (92.m00126) und Cathepsin L (13.m00464) oder die Histidin-Phosphatase (25.m00418) beispielsweise gehören zur Kategorie der Hydrolasen (vgl. Kap. 5.3.2.1). In Bezug auf membranassoziierte Proteine (vgl. Kap. 5.3.2.2) wurden von Jacobs *et al.* z.B. drei der vier in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen V-ATPasen (s. Tab. 24) ebenfalls identifiziert (s. Tab. 27). Außerdem wurde die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierte Calcium-transportierende P-ATPase des SERCA-Typs (225.m00058) von Jacobs und ihren Mitarbeitern übereinstimmend nachgewiesen (s. Tab. 27). Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit eine weitere P-ATPase gefunden (105.m00112, s. Tab. 25).

Des Weiteren wurden einige der identifizierten hypothetischen Proteine (s. Tab. 38) ebenso von Jacobs und ihren Mitarbeitern nachgewiesen (130.m00077, 50.m00189, 129.m00110, 104.m00169, 159.m00051, 8.m00474 und 45.m00225, s. Tab. 27). Für diese Proteine mit unbekannter zellulärer Funktion sind keine homologen Proteine in anderen Organismen bekannt, weshalb sie auch als "hypothetische", "nicht-charakterisierte" oder "unbekannte" Proteine bezeichnet werden (Sivashankari & Shanmughavel 2006). Hypothetische Proteine sind "vorhergesagte" Proteine, deren Vorkommen in vivo experimentell (noch) nicht bestätigt wurde. Hypothetische Proteine mit potentieller Phagozytose-Funktion, die von Jacobs *et al.* gefunden wurden, wurden als „Tpp“ (*Tetrahymena* phagosomal proteome)-Proteine bezeichnet (Jacobs *et al.* 2006). Übereinstimmend in der vorliegenden und in der Jacobs-Studie nachgewiesen wurden die Proteine Tpp2p, Tpp3p, Tpp5p, Tpp7p und Tpp9p (s. Tab. 27). Bei den beiden weiteren übereinstimmend gefundenen hypothetischen Proteinen (8.m00474 und 45.m00225) handelt es sich den Ergebnissen von Jacobs *et al.* zufolge um die Sialidase (Neuraminidase) sowie um das Phagosomenprotein 1 (Php1/P28p).

Über die in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Studie von Jacobs *et al.* gefundenen hypothetischen Proteine (s. Tab. 27) hinaus, wurde eine große Anzahl weiterer hypothetischer Proteine nachgewiesen: 423 und damit fast die Hälfte der insgesamt 888 identifizierten Proteine sind Proteine, deren Funktion nicht bekannt ist (s. Tab. 38). In naszenten Phagosomen wurden 369, in 10 min alten Phagosomen 132 hypothetische Proteine gefunden. Die Zahl von hypothetischen Proteinen, die in beiden Stadien vorkommen, beträgt 79. Aufgrund des Nachweises einiger dieser Proteine durch Jacobs und ihre Mitarbeiter, ist davon auszugehen, dass zumindest ein großer Teil dieser Proteine mit dem Phagosom assoziiert werden kann. Für Tpp2p und Tpp9p konnten Jacobs *et al.* durch Fluoreszenzmikroskopie GFP-fusionierter Proteine eine phagosomale Assoziation bestätigen (Jacobs *et al.* 2006).

Weitere in der vorliegenden Arbeit identifizierte Proteine (s. Tab. 38) sind zum Teil Proteine, die von Jacobs *et al.* (Jacobs *et al.* 2006) zwar nicht identifiziert wurden, die jedoch mit in der Jacobs-Studie nachgewiesenen Proteinen eine gemeinsame Proteinklasse bilden. Hier seien beispielsweise die Rab-Proteine erwähnt. Zwar wurden die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Rab-Proteine (Rab62 und Rab6C,

s. Tab. 38) von Jacobs *et al.* nicht gefunden, es konnten jedoch die Rab-Proteine 1, 7 und 13 nachgewiesen werden (Jacobs *et al.* 2006).

Auch die beiden in der vorliegenden Arbeit identifizierten ABC-Transporter-Proteine (112.m00133 und 162.m00063, s. Tab. 24) wurden von Jacobs *et al.* zwar nicht identifiziert, dafür lieferte die Studie zwei andere ABC-Transporter (Jacobs *et al.* 2006). Demnach kann festgehalten werden, dass die 73 von Jacobs *et al.* nachgewiesenen potentiell phagosomalen Proteine in der vorliegenden Arbeit größtenteils übereinstimmend identifiziert werden konnten. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass sich die Zahl von 73 Proteinen (Jacobs *et al.* 2006) auf Phagosomenkandidaten bezieht und dass sie Proteine, die beispielsweise auf Verunreinigungen hindeuten, nicht berücksichtigt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte MudPIT-Analyse phagosomaler Proteine ergab in der Summe die Identifikation von insgesamt 888 phagosomalen Proteinen (s. Tab. 38). Im Vergleich zu der Studie von Jacobs, die insgesamt 183 Proteine lieferte (Jacobs *et al.* 2006), wurden in der vorliegenden Arbeit demnach deutlich mehr Proteine identifiziert. Dieser Unterschied kann durch die verschiedenen, eingesetzten Methoden zur Aufbereitung des Probenmaterials sowie zur Analyse selbst begründet werden. Eine ebenso mögliche Erklärung wäre allerdings, dass die durchgeführte MudPIT-Analyse sensitiver ist und dass die speziell für Membranproteine geeignete Probenvorbereitung (s. Kap. 4.16) einen umfassenderen Nachweis ermöglichte. Des Weiteren zeigen die vorliegenden Ergebnisse (s. Tab. 38), dass im naszenten Phagosom mit 764 identifizierten Proteinen der Proteingehalt etwa doppelt so hoch ist wie in Phagosomen des 10 min alten Reifungsstadiums (347 Proteine), was den Schluss zulässt, dass an den ersten Phasen der Cyclose deutlich mehr Proteine beteiligt sind. Dies würde ebenfalls erklären, warum Jacobs *et al.* nur 183 Proteine identifizieren konnten, da die in dieser Studie analysierten Phagosomen mindestens 15 min alt waren (15, 30 und 60 min). Möglicherweise wurden in der vorliegenden Arbeit auch mehr Verunreinigungen (z.B. ribosomale Proteine, s. Tab. 38) erfasst.

5.3.4 Datenbank-Abgleich der MudPIT-Ergebnisse

Um eine weitere Bewertung der MudPIT-Ergebnisse vornehmen zu können, wurde die Datenbank *BioSystems* des NCBI (National Center for Biotechnology Information)

genutzt, welche unter anderem einen Zugang zu biologischen Systemen und deren zugehörigen Genen, Proteinen und kleinen Molekülen ermöglicht. Die Suche nach Proteinen des Phagozytose-Pathways in *T. thermophila* (Type: pathway, Taxonomic scope: organism-specific biosystem, Organism: *Tetrahymena thermophila* SB210) lieferte 87 Proteine (vgl. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/153909?Sel=genid:#show=proteins>). Vierzehn der 87 Proteine konnten durch die in dieser Arbeit durchgeführte MudPIT-Analyse detektiert werden (s. Tab. 28).

Tab. 28: In Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer NCBI-Datenbank-Suche gefundene Phagosomenproteine. Die Suche nach Proteinen des Phagozytoseprozesses in *T. thermophila* mit Hilfe der Datenbank *BioSystems* ergab 87 Proteine, von denen die 14 durch die hier durchgeführte MudPIT-Analyse von Proteinen aus naszenten (30 sek) und kondensierten (10 min) Phagosomen identifizierten aufgelistet sind. Neben der Häufigkeit, mit der ein Protein identifiziert wurde (Rot: 1 x, Gelb: 2 x, Grün: 3 x, Blau: 4 x), sind die jeweiligen NCBI-Referenznummern angegeben.

T.t. Gen-ID	Protein	30 sek	10 min	Gen-Name (TGD)	NCBI Referenznummer
7.m00481	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254716 7	√		Vma5 (Vacuolar Membrane ATPase)	XP_00101228 2.2
88.m00155	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254584 88 = Cysteine-proteinase	√	√	Cth34 (Cathepsin 34)	XP_00101954 7.3
13.m00464	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13 = Cathepsin L	√		Cth90 (Cathepsin 90)	XP_00100984 3.3
51.m00203	Sec61beta family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254437 51	√	√	None	XP_00102333 2.1
36.m00227	Tubulin beta chain, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254460 36	√	√	Btu1 (Beta-TUbulin)	XP_00102300 6.1
73.m00202	Tubulin/FtsZ family, GTPase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254486 73	√	√	Atu1 (Alpha-TUbulin)	XP_00102242 4.1
48.m00253	Vacuolar ATP synthase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	√		Vma6 (Vacuolar ATP Synthase)	XP_00101137 4.2

T.t. Gen-ID	Protein	30 sek	10 min	Gen-Name (TGD)	NCBI Referenznummer
88.m00154	Vacuolar ATPase subunit E <i>T. thermophila</i> chr_0 8254584 88		✓	None	XP_00101954 6.2
192.m00076	V-type ATPase 116kDa subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254757 192		✓	None	XP_00101034 1.1
34.m00342	V-type ATPase, A subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	✓	✓	Vma1 (Vacuolar Membrane ATPase)	XP_00101762 8.2
67.m00170	V-type ATPase, B subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67	✓		Vma2 (Vacuolar Membrane ATPase)	XP_00103269 7.1
8.m00321	V-type ATPase, C subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8	✓		Vma11 (Vacuolar Membrane ATPase)	XP_00101064 2.1
140.m00061	V-type ATPase, D subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254483 140	✓		Vma8 (Vacuolar Membrane ATPase)	XP_00103151 6.2
3.m01792	V-type ATPase, G subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	✓	Vma10 (Vacuolar Membrane ATPase)	XP_00101494 2.2

Bei den in Übereinstimmung mit der Datenbank-Suche gefundenen Proteinen handelt es sich vor allem um die bereits erwähnten, auch von Jacobs *et al.* (Jacobs *et al.* 2006) identifizierten, Untereinheiten der V-ATPase (Vacuolar-type H⁺-ATPase) sowie um die Cathepsine Cth34 und Cth90 (s. Tab. 28). Außerdem wurden die beiden Tubulin-Untereinheiten Atu1 und Btu1 gefunden (s. Tab. 28). Diese bilden Heterodimere, aus denen Mikrotubuli – röhrenförmige Mikrofilamente aus Proteinen, die zusammen mit den Intermediärfilamenten das Cytoskelett eukaryotischer Zellen bilden – aufgebaut sind. Es ist bekannt, dass Phagosomen sich entlang der Mikrotubuli bewegen und Untersuchungen mit Immunogold haben ergeben, dass Mikrotubuli – ebenso wie das Mikrotubuli-assoziierte Protein (MAP) Dynein und sein Cofaktor Dynaktin – mit phagosomalen Membranen assoziieren (Habermann *et al.* 2001). Des Weiteren wurde dokumentiert, dass Phagosomen Geschwindigkeiten von 0,2-1,5 µm/s erreichen, was

ein weiterer Indikator für einen Mikrotubuli-Motor-basierten Transport ist (Blocker *et al.* 1998). Schließlich wurde gezeigt, dass durch die Depolymerisierung von Mikrotubuli der Kontakt und die Fusion von Phagosomen mit späten Endosomen deutlich verringert wird (Desjardins *et al.* 1994b; Blocker *et al.* 1997).

Ein weiteres Protein, das durch die durchgeführte MudPIT-Analyse in dieser Arbeit nachgewiesen und nach den Ergebnissen der *BioSystems*-Suche ein phagosomales Protein ist, stellt das *Sec61beta Family Protein* dar (51.m00203, s. Tab. 28). Sec61 bildet einen heterotrimeren Komplex, welcher als sogenannte Translokationspore eine zentrale Rolle beim cotranslationalen Proteintransport, d.h. beim Transport von Proteinen während ihrer Synthese durch oder in eine Biomembran, spielt. Der Sec61-Komplex bildet einen Kanal, durch den Proteine bei der Translokation durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) hindurch transportiert werden. Es ist davon auszugehen, dass das Sec61-Protein als Komponente des Endoplasmatischen Retikulums jedoch keine Kontamination der Phagosomenpräparation darstellt, da bereits in dendritischen Zellen gezeigt werden konnte, dass Phagosomen während oder kurz nach ihrer Bildung mit dem ER fusionieren (Guermontprez 2004). Darüber hinaus wurde das Vorkommen von Sec61 in Phagosomen dendritischer Zellen bereits beobachtet (Houde *et al.* 2003). Der Nachweis von Sec61 (51.m00203, s. Tab. 28) ist insbesondere im Hinblick auf die Herkunft phagosomaler Membranen interessant. Nach dem konventionellen Modell entsteht das naszente Phagosom durch Einstülpung und Abschnürung der Plasmamembran (Ulsamer *et al.* 1971; Silverstein 1977). Dieses Modell wird durch die Tatsache unterstützt, dass die meisten Glycoproteine, die in Phagosomen gefunden wurden, größtenteils identisch mit den Glycoproteinen auf der Zelloberfläche sind (Chastellier *et al.* 1983; Chastellier *et al.* 1995; Chastellier & Thilo 2002).

Kürzlich wurde jedoch ein alternatives Modell vorgeschlagen, nach dem das ER an der Bildung von Phagosomen beteiligt ist (Garin *et al.* 2001; Gagnon *et al.* 2002). Untersuchungen von Makrophagen zeigten, dass das ER während der Phagozytose an den Ort der Partikelaufnahme rekrutiert wird und dort mit der Plasmamembran fusioniert, was annehmen lässt, dass das ER die Hauptquelle der phagosomalen Membran in Makrophagen darstellt (Gagnon *et al.* 2002). Diese Annahme trifft jedoch

den Ergebnissen der Studie von Gagnon *et al.* (Gagnon *et al.* 2002) nicht auf neutrophile Granulozyten zu.

Das Konzept der ER-vermittelten Phagozytose wird dadurch unterstützt, dass in Phagosomen eine große Menge an ER-Markern wie Calnexin, Calreticulin und Sec61 nachgewiesen wurde (Garin *et al.* 2001). Diese Beobachtung konnte von Gagnon *et al.*, die gereinigte Phagosomen durch Immunoblotting charakterisierten, dadurch bestätigt werden, dass ebenfalls eine Anreicherung von dem ER abstammenden Marker-Proteinen detektiert wurde (Gagnon *et al.* 2002).

Die Hypothese der ER-vermittelten Phagozytose (Garin *et al.* 2001; Gagnon *et al.* 2002) stellt eine attraktive Alternative zum konventionellen Phagozytose-Modell dar, da sie zum einen eine Erklärung dafür bietet, wie Phagozyten mehrere große Partikel aufnehmen können ohne dass gleichzeitig ihre Zelloberfläche abnimmt und zum anderen dafür, wie vom aufgenommenen Material abgeleitete Antigene durch MHC-Klasse-I-Moleküle (Haupthistokompatibilitätskomplexe) präsentiert werden können – ein Prozess, der Antigen-Kreuzpräsentation genannt wird und der mit dendritischen Zellen assoziiert wird (Guermontez *et al.* 2003; Houde *et al.* 2003). Bei der Kreuzpräsentation werden Antigene bzw. Proteine aus dem extrazellulären Raum aufgenommen, die daraus hervorgehenden antigenen Peptide jedoch auf MHC-I-Komplexen an CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen präsentiert. Bisher ging man davon aus, dass bei der Kreuzpräsentation Antigene durch einen unspezifischen Mechanismus von endocytischen Kompartimenten (z.B. Phagosomen) ins Cytosol gelangen und anschließend von TAP-Transportern (*transporter associated with antigen processing*) in das Lumen des ER importiert werden, wo sie auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen werden (Watts & Amigorena 2001). Das neue Modell, das ER-Komponenten im Phagosom vorsieht, erlaubt eine räumliche Koordination der Kreuzpräsentationsmaschinerie (Touret *et al.* 2005). Eine Annahme ist, dass der Sec61-Translokationskanal – ein ER-Protein – diese Aufgabe erfüllt (Wiertz *et al.* 1996; Desjardins 2003). Untersuchungen an Makrophagen und dendritischen Zellen zur Beurteilung der Beteiligung von Plasmamembran und ER an der Phagosomenbildung und -reifung ergaben jedoch, dass die Plasmamembran die Hauptquelle phagosomaler Membranen zu sein scheint (Touret *et al.* 2005). Sec61 α -GFP konnte durch Fluoreszenzspektroskopie in Phagosomen nicht nachgewiesen

werden (Touret *et al.* 2005), was den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (s. Tab. 28) zu widersprechen scheint.

Die in der *BioSystems*-Datenbank als Phagosomenproteine von *T. thermophila* angegebenen Proteine entsprechend weitestgehend den Proteinen, die sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der Jacobs-Studie (Jacobs *et al.* 2006) identifiziert wurden. Allerdings werden auch viele Proteine wie beispielsweise das *Dynein Heavy Chain Family Protein* (NCBI-Referenznummer: XP_001022394) angegeben, die in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden wurden. In diesem Fall wurden dafür jedoch einige andere *Dynein Heavy Chain Family Proteine* nachgewiesen (s. Tab. 38), was dafür spricht, dass mit der hier angewandten Methodik phagosomale Proteine verschiedener Reifungsstadien zuverlässig identifiziert werden können.

5.3.5 Fazit der MudPIT-Analysen

Der Prozess der Phagozytose beinhaltet die Fusion von Phagosomen mit Endosomen (Mayorga *et al.* 1991; Pitt *et al.* 1992a; Rabinowitz *et al.* 1992; Desjardins *et al.* 1994a) und Lysosomen (Jahraus *et al.* 1994), wobei die Mechanismen zur Vermittlung dieser Interaktionen kaum verstanden bzw. bisher erstaunlich wenige der beteiligten Polypeptide identifiziert worden sind (Desjardins *et al.* 1994b).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, anhand des Modellorganismus *Tetrahymena thermophila* an der Phagozytose beteiligte Proteine zu identifizieren bzw. Änderungen der Proteinzusammensetzung von Phagosomen zu verfolgen. Dazu wurden mittels etablierter Protokolle stadienspezifische Phagosomen (30 sek und 10 min) aus *T. thermophila* isoliert (s. Kap. 4.11 und 4.12) und die solubilisierten und gefällten Phagosomenproteine (s. Kap. 4.13 und 4.15) mit Hilfe der MudPIT-Methode (s. Kap. 4.16) analysiert.

Auf diese Weise ist es gelungen, in naszenten Phagosomen 764 Proteine (s. Tab. 38, 30 sek) und in kondensierten Phagosomen 347 Proteine (s. Tab. 38, 10 min) nachzuweisen (vgl. Kap. 5.3.1). Demnach kommt es zu einer Abnahme der Proteinanzahl beim Übergang von naszenten zu kondensierten Phagosomen, die bereits durch 2D-Gelelektrophorese-Analysen (s. Abb. 14) beobachtet werden konnte (V. Wittich, Dissertation, 2014).

Bei den gefundenen Proteinen handelt es sich um verschiedene Proteinklassen, die an der Phagozytose beteiligt sind. Zum einen wurden hydrolytische Proteine gefunden (s. Tab. 23), die der Verdauung des durch Phagozytose aufgenommenen Materials dienen, und zum anderen Proteine, die mit der Phagosomenmembran assoziiert bzw. für den Vesikeltransport zuständig sind (s. Tab. 24), sowie Calmodulin und Ca²⁺/Calmodulin-bindende Proteine (s. Tab. 25). Weitere interessante, potentielle Phagosomenproteine konnten darüberhinaus nachgewiesen werden (s. Tab. 26).

Ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit der Studie von Jacobs *et al.*, in der 183 Proteine identifiziert wurden (Jacobs *et al.* 2006), zeigt, dass 43 Proteine übereinstimmend nachgewiesen wurden (s. Tab. 27). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei einem Großteil der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Proteine tatsächlich um phagosomale Proteine handelt. Dass in der vorliegenden Arbeit deutlich mehr Proteine als von Jacobs *et al.* identifiziert wurden, ist vermutlich auf die unterschiedliche Art der Probenvorbereitung und Analyseverfahren sowie auf die gewählten Phagosomenstadien zurückzuführen (vgl. Kap. 5.3.3). Verunreinigungen der Phagosomenpräparation durch beispielsweise ribosomale Proteine (s. Tab. 38) wurden in beiden Studien beobachtet. Mindestens drei von vier getesteten GFP-fusionierten Proteinen (Cathepsin B, Tpp2p und Tpp9p; Tpp5p unsicher) konnten von Jacobs *et al.* mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie als mit Phagosomen assoziierte Proteine nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass die identifizierten Proteine größtenteils tatsächlich an der Phagozytose beteiligt sind (Jacobs *et al.* 2006). Ebenso konnte in der Arbeit von V. Wittich eine Phagosomenassoziation ausgewählter Proteine durch GFP-Fusion und Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden. Außer für das Protein 14-3-3 (13.m00428, s. Tab. 22) konnte für alle getesteten GFP-fusionierten Proteine (Snare: 34.m00271, s. Tab. 24; Php1: 45.m00225, s. Tab. 26; Php2: 81.m00185, s. Tab. 26) eine phagosomale Lokalisation nachgewiesen werden (V. Wittich, Dissertation, 2014).

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse wurden des Weiteren mit den Angaben der NCBI-Datenbank *BioSystems* für phagosomale Proteine in *T. thermophila* verglichen (s. Kap. 5.3.4). Vierzehn der 87 in der Datenbank angegebenen Proteine konnten in der vorliegenden Arbeit detektiert werden (s.

Tab. 28), was ebenfalls auf die Identifikation phagosomaler Proteine durch die durchgeführte MudPIT-Analyse hindeutet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass die Phagozytoseprozesse von einzelligen Eukaryoten große Ähnlichkeiten mit denen von vielzelligen Organismen aufweisen. Dennoch scheint es auch einige Unterschiede zu geben. Lysosomen-assoziierte Membranproteine (LAMPs), die Komponenten von Säuger-Phagolysosomen darstellen und im Phagosom der Maus nachgewiesen werden konnten (Garin *et al.* 2001; Eskelinen *et al.* 2003), wurden in der vorliegenden Studie nicht identifiziert. Es ist davon auszugehen, dass diese Proteine nicht aus methodischen Gründen nicht gefunden wurden, sondern da sie in *T. thermophila* auch tatsächlich nicht vorkommen. Allgemein scheinen einzellige Eukaryoten aufgrund der unterschiedlichen Gegebenheiten zwischen Einzellern und Eumetazoa keine LAMPs zu besitzen. Eine intensive Suche nach Genen, die ähnliche Proteine in Einzellern (*E. histolytica*, *D. discoideum* und *S. cerevisiae*) codieren könnten, ergab keine Treffer (Jacobs *et al.* 2006).

Calnexin und Calreticulin, die normalerweise mit dem ER assoziiert sind und in Maus-Makrophagen identifiziert wurden (Garin *et al.* 2001), wurden durch die MudPIT-Analyse in dieser Arbeit ebenfalls nicht nachgewiesen. Die Abwesenheit dieser ER-Marker stützt demnach nicht das Konzept der ER-vermittelten Phagozytose (vgl. Kap. 5.3.4). Der Nachweis von Sec61 (51.m00203, s. Tab. 28), ebenfalls ein ER-Marker, würde jedoch für eine Beteiligung des Endoplasmatischen Retikulums an der Phagozytose sprechen. Aus diesem Grund müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob das ER an der Entstehung von Phagosomen beteiligt ist oder ob es sich bei den ER-assoziierten Proteinen um Kontaminationen handelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die MudPIT-Analyse von Proteinen, die aus isolierten Phagosomen von *T. thermophila* erhalten wurden, einen detaillierten Überblick über die in Phagosomen vorkommenden Proteine liefert. Dass die Analyse häufig zur Identifikation eines Proteins in nur einem der beiden untersuchten Stadien führte (s. Tab. 38), lässt annehmen, dass stadienspezifische Änderungen der Proteinzusammensetzung von Phagosomen verfolgt werden können. Demnach wäre es möglich, weitere Phagosomenstadien zu untersuchen, um so herauszufinden,

welche Proteine am jeweiligen Schritt der Phagosomenreifung beteiligt sind. Interessante Proteine könnten dann beispielsweise durch RNA-Interferenz (RNA_i) oder Proteininteraktionsstudien auf ihre Funktion hin untersucht werden.

Um weitere Hinweise auf potentielle phagosomale Proteine zu erhalten, wurden für ausgewählte Proteine bzw. die entsprechenden Gene zeitliche Änderungen des mRNA-Levels nach Induktion der Phagocytose untersucht. Hiermit sollte außerdem die Frage geklärt werden, ob mittels MudPIT zeitliche Änderungen der Proteinzusammensetzung von Phagosomen detektiert werden können bzw. ob diese Veränderungen mit Änderungen des mRNA-Levels der Zelle korrelieren. Auf die erhaltenen Ergebnisse wird im folgenden Kapitel eingegangen (s. Kap. 5.4).

5.4 Analyse des mRNA-Levels phagocytierender Zellen

Ausgewählte, in der MudPIT-Analyse identifizierte Proteine bzw. die entsprechenden Gene sollten in einem molekularbiologischen Ansatz näher charakterisiert werden. Ziel hierbei war es, die Rolle der Proteine im Phagocytoseprozess zu validieren bzw. deren Funktion und zeitlichen Einsatz genauer zu bestimmen. In diesem Zusammenhang sollten die Ergebnisse der MudPIT-Analyse ergänzt und näher analysiert werden.

Für die ausgewählten Gene wurden mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR (qPCR) zeitliche Änderungen des Expressionslevels nach Induktion der Phagocytose untersucht. Hiermit sollte die Frage geklärt werden, zu welchen Zeitpunkten der Phagocytose die jeweiligen Proteine aktiv sind. Außerdem sollte überprüft werden, ob die Proteine neben einer Funktion in der Phagocytose weitere Funktionen besitzen.

5.4.1 Etablierung des Systems

Auch wenn die Proteinforschung an immer feineren Methoden arbeitet, um Proteine zu erfassen und ihre Menge zu bestimmen, ist mit den bisherigen Verfahren der Proteomik vor allem die Mengenbestimmung nur unzureichend möglich. Zudem haben Proteine oft eine sehr unterschiedlich lange Lebensdauer und Aktivität, weshalb ihre ermittelte Menge nur eine eingeschränkte Aussage über die Expression des

entsprechenden Gens zulässt. Hier bietet die quantitative Real-Time-PCR, bei der anstelle des Proteins die mRNA erfasst wird, eine wesentlich empfindlichere Methode. Als Ergebnis der qPCR erhält man als indirektes Maß für die Menge der aktiven mRNA des Zielgens den sogenannten Ct-Wert (*Cycle threshold*). Dieser entspricht der Anzahl an PCR-Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die RNA aus *T. thermophila*-Zellen, die zuvor mit Magnetobeads (s. Kap. 4.11) gefüttert wurden, nach verschiedenen Zeiten (Nullprobe, 30 sek, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h und 2 h) isoliert (s. Kap. 4.2.4). Diese Zeitpunkte wurden gewählt, da bereits gezeigt werden konnte, dass sich der gesamte Phagozytoseprozess – von der Abschnürung des Phagosoms bis zur Entleerung seines verdauten Inhalts – bei *T. thermophila* bei 30°C über einen Zeitraum von 1-2 h erstreckt (Batz & Wunderlich 1976; Nilsson 1977b).

Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben (s. Kap. 4.5) und die erhaltenen Proben wurden mittels des SensiMix™ SYBR Low-ROX Kits (s. Tab. 6) nach Angaben des Herstellers für die Real-Time-PCR vorbereitet.

Die verwendeten Primer (s. Tab. 8) wurden mit Software-Programmen wie Primer3 (s. Kap. 3.14) designt, wobei darauf geachtet wurde, dass die optimale Amplikon-Länge von 50-150 bp nicht wesentlich überschritten wurde (größtes Amplikon: 178 bp). Außerdem wurden gen-spezifische, Intron-überspannende Primer eingesetzt (s. Tab. 8), um eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Amplifikation von genomischer DNA (aus möglichen Verunreinigungen) zu vermeiden. Die für das jeweilige Primerpaar optimale Primer-Konzentration wurde mit Hilfe einer Primer-Titration im Bereich von 0,1-1 µM ermittelt (Ergebnisse nicht gezeigt) und lag bei 250-500 nM. Außerdem erwies sich eine cDNA-Menge von 100 ng pro Reaktion als optimal.

Die Durchführung der qPCR erfolgte wie in Kap. 4.6.5 beschrieben, wobei die gemessene Fluoreszenz auf den Wert der jeweiligen Nullprobe (= RNA-Isolierung vor Induktion der Phagozytose) kalibriert wurde. Außerdem wurde ein *Housekeeping*-Gen, welches unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird, als Referenzgen eingesetzt (relative Quantifizierung). In der vorliegenden Arbeit wurde

das Gen, das in *Tetrahymena* für die kleine Untereinheit (*small subunit*, SSU) der ribosomalen RNA (rRNA) codiert, verwendet. Dieses SSU rRNA Gen wurde gewählt, da es phagozytoseunabhängig exprimiert wird, bereits in anderen Arbeiten als *Housekeeping*-Gen verwendet wurde (Miao *et al.* 2006; Feng *et al.* 2007; Guo *et al.* 2008) und andere typische Haushaltsgene wie beispielsweise Aktin oder Tubulin aufgrund ihrer Funktion in der Phagozytose nicht geeignet sind.

Die Berechnung der relativen Expressionsunterschiede erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Livak & Schmittgen 2001), indem die Expression des Zielgens auf die des SSU rRNA – Referenzgens normalisiert und die normalisierten Expressionsunterschiede (ΔCt) der Behandlungsgruppe (Zeitpunkte s.o.) auf die Expression der Kontrollgruppe (Nullproben) kalibriert wurden ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Mit Hilfe der Normalisierung können z.B. Schwankungen in der Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA ausgeglichen werden. Die Varianz der Expressionsergebnisse wird reduziert, da Gewebefeffekte oder Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer Probe beide Gene gleichermaßen betreffen (Pfaffl 2006).

Bei der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ist jedoch zu beachten, dass die PCR-Effizienz des untersuchten Gens von der des SSU rRNA Gens abweicht, was zu einer Verfälschung der quantitativen Resultate führen würde. Um dies zu verhindern, wurde die relative Quantifizierung weiter optimiert, indem die unterschiedlichen qPCR-Effizienzen der untersuchten Gene miteinbezogen wurden. Hierzu wurde für jedes Gen eine Standardkurve, dessen Steigung die Real-Time-PCR-Effizienz liefert (Rasmussen 2001), erstellt, indem der Ct-Wert für sechs unterschiedliche Verdünnungsstufen eines Gemisches aus cDNA aller untersuchten Zeitpunkte bestimmt wurde. Abb. 16 zeigt exemplarisch die für das SSU rRNA Gen erhaltenen *Amplification Plots*, d.h. die in Echtzeit gemessene Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zykluszahl. Gezeigt sind die Ergebnisse für die sechs verschiedenen Verdünnungen (Blau = unverdünnt/100 ng bis Hellblau = stärkste Verdünnung).

Die rot eingezeichnete Linie markiert den Fluoreszenzwert, an dem der Ct-Wert abgelesen wird (s. Abb. 16). Dieser liegt beispielsweise für die unverdünnte Probe (Blau) bei etwa 14. Wie erwartet nimmt der Ct-Wert mit zunehmender Verdünnung gleichermaßen pro Verdünnungsstufe um etwa eine Einheit zu. Entgegen einer

üblicherweise verwendeten Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10, stellte sich in der vorliegenden Arbeit eine 2-fache Verdünnungsreihe als optimal heraus.

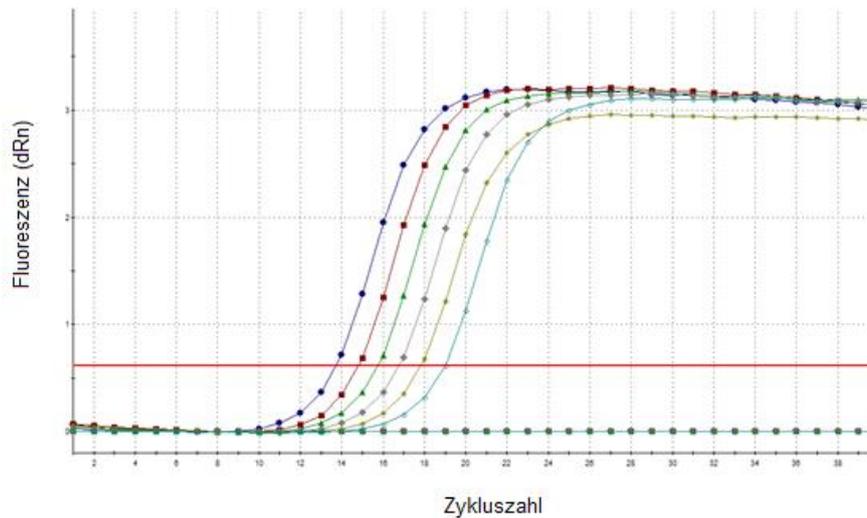


Abb. 16: *Amplification Plots* für das SSU rRNA Gen (dRn = delta Rn; Rn: normalisiertes Reportersignal). Gezeigt sind die Kurven für die sechs verschiedenen Verdünnungen einer 2-fachen Verdünnungsreihe (Blau = unverdünnt/100 ng bis Hellblau = stärkste Verdünnung). Der jeweilige Ct-Wert gibt die Zykluszahl an, bei der ein definiertes Fluoreszenzniveau (rote Linie) erreicht wird.

Bei der Messung der unterschiedlich verdünnten Proben – sowie bei der Messung aller weiteren Proben – wurden zusätzlich Schmelzkurven aufgenommen. Diese geben die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur an. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass durch den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green keine unspezifisch entstandenen Produkte nachgewiesen wurden.

Spezifische PCR-Produkte sind stabiler als unspezifische und weisen daher einen höheren Schmelzpunkt auf, was eine Unterscheidung der Produkte und somit eine Überprüfung der Reaktionsspezifität ermöglicht. Abb. 17 gibt am Beispiel vom SSU rRNA Gen die erhaltenen Schmelzkurven für die bereits erwähnten verschiedenen Verdünnungen an (Blau = unverdünnt/100 ng bis Hellblau = stärkste Verdünnung). Der Abbildung ist zu entnehmen, dass das Produkt der PCR-Reaktion eine Schmelztemperatur von etwa 81,5°C aufweist. Bei dieser für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der DNA-Doppelstrang, wodurch SYBR Green freigesetzt und somit eine Änderung der Fluoreszenz registriert wird. Da nur ein „Peak“ zu verzeichnen ist (s. Abb. 17), kann die Spezifität der qPCR-Reaktion bestätigt werden.

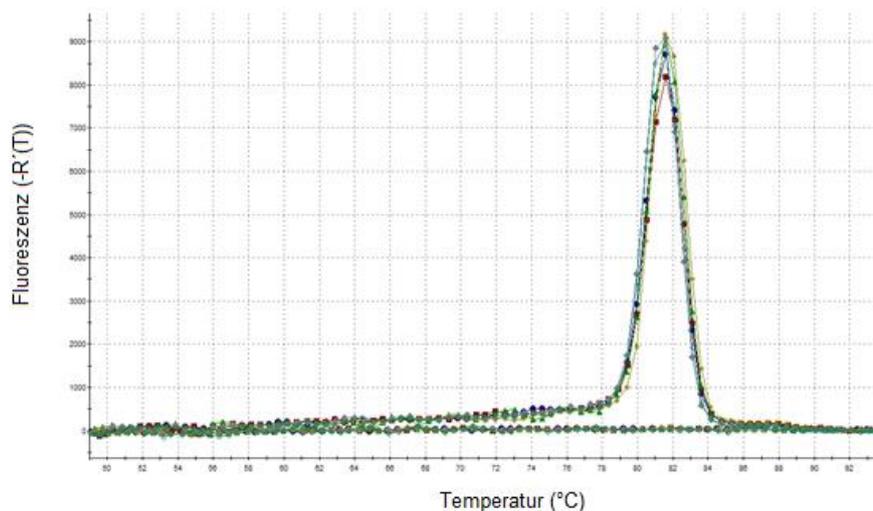


Abb. 17: Schmelzkurven für das SSU rRNA Gen (R: Reportersignal, T: Temperatur). Gezeigt sind die Kurven für sechs verschiedene Verdünnungen (Blau = unverdünnt/100 ng bis Hellblau = stärkste Verdünnung).

Um auszuschließen, dass möglicherweise zwei (oder mehr) Fragmente amplifiziert wurden, die Produkte mit derselben Schmelztemperatur lieferten, wurden die jeweiligen PCR-Ansätze außerdem mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 4.4) analysiert. Abb. 18 zeigt das Ergebnis der gelelektrophoretischen Analyse der qPCR-Ansätze, in denen ein 178 bp - Fragment des SSU rRNA Gens amplifiziert wurde. Überprüft wurden die Proben der sechs verschiedenen cDNA-Verdünnungsstufen, die der Erstellung der Standardkurve dienten (s. Abb. 18 A; 1 = unverdünnt/100 ng bis 6 = stärkste Verdünnung). Außerdem wurden Proben der qPCR-Ansätze, in denen cDNA als Vorlage diente, die durch Reverse Transkription aus RNA erhalten wurde, die vor bzw. zu bestimmten Zeitpunkten nach der Fütterung von *T. thermophila* mit Magnetobeads isoliert wurde (s. Abb. 18 B; 0' = 0 min, 30'' = 30 sek, 5-120' = 5-120 min).

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, sind neben der erwarteten Bande des SSU rRNA Fragments mit einer Größe von 178 bp keine weiteren Banden zu erkennen (s. Abb. 18), so dass auch hiermit die Spezifität der PCR-Reaktion bestätigt werden kann. Die Kontrolle, die sogenannte *No Template Control* (NTC, „Wasserprobe“), mit der die Entstehung von Primerdimeren überprüft werden kann, lieferte erwartungsgemäß keine Bande (s. Abb. 18 A; Spur K). Demnach waren sowohl die verwendeten Primer als auch die Reaktionsbedingungen geeignet, so dass das SSU rRNA Gen als Referenzgen für die qPCR-Analysen verwendet werden konnte.

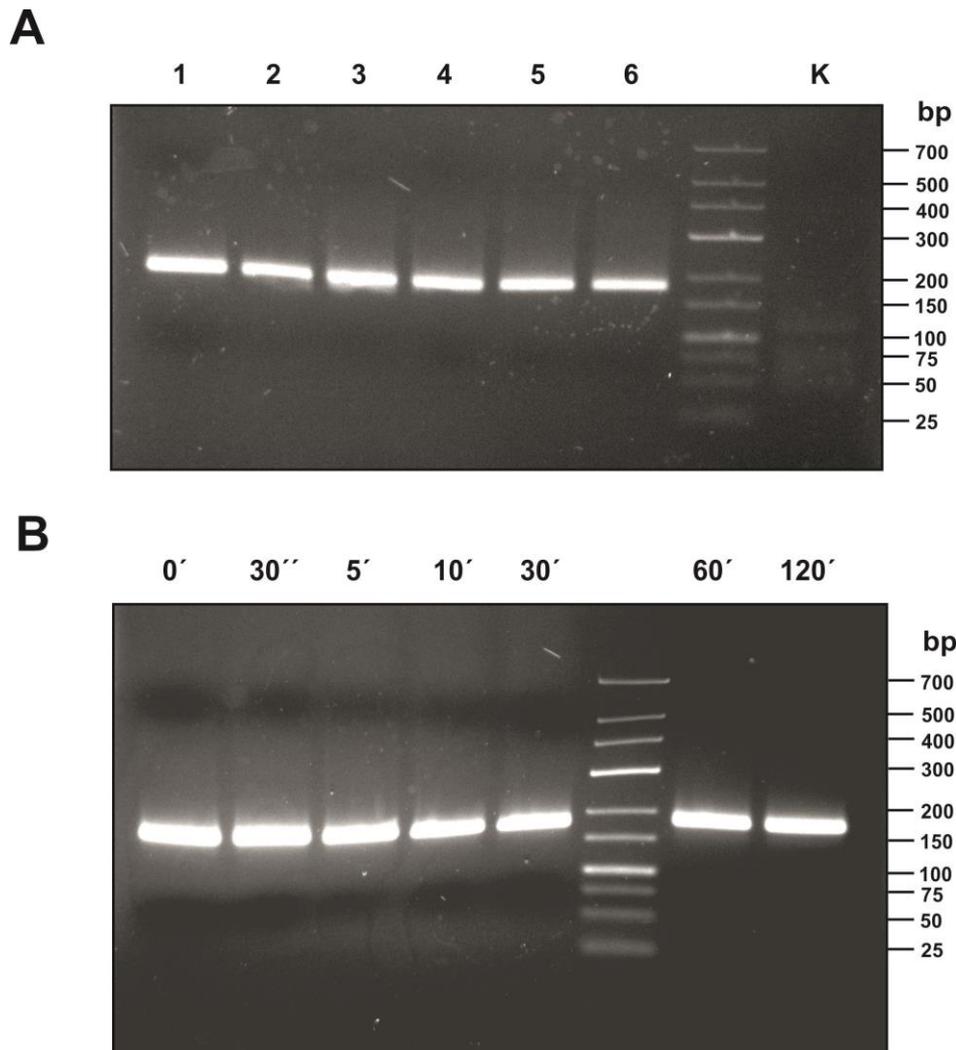


Abb. 18: Gelelektrophoretische Analyse der qPCR-Ansätze zur Amplifikation eines 178 bp - Fragments des SSU rRNA Gens. **A)** Proben zur Erstellung einer SSU rRNA – Standardkurve. Aufgetragen wurden Proben der sechs verschiedenen cDNA-Verdünnungsstufen (1 = unverdünnt/100 ng bis 6 = stärkste Verdünnung). Als Kontrolle (K) diente ein Ansatz ohne cDNA (NTC = *No Template Control*), der wie erwartet kein Produkt lieferte. **B)** Proben mit cDNA, die durch Reverse Transkription aus RNA erhalten wurde, die zu bestimmten Zeitpunkten nach der Fütterung von *T. thermophila* mit Magnetobeads aus den Zellen isoliert wurde (0' = 0 min, 30'' = 30 sek, 5-120' = 5-120 min). **A+B)** Neben der erwarteten Bande des SSU rRNA Fragments (178 bp) sind keine weiteren Banden zu erkennen. Die Größe der Markerbanden ist angegeben. Verwendet wurden 3%ige Agarosegele.

Wie bereits erwähnt, wurden unterschiedliche cDNA-Verdünnungen eingesetzt, um die Effizienz eines jeden Primerpaars zu bestimmen. Am Beispiel des SSU rRNA Gens ist in Abb. 19 die Standardkurve, die die Effizienz liefert, dargestellt. Dabei wird der Ct-Wert gegen die jeweilige relative Ausgangsmenge an cDNA aufgetragen. Für die unverdünnte Probe (relative Ausgangsmenge von 1) sind im Vergleich zu den verdünnten Proben weniger PCR-Zyklen nötig, um das konstant definierte Fluoreszenzniveau zu erreichen, d.h. der Ct-Wert ist am kleinsten (s. Abb. 19;

ca. 13,8). Mit zunehmender Verdünnung steigt er kontinuierlich an, im dargestellten Beispiel bis auf einen Wert von etwa 19 (s. Abb. 19). Die Steigung der sich ergebenden Standardkurve bzw. Ausgleichsgerade liefert nach der Formel $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$ die Effizienz E (Rasmussen 2001). Im vorliegenden Beispiel liegt sie bei etwa 1.91, was einem Wert von 95,7 % (s. Abb. 19) entspricht. Unter optimierten Reaktionsbedingungen sollte die Real-Time-PCR-Effizienz zwischen 1,7 und 1,9 liegen, wobei Schwankungen von 1,5 bis über 2 auftreten (Pfaffl 2004). Da geringste Schwankungen in den Effizienzen von Zielgen und Referenzgen zu enormen Unterschieden in den Expressionsverhältnissen führen und somit die Ergebnisse verzerren (Pfaffl 2006), wurde in der vorliegenden Arbeit den unterschiedlichen Effizienzen in den Proben Rechnung getragen, indem eine Effizienzkorrektur der erhaltenen Ergebnisse durchgeführt wurde.

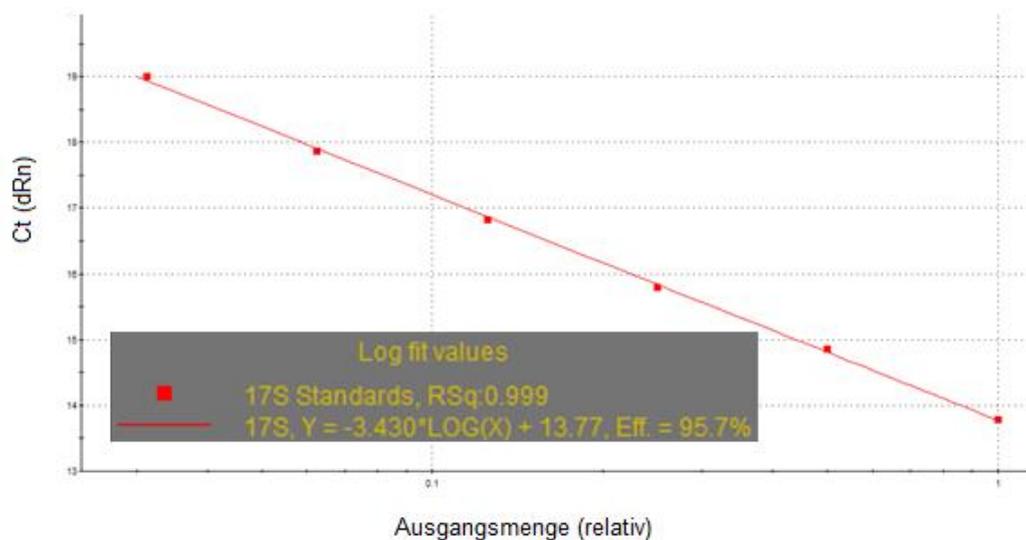


Abb. 19: Standardkurve für das SSU rRNA Gen. Die Standardkurve, die die Abhängigkeit der Ct-Werte von der relativen Ausgangsmenge an cDNA angibt, dient der Ermittlung der Real-Time-PCR-Effizienz. Es wurden sechs verschiedene cDNA-Ausgangsmengen eingesetzt. Die Probe, bei der die unverdünnte cDNA (100 ng) eingesetzt wurde, besitzt eine relative Ausgangsmenge von 1. Für die weiteren Proben zur Erstellung der Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 angesetzt. Mit Hilfe der Steigung (hier: -3,43) der Standardkurve bzw. der Ausgleichsgeraden kann nach der Formel $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$ die Effizienz E berechnet werden (Rasmussen 2001). Für das SSU rRNA Gen liegt sie bei etwa 1.95, was einem Wert von 95,7 % entspricht.

Die Reproduzierbarkeit der qPCR-Ergebnisse wurde exemplarisch an einigen Messungen überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt) und konnte, da für gleiche Proben gleiche Trends erhalten wurden, bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Real-Time-PCR-System erfolgreich etabliert werden konnte. Für eine cDNA-Ausgangsmenge von 100 ng stellte sich für die untersuchten Gene (s. Kap. 5.4.2) eine Primerkonzentration von 250-500 nM je Primer als optimal heraus. Für das SSU rRNA Gen zeigte sich, dass mit den gewählten Primern (s. Tab. 8) unter den angegebenen Reaktionsbedingungen die Amplifikation eines spezifischen Fragments mit einer Größe von 178 bp möglich war (s. Abb. 16 bis Abb. 18), so dass das SSU rRNA Gen als Referenzgen für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene eingesetzt werden konnte. Auf die untersuchten Gene sowie die jeweiligen Ergebnisse wird im Folgenden näher eingegangen (s. Kap. 5.4.2 und 5.4.3).

5.4.2 Untersuchte Gene

In der vorliegenden Arbeit sollte die Expression einiger potentiell phagosomaler Gene überprüft werden. Hierbei wurden zeitliche Änderungen verfolgt, die Hinweise auf die Funktion des Proteins bzw. Gens geben können. Ziel war es, einen genaueren Einblick in die Phagozytose zu erhalten.

Mittels quantitativer Real-Time-PCR (s. Kap. 4.6.5) wurden die Transkripte von vier Genen der entsprechenden in der MudPIT-Analyse (s. Kap. 5.3) identifizierten Proteine analysiert. Hierbei handelt es sich um Proteine mit unbekannter Funktion, die sowohl nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (s. Tab. 38) als auch nach den Ergebnissen von Jacobs *et al.* als Kandidaten für phagosomale Proteine gelten und aus diesem Grund als Tpp (*Tetrahymena* phagosomal proteome)-Proteine bezeichnet werden. Untersucht wurden die Proteine Tpp2p, Tpp3p, Tpp5p und Tpp9p – die für diese Proteine erhaltenen Ergebnisse der MudPIT-Analyse sind Tab. 29 zu entnehmen. Die Tabelle (s. Tab. 29) gibt neben den MudPIT-Ergebnissen der vorliegenden Arbeit für 30 sek und 10 min alte Phagosomen zusätzlich die Ergebnisse für 5 min alte Phagosomen an, die von V. Wittich analysiert wurden (V. Wittich, Dissertation, 2014).

Tpp2p scheint nur in naszenten und Tpp9p in 10 min alten Phagosomen vorzukommen, wohingegen Tpp3p in 5 und 10 min alten und Tpp5p in naszenten und 10 min alten Phagosomen nachgewiesen wurde (s. Tab. 29). Ziel der qPCR-Experimente war es auch, diese Annahmen zu überprüfen.

Tab. 29: Hypothetische bzw. Tpp-Proteine, die mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert wurden (nähere Erläuterungen: s.Text). Gezeigt sind die Ergebnisse, die in der MudPIT-Analyse (s. Kap. 5.3) von Proteinen aus 30 sek (diese Arbeit), 5 min (V. Wittich, Dissertation, 2014) und 10 min (diese Arbeit) alten Phagosomen erhalten wurden. Die Peptidzahl, die zur Identifikation des jeweiligen Proteins führte, sowie die Häufigkeit der Proteinidentifikation (Rot: 1 x, Gelb: 2 x, Grün: 3 x, Blau: 4 x) sind angegeben.

T.t. Gen-ID	Protein	30 sek (Peptidzahl)	5 min (Peptidzahl)	10 min (Peptidzahl)
130.m00077	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254043 130 = Tpp2p	4		
50.m00189	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254609 50 = Tpp3p		2	8
129.m00110	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254549 129 = Tpp5p	8		7
159.m00051	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254707 159 = Tpp9p			2

Am Beispiel der Tpp-Proteine sollte herausgefunden werden, ob anhand des mRNA-Levels die Ergebnisse bezüglich der Proteinidentifikationen bestätigt werden können. Darüber hinaus sollten die MudPIT-Ergebnisse ergänzt werden, um weitere Informationen hinsichtlich der Proteinfunktionen zu erhalten. Untersucht wurden die genannten Tpps, da von einer phagosomalen Assoziation der Proteine ausgegangen werden kann und da es sich um Proteine handelt, deren Funktion nicht bekannt ist. Einige Ergebnisse anderer Studien (z.B. Maicher & Tiedtke 1999; Jacobs *et al.* 2006) werden zur Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ebenfalls herangezogen und mit den hier erzielten Ergebnissen interpretiert.

5.4.3 Ergebnisse der quantitativen Real-Time-PCR

Zunächst wird im Rahmen der quantitativen Real-Time-PCR auf die Ermittlung der qPCR-Effizienz für die untersuchten Gene eingegangen (s. Kap. 5.4.3.1). Im Anschluss werden die Änderungen des mRNA-Levels für die Gene Tpp2p, Tpp3p, Tpp5p und Tpp9p, die nach einer Induktion der Phagozytose auftreten, vorgestellt (s. Kap. 5.4.3.2).

5.4.3.1 Ermittlung der qPCR-Effizienz

Die Ermittlung der qPCR-Effizienz für die Gene Tpp2p, Tpp3p, Tpp5p und Tpp9p erfolgte wie in Kap. 5.4.1 beschrieben und am Beispiel vom SSU rRNA Gen demonstriert (s. Abb. 16, Abb. 18 A und Abb. 19), indem eine cDNA-Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 erstellt und die jeweiligen Ct-Werte bestimmt wurden. Nach Durchführung der qPCR wurden für jedes Gen Proben der sechs verschiedenen Verdünnungsstufen gelelektrophoretisch analysiert (s. Abb. 20).

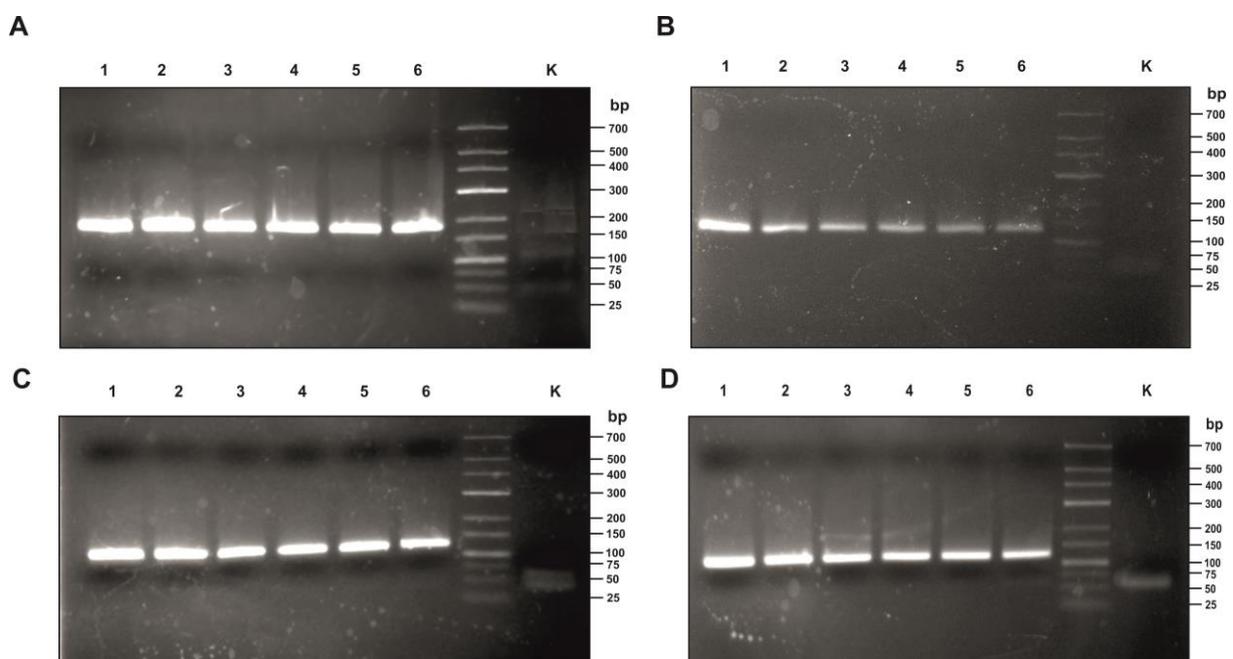


Abb. 20: Gelelektrophoretische Analyse von qPCR-Ansätzen zur Amplifikation von Fragmenten von Tpp-Genen (Tpp: *Tetrahymena* phagosomal proteome). Amplifiziert wurden **A**) ein 167 bp-Fragment des Tpp2p-Gens, **B**) ein 125 bp-Fragment des Tpp3p-Gens, **C**) ein 121 bp-Fragment des Tpp5p-Gens und **D**) ein 119 bp-Fragment des Tpp9p-Gens. **A-D**) Die Ansätze dienen der Erstellung einer Standardkurve, mit der die Effizienz der Real-Time-PCR für das jeweilige Gen ermittelt wurde (Näheres: s. Text). Aufgetragen wurden Proben der sechs verschiedenen cDNA-Verdünnungsstufen (2-fache cDNA-Verdünnungsreihe, 1 = unverdünnt/100 ng bis 6 = stärkste Verdünnung). Als Kontrolle (K) diente je ein Ansatz ohne cDNA (NTC = *No Template Control*), der wie erwartet keine Bande bei der jeweiligen Fragmentgröße lieferte. Neben der jeweils erwarteten Bande des amplifizierten Fragments bei der entsprechenden Größe sind keine weiteren Banden zu erkennen (Spur 1-6). Die Größe der Markerbanden ist angegeben. Verwendet wurden 3%ige Agarosegele.

Wie zu erwarten, weisen die Gele lediglich eine Bande bei der Größe des jeweils amplifizierten Fragments auf (Tpp2p: 167 bp / Tpp3p: 125 bp / Tpp5p: 121 bp / Tpp9p: 119 bp; s. Abb. 20, Spur 1-6), wohingegen die Kontrollen, bei denen kein *Template* im qPCR-Ansatz enthalten war, die entsprechende Bande nicht zeigen (s. Abb. 20,

Spur K). Bei den Kontrollen sind lediglich schwache Banden z.B. bei etwa 50 bp zu erkennen, die auf die Entstehung von Primerdimeren zurückgeführt werden können (s. Abb. 20, Spur K). Da die Schmelzkurven aller vier Tpp-Gene (Kurven nicht gezeigt) jedoch nur je einen „Peak“ bei der jeweiligen probenspezifischen Schmelztemperatur (s. Tab. 30) aufwiesen, ist davon auszugehen, dass die während der qPCR detektierte Fluoreszenz auch lediglich auf das spezifisch gebildete Produkt zurückzuführen ist.

Der Bereich, in dem die Ct-Werte der sechs Verdünnungen für jedes Gen lagen, ist ebenso Tab. 30 zu entnehmen (*Amplification Plots* nicht gezeigt).

Die aus den erhaltenen Ct-Werten erstellten Standardkurven (Kurven nicht gezeigt) lieferten schließlich die Effizienz für das jeweilige Gen (s. Tab. 30). Die ermittelten Effizienzwerte liegen zwischen 1,82 und 1,90 (bzw. 91,1 % und 95,1 %) und damit genau in dem Bereich (1,7 bis 1,9), der für Effizienzen unter optimierten Reaktionsbedingungen angegeben wird (Pfaffl 2004).

Tab. 30: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der quantitativen Real-Time-PCR von Proben, die der Ermittlung der Real-Time-PCR-Effizienz für die vier angegebenen Gene mittels einer Standardkurve dienten (Nähere Erläuterungen: s. Text).

Gen	Schmelzpunkt in °C (ungefähre Angabe)	Bereich Ct-Werte (ungefähre Angabe)	Effizienz
Tpp2p	77,5	22-28	1,85
Tpp3p	82,0	21-26	1,90
Tpp5p	81,5	22-27	1,82
Tpp9p	77,5	25-30	1,88

Es kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse für die vier untersuchten Tpp-Gene (s. Kap. 5.4.2), d.h. die Schmelzkurven und die ermittelten Effizienzen (s. Tab. 30), zufriedenstellend waren, so dass die gewählten PCR-Bedingungen und Primer sowie die durch Primertitration bestimmte optimale Primerkonzentration von 250-500 nM je Primer geeignet waren, um mittels des optimierten qPCR-Systems zeitliche Änderungen des mRNA-Levels der vier Gene (s. Kap. 5.4.3.2) zu verfolgen. Die

angegebenen Effizienzen (s. Tab. 30) wurden in allen weiteren Messungen zur Effizienzkorrektur benutzt bzw. für jede qPCR neu ermittelt, wobei keine deutlichen Abweichungen der Werte voneinander auftraten.

5.4.3.2 Ermittlung von zeitlichen Änderungen des mRNA-Levels

In der vorliegenden Arbeit sollte die Expression der potentiell phagosomalen Gene Tpp2p, Tpp3p, Tpp5p und Tpp9p (s. Kap. 5.4.2) überprüft werden, wobei zeitliche Änderungen des mRNA-Levels während der Phagosomenreifung verfolgt wurden. Ziel hierbei war es, herauszufinden, ob die entsprechenden Proteine, die in der MudPIT-Analyse identifiziert wurden (s. Tab. 29), tatsächlich in Phagosomen lokalisiert sind bzw. zu welchem Zeitpunkt der Phagosomenreifung sie eine Rolle spielen. Mittels der Methode der quantitativen Real-Time-PCR sollte am Beispiel der oben genannten Tpp-Proteine außerdem überprüft werden, ob die stadienspezifischen Änderungen der Proteinzusammensetzung, die in den drei Phagosomenstadien bei der MudPIT-Analyse zu erkennen waren (s. Tab. 29), bestätigt werden können.

Um das mRNA-Level zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Phagosomenreifung analysieren zu können, wurden *T. thermophila*-Zellen mit Magnetobeads (s. Kap. 4.11) gefüttert, wodurch die Bildung von Phagosomen induziert wird. Die RNA wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten der Zellen (Nullprobe = vor Induktion, 30 sek, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h und 2 h) isoliert (s. Kap. 4.2.4) und in cDNA umgeschrieben (s. Kap. 4.5). In die im Anschluss durchgeführte qPCR wurden 100 ng der entsprechenden cDNA als Ausgangsmenge eingesetzt. Wie auch bei der Erstellung der Standardkurven (s. Kap. 5.4.3.1) wurden die Proben nach der Durchführung der qPCR mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (s. Abb. 21; A: Tpp2p, B: Tpp3p, C: Tpp5p, D: Tpp9p). Für jedes der vier Tpp-Gene wurde außer der für das jeweilige PCR-Fragment erwarteten Bande keine weitere Bande detektiert (s. Abb. 21), so dass sich hiermit erneut bestätigte, dass das qPCR-System für die vorliegende Fragestellung erfolgreich etabliert wurde.

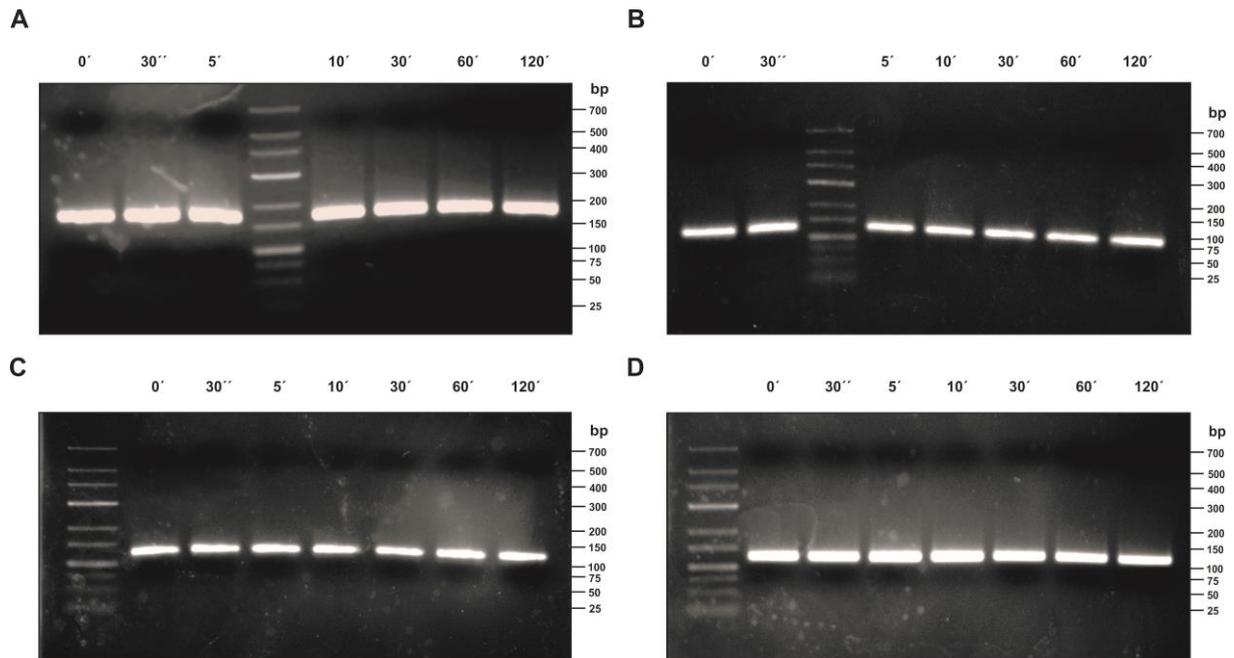


Abb. 21: Gelelektrophoretische Analyse der qPCR-Ansätze zur Amplifikation von Fragmenten von Tpp-Genen (Tpp: *Tetrahymena* phagosomal proteome). Amplifiziert wurden **A)** ein 167 bp-Fragment des Tpp2p-Gens, **B)** ein 125 bp-Fragment des Tpp3p-Gens, **C)** ein 121 bp-Fragment des Tpp5p-Gens und **D)** ein 119 bp-Fragment des Tpp9p-Gens. **A-D)** Aufgetragen wurden Proben von qPCR-Ansätzen, die mit cDNA durchgeführt wurden, die durch Reverse Transkription aus RNA erhalten wurde, die zu bestimmten Zeitpunkten nach der Fütterung von *T. thermophila* mit Magnetobeads aus den Zellen isoliert wurde (0' = 0 min, 30'' = 30 sek, 5-120' = 5-120 min). Neben der erwarteten Bande der jeweiligen Fragmentgröße sind keine weiteren Banden zu erkennen. Die Größe der Markerbanden ist angegeben. Verwendet wurden 3%ige Agarosegele.

Nachfolgend wird das qPCR-System dahingehend, ob sich Expressionsänderungen der Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Phagosomenbildung verfolgen lassen, überprüft (s. Kap. 5.4.3.2.1). Die Ergebnisse der quantitativen Real-Time-PCR, die für das jeweilige Tpp-Gen erhalten wurden, werden in den darauf folgenden Kapiteln vorgestellt und näher erläutert (s. Kap. 5.4.3.2.2 bis 5.4.3.2.5).

5.4.3.2.1 Überprüfung des Systems

Um auszuschließen, dass die nachfolgend für die Tpp-Gene beobachteten Expressionsänderungen (s. Kap. 5.4.3.2.2 bis 5.4.3.2.5) *nicht* auf der unterschiedlichen Inkubationszeit beruhen, wurde eine qPCR mit Primern (s. Tab. 8) zur Amplifikation eines 110 bp Fragments des Gens Vps13 (8.m00549) durchgeführt. Hierbei wurden fünf identische Ansätze mit einem cDNA-Mix aller Zeitpunkte als

Template analysiert, wobei einer der Ansätze als Kalibrator diene. Das erhaltene Ergebnis ist in Abb. 22 dargestellt.

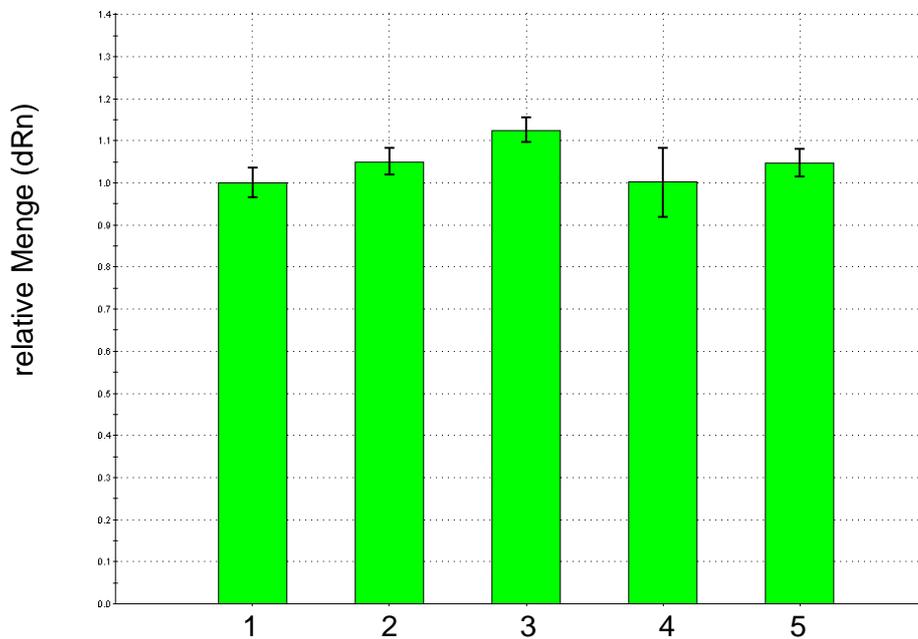


Abb. 22: Überprüfung des qPCR-Systems (dRn = delta Rn; Rn: normalisiertes Reportersignal). Das Balkendiagramm gibt die relative Menge der mRNA (dRn) für das Gen Vps13 an. Es wurden fünf identische Ansätze analysiert (1-5). Ansatz 1 diene als Referenz für die anderen Proben (relative Menge = 1). Gemessen wurden jeweils Tripletts (Fehlerbalken).

Wie erwartet ergaben sich für die Expression des Vps13-Gens in den verschiedenen Proben kaum Unterschiede. Das mRNA-Level lag annähernd konstant bei 1 (Werte von 1 bis 1.12, s. Abb. 22). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass für die Tpp-Gene Expressionsunterschiede beobachtet werden können, die nicht auf Messfehler oder ein ungeeignetes qPCR-System, sondern tatsächlich auf die unterschiedlichen phagosomalen Stadien zurückzuführen sind.

5.4.3.2.2 Tpp2p

Abb. 23 zeigt in Form eines Balkendiagramms die zeitlichen Änderungen des mRNA-Levels für das Tpp2p-Gen (130.m00077). Die relative Menge der mRNA für die unterschiedlichen untersuchten Zeitpunkte (0' = 0 min, 30'' = 30 sek, 5-120' = 5-120 min) ist angegeben, wobei die Nullprobe (0'), die sich auf das mRNA-Level der

Zelle bezieht *bevor* durch Fütterung mit Magnetobeads die Phagosomenbildung induziert wurde, als Referenz diente. Die relative mRNA-Menge dieser Probe wurde auf einen Wert von 1 gesetzt (Kalibrator). Alle weiteren Werte wurden relativ zu diesem Wert angegeben.

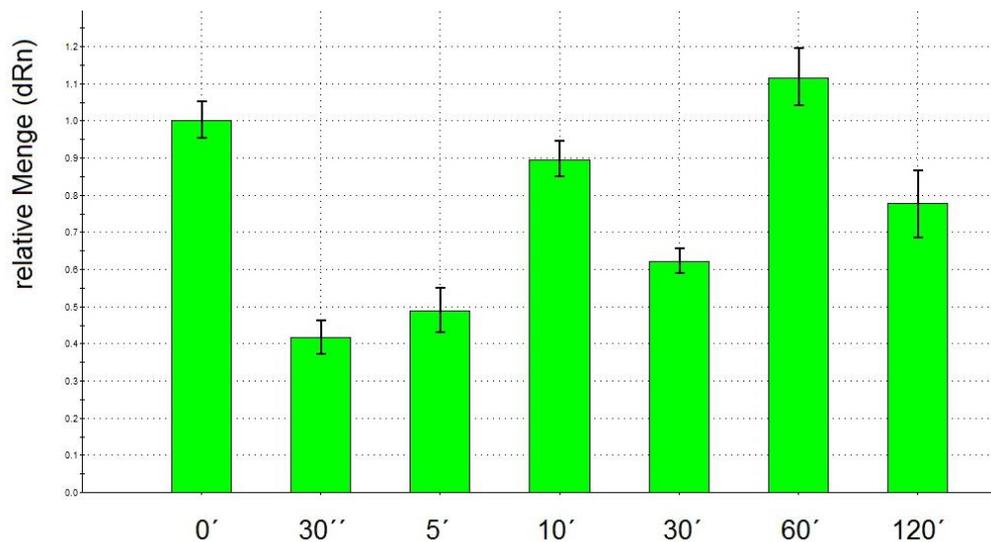


Abb. 23: Darstellung der zeitlichen Änderungen des mRNA-Levels für Tpp2p (dRn = delta Rn; Rn: normalisiertes Reportersignal). Das Balkendiagramm gibt die relative Menge der mRNA (dRn) für unterschiedliche Zeitpunkte an (0' = 0 min, 30'' = 30 sek, 5-120' = 5-120 min). Die Nullprobe (0'), die sich auf das mRNA-Level der Zelle bezieht *bevor* durch Fütterung mit Magnetobeads die Phagosomenbildung induziert wurde, diente als Referenz für die anderen Proben (relative Menge = 1). Gemessen wurden jeweils Triplets (Fehlerbalken).

Die Abbildung zeigt, dass das mRNA-Level des Tpp2p-Gens nach der Fütterung auf einen Wert von etwa 0,4 abnimmt (30''), wohingegen es zu den weiteren Zeitpunkten wieder höher als 0,4 ist. Es ist kein deutlicher Trend des mRNA-Levels zu erkennen, d.h. mit zunehmender Zeit nimmt die Expression weder kontinuierlich zu noch ab. Vielmehr sind Schwankungen der Expression zu beobachten. Lediglich 60 min nach der Fütterung wurde ein Wert erhalten (> 1,1), der größer ist als der der Nullprobe (s. Abb. 23). Für ein Protein, das (hauptsächlich) an der Phagozytose beteiligt ist, wäre zu erwarten gewesen, dass das mRNA-Level im Vergleich zur Nullprobe deutlich höher ist und Werte weit über 1 erhalten werden. Dennoch kann festgehalten werden, dass die Expression des Tpp2p-Gens ab einem Zeitpunkt von 5 min höher zu sein scheint als im naszenten Phagosom, was den Ergebnissen der MudPIT-Analyse, die darauf hindeuten, dass Tpp2p nur in naszenten Phagosomen vorkommt (s. Tab. 29),

widersprechen würde. Dieser Widerspruch könnte auf verschiedenste Weise erklärt werden. Da die quantitative PCR die empfindlichere Methode ist, liegt zunächst die Vermutung nahe, dass mittels der MudPIT-Analyse die Identifikation des Tpp2p-Proteins in 5 und 10 min alten Phagosomen nicht erfolgte, obwohl das Protein eventuell zu diesen Zeitpunkten in Phagosomen vorhanden ist. Möglicherweise ist das geringere mRNA-Level in naszenten Phagosomen im Vergleich zu den Zeitpunkten 5 und 10 min (s. Abb. 23) auch darauf zurückzuführen, dass die Translation bereits stattgefunden hat, so dass in der MudPIT-Analyse Tpp2p in naszenten und nicht in 5 und 10 min alten Phagosomen nachgewiesen werden konnte (s. Tab. 29). Außerdem müssen weitere Analysen durchgeführt werden, um auszuschließen, dass das Protein in der MudPIT-Analyse in naszenten Phagosomen möglicherweise als Artefakt nachgewiesen wurde.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass ein Vergleich der MudPIT- und der qPCR-Ergebnisse ohnehin schwierig ist, da bei der MudPIT-Analyse isolierte Phagosomen untersucht wurden, wohingegen die Ergebnisse der Real-Time-PCR sich auf die gesamte Zelle beziehen, da es hierbei ja um mRNA geht, die in Phagosomen nicht vorhanden ist. Außerdem beruht die MudPIT-Analyse auf Betrachtung des Proteinlevels und die qPCR auf Betrachtung des mRNA-Levels.

Naheliegender als o.g. Annahmen ist daher, dass das mRNA- und das Proteinlevel nicht miteinander korrelieren. Da mRNA schließlich in das entsprechende Protein translatiert wird, geht man in der Regel von einer Korrelation zwischen mRNA- und Proteinlevel aus. Eine fehlende Korrelation wurde jedoch bereits häufig z.B. in menschlichen Krebs- oder in Hefezellen beobachtet (Greenbaum *et al.* 2003). Hierfür gibt es verschiedene Gründe. Zum einen stellen komplizierte und vielfältige posttranskriptionale Modifikationen einen Schlüsselaspekt bei der Synthese des nativen Proteins dar, so dass Proteinkonzentrationen nicht direkt vom mRNA-Level abgelesen werden können (Szallasi 1999; Baldi & Long 2001). Zum anderen besitzen Proteine unterschiedliche Halbwertszeiten, die auf einer variierenden Proteinsynthese sowie auf Abbauprozessen beruhen (Greenbaum *et al.* 2003). Darüber hinaus sind Protein- und mRNA-Experimente gleichermaßen mit Fehlern behaftet, so dass die Möglichkeit, sich ein klares Bild zu machen, eingeschränkt wird (Szallasi 1999; Baldi & Long 2001).

Aufgrund der möglicherweise fehlenden Korrelation von mRNA- und Proteinlevel sind die qPCR-Experimente als Ergänzung und nicht als Überprüfung der MudPIT-Analysen anzusehen. Für ein umfassendes Verständnis, wie die Zelle arbeitet, sind Messungen des mRNA- und des Proteinlevels gleichermaßen unerlässlich (Hatzimanikatis *et al.* 1999).

Eine Bestätigung der Annahme, dass es sich bei Tpp2p um ein rein phagosomales Protein handelt, lieferte das in Abb. 23 gezeigte Ergebnis der quantitativen PCR nicht. Für ein rein phagosomales Protein wären nach Induktion der Phagozytose deutlich höhere mRNA-Mengen zu erwarten gewesen. Möglicherweise ist Tpp2p an der Phagozytose beteiligt, besitzt jedoch darüber hinaus noch eine oder mehrere andere Funktionen in der Zelle, so dass die Induktion der Phagozytose sich nicht in einem deutlichen Anstieg der mRNA-Menge äußert.

Letztendlich sind es jedoch die Konzentrationen der Proteine sowie deren Interaktionen, die das Geschehen in der Zelle beeinflussen. Da Tpp2p in naszenten Phagosomen mittels MudPIT nachgewiesen wurde (s. Tab. 29), ist davon auszugehen, dass Tpp2p (neben anderen Funktionen) eine Funktion bei der Bildung von Phagosomen besitzt.

Um das Tpp2p-Protein weiter zu charakterisieren, wurde mit Hilfe des TMHMM Servers (s. Kap. 3.14), das der Vorhersage von Transmembranhelices in Proteinen dient, die Struktur des Proteins, für das 247 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 27,9 kDa angegeben werden, näher betrachtet. Abb. 24 gibt als erhaltenes Ergebnis die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Bereiche des Proteins (AS: Aminosäuren) an den angegebenen Stellen (Transmembran: Rot, Innen/im Phagosom: Blau, Außen/Cytoplasma: Pink) lokalisiert sind. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass für das Tpp2p-Protein eine Transmembranhelix, die sich in der Nähe des C-Terminus befindet, vorhergesagt wird (s. Abb. 24). Der größte Teil des Proteins befindet sich mit dem N-Terminus außerhalb der Phagosomenmembran im Cytoplasma (s. Abb. 24).

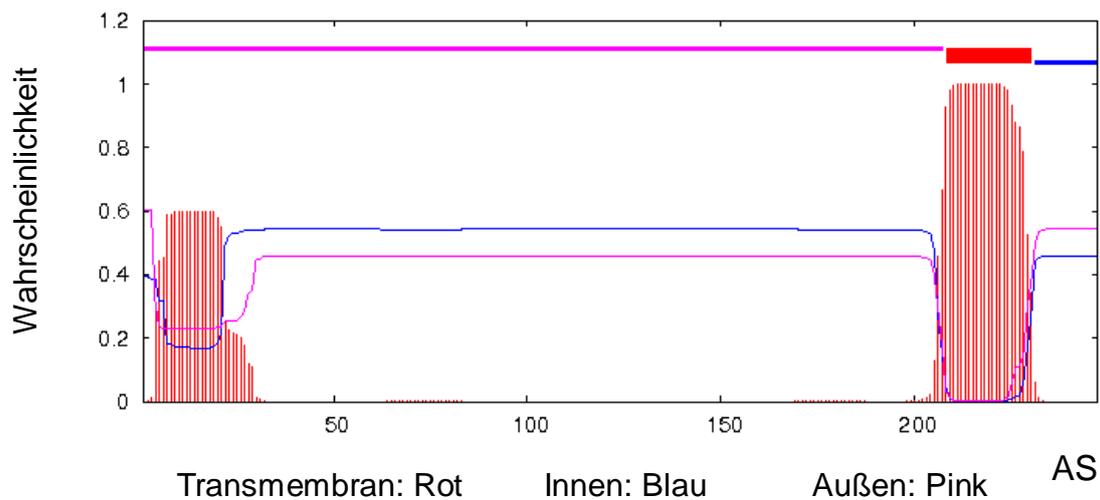


Abb. 24: Vorhersage von Transmembranhelices des Tpp2p-Proteins (TMHMM Server v. 2.0). Die Wahrscheinlichkeit, mit der sich die Bereiche des Proteins (AS: Aminosäuren) an den angegebenen Stellen (Transmembran: Rot, Innen/im Phagosom: Blau, Außen/Cytoplasma: Pink) befinden, ist angegeben. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass für das Tpp2p-Protein eine Transmembranhelix in der Nähe des C-Terminus vorhergesagt wird.

Nach Angaben der *Tetrahymena* Genom-Datenbank (TGD) werden für das hypothetische Protein (130.m00077) mit unbekannter Funktion zwei Domänen vorausgesagt (*flagellar protein FliS* und *Cytochrome c oxidase subunit Ila*), die keine Hinweise auf eine phagosomale Funktion des Proteins geben. Außerdem wird als homologes Protein lediglich ein hypothetisches Protein (254 AS) aus *Tetrahymena borealis* angegeben (TGD).

Fluoreszenzanalysen des GFP-fusionierten Tpp2p-Proteins lassen jedoch auf eine Lokalisation des Proteins sowohl in Phagosomen als auch in der kontraktilen Vakuole von *T. thermophila* schließen (Jacobs *et al.* 2006). Eine interessante Alternative dazu, dass die Lokalisation von Tpp2p in Phagosomen und in der kontraktilen Vakuole unabhängig voneinander verläuft, stellt die Überlegung dar, dass eine Art von Vesikeltransport zwischen den beiden Organellen stattfindet (Jacobs *et al.* 2006). Die Struktur des vorhergesagten Proteins (s. Abb. 24) deutet darauf hin, dass hier eventuell ein Transportprotein vorliegt, das mit seinem größeren cytoplasmatischen Teil ein Substrat bindet und über die Membran in das Phagosomeninnere transportiert. Eine denkbare Funktion des Tpp2p-Proteins wäre demnach eine Beteiligung am Vesikeltransport zwischen Phagosom und kontraktiler Vakuole.

5.4.3.2.3 Tpp3p

Tpp3p (50.m00189) wurde in der MudPIT-Analyse in 5 und 10 min alten, jedoch nicht in naszenten Phagosomen identifiziert (s. Tab. 29). Die Ergebnisse der qPCR-Analyse, bei der das mRNA-Level nach unterschiedlichen Inkubationszeiten der Zellen nach Fütterung mit Magnetobeads detektiert wurde (s. Abb. 25), bestätigen das Ergebnis der MudPIT-Analyse, da das mRNA-Level in den Zellen nach 5- und 10-minütiger Inkubation (kondensierte Phagosomen) im Vergleich zu Zellen, die nur 30 sek inkubiert wurden (naszente Phagosomen), höher ist. Hier scheinen mRNA- und Proteinlevel eindeutig miteinander zu korrelieren.

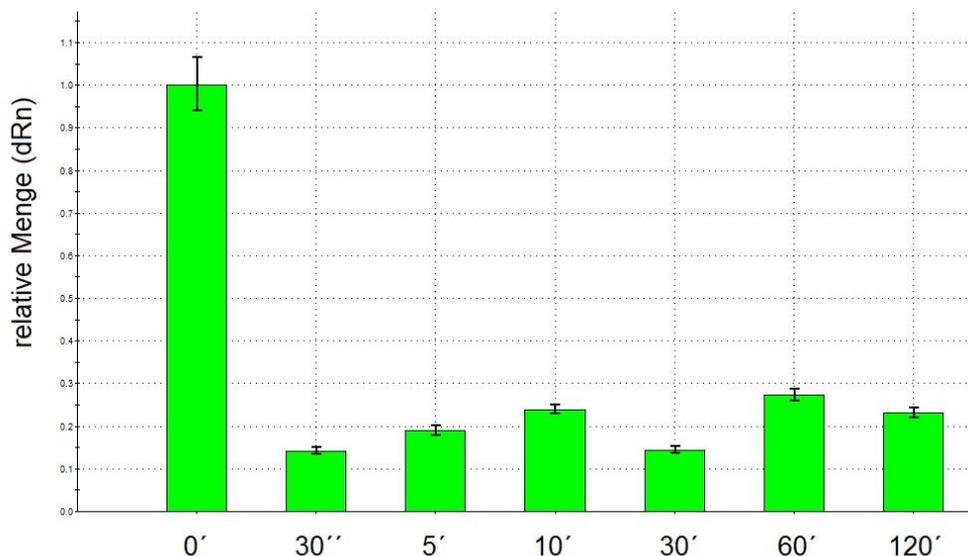


Abb. 25: Darstellung der zeitlichen Änderungen des mRNA-Niveaus für Tpp3p (dRn = delta Rn; Rn: normalisiertes Reportersignal). Das Balkendiagramm gibt die relative Menge der mRNA (dRn) für die unterschiedlichen untersuchten Zeitpunkte an (0' = 0 min, 30'' = 30 sek, 5-120' = 5-120 min). Die Nullprobe (0'), die sich auf das mRNA-Level der Zelle bezieht *bevor* durch Fütterung mit Magnetobeads die Phagosomenbildung induziert wurde, diente als Referenz für die anderen Proben (relative Menge = 1). Gemessen wurden jeweils Triplets (Fehlerbalken).

Es fällt jedoch auf, dass im Vergleich zur Nullprobe, deren relative mRNA-Menge auf einen Wert von 1 gesetzt wurde (Kalibrator), alle weiteren Werte deutlich kleiner sind. Hier liegt das mRNA-Level in allen Fällen unter 0,3 (s. Abb. 25). Eine mögliche Interpretation der vorliegenden zeitlichen Daten ist, dass aufgrund der nicht ausschließlichen Funktion des Tpp3p bei der Phagozytose eine größere Menge an mRNA vorliegt, primär um für weitere (nicht bekannte) Funktionen das Protein

herzustellen. Wird nun die Phagozytose induziert, sinkt das mRNA Level sofort ab, weil die mRNA direkt in Proteine translatiert wird und somit schlechter nachweisbar ist. Auch in der MudPIT-Analyse wurde das Tpp3p-Protein in je nur einer von drei (10 min) bzw. vier (5 min) untersuchten Proben nachgewiesen (s. Tab. 29). Demnach deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass Tpp3p möglicherweise nicht vorwiegend in Phagosomen vorliegt bzw. dass das Protein neben einer Funktion im Phagozytoseprozess weitere Funktionen besitzt. Da das Protein im Vergleich zum naszenten Phagosom hauptsächlich in kondensierten Phagosomen (5 und 10 min) vorliegt, scheint es eine Rolle bei der Phagosomenreifung zu spielen. Identifiziert, jedoch nicht näher charakterisiert wurde Tpp3p auch in der Studie von Jacobs *et al.* (Jacobs *et al.* 2006). Außerdem konnten Maicher und Tiedtke vier Peptide in naszenten und kondensierten Phagosomen nachweisen (Maicher & Tiedtke 1999), die vom Tpp3p-Protein abgeleitet sind.

Für Tpp3p, das 294 AS und ein Molekulargewicht von 32,1 kDa aufweist, wird vorausgesagt, dass es keine Transmembranhelix beinhaltet (TMHMM Server, s. Abb. 26). Diese Vorhersage deutet darauf hin, dass das Protein als peripheres Membranprotein mit der Phagosomenmembran assoziiert vorliegt und jedoch nicht fest in ihr verankert ist.

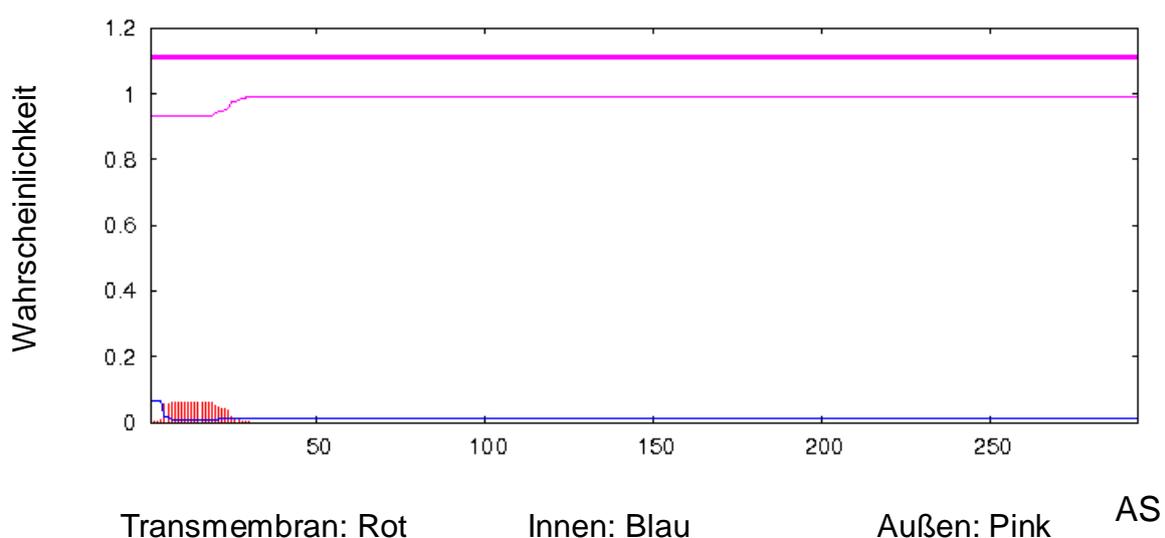


Abb. 26: Vorhersage von Transmembranhelices des Tpp3p-Proteins (TMHMM Server v. 2.0). Die Wahrscheinlichkeit, mit der sich die Bereiche des Proteins (AS: Aminosäuren) an den angegebenen Stellen (Transmembran: Rot, Innen/im Phagosom: Blau, Außen/Cytoplasma: Pink) befinden, ist angegeben.

Außerdem wird vorausgesagt, dass das Tpp3p-Gen ein Protein mit einer Di-trans,poly-cis-Decaprenylcistransferase-Domäne codiert (TGD, s. Kap. 3.14), die in den meisten Organismen in die Biosynthese von Glycosylcarrier-Lipiden involviert ist (Hemmi *et al.* 2001) und zum Beispiel im Endoplasmatischen Retikulum Glycokomponenten an Proteine übertragen kann.

Abgesehen von einem homologen Protein mit 297 AS in *T. borealis* (hypothetisches Protein) existieren keine weiteren homologen Proteine in anderen Organismen (TGD, s. Kap. 3.14).

5.4.3.2.4 Tpp5p

Das Protein Tpp5p (129.m00110) mit 311 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 35,3 kDA weist keine besonderen funktionellen Merkmale auf. Es sind keine Domänen mit bestimmter Funktion bekannt (TGD, s. Kap. 3.14). Außerdem scheint Tpp5p keine Transmembranhelices zu besitzen (TMHMM Server, s. Abb. 27). Jedoch geben Jacobs *et al.* in ihrer Studie zum *Tetrahymena* Phagosomenproteom (Jacobs *et al.* 2006) an, dass die Struktur des Proteins sechs Wiederholungen einer 42 AS-Sequenz beinhaltet.

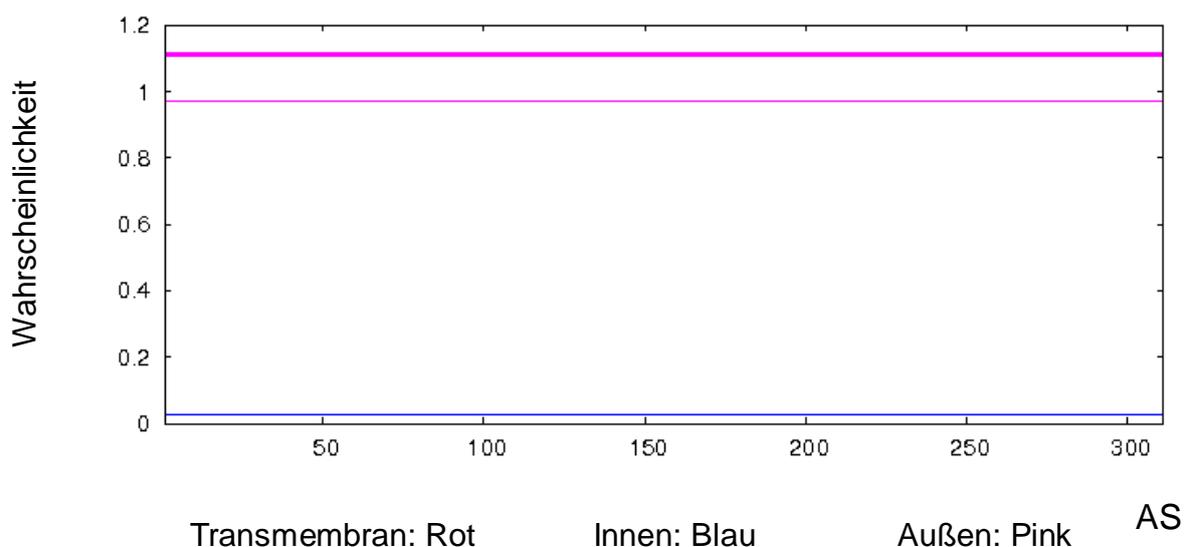


Abb. 27: Vorhersage von Transmembranhelices des Tpp5p-Proteins (TMHMM Server v. 2.0). Die Wahrscheinlichkeit, mit der sich die Bereiche des Proteins (AS: Aminosäuren) an den angegebenen Stellen (Transmembran: Rot, Innen/im Phagosom: Blau, Außen/Cytoplasma: Pink) befinden, ist angegeben.

Es wurde je ein Protein in *T. borealis* (hypothetisches Protein) und *Paramecium tetraurelia* gefunden (TGD, s. Kap. 3.14). Einen Hinweis auf die Funktion von Tpp5p gibt die Tatsache, dass das homologe *Paramecium*-Protein zwei Ricin B-ähnliche Lektin-Domänen enthält (TGD, s. Kap. 3.14), die am Polysaccharidmetabolismus und -transport beteiligt sind (s. <http://supfam2.cs.bris.ac.uk/SUPERFAMILY/cgi-bin/scop.cgi?sunid=50370>).

Abb. 28 gibt die zeitlichen Änderungen des mRNA-Levels für das Tpp5p-Gen in Form eines Balkendiagramms an. Wie bereits beschrieben, wurde hierbei die relative Menge der mRNA für die unterschiedlichen untersuchten Zeitpunkte (30'' = 30 sek, 5-120' = 5-120 min) auf die Nullprobe (0' = 0 min, s. Abb. 28) kalibriert, die das mRNA-Level der Zelle angibt *bevor* die Phagosomenbildung durch Fütterung mit Magnetobeads induziert wurde (relative Menge = 1).

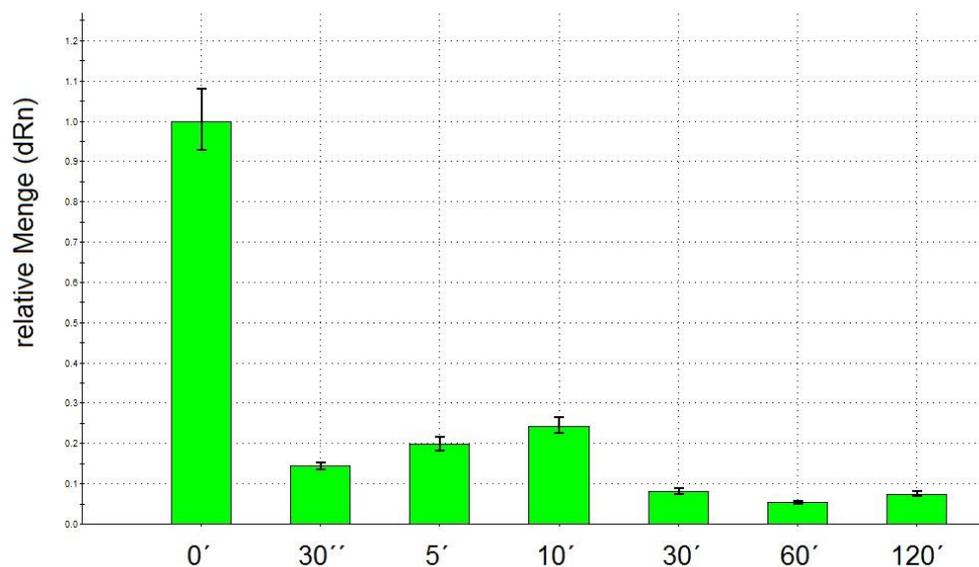


Abb. 28: Darstellung der zeitlichen Änderungen des mRNA-Levels für Tpp5p (dRn = delta Rn; Rn: normalisiertes Reportersignal). Das Balkendiagramm gibt die relative Menge der mRNA (dRn) für die unterschiedlichen untersuchten Zeitpunkte an (0' = 0 min, 30'' = 30 sek, 5-120' = 5-120 min). Die Nullprobe (0'), die sich auf das mRNA-Level der Zelle bezieht *bevor* durch Fütterung mit Magnetobeads die Phagosomenbildung induziert wurde, diente als Referenz für die anderen Proben (relative Menge = 1). Gemessen wurden jeweils Triplets (Fehlerbalken).

Es wird deutlich, dass für alle untersuchten Zeitpunkte ein deutlich geringeres mRNA-Level detektiert wurde als in der Nullprobe. Auch hier gilt die gleiche Annahme wie bei der Analyse der Tpp3p-mRNA: Eine Grundmenge an mRNA ist vorhanden, weil das

Gen nicht nur in Phagosomen eine Rolle spielt. Diese Menge wird aber nach der Induktion mit Cadmium sofort in das Protein translatiert, das auch für die Phagozytose benötigt wird. Das höchste mRNA-Level (etwa 0,25) wurde für die 10⁻⁷-Probe erhalten (s. Abb. 28). Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass das Tpp5p-Protein keine wesentliche Rolle in der Phagozytose bei *T. thermophila* zu spielen scheint, was Jacobs *et al.* den Ergebnissen ihrer Studie zufolge ebenfalls annehmen (Jacobs *et al.* 2006). Jacobs *et al.* konnten in Tpp5p::GFP-Transformanten eine Fluoreszenz im Cytoplasma und im Zellkern, jedoch nicht in Phagosomen beobachten, wobei sie nicht ausschließen, dass möglicherweise die GFP-Fusion eine Mislokalisierung des Proteins zur Folge hat (Jacobs *et al.* 2006). Tpp5p wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, um nähere Informationen hinsichtlich der Lokalisation des Proteins zu erhalten.

Die leichte Zunahme der Fluoreszenz bzw. des mRNA-Levels beim Übergang von 30 sek zu 5 und 10 min (s. Abb. 28) stimmt nicht mit den Ergebnissen der MudPIT-Analyse, nach denen Tpp5p in naszenten (30 sek) und 10 min alten Phagosomen vorkommt (s. Tab. 29), überein. Auch hier scheint keine Korrelation von mRNA- und Proteinlevel vorzuliegen. Da Tpp5p in der MudPIT-Analyse in den beiden Stadien (30 sek und 10 min) in je 2 Proben gefunden wurde, ist von einer Funktion des Proteins sowohl bei der Phagosomenbildung als auch bei der Phagosomenreifung auszugehen. Dass es sich hier um eine Kontamination, die während der Phagosomenisolation aufgetreten ist, handelt, ist unwahrscheinlich, da in der vorliegenden Arbeit insgesamt 15 Peptide (s. Tab. 29) zur Identifikation des Proteins führten und der Nachweis von Jacobs *et al.* (Jacobs *et al.* 2006) ebenso erfolgte.

Die mRNA-Analyse lässt annehmen, dass Tpp5p vor allem an den ersten Schritten der Phagosomenreifung beteiligt ist, da das mRNA-Level nach 10 min wieder abzunehmen scheint (s. Abb. 28). Wie bereits erwähnt, wäre für ein rein phagosomales Protein jedoch eine starke Zunahme des mRNA-Levels nach Induktion der Phagozytose zu erwarten gewesen. Demnach besitzt das Protein eventuell weitere Funktionen in der Zelle.

5.4.3.2.5 Tpp9p

In Abb. 29 sind die zeitlichen Änderungen des mRNA-Levels für das Tpp9p-Gen (159.m00051) dargestellt. Das Ergebnis ähnelt stark den Ergebnissen, die für Tpp3p (s. Abb. 25) und Tpp5p (s. Abb. 28) erhalten wurden. Nach Induktion der Phagosomenbildung (durch Fütterung mit Magnetobeads) scheint die Expression des Gens deutlich abzunehmen, da die relative mRNA-Menge auf Werte $< 0,4$ sinkt (ab 30 sek, s. Abb. 29). Auch hier wird genauso vermutet, dass das Protein nicht ausschließlich für phagosomale Zwecke zur Verfügung steht und daher das mRNA-Level nach Induktion abnimmt.

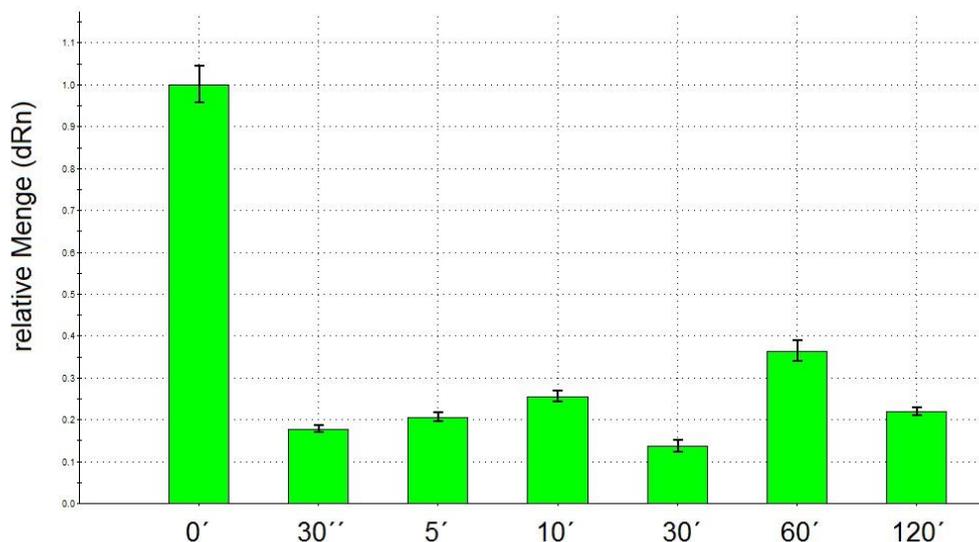


Abb. 29: Darstellung der zeitlichen Änderungen des mRNA-Levels für Tpp9p (dRn = delta Rn; Rn: normalisiertes Reportersignal). Das Balkendiagramm gibt die relative Menge der mRNA (dRn) für die unterschiedlichen untersuchten Zeitpunkte an (0' = 0 min, 30'' = 30 sek, 5-120' = 5-120 min). Die Nullprobe (0'), die sich auf das mRNA-Level der Zelle bezieht *bevor* durch Fütterung mit Magnetobeads die Phagosomenbildung induziert wurde, diente als Referenz für die anderen Proben (relative Menge = 1). Gemessen wurden jeweils Triplets (Fehlerbalken).

Vergleicht man die Ergebnisse für 30 sek, 5 min und 10 min Inkubationszeit, fällt auf, dass das mRNA-Level mit zunehmender Inkubation etwas ansteigt (s. Abb. 29), was damit übereinstimmen würde, dass Tpp9p in der MudPIT-Analyse lediglich in 10 min alten Phagosomen nachgewiesen werden konnte (s. Tab. 29).

Das Tpp9p-Gen codiert ein vorhergesagtes Protein, das aus 202 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 22,6 kDa besitzt. Als homologes Protein wird lediglich ein hypothetisches Protein von *T. borealis* angegeben (TGD, s. Kap. 3.14).

Die Anzahl der vorhergesagten Transmembranhelices (TMHMM Server, s. Kap. 3.14) für das Tpp9p-Protein beträgt drei (s. Abb. 30), was zu der Angabe passt, dass Tpp9p eine Reticulon-Domäne aufweist (TGD, s. Kap. 3.14), da die Reticulon-Familie eine große und vielfältige Gruppe Membran-assoziiierter Proteine in Eukaryoten darstellt (Yang & Strittmatter 2007). Reticulons besitzen diverse Funktionen, hauptsächlich sind sie jedoch im ER lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass sie Einfluss auf den Transport vom ER zum Golgi-Apparat, die Vesikelbildung und die Morphogenese von Membranen nehmen (Yang & Strittmatter 2007).

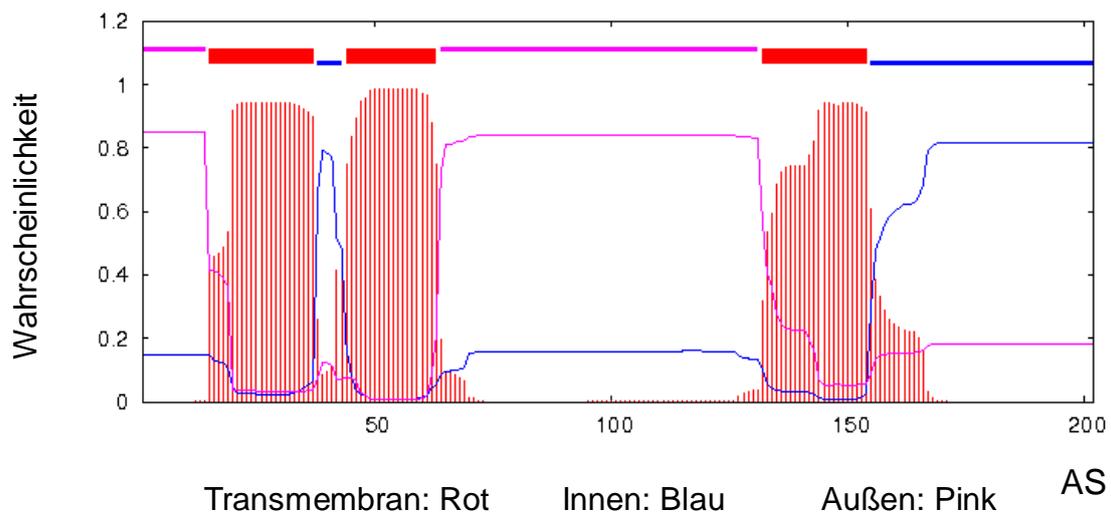


Abb. 30: Vorhersage von Transmembranhelices des Tpp9p-Proteins (TMHMM Server v. 2.0). Die Wahrscheinlichkeit, mit der sich die Bereiche des Proteins (AS: Aminosäuren) an den angegebenen Stellen (Transmembran: Rot, Innen/im Phagosom: Blau, Außen/Cytoplasma: Pink) befinden, ist angegeben. Wie in der Abbildung gezeigt, werden für das Tpp9p-Protein drei Transmembranhelices vorhergesagt.

Die dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Tpp9p wie Tpp3p vor allem an der Phagosomenreifung beteiligt ist. Möglicherweise spielt das Protein als phagosomales Membranprotein bei Fusionsprozessen, die während der Reifung des Phagosoms stattfinden, eine Rolle. Wie auch vor allem für Tpp3p und Tpp5p ist jedoch auch für Tpp9p davon auszugehen, dass es sich um ein Protein handelt, das lediglich

teilweise an der Phagozytose beteiligt ist. Auch hier wären sonst deutlich höhere mRNA-Level zu erwarten gewesen.

Hinsichtlich des Tpp9p-Proteins weisen die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen von Transformanten mit Tpp9p::GFP von Jacobs *et al.* darauf hin, dass das Protein vorübergehend mit Phagosomen interagiert und im Anschluss recycelt und zum Oralapparat zurück transportiert wird, wo es dann erneut mit naszenten Phagosomen interagieren kann (Jacobs *et al.* 2006). Diese Interpretation der Ergebnisse muss jedoch durch weitere Analysen überprüft werden.

5.4.4 Fazit der qPCR-Analysen

Ziel der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten qPCR-Analyse der Tpp (*Tetrahymena* phagosomal proteome)-Gene Tpp2p, Tpp3p, Tpp5p und Tpp9p (s. Tab. 29) war es, zeitliche Änderungen des Expressionslevels der jeweiligen Gene nach Induktion der Phagozytose (durch Fütterung von *Tetrahymena* mit Magnetobeads) zu verfolgen. Zum einen sollten die Tpp-Proteine so hinsichtlich einer Funktion im Phagozytoseprozess bei *T. thermophila* überprüft bzw. zuvor angenommene Funktionen bestätigt werden und zum anderen sollte auf diese Weise festgestellt werden, ob sich mit der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten MudPIT-Analyse (s. Kap. 4.16 und 5.3) stadienspezifische Änderungen der Proteinzusammensetzung von Phagosomen nachweisen lassen.

Die Expression der Gene wurde in den Analysen auf eine sogenannte Nullprobe, d.h. eine Probe, die vor der Fütterung entnommen wurde, kalibriert. Das mRNA-Level dieser Probe wurde auf einen Wert von 1 gesetzt und alle weiteren gemessenen Werte wurden relativ zu diesem Wert angegeben. Durch Primertitrationen wurde die optimale Primerkonzentration bestimmt, die für alle untersuchten Gene bei 250-500 nM lag. Als Referenzgen wurde das *Housekeeping*-Gen SSU rRNA verwendet. Außerdem wurde eine Effizienzkorrektur der erhaltenen Ergebnisse durchgeführt (s. Kap. 5.4.1 und 5.4.3.1).

Bei der durchgeführten qPCR-Analyse wurde davon ausgegangen, dass Proteine mit einer Funktion in der Phagozytose nach Induktion der Phagozytose vermehrt benötigt und somit auch vermehrt gebildet werden. Demnach war für phagosomale Proteine bzw. die entsprechenden Gene eine starke Zunahme der Expression und damit des mRNA-Levels, welches in der quantitativen Real-Time-PCR bestimmt wird, zu erwarten. Das mRNA-Level müsste zu dem Zeitpunkt der Phagozytose, an dem das entsprechende Protein in den Phagozytoseprozess involviert ist, deutlich höher sein als in der Nullprobe. Die Ergebnisse der qPCR zeigen jedoch, dass eine für rein phagosomale Proteine erwartete deutliche Expressionszunahme nicht auftritt (s. Abb. 23, Abb. 25, Abb. 28 und Abb. 29). Die qPCR-Ergebnisse für die untersuchten Gene sind sehr ähnlich. Für alle vier Gene wird beim Übergang von 30 sek zu 5 und 10 min eine Zunahme der Expression beobachtet. Allgemein können ähnliche Tendenzen verzeichnet werden. In den meisten Fällen liegt das mRNA-Level deutlich unter 1. Lediglich für Tpp2p (s. Abb. 23), für das zwar auch gleiche Tendenzen zu erkennen sind, wurden etwas höhere mRNA-Level nachgewiesen als für die anderen Tpp-Gene, bei denen das mRNA-Level zu allen Zeitpunkten unter 0,4 lag (s. Abb. 25, Abb. 28 und Abb. 29). Für Tpp2p hingegen wurden nur Werte, die größer als 0,4 waren, verzeichnet (s. Abb. 23). Außerdem stellte die 60 sek Probe mit einem Wert von ca. 1,1 die einzige Probe dar, für die ein höheres mRNA-Level als in der Nullprobe nachgewiesen wurde (s. Abb. 23). Der Vergleich der Ergebnisse lässt folglich annehmen, dass von den vier untersuchten Genen bzw. Proteinen das Tpp2p-Protein den stärksten Kandidaten für ein rein phagosomales Protein darstellt. Doch auch in diesem Fall kann eine rein phagosomale Lokalisation des Proteins nicht bestätigt werden. Vielmehr deuten die qPCR-Ergebnisse darauf hin, dass die Tpp-Proteine neben einer Funktion in der Phagozytose noch eine oder mehrere weitere Funktionen in der Zelle besitzen oder aber im phagozytoseabhängigen Membranrecycling ständig benötigt werden.

Eine Überprüfung des verwendeten Systems zeigte, dass für gleiche Proben in der qPCR auch gleiche Ergebnisse erhalten werden (s. Kap. 5.4.3.2.1). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die für die Tpp-Gene beobachteten Expressionsunterschiede tatsächlich auf die unterschiedlichen phagosomalen Stadien zurückzuführen sind. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass in dem

Forschungsprojekt von V. Wittich für die Gene *Php1* und *Php2* zwar ähnliche Ergebnisse wie für die *Tpp*-Gene (also zwar eine Beteiligung der Proteine an der Phagozytose, aber keine ausschließliche phagosomale Funktion), für *Snare* (34.m00271) und das *Vps13*-Gen (8.m00549) jedoch deutlich höhere Werte von bis zu 1,6 erhalten wurden (V. Wittich, Dissertation, 2014). Dies weist deutlich darauf hin, dass *Snare* und *Vps13* maßgeblich an der Phagozytose beteiligt sind. Nach Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse kann demnach festgehalten werden, dass das verwendete qPCR-System geeignet ist, um die Beteiligung der Proteine/Gene an der Phagozytose anhand des zeitabhängigen mRNA-Levels zu belegen. Die hohe Sensitivität des Systems ermöglicht es, Expressionsänderungen, die auf unterschiedliche phagosomale Reifungsstadien zurückzuführen sind, zu beobachten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe der MudPIT-Methode ein Einblick in die Proteinzusammensetzung von Phagosomen gewonnen werden konnte. Eine Bestätigung der Annahme, dass mittels MudPIT genaue stadienspezifische Änderungen der Proteinzusammensetzung detektiert werden können, lieferten die vorliegenden qPCR-Ergebnisse nicht. Ziel war es, zu überprüfen, ob die Änderungen des mRNA-Levels mit den entsprechenden Änderungen auf Proteinebene übereinstimmen, um so die in der MudPIT-Analyse erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen. Der Vergleich der durch MudPIT und durch qPCR erhaltenen Ergebnisse zeigt jedoch weitestgehend keine Übereinstimmungen von mRNA- und Proteinlevel. Diese fehlende Korrelation wurde bereits häufiger beobachtet (Greenbaum *et al.* 2003) und können damit gebründet werden, dass posttranskriptionale Modifikationen die Synthese des nativen Proteins beeinflussen können (Szallasi 1999; Baldi & Long 2001). Außerdem besitzen Proteine unterschiedliche Halbwertszeiten, die auf einer variierenden Proteinsynthese sowie auf Abbauprozessen beruhen (Greenbaum *et al.* 2003) und dazu führen, dass sie auf der Proteinebene nicht mehr nachweisbar sind. Natürlich können auch Messfehler bei der Bestimmung von Protein- und mRNA-Level dazu führen, dass voneinander abweichende Resultate erhalten werden. Aufgrund der scheinbar fehlenden Korrelation von mRNA- und Proteinlevel sind die qPCR-Experimente neben der Klärung des zeitlichen Verlaufs nach der Induktion als Ergänzung und nicht als Überprüfung der MudPIT-Analysen anzusehen.

Zur Überprüfung, welche der Gene der entsprechenden in der MudPIT-Analyse identifizierten Proteine (s. Tab. 38) tatsächlich Proteine codieren, die eine Funktion bei der Phagozytose besitzen, wurden ausgewählte Proteine einer komplexen RNA_i-Analyse unterworfen (s. Kap. 5.5). Um auch solche Proteine untersuchen zu können, bei denen die Bestimmung der mRNA Levels auf eine ausschließliche Funktion bei der Phagozytose hindeutet, wurden auch Snare und Vps13 intensiv untersucht.

5.5 RNA_i-Analyse ausgewählter Gene

Basierend auf einer von Howard-Till und Yao entwickelten Methode des Gen-*Silencings* durch RNA-Interferenz in *Tetrahymena* (Howard-Till & Yao 2006) wurden in der vorliegenden Arbeit RNA_i-Analysen ausgewählter Gene durchgeführt. Ziel hierbei war es, die Funktionen der entsprechenden Proteine in der Phagozytose zu überprüfen und näher zu charakterisieren. Es sollten Bedingungen gefunden und optimiert werden, mit denen in den Zellen ein möglichst großer RNA_i-Effekt erzielt werden kann. Der Effekt sollte schließlich mikroskopisch überprüft werden, indem beobachtet wurde, ob dieser sich auf die Phagozytose von *T. thermophila* auswirkt. Nachfolgend werden die angewandte Methodik sowie die untersuchten Gene näher vorgestellt (s. Kap. 5.5.1 und 5.5.2).

5.5.1 RNA_i-Methodik

In Abb. 31 ist die Vorgehensweise bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten RNA_i-Analysen schematisch dargestellt. Zunächst wurden ausgewählte Sequenzen in einen entsprechenden Vektor (s. Abb. 31) kloniert und das erhaltene Konstrukt mittels einer Genkanone (s. Kap. 4.9.3) in *Tetrahymena*-Zellen transfiziert. Die selektierten Transformanten wurden schließlich mit Cadmium behandelt, um die Expression eines dsRNA-*Hairpins* zu induzieren (s. Abb. 31). Dieser *Hairpin* wird durch Enzyme wie das Ribonuklease-Enzym Dicer in 23-24 nt siRNAs gespalten, die höchstwahrscheinlich in den RNA-induzierten *Silencing*-Komplex (RISC) eingebaut werden, was schließlich zu einem gezielten Abbau der entsprechenden mRNA führt (s. Abb. 31; Howard-Till & Yao 2006). Der RNA_i-Effekt bzw. das Gen-*Silencing* wurde mittels OneStep RT-PCR

(s. Kap. 4.6.4 und Kap. 5.5.4.1) bzw. mittels quantitativer Real-Time-PCR (s. Kap. 4.6.5.2 und Kap. 5.5.4.2 bis 5.5.4.4) verfolgt.

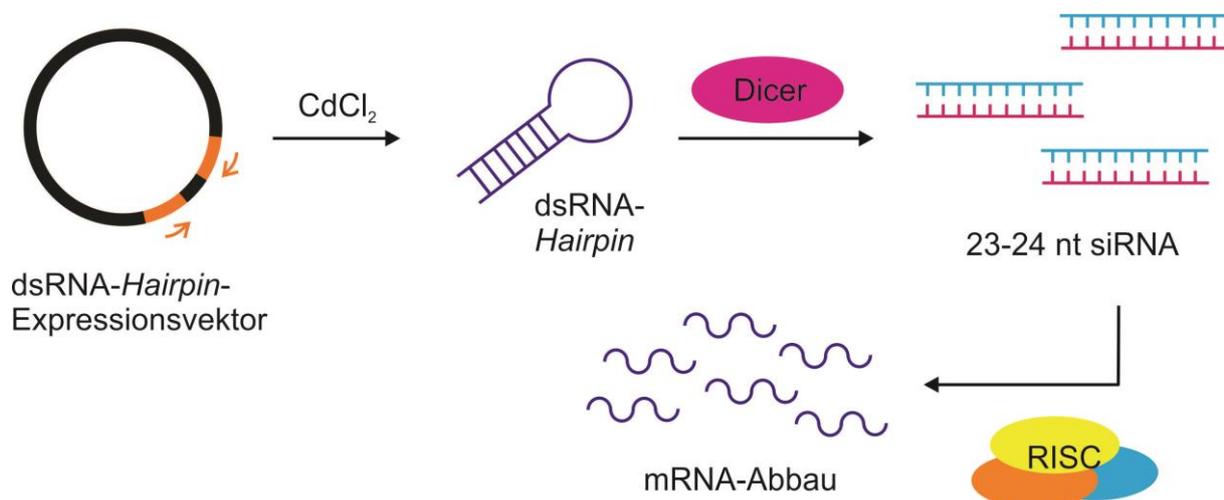


Abb. 31: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten RNA_i-Analysen ausgewählter Gene. Ein dsRNA-*Hairpin*-Expressionsvektor mit zwei zuvor eingebrachten Sequenzen des Zielgens (mit entgegengesetzter Orientierung) wurde in *Tetrahymena*-Zellen transfiziert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von Cadmiumchlorid (CdCl₂). Der gebildete *Hairpin* wird durch Enzyme wie z.B. Dicer in 23-24 nt siRNAs gespalten, die höchstwahrscheinlich in den RNA-induzierten *Silencing*-Komplex (RISC) eingebaut werden, was schließlich zu einem gezielten Abbau der entsprechenden mRNA führt.

Bei der traditionellen Methode zur Untersuchung von Genfunktionen wird vom Phänotypen auf den Genotypen geschlossen, indem Organismen mit durch Mutagenese induzierten auffälligen Phänotypen auf Genom-Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden (*forward genetics*). Im Gegensatz zu diesem Ansatz der klassischen Genetik wird in der modernen Genetik der reverse Ansatz genutzt (*reverse genetics*). Hierbei wird das Gen eines Zielproteins inhibiert und durch die Analyse des Phänotyps von Transformanten die Funktion des entsprechenden Gens ermittelt.

Eine dieser reversen Methoden zur Funktionsanalyse von Genen stellt die *antisense*-Technologie dar. Bei dieser Methode kommt es zur Genstilllegung, indem das entsprechende Gen durch eine Transformation von Wildtypen mit *antisense*-cDNA, deren RNA komplementär zu der RNA eines *sense*-Gens ist, zwar transkribiert, die gebildete mRNA jedoch nicht translatiert werden kann, da sie mit dem *antisense*-RNA-

Strang hybridisiert. Theoretisch kann auf diese Weise jedes beliebige Genprodukt vor der Translation selektiv stillgelegt werden, weshalb man sich in den 1980er Jahren einen großen Erfolg der *antisense*-Technologie in der Therapeutika-Entwicklung versprach. Als problematisch erwies sich jedoch die Freisetzung der *antisense*-Nukleinsäuren, da diese ein Molekulargewicht von über 1000 Da (Shuey *et al.* 2002) besitzen. Um dieses Problem zumindest teilweise zu umgehen, wurde die RNA-Interferenz (RNA_i) – Methode, die ebenfalls auf der Nukleinsäure-Technologie basiert, entwickelt.

Bei der RNA-Interferenz handelt es sich um einen Zellmechanismus in Eukaryoten, welcher der zielgerichteten Abschaltung von Genen dient. Es wird vermutet, dass die RNA-Interferenz unter anderem ein Schutzmechanismus der Zelle gegen "zellfremde" RNA (z.B. Virus-RNA) ist. Ausgelöst wird der RNA_i-Effekt durch kleine, doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA). Diese bewirken unter Beteiligung mehrerer Enzymkomplexe, dass die gesamte mRNA, die dieselbe Nukleotid-Sequenz wie die dsRNA besitzt, abgebaut wird. Dies hat zur Folge, dass die von der mRNA codierten Proteine nicht mehr hergestellt werden. Alternativ zum mRNA-Abbau kann auch die Translation direkt verhindert werden.

Der genaue Mechanismus der RNA-Interferenz konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden, es ist jedoch bekannt, dass es sich um einen post-transkriptionellen Gen-*Silencing* (PTGS) – Effekt handelt, da dsRNA mit einer Intron-Zielsequenz keinen RNA_i-Effekt verursacht. Der zentrale Schritt des RNA_i-Mechanismus besteht in der Spaltung von dsRNA in kleine Bruchstücke definierter Länge durch das Ribonuklease-Enzym Dicer. Hierbei werden zwei Klassen kleiner RNAs unterschieden: microRNAs (miRNAs) und *small interfering RNAs* (siRNAs), wobei siRNAs als Hauptprotagonisten der RNA-Interferenz gelten (Wasi 2003). Der *antisense*-Strang der siRNA wird von dem Multienzymkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) erkannt und gebunden, wodurch der enzymatische mRNA-Abbau vermittelt wird. Die Hydrolyse der RNA findet dabei innerhalb der zur siRNA homologen Region statt (Elbashir *et al.* 2001).

Im Gegensatz zur *antisense*-Technologie werden bei der RNA-Interferenz natürliche zelluläre Prozesse aktiviert, die zu einem hochspezifischen RNA-Abbau und vor allem zu einer Ausbreitung des Effekts von Zelle zu Zelle führen (Shuey *et al.* 2002).

In den Biowissenschaften hat sich die RNA-Interferenz als experimentelle Methode zur Stilllegung von Genen („Gen-Knockdown“) etabliert. Neue auf RNA-Interferenz basierende Therapien befinden sich in der klinischen Entwicklung. Ein Problem bei der therapeutischen Anwendung besteht jedoch bei Säugerzellen darin, dass dsRNA neben der RNA-Interferenz auch eine Interferon-Antwort auslösen kann. Hierbei kommt es zu einer Aktivierung der dsRNA-abhängigen Protein-Kinase (PKR) durch dsRNA (Stark *et al.* 1998), was zu einer allgemeinen Inhibierung der Translation sowie zur Induktion der Apoptose führt. Diese Problematik kann jedoch durch die Verwendung kleinerer dsRNA-Moleküle sowie durch den Einsatz von Vektoren umgangen werden (Shuey *et al.* 2002).

Da der RNA_i-Mechanismus auf der sequenzspezifischen Interaktion von siRNA und mRNA beruht, kann nahezu jedes Gen durch maßgeschneiderte siRNA-Moleküle stillgelegt werden. Durch siRNA, die chemisch synthetisiert oder durch *in vitro* Transkriptionssysteme generiert werden kann, kann in verschiedenen Systemen – einschließlich Säugerzellen – ein RNA_i-Effekt induziert werden. Hierbei bieten siRNA-exprimierende Plasmide den Vorteil, dass das Problem einer zeitlich begrenzten Aktivität, wie es bei exogen zugeführter siRNA auftritt, umgangen wird. RNA_i-Effekte können des Weiteren durch transfizierte Plasmide, mittels derer shRNAs (*short hairpin* RNAs) exprimiert werden, ausgelöst werden. Außerdem können – ebenfalls Vektorbasiert – sogenannte lange Haarnadeln (*long hairpins*) in Zellen exprimiert werden, was den Vorteil bietet, dass durch das Dicer-Enzym mehrere siRNAs gebildet und der Zelle präsentiert werden, so dass die Zelle die effektivste(n) siRNA(s) zum *Silencing* nutzen kann (Shuey *et al.* 2002). Schließlich kann dsRNA z.B. in *C. elegans* durch direktes Füttern oder durch Füttern mit Bakterien, die die dsRNA exprimieren, und sogar durch Tränken der Würmer in dsRNA eingebracht werden, wobei der dadurch erzielte Effekt sogar an die nächste Generation weitergegeben wird (Wasi 2003).

Die Stilllegung von Genen durch RNA_i stellt eine effiziente Methode dar, mit der die Funktion eines Gens analysiert werden kann. Außerdem können mehrere Gene gleichzeitig stillgelegt werden. Die Möglichkeit intrazellulär kleine, doppelsträngige siRNA-Moleküle zu exprimieren, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen vor allem durch den Einsatz von Plasmiden mit RNA-Polymerase III Promotor gezeigt (Shuey *et*

al. 2002). Paddison *et al.* konnten durch die RNA-Polymerase II-vermittelte intrazelluläre Expression einer relativ großen 500 nt dsRNA mit Haarnadel-Struktur in einer embryonalen Zelllinie der Maus einen RNA_i-Effekt und eine stabile Gen-Stilllegung erzielen (Paddison *et al.* 2002b).

RNA_i-Methoden werden häufig verwendet, um schnell phänotypische *Knockouts* zu erzeugen, da so die zeitaufwendige und umständliche Generierung von genotypischen *Knockouts* durch zielgerichtete Genveränderungen umgangen werden kann (Shuey *et al.* 2002). Empirische Daten belegen, dass die transiente Expression eines oder mehrerer RNA_i-Konstrukte zu einer Reduktion der Expression des Zielgens um 40-90 % führt (Paddison & Hannon 2002).

Im Gegensatz zu anderen Eukaryoten, bei denen durch den RNA-Interferenz-Mechanismus eine Genstilllegung hervorgerufen wird, wurde die RNA-Interferenz in dem Ciliaten *Tetrahymena thermophila* zunächst mit einem programmierten DNA-Abbau in Verbindung gebracht (Yao *et al.* 2003). Dieser RNA-vermittelte DNA-Abbau (*genome rearrangement*) ist während der sexuellen Reproduktion bei der Ausbildung des Makronukleus, der aus einer Kopie des Mikronukleus entsteht, von Bedeutung, da im Zuge dieses Prozesses die Chromosomen fragmentiert und etwa 15 % des Genoms entfernt werden (Coyne *et al.* 1996; Yao *et al.* 2002; Yao & Chao 2005). Vieles ist in Bezug auf den Mechanismus der DNA-Deletion bisher noch unbekannt, es wird jedoch davon ausgegangen, dass der Prozess durch kleine 28-30 nt RNA-Moleküle vermittelt wird.

Im Jahr 2006 konnte erstmalig gezeigt werden, dass durch RNA_i in *Tetrahymena* ebenfalls ein Gen-*Silencing* ausgelöst wird (Howard-Till & Yao 2006). In der Studie von Howard-Till und Yao führte die Expression einer zu einem Zielgen homologen dsRNA-Haarnadel zu einer signifikanten Abnahme des korrespondierenden mRNA-Levels. Verantwortlich für diese Abnahme sind in *Tetrahymena* kleine 23-24 nt RNAs, die sich eindeutig von den kleinen 28-30 nt RNAs, die mit der DNA-Deletion assoziiert werden, unterscheiden. Somit scheinen in *Tetrahymena* zwei unterschiedliche RNA-*Pathways* für das Gen-*Silencing* und die DNA-Deletion verantwortlich zu sein (Howard-Till & Yao 2006). Überraschenderweise führte die Expression des RNA-*Hairpins* während der Konjugation ebenso zur gezielten DNA-Deletion, wenn auch mit niedrigen Effizienzen,

was eine Überschneidung der beiden molekularen Mechanismen vermuten lässt (Howard-Till & Yao 2006).

Unter Verwendung eines von R. Howard-Till (Wien) zur Verfügung gestellten Vektors (s. Kap. 3.13) wurde in der vorliegenden Arbeit die Funktion von sechs in der MudPIT-Analyse (s. Kap. 5.3) identifizierten Proteinen untersucht. Auf die Auswahl der Proteine bzw. Gene wird nachfolgend (s. Kap. 5.5.2) eingegangen. Des Weiteren werden die Herstellung der Konstrukte (s. Kap. 5.5.3) sowie die Ergebnisse der durchgeführten RNA_i-Experimente (s. Kap. 5.5.4) vorgestellt.

5.5.2 Untersuchte Gene

Nachdem durch die MudPIT-Analyse (s. Kap. 5.3) sowie durch die qPCR (s. Kap. 5.4) nur begrenzte Aussagen zu den Funktionen der phagosomalen Proteine getroffen werden können, sollten ausgewählte Proteine bzw. die entsprechenden Gene mit Hilfe eines RNA_i-Ansatzes (s. Kap. 5.5.1) untersucht werden.

Tab. 31 sind die Gene bzw. Proteine zu entnehmen, die in der vorliegenden Arbeit in den RNA_i-Experimenten untersucht wurden. Die jeweiligen Ergebnisse der zuvor durchgeführten MudPIT-Analyse (s. Kap. 5.3) sowie die im Folgenden verwendeten Bezeichnungen und Abkürzungen sind in der Tabelle angegeben (s. Tab. 31).

Die bereits in Kap. 5.3.2.2 erwähnten Gene Snare (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*, 34.m00271) und Vps13 (*Vacuolar protein sorting, PH domain containing protein*, 8.m00549) wurden ausgewählt, da in einer parallel durchgeführten Arbeit der Arbeitsgruppe für diese beiden Gene in qPCR-Versuchen höhere Expressionslevel in Phagozytosebetreibenden Zellen als in Zellen, die keine Phagozytose betreiben, nachgewiesen wurden (V. Wittich, Dissertation, 2014), weshalb den jeweiligen Proteinen eine Phagozytose-Funktion zugesprochen werden kann.

Snare-Proteine sind neben SM (Sec1/Munc18-like) – Proteinen an allen intrazellulären Membran-Fusionsereignissen außer an der Fusion von Mitochondrien beteiligt (Südhof & Rothman 2009; Bacaj *et al.* 2010; Carr & Rizo 2010). Mechanistisch gesehen, geht man davon aus, dass Snare-Proteine Membranfusionen vermitteln,

indem sie einen Trans-Komplex zwischen Vesikel- und Zielmembran bilden. Eine stufenweise nach dem Reißverschlussprinzip verlaufende Strukturänderung eines Vier-Helix-Bündels des Snare-Proteins bringt die beiden fusionierenden Phospholipidmembranen in enge räumliche Nähe zueinander, was eine Destabilisierung ihrer Oberflächen bewirkt und so die Fusion der Membranen fördert (Südhof & Rothman 2009; Carr & Rizo 2010). An COS1-Zellen (*Cercopithecus aethiops*, *origin-defective SV-40*, Fibroblasten-Zelllinie) konnte gezeigt werden, dass die Spaltung bestimmter Snare-Proteine (VAMP3) zu einer reduzierten Phagozytose-Effizienz führt (Coppolino *et al.* 2001).

Tab. 31: Proteine bzw. Gene, die mittels RNA_i-Analyse auf ihre Funktion hin untersucht wurden. Die jeweilige in der vorliegenden Arbeit verwendete Bezeichnung sowie das Phagosomenstadium, in dem das jeweilige Protein mittels MudPIT identifiziert wurde, ist angegeben (Rot: 1 x nachgewiesen). Verwendete Abkürzungen: Drp = *Dynamain related protein*, Cbp = *Calmodulin-binding protein*, Cth = *Cathepsin*, Vps = *Vacuolar protein sorting*, Prf = *Profilin*, Snare = *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*.

T.t. Gen-ID	Protein	30 sek	10 min	Bezeichnung
59.m00248	Dynamain central region family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254527 59		√	Drp1
104.m00139	IQ calmodulin-binding motif family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254365 104	√		Cbp
13.m00464	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13 = Cathepsin L	√		Cth90
8.m00549	PH domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8 = Vacuolar protein sorting/Chorein	√		Vps13
7.m00567	Profilin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254716 7		√	Prf1
34.m00271	Snare domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	√		Snare

Das Protein **Vps13** wurde bereits für verschiedene Organismen untersucht. Seine Funktion ist jedoch kaum verstanden. Vps13 wurde nicht nur in der MudPIT-Analyse,

die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, sondern ebenso in der Studie von Jacobs *et al.* (Jacobs *et al.* 2006) als phagosomales Protein identifiziert. Des Weiteren konnten Samaranayake *et al.* die Assoziation eines TtVps13A-GFP-Fusionsproteins mit der Phagosomenmembran während des gesamten Phagozytosezyklus nachweisen (Samaranayake *et al.* 2011). Außerdem wurde bei *Tetrahymena*-Zellen mit einer TtVps13A-*Knockout*-Mutation eine Beeinträchtigung der Phagozytose beobachtet. Unter Bedingungen, bei denen die Phagozytose essentiell ist, wuchsen die Zellen schlechter. Sie bildeten nur wenige Phagosomen und die Ausscheidung phagosomaler Inhalte war im Vergleich zum Wildtyp verzögert. Diese Ergebnisse bestätigten die Annahme, dass das Protein TtVps13A für eine effiziente Phagozytose erforderlich ist (Samaranayake *et al.* 2011).

Neben Snare und Vps13 wurden in der vorliegenden Arbeit vier weitere Gene durch RNA_i-Analysen charakterisiert (s. Tab. 31). Hierzu zählt das *Dynamamin central region family* – Protein, welches auch **Drp1** (*Dynamamin related protein*) genannt wird (s. TGD, 59.m00248). Das untersuchte Drp-Gen stellt eines von acht in *Tetrahymena* vorkommenden Drp-Genen dar. Es ist essentiell für das Wachstum der Zelle (s. TGD). Die Expression des Drp1-Gens ist sowohl bei der Clathrin-vermittelten Endocytose als auch bei der Phagozytose von Bedeutung. Bei Zellen mit verminderter Expression des Gens konnte keine nennenswerte Aufnahme von Partikeln beobachtet werden (Elde *et al.* 2005). Die genaue Funktion von Drp1 im Phagozytoseprozess ist unbekannt. Einen Hinweis auf die Funktion gibt jedoch der Nachweis des GFP-fusionierten Drp1-Proteins entlang der „oral deep fiber“ (s. Kap. 1.3), die als „Vesikel-Highway“ gilt (Nusblat *et al.* 2012).

Ein weiteres für die RNA_i-Analysen interessantes Gen bzw. Protein stellt das *IQ calmodulin-binding motif family* – Protein dar (104.m00139, s. Tab. 31), da angenommen wird, dass der Ca²⁺/Calmodulin-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Nahrungsvakuolen in *T. thermophila* spielt (Gonda *et al.* 2000). Dieses Gen wird in der vorliegenden Arbeit mit **Cbp** (Calmodulin-bindendes Protein) bezeichnet.

Neben dem Gen, das das Protein Cathepsin L, auch **Cth90** genannt, codiert (13.m00464, s. Tab. 31), wurde schließlich das zu einem Protein der Profilin-Familie gehörende Gen **Prf1** (7.m00567, s. Tab. 31) analysiert.

Von Cathepsinen weiss man – wie bereits erwähnt (s. Kap. 5.3.2.1) – dass sie zu den hydrolytischen Enzymen gehören, welche zu den Komponenten des Phagolysosoms zählen (Turk *et al.* 2001; Eskelinen *et al.* 2003). Das Produkt des untersuchten Cth90-Gens stellt eine Cystein-Protease dar.

Das Gen Prf1, das das Aktin-bindende Protein Profilin 1 codiert, wurde aus dem Grund für die RNA_i-Analysen ausgewählt, da *Tetrahymena*-Zellen, denen das entsprechende Protein fehlt, einen Phagocytosedefekt aufweisen, der wahrscheinlich auf einer gestörten Ausbildung des Oralapparats beruht (Wilkes & Otto 2003; Williams *et al.* 2006).

5.5.3 Herstellung der Konstrukte

Die Herstellung der Konstrukte, die im Anschluss in *T. thermophila*-Zellen einen RNA_i-Effekt auslösen sollten, erfolgte nach der von Howard-Till und Yao beschriebenen Methode zum Gen-Silencing in *Tetrahymena* unter Verwendung eines dsRNA-Hairpin-Expressionsvektors (Howard-Till & Yao 2006). Der entsprechende Vektor (pRec8iCHX) wurde freundlicherweise von R. Howard-Till (Wien) zur Verfügung gestellt. Eine Vektorkarte befindet sich exemplarisch im Anhang (s. Abb. 44), wesentliche Merkmale des Vektors sind schematisch in Abb. 32 angegeben.

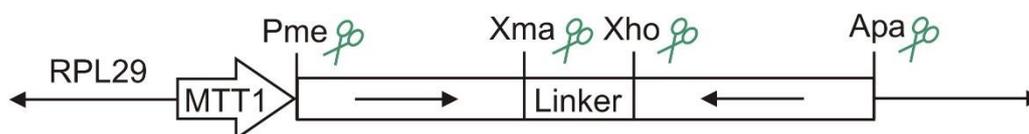


Abb. 32: Schematische Darstellung des verwendeten dsRNA-Hairpin-Expressionsvektors, der eine Sequenz enthält, die einen Bereich des ribosomalen Proteins L29 (RPL29) codiert. Innerhalb dieser rRNA-codierenden Sequenz befindet sich eine Region, die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme PmeI, XmaI, XhoI und ApaI aufweist, wobei zwei der Erkennungssequenzen (PmeI, XmaI) von den anderen beiden durch einen sogenannten Linker getrennt werden. Ein Bereich des Zielgens kann über die Schnittstellen PmeI und XmaI in den Vektor eingefügt werden. Der gleiche Bereich des Zielgens wird mit umgekehrter Orientierung über die Schnittstellen XhoI und ApaI eingefügt. Der induzierbare MTT1-Promotor ermöglicht eine Expressionskontrolle. Abbildung verändert nach Howard-Till & Yao, 2006.

Es handelt sich um einen rDNA-basierten Vektor, da er eine Sequenz enthält, die einen Bereich des ribosomalen Proteins L29 (RPL29, s. Abb. 32) codiert. Dieser ermöglicht die ektopische Expression eines Zielgens, d.h. die Expression erfolgt nicht über den "eigenen" Locus, sondern das Konstrukt wird durch homologe Rekombination in einen anderen (ektopischen) Locus integriert. Dazu wird das Gen von Interesse bzw. ein Bereich des Gens von Interesse in den Vektor kloniert und der Vektor anschließend in die Zelle eingebracht. Ein großer Vorteil hierbei ist die hohe Kopienzahl von rDNA im Makronukleus, da diese die Expression des Transgens auf höchster Ebene ermöglicht. Während der Entstehung des Makronukleus aus dem Mikronukleus wird die rDNA aus einem Chromosom des Mikronukleus ausgeschnitten und in Gegenrichtung verdoppelt, so dass ein palindromisches 21 kb rDNA-Minichromosom entsteht, welches amplifiziert wird und schließlich im Makronukleus in ~ 9000-facher Ausgabe vorliegt (Yao & Gorovsky 1974). Ein weiterer Vorteil des verwendeten *High-copy*-Vektors ist, dass dieser in der rRNA-codierenden Region eine Punktmutation besitzt, die *Tetrahymena*-Zellen nach der Transfektion eine Cycloheximid (CHX) – Resistenz verleiht und so eine Selektion erfolgreich transfizierter Zellen ermöglicht.

Innerhalb der rRNA-codierenden Sequenz des Vektors befindet sich eine Region, die Erkennungssequenzen für vier Restriktionsenzyme (PmeI, XmaI, XhoI, ApaI) aufweist (s. Abb. 32). Über die Schnittstellen PmeI und XmaI wurde ein etwa 500 bp großer Bereich des Zielgens in den Vektor eingebracht. Durch das Schneiden des Vektors mit den beiden unterschiedlichen Restriktionsenzymen konnte hierbei die Orientierung des Inserts, welches zuvor mit den gleichen Enzymen geschnitten wurde, festgelegt werden. Außerdem wurde durch die Restriktion mit zwei unterschiedlichen Endonukleasen die Entstehung eines Religats des Vektors verhindert.

Tab. 32 gibt die Größe des jeweiligen Inserts an. Der ~ 500 bp Bereich, der für das jeweilige Gen ausgewählt wurde, ist Tab. 11 zu entnehmen. Bei der Festlegung dieses Bereichs wurde darauf geachtet, dass dieser ein Intron enthält, da dies von Vorteil zu sein scheint, auch wenn diese Annahme bisher nicht belegt wurde (persönliche Mitteilung, R. Howard-Till, Wien).

Der gleiche ~ 500 bp Bereich des Zielgens wurde mit umgekehrter Orientierung über die Schnittstellen XhoI und ApaI eingefügt.

Tab. 32: Übersicht über die Gene bzw. die Größe des jeweiligen Inserts, das durch Klonierung in den dsRNA-*Hairpin*-Expressionsvektor eingebracht wurde.

Gen	Cbp	Cth90	Drp1	Prf1	Snare	Vps13
Fragmentgröße (bp)	471	454	461	453	540	548

Dass der Vektor einen sogenannten Linker von 91 bp besitzt (s. Abb. 32), der zwei der Erkennungssequenzen (PmeI, XmaI) von den anderen beiden trennt, dient dazu, dass das Konstrukt zur Expression eines dsRNA-*Hairpins* verwendet werden kann. Da der Vektor einen Cadmium-induzierbaren MTT1-Promotor besitzt (s. Abb. 32), ist außerdem eine Kontrolle der Genexpression möglich.

Der Erfolg der einzelnen Schritte der Klonierung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 4.4) überprüft. Die erhaltenen Gelbilder sind exemplarisch für das Gen Drp1 in Abb. 33 dargestellt.

Zunächst wurden die etwa 500 bp großen Fragmente (s. Tab. 32) in einer präparativen PCR amplifiziert (s. Kap. 4.6.1), wobei durch die verwendeten Primer (s. Tab. 9) die entsprechenden Endonuklease-Schnittstellen eingeführt wurden (s. Abb. 33 A). Auf eine Gel-Extraktion des Fragments wurde, da diese das weitere Vorgehen negativ zu beeinflussen schien, verzichtet (s. Kap. 4.4). Nach der Restriktion (s. Kap. 4.8.1) des PCR-Fragments sowie des etwa 9 kb großen Vektors (s. Abb. 33 B) mit den entsprechenden Enzymen wurde der Vektor dephosphoryliert (s. Kap. 4.8.2), um die zuvor beobachtete Bildung von Multimeren zu verhindern. Es folgten die Ligation (s. Kap. 4.8.3) von Insert und Vektor (s. Abb. 33 C) und die Transformation des Vektors in *E. coli*-Zellen (s. Kap. 4.9.2). Zur Identifikation positiver Transformanten wurde eine Kolonie-PCR (s. Kap. 4.6.3) durchgeführt, wobei ein zuvor für die Klonierung verwendeter Primer mit einem Primer "U" (s. Tab. 9) kombiniert wurde, der innerhalb des klonierten Bereichs bindet. Für Drp1 beispielsweise wurde in der Kolonie-PCR ein 420 bp Fragment amplifiziert, wodurch zwei positive Transformanten identifiziert werden konnten (s. Abb. 33 D). Die Negativkontrolle der Kolonie-PCR, die mit dem Ursprungsvektor durchgeführt wurde, zeigte im Agarosegel wie erwartet keine Bande (s. Abb. 33 D).

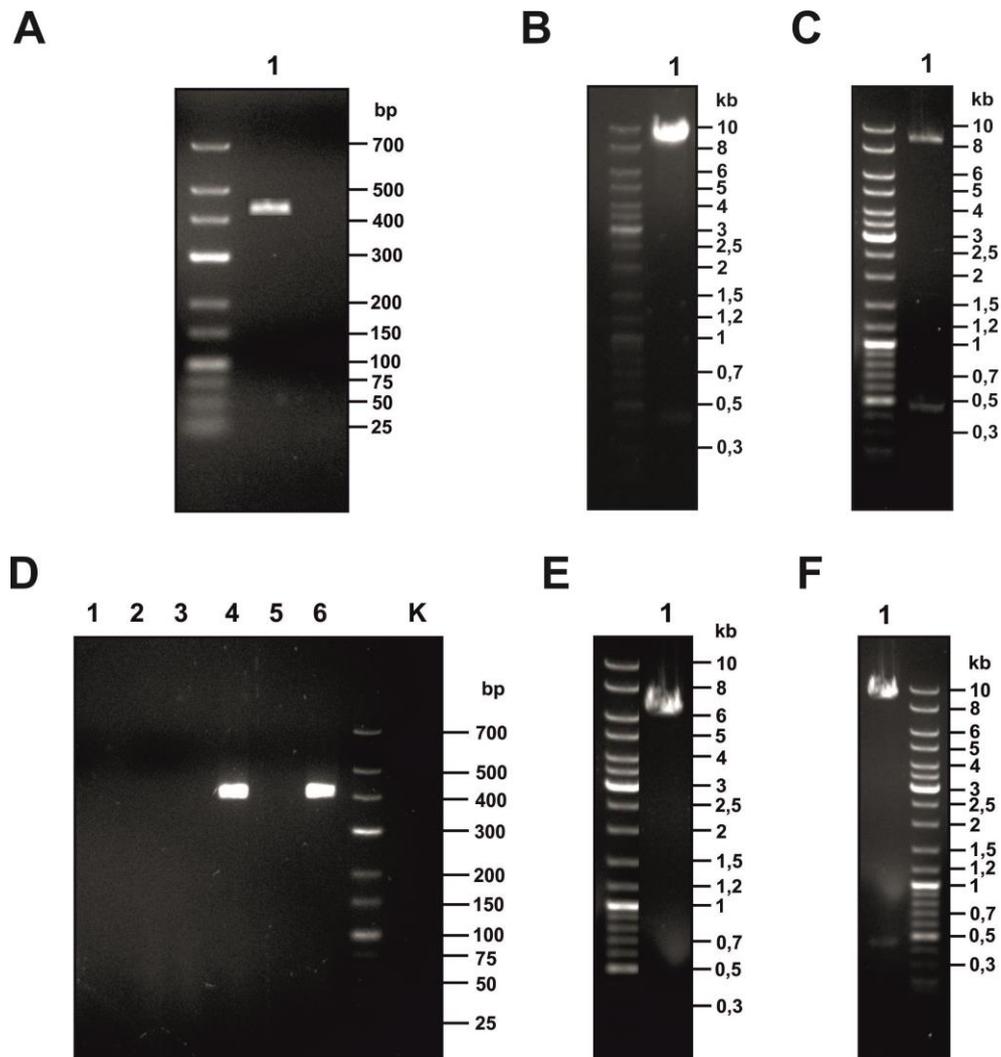


Abb. 33: Überprüfung des Erfolgs der einzelnen Klonierungsschritte mittels Agarose-Gelelektrophorese am Beispiel von Drp1. **A)** 1: 461 bp PCR-Produkt; **B)** 1: Pme/Xma-verdauter, linearisierter Vektor; **C)** 1: Ligationsansatz; **D)** 1-6: Proben nach der Kolonie-PCR zur Amplifikation eines 420 bp Fragments, die zur Identifikation der Klone 4 und 6 als positive Transformanten führten, K: Negativkontrolle (Vektor ohne Drp1-Insert); **E)** 1: Aus einem positiven Transformanten isolierter Vektor (*supercoiled*); **F)** 1: Testverdau des isolierten Vektors. **A-F)** Die Gele zeigen die jeweils erwarteten Banden und bestätigen demnach eine erfolgreiche Klonierung. Die Bande des Vektor-Inserts war auf den entsprechenden Gelen vorhanden, ist auf den Fotos jedoch nicht bzw. nur schwer zu erkennen, da sie nur schwach ausgeprägt war. Verwendet wurden 0,7 %ige (B, C, E, F) bzw. 3 %ige (A, D) Agarosegele mit entsprechend geeigneten Markern, deren Fragmentgrößen angegeben sind.

Aus Flüssigkulturen von positiv getesteten Transformanten wurde schließlich die Plasmid-DNA präpariert (s. Kap. 4.2.1). Dass die Bande des etwa 9 kb großen Vektors im Agarosegel bei etwa 7 kb zu finden ist (s. Abb. 33 E), ist auf die Konformation des intakten Plasmids (*supercoiled*) zurückzuführen. Der Erfolg der Klonierung wurde

mittels eines Testverdaus überprüft (s. Abb. 33 F) und konnte für alle sechs Gene mit Hilfe einer Sequenzierung (s. Kap. 4.10) bestätigt werden.

Die erstellten Konstrukte wurden schließlich mit Hilfe der Genkanone in *T. thermophila* transfiziert (s. Kap. 4.9.3), wobei zuvor eine Linearisierung des Plasmids mit dem Restriktionsenzym BlnI (s. Tab. 4) erfolgte, um die bereits erwähnte homologe Rekombination des Konstrukts zu ermöglichen. Transfiziert wurden Zellen des Stamms CU427 (s. Kap. 3.8.2), da diese das Wildtyp-Allel der rDNA enthalten und somit Cycloheximid-sensitiv sind (Yao & Yao 1991). Die Selektion positiver *Tetrahymena*-Transformanten erfolgte schließlich wie in Kap. 4.9.4 beschrieben durch Zugabe von Cycloheximid. Dieses ist ein Antibiotikum, das aus dem Bakterium *Streptomyces griseus* gewonnen wird. Seine hauptsächliche biologische Aktivität besteht in der Inhibierung der Translation von Eukaryonten durch Bindung an die ribosomale 60S-Untereinheit, wodurch das Zellwachstum gestoppt und der apoptotische Zelltod herbeigeführt wird. Erfolgreich transfizierte Transformanten können selektiert und angereichert werden, da diese aufgrund des mutierten RPL29-Gens eine CHX-Resistenz erworben haben.

Bei einem durch einen Vektor vermittelten RNA_i-Effekt kommt es im Gegensatz zur RNA-Interferenz, die durch von außen zugeführte siRNA ausgelöst wird, *nicht* zu einer zeitlichen Begrenzung der Aktivität (Paddison *et al.* 2002a). Dies gilt insbesondere dann, wenn die Expressionseinheit in das Genom des Wirts integriert wird (Paddison *et al.* 2002a), was bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten pRec8iCHX-Vektor der Fall ist.

5.5.4 Ergebnisse der RNA_i-Experimente

Die sechs verschiedenen *Tetrahymena*-Transformanten, die in der vorliegenden Arbeit durch die Transfektion von Zellen mit den zuvor erstellten Konstrukten erhalten wurden (s. Kap. 5.5.3), wurden im Anschluss für die Analyse der entsprechenden Gene durch RNA_i-Experimente verwendet. Die dabei erhaltenen Ergebnisse werden nachfolgend vorgestellt (s. Kap. 5.5.4.1 bis 5.5.4.4).

5.5.4.1 Analyse mittels One-Step RT-PCR

Die Durchführung der RNA_i-Experimente zur Untersuchung der in Kap. 5.5.2 angegebenen Gene erfolgte wie beschrieben (s. Kap. 4.17). Die Induktion des Cd-induzierbaren MTT1-Promotors des Vektors, der in *Tetrahymena* transfiziert wurde (s. Kap. 4.9.3), erfolgte durch Zugabe von CdCl₂. Als Negativkontrolle wurden Kulturen, denen kein CdCl₂ zugesetzt wurde, verwendet. Es wurden verschiedene Bedingungen getestet, um einen RNA_i-Effekt in den Zellen zu erzielen bzw. um diesen zu erhöhen. Neben der variierenden Inkubationszeit wurden unterschiedliche Cd-Mengen eingesetzt. In der Regel wurden Zellen in Neff's Medium, selten auch in Hungermedium (10 mM Tris) getestet.

Ein mit Hilfe eines dsRNA-*Hairpin*-Expressionsvektors ausgelöster RNA_i-Effekt kann in allen Phasen des Lebenszyklus von *Tetrahymena* (Wachstum, Hungern, Paarung) beobachtet werden (Howard-Till & Yao 2006). Ein RNA-*Knockdown* wird dabei gewöhnlich innerhalb von 1-2 Stunden nach Induktion nachgewiesen, wobei bei vegetativen Zellen 0,1-0,5 µg/ml CdCl₂ und bei hungernden oder konjugierenden Zellen in 10 mM Tris 0,02-0,1 µg/ml CdCl₂ ins Medium gegeben werden (persönliche Mitteilung, R. Howard-Till, Wien). Eine maximale Abnahme der mRNA-Menge konnte mit 0,1 µg/ml Cd (hungernde Zellen) bzw. 1 µg/ml Cd (vegetatives Wachstum) innerhalb von 1 h erreicht werden (Howard-Till & Yao 2006).

In ähnlichen RNA_i-Versuchen nahm die mRNA-Menge des Zielgens nach 45 min ab und die entsprechende Bande konnte im Agarosegel nach 1 h nicht mehr nachgewiesen werden (Awan *et al.* 2009). Hierbei wurden 5 µg/ml CdCl₂ eingesetzt, was sich jedoch als problematisch herausstellte, da die Lebensfähigkeit und die Beweglichkeit der Zellen ebenfalls durch Cd²⁺-Ionen beeinflusst werden und die Zellen innerhalb weniger Stunden starben (Awan *et al.* 2009). Eine hohe Cd-Konzentration zerstört die Zellen, was wahrscheinlich an einer fehlerhaften Osmoregulation liegt, die ein unspezifischer Effekt einer Schwermetallvergiftung ist (Nilsson 1989). In der Studie von Awan *et al.* stellte sich eine Behandlung mit 0,5 µg/ml Cd²⁺ für 12 h als optimal heraus (Awan *et al.* 2009).

Auf der Grundlage oben dargestellter Experimente und Überlegungen sollten in der vorliegenden Arbeit geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden, mit denen die Expression der *Hairpin*-RNA maximiert und die Cd^{2+} -Toxizität minimiert wird. Dazu wurden Cd-Konzentrationen von 0,02-0,5 $\mu\text{g/ml}$ CdCl_2 (Tris-Kulturen) bzw. 0,1-1 $\mu\text{g/ml}$ CdCl_2 (Neff's-Kulturen) und Inkubationszeiten im Bereich von 1-12 h getestet. Außerdem wurden Proben vor der Induktion (0 min) als Kontrolle entnommen.

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Gesamt-RNA aus einer definierten Zahl von Zellen ($2 \cdot 10^4$ Zellen, vgl. Awan *et al.* 2009) isoliert (s. Kap. 4.2.4). Die Präparation der RNA wurde gelelektrophoretisch überprüft, wobei die für intakte RNA typischen zwei deutlich getrennten Banden der 28S- und der 18S-rRNA nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 34).

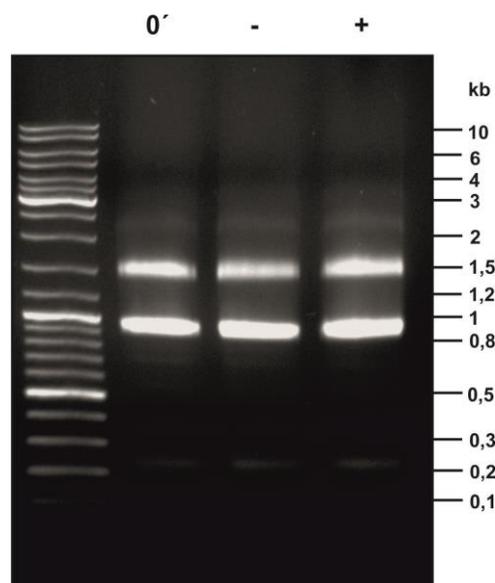


Abb. 34: Überprüfung der RNA-Präparation aus *Tetrahymena*-Zellen durch Agarose-Gelelektrophorese. Exemplarisch ist das erhaltene Gelbild für Cbp-Transformanten gezeigt. Die RNA wurde vor der Induktion (0') sowie nach 2-stündiger Inkubation der Zellen ohne (-) bzw. mit 1 $\mu\text{g/ml}$ CdCl_2 (+) aus Neff's-Kulturen isoliert. Alle drei Proben weisen die für RNA typischen Banden der 28S- (ca. 1,5 kb) und der 18S-rRNA (ca. 0,9 kb) auf. Die Banden der 5S-rRNA (ca. 230 bp) sind nur schwach zu erkennen. Verwendet wurde ein 1 %iges Agarosegel mit entsprechendem Marker, dessen Fragmentgrößen angegeben sind.

1 μl der nach bestimmten Zeitpunkten der Cd-Behandlung präparierten RNA wurde schließlich als *Template* für die One-Step RT-PCR (s. Kap. 4.6.4), bei der die Umschreibung der RNA in cDNA durch das Enzym Reverse Transkriptase und die Amplifizierung eines Fragments durch PCR in einem Schritt erfolgen, eingesetzt (vgl.

Awan *et al.* 2009). Die hierzu verwendeten Primer sind Tab. 8 zu entnehmen. Eine Übersicht über die Größe der erwarteten PCR-Fragmente für die sechs analysierten Gene ist in Tab. 33 angegeben.

Tab. 33: Übersicht über die PCR-Fragmentgrößen der Gene, deren Expression im Rahmen der RNA_i-Experimente untersucht wurde.

Gen	Cbp	Cth90	Drp1	Prf1	Snare	Vps13
PCR-Fragmentgröße (bp)	325	333	289	225	134	110

Die Produkte der One-Step RT-PCR wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 4.4) analysiert. Bei einem durch Cd induzierten RNA_i-Effekt sollten die Banden der entsprechenden Fragmente nicht mehr zu erkennen bzw. schwächer ausgeprägt sein (Awan *et al.* 2009). Dies konnte jedoch bei keinem der untersuchten Gene für die verschiedenen getesteten Cd-Behandlungsmethoden beobachtet werden. Abb. 35 A zeigt exemplarisch die Ergebnisse für Vps13. Es wurden Proben vor der Induktion (0') sowie 12 Stunden nach der Induktion mit 0,1 µg/ml CdCl₂ (+) entnommen. Als Kontrolle diente eine Tris-Kultur, der kein Cd zugesetzt wurde (-). Alle Proben wiesen Banden mit gleicher Intensität auf, lediglich die Kontrolle lieferte wie erwartet keine Bande (s. Abb. 35 A).

Um sicherzustellen, dass die oben beschriebenen Ergebnisse nicht auf variierenden RNA-Mengen beruhen, wurden sogenannte Beladungskontrollen durchgeführt (s. Abb. 35 B). Hierzu wurden PCR-Ansätze mit den gleichen RNA-*Templates* durchgeführt, wobei Primer für das SSU rRNA Gen (vgl. Kap. 5.4) verwendet wurden. Eine einheitliche Beladung konnte dadurch, dass die 178 bp Banden des SSU rRNA Gens in den drei Proben mit gleicher Intensität auftraten, sichergestellt werden (s. Abb. 35 B).

Das für Vps13 unter den angegebenen Bedingungen erhaltene Ergebnis (s. Abb. 35) wurde sowohl auch für weitere getestete Cd-Behandlungsmethoden als auch für die anderen analysierten Gene in der oder in ähnlicher Form beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt). In den meisten Fällen konnte keine Änderung der Bandenintensität

festgestellt bzw. keine Abnahme des mRNA-Levels nach Induktion der Expression des dsRNA-*Hairpins* mit Cd verzeichnet werden.

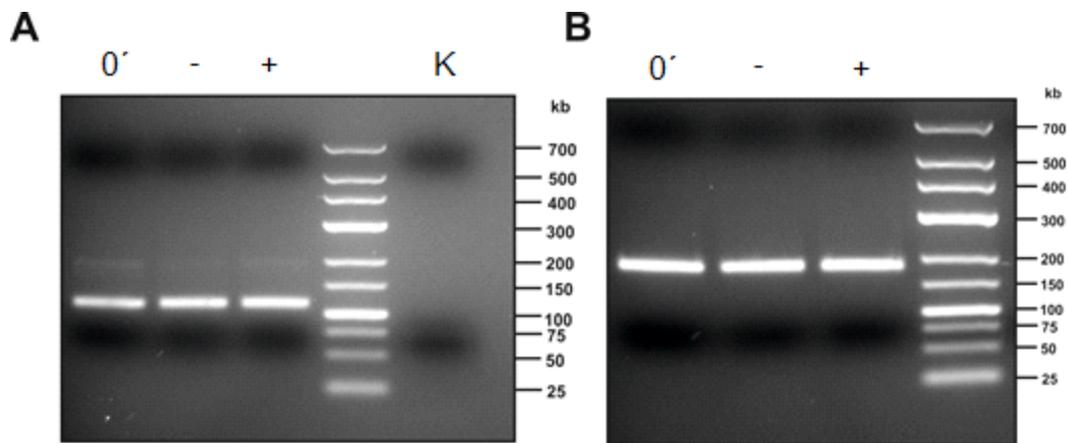


Abb. 35: Überprüfung der Produkte der One-Step RT-PCR am Beispiel von Vps13 (110 bp). Aufgetragen wurden Proben der PCR, die mit RNA als *Template* durchgeführt wurde, die aus unterschiedlich behandelten Zellen isoliert wurde. Die RNA wurde vor der Induktion (0') sowie nach 12-stündiger Inkubation der Zellen ohne (-) bzw. mit 0,1 µg/ml CdCl₂ (+) aus Tris-Kulturen isoliert. **A)** Für alle drei Proben ist die 110 bp Bande des Vps13-Fragments zu erkennen, wobei keine Unterschiede in der Intensität der Banden festzustellen sind. Die Negativkontrolle (K), die kein *Template* enthielt, weist die entsprechende Bande nicht auf. **B)** Beladungskontrollen. Es wurden die RNA-*Templates* aus A benutzt (0', -, +). Um sicherzustellen, dass die PCR-Ergebnisse nicht auf variierenden RNA-Mengen beruhen, wurden Primer für das SSU rRNA Gen eingesetzt. Eine einheitliche Beladung konnte dadurch, dass die 178 bp Banden mit gleicher Intensität auftraten, nachgewiesen werden. **A+B)** Verwendet wurden 3 %ige Agarosegele. Die Größe der Markerbanden ist angegeben.

Da in der Studie von Awan *et al.* ein RNA_i-Effekt mittels Gelelektrophorese deutlich gezeigt werden konnte (Awan *et al.* 2009), wurden in der vorliegenden Arbeit möglicherweise keine geeigneten Cd-Behandlungsbedingungen gewählt. Aus diesem Grund wurden weitere Bedingungen getestet. Um sicherzugehen, dass ein möglicherweise erzielter RNA_i-Effekt auch nachgewiesen wird, wurden die weiteren Ansätze mittels der im Vergleich zur One-Step RT-PCR sensitiveren quantitativen Real-Time-PCR analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse werden im folgenden Kapitel vorgestellt (s. Kap. 5.5.4.2).

5.5.4.2 Analyse mittels quantitativer Real-Time-PCR

Das Metallothionein-Gen (MTT1) reagiert auf Stress und auf Schwermetalle (Awan *et al.* 2009). Insbesondere Cd^{2+} führt zur 200-fach stärkeren Induktion der Transkription durch den Promotor als sie unter Kontrollbedingungen erreicht wird (Dondero *et al.* 2004). Da Zellen in Tris-Medium deutlich stärker auf Cd^{2+} reagierten als Zellen in Proteosepepton-Medium (Awan *et al.* 2009), wurden alle weiteren Experimente unter Hungerbedingungen in 10 mM Tris (pH 7,4) durchgeführt.

Die nachfolgend dargestellten RNA_i-Experimente wurden mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR (s. Kap. 4.6.5) analysiert. Ziel hierbei war es, Bedingungen zu finden, die einen RNA_i-Effekt in *Tetrahymena* auslösen, der mittels qPCR verfolgt werden kann. Im Gegensatz zu den in Kap. 5.4 dargestellten qPCR-Analysen mit SYBR Green wurden die RNA_i-Analysen mit Eva Green, welches im Vergleich zu SYBR Green einige Vorteile bietet (s. Kap. 4.6.5.2), durchgeführt. Die RNA wurde aus den Transformanten nach Cd-Behandlung isoliert (s. Kap. 4.2.4) und in cDNA umgeschrieben (s. Kap. 4.5). Schließlich wurden 200 ng der cDNA in die qPCR eingesetzt. Da bei der Verwendung von Eva Green Fragmente bis zu einer Größe von 500 bp amplifiziert werden können, konnten die Primer, die auch für die One-Step RT-PCR verwendet wurden (s. Tab. 8), eingesetzt werden. Die Größe der erwarteten Fragmente ist Tab. 33 zu entnehmen. Für alle untersuchten Gene lieferte die qPCR das jeweils erwartete Produkt der entsprechenden Größe, wobei keine Banden von Nebenprodukten beobachtet wurden (s. Abb. 36, Spur 1-6). Die jeweiligen Negativkontrollen ohne *Template* (NTC-Proben) lieferten wie erwartet keine Banden (s. Abb. 36, Spur 7-12). Auch die *No-RT*-Kontrollen (s. Kap. 4.6.5) lieferten kein Produkt, so dass eine Kontamination der RNA-Präparation mit genomischer DNA ausgeschlossen werden kann (Ergebnisse nicht gezeigt). Durch Primertitrationen wurden als optimale Konzentration Werte von 50-125 nM je Primer erhalten (Ergebnisse nicht gezeigt).

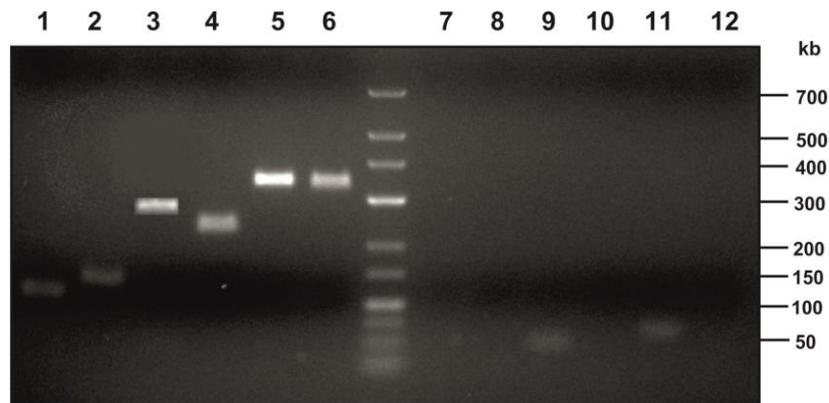


Abb. 36: qPCR-Produkte (Spur 1-6) sowie entsprechende Negativkontrollen ohne *Template* (Spur 7-12) der sechs analysierten Gene. Neben der für das jeweilige Fragment erwarteten Bande (1 = 110 bp Vps13, 2 = 133 bp Snare, 3 = 289 bp Drp1, 4 = 225 bp Prf1, 5 = 333 bp Cth90, 6 = 325 bp Cbp) wurden keine weiteren Banden nachgewiesen. Die entsprechenden NTC-Proben (7 = Vps13, 8 = Snare, 9 = Drp1, 10 = Prf1, 11 = Cth90, 12 = Cbp) lieferten keine Banden im Agarosegel. Verwendet wurde ein 3 %iges Agarosegel. Die Fragmentgrößen des Markers sind angegeben.

Wie bei den in Kap. 5.4 beschriebenen qPCR-Analysen wurde auch im Rahmen der RNA_i-Experimente eine Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung vorgenommen (s. Kap. 4.6.5). Als Referenzgen wurde auch hier das SSU rRNA Gen eingesetzt. Außerdem wurde ebenso für jedes Gen eine Standardkurve mit Proben mit unterschiedlicher cDNA-Ausgangsmenge (unverdünnte cDNA sowie fünf Verdünnungen einer Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2) erstellt, um die qPCR-Effizienz zu bestimmen (vgl. Kap. 5.4). Die Produkte der qPCR wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 4.4) analysiert. Hierbei wurden für alle untersuchten Gene die erwarteten Banden nachgewiesen und Banden von Nebenprodukten traten nicht auf. Abb. 37 zeigt exemplarisch zwei Gelbilder, die für das Gen Cth90 erhalten wurden. Aufgetragen wurden zum einen die Proben zur Erstellung der Standardkurve (s. Abb. 37 A) und zum anderen einige Proben des RNA_i-Experiments (s. Abb. 37 B). Neben der erwarteten Bande für Cth90 mit einer Fragmentgröße von 333 bp (s. Abb. 37, A 1-6 und B 1-3) bzw. für das SSU rRNA Gen bei 178 bp (s. Abb. 37, B 4-6) sind keine weiteren Banden zu erkennen. Demnach waren die gewählten bzw. optimierten qPCR-Bedingungen geeignet, um mit dieser Methode einen potentiellen, Cd-induzierten RNA_i-Effekt nachweisen zu können.

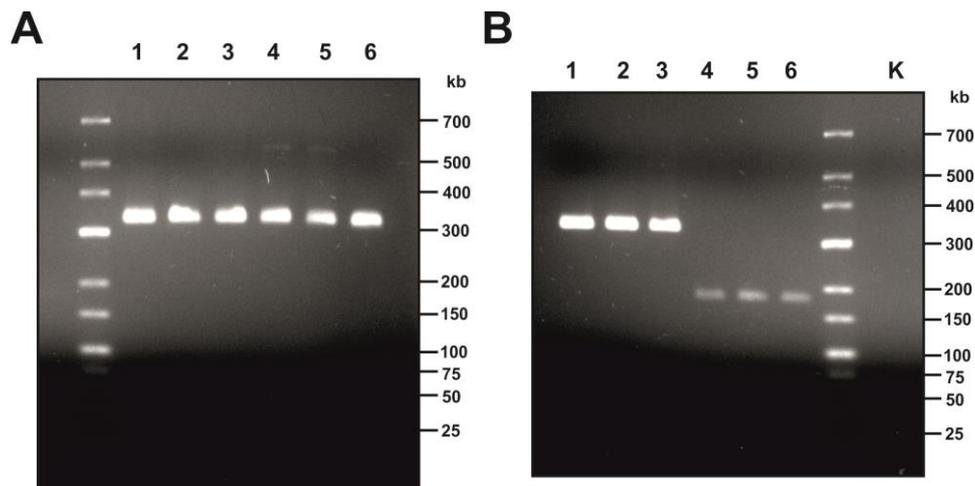


Abb. 37: Analyse von qPCR-Produkten mittels Agarose-Gelelektrophorese am Beispiel von Cth90. **A)** Proben mit unterschiedlicher cDNA-Verdünnung zur Erstellung einer Standardkurve, mit der die qPCR-Effizienz bestimmt wird (1 = unverdünnt, 2-6 = Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2). **B)** Proben aus RNA_i-Experiment. Amplifiziert wurde ein Cth90-Fragment (1-3) sowie ein Fragment des SSU rRNA Gens, das in den qPCR-Analysen als Referenzgen verwendet wurde (4-6). Die RNA, die in cDNA umgeschrieben wurde, wurde aus Transformanten (in 10 mM Tris) isoliert, die 2 h ohne Zugabe von Cd inkubiert wurden (1+4) bzw. die 2 h mit 0,05 µg/ml CdCl₂ (2+5) sowie mit 0,1 µg/ml CdCl₂ (3+6) behandelt wurden. **A+B)** Neben der erwarteten Bande bei 333 bp für Cth90 (A 1-6, B 1-3) bzw. bei 178 bp für das SSU rRNA Gen (B 4-6) sind keine weiteren Banden zu erkennen. Verwendet wurden 3 %ige Agarosegele mit entsprechendem Marker, dessen Fragmentgrößen angegeben sind.

Wie am Beispiel von Cth90 verdeutlicht, wurden auch für die weiteren untersuchten Gene mit Hilfe von Standardkurven die qPCR-Effizienzen bestimmt. Eine Übersicht über die erhaltenen Werte (bzw. Mittelwerte) gibt Tab. 34 an.

Tab. 34: Übersicht über die qPCR-Effizienzen, die für die untersuchten Gene sowie für das SSU rRNA *Housekeeping*-Gen mit Hilfe von Standardkurven ermittelt wurden. Aufgeführt sind die absoluten Werte (abs.) sowie die diesen Werten entsprechenden prozentualen Angaben (%). Die angegebenen Effizienzen stellen beispielhaft angegebene Werte dar bzw. sind Mittelwerte aus diversen qPCR-Experimenten.

Gen		SSU rRNA	Cbp	Cth90	Drp1	Prf1	Snare	Vps13
Effizienz	abs.	1,850	1,812	1,834	1,790	1,810	1,754	2,076
	%	92,7	90,6	91,7	89,5	90,5	87,7	103,8

Hierbei fällt auf, dass lediglich der Wert für Vps13 (2,076) etwas größer ist als die Werte (1.7 bis 1.9), die als optimal betrachtet werden (Pfaffl 2006).

Mit Hilfe des etablierten qPCR-Systems sollten für die sechs in Kap. 5.5.2 genannten Gene bzw. die *Tetrahymena*-Transformanten Bedingungen gefunden werden, mit denen ein RNA_i-Effekt in den Zellen hervorgerufen werden kann. Ob die getesteten Bedingungen geeignet waren, konnte überprüft werden, indem das mRNA-Level, das nach der Behandlung der Zellen mit Cadmium analysiert wurde, mit dem für unbehandelte Kontrollzellen erhaltenen mRNA-Level verglichen wurde.

Abb. 38 zeigt exemplarisch das Ergebnis, das für das Gen Cth90 im RNA_i-Experiment erhalten wurde. Hierbei wurden die Transformanten für 2 h mit 0,05 bzw. 0,1 µg/ml CdCl₂ behandelt (s. Abb. 38 A). Als Kontrolle bzw. "Kalibrator" in der qPCR dienten Zellen, die ohne Cd inkubiert wurden (s. Abb. 38 A, 0). Das Ergebnis macht deutlich, dass in den Transformanten durch die genannten Bedingungen ein klarer **RNA_i-Effekt** erzielt werden konnte. Das mRNA-Level ging auf relative Werte von ca. 0,2 (0,05 µg/ml Cd) bzw. etwa 0,37 (0,1 µg/ml Cd) zurück (s. Abb. 38 A). Um sicherzustellen, dass die Abnahme des mRNA-Levels auf die Induktion der Expression der *Hairpin*-RNA zurückzuführen ist, wurde der Wildtyp CU427 auf die gleiche Weise wie die Transformanten mit Cd behandelt (s. Abb. 38 B). Hier wurde eine starke Zunahme der mRNA-Menge auf Werte von etwa 3,3 (0,05 µg/ml Cd) bzw. 4,7 (0,1 µg/ml Cd) festgestellt. Da die Cd-Behandlung des Wildtyps demnach zu keiner Abnahme des mRNA-Levels führt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem für die Cth90-Transformanten beobachteten Effekt tatsächlich um einen Cd-induzierten RNA_i-Effekt handelt.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die weiteren untersuchten Gene erhalten (s. Abb. 39). Wie auch für Cth90 (s. Abb. 38 A) wurde für Snare, Prf1, Vps13 und Cbp mit 0,05 µg/ml CdCl₂ ein größerer Effekt erzielt als mit 0,1 µg/ml (s. Abb. 39 A-D). Das mRNA-Level sank auf Werte von etwa 0,76 (Prf1), 0,63 (Vps13) und 0,67 (Cbp). Eine Abnahme der mRNA-Menge wurde für entsprechend behandelte Wildtyp-Zellen nicht festgestellt (nicht gezeigt). Lediglich für Snare wurde nur eine geringe Abnahme auf ca. 0,92 beobachtet, die jedoch auch bei Wildtyp-Zellen (ca. 0,89, nicht gezeigt) auftrat.

Die getesteten Bedingungen führten bei Drp1 zu keiner Expressionsabnahme. Vielmehr wurde eine sehr starke Zunahme des mRNA-Levels in Transformanten (ca. 9, s. Abb. 39 E) und im Wildtyp (nicht gezeigt) beobachtet.

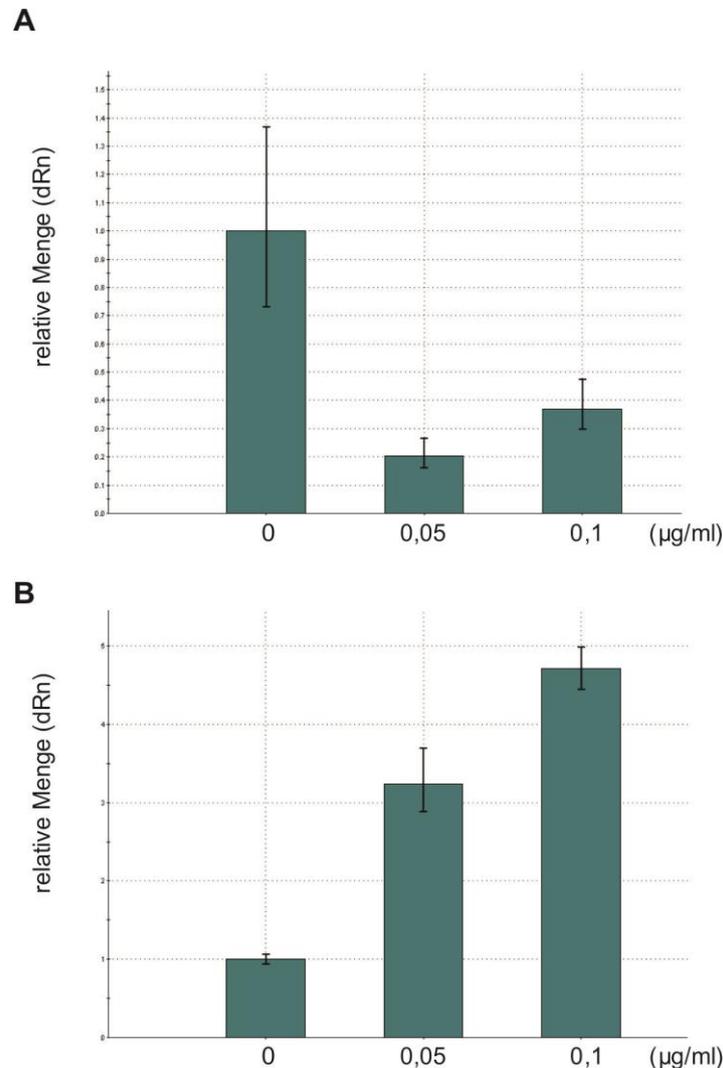


Abb. 38: Darstellung der im RNA_i-Experiment für Cth90 erhaltenen Ergebnisse. **A)** Die Cth90-Transformanten sowie **B)** der Wildtyp CU427 wurden 2 h ohne Cd inkubiert (0, Kalibrator) bzw. 2 h mit 0,05 µg/ml (0,05) oder mit 0,1 µg/ml (0,1) CdCl₂ behandelt. Verwendet wurden über Nacht in Hungermedium (10 mM Tris) inkubierte Zellen, deren Zelltitert am nächsten Tag vor der Induktion der Expression mit frischem Tris auf 2·10⁴ Z/ml eingestellt wurde. Es wird deutlich, dass das mRNA-Level der Transformanten durch die beiden Cd-Behandlungsmethoden im Vergleich zu unbehandelten Zellen stark abnimmt (A). Die relativen Mengen (dRn = delta Rn; Rn: normalisiertes Reportersignal) gehen auf Werte von ca. 0,2 (0,05 µg/ml Cd) bzw. 0,37 (0,1 µg/ml Cd) zurück. Ein RNA_i-Effekt konnte demnach in den Transformanten induziert werden. Dieser Effekt trat bei gleicher Cd-Behandlung von Wildtypen nicht auf (B). Hier wurde vielmehr eine starke Zunahme der mRNA-Menge auf Werte von etwa 3,3 (0,05 µg/ml Cd) bzw. 4,7 (0,1 µg/ml Cd) festgestellt. Gemessen wurden Tripletts (Fehlerbalken).

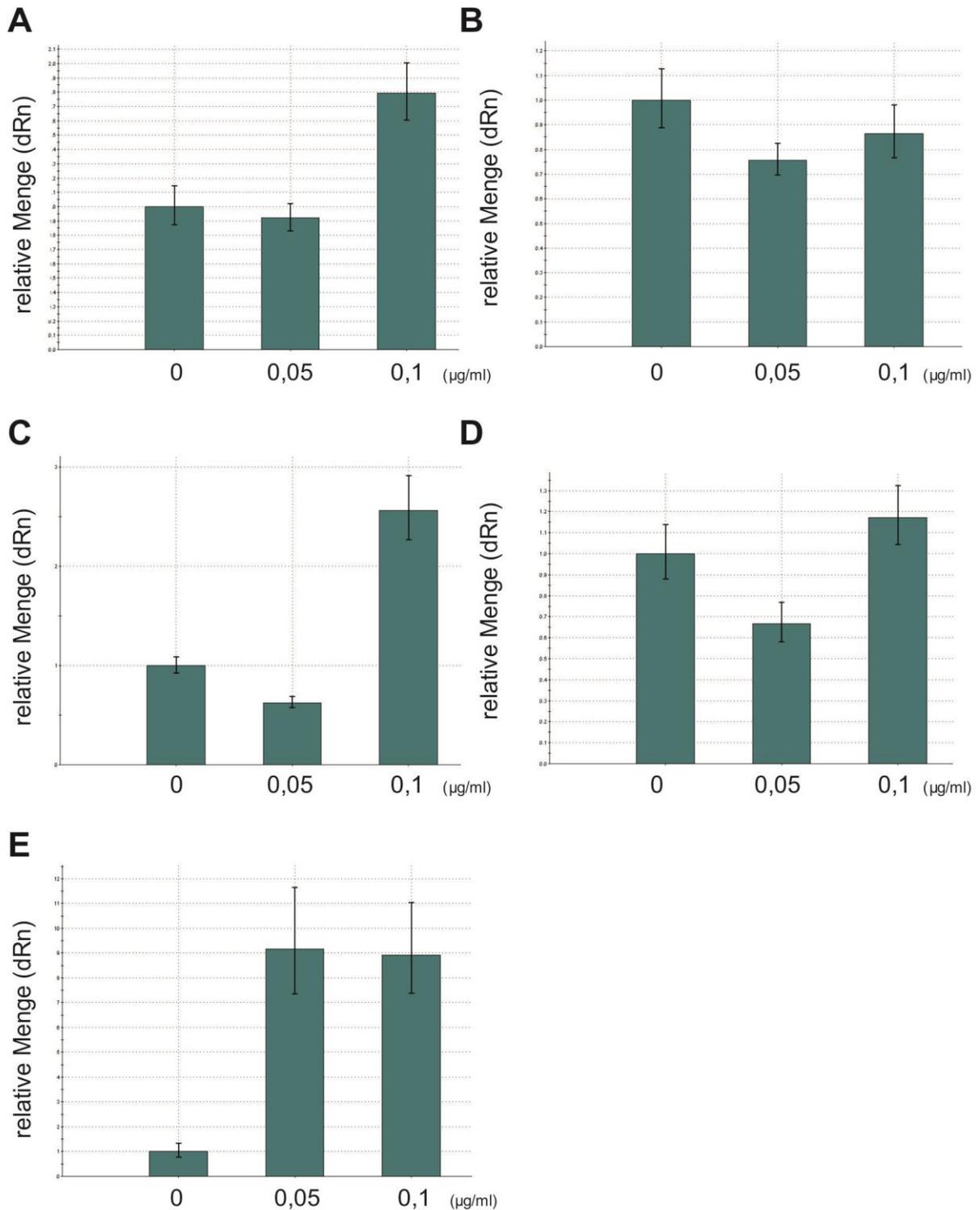


Abb. 39: Darstellung der im RNA_i-Experiment für Snare (A), Prf1 (B), Vps13 (C), Cbp (D) und Drp1 (E) erhaltenen Ergebnisse. Die Transformanten wurden 2 h mit 0,05 µg/ml (0,05) oder mit 0,1 µg/ml (0,1) CdCl₂ behandelt. Die relativen mRNA-Mengen, die sich für die unterschiedlich behandelten Zellen ergaben, sind angegeben (dRn = delta Rn; Rn: normalisiertes Reportersignal). Als Kalibrator diente jeweils das mRNA-Level von Zellen, die *ohne* Cd inkubiert wurden (0). Dieses mRNA-Level wurde je auf den Wert 1 gesetzt (zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung in A-E). Gemessen wurden jeweils Triplets (Fehlerbalken). Nähere Erläuterungen: s. Text.

Es kann zusammenfassend festgehalten werden, dass mit Hilfe der qPCR für vier der sechs untersuchten Gene (Cth90, Vps13, Cbp und Prf1) ein RNA_i-Effekt nachgewiesen werden konnte, da die Cd-Behandlung in den Transformanten zu einer Abnahme der mRNA-Expression führte, welche in Wildtyp-Zellen nicht auftrat. Eine weitere Optimierung des Effekts bzw. für Snare und Drp1 in Hinblick auf die Behandlungsmethoden mit Cd, sollte im Folgenden vorgenommen werden (s. Kap. 5.5.4.3). Da die bisherigen Ergebnisse annehmen lassen, dass geringere Cd-Mengen geeigneter scheinen, wurden die nachfolgend beschriebenen RNA_i-Experimente mit Cd-Konzentrationen von max. 0,05 µg/ml durchgeführt.

5.5.4.3 Optimierung der Versuchsbedingungen

Um den in Kap. 5.5.4.2 beschriebenen RNA_i-Effekt, der für die Gene Vps13, Prf1, Cth90 und Cbp durch eine 2-stündige Inkubation der Zellen mit 0,05 µg/ml CdCl₂ erzielt werden konnte, zu optimieren, wurden weitere Versuchsbedingungen getestet. Eine Erklärung dafür, dass für Snare und vor allem für Drp1 ein ähnlicher Effekt nicht beobachtet wurde, könnte darin liegen, dass die zuvor getesteten Bedingungen (s. Kap. 5.5.4.2) für diese Gene nicht optimal geeignet waren. Dass es sich bei Drp1 um ein essentielles Gen handelt, scheint vernachlässigbar zu sein, da die angewandte Methode zur Erzeugung eines RNA_i-Effekts in *Tetrahymena* auch für essentielle Gene geeignet ist (Howard-Till & Yao 2006). Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die so genannte "phänotypische Auswahl" (*phenotypic assortment*) noch nicht vollständig abgeschlossen war. Die "phänotypische Auswahl" stellt ein Phänomen dar, das aus der zufälligen Verteilung der homologen Chromosomen-Kopien des 45-ploiden Makronukleus bei jeder Zellteilung während des vegetativen Wachstums resultiert. Aus diesem Grund entstehen nach einigen Zellteilungen aus Makronuklei, die zuvor aus heterozygoten Mikronuklei gebildet wurden und daher eine einheitliche Mischung beider Allele enthalten, ungleiche Tochterzellen (Turkewitz *et al.* 2002). Da der Makronukleus verantwortlich für den Phänotyp der Zelle ist, entsteht somit während des vegetativen Wachstums eine Vielseitigkeit an Phänotypen unter den Nachkommen. Es können auch Zellen entstehen, in denen alle Kopien eines Allels eines bestimmten Gens verloren gegangen sind. Das *phenotypic assortment* ist abgeschlossen, wenn nach vielen Zellteilungen Zellen mit einem Makronukleus, der

ausschließlich das eine oder das andere Allel der beiden nicht-identischen Allele der Keimbahn enthält (Turkewitz *et al.* 2002).

Da davon auszugehen ist, dass ein RNA_i-Effekt in Zellen mit abgeschlossenem *phenotypic assortment* stärker zum Tragen kommt, wurden für die nachfolgend dargestellten Versuche Zellen verwendet, die mehrere Monate in Medium mit 40 µg/ml Cycloheximid kultiviert wurden, um so immer mehr Kopien des jeweiligen Konstrukts im Mac zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen für mindestens zwei Wochen in 2 x Neff's Medium ohne CHX und schließlich wieder in Neff's Medium mit 40 µg/ml CHX kultiviert, um das *phenotypic assortment* abzuschließen (vgl. Awan *et al.* 2009).

Da voneinander abweichende Ergebnisse beobachtet wurde, wenn das Zellpellet vor der Cd-Induktion in frischem Tris aufgenommen bzw. wenn der Zelltiter mit dem zuvor verwendeten Tris-Medium eingestellt wurde, wurden beide Ansätze ("mit und ohne frisches Tris") parallel durchgeführt, um eine Optimierung des RNA_i-Effekts zu erzielen.

Das mittels qPCR erhaltene Ergebnis für das Gen Cth90 ist exemplarisch in Abb. 40 dargestellt. Die Cth90-Transformanten wurden ohne frisches Tris (s. Abb. 40 A) bzw. mit frischem Tris (s. Abb. 40 B) auf einen Zelltiter von $2 \cdot 10^4$ Z/ml eingestellt und 2 h mit 0,05 µg/ml CdCl₂ inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte wie beschrieben (s. Kap. 4.17).

Es wird deutlich, dass das mRNA-Level der Transformanten in beiden Fällen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (0, Kalibrator) abnimmt. Die relativen mRNA-Mengen sinken auf Werte von ca. 0,6 (s. Abb. 40 A) bzw. etwa 0,18 (s. Abb. 40 B). Folglich konnte ein RNA_i-Effekt erfolgreich induziert werden, wobei dieser bei Verwendung von frischem Tris (s. Abb. 40 B) größer ist.

Bei der Optimierung der Bedingungen für die weiteren Gene wurde analog vorgegangen. Auch hier wurde der Einfluss des Tris-Mediums ("mit und ohne frisches Tris") überprüft. Abb. 41 gibt die Ergebnisse für die fünf weiteren Gene an, wobei für jedes Gen das Ergebnis für die jeweils angegebenen Bedingungen, mit denen der größte Effekt erzielt wurde, gezeigt ist.

Für die Prf1-, Vps13- und Cbp-Transformanten konnte ein ähnlicher Effekt wie für Cth90 festgestellt werden. Das mRNA-Level nahm durch die jeweilige Cd-Behandlung

ab (s. Abb. 41 B-D). Im Gegensatz dazu wurde für Snare und Drp1 keine Abnahme des mRNA-Levels beobachtet (s. Abb. 41 A und E). Vielmehr blieb die Expression bei Snare konstant und nahm bei Drp1 sogar zu.

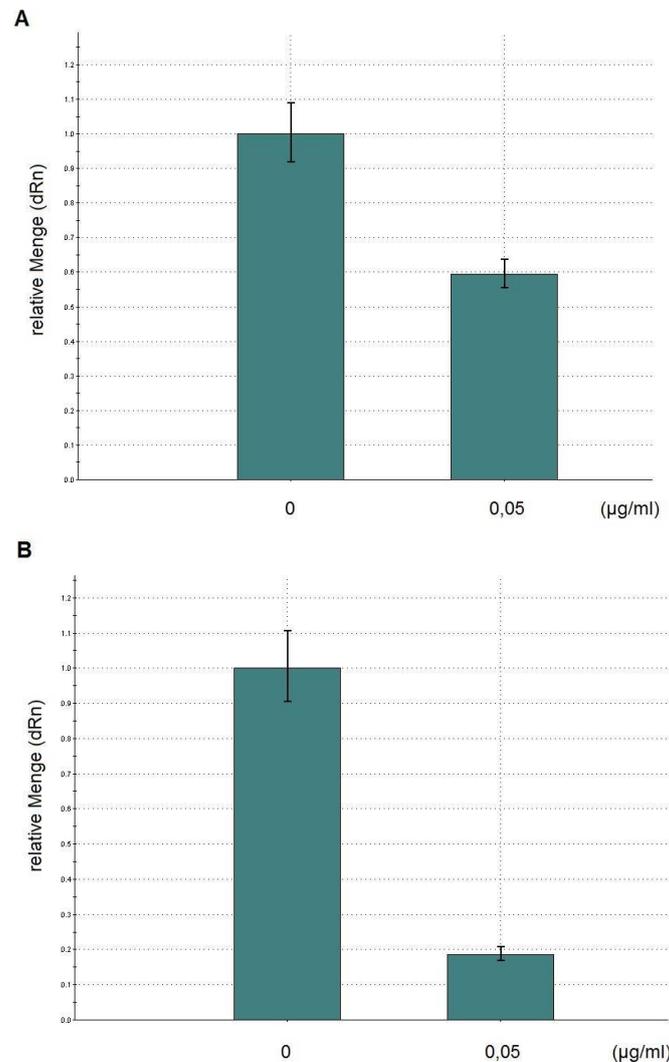


Abb. 40: Darstellung der im RNA_i-Experiment für Cth90-Transformanten mit abgeschlossenem *phenotypic assortment* erhaltenen Ergebnisse. **A)** Die Cth90-Transformanten wurden ohne Verwendung von frischem Tris bzw. **B)** mit frischem Tris auf einen Zelltitert von $2 \cdot 10^4$ Z/ml eingestellt und 2 h ohne Cd inkubiert (0, Kalibrator) bzw. 2 h mit 0,05 µg/ml (0,05) CdCl₂ behandelt. Die Ergebnisse zeigen, dass das mRNA-Level der Transformanten durch die beiden Cd-Behandlungsmethoden im Vergleich zu unbehandelten Zellen (0) abnimmt. Die relativen Mengen (dRn = delta Rn; Rn: normalisiertes Reportersignal) gehen auf Werte von ca. 0,6 (A) bzw. etwa 0,18 (B) zurück. Ein RNA_i-Effekt konnte demnach in den Transformanten induziert werden, wobei dieser bei Verwendung von frischem Tris (B) größer ist. Gemessen wurden jeweils Triplets (Fehlerbalken).

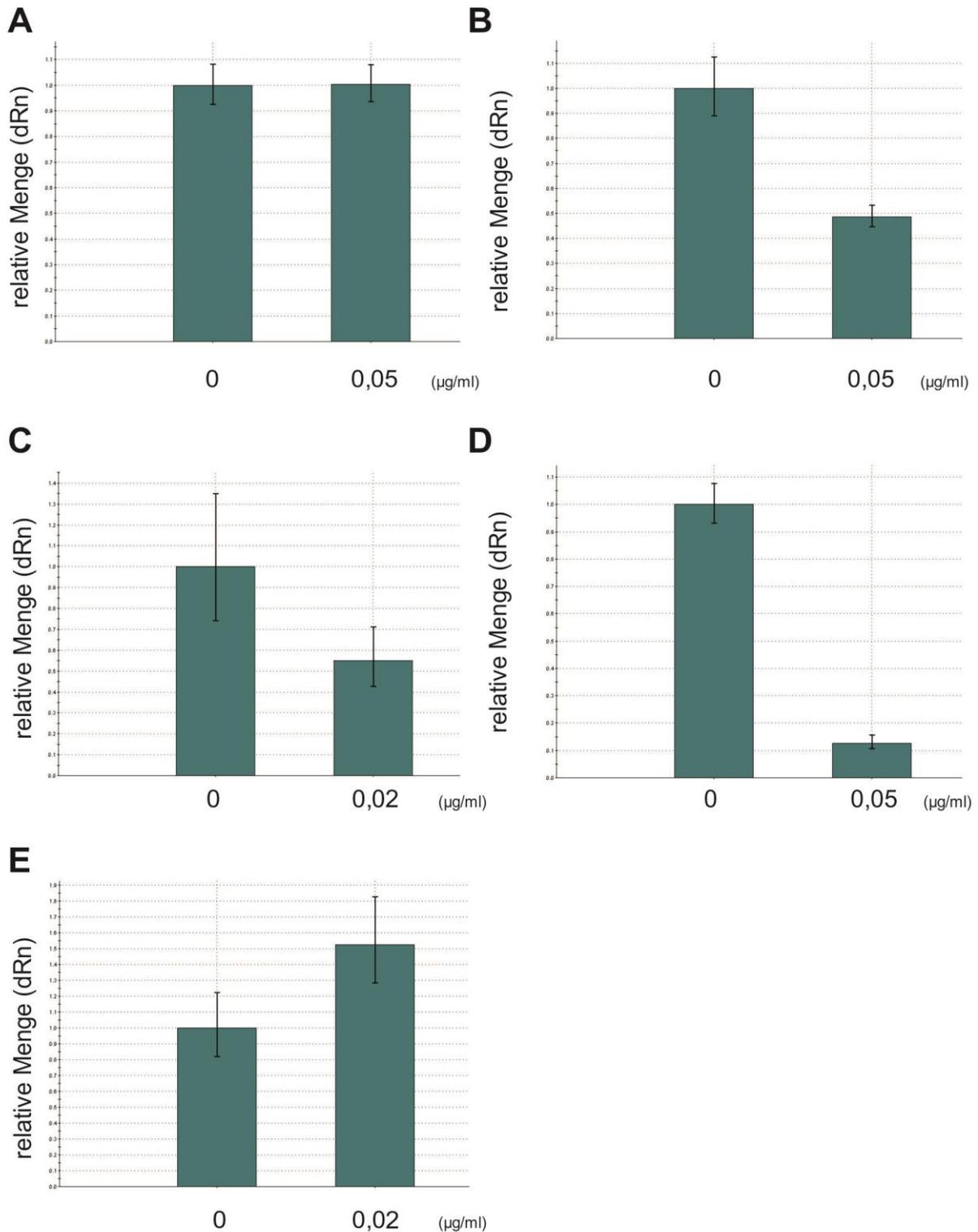


Abb. 41: Darstellung der im RNA_i-Experiment für Snare- (A), Prf1- (B), Vps13- (C), Cbp- (D) und Drp1-Transformanten (E) nach abgeschlossenem *phenotypic assortment* erhaltenen Ergebnisse.

Die Transformanten wurden ohne Verwendung von frischem Tris (C und D) bzw. mit frischem Tris (A, B und E) auf einen Zelltitert von $2 \cdot 10^4$ Z/ml eingestellt und 2 h mit den jeweils angegebenen Cadmium-Mengen behandelt. Als Kalibrator diente jeweils das mRNA-Level von Zellen, die *ohne* Cd inkubiert wurden (0). Dieses mRNA-Level wurde je auf den Wert 1 gesetzt (zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung in A-E). Nähere Erläuterungen: s. Text. Gemessen wurden jeweils Triplets (Fehlerbalken).

Zur besseren Übersicht sind die zuvor dargestellten Ergebnisse (s. Abb. 40 und Abb. 41) in Tab. 35 zusammengefasst. Die jeweils verwendeten Bedingungen sowie das dadurch erhaltene mRNA-Level sind angegeben.

Tab. 35: Erhaltene mRNA-Level durch angegebene Behandlungsmethoden von Transformanten mit abgeschlossenem *phenotypic assortment* (dRn = delta Rn; Rn: normalisiertes Reportersignal). Die grün hervorgehobenen Ergebnisse zeigen, dass für Cbp, Cth90, Prf1 und Vps13 geeignete Bedingungen gefunden wurden, mit denen ein RNA_i-Effekt ausgelöst werden kann. Für Drp1 wurde eine Zunahme der Expression (1,6) und für Snare eine konstante Expression (1) festgestellt. Die Behandlungsmethoden für diese beiden Gene mussten folglich weiter optimiert werden.

Transformant	CdCl ₂ (µg/ml)	Inkubations- zeit (h)	Frisches Tris	Relative mRNA- Menge (dRn)
Cbp	0,05	2	ohne	0,13
Cth90	0,05	2	mit	0,18
Drp1	0,02	2	mit	1,53
Prf1	0,05	2	mit	0,49
Snare	0,05	2	mit	1
Vps13	0,02	2	ohne	0,55

Besonders deutlich ist der nun verstärkte RNA_i-Effekt in Cbp- (dRn = 0,13) und Cth90-Transformanten (dRn = 0,18). Für Prf1 (dRn = 0,49) und Vps13 (dRn = 0,55) wurde eine Abnahme der Expression um etwa die Hälfte und somit ebenfalls ein verstärkter RNA_i-Effekt beobachtet (s. Tab. 35). Da für Drp1 (dRn = 1,53) und Snare (dRn = 1) keine geeigneten Bedingungen gefunden wurden, wurden für diese beiden Gene im Rahmen der nachfolgend dargestellten Analysen (s. Kap. 5.5.4.4) weitere Bedingungen getestet.

5.5.4.4 Überprüfung des RNA_i-Effekts

Nachfolgend werden die Ergebnisse von RNA_i-Experimenten vorgestellt, die zur Überprüfung der Behandlungsmethoden, die den bisherigen Ergebnissen zufolge (s. Tab. 35, grün) als geeignet erschienen, durchgeführt wurden. Diese Überprüfung erfolgte in der Weise, dass neben den Transformanten der Wildtyp CU427 mit den jeweils gleichen Bedingungen wie der Transformant behandelt wurde. Der Nachweis

eines RNA_i-Effekts erfolgte wiederum mittels quantitativer Real-Time-PCR, wobei die gemessenen Fluoreszenzwerte bzw. das sich daraus ergebende mRNA-Level auf das für den Wildtyp erhaltene mRNA-Level kalibriert wurde. Die für die verschiedenen Transformanten gewählten Bedingungen sind Tab. 36 zu entnehmen. Für Cbp, Cth90, Prf1 und Vps13 wurden die bereits optimierten Bedingungen (s. Tab. 35, grün) überprüft. Für Drp1 und Snare wurden weitere Bedingungen getestet (s. Tab. 36).

Tab. 36: Übersicht über die Behandlungsmethoden, die für die sechs verschiedenen Transformanten überprüft werden sollten.

Transformant	Behandlungsmethode
Cbp	ohne frisches Tris, 0.05 µg/ml CdCl ₂ , 2 h
Cth90	mit frischem Tris, 0.05 µg/ml CdCl ₂ , 2 h
Drp1	ohne frisches Tris, 0.05 µg/ml CdCl ₂ , 2 h
Prf1	mit frischem Tris, 0.05 µg/ml CdCl ₂ , 2 h
Snare	ohne frisches Tris, 0.02 µg/ml CdCl ₂ , 2 h
Vps13	ohne frisches Tris, 0.02 µg/ml CdCl ₂ , 2 h

Abb. 42 gibt die Ergebnisse der qPCR für die sechs Transformanten an. Bezüglich aller untersuchten Gene ist im Vergleich zum Wildtyp (dRn = 1) eine – wenn auch unterschiedlich starke – Abnahme der relativen mRNA-Menge zu erkennen (s. Abb. 42 A-F). Demnach ist davon auszugehen, dass durch Zugabe von Cd in den Transformanten ein RNA_i-Effekt erzeugt werden konnte. Zur Verdeutlichung sind die für die Transformanten erhaltenen Werte sowie die prozentuale Abnahme des mRNA-Levels im Vergleich zum Wildtyp in Tab. 37 dargestellt.

Der deutlichste Effekt trat bei Cbp- und Cth90-Transformanten auf. Hier ging das mRNA-Level fast auf Null zurück. Die prozentuale Abnahme beträgt für Cbp 95,2 % und für Cth90 98,3 % (s. Abb. 42 A, B und Tab. 37).

Für Drp1 ist eine Abnahme um etwa die Hälfte (48,5 %) und für Prf1 und Vps13 um mehr als $\frac{2}{3}$ (69,7 %) zu beobachten (s. Abb. 42 C, D, F und Tab. 37).

Für die Snare-Transformanten wurde nur ein geringer Effekt erzielt. Die mRNA-Menge nimmt bezogen auf den Wildtyp jedoch auch hier um 14,7 % ab (s. Abb. 42 E und Tab. 37).

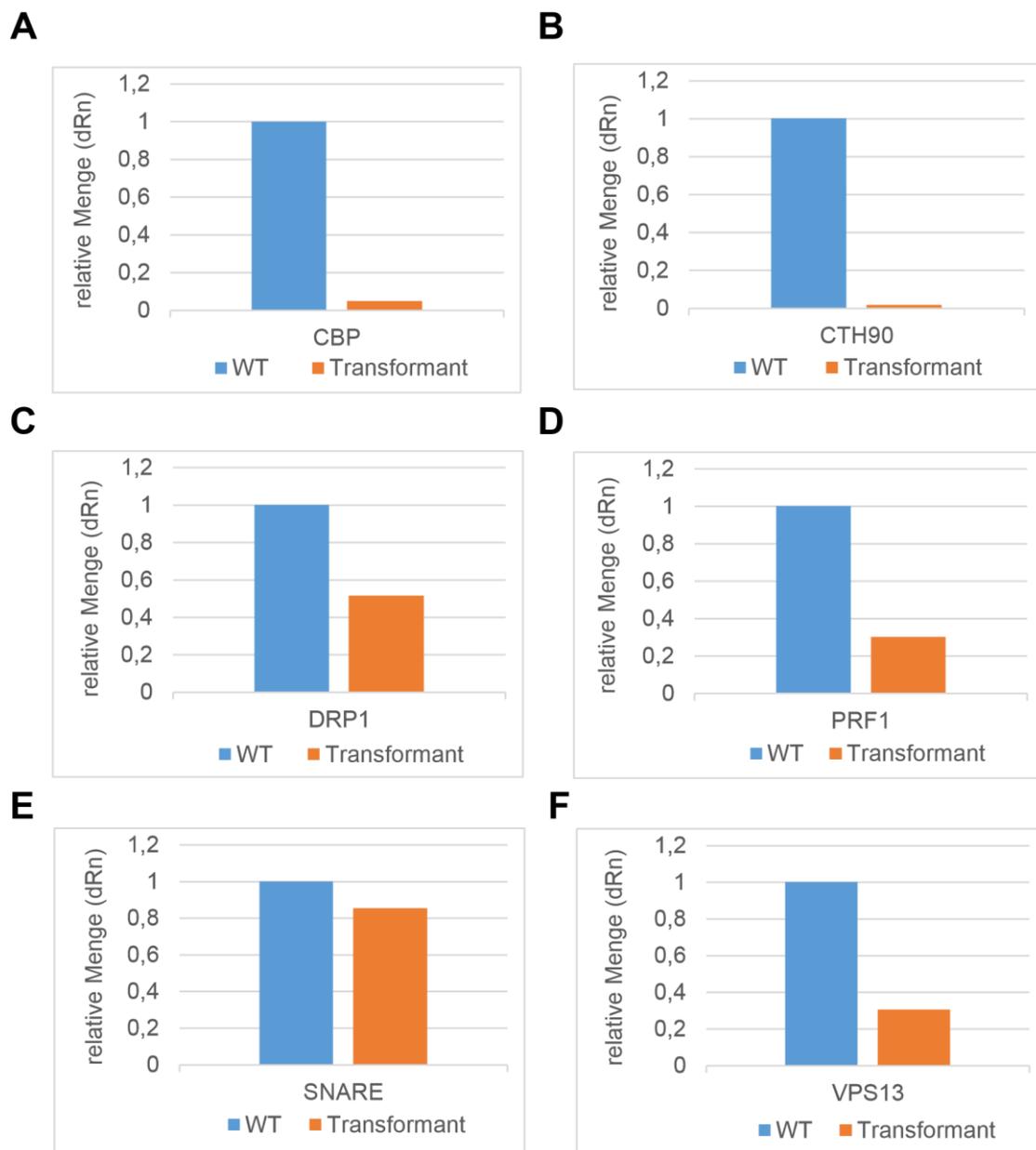


Abb. 42: Ergebnisse der Überprüfung der Behandlungsmethoden. Angegeben sind die durch qPCR ermittelten relativen mRNA-Mengen der Gene Cbp (A), Cth90 (B), Drp1 (C), Prf1 (D), Snare (E) und Vps13 (F) (dRn = delta Rn; Rn: normalisiertes Reportersignal). Die Werte wurden auf die relative Menge des Wildtyps CU427 (dRn = 1, WT, blau), der genauso wie der jeweilige Transformant mit Cd behandelt wurde, kalibriert. Die gewählten Behandlungsmethoden der verschiedenen Transformanten sind in Tab. 36 angegeben und den dargestellten Ergebnissen zufolge geeignet, um durch Induktion der RNA-Hairpin-Expression einen RNA_i-Effekt in den Zellen auszulösen. Die den Balken zugehörigen Werte, die sich für die Transformanten (orange) ergaben, sind in Tab. 37 angegeben.

Tab. 37: Erzielter RNA_i-Effekt. Für die sechs Transformanten wurden geeignete Bedingungen gefunden (s. Tab. 36), mit denen ein RNA_i-Effekt erzeugt werden konnte. Die relative mRNA-Menge (dRn = delta Rn; Rn: normalisiertes Reportersignal) der Transformanten und die prozentuale Abnahme in Bezug auf den (gleich behandelten) Wildtyp sind angegeben.

Transformant	Relative mRNA-Menge (dRn)	Abnahme (%)
Cbp	0,0476	95,2
Cth90	0,0171	98,3
Drp1	0,515	48,5
Prf1	0,303	69,7
Snare	0,853	14,7
Vps13	0,303	69,7

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für alle sechs untersuchten Gene eine Abnahme des mRNA-Levels erzielt werden konnten. Hierzu wurden die Transformanten in Hungermedium (10 mM Tris) kultiviert und mit niedrigen Cd-Konzentrationen (0,02/0,05 µg/ml CdCl₂) für 2 h inkubiert. Ob sich der auftretende RNA_i-Effekt phänotypisch bemerkbar macht, sollte nachfolgend durch mikroskopische Analysen überprüft werden (s. Kap. 5.5.5).

5.5.5 Mikroskopische Analyse von Phänotypen

Wie in Kap. 5.5.4 beschrieben, ist es durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RNA_i-Analysen gelungen, Konstrukte zu erstellen, mit denen in transformierten *Tetrahymena*-Zellen die Expression sechs verschiedener Gene (s. Kap. 5.5.2), die potentiell für phagosomale Proteine codieren, herunterzuregulieren. Die Bedingungen, die dazu geeignet sind, wurden in Kap. 5.5.4.4 angegeben.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob der durch die jeweiligen Bedingungen der Cd-Behandlung hervorgerufene RNA_i-Effekt phänotypische Auswirkungen hat.

Dazu wurden zum einen die Transformanten und zum anderen Wildtyp-Zellen (CU427) jeweils mit den gleichen Bedingungen behandelt und im Anschluss mit Tuschepartikeln gefüttert. Ziel hierbei war es, bei den Transformanten im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle ein verändertes Phagozytoseverhalten nachzuweisen. Es sollte mikroskopisch überprüft werden, ob möglicherweise weniger oder sogar gar keine Phagosomen gebildet werden oder andere Veränderungen zu beobachten sind, um

so eine Funktion des entsprechenden Gens bzw. Proteins in der Phagozytose nachweisen und eventuell näher charakterisieren zu können. Da die Ergebnisse für alle untersuchten Gene ähnlich aussahen, wird exemplarisch das Ergebnis, das für Drp1-Transformanten erhalten wurde, in Abb. 43 gezeigt.

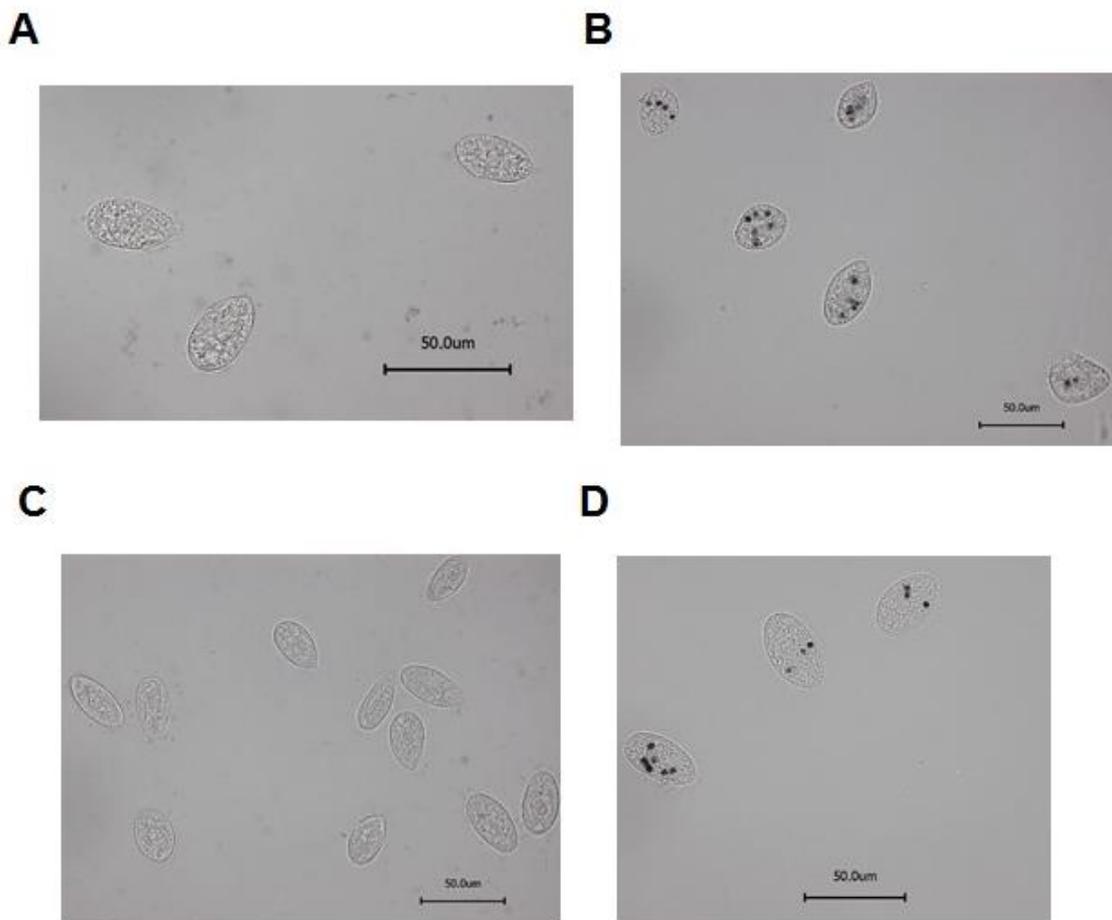


Abb. 43: Mikroskopische Aufnahmen zur Überprüfung von Phänotypen (Balken: 50 μm). Transformierte (A+B; hier: Drp1) und nicht-transformierte CU427 Wildtyp-Zellen (C+D) in Tris-Medium wurden 2 h mit 0,05 $\mu\text{g/ml}$ CdCl_2 behandelt und anschließend mit Tusche partikeln gefüttert. Die Aufnahmen zeigen die Zellen 30 sek nach Zugabe der Tusche partikel (A+C) bzw. 10 min nach Fütterung mit den Partikeln (B+D). Es wird deutlich, dass sich beim Vergleich der Phänotypen von Drp-Transformanten mit Phänotypen der Wildtyp-Zellen keine Unterschiede feststellen lassen. Nach 30 sek sind in beiden Fällen noch keine Phagosomen vorhanden, nach 10 min sind jedoch einige Phagosomen pro Zelle zu erkennen.

Die Aufnahmen zeigen die Drp1-Transformanten (s. Abb. 43 A und B) und die Wildtyp-Zellen (s. Abb. 43 C und D). Mikroskopische Aufnahmen wurden je 30 sek (s. Abb. 43 A und C) und 10 min (s. Abb. 43 B und D) nach Zugabe der Tusche partikel gemacht. Der Vergleich der für die Transformanten gemachten Beobachtungen mit denen der

Wildtyp-Zellen zeigt, dass keine Unterschiede im Phagozytoseverhalten der Zellen auftreten. Nach 30 sek sind in den Transformanten-Zellen keine Phagosomen sichtbar (s. Abb. 43 A), was jedoch nicht z.B. auf eine verzögerte Phagozytose zurückzuführen ist, da in den Wildtyp-Zellen (s. Abb. 43 C) ebenfalls keine Phagosomen vorhanden sind. Möglicherweise werden Tuscheartikel etwas langsamer phagozytiert als die bei der Phagosomenisolierung (s. Kap. 4.12) verwendeten Magnetobeads (s. Kap. 4.11), die 30 sek nach Fütterung von *Tetrahymena* zur Bildung eines Phagosoms pro Zelle führen. Nach 10 min sind jedoch sowohl in den Transformanten- als auch in den Wildtyp-Zellen einige Phagosomen vorhanden (s. Abb. 43 B und D). Wie bereits erwähnt, wurde dieses Ergebnis für alle sechs untersuchten Transformanten beobachtet. Demnach kann festgehalten werden, dass der zuvor nachgewiesene RNA_i-Effekt (s. Kap. 5.5.4) keinen Einfluss auf den Phänotyp der Zelle hat bzw. dass ein Einfluss mikroskopisch nicht nachgewiesen werden kann. Zukünftig sollten andere Methoden etabliert werden, um beispielsweise die Phagosomenzahl quantifizieren oder die Entstehung von Phagosomen zeitlich genauer verfolgen zu können. Eine weitere Möglichkeit, um auf die Funktion der Gene schließen zu können, wäre es, *Knockout*-Mutanten herzustellen, bei denen ein Effekt durch das komplette Ausschalten des Gens möglicherweise mikroskopisch zu beobachten wäre. Diese Alternative wäre jedoch deutlich aufwendiger.

5.5.6 Fazit der RNA_i-Analysen

Um ausgewählte Proteine hinsichtlich ihrer Funktion im Phagozytoseprozess von *Tetrahymena* zu untersuchen, wurde ein Ansatz der modernen Genetik (*reverse genetics*) genutzt und ein *Silencing* der entsprechenden Gene basierend auf dem natürlich in Eukaryoten vorkommenden Mechanismus der RNA-Interferenz durchgeführt. Hierzu wurden sechs Gene ausgewählt (s. Tab. 31), die für Proteine codieren, die in der MudPIT-Analyse, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde (s. Kap. 5.3), als phagosomale Proteine identifiziert wurden. Funktionen in der Phagozytose wurden für diese Proteine darüber hinaus in weiteren Studien nachgewiesen (s. Kap. 5.5.2).

Um einen RNA_i-Effekt in *Tetrahymena* zu erzielen, wurde auf eine im Jahr 2006 von Howard-Till und Yao etablierte Methode zurückgegriffen (Howard-Till & Yao 2006). Der

dabei verwendete Vektor wurde freundlicherweise von R. Howard-Till zur Verfügung gestellt (Vektorkarte: s. Abb. 44). Dieser ermöglicht eine Cadmium-induzierte Expression eines dsRNA-*Hairpins*, der enzymatisch in 23-24 nt siRNA-Moleküle gespalten wird, die schließlich mit Hilfe des Enzymkomplexes RISC den gezielten Abbau der mRNA eines bestimmten Gens bewirken (s. Abb. 31). Ein etwa 500 bp großer Bereich des Zielgens wurde in der vorliegenden Arbeit erfolgreich über die Schnittstellen PmeI und XmaI in den Vektor eingefügt. Der gleiche Bereich des Zielgens wurde außerdem mit umgekehrter Orientierung über die Schnittstellen XhoI und ApaI in den Vektor kloniert (s. Abb. 33). Positive *E. coli*-Transformanten wurden erfolgreich mittels Sequenzierung überprüft und die erstellten Konstrukte konnten mit Hilfe einer Genkanone (*gene gun*) in *T. thermophila*-Zellen eingebracht werden. Die Selektion und Anreicherung positiver *Tetrahymena*-Transformanten war durch Zugabe von Cycloheximid möglich, da der verwendete Vektor einen rRNA-codierenden Bereich (RPL29) mit einer Punktmutation besitzt, die den Zellen nach der Transfektion eine Cycloheximid-Resistenz verleiht (s. Kap. 5.5.3).

In den RNA_i-Experimenten wurden die Transformanten mit CdCl₂ behandelt und anschließend wurde ein Effekt der Cd-Behandlung bezüglich der Expression des Zielgens überprüft. Um einen möglichst großen Effekt zu erzielen, wurden verschiedene Cd-Konzentrationen und Inkubationszeiten getestet. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Gesamt-RNA aus einer definierten Zahl von Zellen isoliert und die Genexpression in einer One-Step RT-PCR analysiert (s. Kap. 5.5.4.1). Da mit dieser Methode keine Änderungen der Expression festgestellt wurden, wurden schließlich weitere Cd-Behandlungsmethoden mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR überprüft (s. Kap. 5.5.4.2). Mit dieser Methode war es möglich, eine Abnahme des mRNA-Levels nach Behandlung der Transformanten mit Cadmium nachzuweisen (s. Abb. 38 A). Diese Abnahme wurde in gleichermaßen behandelten Kontroll-Zellen (Wildtyp CU427) nicht beobachtet (s. Abb. 38 B), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Abnahme der mRNA-Menge auf die Expression des *Hairpins* zurückgeführt werden kann. Ein RNA_i-Effekt konnte demnach erfolgreich erzielt werden.

Da voneinander abweichende Ergebnisse beobachtet wurde, wenn das Zellpellet vor der Cd-Induktion in frischem Tris aufgenommen bzw. wenn der Zelltitel mit dem zuvor verwendeten Tris-Medium eingestellt wurde, wurden beide Ansätze ("mit und ohne

frisches Tris“) parallel durchgeführt, um eine Optimierung des RNA_i-Effekts zu erzielen (s. Kap. 5.5.4.3). Außerdem wurden Transformanten verwendet, die zuvor so kultiviert wurden, dass das so genannte *phenotypic assortment*, welches bewirkt, dass immer mehr Kopien des jeweiligen Konstrukts im Makronukleus vorliegen, abgeschlossen werden konnte (s. Kap. 5.5.4.3). Es ist davon auszugehen, dass in diesen Zellen ein deutlicherer RNA_i-Effekt auftritt.

Für vier Gene (Cbp, Cth90, Prf1 und Vps13) konnten geeignete Bedingungen gefunden werden, mit denen ein Gen-*Silencing* herbeigeführt werden konnte (s. Tab. 35, grün). Diese Bedingungen sowie für Drp1 und Snare weitere “Testbedingungen” (s. Tab. 36) wurden schließlich überprüft, indem neben den Transformanten als Kontrolle Wildtyp-Zellen auf die gleiche Weise behandelt wurden. Für alle sechs untersuchten Gene konnte im Vergleich zur Kontrolle ein leichter bis sehr starker RNA_i-Effekt gezeigt werden (s. Abb. 42 und Tab. 37). Eine Auswirkung des Effekts auf den Phänotyp konnte mittels Mikroskopie von Cd-behandelten und mit Tuschepartikeln gefütterten Transformanten nicht nachgewiesen werden (s. Kap. 5.5.5). Zukünftig sollten andere Methoden etabliert werden, um beispielsweise die Phagosomenzahl quantifizieren oder die Entstehung von Phagosomen zeitlich genauer verfolgen zu können.

6 Fazit und Interpretationen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand des Modellorganismus *Tetrahymena thermophila* an der Phagozytose beteiligte Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren. Dazu wurden Phagosomen bestimmter Reifungsstadien nach dem Verfahren der *Pulse-chase* Markierung (Voßkühler & Tiedtke 1993) aus *T. thermophila* isoliert und zunächst in einem biochemischen Ansatz untersucht. Die Proteine, die aus den isolierten Phagosomen erhalten wurden, wurden hierbei mit Hilfe der multidimensionalen Proteinidentifikationstechnologie (MudPIT) analysiert, wodurch ein Überblick über die Proteinzusammensetzung von Phagosomen während der ersten Schritte der Cyclose gewonnen werden konnte. In neu gebildeten (naszenten) Phagosomen konnten 764 Proteine und in 10 min alten (kondensierten) Phagosomen 347 Proteine nachgewiesen werden. Demnach konnte beim Übergang von naszenten zu kondensierten Phagosomen eine Abnahme der Proteinanzahl festgestellt werden. Die Übersicht der in der MudPIT-Analyse identifizierten Proteine macht deutlich, dass an der Zusammensetzung des Phagosoms von *T. thermophila* verschiedene Proteinklassen beteiligt sind. Hierzu gehören z.B. hydrolytische Enzyme oder Proteine, die eine Rolle beim Transport von Vesikeln spielen.

Neben der Charakterisierung von Phagosomen auf der Proteinebene sollten in einem molekularbiologischen Ansatz zeitliche Änderungen des Expressionslevels ausgewählter Gene nach Induktion der Phagozytose analysiert werden, um die Funktion der entsprechenden Proteine zu überprüfen und näher zu charakterisieren. Dazu konnte ein Real-Time-PCR-System erfolgreich etabliert werden. Die Ergebnisse der durchgeführten qPCR-Analysen zeigen für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine bzw. Gene Tpp2p, Tpp3p, Tpp5p und Tpp9p keine starke Zunahme des Expressionslevels der entsprechenden Gene nach Induktion der Phagozytose. Demnach stellen die genannten Tpp-Proteine phagosomale Proteine dar, die jedoch wahrscheinlich noch weitere Funktionen in der Zelle besitzen. Zukünftig könnten weitere Proteine mit Hilfe des in der vorliegenden Arbeit verwendeten qPCR-Systems auf eine potentielle Funktion in der Phagozytose hin untersucht werden. Außerdem wäre eine umfassende Transkriptomanalyse denkbar, um phagosomale Prozesse in *Tetrahymena* aufzuklären.

Ziel der qPCR-Analyse war es außerdem, am Beispiel der Tpp-Proteine zu überprüfen, ob die Änderungen des mRNA-Levels mit den entsprechenden Änderungen auf Proteinebene übereinstimmen, um so die in der MudPIT-Analyse erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren. Der Vergleich der durch MudPIT und durch qPCR erhaltenen Ergebnisse zeigt jedoch weitestgehend keine Übereinstimmungen von mRNA- und Proteinlevel zu den jeweiligen Zeitpunkten.

Aufgrund der – auch in der Literatur vielfach auftretenden – scheinbar fehlenden Korrelation von mRNA- und Proteinlevel sind die qPCR-Experimente nicht als Überprüfung, sondern als Ergänzung der MudPIT-Analysen anzusehen.

Die Analyse der stadienspezifischen Phagosomen sowie des mRNA-Levels der Zelle deutet darauf hin, dass **Tpp5p** vor allem an den ersten Schritten der Phagozytose (30 sek bis 10 min) beteiligt ist. Demnach ist davon auszugehen, dass das Protein an der Bildung und der Reifung des Phagosoms gleichermaßen beteiligt ist. Die Proteine **Tpp3p** und **Tpp9p** scheinen hingegen insbesondere an der Phagosomenreifung beteiligt zu sein. Beide Proteine kommen in naszenten Phagosomen nicht oder nur geringfügig vor. Die Vorhersage der Quartärstruktur für Tpp9p zeigt, dass das Protein drei Transmembranhelices besitzt. Dies lässt eine Einlagerung des Proteins in die Phagosomenmembran annehmen. Möglicherweise ist Tpp9p für den Transport von z.B. Proteinen oder Ionen oder die Signalübertragung durch die Membran zuständig bzw. an Membran-Fusionsprozessen beteiligt.

Die größten mRNA-Mengen wurden für **Tpp2p** nachgewiesen, so dass für dieses Protein im Vergleich zu den anderen Tpp-Proteinen eine stärkere Beteiligung an der Phagozytose angenommen werden kann. Zu welchen Zeitpunkten Tpp2p benötigt wird, kann anhand der erhaltenen Ergebnisse nicht eindeutig festgestellt werden. Die vorhergesagte Struktur des Proteins deutet allerdings darauf hin, dass Tpp2p möglicherweise ein Transportprotein darstellt. Der größte Teil des membrangebundenen Proteins befindet sich außerhalb des Phagosoms, so dass Tpp2p mit seinem cytoplasmatischen Bereich ein Substrat binden und über die Membran in das Phagosomeninnere transportieren könnte. Eine Funktion des Proteins könnte darin liegen, dass es an einem Vesikeltransport zwischen Phagosom und kontraktile Vakuole beteiligt ist.

In einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit sollte ein *Silencing* bestimmter Gene basierend auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz durchgeführt werden. Diese RNAi-Analysen dienen dazu, ausgewählte Proteine hinsichtlich ihrer Funktion im Phagozytoseprozess von *Tetrahymena* näher zu untersuchen.

Untersucht wurden die Gene von sechs in der MudPIT-Analyse identifizierten Proteinen:

Ein **Snare**-Protein, welches an intrazellulären Membran-Fusionsprozessen beteiligt ist, wurde in naszenten Phagosomen nachgewiesen, so dass eine Funktion bei der Entstehung des Phagosoms angenommen werden kann. Möglicherweise vermittelt es die Fusion von diskoidalen Vesikeln mit dem naszenten bzw. sich bildenden Phagosom. Das ebenfalls in naszenten Phagosomen vorliegende **Vps13** könnte die Fusion unterschiedlicher Vesikeltypen während der Bildung des Phagosoms ermöglichen. Vermutlich bewirkt es, dass diskoidale Vesikel in ausreichender Menge vorhanden sind und dass diese mit dem naszenten Phagosom fusionieren.

Die Proteine **Drp1** und **Prf1** scheinen an der Reifung des Phagosoms beteiligt zu sein. Drp1 wurde in kondensierten Phagosomen nachgewiesen und befindet sich an der "oral deep fiber". Dies lässt den Schluss zu, dass es möglicherweise die Fusion des Phagosoms mit Lysosomen vermittelt. Prf1, welches wie Drp1 in 10 min alten Phagosomen vorliegt, stellt ein Aktin-bindendes Protein dar, so dass eine Rolle bei der Bewegung des Phagosoms vom Cytostom zum Cytoprokt angenommen werden kann. Das Calmodulin-bindende Protein **Cbp** konnte in naszenten Phagosomen identifiziert werden und scheint eine Rolle bei der Bildung von Nahrungsvakuolen zu spielen. Erstaunlicherweise wurde auch **Cth90**, ein hydrolytisches Enzym, welches zu den Komponenten des Phagolysosoms zählt, lediglich in naszenten Phagosomen gefunden. Dies deutet darauf hin, dass die für die Phagozytose benötigten Hydrolasen möglicherweise nicht nur aus Lysosomen stammen, sondern bereits im naszenten Phagosom vorliegen.

Mit Hilfe des RNAi-Ansatzes sollten die Funktionen der sechs genannten Proteine überprüft werden, indem Auswirkungen des *Silencings* auf die Phagozytose analysiert wurden.

Hierzu konnten Konstrukte, die die Expression eines dsRNA-*Hairpins* durch Induktion mit Cadmium ermöglichen, erfolgreich erstellt und mit Hilfe einer Genkanone (*gene gun*) in *T. thermophila*-Zellen eingebracht werden. Nach Behandlung der

Transformanten mit Cadmium konnte eine Abnahme des mRNA-Levels nachgewiesen werden. Da diese Abnahme in gleichermaßen behandelten Kontroll-Zellen (Wildtyp CU427) nicht beobachtet wurde, konnte die abnehmende mRNA-Menge auf die Expression des *Hairpins* zurückgeführt und ein erzielter RNA_i-Effekt demnach bestätigt werden. Eine Auswirkung des Effekts auf den Phänotyp der Zelle konnte mittels Mikroskopie von Cd-behandelten und mit Tuschepartikeln gefütterten Transformanten nicht nachgewiesen werden. Die Phagocytose schien in *Tetrahymena*-Transformanten genauso stattzufinden wie in Wildtyp-Zellen. Zukünftig sollten weitere Methoden etabliert werden, um beispielsweise die Phagosomenzahl quantifizieren oder die Entstehung von Phagosomen zeitlich genauer verfolgen zu können. Denkbar wäre auch, dass die untersuchten Proteine/Gene nicht essentiell für eine funktionierende Phagocytose sind. Möglicherweise übernehmen andere Proteine die Aufgaben des Proteins, dessen Genexpression herunterreguliert wurde. Eventuell ist auch ein vollständiger *Knockout* nötig, um mikroskopisch sichtbare Auswirkungen auf den Phänotyp zu erzielen.

Außerdem könnten Organismen mit durch Mutagenese induzierten auffälligen Phänotypen auf Genom-Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden (*forward genetics*).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen näheren Einblick in den Prozess der Phagocytose von *T. thermophila* geben. Die Identifikation einer Vielzahl von Proteinen in stadienspezifischen Phagosomen ermöglicht es, an der Phagocytose beteiligte Proteine zukünftig im Hinblick auf ihre Funktion zu charakterisieren. Um die Lokalisation der Proteine im Phagosom zu überprüfen bzw. zu bestätigen, könnten GFP-fusionierte Proteine hergestellt werden. Außerdem könnten weitere phagosomale Stadien analysiert werden, um so ein umfassenderes Bild zu erhalten.

Ausgewählte Proteine (Tpps) konnten in der vorliegenden Arbeit durch mRNA-Analysen näher charakterisiert werden. Für diese Proteine angenommene Funktionen sollten in Zukunft beispielsweise ebenfalls durch RNA_i-Analysen überprüft werden. In Bezug auf ihre Funktion konnten für die in der RNA_i-Analyse untersuchten Proteine bzw. Gene keine Aussagen getroffen werden, da Auswirkungen auf die Phagocytose nicht beobachtet werden konnten. Jedoch konnte für alle untersuchten Gene ein RNA_i-

Effekt erzielt werden, so dass auf diese Weise generell auf die Phagocytosebeteiligung der entsprechenden Proteine geschlossen werden kann. Die RNA_i-Analyse weiterer Gene sowie die Entwicklung von Methoden, mit denen sich der RNA_i-Effekt überprüfen lässt, würden ebenfalls dazu beitragen, die Phagocytoseprozesse in *Tetrahymena* besser zu verstehen. Letztlich kann dieses Verständnis dazu beitragen, die Prozesse, die beim Menschen bei der Verteidigung gegen eindringende, pathogene Mikroorganismen eine wichtige Rolle spielen, aufzuklären. Dadurch wäre die Möglichkeit gegeben, an bestimmten Stellen in die Phagocytose einzugreifen, so dass pathogene Mikroorganismen nicht mehr in der Lage sind, mit Hilfe verschiedenster Überlebensmechanismen der Phagocytose zu entgehen. Umfassende Erkenntnisse über die molekularen Zusammenhänge der Phagocytose könnten demnach eine große Relevanz hinsichtlich medizinischer Fragestellungen erlangen.

7 Literatur

- Allen**, L. A.H.; Aderem, A. (1996): Mechanisms of phagocytosis. In: *Current Opinion in Immunology* 8; Jg. 1996-02 (1), S. 36–40.
- Allen**, R. D. (Hg.) (1988): Cytology. In: *Paramecium* (Görtz, H.-D.). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Allen**, R. D.; Fok, A. K. (1983): Nonlysosomal vesicles (acidosomes) are involved in phagosome acidification in *Paramecium*. In: *Journal of Cell Biology* 97; Jg. 1983 (2), S. 566–570.
- Allen**, R. D.; Wolf, R. W. (1979): Membrane recycling at the cytoproct of *Tetrahymena*. In: *Journal of Cell Science* 35, S. 217–227.
- Allen**, R. D. (1967): Fine Structure, Reconstruction and Possible Functions of Components of the Cortex of *Tetrahymena pyriformis*. In: *The Journal of Protozoology* 14 (4), S. 553–565.
- Allen**, R. D.; Bala, N. P.; Ali, R. F.; Nishida, D. M.; Aihara, M. S.; Ishida, M.; Fok, A. K. (1995): Rapid bulk replacement of acceptor membrane by donor membrane during phagosome to phagoacidosome transformation in *Paramecium*. In: *Journal of Cell Science* 108; Jg. 1995 (Pt 3), S. 1263–1274.
- Altschuler**, M. I.; Yao, M. C. (1985): Macronuclear DNA of *Tetrahymena thermophila* exists as defined subchromosomal-sized molecules. In: *Nucleic Acids Research* 13; Jg. 1985 (16), S. 5817–5831.
- Andreassen**, P. H.; Dreisig, H.; Kristiansen, K. (1987): Unusual ciliate-specific codons in *Tetrahymena* messenger-RNAs are translated correctly in a rabbit reticulocyte lysate supplemented with a subcellular fraction from *Tetrahymena*. In: *Biochemical Journal* 244; Jg. 1987-06-01 (2), S. 331–335.
- Asai**, D. J.; Forney, J. D. (2000): *Methods in Cell Biology*. Volume 62. *Tetrahymena thermophila*. Unter Mitarbeit von L. Wilson und P. Matsudaira. San Diego, London: Academic Press.
- Awan**, A.; Bell, A. J.; Satir, P. (2009): Kin5 knockdown in *Tetrahymena thermophila* using RNAi blocks cargo transport of Gef1. In: *PLoS ONE Electronic Resource* 4; Jg. 2009 (3), S. e4873.
- Bacaj**, T.; Pang, Z. P.; Suedhof, T. C. (2010): Testing the Snare/SM protein model of membrane fusion. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107; Jg. 2010-12-28 (52), S. 22365–22366.
- Baldi**, P.; Long, A. D. (2001): A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes. In: *Bioinformatics* 17; Jg. 2001-06 (6), S. 509–519.
- Bared**, S. M.; Buechler, C.; Boettcher, A.; Dayoub, R.; Sigrüener, A.; Grandl, M. *et al.* (2004): Association of ABCA1 with syntaxin 13 and flotillin-1 and enhanced phagocytosis in Tangier cells. In: *Molecular Biology of the Cell* 15; Jg. 2004-12 (12), S. 5399–5407.

- Batz**, W.; Wunderlich, F. (1976): Structural transformation of the phagosomal membrane in *Tetrahymena* cells endocytosing latex beads. In: *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.; Voßkühler, 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.
- Beron**, W.; Alvarez-Dominguez, C.; Mayorga, L.; Stahl, P. D. (1995): Membrane trafficking along the phagocytic pathway. In: *Trends in Cell Biology* 5; Jg. 1995 (3), S. 100–104.
- Blackburn**, E. H.; Gall, J. G. (1978): A tandemly repeated sequence at termini of extrachromosomal ribosomal-RNA genes in *Tetrahymena*. In: *Journal of Molecular Biology* 120; Jg. 1978 (1), S. 33–53.
- Blocker**, A.; Griffiths, G.; Olivo, J. C.; Hyman, A. A.; Severin, F. F. (1998): A role for microtubule dynamics in phagosome movement. In: *Journal of Cell Science* 111; Jg. 1998-02, S. 303–312.
- Blocker**, A.; Severin, F. F.; Burkhardt, J. K.; Bingham, J. B.; Yu, H. R.; Olivo, J. C. *et al.* (1997): Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules. In: *Journal of Cell Biology* 137; Jg. 1997-04-07 (1), S. 113–129.
- Boman**, A. L.; Zhang, C. J.; Zhu, X. J.; Kahn, R. A. (2000): A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi. In: *Molecular Biology of the Cell* 11; Jg. 2000-04 (4), S. 1241–1255.
- Bordier**, C. (1981): Phase-separation of integral membrane-proteins in Triton X-114 solution. In: *Journal of Biological Chemistry* 256; Jg. 1981 (4), S. 1604–1607.
- Bowman**, G. R.; Elde, N. C.; Morgan, G.; Winey, M.; Turkewitz, A. P. (2005): Core formation and the acquisition of fusion competence are linked during secretory granule maturation in *Tetrahymena*. In: *Traffic* 6; Jg. 2005-04 (4), S. 303–323.
- Browman**, D. T.; Hoegg, M. B.; Robbins, S. M. (2007): The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. In: *Trends in Cell Biology* 17; Jg. 2007-08 (8), S. 394–402.
- Brownell**, J. E.; Zhou, J. X.; 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. In: *Cell* 84; Jg. 1996-03-22 (6), S. 843–851.
- Camilli**, P. de; Chen, H.; Hyman, J.; Panepucci, E.; Bateman, A.; Brunger, A. T. (2002): The ENTH domain. In: *FEBS Letters* 513; Jg. 2002-02-20 (1), S. 11–18.
- Campbell**, N. A.; Reece, J. B. (2003): Biologie. 6. Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Caron**, F.; Meyer, E. (1985): Does *Paramecium-primaurelia* use a different genetic-code in its macronucleus. In: *Nature* 314; Jg. 1985 (6007), S. 185–188.
- Carr**, C. M.; Rizo, J. (2010): At the junction of Snare and SM protein function. Review. In: *Current Opinion in Cell Biology* 22; Jg. 2010 (4), S. 488–495.

- Cassidy-Hanley, D.;** Bowen, J.; Lee, J. H.; Cole, E.; VerPlank, L. A.; Gaertig, J. *et al.* (1997): Germline and somatic transformation of mating *Tetrahymena thermophila* by particle bombardment. In: *Genetics* 146; Jg. 1997 (1), S. 135–147.
- Cech, T. R.** (1989): RNA chemistry. Ribozyme self-replication? In: *Nature* 339; Jg. 1989 (6225), S. 507–508.
- Chastellier, C. de;** Lang, T.; Thilo, L. (1995): Phagocytic processing of the macrophage endoparasite, *Mycobacterium avium*, in comparison to phagosomes which contain *Bacillus subtilis* or latex beads. In: *European Journal of Cell Biology* 68; Jg. 1995 (2), S. 167–182.
- Chastellier, C. de;** Ryter, A.; Thilo, L. (1983): Membrane shuttle between plasma membrane, phagosomes, and pinosomes in *Dictyostelium discoideum* amoeboid cells. In: *European Journal of Cell Biology* 30; Jg. 1983 (2), S. 233–243.
- Chastellier, C. de;** Thilo, L. (2002): Pathogenic *Mycobacterium avium* remodels the phagosome membrane in macrophages within days after infection. In: *European Journal of Cell Biology* 81; Jg. 2002-01 (1), S. 17–25.
- Collins, K.;** Gorovsky, M. A. (2005): *Tetrahymena thermophila*. In: *Current Biology* 15; Jg. 2005-05-10 (9), S. R317-R318.
- Confalonieri, F.;** Duguet, M. (1995): A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. In: *Bioessays* 17; Jg. 1995-07 (7), S. 639–650.
- Coppolino, M. G.;** Kong, C.; Mohtashami, M.; Schreiber, A. D.; Brumell, J. H.; Finlay, B. B. *et al.* (2001): Requirement for N-ethylmaleimide-sensitive factor activity at different stages of bacterial invasion and phagocytosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 276; Jg. 2001-02-16 (7), S. 4772–4780.
- Cosson, P.;** Soldati, T. (2008): Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. In: *Current Opinion in Microbiology* 11; Jg. 2008-06 (3), S. 271–276.
- Cox, F. E.G.** (1967): A quantitative method for measuring uptake of carbon particles by *Tetrahymena pyriformis*. In: *Transactions of the American Microscopical Society* 86; Jg. 1967 (3), S. 261-267.
- Coyne, R. S.;** Chalker, D. L.; Yao, M. C. (1996): Genome downsizing during ciliate development: Nuclear Division of Labor through chromosome restructuring. In: *Annual Review of Genetics* 30; Jg. 1996, S. 557–578.
- Coyne, R. S.;** Thiagarajan, M.; Jones, K. M.; Wortman, J. R.; Tallon, L. J.; Haas, B. J. *et al.* (2008): Refined annotation and assembly of the *Tetrahymena thermophila* genome sequence through EST analysis, comparative genomic hybridization, and targeted gap closure. In: *BMC Genomics* 9; Jg. 2008-11-26.
- Csank, C.;** Taylor, F. M.; Martindale, D. W. (1990): Nuclear pre-messenger-RNA introns - analysis and comparison of intron sequences from *Tetrahymena thermophila* and other eukaryotes. In: *Nucleic Acids Research* 18; Jg. 1990-09-11 (17), S. 5133–5141.
- Degasperi, R.;** Al Daher, S.; Daniel, P. F.; Winchester, B. G.; Jeanloz, R. W.; Warren, C. D. (1991): The substrate specificity of bovine and feline lysosomal alpha-D mannosidases in relation to alpha mannosidosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 266(1991) (25), S. 16556–16563.

- Desjardins, M.** (2003): ER-mediated phagocytosis: A new membrane for new functions. In: *Nature Reviews Immunology* 3; Jg. 2003-04 (4), S. 280–291.
- Desjardins, M.; Celis, J. E.; van Meer, G.; Dieplinger, H.; Jahraus, A.; Griffiths, G.; Huber, L. A.** (1994a): Molecular characterization of phagosomes. In: *Journal of Biological Chemistry* 269; Jg. 1994 (51), S. 32194–32200.
- Desjardins, M.; Huber, L. A.; Parton, R. G.; Griffiths, G.** (1994b): Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. In: *Journal of Cell Biology* 124; Jg. 1994-03 (5), S. 677–688.
- Deussing, J.; Kouadio, M.; Rehman, S.; Werber, I.; Schwinde, A.; Peters, C.** (2002): Identification and characterization of a dense cluster of placenta-specific cysteine peptidase genes and related genes on mouse chromosome 13. In: *Genomics* 79; Jg. 2002-02 (2), S. 225–240.
- Dingle, J. T.; Dean, R. T.** (1984): *Lysosomes in Biology and Pathology*. Amsterdam: Elsevier, North Holland Publishing Company.
- Doerder, F. P.; Hallberg, R. L.** (1989): Identification of a cDNA coding for the SerH3 surface protein of *Tetrahymena thermophila*. In: *Journal of Protozoology* 36; Jg. 1989 (3), S. 304–307.
- Dondero, F.; Cavaletto, M.; Ghezzi, A. R.; La Terza, A.; Banni, M.; Viarengo, A.** (2004): Biochemical characterization and quantitative gene expression analysis of the multi-stress inducible metallothionein from *Tetrahymena thermophila*. In: *Protist* 155; Jg. 2004-06 (2), S. 157–168.
- Doudna, J. A.; Rath, V. L.** (2002): Structure and function of the eukaryotic ribosome: The next frontier. In: *Cell* 109; Jg. 2002-04-19 (2), S. 153–156.
- Dryl, S.** (1959): Antigenic transformation in *Paramecium-aurelia* after homologous antiserum treatment during autogamy and conjugation. In: *Journal of Protozoology* 6; Jg. 1959 (3), S. 25.
- Eisen, Jonathan A.; Coyne, Robert S.; Wu, Martin; Wu, Dongying; Thiagarajan, Mathangi; Wortman, Jennifer R. et al.** (2006): Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. In: *PLOS Biology* 4; Jg. 2006-09 (9), S. 1620–1642.
- Elbashir, S. M.; Lendeckel, W.; Tuschl, T.** (2001): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. In: *Genes & Development* 15; Jg. 2001-01-15 (2), S. 188–200.
- 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. In: *PLOS Genetics* 1; Jg. 2005-11 (5), S. 514–526.
- Elliott, A. M.; Clemmons, G. L.** (1966): An ultrastructural study of ingestion and digestion in *Tetrahymena pyriformis*. In: *Journal of Protozoology* 13; Jg. 1966 (2), S. 311–323.
- Eskelinen, E. L.; Tanaka, Y.; Saftig, P.** (2003): At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. In: *Trends in Cell Biology* 13; Jg. 2003-03 (3), S. 137–145.

- Feng, L.;** Miao, W.; Wu, Y. (2007): Differentially expressed genes of *Tetrahymena thermophila* in response to tributyltin (TBT) identified by suppression subtractive hybridization and real time quantitative PCR. In: *Aquatic Toxicology* 81; Jg. 2007-02-15 (1), S. 99–105.
- Gaertig, J.;** Gorovsky, M. A. (1992): Efficient mass transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation of conjugants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89; Jg. 1992 (19), S. 9196–9200.
- Gaertig, J.;** Kapler, G. (2000): Transient and stable DNA transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation. In: *Asai, David J. Author, Forney, James D. Author. Methods in Cell Biology; Tetrahymena thermophila. 2000. 485-499.*
- Gagnon, E.;** Duclos, S.; Rondeau, C.; Chevet, E.; Cameron, P. H.; Steele-Mortimer, O. *et al.* (2002): Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. In: *Cell* 110; Jg. 2002-07-12 (1), S. 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. In: *Journal of Cell Biology* 152; Jg. 2001-01-08 (1), S. 165–180.
- Gentili, H. G.;** Nosedá, D. G.; Nani, M. L.; Nusblat, A.; Tiedtke, A.; Nudel, C. B.; Florin-Christensen, J. (2007): The use of *Tetrahymena thermophila* mutant cell line for removal of cholesterol from milk. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 74; Jg. 2007-03 (4), S. 776–782.
- Gibbons, I. R.;** Rowe, A. J. (1965): Dynein - a protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. In: *Science* 149; Jg. 1965 (3682), S. 424-426.
- Gonda, K.;** Katoh, M.; Hanyu, K.; Watanabe, Y.; Numata, O. (1999): Ca²⁺/calmodulin and p85 cooperatively regulate an initiation of cytokinesis in *Tetrahymena*. In: *Journal of Cell Science* 112; Jg. 1999-11 (21), S. 3619–3626.
- Gonda, K.;** Komatsu, M.; Numata, O. (2000): Calmodulin and Ca²⁺/calmodulin-binding proteins are involved in *Tetrahymena thermophila* phagocytosis. In: *Cell Structure and Function* 25; Jg. 2000-08 (4), S. 243–251.
- 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. In: *Molecular & Cellular Proteomics* 5; Jg. 2006-12 (12), S. 2228–2243.
- Greenbaum, D.;** Colangelo, C.; Williams, K.; Gerstein, M. (2003): Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. In: *Genome Biology* 4; Jg. 2003 (9).
- Greider, C. W.;** Blackburn, E. H. (1985): Identification of a specific telomere terminal transferase-activity in *Tetrahymena* extracts. In: *Cell* 43; Jg. 1985 (2), S. 405–413.
- Grell, K. G.** (1968): Protozoologie. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Gross, S. R.;** Kinzy, T. G. (2005): Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 12; Jg. 2005-09 (9), S. 772–778.
- Gruner, H.-E.** (1980): Lehrbuch der Speziellen Zoologie. Band I: Wirbellose Tiere. 1. Teil: Einführung, Protozoa, Placozoa, Porifera. 4. Aufl. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

- Guermontprez, P.** (2004): ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. In: *Tissue Antigens* 64; Jg. 2004-10 (4), S. 330.
- Guermontprez, P.; Saveanu, L.; Kleijmeer, M.; Davoust, J.; van Endert, P.; Amigorena, S.** (2003): ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. In: *Nature* 425; Jg. 2003-09-25 (6956), S. 397–402.
- Guo, L.; Fu, C.; Miao, W.** (2008): Cloning, characterization, and gene expression analysis of a novel cadmium metallothionein gene in *Tetrahymena pigmentosa*. In: *Gene* 423; Jg. 2008 (1), S. 29–35.
- 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. In: *Journal of Cell Science* 114; Jg. 2001-01 (1), S. 229–240.
- Hai, B.; Gaertig, J.; Gorovsky, M. A.** (2000): Knockout heterokaryons enable facile mutagenic analysis of essential genes in *Tetrahymena*. In: *Methods in Cell Biology* 62; Jg. 2000, S. 513–531.
- Hamilton, E. P.; Williamson, S.; Dunn, S.; Merriam, V.; Lin, C.; Vong, L. et al.** (2006): The highly conserved family of *Tetrahymena thermophila* chromosome breakage elements contains an invariant 10-base-pair core. In: *Eukaryotic Cell* 5; Jg. 2006-04 (4), S. 771–780.
- Hammond, S. M.** (2005): Dicing and slicing - The core machinery of the RNA interference pathway. In: *FEBS Letters* 579; Jg. 2005-10-31 (26), S. 5822–5829.
- Hanahan, D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Journal of Molecular Biology* 166; Jg. 1983 (4), S. 557–580.
- Hanahan, D.** (1985): Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: *Glover, D M(ED.). DNA Cloning, VOL. 1. A practical approach. XIV+190P. IRL Press: Oxford, England; Washington, D.C., USA. Illus. Paper. 109-136; Jg. 1985.*
- Hartmann, M.; Guberman, A.; Florin-Christensen, M.; Tiedtke, A.** (2000): Screening for and characterization of phospholipase A(1) hypersecretory mutants of *Tetrahymena thermophila*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 54; Jg. 2000-09 (3), S. 390–396.
- Hatzimanikatis, V.; Choe, L. H.; Lee, K. H.** (1999): Proteomics: Theoretical and experimental considerations. In: *Biotechnology Progress* 15; Jg. 1999-06 (3), S. 312–318.
- Helftenbein, E.** (1985): Nucleotide sequence of a macronuclear DNA molecule coding for alpha-tubulin from the ciliate *Stylonychia lemnae*. Special codon usage: TAA is not a translation termination codon. In: *Nucleic Acids Research* 13; Jg. 1985 (2), S. 415–433.
- Hemmi, H.; Yamashita, S.; Shimoyama, T.; Nakayama, T.; Nishino, T.** (2001): Cloning, expression, and characterization of cis-polyprenyl diphosphate synthase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. In: *Journal of Bacteriology* 183; Jg. 2001-01 (1), S. 401–404.
- Horowitz, S.; Gorovsky, M. A.** (1985): An unusual genetic-code in nuclear genes of *Tetrahymena*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82; Jg. 1985 (8), S. 2452–2455.

- 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. In: *Cell Motility and the Cytoskeleton* 61; Jg. 2005-05 (1), S. 49–60.
- Houde**, M.; Bertholet, S.; Gagnon, E.; Brunet, S.; Goyette, G.; Laplante, A. *et al.* (2003): Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. In: *Nature* 425; Jg. 2003 (6956), S. 402–406.
- Howard-Till**, R. A.; Yao, M.-C. (2006): Induction of gene silencing by hairpin RNA expression in *Tetrahymena thermophila* reveals a second small RNA pathway. In: *Molecular and Cellular Biology* 26; Jg. 2006-12 (23), S. 8731–8742.
- Introne**, W.; Boissy, R. E.; Gahl, W. A. (1999): Clinical, molecular, and cell biological aspects of Chediak-Higashi syndrome. In: *Molecular Genetics and Metabolism* 68; Jg. 1999-10 (2), S. 283–303.
- Jacobs**, M. E.; DeSouza, L. V.; Samaranayake, H.; Pearlman, R. E.; Siu, K. W. M.; Klobutcher, L. A. (2006): The *Tetrahymena thermophila* phagosome proteome. In: *Eukaryotic Cell* 5; Jg. 2006-12 (12), S. 1990–2000.
- Jahraus**, A.; Storrie, B.; Griffiths, G.; Desjardins, M. (1994): Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the prelysosomal/late endosome compartment. In: *Journal of Cell Science* 107; Jg. 1994 (Pt 1), S. 145–157.
- Jenkins**, N.; Curling, E. M.A. (1994): Glycosylation of recombinant proteins - problems and prospects. In: *Enzyme and Microbial Technology* 16; Jg. 1994-05 (5), S. 354–364.
- Kang**, D. H.; Gho, Y. S.; Suh, M. K.; Kang, C. H. (2002): Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Bulletin of the Korean Chemical Society* 23; Jg. 2002-11-20 (11), S. 1511–1512.
- Karp**, G. (2005): Molekulare Zellbiologie. Aus dem Amerikanischen übersetzt von Kurt Beginnen, Sebastian Vogel und Susanne Kuhlmann-Krieg. 1. deutsche Aufl. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Kawasaki-Nishi**, S.; Nishi, T.; Forgac, M. (2003): Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. In: *FEBS Letters* 545; Jg. 2003-06-12 (1), S. 76–85.
- Kitajima**, Y.; Thompson, G. A. (1977): Differentiation of food vacuolar membranes during endocytosis in *Tetrahymena*. In: *Journal of Cell Biology* 75; Jg. 1977 (2), S. 436–445.
- Kokubun**, Y.; Kobayashi, N. (1979): Phagocytosis. Its Physiology and Pathology. Tokyo: University of Tokyo Press.
- Kozak**, M. (1978): How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? Review 183 refs. In: *Cell* 15; Jg. 1978 (4), S. 1109–1123.
- Kuhn**, M.; Goebel, W. (1995): Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*. Review 161 refs. In: *Genetic Engineering (New York)* Jg. 1995.
- 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. In: *Molecular & Cellular Biochemistry* 96; Jg. 1990 (2), S. 137–142.

- Lamaze**, C.; Schmid, S. L. (1995): The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. In: *Current Opinion in Cell Biology* 7; Jg. 1995-08 (4), S. 573–580.
- Landis**, W. G.; Haley, D. M.; Haley, M. V.; Johnson, D. W.; Durst, H. D.; Savage, R. E. (1987): Discovery of multiple organofluorophosphate hydrolyzing activities in the protozoan *Tetrahymena thermophila*. In: *Journal of Applied Toxicology* 7; Jg. 1987-02 (1), S. 35–41.
- Larson**, D. D.; Blackburn, E. H.; Yaeger, P. C.; Orias, E. (1986): Control of rDNA replication in *Tetrahymena* involves a cis-acting upstream repeat of a promoter element. In: *Cell* 47; Jg. 1986-10-24 (2), S. 229–240.
- Latterich**, M.; Froehlich, K.-U.; Schekman, R. (1995): Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. In: *Cell* 82/1995 (6), S. 885–893.
- 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. In: *Current Opinion in Cell Biology* 12; Jg. 2000-08 (4), S. 457–466.
- Levine**, N. D.; Corliss, J. O.; Cox, F. E.G.; Deroux, G.; Grain, J.; Honigberg, B. M. *et al.* (1980): A newly revised classification of the protozoa. In: *Journal of Protozoology* 27; Jg. 1980 (1), S. 37–58.
- 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. In: *Methods (Duluth)* 25; Jg. 2001 (4), S. 402–408.
- Lock**, R.; Ohman, L.; Dahlgren, C. (1987): Phagocytic recognition mechanisms in human-granulocytes and *Acanthamoeba castellanii* using type-1 fimbriated *Escherichia coli* as phagocytic prey. In: *FEMS Microbiology Letters* 44; Jg. 1987-09 (1), S. 135–140.
- Madinger**, C. L.; Collins, K.; Fields, L. G.; Taron, C. H.; Benner, J. S. (2010): Constitutive Secretion in *Tetrahymena thermophila*. In: *Eukaryotic Cell* 9; Jg. 2010-05 (5), S. 674–681.
- Maicher**, M. T.; Tiedtke, A. (1999): Biochemical analysis of membrane proteins from an early maturation stage of phagosomes. In: *Electrophoresis* 20; Jg. 1999-05 (4-5), S. 1011–1016.
- Maihle**, N. J. (1985): Protein secretion in *Tetrahymena thermophila* - characterization of the secretory mutant strain SB281. In: *Journal of Cell Science* 78; Jg. 1985-10, S. 49–65.
- Marion**, S.; Laurent, C.; Guillen, N. (2005): Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. In: *Cellular Microbiology* 7; Jg. 2005-10 (10), S. 1504–1518.
- Martindale**, D. W. (1989): Codon usage in *Tetrahymena* and other ciliates. In: *Journal of Protozoology* 36; Jg. 1989-02 (1), S. 29–34.
- Mayo**, K. A.; Orias, E. (1981): Further evidence for lack of gene-expression in the *Tetrahymena* micronucleus. In: *Genetics* 98; Jg. 1981 (4), S. 747–762.
- 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. In: *Journal of Biological Chemistry* 266; Jg. 1991 (10), S. 6511–6517.

- Medzihradszky, K. F.;** Zhang, X.; Chalkley, R. J.; Guan, S.; McFarland, M. A.; Chalmers, M. J. *et al.* (2004): Characterization of *Tetrahymena* histone H2B variants and posttranslational populations by electron capture dissociation (ECD) Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry (FT-ICR MS). In: *Molecular & Cellular Proteomics* 3; Jg. 2004 (9), S. 872–886.
- Mehlhorn, H.;** Ruthmann, A. (1992): Allgemeine Protozoologie. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Miao, W.;** Yu, T.; Orias, E.; Wan, M. L.; Fu, C. J. (2006): Identification of differentially expressed genes in *Tetrahymena thermophila* in response to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by suppression subtractive hybridization. In: *Environmental Microbiology* 8; Jg. 2006-06 (6), S. 1122–1129.
- Miller, O. L. Jr.;** Stone, G. E. (1963): Fine structure of the oral area of *Tetrahymena patula*. In: *Journal of Protozoology* Jg. 1963.
- 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.
- Mullis, K.;** Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro - the polymerase chain-reaction. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51; Jg. 1986, S. 263–273.
- Naschberger, E.;** Lubeseder-Martellato, C.; Meyer, N.; Gessner, R.; Kremmer, E.; Gessner, A.; Stuerzl, M. (2006): Human guanylate binding protein-1 is a secreted GTPase present in increased concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with bacterial meningitis. In: *American Journal of Pathology* 169; Jg. 2006-09 (3), S. 1088–1099.
- Nettleship, J. E.;** Assenberg, R.; Diprose, J. M.; Rahman-Huq, N.; Owens, R. J. (2010): Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. In: *Journal of Structural Biology* 172; Jg. 2010-10 (1), S. 55–65.
- Nichols, B. J.;** Ungermann, C.; Pelham, H. R.B.; Wickner, W. T.; Haas, A. (1997): Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-Snares. In: *Nature* 387; Jg. 1997-05-08 (6629), S. 199–202.
- Nilsson, J. R.;** Williams, N. E. (1966): An electron microscope study of the oral apparatus of *Tetrahymena pyriformis*. In: *Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg* 35; Jg. 1966 (7), S. 119–141.
- Nilsson, J. R.** (1977a): Fine structure and RNA synthesis of *Tetrahymena* during cytochalasin B inhibition of phagocytosis. In: *Journal of Cell Science* 271977, S. 115–126.
- Nilsson, J. R.** (1977b): On food vacuoles in *Tetrahymena pyriformis* GL. In: *Journal of Protozoology* 241977 (4), S. 502–507.
- 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.** (1972): Further studies on vacuole formation in *Tetrahymena pyriformis* GL. In: *Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg* 39; Jg. 1972 (6), S. 83-110.

- Nilsson, J. R.** (1976): Physiological and structural studies on *Tetrahymena pyriformis* GL. In: *Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg* 40; Jg. 1976 (18-1), S. 215-355.
- Nilsson, J. R.** (1987): Structural aspects of digestion of *Escherichia coli* in *Tetrahymena*. In: *Journal of Protozoology* 34; Jg. 1987-02 (1), S. 1–6.
- Nilsson, J. R.** (1989): *Tetrahymena* in cytotoxicology - with special reference to effects of heavy-metals and selected drugs. In: *European Journal of Protistology* 25; Jg. 1989-09-15 (1), S. 2–25.
- Nusblat, A. D.; Bright, L. J.; Turkewitz, A. P.** (2012): Conservation and innovation in *Tetrahymena* membrane traffic: proteins, lipids, and compartments. Review. In: *Methods in Cell Biology* Jg. 2012.
- Okada, M.; Huston, C. D.; Oue, M.; Mann, B. J.; Petri, W. A.; Kita, K.; Nozaki, T.** (2006): Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. In: *Molecular and Biochemical Parasitology* 145; Jg. 2006-02 (2), S. 171–183.
- 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*. In: *Eukaryotic Cell* 4; Jg. 2005 (4), S. 827–831.
- Orias, E.** (1981): Probable somatic DNA rearrangements in mating type determination in *Tetrahymena thermophila* - a review and a model. In: *Developmental Genetics* 2; Jg. 1981 (2), S. 185–202.
- Paddison, P. J.; Caudy, A. A.; Bernstein, E.; Hannon, G. J.; Conklin, D. S.** (2002a): Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. In: *Genes & Development* 16; Jg. 2002-04-15 (8), S. 948–958.
- Paddison, P. J.; Caudy, A. A.; Hannon, G. J.** (2002b): Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99; Jg. 2002-02-05 (3), S. 1443–1448.
- Paddison, P. J.; Hannon, G. J.** (2002): RNA interference: the new somatic cell genetics? In: *Cancer Cell* 2; Jg. 2002-07 (1), S. 17–23.
- Pennock, D. G.; Thatcher, T.; Bowen, J.; Bruns, P. J.; Gorovsky, M. A.** (1988a): A conditional mutant having paralyzed cilia and a block in cytokinesis is rescued by cytoplasmic exchange in *Tetrahymena thermophila*. In: *Genetics* 120; Jg. 1988-11 (3), S. 697–705.
- Pennock, D. G.; Thatcher, T.; Gorovsky, M. A.** (1988b): A temperature-sensitive mutation affecting cilia regeneration, nuclear development, and the cell-cycle of *Tetrahymena thermophila* is rescued by cytoplasmic exchange. In: *Molecular and Cellular Biology* 8; Jg. 1988-07 (7), S. 2681–2689.
- Pfaffl, M. W.** (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic Acids Research* 29 (9), S. e45.
- Pfaffl, M. W.** (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. In: *Biospektrum* 10.
- Pfaffl, M. W.** (2006): Neue Entwicklungen in der post-qPCR-Datenanalyse, zuletzt geprüft am 19.09.2013.

- Pfaffl**, M. W.; Riedmaier, I. (2011): Die Real-Time-RT-PCR-Datenanalyse im Fokus der MIQE-Richtlinie. In: *Biospektrum* 17 (3), S. 295–297.
- Pitt**, A.; Mayorga, L. S.; Schwartz, A. L.; Stahl, P. D. (1992a): Transport of phagosomal components to an endosomal compartment. In: *Journal of Biological Chemistry* 267; Jg. 1992 (1), S. 126–132.
- Pitt**, A.; Mayorga, L. S.; Stahl, P. D.; Schwartz, A. L. (1992b): Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. In: *Journal of Clinical Investigation* 90; Jg. 1992 (5), S. 1978–1983.
- Pizarro-Cerda**, J.; Jonquieres, R.; Gouin, E.; Vandekerckhove, J.; Garin, J.; Cossart, P. (2002): Distinct protein patterns associated with *Listeria monocytogenes* InIA- or InIB-phagosomes. In: *Cellular Microbiology* 4; Jg. 2002 (2), S. 101–115.
- 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. In: *Journal of Cell Science* 107; Jg. 1994-06, S. 1661–1670.
- Preer**, J. R.; Preer, L. B.; Rudman, B. M.; Barnett, A. J. (1985): Deviation from the universal code shown by the gene for surface protein 51A in *Paramecium*. In: *Nature* 314; Jg. 1985 (6007), S. 188–190.
- Prescott**, D. M. (1994): The DNA of ciliated protozoa. In: *Microbiological Reviews* 58; Jg. 1994-06 (2), S. 233–267.
- Puertollano**, R.; Bonifacino, J. S. (2004): Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. In: *Nature Cell Biology* 6; Jg. 2004 (3), S. 244–251.
- Rabilloud**, T.; Carpentier, G.; Tarroux, P. (1988): Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. In: *Electrophoresis* 9; Jg. 1988-06 (6), S. 288–291.
- Rabinowitz**, S.; Horstmann, H.; Gordon, S.; Griffiths, G. (1992): Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal-macrophages. In: *Journal of Cell Biology* 116; Jg. 1992-01 (1), S. 95–112.
- Rampoldi**, L.; Dobson-Stone, C.; Rubio, J. P.; Danek, A.; Chalmers, R. M.; Wood, N. W. et al. (2001): A conserved sorting-associated protein is mutant in chorea-acanthocytosis. In: *Nature Genetics* 28; Jg. 2001-06 (2), S. 119–120.
- Rasmussen**, C.; Wiebe, C. (1999): Cloning of a *Schizosaccharomyces pombe* homologue of elongation factor 1 alpha by two-hybrid selection of calmodulin-binding proteins. In: *Biochemistry and Cellbiology-Biochimie et Biologie Cellulaire* 77; Jg. 1999 (5), S. 421–430.
- Rasmussen**, R. (2001): Quantification on the LightCycler. In: Stefan Meuer, Carl Wittwer und Kan-Ichi Nakagawara (Hg.): Rapid Cycle Real-Time PCR: Springer Berlin Heidelberg, S. 21–34. Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0_3.
- 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.
- Renaud**, F. L.; Colon, I.; Lebron, J.; Ortiz, N.; Rodriguez, F.; Cadilla, C. (1995): A novel opioid mechanism seems to modulate phagocytosis in *Tetrahymena*. In: *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42; Jg. 1995-06 (3), S. 205–207.

- Ricketts**, T. R. (1972): The induction of endocytosis in starved *Tetrahymena pyriformis*. In: *Journal of Protozoology* 191972 (2), S. 373–375.
- Ricketts**, T. R. (1972): The interaction of particulate material and dissolved foodstuffs in food uptake by *Tetrahymena pyriformis*. In: *Archiv für Mikrobiologie* 81; Jg. 1972 (4), S. 344.
- Rogers**, L. D.; Foster, L. J. (2007): The dynamic phagosomal proteome and the contribution of the endoplasmic reticulum. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104; Jg. 2007-11-20 (47), S. 18520–18525.
- Roitt**, I. M.; Brostoff, J.; Male, D. K. (1987): Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Rosales**, C. (2005): Molecular Mechanisms of Phagocytosis. New York: Springer Science + Business Media.
- Rossi**, V.; Banfield, D. K.; Vacca, M.; Dietrich, L. E.P.; Ungermann, C.; D'Esposito, M. *et al.* (2004): Longins and their longin domains: regulated Snares and multifunctional Snare regulators. In: *Trends in Biochemical Sciences* 29; Jg. 2004-12 (12), S. 682–688.
- Rothman**, J. E. (1994): Mechanisms of intracellular protein transport. In: *Nature* 372; Jg. 1994 (6501), S. 55–63.
- Sachse**, C. (2010): *Tetrahymena thermophila*: An expression platform for the production of viral antigens. Dissertation. Bergische Universität Wuppertal. Fakultät der Mathematik und Naturwissenschaften.
- Saldarriaga**, J. F.; McEwan, M. L.; Fast, N. M.; Taylor, F. J.R.; Keeling, P. J. (2003): Multiple protein phylogenies show that *Oxyrrhis marina* and *Perkinsus marinus* are early branches of the dinoflagellate lineage. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53; Jg. 2003-01, S. 355–365.
- 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. In: *Eukaryotic Cell* 10; Jg. 2011-09 (9), S. 1207–1218.
- Sansonetti**, P. J. (1991): Bases moléculaires et cellulaires de la virulence de *Shigella flexneri*; Molecular and cellular bases of *Shigella flexneri* virulence. In: *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 175; Jg. 1991 (6), S. 803-9; discussion 809-10.
- Sattler**, C. A.; Staehelin, L. A. (1979): Oral cavity of *Tetrahymena pyriformis* - freeze-fracture and high-voltage electron-microscopy study of the oral rips, cytostome, and forming food vacuole. In: *Journal of Ultrastructure Research* 66; Jg. 1979 (2), S. 132–150.
- Scott**, C. C.; Botelho, R. J.; Grinstein, S. (2003): Phagosome maturation: A few bugs in the system. In: *Journal of Membrane Biology* 193; Jg. 2003-06-01 (3), S. 137–152.
- Shuey**, D. J.; McCallus, D. E.; Giordano, T. (2002): RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. In: *Drug Discovery Today* 7; Jg. 2002-10-15 (20), S. 1040–1046.
- Silverstein**, S. C. (1977): Endocytic uptake of particles by mononuclear phagocytes and penetration of obligate intracellular parasites. In: *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 26; Jg. 1977 (6), S. 161–169.

- Sivashankari, S.;** Shanmughavel, P. (2006): Functional annotation of hypothetical proteins - A review. In: *Bioinformation* 1; Jg. 2006 (8), S. 335–338.
- Smith, H. E.** (1982a): Oral-apparatus structure in the carnivorous macrostomal form of *Tetrahymena vorax*. In: *Journal of Protozoology* 29; Jg. 1982 (4), S. 616–627.
- Smith, H. E.** (1982b): Oral-apparatus structure in the microstomal form of *Tetrahymena vorax*. In: *Transactions of the American Microscopical Society* 101; Jg. 1982 (1), S. 36–58.
- Smith-Somerville, H. E.** (1989): Correlation of digestive stage with changes in amphiphilic phagosomal proteins of *Tetrahymena vorax*. In: *European Journal of Cell Biology* 49:1989 (1), S. 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 in fusion. In: *Nature (London)* 362:1993 (6418), S. 318–324.
- Stark, G. R.;** Kerr, I. M.; Williams, B. R.G.; Silverman, R. H.; Schreiber, R. D. (1998): How cells respond to interferons. In: *Annual Review of Biochemistry* 67; Jg. 1998, S. 227–264.
- Stenmark, H.;** Olkkonen, V. M. (2001): The Rab GTPase family. In: *Genome Biology* 2; Jg. 2001 (5).
- Storch, V.;** Welsch, U. (2009): Kükenenthal. Zoologisches Praktikum. 26. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Stuart, L. M.;** Ezekowitz, R. A.B. (2005): Phagocytosis: Elegant complexity. In: *Immunity* 22; Jg. 2005-05 (5), S. 539–550.
- Südhof, T. C.;** Rothman, J. E. (2009): Membrane fusion: grappling with Snare and SM proteins. Review 71 refs. In: *Science* 323; Jg. 2009 (5913), S. 474–477.
- Sweeney, R.;** Fan, Q. C.; Yao, M. C. (1996): Antisense ribosomes: rRNA as a vehicle for antisense RNAs. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93; Jg. 1996-08-06 (16), S. 8518–8523.
- Szallasi, Z.** (1999): Genetic network analysis in light of massively parallel biological data acquisition. In: *Pacific Symposium on Biocomputing* Jg. 1999.
- 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.
- Tokuyasu, K.;** Scherbaum, O. H. (1965): Ultrastructure of mucocysts and pellicle of *Tetrahymena pyriformis*. In: *Journal of Cell Biology* 27; Jg. 1965 (1), S. 67–81.
- Tondravi, M. M.;** Yao, M. C. (1986): Transformation of *Tetrahymena thermophila* by microinjection of ribosomal RNA genes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83; Jg. 1986 (12), S. 4369–4373.
- Touret, N.;** Paroutis, P.; Terebiznik, M.; Harrison, R. E.; Trombetta, S.; Pypaert, M. *et al.* (2005): Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. In: *Cell* 123; Jg. 2005 (1), S. 157–170.
- Turk, V.;** Turk, B.; Turk, D. (2001): Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. In: *EMBO Journal* 20; Jg. 2001-09-03 (17), S. 4629–4633.

- Turkewitz**, A. P.; Orias, E.; Kapler, G. (2002): Functional genomics: the coming of age for *Tetrahymena thermophila*. In: *Trends in Genetics* 18; Jg. 2002-01 (1), S. 35–40.
- Turkewitz**, A. P.; Bright, L. J. (2011): A Rab-based view of membrane traffic in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. In: *Small GTPases* 2 (2154-1248), S. 222–226.
- Ueno**, S.; Maruki, Y.; Nakamura, M.; Tomemori, Y.; Kamae, K.; Tanabe, H. *et al.* (2001): The gene encoding a newly discovered protein, chorein, is mutated in chorea-acanthocytosis. In: *Nature Genetics* 28; Jg. 2001-06 (2), S. 121–122.
- Ulsamer**, A. G.; Wright, P. L.; Wetzel, M. G.; Korn, E. D. (1971): Plasma and phagosome membranes of *Acanthamoeba castellanii*. In: *Journal of Cell Biology* 51; Jg. 1971 (1), S. 193–215.
- Valcarce**, G.; Munoz, L.; Nusblat, A.; Nudel, C.; Florin-Christensen, J. (2001): The improvement of milk by cultivation with ciliates. In: *Journal of Dairy Science* 84; Jg. 2001-10 (10), S. 2136–2143.
- Velayos-Baeza**, A.; Vettori, A.; Copley, R. R.; Dobson-Stone, C.; Monaco, A. P. (2004): Analysis of the human Vps13 gene family. In: *Genomics* 84; Jg. 2004 (3), S. 536–549.
- Vieira**, O. V.; Botelho, R. J.; Grinstein, S. (2002): Phagosome maturation: Aging gracefully. In: *Biochemical Journal* 3662002 (3), S. 689–704.
- Villasenor-Cardoso**, M. I.; Frausto-Del-Rio, D. A.; Ortega, E. (2013): Aminopeptidase N (CD13) Is Involved in Phagocytic Processes in Human Dendritic Cells and Macrophages. In: *Biomed Research International* Jg. 2013.
- Voßkübler**, C. (1990): Phagozytose und phagozytosedefiziente Mutanten bei *Tetrahymena thermophila*. Diplomarbeit. Westfälische Wilhelms-Universität, Münster.
- Voßkübler**, C. (1994): Analyse des Phagosomen-Lysosomen-Zyklus bei *Tetrahymena*. Dissertation. Westfälische Wilhelms-Universität, Münster.
- Voßkübler**, C.; Tiedtke, A. (1993): Magnetic separation of phagosomes of defined age from *Tetrahymena thermophila*. In: *Journal of Eukaryotic Microbiology* 401993 (5), S. 556–562.
- Wang**, N.; Wu, W. I.; Lozanne, A. de (2002): BEACH family of proteins: Phylogenetic and functional analysis of six *Dictyostelium* BEACH proteins. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 86; Jg. 2002 (3), S. 561–570.
- Washburn**, M. P.; Wolters, D.; Yates, JR (2001): Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. In: *Nature Biotechnology* 19; Jg. 2001-03 (3), S. 242–247.
- Wasi**, S. (2003): RNA interference: The next genetics revolution. In: *Horizon Symposia: Understanding the RNAissance*. Online verfügbar unter www.nature.com/horizon/rna/background/interference.html.
- Watts**, C.; Amigorena, S. (2001): Phagocytosis and antigen presentation. In: *Seminars in Immunology* 13; Jg. 2001-12 (6), S. 373–379.
- Weide**, T.; Herrmann, L.; Bockau, U.; Niebur, N.; Aldag, I.; Laroy, W. *et al.* (2006): Secretion of functional human enzymes by *Tetrahymena thermophila*. In: *BMC Biotechnology* 6; Jg. 2006-03-16.

- Weidenbach**, A. L.; Thompson, G. A. Jr. (1974): Studies of membrane formation in *Tetrahymena pyriformis*. VIII. On the origin of membranes surrounding food vacuoles. In: *Journal of Protozoology* 21; Jg. 1974 (5), S. 745–751.
- Westheide**, W.; Rieger, R. (2004): *Spezielle Zoologie. Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Wiertz**, E. J. H. J.; Tortorella, D.; Bogoy, M.; Yu, J.; Mothes, W.; Jones, T. R. *et al.* (1996): Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. In: *Nature* 384; Jg. 1996-12-05 (6608), S. 432–438.
- Wilkes**, D. E.; Otto, J. J. (2003): Profilin functions in cytokinesis, nuclear positioning, and stomatogenesis in *Tetrahymena thermophila*. In: *Journal of Eukaryotic Microbiology* 502003 (4), S. 252–262.
- Williams**, N. E.; Tsao, C. 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*. In: *Eukaryotic Cell* 5; Jg. 2006-03 (3), S. 555–567.
- Wittich**, V. (2014): Identifizierung und funktionelle Charakterisierung phagosomaler Proteine aus *Tetrahymena thermophila*. Dissertation. Bergische Universität Wuppertal. Fakultät der Mathematik und Naturwissenschaften.
- Wolters**, D. A. (2004): Anwendungen der MudPIT Technologie. In: *Biospektrum* 10 (2), S. 162–164.
- Wolters**, D. A.; Washburn, M. P.; Yates, JR (2001): An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. In: *Analytical Chemistry* 73; Jg. 2001-12-01 (23), S. 5683–5690.
- Wong**, L.; Klionsky, L.; Wickert, S.; Merriam, V.; Orias, E.; Hamilton, E. P. (2000): Autonomously replicating macronuclear DNA pieces are the physical basis of genetic coassortment groups in *Tetrahymena thermophila*. In: *Genetics* 155; Jg. 2000-07 (3), S. 1119–1125.
- Wu**, C. C.; Yates, JR (2003): The application of mass spectrometry to membrane proteomics. In: *Nature Biotechnology* 21; Jg. 2003-03 (3), S. 262–267.
- 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*. In: *Journal of Eukaryotic Microbiology* 461999 (3), S. 239–247.
- Wunderlich**, F.; Speth, V. (1972): Membranes in *Tetrahymena*. I. The cortical pattern. In: *Journal of Ultrastructure Research* 41; Jg. 1972 (3), S. 258–269.
- Yang**, Y. S.; Strittmatter, S. M. (2007): The reticulons: a family of proteins with diverse functions. In: *Genome Biology* 8; Jg. 2007 (12).
- Yao**, M. C.; Chao, J. L. (2005): RNA-guided DNA deletion in *Tetrahymena*: An RNAi-based mechanism for programmed genome rearrangements. In: *Annual Review of Genetics* 39; Jg. 2005, S. 537–559.
- Yao**, M. C.; Fuller, P.; Xi, X. H. (2003): Programmed DNA deletion as an RNA-guided system of genome defense. In: *Science* 300; Jg. 2003-06-06 (5625), S. 1581–1584.

Yao, M. C.; Yao, C. H. (1991): Transformation of *Tetrahymena* to cycloheximide resistance with a ribosomal-protein gene through sequence replacement. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88; Jg. 1991-11 (21), S. 9493–9497.

Yao, M. C.; Yao, C. H.; Monks, B. (1990): The controlling sequence for site-specific chromosome breakage in *Tetrahymena*. In: *Cell* 63; Jg. 1990-11-16 (4), S. 763–772.

Yao, M.-C.; Duharcourt, S.; Chalker, D. L. (2002): Genome-wide rearrangements of DNA in ciliates. In: *Craig, N. L.; Craigie, R.; Gellert, M.; Lambowitz, A. M., Mobile DNA II. 2002. 730-758.* Online verfügbar unter http://digitool.hbz-nrw.de:1801/webclient/DeliveryManager?pid=975023&custom_att_2=simple_viewer.

Yao, M.-C.; Gorovsky, M. A. (1974): Comparison of the sequences of macro- and micronuclear DNA of *Tetrahymena pyriformis*. In: *Chromosoma* 48 (1), S. 1–18.

8 Anhang

8.1 Ergebnisse der MudPIT-Analyse

Der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der MudPIT-Analyse (s. Kap. 5.3) zu entnehmen. Identifiziert wurden Proteine aus naszenten (30 sek) und kondensierten (10 min) Phagosomen.

Tab. 38: Ergebnisse der proteinbiochemischen Analyse phagosomaler Proteine mittels MudPIT. Die in 30 sek und 5 min alten Phagosomen identifizierten Proteine sowie deren Identifikationsnummern der *Tetrahymena* Genome Database (*T.t.* Gen-ID, s. Kap. 3.14) sind angegeben. Die Farben verdeutlichen die Häufigkeit, mit der das jeweilige Protein in vier Analysen von naszenten (30 sek) bzw. in drei Analysen von kondensierten (10 min) Phagosomen gefunden wurde (Rot: 1 x, Gelb: 2 x, Grün: 3 x, Blau: 4 x).

<i>T.t.</i> Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
18.m00476 = PreTt22225	14-3-3 protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254564 18	✓	
13.m00428	14-3-3 protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	✓	
24.m00273	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254649 24	✓	✓
7.m00494	2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydroliipoamide succinyltransferase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254716 7	✓	✓
304.m00019	3'-5' exonuclease family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253974 304	✓	
198.m00041	3'-5' Cyclic nucleotide phosphodiesterase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254410 198	✓	
99.m00158	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, NAD binding domain <i>T. thermophila</i> chr_0 8254579 99	✓	✓
244.m00024	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254423 244	✓	✓
102.m00110	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253823 102	✓	
12.m00411	40S ribosomal protein S6. - related <i>T. thermophila</i> chr_0 8254545 12	✓	✓
146.m00135	60s Acidic ribosomal protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254359 146	✓	✓
57.m00235	60s Acidic ribosomal protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254403 57 = Tpp16p	✓	✓
91.m00115	60s Acidic ribosomal protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254528 91	✓	✓
192.m00087	60s Acidic ribosomal protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254757 192	✓	✓
99.m00148	60S ribosomal protein L21, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254579 99	✓	✓
172.m00085	60S ribosomal protein L31, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254751 172	✓	✓
78.m00128	60s ribosomal protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254464 78	✓	

<i>T.t.</i> Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
38.m00287	AAA family ATPase, CDC48 subfamily protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254813 38	✓	✓
112.m00133	ABC transporter family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254104 112	✓	
162.m00063	ABC transporter family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254576 162		✓
160.m00088	Acetyl-CoA acyltransferases family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254543 160	✓	✓
166.m00059	Acetyl-CoA acyltransferases family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254682 166	✓	✓
2.m02109	Aconitate hydratase 1 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	✓	✓
16.m00260	ACR285Cp-related <i>T. thermophila</i> chr_0 8254617 16	✓	✓
15.m00457	Actin, identical <i>T. thermophila</i> chr_0 8254638 15	✓	
31.m00346	Acyl carrier protein reductase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31 = Peroxisomal multifunctional enzyme	✓	✓
97.m00175	Acyl CoA binding protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254402 97	✓	
32.m00160	Acyl CoA binding protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254691 32	✓	✓
82.m00112	Acyl CoA binding protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254731 82	✓	
12.m00482	Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254545 12	✓	
36.m00308	Adenosylhomocysteinase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254460 36		✓
182.m00058	Adenylate and Guanylate cyclase catalytic domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253900 182		✓
118.m00092	Adenylate kinases family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254476 118	✓	✓
3.m01987	ADP , ATP carrier protein 1, mitochondrial precursor <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	✓

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
115.m00117	AhpC/TSA family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254515 115	✓	✓
270.m00046	AhpC/TSA family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254622 270	✓	✓
140.m00086	Aldehyde dehydrogenase (NAD) family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254483 140	✓	✓
67.m00209	Aldehyde dehydrogenase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67	✓	
132.m00110	Aminotransferase, class III family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254491 132	✓	✓
102.m00101	Aminotransferase, class V family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253823 102	✓	
63.m00214	Ammonium Transporter Family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254487 63	✓	
108.m00113	AMP-binding enzyme family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254187 108	✓	✓
20.m00264	AMP-binding enzyme family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254373 20	✓	✓
34.m00203	AMP-binding enzyme family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	✓	✓
3.m01823	AMP-binding enzyme family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	
211.m00038	Ankyrin repeat <i>T. thermophila</i> chr_0 8254199 211	✓	
15.m00570	Aspartate aminotransferase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254638 15	✓	✓
85.m00147	Aspartyl-tRNA synthetase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254378 85	✓	
80.m00178	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254444 80	✓	✓
76.m00218	ATP synthase F1, alpha subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253850 76	✓	✓
104.m00124	ATP synthase F1, delta subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254365 104	✓	
8.m00440	ATP synthase F1, gamma subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8	✓	✓
131.m00144	ATPase, histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254737 131	✓	
204.m00059	ATP-dependent DNA helicase, RecQ family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254656 204	✓	
94.m00144	ATP-dependent protease La family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254644 94	✓	
83.m00121	B-box zinc finger family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254563 83		✓
1.m00560	B-box zinc finger family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	✓
105.m00144	Beige/BEACH domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253915 105	✓	
73.m00161	Bowman-Birk serine protease inhibitor family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254486 73	✓	
126.m00118	Branched-chain amino acid aminotransferase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254284 126	✓	
50.m00262	bZIP transcription factor family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254609 50	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
20.m00316	C2 domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254373 20		✓
105.m00112	Calcium-translocating P-type ATPase, PMCA-type family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253915 105	✓	✓
225.m00058	Calcium-translocating P-type ATPase, SERCA-type family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254469 225	✓	
113.m00086	Calpain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254377 113	✓	✓
16.m00506	Calpain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254617 16	✓	✓
4.m00497	Calpain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	✓	
73.m00168	Carbonic anhydrase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254486 73	✓	
39.m00300	Carboxyvinyl-carboxyphosphonate phosphorymutase, -related <i>T. thermophila</i> chr_0 8254777 39	✓	
254.m00025	Catalase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254007 254		✓
182.m00067	Cation channel family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253900 182		✓
30.m00280	Cation channel family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254431 30	✓	
132.m00076	Cation channel family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254491 132		✓
14.m00265	Cation channel family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254798 14	✓	
109.m00108	Cation channel family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254820 109	✓	
213.m00076	CCT motif family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254708 213		✓
84.m00112	Cell surface immobilization antigen SerH6, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254754 84	✓	
127.m00074	Chaperonin, 10 kDa family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254670 127	✓	✓
33.m00289	CHCH domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254010 33	✓	✓
194.m00039	Chlamydial polymorphic outer membrane protein repeat containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253992 194	✓	
194.m00027	Chlamydial polymorphic outer membrane protein repeat containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253992 194	✓	
140.m00087	Chlamydial polymorphic outer membrane protein repeat containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254483 140	✓	
127.m00059	Chlamydial polymorphic outer membrane protein repeat containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254670 127	✓	
13.m00526	CHY zinc finger family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	✓	
67.m00163	Citrate synthase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67	✓	✓
31.m00360	Citrate synthase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
6.m00499	Co-chaperone GrpE family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254697 6	✓	
12.m00283	Coenzyme A transferase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254545 12	✓	✓
50.m00187	Coenzyme A transferase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254609 50	✓	✓
16.m00424	Conserved hypothetical coiled-coil protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254617 16	✓	
83.m00197	Conserved hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254563 83	✓	✓
10.m00474	Conserved hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	✓	✓
94.m00118	Conserved hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254644 94		✓
3.m01782	Conserved hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	
133.m00094	Core histone H2A/H2B/H3/H4 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254047 133	✓	
31.m00263	Core histone H2A/H2B/H3/H4 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31	✓	✓
25.m00321	Core histone H2A/H2B/H3/H4 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254600 25	✓	✓
11.m00370	Core histone H2A/H2B/H3/H4 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254747 11		✓
90.m00169	Core histone H2A/H2B/H3/H4 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254764 90	✓	✓
2.m02332	CRAL/TRIO domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	✓	
93.m00144	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253887 93	✓	
57.m00142	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254403 57	✓	
21.m00264	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254406 21	✓	
29.m00202	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254551 29	✓	
3.m01706	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	
8.m00533	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8		✓
1.m00576	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	
4.m00668	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	✓	
45.m00163	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254814 45		✓
48.m00245	Cyclin, N-terminal domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	✓	
3.m01633	Cystathionine beta-lyase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	
128.m00127	Cytochrome c family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254449 128	✓	✓
4.m00445	Cytosol aminopeptidase family, catalytic domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	✓	
134.m00090	Dehydrogenase, isocitrate/isopropylmalate family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254552 134	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
35.m00243	Dehydrogenase, isocitrate/isopropylmalate family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254597 35		✓
1.m00911	DHHC zinc finger domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	
25.m00423	Dicer-related RNase III protein Dcr1p, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254600 25	✓	
3.m01838	Dihydropyrimidine dehydrogenase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	✓
5.m00420	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5	✓	
170.m00054	DnaJ domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254436 170	✓	✓
14.m00361	DnaK protein BiP <i>T. thermophila</i> chr_0 8254798 14 = Hsp-70	✓	✓
105.m00092	DnaK protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253915 105		✓
222.m00042	DnaK protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254401 222	✓	
197.m00079	DnaK protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254457 197	✓	✓
73.m00185	DnaK protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254486 73	✓	
56.m00217	DnaK protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254565 56	✓	
9.m00347	DnaK protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254645 9	✓	
7.m00462	DnaK protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254716 7 = Hsp-70	✓	✓
73.m00135	Down-regulated in metastasis family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254486 73	✓	
154.m00124	Dual specificity phosphatase, catalytic domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253984 154	✓	
59.m00248	Dynamin central region family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254527 59 = Drp1		✓
235.m00033	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254092 235	✓	
68.m00136	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254385 68	✓	
61.m00206	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254446 61		✓
46.m00214	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254475 46	✓	
73.m00204	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254486 73		✓
203.m00051	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254505 203		✓
2.m02053	Dynein heavy chain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	✓	
162.m00071	E1-E2 ATPase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254576 162	✓	
105.m00148	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253915 105	✓	
113.m00092	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254377 113	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
51.m00221	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254437 51	✓	✓
89.m00157	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254470 89	✓	
89.m00187	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254470 89	✓	
46.m00259	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254475 46	✓	
87.m00239	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254479 87	✓	
56.m00261	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254565 56	✓	✓
41.m00190	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254587 41	✓	
3.m01690	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	✓
43.m00325	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254666 43	✓	
4.m00502	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	✓	✓
4.m00605	EF hand family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	✓	✓
152.m00108	EF-1 guanine nucleotide exchange domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254496 152	✓	✓
5.m00524	Electron transfer flavoprotein, alpha subunit containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5	✓	✓
24.m00347	Electron transfer flavoprotein, beta subunit containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254649 24		✓
51.m00219	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254437 51	✓	
170.m00104	Elongation factor G, domain IV family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254436 170	✓	✓
11.m00468	Elongation factor TS family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254747 11	✓	
66.m00157	Elongation factor Tu GTP binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253811 66	✓	
12.m00557	Elongation factor Tu, mitochondrial precursor, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254545 12		✓
3.m01762	Enolase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	✓
48.m00289	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	✓	✓
4.m00381	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	✓	✓
97.m00156	ENTH domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254402 97	✓	
54.m00196	Eukaryotic aspartyl protease family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254593 54	✓	✓
138.m00118	Eukaryotic membrane protein (cytomegalovirus gH-receptor) family <i>T. thermophila</i> chr_0 8254799 138	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
34.m00301	Eukaryotic ribosomal protein L18 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	✓	
4.m00360	FAD binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	✓	✓
25.m00333	F-box domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254600 25	✓	
10.m00484	Fibrillarin, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	✓	
19.m00308	FKBP12 binding protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254665 19	✓	✓
59.m00278	Fructose-bisphosphate aldolase class-I family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254527 59	✓	✓
37.m00230	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254756 37	✓	
37.m00185	GAT domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254756 37	✓	✓
520.m00009	GIY-YIG catalytic domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254240 520	✓	
211.m00046	Glutamate/Leucine/Phenylalanyl/Valine dehydrogenase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254199 211	✓	✓
33.m00180	Glutaredoxin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254010 33	✓	
106.m00156	Glutaredoxin-related protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254422 106	✓	
11.m00319	Glutathione peroxidase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254747 11	✓	
76.m00152	Glutathione S-transferase, N-terminal domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253850 76	✓	
43.m00274	Glutathione S-transferase, N-terminal domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254666 43	✓	✓
72.m00143	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254786 72	✓	✓
72.m00149	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254786 72		✓
134.m00081	Glycine dehydrogenase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254552 134	✓	✓
53.m00242	Glycosyl hydrolases family 31 protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254395 53	✓	
19.m00401	Glycosyl hydrolases family 38 protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254665 19 = α -Mannosidase	✓	
9.m00538	GRAM domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254645 9	✓	
87.m00241	Granule lattice protein 3 precursor, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254479 87	✓	
87.m00262	Granule lattice protein 3 precursor, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254479 87	✓	✓
87.m00240	Granule lattice protein 4 precursor, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254479 87	✓	✓
40.m00228	Granule lattice protein 5 precursor, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254652 40	✓	✓

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
87.m00251	Guanylate kinase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254479 87	✓	
136.m00115	Guanylate-binding protein, N-terminal domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254712 136	✓	
133.m00063	Helicase conserved C-terminal domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254047 133	✓	
5.m00366	Helicase conserved C-terminal domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5	✓	
70.m00135	Helicase conserved C-terminal domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254807 70	✓	
25.m00418	Histidine acid phosphatase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254600 25	✓	
157.m00084	Histidine acid phosphatase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254673 157	✓	✓
93.m00135	Histone deacetylase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253887 93	✓	
15.m00378	Histone H4, minor, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254638 15	✓	✓
75.m00135	HMG box family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254495 75	✓	✓
18.m00255	HMG box family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254564 18	✓	
98.m00105	HMG box family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254577 98	✓	✓
51.m00201	Hsp90 protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254437 51	✓	✓
5.m00599	Hsp90 protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5	✓	
13.m00537	Hsp90 protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	✓	✓
66.m00249	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253811 66	✓	✓
66.m00276	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253811 66	✓	
66.m00152	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253811 66	✓	
66.m00230	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253811 66	✓	
66.m00209	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253811 66		✓
62.m00181	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253815 62	✓	✓
62.m00148	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253815 62	✓	
62.m00247	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253815 62	✓	
62.m00194	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253815 62		✓
206.m00045	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253843 206	✓	
76.m00134	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253850 76	✓	✓
76.m00197	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253850 76	✓	
76.m00187	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253850 76		✓

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
335.m00015	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253864 335	✓	
335.m00016	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253864 335		✓
215.m00057	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253880 215	✓	
215.m00061	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253880 215	✓	
190.m00052	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253886 190	✓	✓
190.m00048	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253886 190	✓	
103.m00121	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253891 103	✓	✓
103.m00160	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253891 103	✓	
147.m00063	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253894 147	✓	
147.m00082	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253894 147	✓	
117.m00117	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253904 117	✓	
276.m00027	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253914 276	✓	
276.m00023	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253914 276		✓
105.m00096	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253915 105	✓	
105.m00118	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253915 105	✓	
171.m00065	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253930 171	✓	
218.m00038	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253957 218	✓	
103.m00094	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253891 103	✓	
304.m00017	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253974 304	✓	
154.m00075	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253984 154	✓	✓
33.m00297	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254010 33	✓	
33.m00325	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254010 33	✓	
33.m00326	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254010 33	✓	
130.m00087	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254043 130	✓	✓
130.m00118	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254043 130		✓
130.m00077	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254043 130 = Tpp2p	✓	
133.m00110	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254047 133	✓	
363.m00015	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254058 363	✓	✓

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
314.m00022	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254062 314	✓	
314.m00026	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254062 314	✓	
314.m00030	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254062 314	✓	
337.m00011	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254072 337	✓	✓
240.m00039	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254095 240	✓	✓
112.m00123	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254104 112	✓	
230.m00032	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254106 230	✓	
230.m00046	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254106 230	✓	
297.m00020	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254122 297	✓	
191.m00066	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254167 191	✓	
167.m00073	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254181 167	✓	
108.m00123	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254187 108	✓	
108.m00181	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254187 108	✓	
229.m00028	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254241 229		✓
126.m00140	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254284 126	✓	
445.m00008	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254305 445	✓	✓
445.m00009	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254305 445	✓	✓
146.m00107	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254359 146	✓	
116.m00107	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254362 116	✓	✓
116.m00106	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254362 116	✓	
104.m00168	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254365 104	✓	
104.m00169	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254365 104 = Tpp7p		✓
123.m00088	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254367 123	✓	
186.m00042	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254369 186	✓	
186.m00050	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254369 186	✓	✓
186.m00051	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254369 186	✓	✓
55.m00264	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254371 55	✓	
20.m00254	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254373 20	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
20.m00261	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254373 20	✓	
113.m00089	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254377 113	✓	
113.m00130	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254377 113	✓	
113.m00112	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254377 113		✓
85.m00125	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254378 85	✓	
85.m00208	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254378 85	✓	
28.m00201	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254379 28	✓	
28.m00265	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254379 28	✓	
28.m00235	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254379 28	✓	
28.m00324	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254379 28	✓	
28.m00362	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254379 28		✓
28.m00190	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254379 28	✓	
245.m00028	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254380 245	✓	
174.m00064	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254382 174	✓	
174.m00039	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254382 174	✓	
68.m00156	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254385 68	✓	✓
110.m00081	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254391 110	✓	
110.m00097	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254391 110		✓
53.m00211	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254395 53	✓	✓
53.m00169	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254395 53	✓	
53.m00202	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254395 53	✓	
53.m00255	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254395 53	✓	
53.m00194	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254395 53		✓
53.m00140	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254395 53		✓
141.m00106	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254397 141	✓	
141.m00099	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254397 141	✓	
222.m00047	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254401 222		✓
97.m00172	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254402 97		✓

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
57.m00141	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254403 57	✓	
57.m00269	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254403 57	✓	
21.m00302	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254406 21	✓	
21.m00352	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254406 21	✓	
21.m00328	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254406 21	✓	
21.m00361	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254406 21	✓	
318.m00023	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254407 318	✓	
198.m00040	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254410 198	✓	
119.m00109	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254417 119	✓	✓
119.m00127	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254417 119	✓	
233.m00039	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254418 233	✓	
233.m00035	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254418 233	✓	
107.m00115	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254420 107	✓	
107.m00102	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254420 107	✓	
106.m00089	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254422 106		✓
69.m00270	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254428 69	✓	
69.m00255	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254428 69	✓	
69.m00266	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254428 69	✓	
208.m00035	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254429 208	✓	✓
208.m00058	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254429 208	✓	
170.m00093	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254436 170		✓
51.m00156	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254437 51	✓	
51.m00184	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254437 51	✓	
51.m00214	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254437 51		✓
142.m00070	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254440 142	✓	
142.m00090	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254440 142		
80.m00203	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254444 80	✓	
61.m00162	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254446 61	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
61.m00258	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254446 61		✓
128.m00104	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254449 128	✓	✓
128.m00141	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254449 128	✓	
128.m00101	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254449 128	✓	
236.m00033	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254454 236	✓	
236.m00026	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254454 236		✓
236.m00032	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254454 236		✓
197.m00078	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254457 197	✓	✓
67.m00160	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67	✓	✓
67.m00178	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67	✓	
67.m00195	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67	✓	
67.m00230	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67	✓	
67.m00206	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67	✓	
67.m00243	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67	✓	
36.m00201	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254460 36	✓	
36.m00280	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254460 36	✓	
36.m00282	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254460 36	✓	
36.m00284	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254460 36	✓	
78.m00120	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254464 78	✓	
78.m00153	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254464 78	✓	
78.m00165	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254464 78	✓	
78.m00167	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254464 78	✓	
46.m00176	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254475 46	✓	
46.m00285	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254475 46	✓	✓
46.m00298	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254475 46	✓	
46.m00193	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254475 46		✓
118.m00129	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254476 118	✓	
87.m00242	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254479 87	✓	✓

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
339.m00011	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254481 339	✓	✓
63.m00163	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254487 63	✓	✓
63.m00165	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254487 63	✓	✓
63.m00226	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254487 63	✓	
63.m00256	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254487 63		✓
63.m00181	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254487 63		✓
115.m00143	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254515 115	✓	
308.m00014	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254521 308		✓
59.m00152	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254527 59	✓	
59.m00200	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254527 59	✓	✓
59.m00283	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254527 59	✓	
59.m00149	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254527 59		✓
91.m00120	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254528 91	✓	
91.m00121	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254528 91	✓	
91.m00185	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254528 91	✓	✓
91.m00165	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254528 91	✓	
91.m00178	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254528 91		✓
160.m00080	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254543 160		✓
12.m00475	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254545 12	✓	
12.m00531	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254545 12	✓	
12.m00359	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254545 12	✓	✓
12.m00503	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254545 12		✓
489.m00004	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254546 489	✓	
217.m00041	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254489 217	✓	
31.m00230	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31	✓	
31.m00242	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31	✓	✓
31.m00351	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31	✓	
31.m00350	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
31.m00264	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31	✓	
129.m00111	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254549 129	✓	
129.m00114	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254549 129	✓	
129.m00110	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254549 129 = Tpp5p	✓	✓
164.m00075	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254550 164	✓	
29.m00255	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254551 29	✓	
134.m00079	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254552 134	✓	
134.m00088	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254552 134	✓	
134.m00131	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254552 134	✓	
134.m00126	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254552 134	✓	✓
44.m00200	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254555 44	✓	
18.m00292	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254564 18	✓	
18.m00337	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254564 18	✓	✓
18.m00466	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254564 18	✓	
18.m00287	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254564 18	✓	
18.m00347	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254564 18	✓	✓
56.m00165	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254565 56	✓	
56.m00307	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254565 56	✓	
56.m00276	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254565 56	✓	
56.m00159	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254565 56	✓	
56.m00250	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254565 56	✓	
81.m00181	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254580 81	✓	✓
81.m00185	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254580 81 = Phagosome protein 2 (Php2p)	✓	
193.m00052	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254581 193	✓	
10.m00387	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	✓	✓
10.m00418	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	✓	
10.m00427	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	✓	
10.m00446	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
10.m00523	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	✓	
10.m00394	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	✓	
10.m00534	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	✓	
10.m00386	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	✓	✓
10.m00323	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10		✓
10.m00396	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10		✓
88.m00106	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254584 88	✓	
88.m00091	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254584 88		✓
41.m00239	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254587 41	✓	
41.m00264	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254587 41	✓	
149.m00072	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254588 149	✓	
22.m00222	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254590 22	✓	
22.m00256	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254590 22	✓	
22.m00296	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254590 22	✓	
22.m00356	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254590 22	✓	
22.m00249	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254590 22	✓	
22.m00341	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254590 22	✓	
54.m00225	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254593 54	✓	
54.m00285	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254593 54	✓	
54.m00288	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254593 54	✓	
54.m00282	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254593 54	✓	
26.m00221	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254594 26	✓	
26.m00237	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254594 26	✓	
26.m00274	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254594 26	✓	
26.m00322	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254594 26	✓	✓
189.m00051	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254595 189	✓	
259.m00038	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254599 259	✓	✓
25.m00322	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254600 25	✓	✓

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
25.m00390	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254600 25	✓	
25.m00376	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254600 25		✓
25.m00370	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254600 25		✓
86.m00160	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254605 86	✓	
86.m00166	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254605 86	✓	
49.m00282	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254607 49		✓
195.m00048	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254608 195	✓	
50.m00189	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254609 50 = Tpp3p		✓
34.m00306	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	✓	✓
34.m00343	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	✓	
34.m00246	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	✓	✓
34.m00269	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	✓	
34.m00348	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	✓	
58.m00202	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254611 58	✓	
58.m00234	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254611 58	✓	✓
58.m00235	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254611 58	✓	✓
58.m00251	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254611 58	✓	
58.m00189	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254611 58	✓	
58.m00167	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254611 58	✓	
16.m00477	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254617 16	✓	✓
16.m00414	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254617 16	✓	
16.m00441	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254617 16	✓	
16.m00420	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254617 16		✓
183.m00025	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254634 183	✓	
183.m00026	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254634 183	✓	
60.m00133	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254636 60		✓
143.m00087	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254637 143	✓	
143.m00101	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254637 143	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
143.m00086	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254637 143	✓	
143.m00061	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254637 143		✓
143.m00075	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254637 143		✓
15.m00359	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254638 15	✓	
15.m00436	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254638 15		✓
94.m00138	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254644 94	✓	✓
94.m00150	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254644 94	✓	
9.m00297	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254645 9	✓	
9.m00410	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254645 9	✓	✓
9.m00413	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254645 9	✓	
9.m00472	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254645 9	✓	
9.m00543	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254645 9	✓	
9.m00387	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254645 9		✓
139.m00139	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254646 139	✓	
24.m00279	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254649 24	✓	
24.m00225	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254649 24	✓	
5.m00611	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5	✓	✓
5.m00439	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5	✓	
40.m00201	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254652 40	✓	✓
40.m00274	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254652 40	✓	
40.m00275	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254652 40	✓	✓
40.m00277	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254652 40	✓	
40.m00202	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254652 40	✓	
92.m00135	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254653 92	✓	
204.m00043	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254656 204	✓	
101.m00178	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254658 101	✓	
101.m00159	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254658 101	✓	✓
101.m00161	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254658 101		✓

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
3.m01759	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	
3.m01821	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	✓
3.m01906	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	
3.m01942	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	
3.m01657	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	✓
3.m01834	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	
65.m00193	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254664 65	✓	✓
65.m00227	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254664 65	✓	
65.m00181	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254664 65	✓	
65.m00230	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254664 65	✓	
19.m00219	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254665 19	✓	
19.m00295	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254665 19		✓
43.m00172	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254666 43	✓	
43.m00198	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254666 43	✓	✓
43.m00269	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254666 43	✓	
95.m00100	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254667 95	✓	
95.m00138	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254667 95	✓	
127.m00082	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254670 127	✓	
47.m00223	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254671 47	✓	
47.m00233	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254671 47	✓	
47.m00256	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254671 47		✓
144.m00135	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254672 144	✓	
268.m00029	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254676 268	✓	✓
282.m00029	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254679 282	✓	
166.m00062	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254682 166	✓	✓
52.m00214	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254686 52	✓	
27.m00313	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254688 27		✓
6.m00493	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254697 6	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
6.m00524	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254697 6	✓	
6.m00589	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254697 6	✓	
159.m00051	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254707 159 = Tpp9p		✓
7.m00291	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254716 7	✓	
7.m00473	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254716 7	✓	
7.m00481	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254716 7	✓	
7.m00490	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254716 7	✓	✓
7.m00525	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254716 7	✓	
7.m00507	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254716 7	✓	✓
184.m00063	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254717 184	✓	
137.m00103	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254718 137	✓	
42.m00268	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254719 42	✓	
42.m00252	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254719 42		✓
42.m00315	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254719 42		✓
463.m00003	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254727 463	✓	
145.m00094	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254728 145	✓	
382.m00007	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254729 382	✓	
120.m00092	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254736 120	✓	✓
48.m00192	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	✓	✓
48.m00235	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	✓	
48.m00255	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	✓	✓
48.m00304	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	✓	✓
48.m00305	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	✓	✓
48.m00286	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	✓	✓
11.m00395	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254747 11	✓	✓
11.m00424	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254747 11	✓	
11.m00482	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254747 11	✓	
11.m00406	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254747 11	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
11.m00471	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254747 11	✓	
111.m00082	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254748 111	✓	
231.m00034	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254749 231	✓	
231.m00035	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254749 231	✓	
172.m00088	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254751 172	✓	
8.m00356	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8	✓	
8.m00437	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8	✓	✓
8.m00399	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8	✓	
8.m00366	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8	✓	
8.m00474	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8 = Sialidase (Neuraminidase)	✓	
84.m00098	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254754 84	✓	
199.m00064	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254760 199	✓	
212.m00044	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254761 212		✓
74.m00187	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254763 74	✓	
74.m00205	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254763 74	✓	
74.m00206	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254763 74	✓	
90.m00113	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254764 90		✓
330.m00016	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254766 330	✓	
13.m00307	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	✓	
13.m00440	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	✓	
13.m00456	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	✓	
13.m00447	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	✓	
13.m00471	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	✓	
39.m00200	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254777 39	✓	
39.m00270	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254777 39	✓	
148.m00063	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254783 148	✓	
148.m00087	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254783 148	✓	
148.m00098	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254783 148	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
72.m00112	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254786 72	✓	
23.m00259	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254788 23	✓	
23.m00229	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254788 23	✓	✓
23.m00292	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254788 23	✓	
14.m00297	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254798 14	✓	
14.m00438	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254798 14	✓	
14.m00445	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254798 14	✓	✓
14.m00484	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254798 14	✓	
14.m00446	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254798 14	✓	
138.m00104	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254799 138	✓	
138.m00108	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254799 138	✓	
138.m00130	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254799 138	✓	
1.m00668	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	
1.m00691	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	
1.m00759	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	
1.m00867	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	
1.m01027	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	
1.m00659	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	
1.m00661	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	✓
1.m00764	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	
1.m00658	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1		✓
70.m00176	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254807 70	✓	
70.m00182	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254807 70	✓	
4.m00462	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	✓	
4.m00498	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	✓	
4.m00600	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	✓	✓
4.m00662	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	✓	
4.m00674	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	✓	✓

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
4.m00642	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4		✓
38.m00199	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254813 38	✓	✓
45.m00225	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254814 45 = Phagosome protein 1 (Php1p/P28p)	✓	✓
17.m00398	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254815 17	✓	✓
17.m00473	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254815 17	✓	✓
2.m02358	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	✓	
2.m02079	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	✓	
2.m02206	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	✓	
2.m02214	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	✓	
2.m02456	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	✓	✓
155.m00087	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254822 155	✓	
71.m00134	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254823 71	✓	✓
303.m00016	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254825 303	✓	
311.m00019	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254826 311	✓	
264.m00012	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254827 264	✓	
1875.m00002	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254952 1875	✓	
1052.m00002	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8255292 1052	✓	
1330.m00002	Hypothetical protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8255343 1330	✓	
120.m00116	Inorganic H ⁺ pyrophosphatase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254736 120 = Vacuolar H ⁺ -translocating inorganic pyrophosphatase	✓	✓
18.m00332	Inorganic pyrophosphatase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254564 18	✓	✓
10.m00535	IPT/TIG domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	✓	
10.m00536	IPT/TIG domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	✓	✓
10.m00537	IPT/TIG domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	✓	
104.m00139	IQ calmodulin-binding motif family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254365 104 = Cbp	✓	
202.m00059	IQ calmodulin-binding motif family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254779 202	✓	
251.m00042	Isocitrate lyase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254530 251	✓	✓
49.m00215	Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase, type 1 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254607 49	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
94.m00120	J immobilization antigen-related <i>T. thermophila</i> chr_0 8254644 94	✓	
31.m00209	Kelch motif family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31	✓	
256.m00023	KH domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254392 256	✓	✓
28.m00345	Kinesin motor domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254379 28	✓	
152.m00110	Kinesin motor domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254496 152		✓
50.m00185	Kinesin motor domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254609 50	✓	✓
77.m00223	LTP family of ribosomal proteins containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254782 77	✓	✓
206.m00043	Leucine Rich Repeat family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253843 206	✓	
33.m00277	Leucine Rich Repeat family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254010 33	✓	
187.m00073	Leucine Rich Repeat family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254389 187	✓	
46.m00151	Leucine Rich Repeat family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254475 46		✓
92.m00163	Ligand-gated ion channel family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254653 92	✓	
20.m00361	LIM domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254373 20	✓	
34.m00401	Liver stage antigen-3-related <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	✓	
106.m00130	Lysyl-tRNA synthetase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254422 106	✓	
21.m00252	Major Facilitator Superfamily protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254406 21	✓	
339.m00012	Major Facilitator Superfamily protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254481 339	✓	
49.m00251	Major Facilitator Superfamily protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254607 49	✓	
2.m02347	malate dehydrogenase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	✓	✓
44.m00211	MaoC like domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254555 44	✓	
83.m00142	Methionine aminopeptidase, type I family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254563 83	✓	✓
28.m00238	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254379 28	✓	✓
69.m00201	Mitochondrial carrier protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254428 69	✓	✓
9.m00342	Mitochondrial carrier protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254645 9	✓	✓
5.m00442	Mitochondrial glycoprotein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5	✓	
97.m00178	Mitochondrial ribosomal protein L51 / S25 / Cl-B8 domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254402 97	✓	
5.m00527	Mov34/MPN/PAD-1 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5	✓	
12.m00434	MutS domain III family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254545 12	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
194.m00023	MYND finger family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253992 194 = Squalene-hopene cyclase/terpenesynthase	✓	
3.m01844	Na,H/K antiporter P-type ATPase, alpha subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3		✓
38.m00298	Na,H/K antiporter P-type ATPase, alpha subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254813 38	✓	
26.m00243	NAC domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254594 26	✓	✓
111.m00081	NAC domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254748 111	✓	✓
31.m00198	NAD transhydrogenase beta subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31	✓	
67.m00198	NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase C-terminus family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67		✓
34.m00245	NADH-quinone oxidoreductase, E subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34		✓
16.m00507	NADH-quinone oxidoreductase, F subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254617 16	✓	✓
32.m00277	Neurohypophysial hormones, N-terminal Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254691 32	✓	
59.m00263	Nitroreductase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254527 59	✓	✓
22.m00354	Nonhistone chromosomal protein LG-1, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254590 22	✓	✓
5.m00327	Nuclear movement protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5	✓	
35.m00283	Nucleoside diphosphate kinase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254597 35	✓	✓
13.m00452	Nucleoside diphosphate kinase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	✓	✓
191.m00040	Oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254167 191	✓	
178.m00076	Oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254575 178		✓
13.m00432	Oxidoreductase, FAD/FMN-binding family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	✓	✓
2.m02297	Oxidoreductase, FAD/FMN-binding family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	✓	✓
226.m00055	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254433 226	✓	
1.m01074	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	
62.m00188	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253815 62	✓	
15.m00408	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254638 15	✓	
103.m00129	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253891 103 = Lysosomal phospholipase A1/cathepsin L	✓	
123.m00091	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254367 123	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
125.m00080	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254370 125 = Cathepsin L/tetrain	✓	
88.m00155	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254584 88 = Cysteine-proteinase	✓	✓
5.m00542	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5 = Cathepsin L-like protein	✓	✓
92.m00126	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254653 92 = Cathepsin B	✓	
13.m00464	Papain family cysteine protease containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13 = Cathepsin L = Cth90	✓	
66.m00240	PBS lyase HEAT-like repeat family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253811 66	✓	
31.m00252	Pectinacylesterase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31	✓	
66.m00251	Penicillin amidase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253811 66		✓
4.m00578	Peptidase C13 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	✓	
146.m00082	Peptidase M16 inactive domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254359 146	✓	✓
63.m00255	Peptidase M16 inactive domain <i>T. thermophila</i> chr_0 8254487 63	✓	✓
21.m00206	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254406 21	✓	✓
156.m00085	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254648 156	✓	
68.m00207	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254385 68	✓	
10.m00322	Peroxidase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10		✓
8.m00549	PH domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8 = Vps 13 (vacuolar protein sorting)/chorein	✓	
95.m00081	Phage head-tail adaptor, putative family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254667 95	✓	
63.m00229	PHD-finger family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254487 63	✓	
17.m00380	Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254815 17	✓	
6.m00433	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254697 6	✓	
46.m00183	Phosphoenolpyruvate carboxykinase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254475 46	✓	✓
1.m01041	Phosphoenolpyruvate phosphomutase precursor <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	✓
45.m00208	Phosphoesterase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254814 45	✓	
45.m00209	Phosphoesterase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254814 45	✓	
45.m00210	Phosphoesterase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254814 45	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
1833.m00002	Phosphoesterase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8255700 1833	✓	
167.m00106	Phosphoglycerate kinase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254181 167	✓	✓
92.m00134	Phosphoglycerate mutase 1 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254653 92	✓	✓
247.m00031	Plectin/S10 domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254002 247	✓	✓
27.m00304	Polyadenylate-binding protein 2 <i>T. thermophila</i> chr_0 8254688 27	✓	✓
24.m00269	Polyprenyl synthetase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254649 24	✓	✓
256.m00035	Predicted protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254392 256	✓	
7.m00567	Profilin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254716 7 = Prf1		✓
27.m00309	Proline dehydrogenase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254688 27	✓	✓
41.m00277	Protease sohB-related <i>T. thermophila</i> chr_0 8254587 41	✓	
57.m00252	Protein disulfide-isomerase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254403 57 = Prolyl-4-hydroxylase (thioredoxin domains)	✓	✓
192.m00071	Protein disulfide-isomerase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254757 192	✓	✓
337.m00014	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254072 337	✓	
68.m00204	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254385 68	✓	
197.m00050	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254457 197	✓	
46.m00187	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254475 46	✓	
59.m00267	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254527 59		✓
12.m00322	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254545 12	✓	
83.m00119	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254563 83		✓
18.m00284	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254564 18	✓	
56.m00207	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254565 56	✓	
15.m00407	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254638 15	✓	
92.m00173	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254653 92	✓	
3.m01674	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	
95.m00123	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254667 95	✓	✓
38.m00314	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254813 38	✓	
71.m00196	Protein kinase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254823 71	✓	
80.m00124	Protein kinase domain <i>T. thermophila</i> chr_0 8254444 80	✓	✓

T.t. Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
48.m00237	Protein-tyrosine phosphatase containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	✓	
146.m00074	PRP38 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254359 146	✓	
225.m00051	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254469 225	✓	
87.m00138	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254479 87	✓	✓
67.m00253	Pyruvate dehydrogenase complex dihydrolipoamide acetyltransferase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67	✓	✓
16.m00262	Pyruvate dehydrogenase E1 component <i>T. thermophila</i> chr_0 8254617 16	✓	✓
247.m00044	Ras family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254002 247 = RAB62	✓	
5.m00586	Ras family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5 = RAB6C	✓	
24.m00346	Region in Clathrin and VPS family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254649 24	✓	
224.m00032	Regulator of chromosome condensation (RCC1) <i>T. thermophila</i> chr_0 8254502 224		✓
1.m00990	Regulator of chromosome condensation <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	✓
191.m00071	Response regulator receiver domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254167 191	✓	
69.m00258	Ribose-phosphate pyrophosphokinase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254428 69		✓
58.m00168	Ribosomal L18ae protein family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254611 58	✓	
120.m00131	Ribosomal L18p/L5e family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254736 120	✓	✓
34.m00340	Ribosomal L40e family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	✓	
213.m00073	Ribosomal protein L10.e containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254708 213	✓	
2.m02033	Ribosomal protein L11, RNA binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	✓	✓
119.m00110	Ribosomal protein L13 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254417 119	✓	
78.m00129	Ribosomal protein L13e containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254464 78	✓	✓
34.m00359	Ribosomal protein L22 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	✓	
34.m00359	Ribosomal protein L22 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	✓	
19.m00329	Ribosomal protein L22 <i>T. thermophila</i> chr_0 8254665 19	✓	✓
10.m00367	Ribosomal protein L23 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	✓	
58.m00165	Ribosomal protein L24e containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254611 58	✓	
62.m00237	Ribosomal protein L3 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253815 62	✓	✓
115.m00079	Ribosomal protein L30p/L7e containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254515 115	✓	✓

T.t. Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
6.m00440	Ribosomal protein L32 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254697 6	✓	
247.m00042	Ribosomal protein L36e containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254400 247	✓	✓
217.m00044	Ribosomal protein L37e containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254489 217	✓	
34.m00202	Ribosomal protein L4/L1 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	✓	✓
163.m00048	Ribosomal protein L7/L12 C-terminal domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253817 163	✓	
128.m00103	Ribosomal protein L7Ae containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254449 128	✓	✓
13.m00457	Ribosomal protein L7Ae containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13		✓
186.m00054	Ribosomal protein S10 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254369 186	✓	
126.m00120	Ribosomal protein S11 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254284 126	✓	✓
10.m00281	Ribosomal protein S13p/S18e containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10	✓	
128.m00102	Ribosomal protein S15 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254449 128	✓	
239.m00049	Ribosomal protein S17 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254504 239		✓
141.m00094	Ribosomal protein S19e containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254397 141	✓	✓
65.m00196	Ribosomal protein S2 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254664 65	✓	
55.m00223	Ribosomal protein S24e containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254371 55		✓
48.m00308	Ribosomal protein S25 <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	✓	
104.m00161	Ribosomal protein S27a containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254365 104		✓
7.m00482	Ribosomal protein S28e containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254716 7	✓	✓
66.m00182	Ribosomal protein S30 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253811 66		✓
48.m00311	Ribosomal protein S4 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	✓	✓
16.m00313	Ribosomal protein S5 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254617 16	✓	✓
358.m00012	Ribosomal protein S7 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254767 358	✓	✓
111.m00107	Ribosomal protein S9 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254748 111	✓	✓
113.m00135	Ribosomal Proteins L2, C-terminal domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254377 113	✓	✓
126.m00078	Ribosomal S17 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254284 126	✓	✓
3.m01917	Ribosomal S3Ae family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	✓
27.m00278	Rieske iron-sulfur protein, Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit <i>T. thermophila</i> chr_0 8254688 27		✓

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
118.m00133	RNA binding protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254476 118	✓	✓
315.m00023	SCP-2 sterol transfer family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254332 315	✓	✓
51.m00203	Sec61beta family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254437 51	✓	✓
87.m00173	Ser/Thr protein phosphatase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254479 87	✓	
84.m00113	SerH3 immobilization antigen, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254754 84	✓	✓
8.m00411	Seryl-tRNA synthetase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8		✓
370.m00012	Sm protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253890 370	✓	
34.m00271	Snare domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34 = Snare	✓	
62.m00225	SPFH domain / Band 7 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253815 62	✓	
42.m00234	SPFH domain / Band 7 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254719 42	✓	
34.m00265	Spore wall protein 2 precursor-related <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	✓	
40.m00257	Squalene and phytoene synthases family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254652 40	✓	✓
3.m01828	Succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	✓
4.m00602	Succinyl-CoA synthetase, alpha subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254811 4	✓	✓
69.m00153	Succinyl-CoA synthetase, beta subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254428 69	✓	✓
49.m00188	Succinyl-CoA synthetase, beta subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254607 49	✓	
5.m00550	Succinyl-CoA synthetase, beta subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254650 5	✓	
37.m00311	Superoxide dismutase, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254756 37	✓	✓
37.m00310	Superoxide dismutase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254756 37	✓	
205.m00042	TB2/DP1, HVA22 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254711 205	✓	
20.m00331	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254373 20	✓	
20.m00376	Thioredoxin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254373 20	✓	
76.m00142	Thioredoxin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253850 76 = Protein-disulfide-isomerase-related protein	✓	✓
193.m00049	Thioredoxin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254581 193	✓	
35.m00176	Thioredoxin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254597 35	✓	
71.m00217	Thioredoxin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254823 71	✓	✓
16.m00405	Threonyl-tRNA synthetase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254617 16	✓	✓
69.m00196	TIP41-like family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254428 69		✓

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
62.m00176	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253815 62	✓	
141.m00128	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254397 141	✓	
87.m00171	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254479 87	✓	
75.m00153	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254495 75	✓	
31.m00268	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254548 31	✓	
19.m00283	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254665 19	✓	
14.m00333	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254798 14		✓
1.m00909	TPR Domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	✓
131.m00134	Transketolase, C-terminal domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254737 131	✓	✓
183.m00027	Transketolase, pyridine binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254634 183	✓	
8.m00329	Transketolase, pyridine binding domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8	✓	
96.m00145	Translation elongation factor EF-1, subunit alpha <i>T. thermophila</i> chr_0 8254435 96	✓	✓
14.m00412	Triosephosphate isomerase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254798 14	✓	
36.m00227	Tubulin beta chain, putative <i>T. thermophila</i> chr_0 8254460 36	✓	✓
73.m00202	Tubulin/FtsZ family, GTPase domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254486 73	✓	✓
225.m00052	Tubulin-tyrosine ligase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254469 225	✓	
205.m00065	Type III restriction enzyme, res subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254711 205	✓	
147.m00087	U1 small nuclear ribonucleoprotein A <i>T. thermophila</i> chr_0 8253894 147	✓	
1.m00883	UBA/TS-N domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254803 1	✓	
10.m00339	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferases family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254582 10		✓
3.m01719	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	
35.m00290	Ubiquitin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254597 35	✓	
35.m00291	Ubiquitin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254597 35	✓	✓
35.m00292	Ubiquitin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254597 35	✓	
35.m00293	Ubiquitin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254597 35	✓	
35.m00294	Ubiquitin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254597 35	✓	
35.m00295	Ubiquitin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254597 35	✓	
35.m00296	Ubiquitin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254597 35	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
35.m00297	Ubiquitin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254597 35	✓	✓
35.m00298	Ubiquitin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254597 35	✓	
34.m00371	Ubiquitin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34		✓
94.m00103	Ubiquitin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254644 94	✓	
6.m00442	Ubiquitin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254697 6	✓	
136.m00074	Ubiquitin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254712 136	✓	
13.m00531	Ubiquitin transferase, HECT domain family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	✓	
12.m00352	Ubiquitin-activating enzyme E1 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254545 12	✓	
2.m02165	Ubiquitin-activating enzyme E1 family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254819 2	✓	
100.m00144	Ubiquitin-conjugating enzyme family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254028 100	✓	
68.m00229	Ubiquitin-conjugating enzyme family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254385 68	✓	
244.m00035	Ubiquitin-conjugating enzyme <i>T. thermophila</i> chr_0 8254423 244		✓
48.m00253	Vacuolar ATP synthase <i>T. thermophila</i> chr_0 8254745 48	✓	
88.m00154	Vacuolar ATPase subunit E <i>T. thermophila</i> chr_0 8254584 88		✓
13.m00284	Vacuolar protein sorting 36 containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	✓	
164.m00073	Variant SH3 domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254550 164	✓	
53.m00278	Viral A-type inclusion protein repeat containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254395 53	✓	
78.m00117	Viral A-type inclusion protein repeat containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254464 78	✓	✓
91.m00119	Viral A-type inclusion protein repeat containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254528 91	✓	✓
9.m00395	Viral A-type inclusion protein repeat containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254645 9	✓	
40.m00239	Viral A-type inclusion protein repeat containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254652 40	✓	✓
74.m00203	Viral A-type inclusion protein repeat containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254763 74	✓	
192.m00076	V-type ATPase 116kDa subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254757 192		✓
39.m00240	V-type ATPase 116kDa subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254777 39	✓	
34.m00342	V-type ATPase, A subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254610 34	✓	✓
67.m00170	V-type ATPase, B subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254459 67	✓	
95.m00161	V-type ATPase, C subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254667 95	✓	
8.m00321	V-type ATPase, C subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254752 8	✓	

T.t Gen-ID	Protein	30 sek	10 min
140.m00061	V-type ATPase, D subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254483 140	✓	
3.m01792	V-type ATPase, G subunit family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254659 3	✓	✓
154.m00103	WGR domain containing protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253984 154		✓
93.m00079	XRN 5'-3' exonuclease N-terminus family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8253887 93	✓	
13.m00275	Zinc finger domain, LSD1 subclass family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	✓	
13.m00521	Zinc finger in N-recognin family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254776 13	✓	
53.m00156	Zinc finger protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254395 53	✓	
239.m00041	Zinc knuckle family protein <i>T. thermophila</i> chr_0 8254504 239	✓	

8.2 Vektorkarte des dsRNA-*Hairpin*-Expressionsvektors

Abb. 44 zeigt die Vektorkarte des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten dsRNA-*Hairpin*-Expressionsvektors.

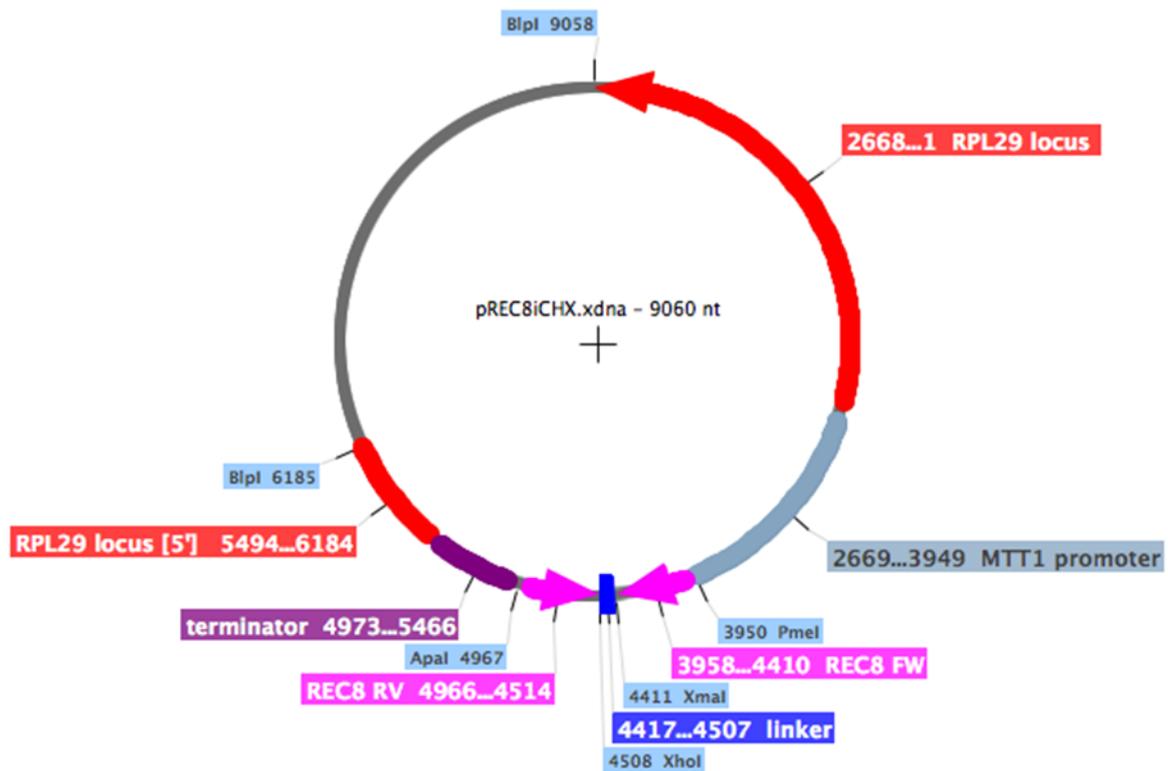


Abb. 44: Vektorkarte des dsRNA-*Hairpin*-Expressionsvektors. Die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind angegeben (PmeI/XmaI, XhoI/ApaI). Die Schnittstelle BspI diente der Linearisierung des Vektors vor der Transformation (Nähere Erläuterungen: s. Kap. 5.5).

9 Danksagung

Abschließend möchte ich mich besonders bei Frau Prof. Dr. Gela Preisfeld für die Möglichkeit zur freien Durchführung dieser Arbeit sowie die Übernahme der Begutachtung und Betreuung dieser Arbeit und die stets freundlichen und hilfreichen Besprechungen, die zu jeder Zeit möglich waren, bedanken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Eberhard Schmidt danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit sowie für eine sehr gute Zusammenarbeit im Rahmen der Lehrveranstaltung „Chemie und Physik für Biologen“.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Arno Tiedtke, ohne den das Projekt gar nicht erst entstanden wäre, für zahlreiche Besuche und fachliche Gespräche.

Außerdem gilt mein Dank der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Dirk Wolters der Ruhr-Universität Bochum für die erfolgreiche Kooperation sowie Frau Dr. Rachel Howard-Till und Herrn Dr. Martin Simon für ihre Ratschläge bzgl. der RNA_i-Experimente.

Ein großes Dankeschön auch an die Mitarbeiter der Cilian AG in Münster dafür, dass wir des Öfteren ihre Gene Gun benutzen durften und immer sehr nett dabei unterstützt wurden.

Meinen Dank möchte ich außerdem Andreas und Tim für die Unmengen an Stickstoff sowie Soner, der gern z.B. seine qPCR-Erfahrungen geteilt hat, aussprechen.

Ein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern der AG Preisfeld sowie dem Labor L.10.65:

- Stefan, Marisa und Nadja - bessere Bürokollegen als euch kann man sich nicht wünschen
- Sabine für ihre ausgesprochene Hilfsbereitschaft und viele gute Tipps und Tricks im Labor

- Allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre

Ganz besonders bedanke ich mich bei Viktoria für die hervorragende Zusammenarbeit. Ohne dich hätte ich wohl so manches Mal keine Lust mehr gehabt.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und bei meiner Familie für die moralische Unterstützung und ihr Interesse bedanken.

10 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,

Kathrin Czora