

**Charakterisierung der Hydrogenosomen des  
anaeroben Pilzes *Neocallimastix frontalis* –  
Proteomanalyse und EST-Sequenzierung**

**I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Gabriel Gelius-Dietrich

aus Düsseldorf

April 2008

---

Aus dem Institut für Ökologische Pflanzenphysiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. William Martin  
Korreferent: Prof. Dr. Martin Lercher

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juni 2008

---

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Zustimmung des Betreuers in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

**Atteia, A., van Lis, R., Gelius-Dietrich, G., Adrait, A., Garin, J., Joyard, J., Roland, N. und Martin, W.** Pyruvate formate-lyase and a novel route of eukaryotic ATP synthesis in *Chlamydomonas* mitochondria. *J Biol Chem*, 2006. **281**(15):9909–9918.

**Esser, C., Ahmadinejad, N., Wiegand, C., Rotte, C., Sebastiani, F., Gelius-Dietrich, G., Henze, K., Kretschmann, E., Richly, E., Leister, D., Bryant, D., Steel, M. A., Lockhart, P. J., Penny, D. und Martin, W.** A genome phylogeny for mitochondria among  $\alpha$ -proteobacteria and a predominantly eubacterial ancestry of yeast nuclear genes. *Mol Biol Evol*, 2004. **21**(9):1643–1660.

**Gelius-Dietrich, G. und Henze, K.** Pyruvate formate lyase (PFL) and PFL activating enzyme in the chytrid fungus *Neocallimastix frontalis*: a free-radical enzyme system conserved across divergent eukaryotic lineages. *J Eukaryot Microbiol*, 2004. **51**(4):456–463.

**Gelius-Dietrich, G., ter Braak, M. und Henze, K.** Mitochondrial steps of arginine biosynthesis are conserved in the hydrogenosomes of the chytridiomycete *Neocallimastix frontalis*. *J Eukaryot Microbiol*, 2007. **54**(1):42–44.

**Martin, W., Rotte, C., Hoffmeister, M., Theissen, U., Gelius-Dietrich, G., Ahr, S. und Henze, K.** Early cell evolution, eukaryotes, anoxia, sulfide, oxygen, fungi first (?), and a tree of genomes revisited. *IUBMB Life*, 2003. **55**(4-5):193–204.

**Nowitzki, U., Gelius-Dietrich, G., Schwieger, M., Henze, K. und Martin, W.** Chloroplast phosphoglycerate kinase from *Euglena gracilis*: endosymbiotic gene replacement going against the tide. *Eur J Biochem*, 2004. **271**(20):4123–4131.

**Pütz, S., Dolezal, P., Gelius-Dietrich, G., Bohacova, L., Tachezy, J. und Henze, K.** Fe-hydrogenase maturases in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell*, 2006. **5**(3):579–586.

**Pütz, S., Gelius-Dietrich, G., Piotrowski, M. und Henze, K.** Rubrerythrin and peroxiredoxin: two novel putative peroxidases in the hydrogenosomes of the microaerophilic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*, 2005. **142**(2): 212–223.

---

**Tagungsbeiträge**

Society of Protozoologists “56<sup>th</sup> Annual Meeting” (Juni 2004) Smithfield, Rhode Island, USA. Posterpräsentation.

FEBS Advanced Course on “Origin and Evolution of Mitochondria and Chloroplasts” (März 2005) Wildbad Kreuth, Deutschland. Posterpräsentation.

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
3.1	Energiestoffwechsel . . . . .	5
3.2	Amitochondriate Lebewesen . . . . .	6
3.3	<i>Neocallimastix frontalis</i> . . . . .	9
3.4	Hydrogenosomen . . . . .	10
3.5	Hydrogenosomen von <i>Neocallimastix frontalis</i> . . . . .	12
3.5.1	Fermentative Formiat Produktion . . . . .	13
3.5.2	Arginin-Stoffwechsel . . . . .	15
3.6	Ziele der Arbeit . . . . .	17
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
4.1	Chemikalien . . . . .	19
4.2	Reagenssätze . . . . .	19
4.3	Enzyme . . . . .	20
4.4	Oligonukleotide . . . . .	20
4.5	Vektoren . . . . .	20
4.6	Kulturen . . . . .	20
4.6.1	<i>Neocallimastix frontalis</i> . . . . .	20

4.6.2	<i>Escherichia coli</i> . . . . .	21
4.6.3	Anzucht der Kulturen . . . . .	21
4.6.4	Isolation von Hydrogenosomen aus <i>Neocallimastix frontalis</i> . .	22
4.6.5	Elektronenmikroskopie . . . . .	23
4.7	Arbeiten mit Nukleinsäuren . . . . .	24
4.7.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren . . . . .	25
4.7.2	Reinigung von polyadenylierter RNA aus <i>N. frontalis</i> . . . . .	25
4.7.3	Herstellung einer cDNA-Bibliothek aus <i>N. frontalis</i> . . . . .	26
4.7.4	Kontroll-PCR . . . . .	27
4.7.5	Sequenzierung von DNA-Fragmenten . . . . .	27
4.7.6	Ausschluß mehrfach sequenzierter Klone . . . . .	28
4.7.7	Northern-Hybridisierung . . . . .	30
4.8	Arbeiten mit Proteinen . . . . .	30
4.8.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen . . . . .	30
4.8.2	Elektrophoretische Trennung von Proteinen . . . . .	31
4.8.3	Western-Transfer . . . . .	31
4.8.4	Immunodetektion von Proteinen . . . . .	31
4.8.5	Zweidimensionale Gelelektrophorese . . . . .	32
4.8.6	Färben von Polyacrylamidgelen . . . . .	34
4.8.7	Tryptische Spaltung von Proteinen und Proteinsequenzierung	34
4.8.8	Messung enzymatischer Aktivitäten . . . . .	35
4.9	Bioinformatische Methoden . . . . .	35
4.9.1	Phylogenetische Analysen . . . . .	36
4.9.2	Verwaltung der EST-Sequenzen . . . . .	36
4.9.3	Suchen in der EST-Datenbank . . . . .	41
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
5.1	Proteomanalyse . . . . .	44
5.2	Proteine aus der Proteomanalyse . . . . .	46
5.3	Die Pyruvat-Formiat Lyase . . . . .	50

5.3.1	cDNA Klone . . . . .	50
5.3.2	PFL im Proteom der Hydrogenosomen . . . . .	52
5.3.3	Phylogenetische Analyse der PFL-Sequenzen . . . . .	52
5.4	Das aktivierende Enzym der PFL . . . . .	53
5.4.1	PFL-AE in der EST-Datenbank . . . . .	53
5.4.2	Phylogenetische Analyse der PFL-AE-Sequenzen . . . . .	54
5.5	Succinyl-CoA Ligase . . . . .	55
5.6	Ornithin Carbamoyltransferase . . . . .	56
5.7	Superoxid Dismutase . . . . .	57
5.8	Cytosolische Enzyme . . . . .	58
5.9	EST-Datenbank . . . . .	59
5.9.1	cDNA-Bibliothek . . . . .	59
5.9.2	Quantifizierung . . . . .	60
5.9.3	Funktionale Kategorisierung . . . . .	60
5.9.4	Graphische Benutzeroberfläche der EST-Datenbank . . . . .	61
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
6.1	Die EST-Datenbank von <i>Neocallimastix frontalis</i> . . . . .	65
6.2	Das hydrogenosomale Proteom von <i>Neocallimastix frontalis</i> . . . . .	66
6.2.1	Weitere Enzyme in der hydrogenosomalen Fraktion . . . . .	67
6.2.2	Speichern und Verarbeiten von Information . . . . .	67
6.2.3	Glykolytische Enzyme . . . . .	68
6.3	PFL und verwandte Enzyme in Eukaryoten . . . . .	69
6.4	Der evolutive Ursprung der PFL und PFL-AE . . . . .	71
6.5	Chemische Energie . . . . .	72
6.6	Arginin-Stoffwechsel . . . . .	73
6.7	Der Umgang mit Sauerstoff . . . . .	74
6.8	Eigenschaften der Hydrogenosomen von <i>N. frontalis</i> . . . . .	75
6.9	Ausblick auf weiterführende Arbeiten . . . . .	77

<b>Anhang</b>	<b>79</b>
---------------	-----------

---

<b>Einheiten und Abkürzungen</b>	<b>91</b>
----------------------------------	-----------

---

<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>95</b>
-----------------------------	-----------

---



# 1 Zusammenfassung

---

*Neocallimastix frontalis*, ein anaerober Pilz aus dem Phylum Neocallimastigomycota, der im Verdauungstrakt der Ruminantia lebt, besitzt als energieliefernde Organellen anstelle von Mitochondrien Hydrogenosomen – eine anaerobe Form der Mitochondrien. Der gemeinsame Ursprung der Hydrogenosomen mit den Mitochondrien sollte anhand neuer charakteristischer Merkmale der Hydrogenosomen von *N. frontalis* belegt werden. Ferner sollten Unterschiede zu den Hydrogenosomen anderer Organismen gefunden werden, welche die Hypothese einer polyphyletischen Entstehung der Hydrogenosomen verschiedener Gruppen aus Mitochondrien unterstützen.

Dazu wurde aus *N. frontalis* polyadenylierte RNA gereinigt und zur cDNA-Synthese verwendet. Eine cDNA-Bibliothek wurde erstellt, aus der 1615 zufällig ausgewählte, unabhängige Klone sequenziert und anhand einer BLAST-Suche gegen die nicht-redundante Proteindatenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) annotiert wurden.

Im Laufe der Sequenzierungen wurden Koloniehybridisierungen mit bereits vorhandenen Klonen vorgenommen, um Mehrfachsequenzierungen zu vermeiden. Die Daten wurden in einer MySQL-Datenbank gespeichert und sind mit einer mittels der Skriptsprache PHP erstellten graphischen Benutzeroberfläche über einen Internet-Browser zugänglich.

Desweiteren wurden aus *N. frontalis* Hydrogenosomen mit Hilfe von isopyknischer Zentrifugation isoliert. Die Reinheit der hydrogenosomalen Fraktion wurde durch Messen der Aktivität von Markerenzymen überprüft. Das Proteom der Hydrogenosomen wurde mit Hilfe von zweidimensionaler Gelelektrophorese (1. Trennung nach isoelektrischem Punkt (IEF), 2. Trennung nach Molekulargewicht (SDS-PAGE)) getrennt. Aus diesen Gelen wurden ca. 200 Proteine sequenziert und anhand der erstellten cDNA-Bibliothek identifiziert.

Zwei der identifizierten Enzyme wurden genauer untersucht: die Pyruvat-Formiat Lyase (PFL, EC: 2.3.1.54) und die Ornithin Carbamoyltransferase (OTC, EC: 2.1.3.3). Ersteres katalysiert die nicht-oxidative Dissimilation von Pyruvat zu Formiat und Acetyl-CoA und nimmt somit die Stellung des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes innerhalb des Kohlenstoffmetabolismus der aeroben Mitochondrien ein. Letzteres ist an der Arginin-Biosynthese beteiligt und bei Eukaryoten üblicherweise in den Mitochondrien lokalisiert. In dieser Arbeit konnte die OTC erstmals auch in den Hydrogenosomen der anaeroben Pilze nachgewiesen werden. In *Trichomonas vaginalis* – einem mikroaerophilen Humanparasiten, der ebenfalls Hydrogenosomen besitzt – ist die OTC dagegen am vollständig cytosolisch lokalisierten Arginin-Dihydrolase-Weg beteiligt und nicht in den Hydrogenosomen vorhanden.

Hiermit sind zwei neue Eigenschaften der Hydrogenosomen von *Neocallimastix frontalis* gefunden worden, welche die Verwandtschaft der Organellen zu den Mitochondrien belegen, aber auch ihre Diversität in unterschiedlichen Organismengruppen zeigen.

## 2 Abstract

---

*Neocallimastix frontalis*, an anaerobic fungus residing in the digestive tract of ruminantia, contains hydrogenosomes—an anaerobic form of mitochondria—instead of “genuine” mitochondria as energy supplying organelles. The common origin of hydrogenosomes and mitochondria has to be shown by the means of new characterising attributes of the hydrogenosomes of *N. frontalis*. In addition, differences to hydrogenosomes of other organisms have to be found, supporting the polyphyletic genesis of hydrogenosomes. The major aims of this study were to find proof for a common origin of fungal hydrogenosomes and mitochondria and to explore the diversity of hydrogenosomes in different organisms.

Polyadenylated RNA was isolated from *N. frontalis* and used for cDNA synthesis. A cDNA library was constructed. From that, 1615 randomly chosen independent clones were sequenced and annotated by BLAST search against the non redundant protein database of NCBI (National Center for Biotechnology Information).

During EST sequencing, colony hybridisations with already sequenced clones were performed to reduce redundant sequencing. The data were stored in a MySQL database reachable via a graphical user interface—written in PHP scripting language—with an internet browser.

Hydrogenosomes of *N. frontalis* were prepared by isopycnic centrifugation. The purity of the hydrogenosomal fraction was evaluated by the enzymatic activities of marker enzymes. The hydrogenosomal proteome was separated by 2D gel electrophoresis (1. dimension pI (IEF), 2. dimension molecular weight (SDS-PAGE)). From these gels about 200 randomly chosen proteins were sequenced and identified by comparison with the constructed EST-database.

Two newly identified enzymes were further investigated: pyruvate-formate lyase (PFL, EC: 2.3.1.54) and ornithine carbamoyltransferase (OTC, EC: 2.1.3.3). PFL catalyses the non-oxidative dissimilation of pyruvate to formate and acetyl-CoA, substituting for the position of the pyruvate dehydrogenase complex in the carbon

metabolism of aerobic mitochondria. OTC takes part in arginine biosynthesis and is usually localised in the mitochondria of eukaryotes. Here, OTC is identified for the first time in hydrogenosomes. In *Trichomonas vaginalis*—an anaerobic parasite of the human urogenital tract containing hydrogenosomes as well—OTC takes part in the complete cytosolic arginine dihydrolase pathway and is not found in the hydrogenosomes.

In this work two new properties of the hydrogenosomes of *N. frontalis* were identified, supporting the relationship of these organelles to the mitochondria, but also showing the diversity in different groups of organisms.

## 3 Einleitung

---

### 3.1 Energiestoffwechsel

Das wichtigste Merkmal eines eukaryotischen Organismus ist die Kompartimentierung der Zelle. Im Gegensatz zur prokaryotischen Zelle ist der Zellinnenraum in weitere Räume unterteilt. Diese sind von mindestens einer Membran umgeben und erfüllen die unterschiedlichsten Aufgaben, wie Stofftransport, Bereitstellung von Reaktionsräumen, usw.

Eine besondere Stellung unter diesen sogenannten Organellen nehmen jene ein, die von zwei oder mehr Membranen umschlossen sind. Es handelt sich um Mitochondrien und Chloroplasten, wobei letztere nicht in Tieren, Pilzen und einigen Einzellern (Protozoa) zu finden sind (Martin et al., 1998, 2001). Mitochondrien und Chloroplasten sind die einzigen Organellen, die neben dem Zellkern über eigene DNA und einen eigenen Proteinbiosyntheseapparat verfügen. Durch die Ähnlichkeit der Organellen-DNA mit prokaryotischer DNA ist davon auszugehen, daß es sich um einst freilebende prokaryotische Organismen handelt, die im Zuge von Endosymbioseereignissen ihren jetzigen Status als semiautonome Organellen erhalten haben (Martin et al., 2001).

Allen Eukaryoten ist gemein, daß sie ihre zum Leben benötigte Energie durch die Oxidation von Kohlenstoffverbindungen gewinnen. Startpunkt ist die Glykolyse: Glukose wird zu Pyruvat oxidiert, dabei werden zwei Moleküle ATP, dem universellen Energiespeicher einer Zelle, produziert (Hannaert et al., 2000).

Unter anaeroben Bedingungen wird Pyruvat zu Milchsäure oder Ethanol verstoffwechselt. Im aeroben Milieu hingegen wird Pyruvat in die Mitochondrien transportiert und dort von dem Enzym Pyruvat Dehydrogenase zu Acetyl-Coenzym A umgewandelt. Im Citratzyklus wird Acetyl-CoA vollständig zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  oxidiert. Dabei wird  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  produziert, das in der Atmungskette zum Aufbau des Protonengradienten benötigt wird. Die aus dem Abbau des Protonen-

gradienten resultierende Energie treibt die ATP-Synthase an und ermöglicht so eine sehr effektive ATP-Produktion. Während der Glykolyse werden über Substratkettenphosphorylierung zwei Moleküle ATP pro Glukosemolekül produziert. Bei der vollständigen Oxidation von Glukose zu CO<sub>2</sub> entstehen 30 Moleküle ATP (Hinkle et al., 1991).

In Mitochondrien findet jedoch nicht nur die strikt an aerobe Milieus gebundene oxidative Phosphorylierung statt. Viele eukaryotische Organismen sind zudem befähigt, ihren Energiehaushalt auch in anaerober Umgebung aufrecht zu erhalten. Zum einen gelingt dies durch cytosolische Gärungsprozesse mit Ethanol oder Milchsäure als Endprodukt. Zum anderen können einige Mitochondrien andere Elektronenendakzeptoren als Sauerstoff verwenden. Solche anaeroben Mitochondrien sind in einigen Protozoa (z. B. *Euglena gracilis*) aber auch in mehrzelligen Organismen zu finden (z. B. *Arenicola marina*), aber nicht in höheren Pflanzen. Der terminale Elektronenakzeptor wird entweder aus der Umgebung aufgenommen (z. B. Nitrat bei *Fusarium* oder *Cylindrocarpon*), oder er wird selbst hergestellt (z. B. Fettsäuresynthese bei *Euglena gracilis* oder Fumarat bei *Ascaris*) (Tielens et al., 2002).

Unter diesen Organismen findet sich auch eine Ausnahme zu der Regel, dass alle Eukaryoten Energie durch die Oxidation organischer Verbindungen gewinnen: Der Wattwurm *Arenicola marina* ist in der Lage, bei geringer Sauerstoffkonzentration Sulfid zu Thiosulfat zu oxidieren und die Elektronen zur ATP-Synthese zu gebrauchen (Doeller et al., 2001; Theißen et al., 2003).

Die Glykolyse ist der universelle Stoffwechselweg der Eukaryoten. Einige anaerobe Protisten können auch den Arginin-Dihydrolase-Weg als Energiequelle nutzen (Brown et al., 1998; Yarlett et al., 1996), aber die Möglichkeit Kohlenhydrate zu verwenden, ist immer gegeben. Anders als bei den Prokaryoten, wo die Glykolyse eine eher untergeordnete Rolle spielt. Es wird zwar Glukose zu Pyruvat oxidiert, aber nicht zwangsläufig über die Glykolyse (Pelroy et al., 1972; Schönheit und Schäfer, 1995; Selig et al., 1997). Thermophile und hyperthermophile Prokaryoten synthetisieren ATP mit Hilfe von Redox-Reaktionen mit anorganischen Elektronendonoren und -akzeptoren (Amend und Shock, 2001).

## 3.2 Amitochondriate Lebewesen

Unter dem Begriff »amitochondriat« werden alle Eukaryoten zusammengefaßt, die nicht über »klassische« Mitochondrien verfügen. Diese Organismen haben

keine Atmungskette (in Folge dessen auch keine oxidative Phosphorylierung) und keinen Citratzyklus. Es handelt sich um keine systematische Einteilung, da Amitochondriate in vielen eukaryotischen Linien – beispielsweise unter den Pilzen – zu finden sind. Allerdings gibt es keinen mehrzelligen Vertreter dieser Organismen.

Vielmehr ist der Begriff historisch zu verstehen, da im elektronenmikroskopischen Bild keine dem Mitochondrium ähnliche Struktur zu erkennen ist und die für Mitochondrien typische Biochemie der ATP-Synthese fehlt. Mitochondrien haben im elektronenmikroskopischen Bild eine unverwechselbare Morphologie. Das Fehlen erkennbarer Mitochondrien legte die Schlußfolgerung nahe, daß auch die entsprechende Biochemie fehlt. Schwer zu kultivierende Organismen, deren biochemische Eigenschaften nicht im Labor meßbar sind, wurden nach diesem Kriterium als Amitochondriate identifiziert. Es wurde angenommen, daß die Amitochondriaten sehr ursprüngliche Eukaryoten sind, die vor der Entstehung der Mitochondrien von den Eukaryoten abzweigten (Cavalier-Smith, 1983; Cavalier-Smith und Chao, 1996). Unterstützt wurde diese Hypothese durch phylogenetische Untersuchungen an Genen für ribosomale RNA (Leipe et al., 1993; Woese et al., 1990) und Elongationsfaktor Proteinen (Hashimoto et al., 1997). Alle anderen Eukaryoten haben Mitochondrien, da sie nach dem Endosymbiose-Ereignis durch das die Mitochondrien entstanden, abzweigten (Gray et al., 2004). Inzwischen ist diese These durch neuere Erkenntnisse verworfen worden (Embley und Martin, 2006; Martin et al., 2003).

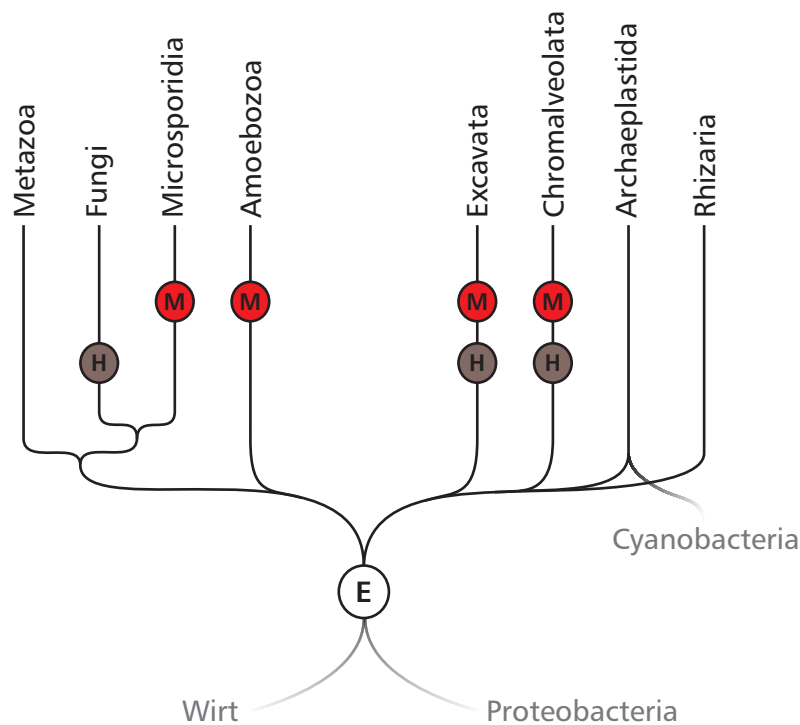
Alle Vertreter der Amitochondriaten sind Anaerobier, einige davon sind mikroaerophil. Sie brauchen keinen Sauerstoff, um ihren Metabolismus aufrecht zu erhalten, da keine oxidative Phosphorylierung betrieben wird. Unter atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen (ca. 300  $\mu\text{M}$ ) ist kein Wachstum mehr möglich, da verschiedene Enzyme des Energiestoffwechsels durch die Anwesenheit von Sauerstoff gehemmt oder inaktiviert werden (z. B. Hydrogenase und Pyruvat-Ferredoxin Oxidoreduktase) (Hrdý und Müller, 1995; Page-Sharp et al., 1996).

Für einige amitochondriate Protisten ist bekannt, daß sie unter geringen Sauerstoffkonzentrationen (3 bis 30  $\mu\text{M}$ ) durchaus wachsen können, mitunter sogar besser als gänzlich ohne Sauerstoff (Lloyd, 1996; Paget und Lloyd, 1990). Diese Organismen werden auch als »mikroaerophil« bezeichnet (Lloyd, 1996). Sie sind nicht »strikt anaerob«; sie treten in ihren Lebensräumen mit Sauerstoff in Kontakt und haben biochemische Mechanismen entwickelt, die Sauerstoff wie ein Toxin behandeln und entgiften (Abschnitt 6.7). Amitochondriate werden in zwei Typen unterteilt (Martin und Müller, 1998; Müller, 1988):

**Typ I** Der gesamte Energiestoffwechsel findet im Cytosol statt. Die ATP-Synthese (Substratkettenphosphorylierung) ist nicht an ein Organell gebunden.

**Typ II** Die Glykolyse findet im Cytosol statt, die ATP-Synthese (Substratkettenphosphorylierung) hingegen in wasserstoffproduzierenden Organellen, den Hydrogenosomen.

Ein Beispiel für die Typ I Amitochondriaten ist *Giardia intestinalis* [Excavata] (Tovar et al., 2003). *Giardia* verfügt über ein von zwei Membranen umgebenes Organell – das Mitosom – ein stark reduziertes Mitochondrium (Tovar et al., 1999). Die Mitosomen sind, ebenso wie die Hydrogenosomen und die Mitochondrien, an der Synthese von Eisen-Schwefel-Proteinen beteiligt (Lill und Mühlenhoff, 2005; Tachezy et al., 2001). Weitere Typ I Amitochondriaten sind die Organismen *Entamoeba histolytica* [Amoebozoa] (Tovar et al., 1999), *Trachipleistophora hominis* [Microsporidia] (Williams et al., 2002) und *Cryptosporidium parvum* [Chromalveolata] (Keithly et al., 2005).



**Abbildung 3.1:** Eukaryotische Organismen. Der Buchstabe »E« bezeichnet die vermutete Wurzel des eukaryotischen Stammbaumes. Links zweigen die Unikonten ab, rechts die Bikonten. Alle Organismengruppen haben Mitochondrien; einige enthalten Organismen mit Mitosomen »M«, und/oder Hydrogenosomen »H« (Embley und Martin, 2006).



Vertreter der Typ II Amitochondriaten sind unter den Eukaryoten sehr verstreut. Darunter fallen Ciliaten [Chromalveolata] (z. B. *Plagiopyla frontata* und *Nyctotherus ovalis*), Parabasalia [Excavata] (z. B. *Trichomonas vaginalis*) und anaerobe Pilze [Fungi] (z. B. *Neocallimastix frontalis*) (Müller, 1993). Hydrogenosomen und Mitosomen sind im Stammbaum der Eukaryoten polyphyletisch, sie werden in den unterschiedlichsten Organismengruppen gefunden. Alle Gruppen, die amitochondriate Arten enthalten, schließen auch Arten mit Mitochondrien ein (Abbildung 3.1).

### 3.3 *Neocallimastix frontalis*



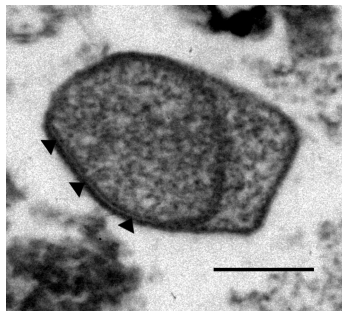
**Abbildung 3.2:** *Neocallimastix frontalis*. (— 100 µm)

Der Pilz *Neocallimastix frontalis* (Orpin, 1975) gehört seit 2007 nicht mehr zum Phylum Chytridiomycota, sondern in das neue Phylum Neocallimastigomycota (Hibbett et al., 2007). Das Phylum Neocallimastigomycota umfasst die anaerob lebenden, begeißelten Pilze. Deren Lebensraum ist der Verdauungstrakt der Ruminantia. Sie sind für den »Wirtsorganismus« wichtige Lebenspartner, da letztere nicht in der Lage sind, Polysaccharide pflanzlicher Zellwände zu verdauen. Die anaeroben Pilze produzieren hydrolysierende Enzyme und können so Mono- und Disaccharide zur Verfügung stellen (Borneman und Akin, 1994).

*N. frontalis* (Abbildung 3.2) bildet ein Sporangium aus, das bis zu 88 vielfach begeißelte Sporen enthält. Die Sporen bilden nach ihrer Entlassung aus dem Sporangium ein amöboides Stadium aus und setzen sich an Pflanzenteilen oder anderen festen Oberflächen ab. Dort bilden sie eine Zyste, die wiederum das Rhizoidmyzel ausbildet (Lowe et al., 1987).

Die Gattung *Neocallimastix* besitzt Hydrogenosomen anstelle von Mitochondrien (Yarlett et al., 1986) und gehört daher zu den »Typ II Amitochondriaten«, die ATP über eine Substratkettenphosphorylierung herstellen (Tielens et al., 2002).

#### 3.4 Hydrogenosomen



**Abbildung 3.3:** Die von einer doppelten Hüllmembran (Benchimol und De Souza, 1983) umgebenen Hydrogenosom aus *Neocallimastix frontalis* (— 0,25  $\mu\text{m}$ , ► Membran).

Hydrogenosomen sind von zwei Membranen umgebene Organellen, die unter anaeroben Bedingungen molekularen Wasserstoff erzeugen (Lindmark und Müller, 1973; Martin und Müller, 1998; Müller, 1993). Sie verfügen in der Regel über keine eigene DNA (Clemens und Johnson, 2000; van der Giezen et al., 1997b). Sämtliche hydrogenosomalen Proteine werden demnach im Zellkern kodiert, im Cytosol synthetisiert und dann in das Organell importiert. Die derzeit einzige bekannte Ausnahme ist der Ciliat *Nyctotherus ovalis* (Akhmanova et al., 1998; Boxma et al., 2005). *N. ovalis* besitzt ein Wasserstoff-produzierendes Organell mit eigener DNA. Unter anderem sind Teile des Komplexes I der Atmungskette hier kodiert. Daher wird dieses Organell als Bindeglied zwischen Hydrogenosomen und Mitochondrien angesehen (Gray, 2005).

Hydrogenosomen und Mitochondrien sind unterschiedliche Ausprägungen des gleichen Organells (Embley et al., 2003). Es gibt viele Gemeinsamkeiten zwischen beiden, beispielsweise die doppelte Hüllmembran (Benchimol und De Souza, 1983) – ein starkes Argument für einen endosymbiontischen Ursprung der Organellen. Weitere Berührungspunkte sind die Produktion von ATP und die Oxidation von Pyruvat (Müller, 1993). Die ersten molekularen Hinweise für einen gemeinsamen Ursprung lieferten die phylogenetischen Analysen der mitochondrialen und hydrogenosomalen Hitzeschockproteine Hsp10, Hsp60 und Hsp70 (Bui et al.,

1996; Germot et al., 1996; Horner et al., 1996; Roger et al., 1996). Es gibt allerdings auch fundamentale Unterschiede.

Zum einen gibt es Eigenschaften, die ausschließlich den Hydrogenosomen vorbehalten sind: die namensgebende Produktion von Wasserstoffgas durch eine [Fe]-Hydrogenase und die Enzyme Pyruvat-Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR) in den Trichomonaden (Müller, 1993), bzw. Pyruvat-Formiat Lyase (PFL) der anaeroben Pilze (Akhmanova et al., 1999; Gelius-Dietrich und Henze, 2004). Eine Ausnahme bildet das Enzym Pyruvat-NADP<sup>+</sup> Oxidoreduktase (PNO) aus den fakultativ anaeroben Mitochondrien von *Euglena gracilis*. Die PNO ist eine Fusion aus den Enzymen Pyruvat-Ferredoxin Oxidoreduktase und der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase und stellt so eine phylogenetische Verbindung zwischen fakultativ anaeroben Mitochondrien und Hydrogenosomen dar (Rotte et al., 2001). Die Enzyme PFL, PFOR und PNO nehmen die Position des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes der aeroben Mitochondrien ein, der in den Hydrogenosomen nicht vorliegt.

Zum anderen gibt es viele biochemische Eigenschaften der aeroben Mitochondrien, welche nicht in Hydrogenosomen zu finden sind. In Hydrogenosomen ist keine Elektronentransportkette vorhanden und somit auch keine oxidative Phosphorylierung von ATP und kein Citratzyklus. Eine morphologische Folge daraus, ist das Fehlen einer Oberflächenvergrößerung der inneren Hüllmembran (Embley und Martin, 2006; Honigberg et al., 1984; Müller, 1993; Tielens et al., 2002).

Die einzige Reaktion des Citratzyklus, die in den Hydrogenosomen stattfindet, ist die ATP bereitstellende Reaktion: die Substratkettenphosphorylierung von ADP durch die Succinyl-CoA Ligase (SCS) (Abschnitt 5.5 und Abschnitt 6.5). Der Verlust aller Enzyme des Citratzyklus bis auf die SCS in den Hydrogenosomen impliziert, daß Energie ein wesentlicher Aspekt dieser Organellen ist (Dacks et al., 2006).

Die Entstehung der Hydrogenosomen geht auf dasselbe Endosymbioseereignis zurück, durch das die Mitochondrien entstanden sind (Martin und Müller, 1998; Müller und Martin, 2007). Die Identität des Wirtes dieser Endosymbiose ist umstritten. Einige Hypothesen schlagen einen ursprünglichen, amitochondriaten Eukaryoten vor (Cavalier-Smith, 2002, 2004; Lake et al., 2005; Margulis et al., 2005; Moreira und Lopez-Garcia, 1998). Die Entdeckung von Mitosomen und Hydrogenosomen in diesen Organismen widerspricht dieser Annahme (Abschnitt 3.2). Andere Hypothesen postulieren einen archaebakteriellen Wirt und stellen die Entstehung der Eukaryoten als Folge der Endosymbiose dar (Martin und Müller, 1998; Searcy, 1992; Vellai et al., 1998). Die verschiedenen Hypothesen und Theorien zum Ursprung von Eukaryoten und Mitochondrien werden in Embley und Martin (2006) diskutiert.

Ein Modell zur Genese der Eukaryoten wird durch die »Wasserstoff-Hypothese« von Martin und Müller (1998) beschrieben: Der gemeinsame Vorfahre aller Ausprägungen von Mitochondrien war ein fakultativ anaerobes  $\alpha$ -Proteobakterium (Embley und Martin, 2006; Esser et al., 2004), das von einem strikt anaeroben, wasserstoffabhängigen Archaeobakterium – vermutlich methanogen (Martin und Müller, 1998) – vereinnahmt wurde. Der erste Eukaryot war also das Ergebnis der Symbiose zwischen einem Eubakterium und einem Archaeobakterium (Abbildung 3.1).

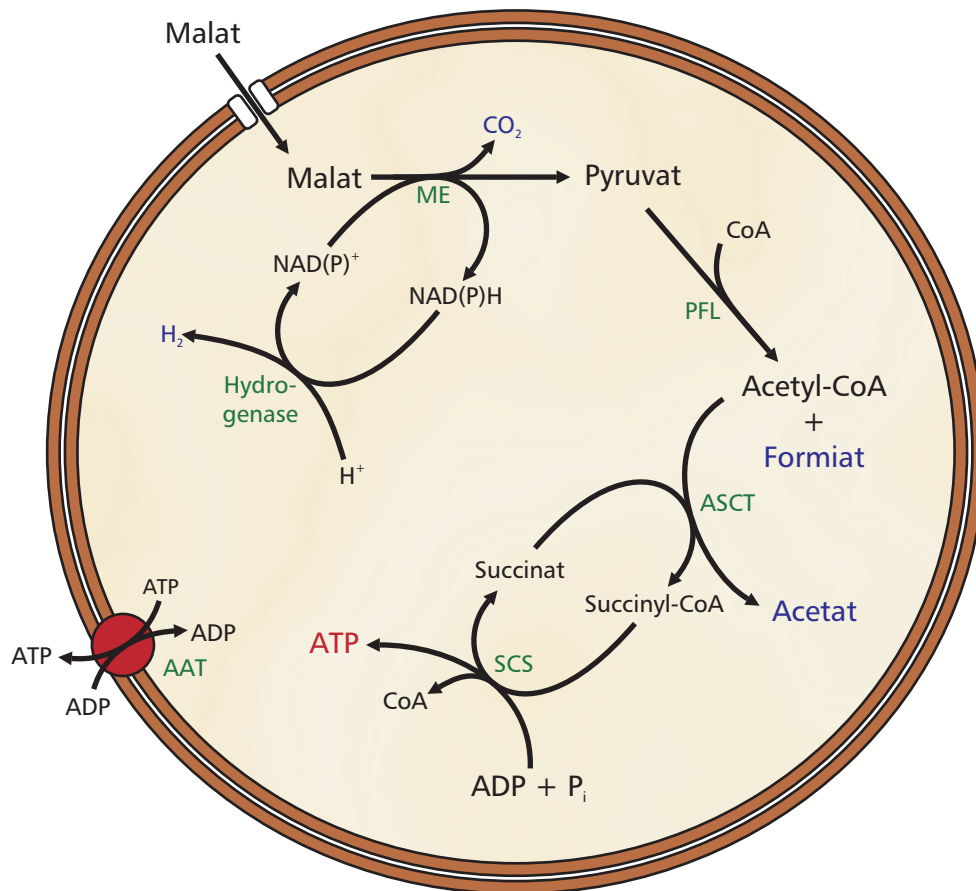
Im Laufe der Spezialisierung des Symbionten auf die verschiedenen Arten der Mitochondrien (aerobe und anaerobe Mitochondrien, Hydrogenosomen und Mitosomen) hat ein massiver Genverlust stattgefunden. Zum einen durch endosymbiontischen Gentransfer in den Zellkern und gegebenenfalls auch durch die Umstellung der Lokalisation der entsprechenden Genprodukte in andere Kompartimente. Zum anderen durch gänzlichen Verlust von nicht mehr benötigten Genen (Henze, 2008).

Neue Gene wurden durch horizontalen Gentransfer von anderen Prokaryoten zum Wirt der Endosymbiose, oder durch eukaryotische Errungenschaften hinzugewonnen (Gabaldon und Huynen, 2004). Darunter beispielsweise Komponenten des Proteinimports (Dolezal et al., 2006) und mitochondriale ATP/ADP Transporter (Kuan und Saier, 1993; Kunji, 2004). Dadurch kann der Ursprung von nur noch weniger als 20 % der mitochondrialen Proteine auf den  $\alpha$ -proteobakteriellen Symbionten zurückverfolgt werden (Gabaldon und Huynen, 2004, 2005).

Einige dieser »Neuerwerbungen« sind allen Mitochondrien gemeinsam und daher vermutlich vor der Aufspaltung der eukaryotischen Linien entstanden. Viele andere sind organismusspezifisch (Richly et al., 2003), was die Unterschiede der Spezialisierung der Mitochondrien in verschiedenen Organismen widerspiegelt. Ein Beispiel dafür ist die Wachsester-Fermentation bei *Euglena gracilis* (Hoffmeister et al., 2005).

### 3.5 Hydrogenosomen von *Neocallimastix frontalis*

Die Hydrogenosomen von *N. frontalis* importieren Malat, das von dem Malat Enzym zu Pyruvat decarboxyliert wird. Dabei wird  $\text{NAD(P)}^+$  als Elektronenakzeptor verwendet. Die Elektronen werden von einer [Fe]-Hydrogenase auf Protonen übertragen und so Wasserstoffgas erzeugt. Pyruvat wird mit Coenzym A von der PFL zu Acetyl-CoA und Formiat umgesetzt (Abschnitt 3.5.1). Der CoA-Rest von



**Abbildung 3.4:** Energiestoffwechsel der Hydrogenosomen von *Neocallimastix frontalis* nach Hackstein et al. (1999). ME: Malat Enzym (EC: 1.1.1.40), PFL: Pyruvat-Formiat Lyase (EC: 2.3.1.54), ASCT: Acetat-Succinat-CoA Transferase (EC: 2.8.3.-), SCS: Succinyl-CoA Ligase (EC: 6.2.1.4–5), [Fe]-Hydrogenase (EC: 1.12.7.2), AAT: ATP/ADP Transporter.

Acetyl-CoA wird von der Acetat-Succinat-CoA Transferase (ASCT) auf Succinat übertragen, wobei Acetat und Succinyl-CoA entstehen. Letzteres ist das Substrat der Substratkettenphosphorylierung die ATP produziert und von der SCS durchgeführt wird (Abschnitt 6.5). ATP kann dann durch einen ATP/ADP Transporter ins Cytosol exportiert werden (Hackstein et al., 1999; Müller, 1993; Voncken et al., 2002). Der Energiestoffwechsel der Hydrogenosomen von *N. frontalis* ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

### 3.5.1 Fermentative Formiat Produktion

Der Pyruvat-Stoffwechsel in den Hydrogenosomen von *N. frontalis* erfordert keine Redox-Chemie wie es beispielsweise bei aeroben Mitochondrien durch die Pyruvat Dehydrogenase oder in den Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* durch

die Pyruvat-Ferredoxin Oxidoreduktase der Fall ist. In *N. frontalis* wird die Dissimilation von Pyruvat zu Formiat durch das Enzym Pyruvat-Formiat Lyase (Syn. Formiat C-Acetyltransferase, PFL, EC: 2.3.1.54) durchgeführt.

Das Enzym PFL in *E. coli* ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 85 kDa pro Untereinheit. PFL setzt Pyruvat und Coenzym A (CoA) mittels homolytischer Spaltung zu Formiat und Acetyl-CoA um. Der Reaktionsmechanismus benötigt ein Glycinradikal und zwei konservierte Cystein-Reste im aktiven Zentrum des Enzyms (Becker et al., 1999). An der Position des Glycins befindet sich ein über viele Organismengruppen konserviertes Pentapeptid (Sawers und Watson, 1998). Die Produktion von Formiat im Zuge der heterotrophen ATP-Synthese ist in Eukaryoten bei den Grünalgen (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorogonium elongatum* und *Chlorella fusca*) und den anaeroben Pilzen bekannt (Atteia et al., 2006; Bauchop, 1989; Kreuzberg, 1984).

Nur vier weitere Enzyme mit einem ähnlichen, auf ein Glycinradikal angewiesenen, Reaktionsmechanismus sind derzeit aus anaeroben und fakultativ anaeroben Prokaryoten bekannt: Die Benzylsuccinat Synthase (BSS) aus den beiden  $\beta$ -Proteobakterien *Thauera aromatica* und *Azoarcus* sp. (Krieger et al., 2001; Leuthner et al., 1998), die p-Hydroxyphenylacetat Decarboxylase (HPAD) in *Chlostridium difficile* (Selmer und Andrei, 2001), die Vitamin B12 unabhängige Glycerin Dehydratase in *Chlostridium butyricum* (Raynaud et al., 2003) und die anaerobe Klasse III Ribonukleotid Reduktase (ARNR) in vielen anaeroben Eubakterien und Archaeobakterien (Reichard, 2002).

Die Enzyme BSS und HPAD haben eine Sequenzähnlichkeit zu anderen PFLs anderer Organismen (Krieger et al., 2001; Leuthner et al., 1998). ARNR hat ebenfalls das konservierte Pentapeptid an der Position des Glycinradikals und benutzt den gleichen Mechanismus, um das Radikal in die Peptidkette einzufügen, hat aber sonst wenig Sequenzähnlichkeit zur PFL (Sawers und Watson, 1998). Alle anderen Enzyme (außer PFL), die den Glycinradikal-Mechanismus verwenden, haben – im Gegensatz zur PFL – nur einen der zwei bei PFL konservierten und in der Peptidkette nebeneinander liegenden Cystein-Reste (Leuthner et al., 1998; Raynaud et al., 2003; Selmer und Andrei, 2001).

Die Pyruvat-Formiat Lyase wird in der inaktiven Form – ohne Radikal – synthetisiert. Das freie Radikal wird posttranslational durch ein spezielles aktivierendes Enzym, die PFL-Aktivase (PFL-AE, EC: 1.97.1.4), eingefügt. PFL-AE besitzt ein [4Fe-4S] Cluster im aktiven Zentrum und verwendet S-Adenosylmethionin (SAM) und reduziertes Flavodoxin als Cofaktoren, um ein permanentes Glycinradikal in

der aktivierten PFL zu erzeugen (Broderick et al., 1997; Frey et al., 1994; Külzer et al., 1998). Der gleiche Mechanismus sowie ein spezifisches aktivierendes Enzym wird benutzt, um ARNR zu aktivieren (Reichard, 2002).

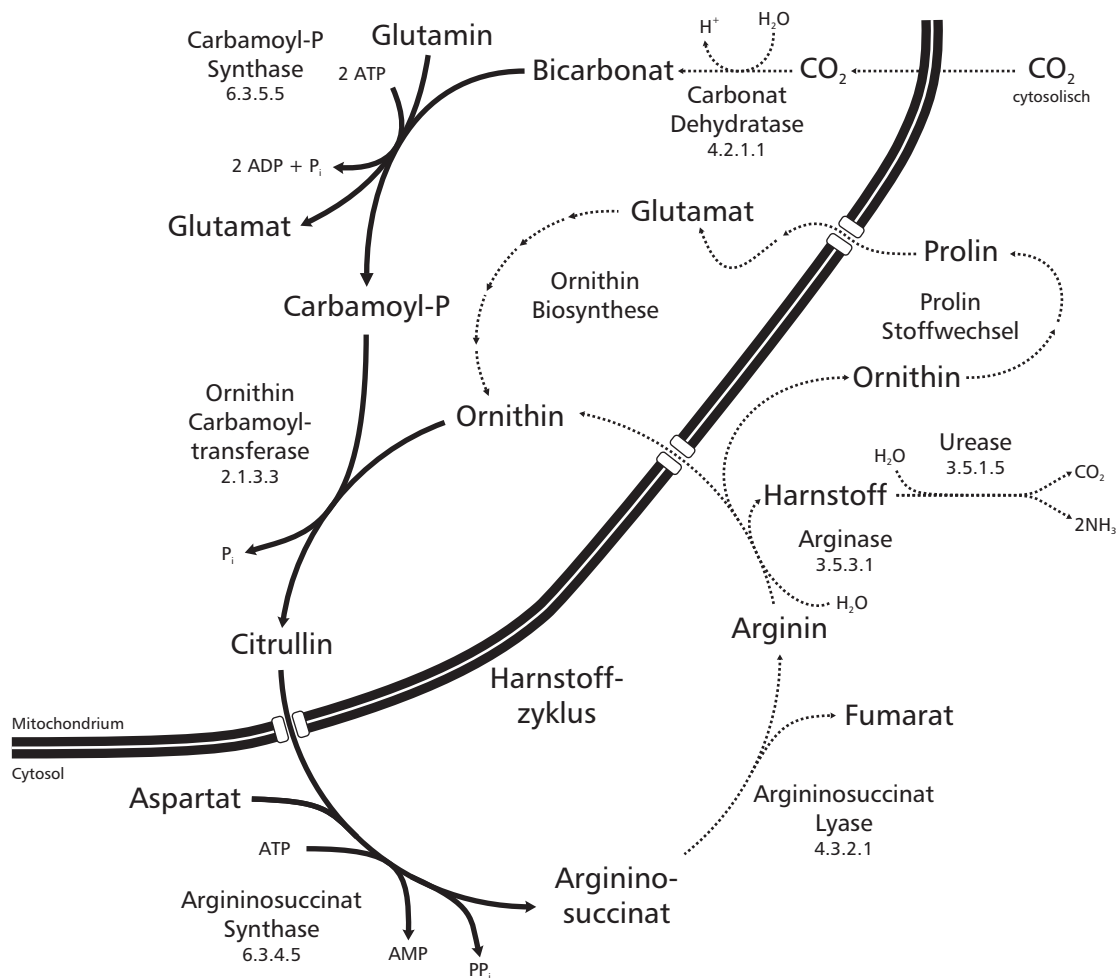
PFL ist in seiner aktiven Form durch das freie Radikal sehr empfindlich gegenüber Sauerstoff (Gauld und Eriksson, 2000). Die Anwesenheit von Sauerstoff führt zur irreversiblen Spaltung des Enzyms. Eine multifunktionale Alkohol Dehydrogenase (AdhE) entfernt das Radikal unter aeroben Bedingungen, inaktiviert so das Protein und schützt es gleichzeitig vor der Spaltung (Kessler et al., 1992).

Aktivitäten der Enzyme PFL und PFL-AE konnten in vielen anaeroben und fakultativ anaeroben Prokaryoten gemessen werden (Abbe et al., 1982; Alexeeva et al., 2000; Melchiorson et al., 2000; Thauer et al., 1972; Yamamoto et al., 2000). In *E. coli* sind drei weitere Gene mit hoher Sequenzidentität (Sequenzähnlichkeit) zu *pfl* bekannt: *tdcE* mit 79 % Sequenzidentität (88 % Sequenzähnlichkeit) kodiert für eine 2-Ketobutyrat-Formiat Lyase, die auch PFL-Aktivität zeigt. Die Gene *pflD* und *f810* zeigen 23 % und 26 % Sequenzidentität zu *pfl* (41 % und 44 % Sequenzähnlichkeit), aber den entsprechenden Genprodukten fehlt – wie ARNR, BSS und HPAD – eines der nebeneinanderliegenden Cysteine im aktiven Zentrum. Die Enzyme haben daher vermutlich andere Funktionen als die PFL (Sawers und Watson, 1998).

Die Enzyme PFL und das aktivierende Enzym PFL-AE sind bei Prokaryoten weit verbreitet, aber innerhalb der Eukaryoten nur selten zu finden. PFL-Aktivität ist im Cytosol und in den Hydrogenosomen der Pilze *Piromyces* sp. und *Neocallimastix* sp. nachgewiesen worden (Akhmanova et al., 1999). PFL ist ebenfalls an der anaeroben Fermentation von Stärke in den Mitochondrien und Chloroplasten von Grünalgen beteiligt (Kreuzberg, 1984, 1985; Kreuzberg et al., 1987). Ein eukaryotisches PFL aktivierendes Enzym war bisher nicht bekannt.

### 3.5.2 Arginin-Stoffwechsel

Die Arginin-Biosynthese in Pilzen umfasst – wie in den meisten Eukaryoten – enzymatische Umsetzungen sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien (Davis, 1986). Das Enzym Ornithin Carbamoyltransferase (OTC) kondensiert im Mitochondrium Carbamoylphosphat und Ornithin zu Citrullin. Carbamoylphosphat wird – ebenfalls im Mitochondrium – von dem Enzym Carbamoylphosphat Synthase aus Bicarbonat, Glutamin und Phosphat in Anwesenheit von N-Acetylglutamat gebildet. Ornithin wird von Glutamat ausgehend im Mitochondrium synthetisiert



**Abbildung 3.5:** Der Arginin-Stoffwechsel in Pilzen (Davis, 1986). Die hintereinander geschalteten Reaktionen der Enzyme Ornithin Carbamoyltransferase, Argininosuccinat Synthase, Argininosuccinat Lyase und Arginase entsprechen denen des Harnstoffzyklus. Die mit durchgängigen Pfeilen dargestellten Enzyme sind durch die EST-Sequenzierung, bzw. durch die Proteomanalyse in *Neocallimastix frontalis* identifiziert worden.

und der Kondensationsreaktion zugeführt, bei der Citrullin produziert wird. Citrullin wird aus dem Mitochondrium exportiert und von der Argininosuccinat Synthase mit Aspartat zu Argininosuccinat kondensiert. Letztlich spaltet das Enzym Argininosuccinat Lyase Argininosuccinat zu Arginin und Fumarat. In einem katabolischen Pfad wird das entstandene Arginin von der Arginase zu Harnstoff und Ornithin hydrolysiert. Ornithin kann in den Prolin-Stoffwechsel eingehen oder in das Mitochondrium transportiert werden und dort mit Carbamoylphosphat zu Citrullin reagieren (Abbildung 3.5). Die einzige bekannte Abweichung von der Kompartimentierung des anabolischen Teils des Arginin-Metabolismus ist in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zu finden (Davis, 1986).



Das Enzym OTC ist auch aus anderen Protisten bekannt, die Hydrogenosomen besitzen. Der Flagellat *Trichomonas vaginalis* kann kein Arginin produzieren, da die Enzyme Argininosuccinat Synthase und Argininosuccinat Lyase nicht vorhanden sind. OTC wird im ATP-produzierenden Arginin-Dihydrolase-Weg im Cytosol benutzt (Linstead und Cranshaw, 1983). Diese bakterientypische Fermentation von Arginin ist auch in den Diplomonaden *Hexaminta inflata* (Biagini et al., 2003) und *Giardia intestinalis* (Schofield et al., 1992) gefunden worden.

Im Zuge der EST-Sequenzierung von *Neocallimastix frontalis* wurde eine für OTC kodierende cDNA gefunden, was die Frage aufwarf, ob das Genprodukt in der – wie es für Pilze typisch wäre – kompartimentierten Arginin-Biosynthese beteiligt ist, oder – wie bei anderen Amöbentriaten – als katabolisches Enzym im Arginin-Dihydrolase-Weg zur ATP-Synthese beiträgt.

### 3.6 Ziele der Arbeit

Die Hydrogenosomen sind in Bezug auf ihre Entdeckung ein relativ junges Organell. Lindmark und Müller (1973) beschrieben das Organell für den Flagellaten *Tritrichomonas foetus* und 13 Jahre später Yarlett et al. (1986) für *N. frontalis*. Bis heute sind noch nicht alle Eigenschaften der Hydrogenosomen aufgeklärt, aber es ist bekannt, daß die Organellen nicht in allen Organismen die gleiche Biochemie betreiben (Müller, 1993).

Gegenstand des Projektes ist es, einzigartige Merkmale der Hydrogenosomen eines anaeroben Pilzes, im Vergleich mit anderen Arten, zu finden. Anhand der Proteomanalyse der Hydrogenosomen von *N. frontalis* sollte der Bestand an Enzymen in diesem Organell erfasst werden, um Aussagen über den Metabolismus der Hydrogenosomen treffen zu können.

Dazu dient die Annotation von Sequenzen von Proteinspots aus einer hydrogenosomalen Proteomanalyse anhand einer zu erstellenden EST-Datenbank. Mit Hilfe von neu identifizierten Enzymen können durch phylogenetische Untersuchungen die Verwandtschaftsverhältnisse geklärt werden. Ferner kann die Herkunft schon aus Mitochondrien bekannter Enzyme ermittelt werden.

Mit den Ergebnissen des Projektes kann das Verständnis um die Evolution der Hydrogenosomen erweitert und die Diversität der Organellen verschiedener Organismengruppen verdeutlicht werden.



## 4 Material und Methoden

---

### 4.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von den Firmen Arcos, Bio-Rad, Fluka, GE Healthcare, GibcoBRL, Riedel-de Haën, Sigma und VWR bezogen. Radiochemikalien wurden von der Firma Hartmann Analytik geliefert.

### 4.2 Reagenzsätze

mRNA Purification Kit	Stratagene
TimeSaver™ cDNA Synthesis Kit	GE Healthcare
Lambda ZAP® II Predigested <i>Eco</i> RI/CIAP-Treated Vector Kit	Stratagene
Gigapack® III Gold Packaging Extract	Stratagene
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Jetstar Plasmid 2.0 Maxi Kit	Genomed
Montage™ Plasmid Miniprep <sub>96</sub> Kit	Millipore
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
Thermo Sequenase DYEnamic Direct cycle sequencing Kit	GE Healthcare
CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit	Fermentas
BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate (POD)	Roche Applied Science
2-D Clean-Up Kit	GE Healthcare

### 4.3 Enzyme

Klenow Fragment	MBI Fermentas
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, NEB
T4 DNA Ligase	GE Healthcare
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Eppendorf (Qiagen)

### 4.4 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert. Oligonukleotide für die Kontroll-PCR von Fragmenten im pBluescript<sup>®</sup> SK(-) Vektor:

BM100: 5' -GAA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC-3'

BM101: 5' -GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'

Primer zur Sequenzierung von Fragmenten im pBluescript<sup>®</sup> SK(-) Vektor:

M13(24)For: 5' -IRD700-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'

M13(24)Rev: 5' -IRD800-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3'

Oligonukleotide für die Sequenzierung der PFL mit »Primer-Walking«. PFL1\_For: Nukleotide 816 bis 840 in der Sequenz nf\_0169f; PFL1\_Rev: Nukleotide 666 bis 691 in der Sequenz nf\_0169r.

PFL1\_For: 5' -IRD700-GTT GCT GAC CAA GTT AAG GCT CTT A-3'

PFL1\_Rev: 5' -IRD800-GAT ACC ATC CAT ACA AGA ATC GTA GT-3'

### 4.5 Vektoren

Zur Klonierung der cDNA-Bibliothek wurde der Lambda ZAP<sup>®</sup> II Vektor der Firma Stratagene verwendet. Als Plasmidvektor kam der Vektor pBluescript<sup>®</sup> SK(-) zum Einsatz (Stratagene).

### 4.6 Kulturen

#### 4.6.1 *Neocallimastix frontalis*

*Neocallimastix frontalis* Stamm SR4 wurde freundlicherweise von Jay Yanke vom »Agriculture and Agri-Food Canada Lethbridge Research Center« zur Verfügung gestellt.

#### 4.6.2 *Escherichia coli*

Es wurden die Stämme SOLR™ und XL1-Blue MRF' der Firma Stratagene für Klonierungen verwendet.

#### 4.6.3 Anzucht der Kulturen

##### 4.6.3.1 *Neocallimastix frontalis*

Die Pilzkulturen wurden im definiertem Medium M2 (Teunissen et al., 1991) angezogen. Die Anzucht erfolgte in einer sauerstofffreien Atmosphäre aus 80 Teilen Stickstoff und 20 Teilen Kohlendioxid in einem Volumen von jeweils 80 ml bzw. 350 ml. Dabei enthielten 950 ml Medium: 150 ml Lösung A; 150 ml Lösung B; 10 ml Spurenelemente; 10 ml Hemin; 1 ml Resazurin (0,1 % [w/v]); 0,95 ml Vitamine; 5 g Glukose; 1 g Cystein-HCl; 6 g NaHCO<sub>3</sub>. Das Medium wurde in Flaschen à 80 ml (100 ml Flaschenvolumen) oder 350 ml (500 ml Flaschenvolumen) aliquotiert und dann mit einem Gasgemisch aus 80 Teilen N<sub>2</sub> und 20 Teilen CO<sub>2</sub> für fünf Minuten begast. Die Gefäße wurden luftdicht verschlossen und für 20 Minuten evakuiert. Anschließend wurden die Flaschen erneut wie oben begast. Das Medium wurde bei 115 °C für 15 Minuten im Dampfdruckautoklaven sterilisiert.

**Zusammensetzung der Stammlösungen:** Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit vollentsalztem Wasser angesetzt. Die angegebenen Mengen werden für jeweils einen Liter Endvolumen benötigt.

##### Lösung A:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3 g
NaCl	6 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1,2 g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,8 g

##### Lösung B:

K <sub>2</sub> HPO · 3 H <sub>2</sub> O	3,9 g
---	-------

##### Hemin:

In 10 ml Ethanol 0,1 g Hemin lösen.  
Mit 0,05 M NaOH auffüllen.

##### Spurenelemente in 0,2 M HCl:

MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	250 mg
NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	250 mg
NaMoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	250 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	250 mg
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	200 mg
CoCl · 6 H <sub>2</sub> O	50 mg
NaVO · 4 H <sub>2</sub> O	50 mg
SeO <sub>2</sub>	50 mg
ZnCl <sub>2</sub>	25 mg
CuCl · 2 H <sub>2</sub> O	25 mg

<b>Vitamine:</b>		Folsäure	2 mg
Thiamin-HCl	5 mg	Cyanocobalamin	1 mg
Riboflavin	5 mg	Biotin	1 mg
Ca-Panthotenat	5 mg	Pyridoxin-HCl	10 mg
Nikotinsäure	5 mg	p-Aminobenzoensäure	5 mg

Die Kulturen wurden nach drei bis vier Tagen in 39 °C warmes Medium überimpft. In 350 ml wurden 10 ml Kulturbrühe überführt, 80 ml Medium wurden mit 2,5 ml Kulturbrühe inokuliert.

#### 4.6.3.2 *Escherichia coli*

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme erfolgte nach den Protokollen der Firma Stratagene (Lambda ZAP<sup>®</sup> II Predigested *Eco* RI/CIAP-Treated Vector Kit) zur Transfektion und zur Vermehrung der Lambda-Phagen. Für alle anderen Arbeiten wurden die Standardprotokolle nach Sambrook et al. (1989) verwendet:

- Herstellung des LB-Kulturmediums und
- Anzucht von Bakterienstämmen auf Fest- und Flüssigmedien.
- Zur Transformationskontrolle wurden die *E. coli*-Zellen auf LB- Agarplatten mit Ampicillin (0,1 mg/ml), X-GAL (0,1 mM) und IPTG (0,2 mM) angezogen.

#### 4.6.4 Isolation von Hydrogenosomen aus *Neocallimastix frontalis*

Alle verwendeten Geräte und Lösungen wurden auf Eis vorgekühlt, alle Zentrifugationsläufe wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Hydrogenosomen wurden aus 4,2 l vier Tage alter Kultur gewonnen. Die Kultur war auf zwölf 500 ml-Schott-Flaschen zu je 350 ml verteilt. Das Myzel wurde durch einen Filter abgesaugt und in 250 ml SMB-Puffer (250 mM Saccharose; 10 mM MOPS pH 7,2; 10 mM 2-Mercaptoethanol) gewaschen. Nach erneutem Filtrieren wurden die Zellen in 10 ml SMDI-Puffer (250 mM Saccharose; 10 mM MOPS pH 7,2; 50 µg/ml TLCK; 10 µg/ml Leupeptin; 10 mM DTT) mit 1 mg/ml Lysozym (183 000 units/mg, Serva) aufgenommen. Für den Zellaufschluß wurde das Gewebe zehn Minuten vorsichtig bei 4 °C gemörsert. Nach Zugabe von weiteren 5 ml SMDI-Puffer wurde das Gewebe in ein Zentrifugegefäß überführt und fünf Minuten bei 700 g sedimentiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand bei 3000 g ein weiteres mal zentrifugiert.

Um eine cytosolische Fraktion zu erhalten, wurde ein Teil des Überstandes bei 47 800 g zentrifugiert. Der Rest wurde mit 40 ml Percoll<sup>™</sup> (GE-Healthcare), 8 ml

isotonischer Saccharose (100 mM MOPS pH 7,2; 2,5 M Saccharose), 0,8 ml DTT (1 M), 160  $\mu$ l Leupeptin (5 mg/ml) und 160  $\mu$ l TLCK (25 mg/ml) versetzt und mit H<sub>2</sub>O auf 80 ml aufgefüllt. Der Ansatz wurde auf zwei Beckman-Zentrifugenröhrchen (OptiSeal™, 26 × 87 mm, 36,2 ml) verteilt und in einer Beckmann L8-70 M Ultrazentrifuge bei 30 000 rpm im Rotor VTi 50 (ca. 75 000 g) zentrifugiert. Der Lauf dauerte eine Stunde und 15 Minuten und wurde ohne Bremse gestoppt.

Die entstandene hydrogenosomale Bande wurde mit einer langen Pasteur-Pipette entnommen und im Verhältnis 1 : 10 mit SMDI-Puffer verdünnt. Die Suspension wurde 15 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 20 ml SMDI-Puffer gewaschen und erneut zehn Minuten bei 7500 g zentrifugiert. Die sedimentierten Organellen wurden in 1 ml SMDI-Puffer aufgenommen und auf Eis bei 4 °C aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Organellen bei –80 °C eingefroren. Die Reinheit der hydrogenosomalen Fraktion wurde mittels der enzymatischen Aktivität von Markerenzymen überprüft (Abschnitt 4.8.8).

#### 4.6.5 Elektronenmikroskopie

Die hydrogenosomale Fraktion wurde mit Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) photographiert. Alle Versuche wurden am Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit Frau Marion Nissen durchgeführt. Für die Einbettung in Araldit wurden 3 bis 4 mg Gesamtprotein verwendet. Zur Fixierung wurden die Proben in 5 % [v/v] Glutaraldehyd; 0,1 M Na-Cacodylat pH 7,3 über Nacht inkubiert. Es wurde fünf mal zehn Minuten in 0,1 M Na-Cacodylat pH 7,3 gewaschen. Durch Zentrifugation wurde die Flüssigkeit von der Probe weitgehend entfernt und diese in 3,5 % [w/v] Agar mit niedrigem Schmelzpunkt eingebracht.

Die Osmierung der Proben erfolgte durch eine zweistündige Inkubation in 2 % [w/v] OsO<sub>4</sub>; 0,1 M Na-Cacodylat pH 7,3; 0,8 % [w/v] Kaliumhexacyanoferrat III. Anschließend wurde erneut wie oben gewaschen. Die Probe wurde in einer Acetonreihe entwässert: jeweils 15 Minuten in 50 % [v/v], 70 % [v/v], 80 % [v/v], 90 % [v/v], 96 % [v/v] und dreimal 15 Minuten in 100 % [v/v] Aceton (absolutiert).

Hinterher erfolgt die Infiltration mit Araldit (49 % [v/v] Araldite® CY 212; 49 % [v/v] Araldite® Hardener HY 964; 2 % [v/v] Araldite® Accelerator DY 964), wobei das Aceton schrittweise durch Araldit ersetzt wird: Zunächst wurden die Proben für zwei Stunden in einem Mischungsverhältnis von 1 : 3 (Araldit zu Aceton) inkubiert, dann zwei Stunden im Verhältnis 1 : 1. In einem 3 : 1 Verhältnis wurden

über Nacht und schließlich drei Stunden in reinem Araldit weitere Inkubationen durchgeführt. Die Endeinbettung erfolgte durch Inkubationen bei 45 °C über Nacht und bei 70 °C für drei Tage. Ultradünnschnitte von 70 bis 80 nm wurden am Mikrotom Ultracut E der Firma Reichert-Jung durchgeführt.

Die Schnitte wurden mit Uranylacetat (Stempak und Ward, 1964; Strugger, 1956) und Bleicitrat doppelt kontrastiert. Die Proben wurden in 50 % [v/v] Ethanol gewaschen und dann 20 Minuten in 5%igem [v/v] Uranylacetat im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal mit 50%igem [v/v] Ethanol und abschließend mit Wasser gewaschen. Die Bleicitratkontrastierung wurde nach Reynolds (1963) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden am Transmissions-Elektronenmikroskop CEM 902 der Firma Zeiss erstellt.

### 4.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Sofern nicht anders angegeben wurden die Standardprotokolle nach Sambrook et al. (1989) verwendet. Folgende Methoden wurden eingesetzt:

#### Präparation, Reinigung und Analyse

- Mini- und Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* nach den Herstellerangaben von Millipore (Montage™), Macherey-Nagel (Nucleospin®) und Genomed (Jetstar),
- Reinigen und Präzipitieren gelöster Nukleinsäuren durch Phenolextraktion und Isopropanol- oder Ethanol-fällung,
- Photometrische Konzentrationsbestimmung,
- Trennung von Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese.

#### Enzymatische Modifikationen

- Restriktion von DNA,
- Phosphorylieren und Dephosphorylieren von DNA,
- Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4 DNA Ligase,
- Auffüllreaktionen mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA Polymerase.

**Andere Techniken** Arbeiten mit dem Bakteriophagen Lambda ZAP® II nach den Protokollen der Firma Stratagene:

- cDNA-Synthese,
- Verpacken von cDNA (Gigapack® III Gold Verpackungsextrakte),
- Ausplattieren und Amplifizieren von cDNA-Bibliotheken.



#### 4.7.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung wurde die Probe so verdünnt, daß der Meßwert im Bereich von 0,1 OD bis 1,0 OD (optische Dichte) lag. Folgende Vereinfachungen lagen der Berechnung zugrunde:

einzelsträngige RNA:  $1 \text{ OD}_{260} = 33 \mu\text{g/ml}$

einzelsträngige DNA:  $1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$

doppelsträngige DNA:  $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$

Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zusätzlich wurde bei 230 nm (Polysaccharide) und bei 280 nm (Proteine) gemessen, um die Reinheit der Probe zu überprüfen. Optimal ist ein Verhältnis von

$$\text{OD}_{230} : \text{OD}_{260} : \text{OD}_{280} = 1 : 2 : 1$$

#### 4.7.2 Reinigung von polyadenylierter RNA aus *Neocallimastix frontalis*

Polyadenylierte RNA wurde aus isolierter Gesamt-RNA von *N. frontalis* gereinigt. Alle verwendeten Geräte wurden mit einer 0,65%igen [v/v] Natrium-Hypochloritlösung gesäubert. Alle Lösungen wurden mit 10 mg/ml Proteinase K versetzt und in DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt.<sup>1</sup>

Als Ausgangsmaterial dienten 3,4 l vier Tage alter Kultur. Die Myzelien wurden filtriert und sofort in flüssigen Stickstoff überführt. Das gefrorene Gewebe wurde bei 4 °C 30 Minuten gemörsert. Anschließend wurde das Pulver in 100 ml Homogenisierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 9,0; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 30 mM 2-Mercaptoethanol; 0,1 % [w/v] SDS; 20 mg Proteinase K) gegeben. Die Suspension wurde in ein Zentrifugengefäß überführt und zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die Phasentrennung wurde durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 5000 g beschleunigt. Aus der wässrigen Phase wurden die Nukleinsäuren mittels einer Isopropanolfällung gewonnen. Das Präzipitat wurde 20 Minuten bei 16 000 g und 4 °C zentrifugiert und anschließend mit 70%igem [v/v] Ethanol gewaschen. Das Sediment wurde in 10 ml TE-Puffer (mit 100 µg Proteinase K und 30 mM 2-Mercaptoethanol) resuspendiert.

---

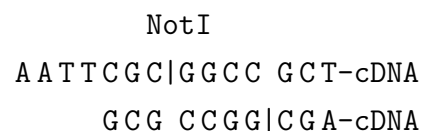
1 DEPC-H<sub>2</sub>O: 1 ml DEPC pro Liter H<sub>2</sub>O; über Nacht rühren und anschließend autoklavieren.

Um die RNA zu fällen, wurde die Lösung mit 2,5 ml LiCl (10 M) versetzt und 4,5 Stunden bei 0 °C inkubiert. Die RNA wurde 30 Minuten bei 16 000 g und 4 °C abzentrifugiert, mit 70%igem [%] Ethanol gewaschen und in 5 ml (mit 50 µg Proteinase K und 30 mM 2-Mercaptoethanol) aufgenommen. Die Reinigung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus der Gesamt-RNA erfolgte mit dem »mRNA Purification Kit« der Firma GE Healthcare nach den Herstellerangaben. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurde die poly(A)<sup>+</sup>-RNA bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### 4.7.3 Herstellung einer cDNA-Bibliothek aus *Neocallimastix frontalis*

Die Synthese von cDNA wurde mit dem »TimeSaver<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit« der Firma GE Healthcare nach dem Prinzip von Gubler und Hoffman (1983) durchgeführt. Für die Erststrangsynthese wurden Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Oligonukleotide, 5 µg poly(A)<sup>+</sup>-RNA (Abschnitt 4.7.2) und 1,5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol) benutzt. Nach der Erststrangsynthese wurden 400 U Superscript II Reverse Transkriptase der Firma Gibco BRL hinzugefügt und die Reaktion 30 Minuten bei 42 °C inkubiert.

Nach der Zweitstrangsynthese erfolgte die Ligation der *EcoRI/NotI*-Adapter. Dadurch entstanden cDNA-Fragmente, mit einem *EcoRI*-Überhang und einer unmittelbar darauffolgenden *NotI*-Schnittstelle:



Nach Phosphorylierung des *EcoRI* Überhangs konnte die cDNA in den Lambda ZAP<sup>®</sup> II Vektor ligiert werden. Hierzu wurden 1 µg Vektor-DNA und 37 ng cDNA (durchschnittliche Fragmentgröße 1,5 kb) verwendet. Vor Zugabe der T4 DNA Ligase wurde der Reaktionsansatz eine Stunde auf Eis inkubiert. Die anschließende Ligation mit 2 U T4 DNA Ligase erfolgte über Nacht bei 4 °C in einem Gesamtvolumen von 5,2 µl.

Die Phagenbank wurde mit dem »Gigapack<sup>®</sup> III Gold Packaging Extract« der Firma Stratagene hergestellt. Alle weiteren Experimente (Einzelklonausschleusung, Massenausschleusung, Amplifizierung der Phagenbank, ...) wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 4.7.4 Kontroll-PCR

Die Insertionsgröße der cDNA-Klone wurde mittels PCR bestimmt. Als Vorlage dienten in Wasser resuspendierte SOLR™-Zellen aus einer Massenausschleusung der Phagenbank (Abschnitt 4.7.3). Eine mit einer Pipettenspitze gepickte Kolonie wurde in 10 µl Wasser resuspendiert und im PCR-Gerät (Primus 96 plus der Firma MWG AG Biotech) aufgeschlossen:

5 min	98 °C	}	2 ×
1 min 30 s	50 °C		
5 min	98 °C		
1 min	45 °C		
3 min	98 °C		
1 min	40 °C		

Der Ansatz wurde mit 10 µl eines 2 × Reaktionsansatzes versetzt, so daß folgende Endkonzentrationen vorlagen: 1 × *Taq*-Puffer mit 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>; je 200 µM dNTPs; 2 µM je Oligonukleotid (BM100, BM101); 1 U *Taq* DNA Polymerase pro Reaktion. Das Endvolumen des Ansatzes betrug 20 µl.

5 min	98 °C	}	30 ×
30 s	98 °C		
30 s	50 °C		
1 min 45 s	72 °C		
5 min	72 °C		

Der Reaktionsansatz wurde nach der Amplifikation mit 2 µl 10 × Ladepuffer versetzt und in einem 1%igen [w/v] Agarosegel getrennt. Es wurden nur diejenigen Klone weiterverwendet, die ein Amplifikat größer als 300 kb lieferten.

#### 4.7.5 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach dem Prinzip von Sanger et al. (1977). Die Reaktionen wurden durch einen RoboAmp® 4200 (MWG AG Biotech) automatisiert pipettiert. Für Sequenzierungen wurden 2 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 20 µl eingesetzt. 16 µl wurden mit jeweils 2 µl (1 µM) der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sequenzieroligonukleotide (Abschnitt 4.4) versetzt. Nach Mischen des Ansatzes wurde dieser in vier neue Ansätze zu je 3 µl aufgeteilt. Zu jedem neuen Ansatz wurden 4 µl des entsprechenden Terminationsmixes (1 : 3 mit H<sub>2</sub>O verdünnt) gegeben. Die Reaktion wurde folgendermaßen durchgeführt:

5 min	98 °C	} 8 ×
1 min	98 °C	
Heizen	bis 65 °C bei 1 °C/min	
Heizen	bis 35 °C bei 0,5 °C/min	
5 min	35 °C	
Kühlen	bis 69 °C bei 1 °C/min	
4 min	69 °C	

Nach der Reaktion wurden die Proben mit 7 µl Ladepuffer (95 % [v/v] Formamid; 10 mM EDTA; 0,1 % [w/v] Fuchsin basisch; 0,01 % [w/v] Bromphenolblau) versetzt und für drei Minuten bei 70 °C denaturiert. Von den Proben wurden 2 µl auf ein Sequenziergel aufgetragen.

Die Sequenziergele hatten eine Dicke von 0,2 mm und eine Länge von 41 cm. Sie wurden aus fertigen Lösungen der Firma »National Diagnostics« hergestellt: 24 ml Sequagel XR; 6 ml Sequagelpuffer und 240 µl 10%iges [w/v] Ammoniumpersulfat. Die Elektrophorese wurde in einem Long Readir 4200 der Firma Li-Cor Biosciences durchgeführt. Die Gele liefen bei einer Spannung von 1700 V, einer Leistung von 45 W, einer Stromstärke von 25 mA und einer Temperatur von 45 °C. Der Laserscanner arbeitete mit einer mittleren (moderate-3) Geschwindigkeit. Die Auswertung wurde mit der Software eSeq (Versionen 1 bis 3), ebenfalls von der Firma Li-Cor Biosciences, durchgeführt.

#### 4.7.6 Ausschluß mehrfach sequenzierter Klone

Um die bei einer cDNA-Bibliothek naturgemäß auftretende Redundanz zu verringern, wurden mittels Kolonie-Hybridisierung (Abschnitt 4.7.6.2) bereits sequenzierte Klone identifiziert. Eine Massenauscheidung einer nicht-amplifizierten Phagenbank (Abschnitt 4.7.3) wurde auf Agarplatten (20 cm × 20 cm) mit einer Dichte von 2000 bis 3000 Klonen pro Platte ausplattiert. Davon wurden 20 000 Klone auf Nylonmembranen (Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>, GE Healthcare) und in Glycerin-Dauerkulturen transferiert.

Die Klone wurden am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln (Deutschland) automatisiert in 384iger Mikrotiterplatten vereinzelt. Die Kulturen wurden in einer 1 : 1 Mischung aus dYT-Medium (16 g/l Bacto-Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; pH 7,5) und HMNF-Puffer (9 g/l Ammoniumsulfat; 440 g/l Glycerin; 47 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 18 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 4,5 g/l tri-Natriumcitrat; 760 mg/l MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O) über Nacht bei 37 °C angezogen und dann bei -80 °C gelagert.

Die Membranen wurden ebenfalls automatisiert hergestellt. Sie wurden luftblasenfrei auf eine LB-Agarplatte gelegt. Darauf wurden die Kolonien aus den Mikrotiterplatten übertragen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Für die Lyse der Kolonien wurden die Membranen mit der Kolonieseite nach oben jeweils sieben Minuten auf in verschiedene Lösungen geränktes Watman 3MM Papier gelegt: Lösung 1: Denaturieren (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl), Lösung 2: Neutralisieren (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl; pH 8,0), Lösung 3: Waschen (2 × SSC<sup>2</sup>). Die getrockneten Membranen wurden dann für drei Minuten zur Fixierung der DNA mit UV-Licht bestrahlt.

#### 4.7.6.1 Auswahl der Vorlagen-Klone

Zunächst wurden nur ribosomale Proteine gesucht. Mit allen zum Zeitpunkt der Durchführung sequenzierten und als ribosomale Proteine annotierten Klonen, wurde eine Assemblierung (Zusammenfügen) mit dem Programm TIGR Assembler 2.0 von TIGR<sup>3</sup> (Abschnitt 4.9.2.1) durchgeführt. Aus jeder entstandenen Gruppe von Sequenzen wurde der längste Klon zur Hybridisierung eingesetzt. Die Insertionen der betreffenden Klone wurden mit einer PCR-Reaktion (Abschnitt 4.7.4) amplifiziert und je fünf Amplifikate zusammen mit dem QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel eluiert und vereinigt. Vektorreste wurden durch eine Restriktion mit *EcoRI* entfernt. Die Markierung mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP wurde mit gerinfügigen Modifikationen nach Feinberg und Vogelstein (1983, 1984) durchgeführt.

Eine zweite Hybridisierung wurde später mit der gesamten cDNA-Bibliothek vorgenommen. Dabei wurde genau so wie für die ribosomalen Proteine verfahren.

#### 4.7.6.2 Kolonie-Hybridisierung

Die Membran aus Abschnitt 4.7.6 wurde für eine Stunde bei 68 °C im Hybridisierungssofen vorhybridisiert. Zu 50 ml Hybridisierungslösung (250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,4; 7% [w/v] SDS; 2,5 mM EDTA) wurden 50 µg mit Ultraschall behandelte pBluescript<sup>®</sup> SK(-) DNA gegeben. Die Hybridisierung wurde in einem Gesamtvolumen von 5 ml Hybridisierungslösung über Nacht bei 68 °C durchgeführt. Es wurden wie bei der Vorhybridisierung 50 µg mit Ultraschall behandelte Plasmid-DNA und die Sonde (Abschnitt 4.7.6.1) hinzugegeben.

---

2 20 × SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0

3 <ftp://ftp.tigr.org/pub/software/assembler/>

Nach der Hybridisierung wurde die Membran mehrmals für jeweils 40 Minuten bei 68 °C mit niedriger werdenden Verdünnungen von 20 × SSC gewaschen: 2,5 ×; 1 ×; 0,5 ×; 0,2 × und 0,1 ×. Jede der Lösungen enthielt 1 % [w/v] SDS, die letzte 0,5 % [w/v] SDS. Anschließend wurde die Membran auf Kodak® X-Omat AR Filmen ohne Verstärkerfolie für zwei, bzw. zwölf Stunden bei Raumtemperatur exponiert.

### 4.7.7 Northern-Hybridisierung

Die zu untersuchende RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in einem Agarosegel (1 % [w/v] Seakem® LE Agarose; 1 × MOPS-Puffer<sup>4</sup>; 10 % [v/v] Formaldehyd) elektrophoretisch getrennt. In jeder Spur wurden 50 µg Gesamt-RNA (Abschnitt 4.7.2) verwendet. Diese wurden in 20 µl TE-Puffer, 34 µl Ladepuffer (57 % [v/v] Formamid; 8 % [v/v] Formaldehyd; 1,4 % [w/v] Ficoll 400; 1,15 × MOPS-Puffer; 0,1 mg/ml Bromphenolblau) und 5 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) aufgenommen. Vom RNA-Größenstandard (Promega) wurden 5 µl in 5 µl TE-Puffer und 8,5 µl Ladepuffer gelöst. Proben und Marker wurden 15 Minuten bei 60 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde mit 1 V/cm über Nacht in 1 × MOPS-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde das Gel 3 × 20 Minuten in H<sub>2</sub>O und 10 mg/ml Proteinase K gewaschen und dann für fünf Minuten in 20 × SSC äquilibriert.

Die RNA wurde durch Kapillartransfer in 20 × SSC nach Sambrook et al. (1989) auf eine Nylonmembran (Hybond™-N<sup>+</sup>, GE Healthcare) übertragen. Die Hybridisierung wurde – sofern nicht anders angegeben – wie in Abschnitt 4.7.6.2 beschrieben durchgeführt. Gewaschen wurde nur bis 0,5 × SSC. Die Membranen wurden anschließend bei –80 °C mit Verstärkerfolie auf Kodak® X-Omat AR Filmen mindestens über Nacht exponiert.

## 4.8 Arbeiten mit Proteinen

### 4.8.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Konzentrationsbestimmungen von proteinhaltigen Proben wurden nach Bradford (1976) durchgeführt. Es wurde 1 ml 1 : 5 mit Wasser verdünntes Bradfordreagenz (Biorad Protein Assay) mit 1 bis 10 µl der Probe versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Extinktion gegen eine Referenz gemessen. Mittels einer

---

<sup>4</sup> 10 × MOPS-Puffer: 200 mM MOPS pH 7,0; 50 mM Natriumacetat pH 6,4; 10 mM EDTA pH 8,0

Kalibrierungsgeraden aus Rinderserumalbumin als Standard, konnte die Proteinkonzentration abgelesen werden.

#### 4.8.2 Elektrophoretische Trennung von Proteinen

Eindimensionale Trennungen von Proteinen wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970) – im Folgenden SDS-PAGE genannt – durchgeführt. Es wurden die Standardprotokolle von Sambrook et al. (1989) für 12%ige Trenngele verwendet. Es wurden vertikale Laufkammern der Firma Owl Separation Systems aus der Serie Emperor Penguin<sup>TM</sup>, oder eine Hoefer-Kammer der Firma GE Healthcare aus der Serie SE600 benutzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen in einem Fünftel Volumen Probenpuffer fünf Minuten bei 98 °C denaturiert.

#### 4.8.3 Western-Transfer

Der Transfer von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran wurde nach Gershoni und Palade (1983) in der Halbtrockenzelle »Multiphor II NovaBlot<sup>TM</sup>« der Firma GE Healthcare durchgeführt. Anode und Kathode wurden mit deionisiertem Wasser angefeuchtet. Sechs Lagen Watmann 3MM Papier, eine Nitrocellulosemembran und das Gel wurden in Western-Transferpuffer (40 mM Glycin; 50 mM Tris-Puffersubstanz; 1 mM SDS; 20 % [v/v] Methanol) getränkt. Auf die Anode wurden in der folgenden Reihenfolge drei Lagen Whatmann 3MM Papier, die Nitrocellulosemembran, das Gel und weitere drei Lagen Whatmann 3MM Papier luftblasenfrei übereinander gelegt. Nach Platzieren der Kathode wurde der Transfer bei einer konstanten Stromstärke von 0,82 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche über 90 Minuten durchgeführt. Zur Kontrolle wurde die Membran nach dem Transfer mit Ponceaus S (0,5 % [w/v] Ponceaus S; 1 % [v/v] Essigsäure) reversibel angefärbt. Die Färbung wurde durch Waschen der Membran mit deionisiertem Wasser entfernt.

#### 4.8.4 Immunodetektion von Proteinen

Zur Sättigung der Nitrocellulosemembran aus Abschnitt 4.8.3 wurde sie eine Stunde in TBST-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1 % [v/v] Tween 20; 5 % [w/v] Magermilchpulver) geschüttelt. Die Hybridisierung mit dem primären Antikörper erfolgte in TBST über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 Minuten in TBST gewaschen. Dann wurde die Membran für

eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Anti-rabbit IgG-POD der Firma Roche Applied Science; 1 : 3000) in TBST inkubiert, danach wurde wieder zweimal für 15 Minuten mit TBST gewaschen.

Die Nachweisreaktion wurde mit dem »BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate (POD)« der Firma Roche Applied Science nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Zum Schluß wurde ein »Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film« der Firma Roche Applied Science für ca. eine Minute über der Membran exponiert.

#### 4.8.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Trennung hydrogenosomaler Proteine aus *N. frontalis* erfolgte mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese nach Görg et al. (1985, 1988). Für die Durchführung wurde ein modifiziertes Protokoll aus Pütz et al. (2005) verwendet.

##### 4.8.5.1 Probenvorbereitung

Das Protokoll zur Probenvorbereitung richtete sich nach dem aufzutrennenden pH-Bereich in der ersten Dimension:

**pH 3 bis 10:** Alle Volumenangaben beziehen sich auf eine Menge von bis zu 1 mg Gesamtprotein (Abschnitt 4.8.1), für größere Mengen wurden die jeweiligen Volumina verdoppelt. Isolierte Hydrogenosomen (Abschnitt 4.6.4) wurden für zwei Minuten bei 16 000 g abzentrifugiert. Die Organellen wurden in 90 µl Lysis-puffer (7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 4 % [w/v] CHAPS; 40 mM Tris-HCl pH 9,0) resuspendiert. Dann wurden 10 µl DTT (10 % [w/v]) zur Reduzierung der Schwefelbrücken hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Cystein-Reste wurden mittels 7,5 µl Acrylamid (Acrylamid PAGE 40 % Solution PlusOne™ der Firma GE Healthcare) und Inkubation für drei Stunden bei Raumtemperatur alkyliert. Anschließend wurden die Proteine mit dem »2-D Clean-Up Kit« der Firma GE Healthcare gefällt. Dabei wurde nach den Herstellerangaben verfahren. Das Präzipitat wurde in 360 µl Rehydratisierungspuffer (7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 4 % [w/v] CHAPS; 0,5 % [v/v] IPG-Puffer (GE Healthcare) pH 3 bis 10) und 36 µl DTT (10 % [w/v]) – auch bei Proteinmengen von mehr als 1 µg – aufgenommen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden 30 Minuten bei 16 000 g abzentrifugiert.



**pH 6 bis 11:** Die isolierten Hydrogenosomen wurden zunächst durch eine Zentrifugation für zwei Minuten bei 16 000 g sedimentiert und dann in 100 µl Lysispuffer (7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 2 % [w/v] CHAPS; 2 % [w/v] ASB-14; 40 mM Tris-HCl pH 9,0) und 1,2 µl DeStreak™ (GE Healthcare) aufgenommen und vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte eine Fällung der Proteine mit dem »2-D Clean-Up Kit« der Firma GE Healthcare nach den Herstellerangaben. Das Präzipitat wurde in 380 µl Rehydratationspuffer (7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 2 % [w/v] CHAPS; 2 % [w/v] ASB-14; 0,5 % [v/v] IPG-Puffer (GE Healthcare) pH 6 bis 11) und 4,56 µl DeStreak™ für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden 30 Minuten bei 16 000 g abzentrifugiert.

#### 4.8.5.2 Erste Dimension

Die isoelektrische Fokussierung wurde am Ettan™ IPGphor™ IEF System der Firma GE Healthcare durchgeführt. Verwendet wurden 18 cm lange Immobiline™ DryStrip Gele pH 3 bis 10 und pH 6 bis 11, ebenfalls von der Firma GE Healthcare. Die Gele quollen sechs Stunden bei 20 °C im Rehydratationspuffer mit einer Stromstärke von 50 µA pro Gel auf. Die eigentliche isoelektrische Fokussierung geschah wie folgt: 6 h bei 30 V (pH 3 bis 10); 4,5 h bei 30 V (pH 6 bis 11); 1 h bei 100 V; 1 h bei 200 V; 1 h bei 500 V; 1 h bei 1000 V (Gradient); 1 h bei 8000 V (Gradient); 5 h bei 8000 V (pH 3 bis 10); 6,5 h bei 8000 V (pH 6 bis 11). Anschließend wurden die Gele bei –80 °C gelagert.

#### 4.8.5.3 Zweite Dimension

Zur Trennung der hydrogenosomalen Proteine nach Molekulargewicht wurde eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Die Gele der ersten Dimension wurden 15 Minuten in 10 ml Äquilibrierungspuffer (6 M Harnstoff; 50 mM Tris-HCl pH 8,8; 30 % [v/v] Glycerin; 2 % [w/v] SDS; 0,002 % [w/v] Bromphenolblau) und 1 % [w/v] DTT geschüttelt, dann weitere 15 Minuten in 10 ml Äquilibrierungspuffer und 2,5 % [w/v] Iodoacetamid. Daraufhin wurden die Gele auf ein 12%iges Polyacrylamidgel (Sambrook et al., 1989) gebracht und mit einer Agaroselösung (0,5 % [w/v] Agarose M; 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % [w/v] SDS; 0,002 % [w/v] Bromphenolblau) bedeckt. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Gelkammer der Firma Owl Separation Systems (Modell P10DS Emperor Penguin™) bei 12 °C durchgeführt. Die Laufbedingungen waren: 20 Minuten bei

einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel, dann 5 h bei konstanten 40 mA pro Gel.

##### 4.8.6 Färben von Polyacrylamidgelen

**Coomassie:** Die Coomassie-Färbung (Heukeshoven und Dernick, 1988; Neuhoff et al., 1985) wurde mit PhastGel<sup>TM</sup> Blue R-350 der Firma GE Healthcare durchgeführt. Eine Tablette wurde in 80 ml Wasser gelöst und mit 120 ml Methanol aufgefüllt. Die Lösung wurde filtriert und bei 4 °C gelagert. Für die Färbung wurde eine 1 : 10 Verdünnung in 10%iger [v/v] Essigsäure hergestellt und auf 90 °C erhitzt. Die Gele wurden für eine Stunde in der Färbelösung geschüttelt und zur Entfärbung des Hintergrundes in 10%ige [v/v] Essigsäure überführt.

**Silber:** Die Silberfärbung wurde nach einem modifizierten Protokoll von Blum et al. (1987) angefertigt. Die Gele wurden eine Stunde fixiert (30 % [v/v] Methanol; 12 % [v/v] Essigsäure), dann zweimal 30 Minuten in Wasser und weitere dreimal 20 Minuten in 30 % [v/v] Ethanol gewaschen. Es folgte eine Vorinkubation in 0,02 % [w/v] Natriumthiosulfat und eine Waschung in Wasser (dreimal 20 Sekunden). Hinterher wurden die Gele in einer Silbernitratlösung imprägniert (30 Minuten in 0,2 % [w/v] AgNO<sub>3</sub>; 0,075 % [v/v] Formaldehyd). Die Gele wurden erneut zweimal fünf Minuten in Wasser gewaschen. Nun wurden die Gele entwickelt (6 % [w/v] Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,0004 % [w/v] Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 0,05 % [v/v] Formaldehyd). Nach Erreichen der notwendigen Intensität wurde die Färbung beendet (50 % [v/v] Methanol; 12 % [v/v] Essigsäure).

##### 4.8.7 Tryptische Spaltung von Proteinen und Proteinsequenzierung

Ausgewählte Proteinspots aus der 2D-Elektrophorese (Abschnitt 4.8.5) wurden nach Jensen et al. (1999) tryptisch gespalten. Für die Reaktion wurde Trypsin der Firma Promega verwendet.

Die Sequenzierungen wurden von Dr. Simone Pütz und PD Dr. Katrin Henze am Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) in Düsseldorf mittels ESI-QqTOF-MS/MS (Applied Biosystems QSTAR<sup>®</sup> XL) durchgeführt (Pütz et al., 2005). Die Auswertung erfolgte mit der Software Analyst<sup>®</sup> QS 1.1 (Applied Biosystems).

#### 4.8.8 Messung enzymatischer Aktivitäten

Die Reinheit isolierter Hydrogenosomen (Abschnitt 4.6.4) wurde mittels der enzymatischen Aktivität von Markerenzymen überprüft. Als hydrogenosomaler Marker diente das decarboxylierende Malat Enzym (Kremer et al., 1989) und als cytosolischer Marker die Malat Dehydrogenase (Stams et al., 1984).

Die enzymatische Aktivität der Enzyme des Arginin-Dihydrolase-Weges und des Harnstoffzyklus wurden von Dipl. Biol. Michael ter Braak im Zuge seiner Diplomarbeit gemessen (ter Braak, 2004). Die Pyruvat-Ferredoxin Oxidoreduktase wurde wie in Williams et al. (1987) beschrieben gemessen.

### 4.9 Bioinformatische Methoden

Sequenzanalysen, wie die Suche nach Restriktionsstellen, Translatieren von DNA, paarweise Sequenzvergleiche und die Berechnung von pI-Werten und Molekulargewichten von Proteinsequenzen wurden mit dem EMBOSS-Paket<sup>5</sup> (Rice et al., 2000) durchgeführt. Homologe Proteine wurden mittels BLAST-Suche (Altschul et al., 1997) gegen die nicht-redundante Proteindatenbank (nr) des NCBI<sup>6</sup> identifiziert. Vorhersagen über Transitpeptide und intrazellulärer Lokalisation von Proteinen wurden versucht mit iPSORT<sup>7</sup> (Bannai et al., 2002), den Programmen des »CBS Prediction Servers«<sup>8</sup> (TargetP (Emanuelsson et al., 2000) und SignalP (Bendtsen et al., 2004; Nielsen et al., 1997)), PSORTII<sup>9</sup> (Nakai und Horton, 1999) und MitoProt<sup>10</sup> (Claros und Vincens, 1996) zu treffen. Sequenzierte Peptide wurden mittels einer TFAST-Suche gegen die erstellte EST-Datenbank von *N. frontalis* (Abschnitt 4.9.3), bzw. einer FAST-Suche gegen die UniProt-Datenbank des European Bioinformatics Institute (EBI)<sup>11</sup> annotiert.

---

5 <http://emboss.sourceforge.net/>

6 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

7 <http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/>

8 <http://www.cbs.dtu.dk/services/>

9 <http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>

10 <http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>

11 <http://www.ebi.ac.uk/>

### 4.9.1 Phylogenetische Analysen

Homologe Sequenzen wurden via BLAST gegen die Datenbanken des NCBI, TIGR<sup>12</sup> und DOE Joint Genome Institute<sup>13</sup> gesucht. Alle Untersuchungen wurden mit Proteinsequenzen durchgeführt. Multiple globale Alignments wurden mit Clustal W (Thompson et al., 1994) erstellt. Vor der phylogenetischen Analyse wurden lückenhafte Positionen aus dem Alignment entfernt. Maximum-Likelihood-Berechnungen wurden mit dem Molphy-Paket (Adachi und Hasegawa, 1996) durchgeführt. Neighbor-Joining-Berechnungen wurden mit dem Phylip-Paket<sup>14</sup> (Felsenstein, 1989) erstellt.

Phylogenetische Netzwerke basierend auf LogDet Distanzen (Lockhart et al., 1994) wurden mit LDDist (Thollesson, 2004) und Neighbor-Net (Bryant und Moulton, 2004) erstellt. Die Graphen wurden mit SplitsTree (Huson, 1998; Huson und Bryant, 2006) visualisiert.

### 4.9.2 Verwaltung der EST-Sequenzen

Die EST-Sequenzen wurden von einer MySQL-Datenbank<sup>15</sup> verwaltet. MySQL gehört zu den relationalen Datenbanken, d. h. die Daten werden in Form von Tabellen gespeichert. Eine Datenbank umfasst eine Menge von Tabellen, die über Schlüssel miteinander verknüpft sind. Der Zugriff erfolgte über das Intranet des Instituts mittels der Skriptsprache PHP, die in HTML integrierbar ist und den Zugriff auf MySQL ermöglicht.

#### 4.9.2.1 Datenvorbereitung

Die Assemblierung (Zusammenfügen) und Annotation der EST-Sequenzen (Abschnitt 4.7.5) erfolgte halb automatisiert über ein System aufeinander aufbauender Perl<sup>16</sup>-Skripte und weiterer Programme (Abbildung 4.1). Zunächst wurden die Sequenzen (die »Rohdaten«, die Ausgabedatei vom Sequenzierer `nf.txt`) durch das Skript »convfasta« in ein einheitliches Format (FastA) überführt:

```
>nf|nf_0565f
AGGACAAATAGATGCTGTAGCAATATAATCTTTTGGACTTTCTCCCTCTTCCCAATGACT
```

---

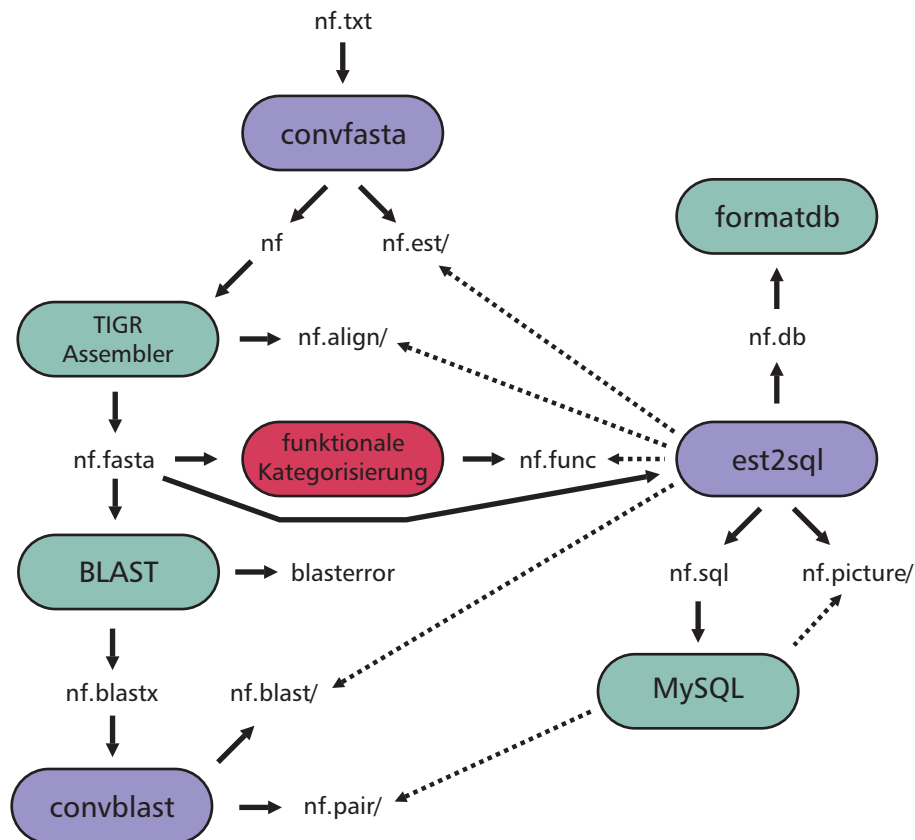
12 <http://www.tigr.org/>

13 <http://www.jgi.doe.gov/>

14 <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>

15 <http://www.mysql.de/>

16 <http://www.perl.org/>



**Abbildung 4.1:** Flußdiagramm zur Verwaltung der EST-Sequenzen. Benutzte Programme stehen in Ovalen. Grün: Frei verfügbare Programme, blau: eigene Perl-Skripte. Die funktionale Kategorisierung (rot) umfasst mehrere Schritte, die im Text (Abschnitt 4.9.2.1) erläutert werden. Durchgezogene Pfeile sind Eingabe- und Ausgabedateien, bzw. Verzeichnisse die für eine Ausgabe erstellt werden (durch ein abschließendes »/« gekennzeichnet). Gepunktete Pfeile sind Informationen die vom jeweiligen Programm bei Bedarf aus der entsprechenden Datei oder dem Verzeichnis gezogen werden.

Der Titel (die ID) einer Sequenz bestand aus zwei durch einen senkrechten Strich getrennten Teilen: Den Namen der Datenbank `nf` und den Namen der Sequenz `nf_0565f` mit der Sequenzierrichtung (`f`: vorwärts, `r`: rückwärts). Es wurde eine alle Sequenzen enthaltende Datei (`nf`) und ein Verzeichnis (`nf.est/`) mit allen Sequenzen in je einer Datei erstellt. Die Ausgabedatei `nf` diente als Eingabe für das Programm TIGR Assembler<sup>17</sup>. Nun wurde eine Assemblierung der Sequenzen mit den voreingestellten Parametern des vom TIGR Assembler mitgelieferten Start-Skriptes »runTA.pl«, durchgeführt. Die Ausgabedatei von TIGR Assembler (`nf.fasta`) enthielt sowohl die Konsensus-Sequenzen zusammengefüger Sequen-

<sup>17</sup> <ftp://ftp.tigr.org/pub/software/assembler/>

zen (Contigs), als auch diejenigen, die sich keiner anderen Sequenz zuordnen ließen (Singletons). Als weitere Ausgabe wurde ein Verzeichnis mit allen erstellten Alignments (nf.align/) produziert, wobei jedes Alignment (Contig) eine eigene Datei erhält.

Zur Annotation wurde die Datei nf.fasta mittels BLAST mit der nicht-redundanten Proteindatenbank (nr) des NCBI verglichen. Die BLAST-Suche erfolgte durch das Programm blastx und ohne Filterung der Daten. Zu jeder Suche wurden 20 Treffer und 20 Alignments in der Datei nf.blastx gespeichert. Die Ausgabe der BLAST-Suche wurde von »confblast« analysiert. Das Ergebnis für jede einzelne Sequenz wurde in eine eigene Datei in das Verzeichnis nf.blast/ und jedes Alignment in eine weitere Datei in das Verzeichnis nf.pair/ geschrieben. Die BLAST-Ergebnisse im Verzeichnis nf.blast/ wurden nach folgendem Schema gespeichert:

```
ID Sequenz-ID
H1 Beschreibung des ersten Treffers aus der BLAST-Tabelle
B1 bit Score des ersten Treffers
E1 E Value des ersten Treffers
:
A1 Dateiname des Alignments für den ersten Treffer
   (im Verzeichnis nf.pair/)
:
```

Zur funktionalen Kategorisierung wurde die Swiss-Prot-Datenbank<sup>18</sup> verwendet. Die Funktion jedes Proteins in Swiss-Prot ist über Schlüsselwörter beschrieben. Anhand dieser Schlüsselwörter wurde jeder Eintrag einer der folgenden Kategorien zugeordnet:

- Speichern und Verarbeiten von Information,
- Zelluläre Prozesse und Signale,
- Stoffwechsel,
- Transport,
- unbekannt.

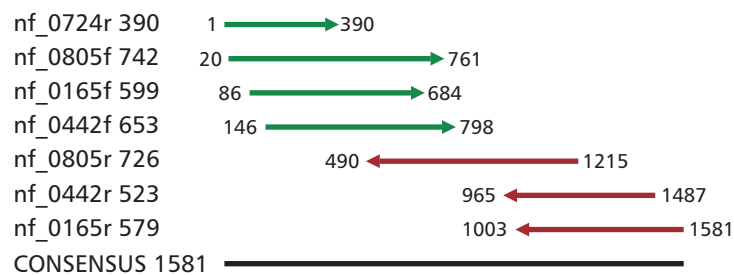
Nun wurde eine BLAST-Suche (blastx) mit den assemblierten Sequenzen (Ausgabe von TIGR Assembler) gegen die Swiss-Prot-Datenbank durchgeführt und jede Sequenz der entsprechenden Kategorie des besten BLAST-Treffers in Swiss-Prot

---

<sup>18</sup> <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>

zugeordnet (Abbildung 5.16). Dabei wurden nur Treffer mit einem Erwartungswert (E Value)  $< 10^{-4}$  berücksichtigt.

Das Skript »est2sql« erstellt schließlich aus allen diesen Informationen eine Eingabedatei für MySQL. Zunächst wird die Datei nf.fasta Sequenz für Sequenz gelesen. »Est2sql« überprüft, ob es sich bei der jeweiligen Sequenz um eine Konsensus-Sequenz oder eine einzelne handelt. Im Falle einer Konsensus-Sequenz wurde zusätzlich ein Übersichtsbild mit allen eingegangenen EST-Sequenzen und deren Position im Alignment generiert (Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2:** Übersicht über eine zusammengehörende Gruppe von Sequenzen (Contig), von TIGR Assembler identifiziert. Rote Sequenzen gingen invers und komplementär in das Alignment ein; grüne wurden nicht verändert. Die Konsensus-Sequenz ist schwarz dargestellt. Die Zahlen an den Pfeilen entsprechen der Position einer Sequenz im Alignment, gemessen an der Konsensus-Sequenz. Die Sequenzlänge wird hinter dem Namen angegeben.

#### 4.9.2.2 Aufbau der MySQL-Datenbank

Die EST-Datenbank von *Neocallimastix frontalis* besteht aus fünf Tabellen. Die Tabelle »assembly« enthält alle Informationen zu den zusammengeführten Sequenzen, inklusive der Ergebnisse der BLAST-Suche. Die Tabelle »est« liefert Daten zu den EST-Sequenzen, in der Tabelle »seq« sind alle Sequenzen gespeichert, die Tabelle »function« ordnet die gruppierten Sequenzen den Kategorien zu und die Tabelle »swissprot« beinhaltet die funktionalen Kategorien:

1. **assembly:** Enthält Informationen über die vereinigten Sequenzen. Die Spalten »member« und »coordinates« sind nur ausgefüllt, wenn die Sequenz kein Singleton, sondern die Konsensus-Sequenz eines Contigs ist.  
**id** Sequenz-ID zur eindeutigen Identifizierung (Primärschlüssel),  
**type** »c« oder »s« für Konsensus oder Singleton,  
**member** Liste aller Sequenzen in einer Gruppe (type = c),

- length** Sequenzlänge,  
**asm** Laufende Nummer (Primärschlüssel),  
**coordinates** Liste der Koordinaten (in Pixeln) der Sequenznamen im entsprechenden Übersichtsbild (type = c),  
**hit1–20** Beschreibung der BLAST-Treffer,  
**bs1–20** entsprechender bit Score,  
**ev1–20** entsprechender E Value.
2. **est:** Enthält Informationen über die EST-Sequenzen. Die Spalten »member«, »rc«, »start« und »end« sind nur ausgefüllt, wenn die Sequenz kein Singleton ist.
- id** Sequenz-ID zur eindeutigen Identifizierung (Primärschlüssel),  
**member** assembly.id, wenn die Sequenz einer Gruppe angehört,  
**length** Sequenzlänge,  
**rc** 1 wenn die Sequenz in der Gruppe invers und komplementär ist, andernfalls 0,  
**start** Startposition der Sequenz im Alignment,  
**end** Endposition der Sequenz im Alignment.
3. **seq:** Enthält alle Sequenzen.
- id** Sequenz-ID zur eindeutigen Identifizierung (Primärschlüssel),  
**sequence** Nukleotid-Sequenz.
4. **function:** Zuordnung zu den funktionalen Kategorien.
- id\_asm** assembly.asm – laufende Nummer aus der Tabelle »assembly«,  
**mcat** Hauptkategorie der funktionalen Kategorisierung,  
**scat** Unterkategorie der funktionalen Kategorisierung.
5. **swissprot:** Die funktionalen Kategorien.
- mcat** ID der Hauptkategorie,  
**scat** ID der Unterkategorie (Primärschlüssel),  
**category** Name der Kategorie.

Das Skript »est2sql« erstellte die Datei nf.sql. Diese enthielt die entsprechenden MySQL-Befehle, um die Tabellen mit Daten zu füllen. Weiterhin wurde das Verzeichnis nf.picture/ erstellt. Hier wurden die Übersichtsgaphiken zu den Contigs gespeichert (Abbildung 4.2). Letztlich wurde die Datei nf.db erzeugt,



die als Eingabe für das Programm formatdb des NCBI diente, um eine BLAST-Datenbank zu erzeugen. Diese Datei war inhaltsgleich mit nf.fasta – der Ausgabe von TIGR Assembler – enthielt in der Sequenzbeschreibung aber zusätzlich den jeweils besten BLAST-Treffer als Beschreibung. Der Sequenzname wurde nach den NCBI-Konventionen<sup>19</sup> umformatiert:

```
>gnl|nf|co_0577 gb|EAT05729.1| UbiE/COQ5 methyltransferase [delta ...  
AGGACAAATAGATGCTGTAGCAATATAATCTTTTGGACTTTCTCCCTCTTCCCAATGACT
```

### 4.9.3 Suchen in der EST-Datenbank

Der Zugang zur EST-Datenbank wurde über eine graphische Benutzeroberfläche ermöglicht. Die Benutzeroberfläche kann mit einem Internet-Browser erreicht werden. Es wurden zwei verschiedene Methoden der Suche zur Verfügung gestellt: Zum einen die Suche nach Sequenznamen und Funktionen und zum anderen die Suche durch Sequenzvergleiche mittels BLAST und FastA.

Die EST-Datenbank ist mit BLAST durchsuchbar. Es wurde die Server-Software des NCBI (wwwBLAST) verwendet. Desweiteren kann die Datenbank mit dem TFastS-Algorithmus durchsucht werden, um sequenzierte Proteine zu identifizieren (Abschnitt 4.8.7).

Die graphische Benutzeroberfläche für die Suche nach Beschreibungen oder Sequenznamen wurde in HTML<sup>20</sup> geschrieben, für die optischen Details wurde CSS<sup>21</sup> verwendet. Der Kontakt zur MySQL-Datenbank wurde mit der Skriptsprache PHP<sup>22</sup> hergestellt.

---

19 <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/documents/formatdb.html>

20 <http://www.w3.org/MarkUp/>

21 <http://www.w3.org/Style/CSS/>

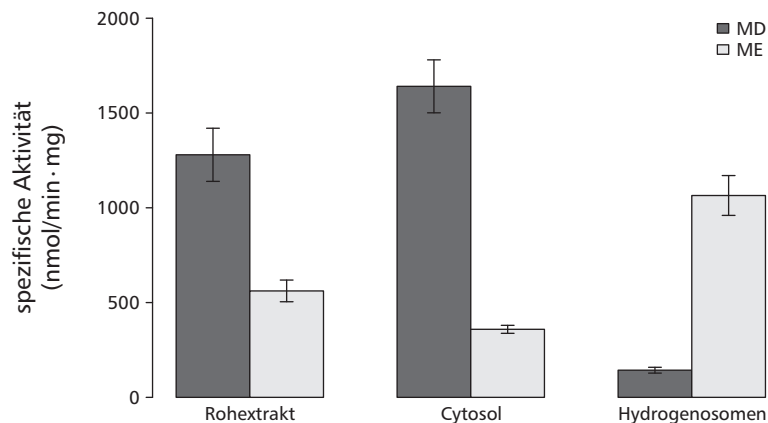
22 <http://www.php.net/>



## 5 Ergebnisse

---

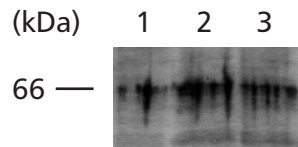
Mittels einer Proteomanalyse der Hydrogenosomen des anaeroben Pilzes *Neocallimastix frontalis* wurden für diese Organellen spezifische Eigenschaften gefunden, die den Hydrogenosomen anderer Organismen fehlen. Dazu wurde eine cDNA-Bibliothek erstellt und die Sequenzen mittels BLAST annotiert. Zur Identifizierung von hydrogenosomal lokalisierten Proteinen wurde eine Proteom-Analyse durchgeführt. Dazu wurden Organellen über einen Percoll-Gradienten gereinigt. Die Reinheit der hydrogenosomalen Fraktion wurde über die enzymatische Aktivität von Markerenzymen (Abbildung 5.1) und über eine Western-Blot Analyse mit einem Hydrogenase-spezifischen Antikörper überprüft (Abbildung 5.2).



**Abbildung 5.1:** Spezifische Aktivitäten (nmol/min · mg) von Markerenzymen in subzellulären Fraktionen von *Neocallimastix frontalis* (MD: Malat Dehydrogenase, ME: Malat Enzym).

Das Malat Enzym<sup>1</sup> (ME, EC: 1.1.1.40) wurde als hydrogenosomales Markerenzym verwendet. Die höchste spezifische Aktivität ist in der Organellenfraktion zu messen. In der cytosolischen Fraktion ist ein geringer Anteil an Aktivität vorhanden, der auf zerstörte Organellen zurückzuführen ist.

<sup>1</sup> Syn. Malat Dehydrogenase (Oxaloacetat decarboxylierend) (NADP<sup>+</sup>)



**Abbildung 5.2:** Western-Blot Analyse subzellulärer Fraktionen von *N. frontalis* mit Antiserum gegen die [Fe]-Hydrogenase von *Chlamydomonas reinhardtii* in einer Verdünnung von 1 : 1000, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Thomas Happe (Florin et al., 2001; Happe et al., 1994). Der Blot zeigt eine Antikörperbindung bei einem Molekulargewicht von 66 kDa. Spur 1: Cytosol, Spur 2: Sediment nach Zentrifugation bei 47 800 g (angereicherte Hydrogenosomen), Spur 3: Hydrogenosomale Fraktion nach einer Reinigung über einen Percoll-Gradienten (Abschnitt 4.6.4).

Die Malat Dehydrogenase (MD, EC: 1.1.1.37) diene als cytosolisches Markenzym und wies die höchste Aktivität in der cytosolischen Fraktion auf. In der hydrogenosomalen Fraktion ist nur eine geringe spezifische Aktivität festzustellen, was auf eine geringe Kontamination der hydrogenosomalen Fraktion schließen lässt (Abbildung 5.1).

Eine Western-Blot Analyse der subzellulären Fraktionen von *N. frontalis* (Abbildung 5.2) detektiert eine Antikörperbindung in allen Fraktionen. Die Signale in der cytosolischen Fraktion sind auf durch die Präparation zerstörte Organellen zurückzuführen. Das stärkste Signal zeigen dennoch die hydrogenosomalen Fraktionen.

## 5.1 Proteomanalyse

Für die Proteom-Analyse wurden ausschließlich Percoll-gereinigte Organellen verwendet. Die Trennung der Proteine erfolgte in der ersten Dimension über eine isoelektrische Fokussierung (pH3 bis 10 oder pH6 bis 11) und in der zweiten Dimension über eine SDS-PAGE. Zufällig ausgewählte Proteinspots wurden sequenziert und über eine (T)FastS-Suche<sup>2</sup> gegen die *N. frontalis*-EST-Datenbank oder gegen die UniProt-Datenbank<sup>3</sup> annotiert. Die Annotationen wurden in zehn verschiedene Klassen eingeteilt. Abbildung 5.3 gibt den Anteil der Spots an den verschiedenen Klassen wieder. Im Folgenden sind die Klassen aufgelistet. Die Zahlen geben die Nummern der Spots wieder, in denen Peptide des entsprechenden Typs gefunden wurden.

<sup>2</sup> <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>

<sup>3</sup> <http://www.expasy.uniprot.org/>

**Hydrogenosomal Stoffwechsel**

- Hydrogenase: 132
- Malat Enzym: 45 51 55 (= 124) 61 62 63 64 74 75 82 (= 109) 85 110 114 125 133 152
- Pyruvat-Formiat Lyase: 96 97 98 127 128 129
- Succinyl-CoA Ligase  $\alpha$ : 28 29 172 173 174 175
- Succinyl-CoA Ligase  $\beta$ : 36 94 120 134 153 155 156 159
- Superoxid Dismutase: 111
- Adenylat Kinase: 180 181
- NADH Dehydrogenase: 177 176
- Hsp70: 20 25 35 190 191
- Carbamoylphosphat Synthase: 192
- Ketolsäure Reduktoisomerase: 48
- Acetyl-CoA Hydrolase: 130 161 162

**Speichern und Verarbeiten von Information**

- 40S Ribosomales Protein: 8 13 31 32 (= 121)
- 60S Ribosomales Protein: 27
- ELF1: 119 135 160 167 168 169
- ELF2: 65 (= 149) 141
- ELF5: 6
- Hsp20: 7 112
- Hsp78: 148
- Hsp90: 136 139
- Guanin Nukleotid bindendes Protein: 54 56
- 26S Proteasom: 26
- Naszierendes Polypeptid assoziierter Komplex  $\alpha$ : 37
- Translational kontrolliertes Tumor Protein Homolog: 5 (= 117)

**Cytoskelett**

- Actin: 39 40 46 60 123
- Tubulin  $\alpha$ : 22
- Tubulin  $\beta$ : 21 24 89

**Glykolyse**

- Hexokinase: 38
- Fruktosebisphosphat Aldolase: 72

- Triosephosphat Isomerase: 87 (= 113) 126
- Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase: 10 12 53 57 81 83 93 154 157 158
- Phosphoglycerat Kinase: 77
- Phosphoglycerat Mutase: 41

#### **Cytosol (sonstiges)**

- Alkohol Dehydrogenase C: 70 71 78 92
- Phosphoenolpyruvat Carboxykinase: 68
- Adenosin Kinase: 44
- Actophorin: 14
- Peroxiredoxin/Glutaredoxin: 84
- vATPase Untereinheit  $\alpha$ : 4

#### **Endoplasmatisches Reticulum**

- Calnexin/Calreticulin: 18 138
- Disulfid Isomerase: 19

#### **Zellkern**

- Serin/Threonin Phosphatase: 58

#### **nicht zu klassifizieren, aber in der EST-Datenbank vorhanden**

- Hypothetisches Protein: 47

#### **nicht zu klassifizieren**

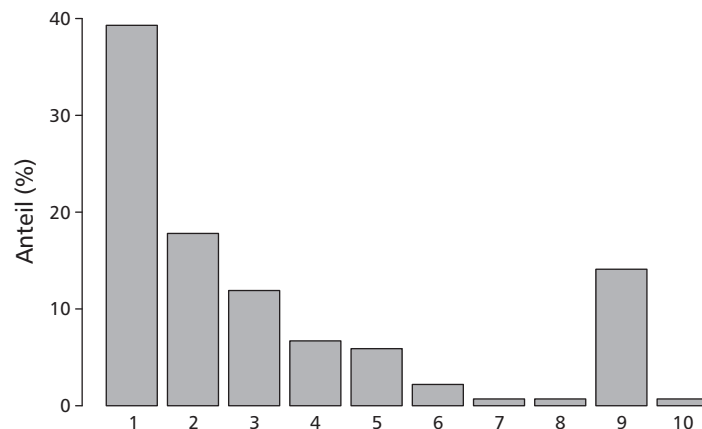
- 2 (= 118) 3 9 11 15 16 17 23 30 33 34 (= 122) 42 49 50 115 116 131 137 140 163

#### **Kontamination**

- Keratin: 1

## **5.2 Proteine aus der Proteomanalyse**

Die Enzyme des hydrogenosomalen Kohlenstoffmetabolismus (Abbildung 3.4) konnten in der Proteomanalyse – bis auf die Acetat-Succinat-CoA Transferase – eindeutig identifiziert werden. Das Malat Enzym (ME, EC: 1.1.1.40) decarboxyliert Malat und produziert dabei Pyruvat. Als Cofaktor wird NADP<sup>+</sup> verwendet (van der Giezen et al., 1997a). Das Enzym hat eine molekulare Masse von 65 kDa und ist eines der abundantesten in der Proteomanalyse. Es sind auch Spots bei 30, 35 und 45 kDa zu finden. Hierbei handelt es sich um Bruchstücke des Enzyms.



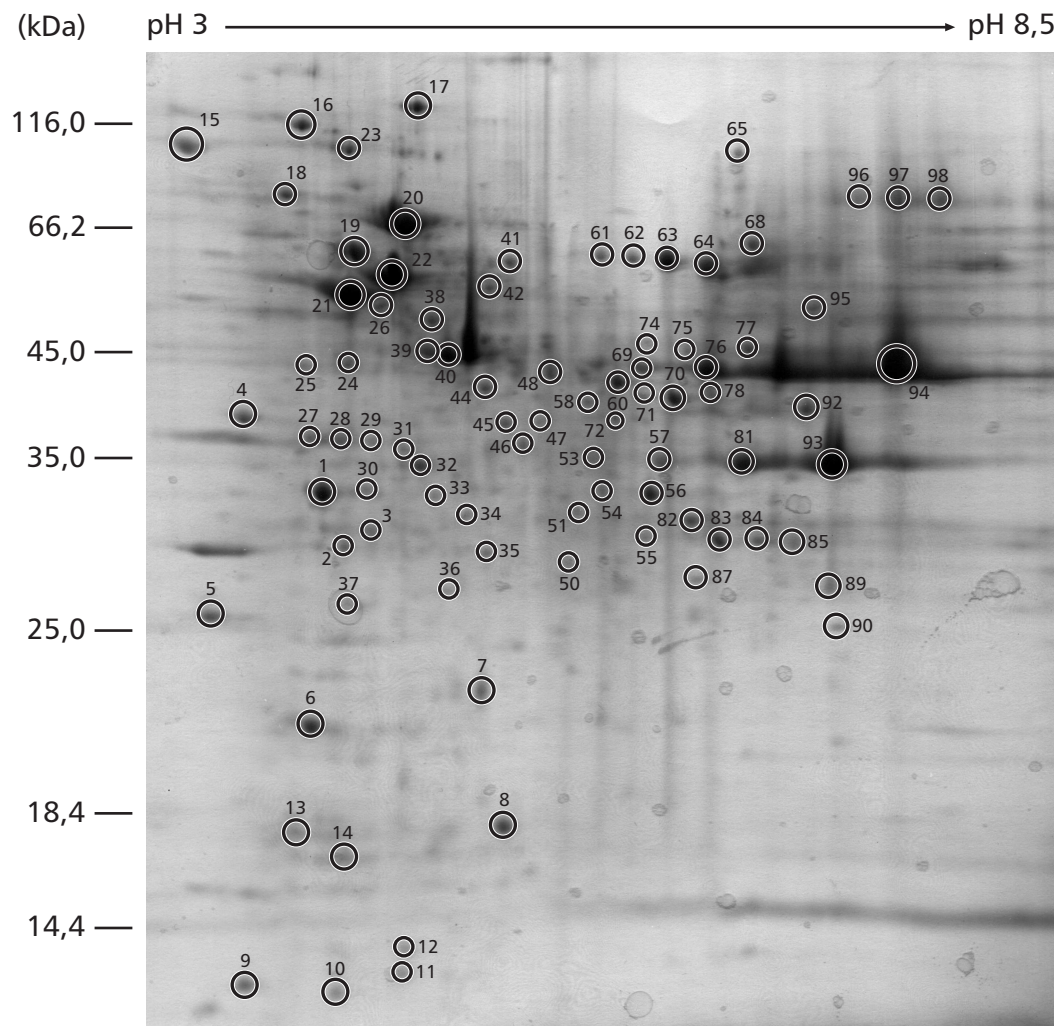
**Abbildung 5.3:** Prozentualer Anteil der Proteine in den Kategorien: 1) Hydrogenosomaler Stoffwechsel, 2) Speichern und Verarbeiten von Information, 3) Glykolyse, 4) Cytoskelett, 5) Cytosol (sonstiges), 6) Endoplasmatisches Retikulum, 7) Zellkern, 8) nicht zu klassifizieren, aber in der EST-Datenbank vorhanden, 9) gar nicht zu klassifizieren und 10) Kontamination.

Die Elektronen aus der ME-Reaktion ( $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ) werden von der Hydrogenase auf Protonen übertragen und molekularer Wasserstoff wird erzeugt. Die Hydrogenase (Abbildung 5.5 Spot 132) hat mit einem Molekulargewicht von 66 kDa die erwartete Größe (Voncken et al., 2002). Auch der isoelektrische Punkt (pI)<sup>4</sup> von pH 8 wird bestätigt.

Das Pyruvat aus der ME-Reaktion wird von der Pyruvat-Formiat Lyase (PFL, EC: 2.3.1.54) zu Acetyl-CoA und Formiat abgebaut. Das Enzym ist bei 81 kDa zu finden (Abschnitt 5.3).

Das einzige am hydrogenosomalen Kohlenstoffmetabolismus beteiligte Enzym, das nicht zweifelsfrei identifiziert werden konnte, ist die Acetat-Succinat-CoA Transferase (ASCT, EC: 2.8.3.-). Das Enzym überträgt den CoA-Rest von Succinyl-CoA auf Succinat und liefert Succinyl-CoA als Substrat für die Succinyl-CoA Ligase. Die ASCT ist bislang nur in den Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* identifiziert worden (van Grinsven et al., 2008). Die Peptide der Spots Nr. 130, 160 und 161 (Abbildung 5.5 und Abbildung 5.6) zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit zur Acetyl-CoA Hydrolase (ACH, EC: 3.1.2.1), einem Enzym mit einem Molekulargewicht von 58 kDa, das in den Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen wurde (Buu et al., 2003). ACH setzt den CoA-Rest von Acetyl-CoA frei und produziert Acetat. ACH ist vermutlich in der Regulation

<sup>4</sup> Errechnet mit pepstats aus dem EMBOSS-Paket.

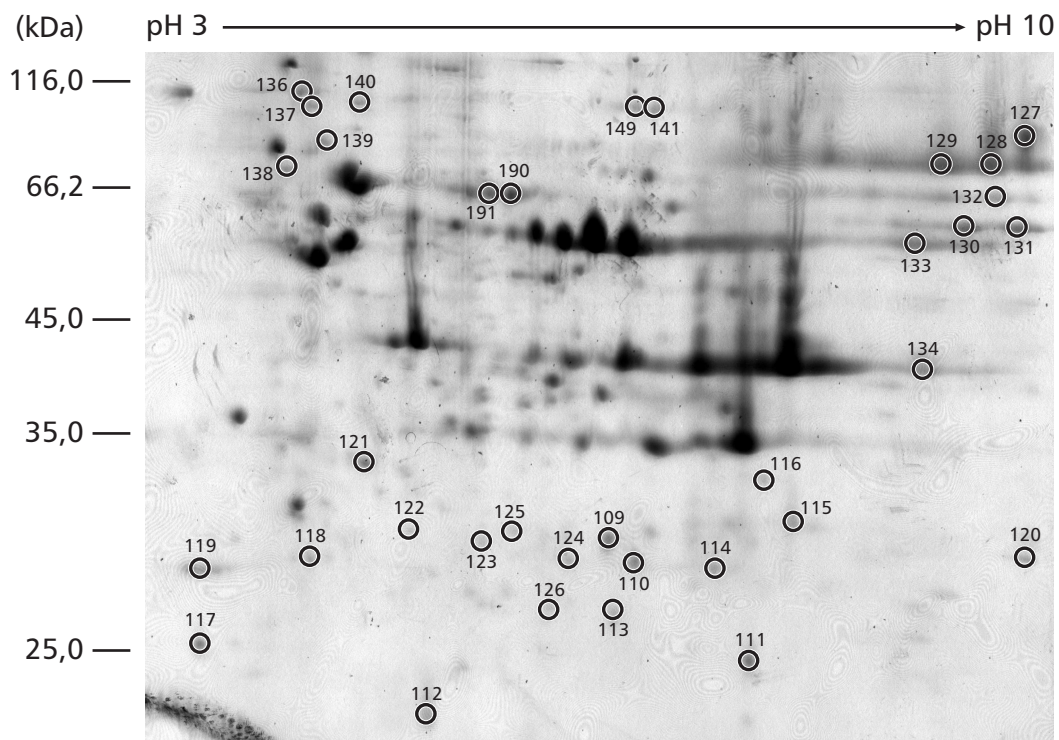


**Abbildung 5.4:** Zweidimensionale Gelelektrophorese der hydrogenosomalen Fraktion aus *Neocallimastix frontalis*. Das Proteom im Bereich von pH 3 bis 8,5. Aufgetragen sind 1,5 mg Gesamtprotein; das Gel ist mit Coomassie gefärbt.

intrazellulärer Acetyl-CoA und CoA-SH Pools involviert und in einigen Geweben von Säugetieren entdeckt worden (Buu et al., 2003).

Die Enzyme Acetyl-CoA Hydrolase und Acetat-Succinat-CoA Transferase weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf (van Grinsven et al., 2008; Söhling und Gottschalk, 1996). Zwei Mutationen im aktiven Zentrum der Hydrolase erzeugen eine effektive Transferase (Witkowski et al., 1994). Das in *Trichomonas vaginalis* identifizierte Enzym (ASCT) hat ein Molekulargewicht von ca. 65 kDa und einen pI von ca. pH 9 (van Grinsven et al., 2008). Die Werte entsprechen denjenigen Proteinspots, die als ADH annotierte Peptide enthalten. Die Annotation als ADH basiert ausschließlich auf Sequenzvergleichen, daher ist es aufgrund der hohen



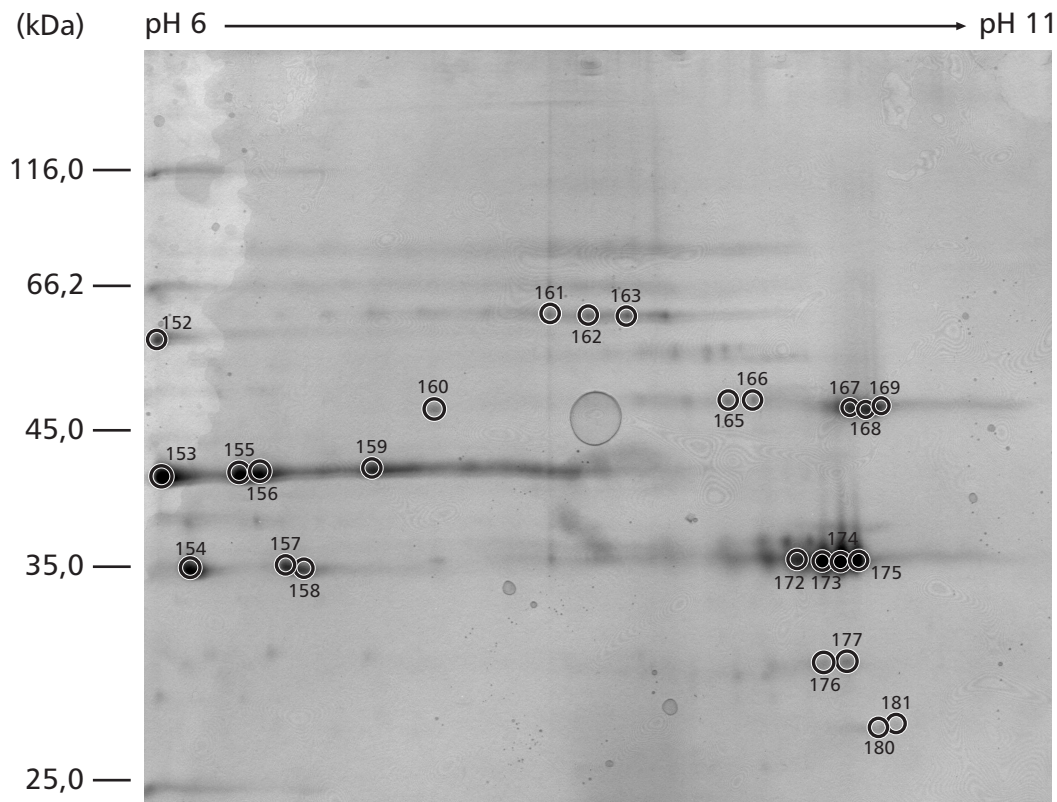


**Abbildung 5.5:** Zweidimensionale Gelelektrophorese der hydrogenosomalen Fraktion aus *Neocallimastix frontalis*. Das Proteom im Bereich von pH 3 bis 10. Aufgetragen sind 2 mg Gesamtprotein; das Gel ist mit Coomassie gefärbt.

Sequenzähnlichkeit nicht möglich, die Peptide dem einen oder anderen Enzym eindeutig zuzuordnen.

Succinyl-CoA wird von der Succinyl-CoA Ligase (SCS, EC: 6.2.1.4–5) zur Substratkettenphosphorylierung verwendet (Abschnitt 5.5). Das vollständige Enzym SCS besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ . SCS  $\alpha$  hat in dem zu *N. frontalis* nahe verwandten Organismus *Neocallimastix patriciarum* eine Größe von 35 kDa (Dacks et al., 2006). Die  $\beta$ -Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 45 kDa (Brondijk et al., 1996).

Die zweitgrößte Gruppe im Proteom wird von Enzymen gestellt, die dem Speichern und Verarbeiten von Information dienen. Hier sind insbesondere an der Proteinbiosynthese beteiligte Enzyme zu finden (Abschnitt 6.2). Dann folgen die Enzyme der Glykolyse und des Cytosols (Abschnitt 5.8 und Abschnitt 6.2). Kleinere Gruppen bieten die Proteine des Endoplasmatischen Retikulums, des Zellkerns und die Kontaminationen. Ein weiterer geringer Anteil an Peptiden ist in der EST-Datenbank als exprimiertes Protein wiederzufinden, kann aber keiner Funktion zugeordnet werden. Etwa 14 % aller analysierten Proteinspots können nicht identifiziert werden (Abschnitt 6.2).



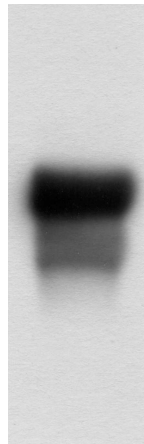
**Abbildung 5.6:** Zweidimensionale Gelelektrophorese der hydrogenosomalen Fraktion aus *Neocallimastix frontalis*. Das Proteom im Bereich von pH 6 bis 10. Aufgetragen sind 1,5 mg Gesamtprotein; das Gel ist mit Coomassie gefärbt.

### 5.3 Die Pyruvat-Formiat Lyase

Die Pyruvat-Formiat Lyase (PFL, EC: 2.3.1.54) ist im Hydrogenosom von *N. frontalis* am Energiestoffwechsel beteiligt und katalysiert die nicht-oxidative Dissimilation von Pyruvat zu Acetyl-CoA, dem Substrat für die Succinyl-CoA Ligase.

#### 5.3.1 cDNA Klone

Für das EST-Projekt sind 1615 unabhängige Klone sequenziert worden. 26 Klone kodieren für die Pyruvat-Formiat Lyase. Der Klon nf\_0169 hat das längste N-terminale Ende. Er entspricht der von Akhmanova et al. (1999) beschriebenen »langen« Form der PFL. Der Klon nf\_0169 enthält ein 2409 bp langes offenes Leseraster für ein nahezu vollständiges PFL-Protein. Es fehlen lediglich drei Aminosäuren am N-Terminus im Vergleich zu der in *Piromyces* sp. identifizierten



**Abbildung 5.7:** Northern-Hybridisierung. Als Sonde diente das offene Leseraster des Klons nf\_0129. Dieser deckt einen 1370 bp langen Bereich am 3'-Ende der *pfl* ab. Die Hybridisierung wurde wie in Abschnitt 4.7.6.2 beschrieben durchgeführt, allerdings wurden, um die Membran abzublocken, 100 ng/ml poly(A)-DNA hinzugegeben. Zur Hybridisierung wurden 175 ng der Insertion von Klon nf\_0129 verwendet.

Peptidsequenz (Abbildung 5.8). Die mRNA-Sequenz der PFL ist bei GenBank<sup>5</sup> unter der Accession-Nummer AY500825 und die Aminosäuresequenz unter der Accession-Nummer AAS06904 veröffentlicht. Die Programme MitoProt, TargetP und PSORTII sagen eine mögliche mitochondriale Transitsequenz voraus, können aber eine Schittstelle des Transitpeptids nicht näher definieren.

Bei keinem der anderen Klone ist ein eindeutiges N-terminales Ende feststellbar, daher kann keine Zuordnung zur »langen« oder »kurzen« Form gemacht werden. Da einige Klone allerdings Sequenzunterschiede aufweisen, ist es wahrscheinlich, daß auch die PFL in *N. frontalis* von einer Genfamilie wie in *Piromyces* sp. kodiert wird (Akhmanova et al., 1999). Die Expression der PFL wird durch eine Northern-

<i>Piromyces</i> sp.	MESLALSNVSVLANTVSVNAVAATKVAGVRMAKPSRA
<i>N. frontalis</i>	---LALSNVSVLANTVSVINAVAATKVAGVRMAKPTRA
<i>E. coli</i>	-----MSELNEKLATAWEGFTKG-----
	.:* ** *. .

**Abbildung 5.8:** Alignment der N-terminalen Region der PFL-Aminosäuresequenzen von *Piromyces* sp. (CAA76352), *N. frontalis* (AAS06904) und *E. coli* (NP\_415423). Die Sequenz von *N. frontalis* zeigt keinen Transkriptionsstart. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zur Sequenz von *Piromyces* sp. ist zu vermuten, daß am N-Terminus drei Aminosäuren fehlen.

5 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

	387		423
Piomyces sp.	ATKVSIDTSSIQYESDALMSARFG-DDYGIACCVSAM		
N. frontalis	ATKVSIDTSSIQYESDALMSARFG-DDYGIACCVSAM		
E. coli	AAKVSIDTSSLQYENDDLMRPDFNDDYAIACCVSPM		
	*:*****:***.* ** . *. ****.*****.*		
	723		759
Piomyces sp.	ENYPNLTIRVSGYAVNFVKLTPQQQKEVIARTFHEKM		
N. frontalis	ENYPNLTIRVSGYAVNFVKLTPAQQKEVIARTFHEKM		
E. coli	EKYPQLTIRVSGYAVRFNSLTKEQQQDVITRFTQSM		
	*:***:*****.* .** **:***:*** :.*		

**Abbildung 5.9:** Alignment der Bereiche des aktiven Zentrums der PFL. Mit »|« markiert wurden die nebeneinanderliegenden Cysteine und das Glycin, welches das freie Radikal im aktiven Zustand des Enzyms trägt. Für das Alignment wurden die selben Sequenzen wie in Abbildung 5.8 verwendet. Die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz von *E. coli*.

Hybridisierung – Transkription – (Abbildung 5.7) und durch die Identifizierung im Proteom der Hydrogenosomen – Translation – (Abbildung 5.4, Spots Nr. 96 bis 98) bestätigt.

Die zwei nebeneinanderliegenden Cystein-Reste und das Glycin des aktiven Zentrums der PFL von *E. coli* (Becker et al., 1999) sind in der Sequenz von *N. frontalis* und *Piomyces* sp. konserviert (Abbildung 5.9).

### 5.3.2 PFL im Proteom der Hydrogenosomen

Das aus der Aminosäuresequenz errechnete<sup>6</sup> Molekulargewicht der PFL beträgt 89 kDa. Die PFL-Spots aus der Proteomanalyse (Abbildung 5.4) sind bei ca. 81 kDa zu finden. Die Differenz ist vermutlich auf die Abspaltung eines N-terminalen Transitpeptids zurückzuführen (Akhmanova et al., 1999). Abbildung 5.10 zeigt die sequenzierten Peptide in der PFL-Sequenz. Der – ebenfalls mit pepstats – errechnete isoelektrische Punkt der PFL liegt bei pH 9,2. In den 2D-Gelen erstreckt sich das Protein über einen Bereich von ca. pH 8 bis 10.

### 5.3.3 Phylogenetische Analyse der PFL-Sequenzen

Die phylogenetische Analyse (Abbildung 6.3) beinhaltet drei Sequenzen von eukaryotischen Organismen: den nahe verwandten Pilzen *N. frontalis* und *Piomyces* sp.

<sup>6</sup> pepstats aus dem EMBOSS-Paket

```

>gi|41400039|gb|AAS06904.1| pyruvate formate lyase [Neocallimastix frontalis]
LALSNVSVLANTVVSINAVAATKVAGVRMAKPTRALHTPAMKTTLKASKKAAVPVMQAKTYATAPVITNDAAAKSEIDVEG
WIKKHYPYEGDGSFLAGPTEKTKKLFKAEEYLAKERANGGLYDVPHTPSTITSHKPGYLDKENEVIYGYQTDVPLKR
AIKPFGGVNMVKNALKAVNVPMDEVEHIFSDYRKTHNTAVFDIYSKEMRAGRSNAIMTGLPDGYGRGRIIGDYRRVALY
GTDRLIAQKEKDKAELQKKQMDEPTMKLIGEVADQVKALKQLTQMAKSYGIDITKPAKNAREATQFVYFGYLGSIKEQDG
AAMSLGRVDAFLDCFFENDLKNGVITESEAQEIIDNLILKLRFARHLRTPPEYNDLFAGDPTWVTMSLGGMGSDGRTLVTK
TSFRVLNNTLYNLGPAPEPNITVLWNKNLPKNFKDFATKVSIDTSSIQYESDALMSARFGDDYGIACCVSAMRIGKDMQFF
GARCNLAKLMLYVLNHHGKDERTGKQVGPDPFGVPEGPIPFDDWWTYDKAMDWIAKLYVNTMNVIIHFCHDQYCYESLQMA
LHDTDVRRLMAFGVAGLSVVADSFSAIKYAKVTPIRDPKTGLTVDFKVEGEFPPKFGNDDDRVDFFARTVTDKLINKLRKT
PTYRGATHTLSILTITSNVVYGKKTGSTPDGRKAGQPFAPGCNPMHGREFSGAVASLSSVAKVNYDSCMDGISNTFSIVP
NTIGKTLQERQGNLSGLLDGYFSKGAHHLNVNVLKRETLEDAMAHPENYPNLTIRVSGYAVNFVKLTPAQKQEVARTFH
EKM

```

**Abbildung 5.10:** In den Spots Nr. 96 bis 98 (Abbildung 5.4) und Nr. 127 bis 129 (Abbildung 5.5) sequenzierte Peptide der PFL.

und der entfernt verwandten Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Weiterhin sind 33 prokaryotische Sequenzen enthalten. Ebenso ist das  $\gamma$ -proteobakterielle Gen *tdcE* – eine 2-Ketobutyrate-Formiat Lyase, die auch PFL-Aktivität aufweist – und die nah verwandten Proteine PFLD von zwei Archaeobakterien, zwei grampositiven Bakterien und drei  $\gamma$ -Proteobakterien, die zwei bekannten BSS-Sequenzen der  $\beta$ -Proteobakterien, eine Glycerin Dehydratase von *C. butyricum* und HPAD von *C. difficile* enthalten. Außer den drei genannten eukaryotischen Sequenzen sind keine weiteren gefunden worden (Gelius-Dietrich und Henze, 2004).

Die verschiedenen Gruppen von Proteinen bilden anhand ihrer Sequenzähnlichkeit zwei ausgeprägte, voneinander getrennte Gruppen: die als funktionale PFLs annotierten und alle anderen (Abbildung 6.3). Diese Anordnung wird dadurch bestätigt, daß den nicht-PFL-Proteinen eines der zwei für funktionale PFLs charakteristischen Cysteine im aktiven Zentrum fehlt (Sawers und Watson, 1998).

## 5.4 Das aktivierende Enzym der PFL

Die PFL-AE (EC: 1.97.1.4) führt das zur Reaktion notwendige freie Glycinradikal in das Enzym ein. Eine Alkohol Dehydrogenase (AdhE) kann das Radikal wieder entfernen und so die PFL vor der Zerstörung durch Sauerstoff schützen.

### 5.4.1 PFL-AE in der EST-Datenbank

In der EST-Datenbank von *N. frontalis* sind drei Klone enthalten, die bei einer BLAST-Suche hohe Ähnlichkeit zu einigen eubakteriellen und archaeobakteriellen Genen aufweisen, die für PFL aktivierende Enzyme (PFL-AE) und ARNR akti-

vierende Enzyme kodieren: die Klone nf\_0008, nf\_1434 und nf\_1953. Der Klon nf\_0008 enthält ein 798 bp langes offenes Leseraster, das für ein 266 Aminosäuren langes Protein kodiert. Das Leseraster enthält drei mögliche Positionen für den Translationsstart. Die mRNA-Sequenz der PFL-AE ist bei GenBank unter der Accession-Nummer AY500826, die Aminosäuresequenz unter der Accession-Nummer AAS06905 publiziert.

Die Identifikation der PFL-AE in *N. frontalis* lässt vermuten, daß andere Eukaryoten, die auch eine PFL-Aktivität zeigen – beispielsweise einige Grünalgen (Kreuzberg, 1984, 1985) – den gleichen Mechanismus zur Aktivierung verwenden. Für die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurde das gesamte PFL-System (bestehend aus PFL, PFL-AE, AdhE) in Atteia et al. (2006) beschrieben.

Mittels einer BLAST-Suche gegen die Datenbank nr (nicht-redundante Proteindatenbank) des NCBI wurde eine Sequenz des anaeroben Protisten *Giardia intestinalis* mit einer hohen Ähnlichkeit zu PFL-AE und ARNR-AE gefunden. Unerwarteter Weise verlief eine Suche im Genom von *G. intestinalis*<sup>7</sup> nach einer zu einem Enzym mit Glycinradikal-Mechanismus homologen Sequenz ergebnislos. Die Suche in den Genomen anderer anaerober Protisten nach einer Glycinradikal Enzym Aktivase (GRE-AE) verlief bei *Trichomonas vaginalis*<sup>8</sup> und *Entamoeba histolytica*<sup>9</sup> erfolgreich, allerdings konnte auch hier kein potentiell Ziel-Enzym entdeckt werden. Vermutlich wird ein Glycinradikal Enzym mit bislang unbekannter Funktion aktiviert (Gelius-Dietrich und Henze, 2004).

### 5.4.2 Phylogenetische Analyse der PFL-AE-Sequenzen

Die phylogenetische Analyse (Abbildung 6.5) zeigt vier Gruppen von Sequenzen, die mit den funktionalen Annotationen der Sequenzen als PFL-AE, ARNR-AE, BSS-AE und GRE-AE gut übereinstimmen. Die eukaryotischen PFL-AE-Sequenzen von *N. frontalis* und *C. reinhardtii* bilden mit den prokaryotischen Sequenzen eine Gruppe. Ein schwacher Split vereinigt die Eukaryoten mit dem gramnegativen Bakterium *B. thetaiotaomicron*, allerdings gibt es einen genauso starken Split, der letzteres mit dem  $\alpha$ -Proteobakterium *Z. mobilis* verbindet.

Die weiteren eukaryotischen Sequenzen – annotiert als GRE-AE – bilden eine eigene monophyletische Gruppe; das entsprechende Glycinradikal Enzym ist noch unentdeckt.

---

7 <http://www.giardiadb.org/giardiadb/>

8 <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tvg/>

9 <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1/>

Das Netzwerk zeigt viele inkompatible Splits, insbesondere bei den prokaryotischen PFL-AE-Sequenzen. Eine korrekte Gruppierung innerhalb der vier größeren Gruppen ist nicht möglich, was auch die Streuung der Sequenzen der grampositiven Bakterien (Firmicutes) im Netzwerk zeigt.

## 5.5 Succinyl-CoA Ligase

Das Enzym Succinyl-CoA Ligase (SCS, EC: 6.2.1.4–5) ist das einzige Protein des Citratzyklus aerober Mitochondrien, das in allen Hydrogenosomen anaerober Eukaryoten zu finden ist. Gleichzeitig ist es das energiespeichernde Enzym der Hydrogenosomen: via Substratkettenphosphorylierung wird Energie aus der Oxidation von Pyruvat als chemische Energie in Form von ATP gespeichert (Müller, 1993). Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten. Die  $\alpha$ -Untereinheit ist die Coenzym A Bindestelle, die  $\beta$ -Untereinheit enthält die Bindedomänen für Succinat und ADP (Bridger et al., 1987; Joyce et al., 2000).

Die SCS ist in der EST-Datenbank von *N. frontalis* eines der abundantesten Enzyme; eine Suche liefert 21 Treffer mit einem Erwartungswert  $\leq 10^{-20}$ . Der Klon nf\_0011 enthält ein offenes Leseraster für ein 330 Aminosäuren langes Peptid der  $\alpha$ -Untereinheit. Die mRNA-Sequenz der SCS  $\alpha$  ist bei GenBank unter der Accession-Nummer AY238445, die Aminosäuresequenz unter der Accession-Nummer AAP13544 zu finden.

Die Programme TargetP, MitoProt und PSORTII (Abschnitt 4.9) finden in der Sequenz der SCS  $\alpha$  ein mitochondriales Transitpeptid von 23 Aminosäuren. Die Transitsequenz ist serinreich und hat an Position  $-3$  bezüglich der Schnittstelle ein Arginin (Abbildung 5.11).

Auch in der Proteomanalyse sind beide Untereinheiten häufig zu finden (Abschnitt 5.1). Die  $\alpha$ -Untereinheit ist auf einer Höhe von 35 kDa im einem pH-Bereich von ca. 4 (Abbildung 5.4, Spots 28 und 29) und ebenso bei ca. pH 10 (Abbildung 5.6,

<i>R. norvegicus</i>	MVSGSSGLAAARLLSRTFLLQQNGIRH   GSYTASRKNYIDKNTK
<i>N. frontalis</i>	MISNQVSSSAKVAAS----AVSKRLY   STAYEQTLKNLLINKNTK
<i>E. coli</i>	-----MSILIDKNTK
<i>R. solanacearum</i>	-----MSILINKDTK

**Abbildung 5.11:** Alignment verschiedener Sequenzen von SCS  $\alpha$  Homologen (Accession-Nr. NP\_446204, AAP13544, BAB34177 und CAD14083). Das Arginin an Position  $-2/-3$  bezüglich der Schnittstelle »|« ist markiert.

Spots 172 bis 175). Letzteres entspricht dem errechneten isoelektrischen Punkt von pH 9,6.<sup>10</sup>

Die  $\beta$ -Untereinheit der SCS hat in *Neocallimastix patriciarum* ein Molekulargewicht von 47 kDa und einen isoelektrischen Punkt von pH 8,8.<sup>11</sup> Nach Entfernen des von Dacks et al. (2006) identifizierten Transitpeptids hat das aktive Enzym ein Molekulargewicht von 45 kDa und einen isoelektrischen Punkt von pH 8,2. Die  $\beta$ -Untereinheit von *N. frontalis* ist in den 2D-Gelen der Proteomanalyse (Abbildung 5.4, Spot 94 und Abbildung 5.6, Spots 153, 155, 156 und 159) bei einer Höhe von ca. 43 bis 45 kDa und bei einem pH-Wert von ca. 8 zu finden. In Abbildung 5.6 weitet sich die Bande über einen Bereich von ca. pH 6 bis 8 aus.

In einer phylogenetischen Analyse von homologen Sequenzen der SCS  $\alpha$  (Abbildung 6.6) werden alle eukaryotischen Sequenzen in einer monophyletischen Gruppe zusammengefasst. An deren Basis befinden sich mit hoher Bootstrap-Unterstützung (100 %) die  $\alpha$ -proteobakteriellen Sequenzen, gefolgt von anderen Gruppen proteobakterieller Homologe, was stark für einen mitochondrialen Ursprung der SCS  $\alpha$  in *N. frontalis* spricht. Innerhalb der Eukaryoten befindet sich *N. frontalis* an der Basis der monophyletischen Gruppe der Pilze innerhalb der Unikonten (im vorliegenden Datensatz nur Tiere und Pilze). Die Unikonten- und Bikonten-Homologen werden mit einer Bootstrap-Unterstützung von 93 % innerhalb der monophyletischen Gruppe der Eukaryoten voneinander getrennt.

Die einzigen amitochondriaten Organismen in der phylogenetischen Analyse sind *N. frontalis* und *T. vaginalis*. In beiden ist die SCS in den Hydrogenosomen lokalisiert. Beide Sequenzen stehen im Baum allerdings sehr weit voneinander entfernt, was für ein mehrfaches, unabhängiges Entstehen der Hydrogenosomen aus mitochondrialen Vorfahren in unterschiedlichsten Klassen der Lebewesen spricht.

### 5.6 Ornithin Carbamoyltransferase

Im Zuge der EST-Sequenzierungen von *N. frontalis* ist eine für das Enzym Ornithin Carbamoyltransferase (OTC, EC: 2.1.3.3) kodierende cDNA identifiziert worden. OTC ist in vielen Eukaryoten am Arginin-Stoffwechsel in den Mitochondrien

---

<sup>10</sup> Errechnet mit pepstats aus dem EMBOSS-Paket. Die Sequenz von *Neocallimastix frontalis* ohne Transitsequenz lag der Berechnung zugrunde (Accession-Nr. AAP13544).

<sup>11</sup> Errechnet mit pepstats aus dem EMBOSS-Paket. Die Sequenz von *Neocallimastix patriciarum* lag der Berechnung zugrunde (Accession-Nr. AAP83351).



beteiligt (Davis, 1986). Das Enzym fehlt allerdings in den Hydrogenosomen des mikroaerophilen Flagellaten *Trichomonas vaginalis*; OTC ist hier im Cytosol lokalisiert und an der ATP-Synthese über den Arginin-Dihydrolase-Weg beteiligt (Yarlett et al., 1994).

Um die Frage zu klären, ob die OTC in *N. frontalis* am mitochondrialen Teil des Arginin-Stoffwechsels oder an der cytosolischen ATP-Produktion beteiligt ist, wurde die intrazelluläre Lokalisation des Enzyms mittels Zellfraktionierungsexperimenten ermittelt. In mit Hydrogenosomen angereicherten Fraktionen aus *N. frontalis* (Abschnitt 4.6.4) und zum Vergleich aus *Trichomonas vaginalis* (Pütz et al., 2005) und den jeweiligen cytosolischen Fraktionen wurde die enzymatische Aktivität der OTC gemessen (Gelius-Dietrich et al., 2007).

Tabelle 5.1 zeigt, daß der Hauptanteil der OTC-Aktivität bei *N. frontalis* in den Hydrogenosomen lokalisiert ist. Die hydrogenosomale Fraktion wurde durch die Messung von Marker-Enzymen ermittelt (Abbildung 5.1). In *N. frontalis* wurde, im Gegensatz zu *T. vaginalis*, keine Aktivität von Enzymen des Arginin-Dihydrolase-Weges detektiert (Tabelle 5.2).

**Tabelle 5.1:** Spezifische Aktivitäten (nmol/min · ml) der OTC in subzellulären Fraktionen von *Neocallimastix frontalis* und *Trichomonas vaginalis*.

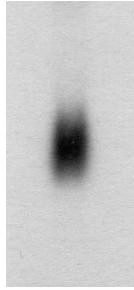
	Cytosol	Hydrogenosomen
<i>N. frontalis</i>	4,7 ± 0,4	29 ± 2,8
<i>T. vaginalis</i>	186 ± 36	5,5 ± 1,8

**Tabelle 5.2:** Spezifische Aktivitäten (nmol/min · ml) von Enzymen des Arginin-Dihydrolase-Weges in Rohextrakten von *Neocallimastix frontalis* und *Trichomonas vaginalis*.

	Arginin Deiminase	Carbamat Kinase
<i>N. frontalis</i>	nd	nd
<i>T. vaginalis</i>	0,2	36

## 5.7 Superoxid Dismutase

Das Enzym Superoxid Dismutase (SOD, EC: 1.15.1.1) ist üblicherweise ein Schutz gegen reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS). In anaeroben und mikroaerophilen Orga-



**Abbildung 5.13:** Northern-Hybridisierung. Als Sonde diente das offene Leseraster des Klon *nf\_0296*. Dieser Klon enthält ein für Superoxid Dismutase (SOD) kodierendes offenes Leseraster von 843 bp Länge. Die Hybridisierung wurde wie in Abschnitt 4.7.6.2 beschrieben durchgeführt, allerdings wurden, um die Membran abzublocken, 100 ng/ml poly(A)-DNA hinzugegeben. Zur Hybridisierung wurden 285 ng der Insertion von Klon *nf\_0296* verwendet.

nismen ist die SOD Teil eines Schutzmechanismus der sauerstoffsensitive Enzyme – wie die Hydrogenase oder die PFL – vor einer mitunter irreversiblen Inaktivierung bewahrt (Pütz et al., 2005).

In der Proteomanalyse der Hydrogenosomen von *N. frontalis* sind zur SOD homologe Peptide gefunden worden. Diese Peptide passen auf die Konsensus-Sequenz des Contigs *co\_0297* (Abbildung 5.12). Die einzigen Mitglieder des Contigs sind die Klone *nf\_0296* und *nf\_0704*. Zusätzlich ist die Transkription eines SOD-kodierenden Gens in *N. frontalis* durch eine Northern-Hybridisierung gezeigt worden (Abbildung 5.13).

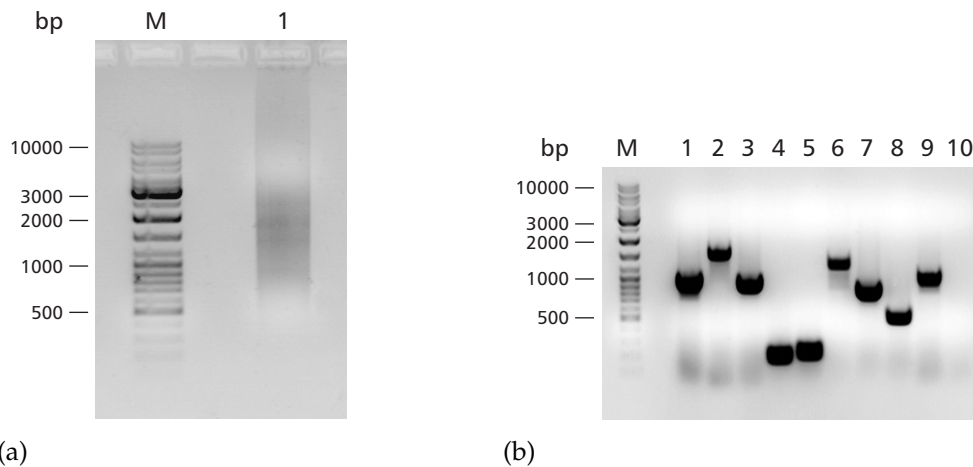
Die besten BLAST-Treffer zur Annotation von *co\_0297* sind proteobakterielle eisenabhängige SODs ([Fe]-SOD), wie sie auch in den Hydrogenosomen der Trichomonaden gefunden wurden (Kitchener et al., 1984; Lindmark und Müller, 1974).

```
>co_0297
IKNMSQITKHVLKPLPYSLNALAPFISEETLRHYHGKHHQSYVNNLNNLLSLKENSEFVNKSLVEIIQNKSVSTGLFNNA
AQVYNHDFYWESLTPPKGEGNPLPTGKISEELIKNFGSYESFKDQFSKASTGRFGSGWAWLVQNIKTGKLEIMSTSNADN
PLTTPDLKPIILTCDVWEHAYYIDYRNDRGKYVQDAFWKLVNWFANKNLQ
```

**Abbildung 5.12:** Im Spot Nr. 111 (Abbildung 5.5) sequenzierte Peptide der SOD.

## 5.8 Cytosolische Enzyme

Die Sequenzierung von Proteinspots in den 2D-Gelen des Proteoms der Hydrogenosomen von *N. frontalis* ergab viele cytosolische Enzyme. Diese Beobachtung



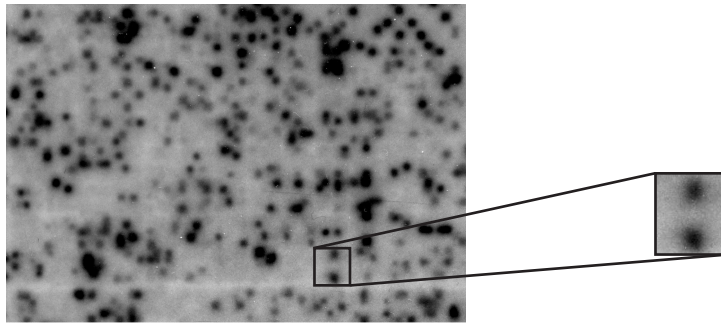
**Abbildung 5.14:** (a) Die cDNA im Agarosegel. M: 500 ng GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas); 1: 10 µg cDNA. (b) Insertionskontrolle bei zehn zufällig ausgewählten Klonen mittels einer Kontroll-PCR (Abschnitt 4.7.4). In einem von zehn Fällen wurde kein Amplifikat erzeugt. M: 500 ng GeneRuler™ DNA Ladder Mix; 1 bis 10: PCR-Reaktionsansätze.

ist zum Teil auf eine Kontamination der hydrogenosomalen Fraktion mit der cytosolischen Fraktion zurückzuführen (Abbildung 5.1). Allerdings ist innerhalb der identifizierten cytosolischen Enzyme eine deutlich höhere Anzahl an Spots Proteinen zuzuordnen, die an der Glykolyse beteiligt sind. 17 von 26 cytosolischen Spots passen auf glykolytische Enzyme; die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) gehört mit zehn Spots zu den häufigsten in den 2D-Gelen (Abschnitt 5.1).

## 5.9 EST-Datenbank

### 5.9.1 cDNA-Bibliothek

Für die cDNA-Synthese wurden aus 3,4 l Kultur von *N. frontalis* 7 mg Gesamt-RNA isoliert. Aus 1,25 mg RNA wurden 40 µg polyadenylierte RNA gewonnen, was einer Ausbeute von 3,2 % entspricht (Abschnitt 4.7.2). Zur Herstellung von 1,2 µg cDNA (Abbildung 5.14a) wurden 5 µg poly(A)<sup>+</sup>-RNA verwendet. Die cDNA wurde mit dem »Gigapack® III Gold Packaging Extract« der Firma Stratagene in Lambda-Phagenköpfe verpackt. Es wurden 130 000 Klone produziert; die Phagenbank hatte eine Insertionsrate von 1 : 10 (Abbildung 5.14b). Die Insertionsrate wurde zusätzlich mit einer Blau-Weiß-Selektion überprüft. Zur EST-Sequenzierung wurde die Phagenbank auf  $2 \times 10^{11}$  Klone amplifiziert.



**Abbildung 5.15:** Die Koloniehybridisierungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Jedes »Muster« eines bestimmten Signals in einem Quadranten (kleines Bild) entspricht einem positiven Signal in einer der Glycerin-Dauerkulturen.

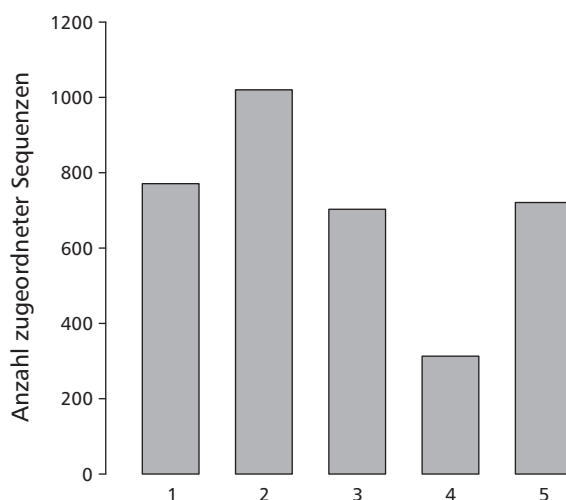
Die Redundanz der cDNA-Bibliothek wurde durch Kolonie-Hybridisierungen (Abschnitt 4.7.6 und Abbildung 5.15) ausgeglichen. Dazu wurde eine unamplifizierte Phagenbank (200 000 Klone) verwendet. Diese wurde zunächst mit den als »ribosomales Protein« identifizierten Sequenzen hybridisiert. Durch dieses Verfahren konnte der Anteil an »ribosomalen Proteinen« von 50 % auf 22 % abgesenkt werden. Desweiteren wurden nur Klone mit einer Insertionsgröße von mehr als 300 bp für die Sequenzierung verwendet. Dazu wurde mit jedem Klon eine Kontroll-PCR (Abschnitt 4.7.4) durchgeführt.

### 5.9.2 Quantifizierung

Die EST-Datenbank enthält 3034 Sequenzen aus 1615 unabhängigen Klonen. Dabei wurden 1 643 835 Nukleotide sequenziert. TIGR Assembler erstellte 484 Gruppen (Contigs), und konnte 1260 Sequenzen keiner Gruppe zuordnen (Singletons). Das entspricht 1744 Sequenzen, mit denen eine BLAST-Suche vorgenommen wurde.

### 5.9.3 Funktionale Kategorisierung

Abbildung 5.16 gibt die Zuordnung der annotierten EST-Sequenzen in die funktionalen Kategorien (Abschnitt 4.9.2.1) wieder. Die Summe aller Sequenzen ist größer als 1744, da die Einteilung in die Kategorien mitunter nicht eindeutig ist. Eine EST-Sequenz kann daher in mehreren Kategorien auftauchen.



**Abbildung 5.16:** Häufigkeit der funktionalen Kategorien in den EST-Sequenzen: 1) Speichern und Verarbeiten von Information (771), 2) Zelluläre Prozesse und Signale (1020), 3) Stoffwechsel (703), 4) Transport (313), 5) Unbekannt (721).

#### 5.9.4 Graphische Benutzeroberfläche der EST-Datenbank

Die EST-Datenbank ist mittels einer graphischen Benutzeroberfläche über das Intranet des Instituts für Ökologische Pflanzenphysiologie der HHU zu erreichen. Die Suchanfragen eines Benutzers werden über die Skriptsprache PHP an die MySQL-Datenbank übergeben. Das Ergebnis wird ebenfalls über PHP ausgewertet und an den Browser ausgegeben (Abschnitt 4.9.3). Abbildung 5.17 zeigt den ersten Teil der Suchmaske. Es gibt zwei Möglichkeiten, zu suchen: zum einen nach einer Sequenz-ID, oder zum anderen nach einer Funktion. Bei der Suche nach einer Sequenz-ID werden die Spalten »id« und »member« der Tabellen »assembly« und »est« durchsucht (Abschnitt 4.9.2.2). Die Suche nach einer Funktion entspricht der Suche nach einem Wort in der Beschreibung des BLAST-Treffers (Spalten hit1-20 der Tabelle »assembly«). Es stehen zwei Eingabefelder für Suchbegriffe zur Verfügung.

##### 5.9.4.1 Abfrage

**Suche nach einer Sequenz-ID** Bei der Suche nach einer Sequenz-ID können eine oder mehrere, durch Leerzeichen getrennte, Sequenz-IDs eingegeben werden. Die IDs beginnen mit `co_` für eine Konsensus-Sequenz, bzw. mit `nf_` für ein Singleton oder eine EST-Sequenz, gefolgt von einer vierstelligen Zahl. Bei den EST-Sequenzen folgt noch ein `f` oder `r` zur Kennzeichnung der Sequenzierrichtung (`f`: vorwärts,

The screenshot shows a search interface with the following elements:

- Search for:** A text input field containing "a function" and a dropdown arrow.
- Second query, connected by:** A text input field (empty) and a dropdown menu showing "and".
- Search Options:**
  - logical operators ( \_ = OR)
  - exact match
  - regular expression
  - Assembly
  - Members
- Sorting Options:**
  - sequence ID
  - sequence length
  - E Value of best hit
  - bit Score of best hit
  - ascending
  - descending
- Additional Options:**
  - Search in ESTs (IDs only)
  - Explain query

**Abbildung 5.17:** Die graphische Benutzeroberfläche Teil 1. Links die Suchwörter, rechts die Sortieroptionen.

r: rückwärts). Für die Suche ist nur die Zahl notwendig. Wird beispielsweise »125« eingegeben, werden diejenigen Konsensus-Sequenzen gefunden, welche die EST-Sequenzen nf\_0125f und nf\_0125r enthalten und das Contig co\_0125. Um explizit nur ein bestimmtes Contig oder eine bestimmte EST-Sequenz zu finden, muß die ID exakt eingegeben werden.

Es ist ebenfalls möglich, eine obere und eine untere Grenze für die Suche anzugeben: beispielsweise Sequenz 125 bis 130. Dazu müssen beide Eingabefelder benutzt werden, die Verknüpfung wird dabei immer als »bis« interpretiert. Die Suche nach einer ID kann auch auf die Tabelle »est« beschränkt werden. Über die beiden Häkchen »Assembly« und »Member« kann bestimmt werden, ob eine Sequenz-ID nur in den Spalten »id« bzw. »member« gesucht werden soll. Wenn bei einer Suche nicht die Mitglieder eines Contigs durchsucht werden sollen, muß das Häkchen bei »Assembly« gesetzt sein.

**Suche nach einer Funktion** Bei der Suche nach einer Funktion können die beiden Eingabefelder mit einem logischen Operator (AND, OR, NOT, XOR) verknüpft werden. Es gibt zusätzlich drei Varianten, den Suchbegriff zu interpretieren. Im voreingestellten Fall (»logical operators«) können die Wörter durch beliebige logische Operatoren verknüpft werden. Enthält der Suchbegriff Leerzeichen, wird immer ein »oder« angenommen. Sollen unterschiedliche Operatoren verwendet werden, müssen alle explizit angegeben werden. So wird z. B. die Eingabe von »pyruvate formate lyase« als »Suche nach ›pyruvate‹ oder ›format‹ oder ›lyase«

**Abbildung 5.18:** Die graphische Benutzeroberfläche Teil 2. Ausgabeoptionen.

interpretiert, hingegen die Eingabe von »pyruvate OR formate lyase« als »Suche nach ›pyruvate‹ oder ›format lyase‹«. Wenn beide Eingabefelder ausgefüllt sind – mit Suchbegriffen, die logische Operatoren enthalten – wird bei der Suche zunächst das erste Eingabefeld auf die Datenbank angewandt, dann mit der gewählten Verknüpfung das zweite.

Wird die Option »exact match« angewählt, wird der Suchbegriff exakt so gesucht, wie eingegeben. Die Anwahl von »regular expression« ermöglicht eine Mustersuche mit regulären Ausdrücken.

#### 5.9.4.2 Sortierungen

Die Ausgabe der Ergebnisse lässt sich nach bestimmten Kriterien aufsteigend oder absteigend sortieren: nach der Sequenz-ID (voreingestellt), nach Sequenzlänge und nach dem E Value oder dem bit Score des besten BLAST-Treffers.

#### 5.9.4.3 Ausgabeoptionen

Die verschiedenen Optionen für die Ausgabe sind in Abbildung 5.18 dargestellt. Zunächst kann das Ausgabeformat bestimmt werden. Voreingestellt ist eine Ausgabe, wie sie in Abbildung 6.7 zu sehen ist. Rechts von der Sequenz wird im Falle eines Contigs die entsprechende Übersichtsgraphik angezeigt, darunter die BLAST-Treffer zur Annotation. Ganz unten steht die der Sequenz zugeordnete funktionale Kategorie. Alternativ können die Sequenzen im FastA-Format ausgegeben werden. Desweiteren ist es möglich, für die Sequenzlänge, den bit Score und den E Value Maximal-, bzw. Minimalwerte anzugeben.

Die Anzahl auszugebender BLAST-Treffer – voreingestellt sind fünf – stellt gleichzeitig die Suchtiefe für die Suche nach einer Funktion dar. Bei einer Eingabe von »10« werden die besten zehn BLAST-Treffer durchsucht, bei einer Eingabe von »5« nur die ersten fünf. Die Menge der Ergebnisse lässt sich limitieren und die Anzahl der Ergebnisse pro Seite festlegen. Es können auch alle Ergebnisse auf einer Seite erscheinen, diese Option überschreibt eine festgelegte Anzahl der Ergebnisse pro Seite.

Desweiteren lässt sich die Suche nach einer Funktion auf eine oder mehrere bestimmte funktionale Kategorien beschränken. Es existieren fünf Hauptkategorien, die wiederum in Unterkategorien eingeteilt sind. Die Auswahl einer Hauptkategorie schließt automatisch alle Unterkategorien mit ein (Abschnitt 4.9.2.1).



## 6 Diskussion

---

### 6.1 Die EST-Datenbank von *Neocallimastix frontalis*

Zur Erstellung einer EST-Datenbank von *Neocallimastix frontalis* sind 3034 Sequenzen aus 1615 unabhängigen cDNA-Klonen sequenziert worden (Abschnitt 5.9). Die Sequenzen und deren Annotationen sind über eine graphische Benutzeroberfläche mit einem Internet-Browser erreichbar. Um eine halb-automatisierte Aktualisierung des laufenden Sequenzierungsprojektes in der Datenbank zu gewährleisten, sind aufeinander aufbauende Perl-Skripte entwickelt worden (Abbildung 4.1).

Die EST-Datenbank ermöglichte es, die Peptidsequenzen aus der Proteomanalyse der Hydrogenosomen von *N. frontalis* anhand eines einheitlichen Datensatzes zu annotieren. Die EST-Datenbank enthält ausschließlich Sequenzen von *N. frontalis*, so daß die Peptide mit einer größeren Exaktheit gesucht werden können. Die Suche von Homologen zu sequenzierten Peptiden in Datenbanken wie Swiss-Prot liefert aus Gründen der Sequenzdiversität innerhalb verschiedener Organismen mitunter weniger gute oder gar keine Treffer. Demgegenüber sind die Treffer in der EST-Datenbank eindeutig und die gefundenen Sequenzen mit den gesuchten identisch.

Problematisch ist ein EST-Sequenzierungs-Projekt insofern, als daß die resultierende Datenbank stark redundant ist (Bonaldo et al., 1996; Soares et al., 1994). Die enthaltene Information ist auf der Ebene der Transkription anzusiedeln, daher treten Gene, die in hoher Zahl transkribiert werden, weiter in den Vordergrund als andere. Insbesondere ribosomale Proteine treten sehr häufig auf. Die Redundanz der EST-Datenbank wurde durch Kolonie-Hybridisierungen verringert (Abschnitt 5.9.1).

Dennoch liefert die EST-Datenbank kein vollständiges Bild der translatierten Gene von *N. frontalis*. Dies wird durch das Fehlen verschiedener zu erwartender Gene deutlich, beispielsweise solcher, die für Enzyme der Eisen-Schwefel-Cluster

Synthese kodieren. Ebenso fehlen die Gene der Hydrogenase Maturasen, wie sie im Genom und im hydrogenosomalen Proteom von *Trichomonas vaginalis* gefunden wurden (Pütz et al., 2006).

Der Vorteil eines EST-Projektes gegenüber einem Genomprojekt ist die schon aufbereitete Information. Jeder EST-Klon enthält genau eine Kopie eines mRNA-Moleküls, somit müssen keine offenen Leseraster im Genom gesucht werden. Modifikationen auf Transkriptionsebene spielen beim Vergleich von Proteinsequenzen mit den EST-Sequenzen ebenso nur eine untergeordnete Rolle.

## 6.2 Das hydrogenosomale Proteom von *Neocallimastix frontalis*

In der Untersuchung des hydrogenosomalen Proteoms von *N. frontalis* sind die Enzyme des Energiestoffwechsels identifiziert worden (Abbildung 3.4 und Abschnitt 5.2). Nur die Acetat-Succinat-CoA Transferase (ASCT) konnte nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Spots Nr. 130, 160 und 161 (Abbildung 5.5 und Abbildung 5.6) weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit mit Enzymen aus der Acetyl-CoA Hydrolase/Transferase Familie auf und wurden durch Sequenzvergleiche als Acetyl-CoA Hydrolase (ACH) annotiert.

Das Protein zeigt in Bezug auf Molekulargewicht und pI-Wert ähnliche Eigenschaften wie die ASCT in *Trichomonas vaginalis* (Abschnitt 5.2). Auch in *T. vaginalis* wurde die ASCT durch Sequenzvergleiche zunächst als ACH annotiert; biochemische Experimente wiesen das Enzym jedoch als ASCT aus (van Grinsven et al., 2008). Ausschließlich auf Sequenzvergleichen basierende Methoden reichen nicht aus, die sequenzierten Peptide aus den Hydrogenosomen von *N. frontalis* eindeutig einem Enzym zuzuordnen.

Auch in der Proteomanalyse konnten – wie in der EST-Datenbank – keine an der Eisen-Schwefel-Cluster Synthese beteiligten Enzyme und keine Hydrogenase Maturasen erkannt werden. Die Darstellung eines Proteoms mittels der zweidimensionalen Gelelektrophorese ist naturgemäß unvollständig. Seltene oder gering exprimierte Proteine, oder solche mit sehr hohem oder sehr kleinem Molekulargewicht sind im Gel unterrepräsentiert (Henze, 2008). Gleiches gilt für Membranproteine, die aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften nicht für die isoelektrische Fokussierung löslich gemacht werden können. In den Membranen der Hydrogenosomen sollten erwartungsgemäß viele Substrat- und Metabolit-Transporter zu finden sein, aber derzeit ist nur Hmp31 – ein Mitglied der mitochondrialen Transporterfamilie – in *T. vaginalis* gefunden worden (Dyall et al., 2000).

Die Anzahl der Enzyme des hydrogenosomalen Proteoms von *T. vaginalis* wird auf ca. 200 geschätzt (Henze, 2008). Die Proteomanalyse der Hydrogenosomen von *N. frontalis* (Abschnitt 5.1) lässt auf eine vergleichbare Menge an Enzymen schließen. Für das Proteom des Hefe-Mitochondriums werden ca. 700 Enzyme angegeben (Prokisch et al., 2004). Somit liegen die Hydrogenosomen – in Bezug auf ihre Komplexität – im Bereich der reduzierten Mitochondrien intrazellulärer Parasiten und der Mitosomen. Richly et al. (2003) ermitteln für die Mitochondrien von *Plasmodium falciparum* 187 Enzyme und für die Mitosomen von *Encephalitozoon cuniculi* 156 Enzyme.

### 6.2.1 Weitere Enzyme in der hydrogenosomalen Fraktion

Auch nicht-hydrogenosomale Proteine sind in der hydrogenosomalen Fraktion identifiziert worden. Darunter insbesondere ribosomale Proteine, bzw. allgemein Proteine aus dem Bereich »Speichern und Verarbeiten von Information« und Enzyme der Glykolyse. Weitere Vertreter sind Peptide des Cytoskeletts, Enzyme aus dem Cytosol (zusätzlich zu den an der Glykolyse beteiligten) und eine Serin/Threonin-Phosphatase aus dem Zellkern.

Außerdem wurden Enzyme des Endoplasmatischen Reticulums (ER) identifiziert: Calnexin/Calreticulin, ein Protein, das als Chaperon bei der Faltung von Glykoproteinen dient (Zapun et al., 1998) und eine Disulfid Isomerase, die Neuarrangierungen von Disulfidbrücken in Proteinen vornimmt (Freedman et al., 1994).

Von dem mit *T. vaginalis* nahe verwandten Organismus *Tritrichomonas foetus* ist bekannt, daß die Hydrogenosomen mit dem Cytoskelett verbunden sind (Benchimol, 2005). Daher sind diese Spots in der Proteomanalyse auf an den Hydrogenosomen hängende Cytoskelettreste zurückzuführen. Ebenso sind die Proteine des Cytosols und des Zellkerns kontaminierende Reste in der hydrogenosomalen Fraktion. In Abbildung 5.1 wird gezeigt, daß die Aktivität des cytosolischen Markerenzym in der hydrogenosomalen Fraktion von *N. frontalis* zwar gering ist, aber nicht gänzlich entfernt werden konnte. Somit lässt sich die Anwesenheit der cytosolischen Enzyme als Kontamination erklären.

### 6.2.2 Speichern und Verarbeiten von Information

In der Proteomanalyse wurden eukaryotische 40S und 60S ribosomale Proteine identifiziert, sowie weitere an der Proteinbiosynthese und Proteinfaltung beteiligte

Proteine, darunter die Elongationsfaktoren 1, 2 und 5, sowie die Hitzeschockproteine 20, 78 und 90. Die Existenz dieser Enzyme in der hydrogenosomalen Fraktion kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Erstens: auf eine Kontamination der Fraktion mit rauhem ER, bzw. freien Ribosomen. Oder zweitens: auf einen co-translationalen Import hydrogenosomaler Proteine in das Organell.

Für die erste Annahme spricht die zusätzliche Identifizierung der Proteine aus dem ER (Abschnitt 6.2.1). Daher ist eine gewisse Kontamination nicht auszuschließen. Für die zweite Hypothese spricht, daß in der Kategorie »Speichern und Verarbeiten von Information« viel mehr Proteine gefunden wurden und das diese auch ein größeres Spektrum an Proteinklassen abdecken (Abschnitt 5.1). Ebenso dafür spricht, daß für die Hydrogenosomen von *T. vaginalis* Hinweise auf einen co-translationalen Transport von Proteinen in das Hydrogenosom gefunden wurden (Pütz, 2007). Desweiteren ist von Hefe und Säugetieren bekannt, daß Ribosomen an Mitochondrien binden und Proteine während der Translation in die Organellen transportiert werden (Ades und Butow, 1980; MacKenzie und Payne, 2004; Marc et al., 2002).

### 6.2.3 Glykolytische Enzyme

Die Assoziation glykolytischer Enzyme an Mitochondrien ist aus *Arabidopsis thaliana* bekannt. Giegé et al. (2003) haben sieben mit den Mitochondrien assoziierte glykolytische Enzyme durch Peptidsequenzierungen gefunden. In mitochondrialen Fraktionen konnte für alle zehn Enzyme eine Aktivität nachgewiesen werden. Brandina et al. (2006) haben in Hefe ebenso alle zehn Enzyme in mitochondrialen Fraktionen messen können. Auch in dem Ciliaten *Tetrahymena thermophila* wurden Peptide glykolytischer Enzyme in mitochondrialen Fraktionen identifiziert (Smith et al., 2007; Srere, 1987). Giegé et al. (2003) postulieren, daß der Vorteil einer mitochondrial assoziierten Glykolyse darin besteht, daß ein direkter Pyruvat-Import ins Mitochondrium gewährleistet wird. Die duale Lokalisation an der Oberfläche von Mitochondrien und im Cytosol ist in *Arabidopsis thaliana* und *Solanum tuberosum* abhängig von der Respirationsrate (Graham et al., 2007). Die Aufteilung der glykolytischen Enzyme ermöglicht es, Pyruvat direkt und am Ort des Gebrauchs, zur Verfügung zu stellen.

Die sieben von Giegé et al. (2003) identifizierten glykolytischen Enzyme sind – bis auf die Enolase – dieselben, die im hydrogenosomalen Proteom von *N. frontalis* gefunden wurden. Das Enzym Enolase ist in *N. frontalis* für das erste identifizierte

Intron bekannt geworden (Durand et al., 1995) und mit dem Klon nf\_0004 existiert auch eine cDNA mit vollständigem offenen Leseraster.

Im Proteom der Hydrogenosomen von *T. vaginalis* sind weniger glykolytische Enzyme gefunden worden (eine Enolase und zwei Fruktosebisphosphat Aldolasen), allerdings sind in dieser Arbeit die Organellen über zwei aufeinanderfolgende Percoll-Gradienten gereinigt worden (Pütz, 2007). Vermutlich sind dadurch die meisten der außen am Hydrogenosom anhaftenden Proteine entfernt worden.

### 6.3 PFL und verwandte Enzyme in Eukaryoten

Im EST-Sequenzierungsprojekt von *N. frontalis* wurde das die Pyruvat-Formiat Lyase (PFL) aktivierende Enzym (PFL-AE) gefunden. Die PFL katalysiert in den Hydrogenosomen der anaeroben Pilze die Umsetzung von Pyruvat und Coenzym A zu Acetyl-CoA und Formiat (Hackstein et al., 1999). Die Reaktion erfolgt durch homolytische Spaltung und erfordert ein freies Glycinradikal in der Polypeptidkette. Dieses Radikal wird durch das PFL aktivierende Enzym eingeführt; die PFL ist somit im aktiven Zustand. Um eine irreversible Spaltung des Enzyms (der PFL) durch Sauerstoff zu verhindern, kann das Radikal durch eine multifunktionale Alkohol Dehydrogenase (AdhE) wieder entfernt und so die PFL deaktiviert werden (Becker et al., 1999; Sawers und Watson, 1998).

In prokaryotischen Organismen ist dieser Reaktionsmechanismus weit verbreitet und findet sich in vielen Enzymen wieder (Abschnitt 3.5.1), demzufolge sind viele Glycinradikal Enzyme (GRE) und deren aktivierenden Enzyme (GRE-AE) bekannt. In eukaryotischen Organismen ist ein Glycinradikal-Mechanismus nur bei einigen Anaerobiern oder zumindest fakultativ anaerob lebenden Organismen zu finden. Darunter Grünalgen (Atteia et al., 2006; Kreuzberg, 1984) und Pilze (Bauchop, 1989). Eine genauere Suche in den Genomen einiger anaerober Protisten konnte Sequenzen identifizieren, die für eine Glycinradikal Enzym Aktivase kodieren, allerdings blieb die Suche nach einem zu aktivierenden Enzym erfolglos (Abschnitt 5.4.1).

Die phylogenetische Analyse homologer PFL-Sequenzen (Abschnitt 5.4.2 und Abbildung 6.3) zeigt eine eindeutige Gruppierung der funktionalen PFLs getrennt von allen anderen Enzymen. Eine mögliche Ursache dieser Gliederung ist eine Genduplikation in einem gemeinsamen Vorfahren, wobei sich eines der Gene im Verlauf der Evolution derart verändert hat, daß es jetzt andere Funktionen ausübt. Unterstützt wird die Theorie durch die langen Äste der »nicht-PFL-Sequenzen«,

was auf eine hohe Sequenzdiversität hinweist, und die relativ kurzen Äste der PFL-Sequenzen, was auf konserviertere Sequenzen und daher auf einen Erhalt der Funktion hindeutet.

Die eukaryotischen PFL-Sequenzen von *N. frontalis*, *Piromyces* sp. und *C. reinhardtii* bilden eine monophyletische Gruppe im Netzwerk. Die nächsten Nachbarn sind die Bakterien *Bacteroides thetaiotaomicron* und *Clostridium pasteurianum*. Eine phylogenetische Untersuchung nur mit den funktionalen PFL-Sequenzen ergibt das gleiche Bild (Abbildung 6.4). Eine eubakterielle Quelle der PFL ist nicht zu erkennen. Die prokaryotischen Gruppen sind im Netzwerk nicht aufgelöst und die meisten prokaryotischen Spezies sind unterrepräsentiert. Im Netzwerk dominieren die  $\gamma$ -proteobakteriellen und grampositiven Sequenzen. Die  $\alpha$ -Proteobakterien – die Vorfahren der heutigen Mitochondrien (Embley und Martin, 2006; Esser et al., 2004; Gray et al., 1999) – sind nur durch eine einzige Sequenz repräsentiert.

Ein ähnliches Bild zeichnet die phylogenetische Analyse der PFL-AE-Sequenzen (Abbildung 6.5). Es gibt vier große Gruppen bezüglich der Annotation der Proteine und die Eukaryoten sind sowohl in der Gruppe PFL-AE als auch in der Gruppe GRE-AE monophyletisch. Innerhalb der Gruppen sind die Prokaryoten nicht gut aufgelöst, insbesondere die grampositiven Bakterien sind über das ganze Netzwerk verstreut. Auch hier kann – trotz des offensichtlich monophyletischen Ursprungs der PFL-AE – kein spezifischer prokaryotischer Donor ausfindig gemacht werden.

Die monophyletische Gruppe der GRE-AEs liegt nahe an dem großen Split, der die ARNR-AEs (anaerobe Ribonukleotid Reduktase aktivierendes Enzym) von den PFL-AEs trennt. Die von den eukaryotischen PFL-AEs entfernt liegende Position der GRE-AEs der anaeroben Protisten spricht für eine funktionelle Diversifikation und nicht für einen unabhängigen Ursprung aus verschiedenen prokaryotischen Quellen. Es ist allerdings nicht zu sagen, ob die GRE-AEs der anaeroben Protisten von einem PFL-AE-Vorläufer oder einem ARNE-AE-Vorläufer abstammen (Gelius-Dietrich und Henze, 2004).

Verschiedene Programme finden in der Peptid-Sequenz der PFL von *N. frontalis* ein mitochondriales Transitpeptid, können aber keine Schnittstelle ermitteln (Abschnitt 5.3.1). In der Sequenz der PFL-AE hingegen wird kein Transitpeptid gefunden. Eine mögliche Erklärung ist, daß die PFL im Cytosol aktiviert und so in das Hydrogenosom importiert wird. Dieser Mechanismus würde auch das Fehlen der PFL-AE in der hydrogenosomalen Proteomanalyse erklären.

## 6.4 Der evolutive Ursprung der PFL und PFL-AE

Anhand der phylogenetischen Analyse der PFL (Abbildung 6.3) und der PFL-AE (Abbildung 6.5) haben beide Enzyme einen einzelnen eubakteriellen Ursprung. Nach Stechmann und Cavalier-Smith (2002, 2003) liegt die Wurzel des phylogenetischen Baumes der Eukaryoten zwischen den Unikonten (darunter die Tiere, Pilze und Amoebozoa) und den Bikonten (darunter die Protisten und Pflanzen), demzufolge ist der Split, der die eukaryotischen Sequenzen von den prokaryotischen trennt, möglicherweise der tiefste in Bezug auf die Evolution eukaryotischer Lebewesen (zusammengefasst in Embley und Martin (2006)).

Unter dieser Voraussetzung bedeutet die Anwesenheit von PFL und PFL-AE in Pilzen (Unikont) und in Grünalgen (Bikont), daß die Aufnahme dieser Gene sehr früh in der Evolution stattgefunden hat, was einer mehrfachen Aufnahme der Gene durch horizontalen Gentransfer widersprechen würde. Da der eubakterielle Donor der Gene aus den Daten nicht hervorgeht, sind prinzipiell zwei mögliche Hypothesen denkbar:

1. Die Gene für PFL und PFL-AE sind mittels horizontalem Gentransfer von einem eubakteriellen Donor auf den gemeinsamen Vorfahren der Unikonten und Bikonten übertragen worden, oder
2. beide Gene sind durch den endosymbiontischen,  $\alpha$ -proteobakteriellen Vorfahren der Mitochondrien in die Linie der Eukaryoten gelangt.

Horizontaler Gentransfer zwischen Bakterien aller Arten ist ein häufig auftretendes Phänomen (Theißen et al., 2003). Daher ist es nicht zwingend erforderlich, daß bei der phylogenetischen Analyse eines einzelnen Gens eine eukaryotische monophyletische Gruppe mit einem  $\alpha$ -proteobakteriellen Vertreter auf einem Ast sein muß. Eine Folge daraus ist, daß vermutlich kein rezentes  $\alpha$ -Proteobakterium die gleiche Menge orthologer Gene hat, wie der mitochondriale Endosymbiont (Esser et al., 2007).

Demzufolge kann aus dem Fehlen einer Beziehung zwischen den eukaryotischen PFL und PFL-AE Sequenzen und entsprechenden proteobakteriellen Homologen nicht geschlossen werden, daß die Gene nicht mitochondrialen Ursprungs sind. Insbesondere deshalb nicht, weil es sich um »Ein-Gen-Analysen« handelt, deren Möglichkeiten, eine korrekte evolutionäre Geschichte wiederzugeben, limitiert sind (Rokas et al., 2003).

Die evolutive Geschichte, die aus den phylogenetischen Analysen der PFL und PFL-AE resultiert – die Abstammung von einem einzigen Vorfahren, wobei der

Vorfahre nicht eindeutig zu identifizieren oder zu klassifizieren ist – ist häufig auch für andere Proteine, die am anaeroben Stoffwechsel der Eukaryoten beteiligt sind, zu sehen. Beispielsweise bei der Sufid-Chinon Oxidoreduktase (Theißen et al., 2003), der [Fe]-Hydrogenase (Horner et al., 2000, 2002), der Pyruvat-Ferredoxin Oxidoreduktase (Horner et al., 1999) und der NADH Oxidase (Nixon et al., 2002). Das Erbe dieser Enzyme von einem fakultativ anaeroben Vorfahren der Mitochondrien (Martin und Müller, 1998) erscheint einfacher, als die Übernahme jedes einzelnen Enzyms aus einer anderen eubakteriellen Quelle.

## 6.5 Chemische Energie

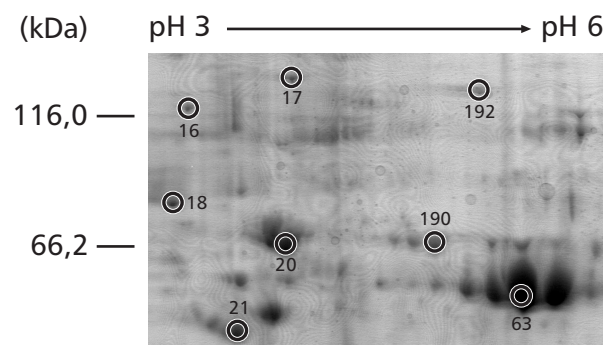
In den Hydrogenosomen aller Organismen wird ATP durch die Reaktion der Succinyl-CoA Ligase (SCS) bereitgestellt (Abschnitt 5.5). Das Substrat Succinyl-CoA entsteht bei der Übertragung der energiereichen Bindung in Acetyl-CoA auf Succinat. Diese Reaktion wird durch die Acetat-Succinat-CoA Transferase katalysiert, ein Enzym, das bislang nur in den Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* identifiziert werden konnte (van Grinsven et al., 2008).

In einer phylogenetische Analyse homologer Sequenzen der  $\alpha$ -Untereinheit von SCS werden die Eukaryoten in einer monophyletischen Gruppe zusammengefasst (Abbildung 6.6). *N. frontalis* steht in dieser Untersuchung an der Basis des Pilz-Astes. Ein weiterer zusätzlicher Hinweis auf eine sehr frühe Abspaltung der – bis 2007 zu den Chytridiomyceten gehörenden – anaeroben Pilze (Van der Auwera und De Wachter, 1996).

Die Positionierung der  $\alpha$ -Proteobakterien an der Basis des eukaryotischen Astes deutet auf einen mitochondrialen Ursprung des Gens hin. Die Stellung der Sequenzen von *N. frontalis* und *T. vaginalis* zueinander – innerhalb der Eukaryoten – lässt nicht auf eine eigenständige hydrogenosomale Entwicklung schließen. Die SCS  $\alpha$  ist als Überbleibsel eines gemeinsamen mitochondrialen Vorfahrens zu verstehen.

Dafür spricht auch die Existenz eines Transitpeptids mit allen mitochondrialen Eigenschaften (Abbildung 5.11). Eine konservierte mitochondriale Proteinimport-Maschinerie ist auch für das Malat Enzym (van der Giezen et al., 1998) und beide SCS-Untereinheiten in *Neocallimastix patriciarum* (Dacks et al., 2006) beschrieben worden.





**Abbildung 6.1:** Ausschnitt aus einer zweidimensionalen Gelelektrophorese der hydrogenosomalen Fraktion aus *Neocallimastix frontalis*. Spot Nummer 192 enthält Peptide des Enzyms Carbamoylphosphat Synthase (CPS).

## 6.6 Arginin-Stoffwechsel

Durch Zellfraktionierungsexperimente wurde die intrazelluläre Lokalisation des Enzyms Ornithin Carbamoyltransferase (OTC) in *Neocallimastix frontalis* festgestellt. Die höchste enzymatische Aktivität wurde in der hydrogenosomalen Fraktion gemessen (Tabelle 5.1). Diese Lokalisation lässt darauf schließen, daß in *N. frontalis* die OTC zur Arginin-Biosynthese eingesetzt wird. Die von einigen amitochondriaten Protisten verwendete Alternative – der ATP produzierende Arginin-Dihydrolase-Weg – ist vollständig im Cytosol lokalisiert (Yarlett et al., 1994), wohingegen der Arginin-Metabolismus bei Pilzen (Abbildung 3.5) kompartimentiert abläuft (Davis, 1986).

Die Sequenzierung zufällig ausgewählter Proteine aus der Proteomanalyse ergab ein weiteres Enzym des Arginin-Stoffwechsels, und zwar die Carbamoylphosphat Synthase (CPS) (Abbildung 6.1 und Abbildung 6.2). CPS produziert Carbamoylphosphat, das Substrat für die OTC. Das Enzym CPS agiert im mitochondrialen Teil der Arginin-Biosynthese einen Schritt vor der OTC. Ein weiteres cytosolisches Enzym, die Argininosuccinat Synthase, wurde in der EST-Datenbank identifiziert (Klone nf\_0699 und nf\_1770).

Es konnte in keiner der subzellulären Fraktionen von *N. frontalis* enzymatische Aktivität von CPS nachgewiesen werden (ter Braak, 2004; Gelius-Dietrich et al., 2007). Möglicherweise liegt das an der hohen Instabilität des Proteins, wie es von Pierard und Schröter (1978) in Hefe beobachtet wurde. Aktivitäten weiterer Enzyme des Arginin-Dihydrolase-Weges – der Arginin Deiminase und der Carbamat Kinase – konnten in *N. frontalis* nicht gemessen werden, wohl aber in *T. vaginalis*

<i>N. frontalis</i>	133 LVNPNLQTLQTKG 155	184 SLAPQLLVER 303
<i>A. fumigatus</i>	GVKSVLINPNIATIQTDHKLAD	ASRSLTLAPQILVEKSLKGW
<i>N. crassa</i>	GVASVLINPNIATIQTNHSLAD	AARSLTLSPQILVEKSLKGW
<i>S. pombe</i>	SVHTILINPNIATIQQSSHSLAD	AAKSLSLTPQILVEKSLKGW
<i>S. cerevisiae</i>	NKFTILVNPNIATNQTSHSLADK	AAQSLSLAPQILVEKSLKGW
<i>K. lactis</i>	NKKTILVNPNIATNQTSHSLAD	ASQSLSLAPQILVEKSLKGW
<i>Y. lipolytica</i>	GKQSILINPNIATNQTSHFLAD	AAQSLSLAPQILVEKSLKGW
	. :*:***** *:.* ***:	*:***:*****
<i>N. frontalis</i>	693 LYFEELNFER 712	939 VLDTNFLDLATR 961
<i>A. fumigatus</i>	DTADKLYFEELSYERVMDIY	PFVSKVLGTFNFDVATKALVG-R
<i>N. crassa</i>	DTADKLYFEELSYERVMDIY	PFVSKVLGVNFIDAATKALVG-K
<i>S. pombe</i>	DECERLYFEELSYERVMDIY	PFVSKTLGVNFIDVATRSIID-Q
<i>S. cerevisiae</i>	DEVDRLYFEELSYERVMDIY	PFVSKVLGVNFIEIAVKAFLGGD
<i>K. lactis</i>	DEVDRLYFEELSFERVMDIY	PFVSKVLGVNFIEAAVQAFLS-K
<i>Y. lipolytica</i>	DEVDRLYFEELSFERTMDIY	PFVSKVLGVNFIEVATKALMQ-E
	* :*:*****:***.*****	*****.**.***: *.:***:

**Abbildung 6.2:** Alignment mit Peptiden aus dem Spot Nummer 192 mit andern CPS-Sequenzen. Die Nummerierung der Aminosäurereste bezieht sich auf die Sequenz von *Aspergillus fumigatus*. In das Alignment sind folgende Sequenzen eingegangen: *A. fumigatus* (EAL93302), *N. crassa* (EAA36214), *S. pombe* (CAA22122), *S. cerevisiae* (AAA66902), *K. lactis* (CAG97932) und *Y. lipolytica* (CAG82526).

(ter Braak, 2004; Gelius-Dietrich et al., 2007). Anhand dieser Daten kann *N. frontalis* Arginin nicht wie andere Protisten (Schofield et al., 1992; Yarlett et al., 1994) als Energiequelle über den Arginin-Dihydrolase-Weg nutzen.

## 6.7 Der Umgang mit Sauerstoff

In den Hydrogenosomen der Trichomonaden sind hoch entwickelte Systeme zum Schutz vor Sauerstoff gefunden worden (Coombs et al., 2004; Pütz et al., 2005). Der Lebensraum von *T. vaginalis* ist nicht strikt anaerob. *Trichomonas* zeigt bei sehr geringen Sauerstoffkonzentrationen ein besseres Wachstum und eine erhöhte Acetat-Produktion, was auf eine erhöhte Rate der Substratkettenphosphorylierung schließen lässt (Paget und Lloyd, 1990). Ebenso ist bekannt, daß in den Hydrogenosomen von *Trichomonas* aktiv Wasserstoffperoxid umgesetzt wird (Chapman et al., 1999). Daher müssen Mechanismen vorhanden sein, um sauerstoffempfindliche Enzyme, wie die Hydrogenase und die Pyruvat-Ferredoxin Oxidoreduktase, zu schützen.

Die identifizierte SOD ist vermutlich eisenabhängig (Abschnitt 5.7), ebenso wie die hydrogenosomale SOD der Trichomonaden und die SOD der mitochondrialen Matrix anderer Eukaryoten (Kitchener et al., 1984; Lindmark und Müller, 1974). Die Existenz des bakteriellen Enzyms sowohl in den Hydrogenosomen als auch in den Mitochondrien ist ein weiteres Indiz für den gemeinsamen, eubakteriellen Ursprung beider Organellen.

Der Lebensraum von *N. frontalis* – der Verdauungstrakt der Ruminantia – ist augenscheinlich nicht aerob. Ein Enzym zur Entgiftung reaktiver Sauerstoff Spezies, wie die Superoxid Dismutase, erscheint so auf den ersten Blick überflüssig. Die sauerstoffempfindlichen Enzyme [Fe]-Hydrogenase und PFL sind demnach aufgrund ihrer Umgebung vor einer Inaktivierung geschützt. Untersuchungen an im Rumen lebenden Bakterien, wie z. B. *Streptococcus bovis* zeigen, daß auch in diesen Organismen Superoxid Dismutasen aktiv sind (Holovská et al., 2002b). Akkumulationen von Wasserstoffperoxid wird in Mikroorganismen mit Katalasen und Peroxidasen entgegengewirkt (Hassan und Fridovich, 1978). Im Rumen können Sauerstoffradikale durch partielle Reduktion von Sauerstoff entstehen. Der Sauerstoff selbst kann über das Blut durch die Darmwand diffundieren, oder beispielsweise durch das Trinken von sauerstoffhaltigem Wasser aufgenommen werden. Ebenso können Schadstoffe (z. B. Schwermetalle), die der »Wirt« zu sich nimmt, zu erhöhten Konzentrationen freier Sauerstoffradikale führen (Holovská et al., 2002a,b).

Auch die Identifizierung eines Enzyms aus der Peroxiredoxin/Glutaredoxin Familie in der Proteomanalyse (Abschnitt 5.1 und Abbildung 5.4) und in der EST-Datenbank (co\_0529<sup>1</sup> und co\_0573<sup>2</sup>) lässt darauf schließen, daß in *N. frontalis* ebenfalls ein schützender Mechanismus gegen die Hemmung verschiedener Enzyme durch Sauerstoff vorhanden ist.

## 6.8 Eigenschaften der Hydrogenosomen von *N. frontalis*

Viele Ergebnisse in Bezug auf Hydrogenosomen und deren Herkunft zeigen, daß Hydrogenosomen und Mitochondrien einen monophyletischen Ursprung haben, aber die Hydrogenosomen innerhalb der Eukaryoten polyphyletisch sind (Embley und Martin, 2006). Es gibt Eigenschaften, die in allen Hydrogenosomen

---

1 Mitglieder des Contigs co\_0529: nf\_0514, nf\_0515, nf\_0766 und nf\_1900

2 Mitglieder des Contigs co\_0573: nf\_0562, nf\_1061 und nf\_1835

auftreten (Wasserstoffproduktion, anaerobe Pyruvat-Fermentation), Merkmale, die die Hydrogenosomen verschiedener Organismengruppen voneinander abgrenzen (PFL und OTC in *N. frontalis*, PFOR in *T. vaginalis*) und viele Fähigkeiten, die die Hydrogenosomen mit den »klassischen« Mitochondrien gemeinsam haben (Doppelmembran, ATP-Produktion, Eisen-Schwefel-Cluster Synthese).

Spezielle Attribute der Hydrogenosomen von *N. frontalis* sind die PFL und die PFL-AE und die OTC. In den Hydrogenosomen der Trichomonaden wird die Reaktion von Pyruvat und Coenzym A zu Acetyl-CoA und CO<sub>2</sub> durch die PFOR katalysiert (Müller, 1993). In den anaeroben Pilzen ist mit der PFL und den dazugehörigen Enzymen PFL-AE und AdhE ein bakterieller Glycinradikal-Mechanismus konserviert (Gelius-Dietrich und Henze, 2004).

Die Anwesenheit der PFOR in den anaeroben Pilzen ist umstritten und bis heute nicht eindeutig geklärt (Embley et al., 2003). Unterschiedliche Ergebnisse verschiedener Arbeiten können an variierenden experimentiellen Bedingungen liegen (Marvin-Sikkema et al., 1993; O'Fallon et al., 1991; Yarlett et al., 1986). Auch in dieser Arbeit konnten keine Hinweise auf eine PFOR in *N. frontalis* gefunden werden. Möglicherweise wird die PFOR nur sehr gering exprimiert, so daß die Wahrscheinlichkeit eines Treffers in einer Proteomanalyse oder durch EST-Sequenzierungen sehr klein ist.

Weiterhin sind die Hydrogenosomen von *N. frontalis* am Arginin-Stoffwechsel beteiligt. Die Lokalisation der OTC in den Hydrogenosomen und die Identifizierung weiterer Enzyme des Arginin-Stoffwechsels sprechen gemeinsam mit dem Fehlen enzymatischer Aktivitäten von Enzymen des Arginin-Dihydrolase-Weges für die Beteiligung der OTC an der anabolischen Arginin-Synthese. In diesem Kontext sind die Hydrogenosomen von *N. frontalis* den »klassischen« Mitochondrien ähnlicher, als den Hydrogenosomen von *T. vaginalis*. Hingegen ist die cytosolische OTC und der Arginin-Dihydrolase-Weg – der Verlust einer mitochondrial lokalisierten OTC – ein Merkmal der anaeroben bikonten Organismen. Diese Ergebnisse sind weitere Hinweise für einen gemeinsamen evolutiven Ursprung der Hydrogenosomen der anaeroben Pilze und der Mitochondrien der aeroben Pilze (van der Giezen et al., 1997b, 2003). Ebenso zeigen die Resultate die biochemische Diversität der Hydrogenosomen in unterschiedlichen eukaryotischen Linien (Akhmanova et al., 1999; Boxma et al., 2005; Gelius-Dietrich und Henze, 2004).

Im Unterschied zu den Hydrogenosomen der Parabasalia und den Mitosomen der Diplomonaden und Microsporidien (Katinka et al., 2001; Sutak et al., 2004; Tachezy et al., 2001) wurden keine an der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern

beteiligten Enzyme in *N. frontalis* gefunden. Die Herstellung von FeS-Clustern wird als eine allen Variationen von Mitochondrien gemeinsame Funktion angesehen (Sutak et al., 2004). Die Identifizierung entsprechender Gene oder Proteine in den anaeroben Pilzen würde die Hypothese eines monophyletischen Ursprungs von Mitochondrien, Hydrogenosomen und Mitosomen aller Eukaryoten weiter untermauern.

## 6.9 Ausblick auf weiterführende Arbeiten

Die EST-Sequenzierung und insbesondere die Proteomanalyse bieten die Möglichkeit, ein Organell zu charakterisieren und kennzeichnende Eigenschaften zu ermitteln. Allerdings ist es nicht möglich, so alle Proteine eines Proteoms zu lokalisieren. Gering exprimierte Enzyme werden in der Proteomanalyse nicht gefunden, bzw. sind bei einer EST-Sequenzierung unterrepräsentiert.

Schwierig wird es, auf diese Weise einen co-translationalen Import von Proteinen in das Hydrogenosom – wie er für Mitochondrien gefunden wurde (Ades und Butow, 1980; MacKenzie und Payne, 2004; Marc et al., 2002) – nachzuweisen. Im Weiteren würden Lokalisationsstudien bestimmter Enzyme in Bezug auf das Hydrogenosom weitere Ergebnisse liefern. Dahin gehend ist eine Ausweitung des Methodenspektrums auf ein effizientes Transformationssystem für *N. frontalis* entscheidend.

Durch das laufende Genomsequenzierungs-Projekt bei *Piromyces* sp. – einem mit *N. frontalis* nah verwandten Pilz – wird es möglich, alle vorhandenen Gene zu identifizieren. Desweiteren könnte der Vergleich von Proteomanalysen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen weitere Fragen in Bezug auf den Nährstoffbedarf und den Stoffwechsel klären.

Die Analyse der Proteome weiterer Organismen, wie zum Beispiel das des Ciliaten *Nyctotherus ovalis* durch seine besondere Stellung zwischen Hydrogenosomen und Mitochondrien und anderer Organismengruppen, wird zusätzliche Daten über die Komplexität von Hydrogenosomen liefern. Ebenso können die entsprechenden Genomprojekte dazu beitragen, die evolutive Geschichte der Mitochondrien und deren unterschiedliche Ausprägungen zu verstehen.



# Anhang

---

**Tabelle 6.1:** Accession-Nummern der Sequenzen in den Netzwerken in Abbildung 6.3 (PFL und verwandte Sequenzen) und Abbildung 6.4 (nur die funktionalen PFL-Sequenzen).

Organismus	Accession-Nr.	Protein
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AAD52103	PFL
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	NP_070278	<i>pflD</i>
<i>Azoarcus</i> sp.	AAK50372	BSS
<i>Bacillus anthracis</i>	NP_654440	PFL
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	NP_813649	PFL
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	NP_811867	<i>pflD</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	NP_696127	PFL
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CAF04129	PFL
<i>Clostridium butyricum</i>	AAM54728	<i>dhaB</i> <sup>3</sup>
<i>Clostridium difficile</i>	CAD65889	HPAD
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Q46266PFL	PFL
<i>Enterococcus faecalis</i>	NP_815326	PFL
<i>Escherichia coli</i>	NP_755739	<i>tdcE</i>
<i>Escherichia coli</i>	NP_415423	PFL

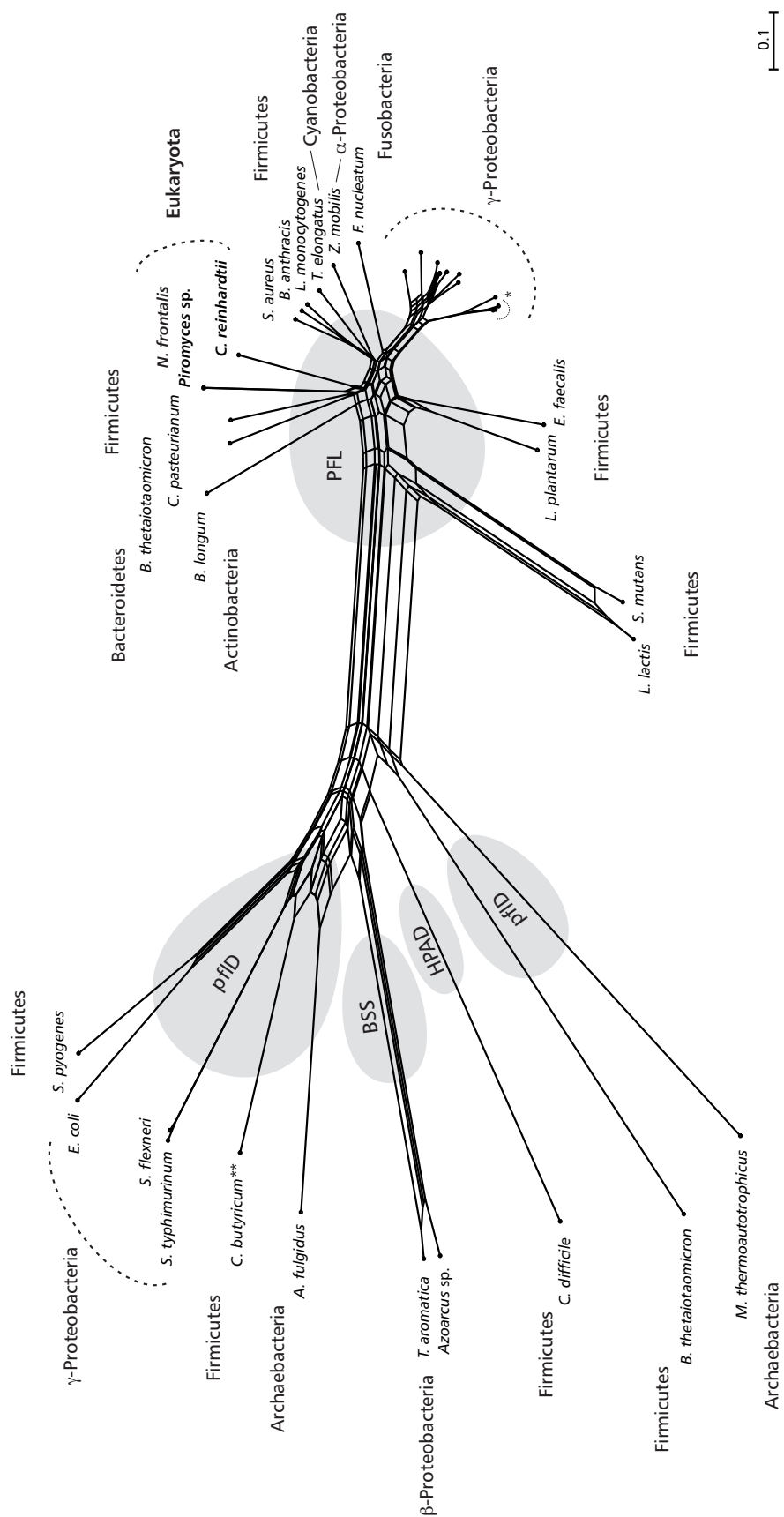
---

<sup>3</sup> Glycerin Dehydratase aus *Clostridium butyricum*.

---

Organismus	Accession-Nr.	Protein
<i>Escherichia coli</i>	BAA35511	<i>pflD</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	EAA23696	PFL
<i>Haemophilus influenzae</i>	P43753	PFL
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NP_786563	PFL
<i>Lactococcus lactis</i>	NP_266820	PFL
<i>Listeria monocytogenes</i>	NP_464931	PFL
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	NP_275489	<i>pflD</i>
<i>Neocallimastix frontalis</i>	AY500825	PFL
<i>Pasteurella multocida</i>	NP_245012	PFL
<i>Piromyces</i> sp.	CAA76352	PFL
<i>Salmonella enterica</i>	NP_455460	PFL
<i>Salmonella typhimurium</i>	NP_462994	<i>pflD</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	NP_462155	<i>tdcE</i>
<i>Shewanella oneidensis</i>	NP_718482	PFL
<i>Shigella flexneri</i>	NP_706821	PFL
<i>Shigella flexneri</i>	NP_709751	<i>pflD</i>
<i>Shigella flexneri</i>	NP_708918	<i>tdcE</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	NP_370750	PFL
<i>Streptococcus mutans</i>	NP_720850	PFL
<i>Streptococcus pyogenes</i>	NP_269993	<i>pflD</i>
<i>Thaueria aromatica</i>	CAA05052	BSS
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	NP_681780	PFL
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NP_797373	PFL
<i>Yersinia pestis</i>	NP_404976	PFL
<i>Zymomonas mobilis</i>	AAF18275	PFL





**Abbildung 6.3:** Neighbor-Net Analyse von PFL und verwandten Sequenzen. \* Produkt des *tdcE*-Gens in  $\gamma$ -Proteobakterien. \*\* Glycerin Dehydratase aus *Clostridium butyricum*.

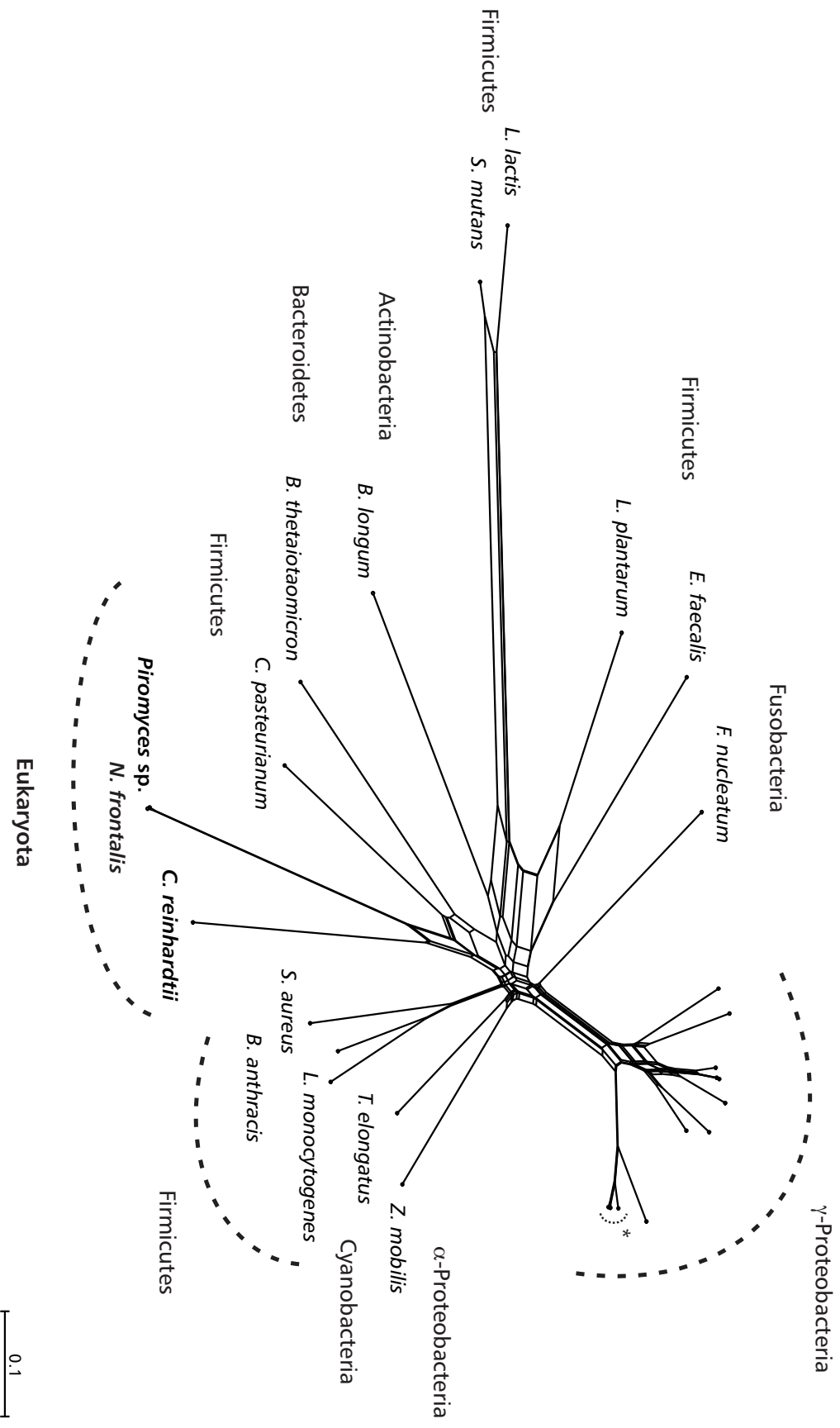


Abbildung 6.4: Neighbor-Net Analyse mit den funktionalen PFLs von Abbildung 6.3. \* Produkt des *tdcE*-Gens in  $\gamma$ -Proteobakterien.

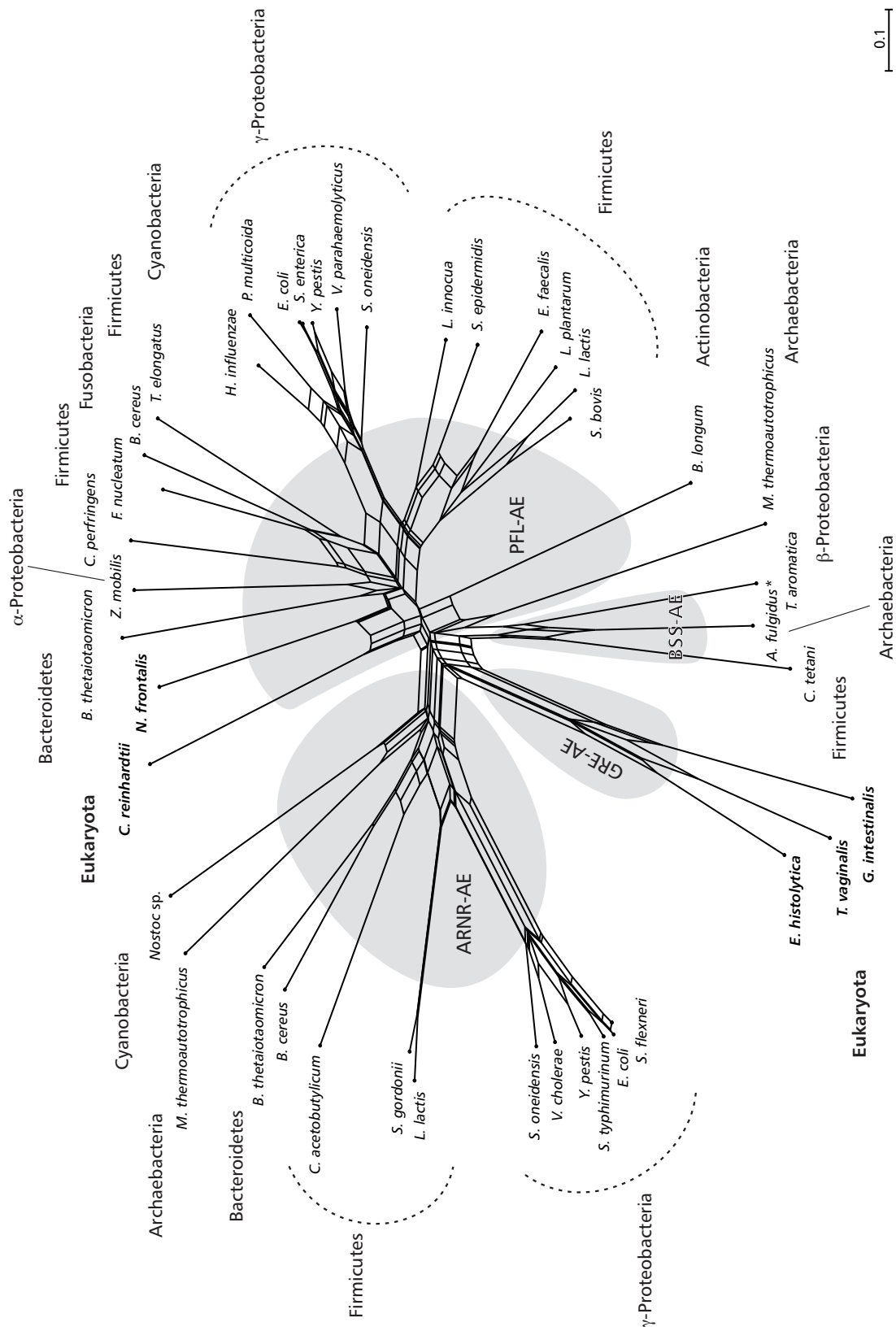
**Tabelle 6.2:** Accession-Nummern der Sequenzen (PFL-AE) im Netzwerk in Abbildung 6.5.

Organismus	Accession-Nr.	Protein
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	NP_070279	PFL-AE
<i>Bacillus cereus</i>	NP_830329	PFL-AE
<i>Bacillus cereus</i>	NP_833334	ARNR-AE
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	NP_813648	PFL-AE
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	NP_810912	ARNR-AE
<i>Bifidobacterium longum</i>	NP_696126	PFL-AE
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CAF04130	PFL-AE
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	NP_347121	ARNR-AE
<i>Clostridium perfringens</i>	NP_562070	PFL-AE
<i>Clostridium tetani</i>	NP_782069	BSS-AE
<i>Entamoeba histolytica</i>	TIGR Genom <sup>4</sup>	GRE-AE
<i>Enterococcus faecalis</i>	NP_815325	PFL-AE
<i>Escherichia coli</i>	NP_286777	PFL-AE
<i>Escherichia coli</i>	NP_290868	ARNR-AE
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	NP_603168	PFL-AE
<i>Giardia intestinalis</i>	AAM94639	GRE-AE
<i>Haemophilus influenzae</i>	NP_438347	PFL-AE
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NP_786564	PFL-AE
<i>Lactococcus lactis</i>	NP_267970	PFL-AE
<i>Lactococcus lactis</i>	NP_266430	ARNR-AE
<i>Listeria innocua</i>	NP_470780	PFL-AE
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	NP_275430	ARNR-AE

<sup>4</sup> Aus dem genomischen Klon 5912 des *Entamoeba histolytica* Genom Projektes.

Organismus	Accession-Nr.	Protein
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	NP_276698	PFL-AE
<i>Neocallimastix frontalis</i>	AY500826	PFL-AE
<i>Nostoc</i> sp.	NP_484774	ARNR-AE
<i>Pasteurella multocida</i>	AAD02826	PFL-AE
<i>Salmonella enterica</i>	NP_455458	PFL-AE
<i>Salmonella typhimurium</i>	AAF60352	ARNR-AE
<i>Shewanella oneidensis</i>	NP_718483	PFL-AE
<i>Shewanella oneidensis</i>	NP_718405	ARNR-AE
<i>Shigella flexneri</i>	NP_709964	ARNR-AE
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NP_763770	PFL-AE
<i>Streptococcus bovis</i>	BAB55635	PFL-AE
<i>Streptococcus gordonii</i>	AAN64574	ARNR-AE
<i>Thauera aromatica</i>	CAA05050	BSS-AE
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	NP_681017	PFL-AE
<i>Trichomonas vaginalis</i>	TIGR Genom <sup>5</sup>	GRE-AE
<i>Vibrio cholerae</i>	NP_232903	ARNR-AE
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NP_797371	PFL-AE
<i>Yersinia pestis</i>	NP_406914	ARNR-AE
<i>Yersinia pestis</i>	NP_670093	PFL-AE
<i>Zymomonas mobilis</i>	AAF18276	PFL-AE

5 Aus dem genomischen Klonen 16052 und 33532 des *Trichomonas vaginalis* Genom Projektes.



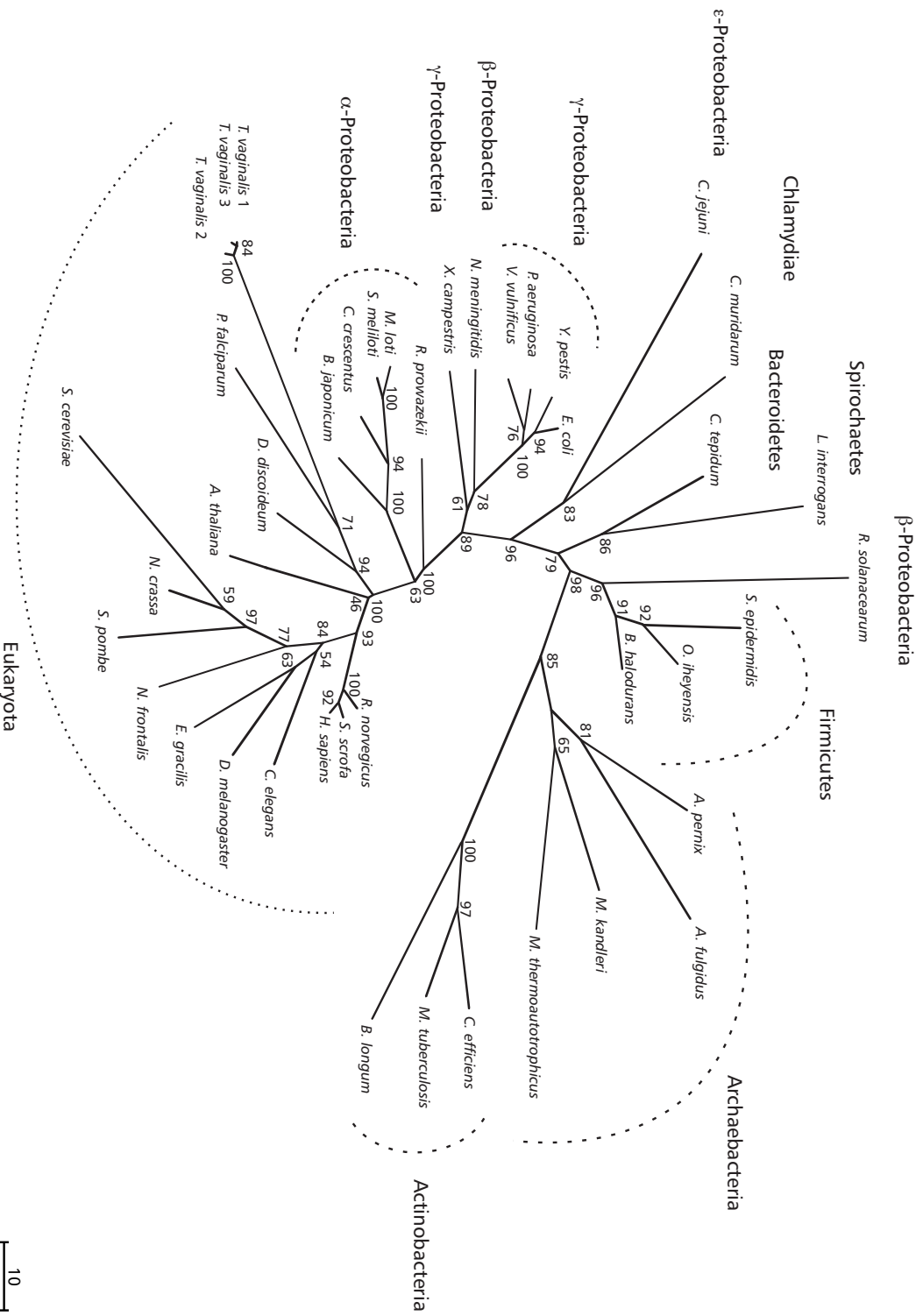
**Abbildung 6.5:** Neighbor-Net Analyse der Sequenzen von PFL-AE, ARNR-AE, BSS-AE und der GRE-AE. \* Die mit den zu BSS-AE homologen Sequenzen gruppierte Sequenz von *A. fulgidus* ist als PFL-AE annotiert.

**Tabelle 6.3:** Accession-Nummern der Sequenzen (SCS  $\alpha$ ) in der phylogenetischen Analyse in Abbildung 6.6.

Organismus	Accession-Nr.
<i>Aeropyrum pernix</i>	BAA80057
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAA48891
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	NP_070368
<i>Bacillus halodurans</i>	NP_243335
<i>Bifidobacterium longum</i>	NP_695914
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	BAC45718
<i>Caenorhabditis elegans</i>	CAA94107
<i>Campylobacter jejuni</i>	CAB75170
<i>Caulobacter crescentus</i>	AAK22325
<i>Chlamydia muridarum</i>	H81729
<i>Chlorobium tepidum</i>	AAM71515
<i>Corynebacterium efficiens</i>	NP_739059
<i>Dictyostelium discoideum</i>	P36967
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_523905
<i>Escherichia coli</i>	BAB34177
<i>Homo sapiens</i>	P53597
<i>Leptospira interrogans</i>	NP_711282
<i>Lycopersicon esculentum</i>	AAN86619
<i>Mesorhizobium loti</i>	BAB50992
<i>Methanopyrus kandleri</i>	AAM01946
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	O26663
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	AAK45227

---

Organismus	Accession-Nr.
<i>Neisseria meningitidis</i>	G81137
<i>Neocallimastix frontalis</i>	AAP13544
<i>Neurospora crassa</i>	T48739
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	NP_692465
<i>Plasmodium falciparum</i>	AAN35685
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B83446
<i>Ralstonia solanacearum</i>	CAD14083
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_446204
<i>Rickettsia prowazekii</i>	O08371
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_014785
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CAB11045
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	CAC47633
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AAO04521
<i>Sus scrofa</i>	1EUC_A
<i>Trichomonas vaginalis</i>	P53401
<i>Trichomonas vaginalis</i>	AAC41559
<i>Trichomonas vaginalis</i>	AAC41558
<i>Vibrio vulnificus</i>	NP_759165
<i>Xanthomonas campestris</i>	NP_638440
<i>Yersinia pestis</i>	CAC89959



**Abbildung 6.6:** Maximum Likelihood Analyse von homologen Sequenzen der SCS ( $\alpha$ -Untereinheit). Die Zahlenwerte an den Verzweigungen sind Bootstrap-Werte nach 1000 Wiederholungen. Die Sequenz von *Esiglena gracilis* wurde freundlicherweise von Christiane Schindeldecker (Institut für Ökologische Pflanzenphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.



co\_0229 1601 nucleotides FastA?  top of page

```

GTGAAGcTAGAGCTCCAGAATTTGTACAAAAGGGTAAAGATGGTAAGGATTTATCCAGATA
TTGATTACGGTCATCACTACTCGTGAAATTTAACTTTATTAAAGCTTAAAGAAGATTAATC
CAGCTGAACCTCCAGATGATAAGTTTGTAGTCyWTTAGGTAATGGTTTCATCTGCTGGTA
ATTTATTCGGTGTACTCGTGGTGGTTATGGAAAGCTGCTAATTCGTAAGCTCAAGTTATTA
CTGGTGTGAAAATCCAAATCCATTTAGGTGAAATTAAGGCTATTCGTGGTCTTGTATGGTA
TTAAGGCTGCTAACGTTCCATTTAAGACTAAGGATGGTAAGGAAGTTAGCGTTTCGTGCTG
CTGTTGTTAGTGGTGGTCCCAATATCCAAAAATTCCTGGAAAAAGATTAAAGAACAAGGAAC
TTGAATTTGATTCATTGAAATGATGATGTCGCCAGGTGGTTGTATTAAATCGTGGTGGTC

```

nf\_0724r 390 1 → 390

nf\_0805f 742 20 → 761

nf\_0165f 599 86 → 684

nf\_0442f 653 146 → 798

nf\_0805r 726 490 → 1215

nf\_0442r 523 965 → 1487

nf\_0165r 579 1003 → 1581

CONSENSUS 1581

	bit Score	E Value
gb   AAK60409.1   <b>hydrogenase</b> [Neocallimastix frontalis]	465	e-129
gb   AAN39277.1   iron <b>hydrogenase</b> precursor [Neocallimastix fronta...	413	e-114
gb   AAL90459.1   [Fe]- <b>hydrogenase</b> [Piromyces sp. E2]	393	e-108
gb   AAD35293.1   NADP-reducing <b>hydrogenase</b> , subunit D, putative [I...	204	5e-51
gb   AAT90438.1   plastid Fe- <b>hydrogenase</b> precursor [Chlamydomonas m...	191	6e-47

**Transport facilitation**  
Ion transport; General

Abbildung 6.7: Beispiel für die Ausgabe eines Suchergebnisses in der EST-Datenbank (Abschnitt 5.9.4.3).



# Einheiten und Abkürzungen

---

A	.....	Ampere
°C	.....	Grad Celsius
c	.....	Zenti $10^2$
Da	.....	Dalton
g	.....	Erdbeschleunigung $1 g = 9,81 \text{ m/s}^2$
g	.....	Gramm
h	.....	Stunde
k	.....	Kilo $10^3$
l	.....	Liter
m	.....	Meter
μ	.....	Mikro $10^{-6}$
m	.....	Milli $10^{-3}$ (als SI-Präfix)
min	.....	Minute
M	.....	Molar mol/l
mol	.....	Mol
n	.....	Nano $10^{-9}$
s	.....	Sekunde
V	.....	Volt
AAT	.....	ATP/ADP Transporter
Ac	.....	Acetat
ACH	.....	Acetyl-CoA Hydrolase, EC: 3.1.2.1
Adh	.....	Alkohol Dehydrogenase, EC: 1.1.1.1–2

ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AE	aktivierendes Enzym
ARNR	anaerobe Ribonukleotid Reduktase, EC: 1.17.4.1–2
ASCT	Acetat-Succinat-CoA Transferase, EC: 2.8.3.-
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
b	Basen
BLAST	engl. Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSS	Benzylsuccinat Synthase, EC: 4.1.99.11
cDNA	copy DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat Hydrat
CoA	Coenzym A
CPS	Carbamoylphosphat Synthase, EC: 6.3.5.5
CTP	Cytidintriphosphat
D	Dimension
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E Value	Erwartungswert
EC	engl. Enzyme Commission numbers
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELF	Elongationsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	engl. expressed sequence tags
et al.	lat. et alii
FastA	engl. Fast-All

---

GAPDH	.....	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase, EC: 1.2.1.12
GRE	.....	Glycinradikal Enzym
HHU	.....	Heinrich-Heine-Universität
HPAD	.....	p-Hydroxyphenylacetat Decarboxylase, EC: 4.1.1.83
Hsp	.....	Hitzeschock Protein
HTML	.....	engl. Hypertext Markup Language
ID	.....	Identifikator
IEF	.....	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	.....	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LB	.....	engl. lysogeny broth
MD	.....	Malat Dehydrogenase, EC: 1.1.1.37
ME	.....	Malat Enzym, EC: 1.1.1.40
MOPS	.....	3-N-(Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	.....	Boten-RNA
NAD <sup>+</sup>	.....	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP <sup>+</sup>	.....	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nd	.....	nicht detektierbar
Nr.	.....	Nummer
OD	.....	optische Dichte
OTC	.....	Ornithin Carbamoyltransferase, EC: 2.1.3.3
PAGE	.....	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	.....	Polymerase-Kettenreaktion
PFL	.....	Pyruvat-Formiat Lyase, EC: 2.3.1.54
PFL-AE	.....	Pyruvat-Formiat Lyase Aktivase, EC: 1.97.1.4
PFOR	.....	Pyruvat-Ferredoxin Oxidoreduktase, EC: 1.2.7.1
pH	.....	pH-Wert: $\text{pH} = -\lg(c_{\text{H}_3\text{O}^+})$ (lat. potentia Hydrogenii)
PHP	.....	engl. Hypertext Preprocessor (urspr. Personal Home Page Tools)

pI	pH-Wert am isoelektrischen Punkt
PNO	Pyruvat-NADP <sup>+</sup> Oxidoreduktase, EC: 1.2.1.51
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoff Spezies
S	Svedberg, Maßeinheit des Sedimentationskoeffizienten. 1 S = 10 <sup>-13</sup> s
SAM	S-Adenosylmethionin
SCS	Succinyl-CoA Ligase, EC: 6.2.1.4-5
SDS	Natriumlaurylsulfat
SMB	Saccharose MOPS β-Mercaptoethanol
SMDI	Saccharose MOPS DTT Protease-Inhibitoren
SOD	Superoxid Dismutase, EC: 1.15.1.1
sp.	Spezies
SQL	engl. Structured Query Language
SSC	Natrium Natriumcitrat
TBST	Tris-Puffer Natrium Tween
TE	Tris EDTA
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TLCK	N <sub>α</sub> -Tosyl-L-Lysin Chloromethyl Keton Hydrochlorid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymaktivität kommerzieller Enzyme, nach Herstellerangaben
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
v	Volumen
vATPase	vacuolar ATPase
w	Gewicht
X-GAL	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

# Literaturverzeichnis

---

- Abbe, K., Takahashi, S. und Yamada, T.** Involvement of oxygen-sensitive pyruvate formate-lyase in mixed-acid fermentation by *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. *J Bacteriol*, 1982. **152**(1):175–182.
- Adachi, J. und Hasegawa, M.** MOLPHY version 2.3 programs for molecular phylogenetics based on maximum likelihood. *Computer Science Monographs*, 1996. **28**.
- Ades, I. Z. und Butow, R. A.** The products of mitochondria-bound cytoplasmic polysomes in yeast. *J Biol Chem*, 1980. **255**(20):9918–9924.
- Akhmanova, A., Voncken, F., van Alen, T., van Hoek, A., Boxma, B., Vogels, G., Veenhuis, M. und Hackstein, J. H.** A hydrogenosome with a genome. *Nature*, 1998. **396**(6711):527–528.
- Akhmanova, A., Voncken, F. G., Hosea, K. M., Harhangi, H., Keltjens, J. T., op den Camp, H. J., Vogels, G. D. und Hackstein, J. H.** A hydrogenosome with pyruvate formate-lyase: anaerobic chytrid fungi use an alternative route for pyruvate catabolism. *Mol Microbiol*, 1999. **32**(5):1103–1114.
- Alexeeva, S., de Kort, B., Sawers, G., Hellingwerf, K. J. und de Mattos, M. J.** Effects of limited aeration and of the ArcAB system on intermediary pyruvate catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2000. **182**(17):4934–4940.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(17):3389–3402.
- Amend, J. P. und Shock, E. L.** Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2001. **25**(2):175–243.

- Atteia, A., van Lis, R., Gelius-Dietrich, G., Adrait, A., Garin, J., Joyard, J., Roland, N. und Martin, W.** Pyruvate formate-lyase and a novel route of eukaryotic ATP synthesis in *Chlamydomonas* mitochondria. *J Biol Chem*, 2006. **281**(15):9909–9918.
- Van der Auwera, G. und De Wachter, R.** Large-subunit rRNA sequence of the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*, and implications for the evolution of zoosporic fungi. *J Mol Evol*, 1996. **43**(5):476–483.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K. und Miyano, S.** Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics*, 2002. **18**(2):298–305.
- Bauchop, T.** Biology of gut anaerobic fungi. *Biosystems*, 1989. **23**(1):53–64.
- Becker, A., Fritz-Wolf, K., Kabsch, W., Knappe, J., Schultz, S. und Volker Wagner, A. F.** Structure and mechanism of the glycyl radical enzyme pyruvate formate-lyase. *Nat Struct Biol*, 1999. **6**(10):969–975.
- Benchimol, M.** New ultrastructural observations on the skeletal matrix of *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res*, 2005. **97**(5):408–416.
- Benchimol, M. und De Souza, W.** Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. *J Protozool*, 1983. **30**(2):422–425.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. und Brunak, S.** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 2004. **340**(4):783–795.
- Biagini, G. A., Yarlett, N., Ball, G. E., Billetz, A. C., Lindmark, D. G., Martinez, M. P., Lloyd, D. und Edwards, M. R.** Bacterial-like energy metabolism in the amitochondriate protozoon *Hexamita inflata*. *Mol Biochem Parasitol*, 2003. **128**(1):11–19.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J.** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 1987. **8**(2):93–99.
- Bonaldo, M. F., Lennon, G. und Soares, M. B.** Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res*, 1996. **6**(9):791–806.
- Borneman, S. und Akin, D.** The nature of anaerobic fungi and their polysaccharide degrading enzymes. *Mycoscience*, 1994. **35**(2):199–211.



- Boxma, B., de Graaf, R. M., van der Staay, G. W. M., van Alen, T. A., Ricard, G., Gabaldon, T., van Hoek, A. H. A. M., Moon-van der Staay, S. Y., Koopman, W. J. H., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G. M., Friedrich, T., Veenhuis, M., Huynen, M. A. und Hackstein, J. H. P.** An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature*, 2005. **434**(7029):74–79.
- ter Braak, M.** *Arginin-Dihydrolase Weg und Harnstoffzyklus in dem anaeroben Chytridiomyceten Neocallimastix frontalis*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2004.
- Bradford, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. **72**:248–254.
- Brandina, I., Graham, J., Lemaitre-Guillier, C., Entelis, N., Krasheninnikov, I., Sweetlove, L., Tarassov, I. und Martin, R. P.** Enolase takes part in a macromolecular complex associated to mitochondria in yeast. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1757**(9-10):1217–1228.
- Bridger, W. A., Wolodko, W. T., Henning, W., Upton, C., Majumdar, R. und Williams, S. P.** The subunits of succinyl-coenzyme A synthetase – function and assembly. *Biochem Soc Symp*, 1987. **54**:103–111.
- Broderick, J., Duderstadt, R., Fernandez, D., Wojtuszewski, K., Henshaw, T. und Johnson, M.** Pyruvate formate-lyase activating enzyme is an iron-sulfur protein. *J Am Chem Soc*, 1997. **119**(31):7396–7397.
- Brondijk, T. H., Durand, R., van der Giezen, M., Gottschal, J. C., Prins, R. A. und Fèvre, M.** scsB, a cDNA encoding the hydrogenosomal beta subunit of succinyl-CoA synthetase from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Mol Gen Genet*, 1996. **253**(3):315–323.
- Brown, D. M., Upcroft, J. A., Edwards, M. R. und Upcroft, P.** Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Int J Parasitol*, 1998. **28**(1):149–164.
- Bryant, D. und Moulton, V.** Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol Biol Evol*, 2004. **21**(2):255–265.

- Bui, E. T., Bradley, P. J. und Johnson, P. J.** A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(18):9651–9656.
- Buu, L.-M., Chen, Y.-C. und Lee, F.-J. S.** Functional characterization and localization of acetyl-CoA hydrolase, Ach1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(19):17203–17209.
- Cavalier-Smith, T.** A 6-kingdom classification and a unified phylogeny. In **Schenk, H. E. A. und Schwemmler, W.** (Herausgeber) *Endocytobiology II*. De Gruyter, Berlin, 1983. 1027–1034.
- Cavalier-Smith, T.** The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of protozoa. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002. **52**(Pt 2):297–354.
- Cavalier-Smith, T.** Only six kingdoms of life. *Proc Biol Sci*, 2004. **271**(1545):1251–1262.
- Cavalier-Smith, T. und Chao, E. E.** Molecular phylogeny of the free-living archaeozoan *Trepomonas agilis* and the nature of the first eukaryote. *J Mol Evol*, 1996. **43**(6):551–562.
- Chapman, A., Linstead, D. J. und Lloyd, D.** Hydrogen peroxide is a product of oxygen consumption by *Trichomonas vaginalis*. *J Biosci*, 1999. **24**(3):339–344.
- Claros, M. G. und Vincens, P.** Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem*, 1996. **241**(3):779–786.
- Clemens, D. L. und Johnson, P. J.** Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. *Mol Biochem Parasitol*, 2000. **106**(2):307–313.
- Coombs, G. H., Westrop, G. D., Suchan, P., Puzova, G., Hirt, R. P., Embley, T. M., Mottram, J. C. und Müller, S.** The amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis* contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system. *J Biol Chem*, 2004. **279**(7):5249–5256.
- Dacks, J. B., Dyal, P. L., Embley, T. M. und van der Giezen, M.** Hydrogenosomal succinyl-CoA synthetase from the rumen-dwelling fungus *Neocallimastix*

- patriciarum*; an energy-producing enzyme of mitochondrial origin. *Gene*, 2006. **373**:75–82.
- Davis, R. H.** Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, 1986. **50**(3):280–313.
- Doeller, J. E., Grieshaber, M. K. und Kraus, D. W.** Chemolithoheterotrophy in a metazoan tissue: thiosulfate production matches ATP demand in ciliated mussel gills. *J Exp Biol*, 2001. **204**(Pt 21):3755–3764.
- Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J. und Lithgow, T.** Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science*, 2006. **313**(5785):314–318.
- Durand, R., Fischer, M., Rascle, C. und Fèvre, M.** *Neocallimastix frontalis* enolase gene, enol: first report of an intron in an anaerobic fungus. *Microbiology*, 1995. **141**(Pt 6):1301–1308.
- Dyall, S. D., Koehler, C. M., Delgadillo-Correa, M. G., Bradley, P. J., Plümper, E., Leuenberger, D., Turck, C. W. und Johnson, P. J.** Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(7):2488–2497.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. und von Heijne, G.** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, 2000. **300**(4):1005–1016.
- Embley, T. M. und Martin, W.** Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature*, 2006. **440**(7084):623–630.
- Embley, T. M., van der Giezen, M., Horner, D. S., Dyal, P. L. und Foster, P.** Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2003. **358**(1429):191–201.
- Esser, C., Ahmadinejad, N., Wiegand, C., Rotte, C., Sebastiani, F., Gelius-Dietrich, G., Henze, K., Kretschmann, E., Richly, E., Leister, D., Bryant, D., Steel, M. A., Lockhart, P. J., Penny, D. und Martin, W.** A genome phylogeny for mitochondria among  $\alpha$ -proteobacteria and a predominantly eubacterial ancestry of yeast nuclear genes. *Mol Biol Evol*, 2004. **21**(9):1643–1660.

- Esser, C., Martin, W. und Dagan, T.** The origin of mitochondria in light of a fluid prokaryotic chromosome model. *Biol Lett*, 2007. **3**(2):180–184.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B.** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, 1983. **132**(1):6–13.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B.** “A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity”. Addendum. *Anal Biochem*, 1984. **137**(1):266–267.
- Felsenstein, J.** PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 1989. **5**(1):164–166.
- Florin, L., Tsokoglou, A. und Happe, T.** A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain. *J Biol Chem*, 2001. **276**(9):6125–6132.
- Freedman, R. B., Hirst, T. R. und Tuite, M. F.** Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci*, 1994. **19**(8):331–336.
- Frey, M., Rothe, M., Wagner, A. F. und Knappe, J.** Adenosylmethionine-dependent synthesis of the glycyl radical in pyruvate formate-lyase by abstraction of the glycine C-2 pro-S hydrogen atom. Studies of [2H]glycine-substituted enzyme and peptides homologous to the glycine 734 site. *J Biol Chem*, 1994. **269**(17):12432–12437.
- Gabaldon, T. und Huynen, M. A.** Shaping the mitochondrial proteome. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1659**(2-3):212–220.
- Gabaldon, T. und Huynen, M. A.** Lineage-specific gene loss following mitochondrial endosymbiosis and its potential for function prediction in eukaryotes. *Bioinformatics*, 2005. **21**(Suppl 2):ii144–ii150.
- Gauld, J. und Eriksson, L.** Oxidative degradation of pyruvate formate-lyase. *J Am Chem Soc*, 2000. **122**(9):2035–2040.
- Gelius-Dietrich, G. und Henze, K.** Pyruvate formate lyase (PFL) and PFL activating enzyme in the chytrid fungus *Neocallimastix frontalis*: a free-radical enzyme system conserved across divergent eukaryotic lineages. *J Eukaryot Microbiol*, 2004. **51**(4):456–463.

- Gelius-Dietrich, G., ter Braak, M. und Henze, K.** Mitochondrial steps of arginine biosynthesis are conserved in the hydrogenosomes of the chytridiomycete *Neocallimastix frontalis*. *J Eukaryot Microbiol*, 2007. **54**(1):42–44.
- Germot, A., Philippe, H. und Le Guyader, H.** Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(25):14614–14617.
- Gershoni, J. M. und Palade, G. E.** Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem*, 1983. **131**(1):1–15.
- Giegé, P., Heazlewood, J. L., Roessner-Tunali, U., Millar, A. H., Fernie, A. R., Leaver, C. J. und Sweetlove, L. J.** Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell*, 2003. **15**(9):2140–2151.
- van der Giezen, M., Rechinger, K. B., Svendsen, I., Durand, R., Hirt, R. P., Fèvre, M., Embley, T. M. und Prins, R. A.** A mitochondrial-like targeting signal on the hydrogenosomal malic enzyme from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: support for the hypothesis that hydrogenosomes are modified mitochondria. *Mol Microbiol*, 1997a. **23**(1):11–21.
- van der Giezen, M., Sjollema, K. A., Artz, R. R., Alkema, W. und Prins, R. A.** Hydrogenosomes in the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* have a double membrane but lack an associated organelle genome. *FEBS Lett*, 1997b. **408**(2):147–150.
- van der Giezen, M., Kiel, J. A., Sjollema, K. A. und Prins, R. A.** The hydrogenosomal malic enzyme from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* is targeted to mitochondria of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr Genet*, 1998. **33**(2):131–135.
- van der Giezen, M., Birdsey, G. M., Horner, D. S., Lucocq, J., Dyal, P. L., Benchimol, M., Danpure, C. J. und Embley, T. M.** Fungal hydrogenosomes contain mitochondrial heat-shock proteins. *Mol Biol Evol*, 2003. **20**(7):1051–1061.
- Görg, A., Postel, W., Günther, S. und Weser, J.** Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis*, 1985. **6**(12):599–604.

- Görg, A., Postel, W. und Günther, S.** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 1988. **9**(9):531–546.
- Graham, J. W. A., Williams, T. C. R., Morgan, M., Fernie, A. R., Ratcliffe, R. G. und Sweetlove, L. J.** Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *Plant Cell*, 2007. **19**(11):3723–3738.
- Gray, M. W.** Evolutionary biology: the hydrogenosome's murky past. *Nature*, 2005. **434**(7029):29–31.
- Gray, M. W., Burger, G. und Lang, B. F.** Mitochondrial evolution. *Science*, 1999. **283**(5407):1476–1481.
- Gray, M. W., Lang, B. F. und Burger, G.** Mitochondria of protists. *Annu Rev Genet*, 2004. **38**:477–524.
- van Grinsven, K. W. A., Rosnowsky, S., van Weelden, S. W. H., Pütz, S., van der Giezen, M., Martin, W., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G. M. und Henze, K.** Acetate:succinate CoA-transferase in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: identification and characterization. *J Biol Chem*, 2008. **283**(3):1411–1418.
- Gubler, U. und Hoffman, B. J.** A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, 1983. **25**(2–3):263–269.
- Hackstein, J. H., Akhmanova, A., Boxma, B., Harhangi, H. R. und Voncken, F. G.** Hydrogenosomes: eukaryotic adaptations to anaerobic environments. *Trends Microbiol*, 1999. **7**(11):441–447.
- Hannaert, V., Brinkmann, H., Nowitzki, U., Lee, J. A., Albert, M. A., Sensen, C. W., Gaasterland, T., Müller, M., Michels, P. und Martin, W.** Enolase from *Trypanosoma brucei*, from the amitochondriate protist *Mastigamoeba balamuthi*, and from the chloroplast and cytosol of *Euglena gracilis*: pieces in the evolutionary puzzle of the eukaryotic glycolytic pathway. *Mol Biol Evol*, 2000. **17**(7):989–1000.
- Happe, T., Mosler, B. und Naber, J. D.** Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem*, 1994. **222**(3):769–774.

- Hashimoto, T., Nakamura, Y., Kamaishi, T. und Hasegawa, M.** Early evolution of eukaryotes inferred from protein phylogenies of translation elongation factors 1 $\alpha$  and 2. *Arch. Protistenkd.*, 1997. **148**(3):287–295.
- Hassan, H. M. und Fridovich, I.** Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1978. **253**(18):6445–6420.
- Henze, K.** The proteome of *T. vaginalis* hydrogenosomes. In **Tachezy, J.** (Herausgeber) *Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of Anaerobic Eukaryotes*, Band 9 von *Microbiology Monographs*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2008. 163–178.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R.** Increased sensitivity for coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem development unit. *Electrophoresis*, 1988. **9**(1):60–61.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lucking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y.-C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Koljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K.-H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.-M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schussler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y.-J. und Zhang, N.** A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res*, 2007. **111**(Pt 5):509–547.
- Hinkle, P. C., Kumar, M. A., Resetar, A. und Harris, D. L.** Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry*, 1991. **30**(14):3576–3582.
- Hoffmeister, M., Piotrowski, M., Nowitzki, U. und Martin, W.** Mitochondrial *trans*-2-enoyl-CoA reductase of wax ester fermentation from *Euglena gracilis* defines a new family of enzymes involved in lipid synthesis. *J Biol Chem*, 2005. **280**(6):4329–4338.

- Holovská, K., Lenártová, V., Holovská, K. und Javorský, P.** Characterization of superoxide dismutase in the rumen bacterium *Streptococcus bovis*. *Vet Med (Praha)*, 2002a. **47**(2–3):38–44.
- Holovská, K., Lenártová, V., Holovská, K., Pristaš, P. und Javorský, P.** Are ruminal bacteria protected against environmental stress by plant antioxidants? *Lett Appl Microbiol*, 2002b. **35**(4):301–304.
- Honigberg, B. M., Volkmann, D., Entzeroth, R. und Scholtzyseck, E.** A freeze-fracture electron microscope study of *Trichomonas vaginalis* Donne and *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller). *J Protozool*, 1984. **31**(1):116–131.
- Horner, D. S., Hirt, R. P., Kilvington, S., Lloyd, D. und Embley, T. M.** Molecular data suggest an early acquisition of the mitochondrion endosymbiont. *Proc Biol Sci*, 1996. **263**(1373):1053–1059.
- Horner, D. S., Hirt, R. P. und Embley, T. M.** A single eubacterial origin of eukaryotic pyruvate:ferredoxin oxidoreductase genes: implications for the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol Biol Evol*, 1999. **16**(9):1280–1291.
- Horner, D. S., Foster, P. G. und Embley, T. M.** Iron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol Biol Evol*, 2000. **17**(11):1695–1709.
- Horner, D. S., Heil, B., Happe, T. und Embley, T. M.** Iron hydrogenases—ancient enzymes in modern eukaryotes. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(3):148–153.
- Hrdý, I. und Müller, M.** Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *trichomonas vaginalis*. *J Mol Evol*, 1995. **41**(3):388–396.
- Huson, D. H.** SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics*, 1998. **14**(1):68–73.
- Huson, D. H. und Bryant, D.** Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*, 2006. **23**(2):254–267.
- Jensen, O. N., Wilm, M., Shevchenko, A. und Mann, M.** Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels. In **Link, A. J.** (Herausgeber) *Methods in molecular biology*<sup>TM</sup>, Band 112, Kapitel 52. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999. 513–530.



- Joyce, M. A., Fraser, M. E., James, M. N., Bridger, W. A. und Wolodko, W. T.** ADP-binding site of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase revealed by x-ray crystallography. *Biochemistry*, 2000. **39**(1):17–25.
- Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J. und Vivarès, C. P.** Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 2001. **414**(6862):450–453.
- Keithly, J. S., Langreth, S. G., Buttle, K. F. und Mannella, C. A.** Electron tomographic and ultrastructural analysis of the *Cryptosporidium parvum* relict mitochondrion, its associated membranes, and organelles. *J Eukaryot Microbiol*, 2005. **52**(2):132–140.
- Kessler, D., Herth, W. und Knappe, J.** Ultrastructure and pyruvate formate-lyase radical quenching property of the multienzymic AdhE protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(25):18073–18079.
- Kitchener, K. R., Meshnick, S. R., Fairfield, A. S. und Wang, C. C.** An iron-containing superoxide dismutase in *Tritrichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol*, 1984. **12**(1):95–99.
- Kremer, D. R., Nienhuis-Kuiper, H. E., Timmer, C. J. und Hansen, T. A.** Catabolism of malate and related dicarboxylic acids in various *Desulfovibrio* strains and the involvement of an oxygen-labile NADPH dehydrogenase. *Arch Microbiol*, 1989. **151**:34–39.
- Kreuzberg, K.** Starch fermentation via a formate producing pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorogonium elongatum* and *Chlorella fusca*. *Physiol Plant*, 1984. **61**(1):87–94.
- Kreuzberg, K.** Pyruvate degradation via pyruvate formate-lyase (EC 2.3.1.54) and the enzymes of formate fermentation in the green alga *Chlorogonium elongatum*. *Planta*, 1985. **163**(1):60–67.
- Kreuzberg, K., Klöck, G. und Grobheiser, D.** Subcellular distribution of pyruvate-degrading enzymes in *Chlamydomonas reinhardtii* studied by an improved protoplast fractionation procedure. *Physiol Plant*, 1987. **69**(3):481–488.

- Krieger, C. J., Roseboom, W., Albracht, S. P. und Spormann, A. M.** A stable organic free radical in anaerobic benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* sp. strain T. *J Biol Chem*, 2001. **276**(16):12924–12927.
- Kuan, J. und Saier, M. H. J.** The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional, and evolutionary relationships. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1993. **28**(3):209–233.
- Külzer, R., Pils, T., Kappl, R., Hüttermann, J. und Knappe, J.** Reconstitution and characterization of the polynuclear iron-sulfur cluster in pyruvate formate-lyase-activating enzyme. Molecular properties of the holoenzyme form. *J Biol Chem*, 1998. **273**(9):4897–4903.
- Kunji, E. R. S.** The role and structure of mitochondrial carriers. *FEBS Lett*, 2004. **564**(3):239–244.
- Laemmli, U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. **227**(5259):680–685.
- Lake, J., Moore, J. E., Simonson, A. und Rivera, M. C.** Fulfilling darwin's dream. In **Sapp, J.** (Herausgeber) *Microbial Phylogeny and Evolution: Concepts and Controversies*, Kapitel 9. Oxford University Press, Oxford, 2005. 184 pp.
- Leipe, D. D., Gunderson, J. H., Nerad, T. A. und Sogin, M. L.** Small subunit ribosomal RNA<sup>+</sup> of *Hexamita inflata* and the quest for the first branch in the eukaryotic tree. *Mol Biochem Parasitol*, 1993. **59**(1):41–48.
- Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., Horth, P., Haehnel, W., Schiltz, E., Schagger, H. und Heider, J.** Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol Microbiol*, 1998. **28**(3):615–628.
- Lill, R. und Mühlenhoff, U.** Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci*, 2005. **30**(3):133–141.
- Lindmark, D. G. und Müller, M.** Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J Biol Chem*, 1973. **248**(22):7724–7728.

- Lindmark, D. G. und Müller, M.** Superoxide dismutase in the anaerobic flagellates, *Tritrichomonas foetus* and *Monocercomonas* sp. *J Biol Chem*, 1974. **249**(14):4634–4637.
- Linstead, D. und Cranshaw, M. A.** The pathway of arginine catabolism in the parasitic flagellate *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*, 1983. **8**(3):241–252.
- Lloyd, D.** Obligate anaerobe or not. *Nature*, 1996. **381**(6578):121.
- Lockhart, P. J., Steel, M. A., Hendy, M. D. und Penny, D.** Recovering evolutionary trees under a more realistic model of sequence evolution. *Mol Biol Evol*, 1994. **11**(4):605–612.
- Lowe, S. E., Griffith, G. W., Milne, A., Theodorou, M. K. und Trinci, A. P. J.** The life cycle and growth kinetics of an anaerobic rumen fungus. *J Gen Microbiol*, 1987. **133**:1815–1827.
- MacKenzie, J. A. und Payne, R. M.** Ribosomes specifically bind to mammalian mitochondria via protease-sensitive proteins on the outer membrane. *J Biol Chem*, 2004. **279**(11):9803–9810.
- Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinski, M. und Jacq, C.** Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep*, 2002. **3**(2):159–164.
- Margulis, L., Dolan, M. E. und Whiteside, J. H.** “Imperfections and oddities” in the origin of the nucleus. *Paleobiology*, 2005. **31**(2):175–191.
- Martin, W. und Müller, M.** The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*, 1998. **392**(6671):37–41.
- Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hapsmann, S., Hasegawa, M. und Kowallik, K. V.** Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature*, 1998. **393**(6681):162–165.
- Martin, W., Hoffmeister, M., Rotte, C. und Henze, K.** An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biol Chem*, 2001. **382**(11):1521–1539.

- Martin, W., Rotte, C., Hoffmeister, M., Theißen, U., Gelius-Dietrich, G., Ahr, S. und Henze, K.** Early cell evolution, eukaryotes, anoxia, sulfide, oxygen, fungi first (?), and a tree of genomes revisited. *IUBMB Life*, 2003. **55**(4-5):193–204.
- Marvin-Sikkema, F. D., Pedro Gomes, T. M., Grivet, J. P., Gottschal, J. C. und Prins, R. A.** Characterization of hydrogenosomes and their role in glucose metabolism of *Neocallimastix* sp. L2. *Arch Microbiol*, 1993. **160**(5):388–396.
- Melchiorson, C. R., Jokumsen, K. V., Villadsen, J., Johnsen, M. G., Israelsen, H. und Arnau, J.** Synthesis and posttranslational regulation of pyruvate formate-lyase in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 2000. **182**(17):4783–4788.
- Moreira, D. und Lopez-Garcia, P.** Symbiosis between methanogenic archaea and  $\delta$ -proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. *J Mol Evol*, 1998. **47**(5):517–530.
- Müller, M.** Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annu Rev Microbiol*, 1988. **42**:465–488.
- Müller, M.** The hydrogenosome. *J Gen Microbiol*, 1993. **139**(12):2879–2889.
- Müller, M. und Martin, W.** (Herausgeber) *Origin of Mitochondria and Hydrogenosomes*. 1. Auflage. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2007.
- Nakai, K. und Horton, P.** PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci*, 1999. **24**(1):34–36.
- Neuhoff, V., Stamm, R. und Eibl, H.** Clear background and highly sensitive protein staining with coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis*, 1985. **6**(9):427–448.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G.** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*, 1997. **10**(1):1–6.
- Nixon, J. E. J., Wang, A., Field, J., Morrison, H. G., McArthur, A. G., Sogin, M. L., Loftus, B. J. und Samuelson, J.** Evidence for lateral transfer of genes encoding ferredoxins, nitroreductases, NADH oxidase, and alcohol dehydrogenase 3 from anaerobic prokaryotes to *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell*, 2002. **1**(2):181–190.

- O'Fallon, J. V., Wright, R. W. J. und Calza, R. E.** Glucose metabolic pathways in the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. *Biochem J*, 1991. 274(Pt 2):595–599.
- Orpin, C. G.** Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J Gen Microbiol*, 1975. 91(2):249–262.
- Page-Sharp, M., Behm, C. A. und Smith, G. D.** *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*: the pattern of inactivation of hydrogenase activity by oxygen and activities of catalase and ascorbate peroxidase. *Microbiology*, 1996. 142(Pt 1):207–211.
- Paget, T. A. und Lloyd, D.** *Trichomonas vaginalis* requires traces of oxygen and high concentrations of carbon dioxide for optimal growth. *Mol Biochem Parasitol*, 1990. 41(1):65–72.
- Pelroy, R. A., Rippka, R. und Stanier, R. Y.** Metabolism of glucose by unicellular blue-green algae. *Arch Mikrobiol*, 1972. 87(4):303–322.
- Pierard, A. und Schröter, B.** Structure-function relationships in the arginine pathway carbamoylphosphate synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1978. 134(1):167–176.
- Prokisch, H., Scharfe, C., Camp, D. G. n., Xiao, W., David, L., Andreoli, C., Monroe, M. E., Moore, R. J., Gritsenko, M. A., Kozany, C., Hixson, K. K., Mottaz, H. M., Zischka, H., Ueffing, M., Herman, Z. S., Davis, R. W., Meitinger, T., Oefner, P. J., Smith, R. D. und Steinmetz, L. M.** Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol*, 2004. 2(6):e160.
- Pütz, S.** *Charakterisierung des hydrogenosomalen Proteoms aus dem mikroaerophilen Humanparasiten Trichomonas vaginalis*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2007.
- Pütz, S., Gelius-Dietrich, G., Piotrowski, M. und Henze, K.** Rubrerythrin and peroxiredoxin: two novel putative peroxidases in the hydrogenosomes of the microaerophilic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*, 2005. 142(2):212–223.

- Pütz, S., Dolezal, P., Gelius-Dietrich, G., Bohacova, L., Tachezy, J. und Henze, K.** Fe-hydrogenase maturases in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell*, 2006. **5**(3):579–586.
- Raynaud, C., Sarçabal, P., Meynial-Salles, I., Croux, C. und Soucaille, P.** Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(9):5010–5015.
- Reichard, P.** Ribonucleotide reductases: the evolution of allosteric regulation. *Arch Biochem Biophys*, 2002. **397**(2):149–155.
- Reynolds, E. S.** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, 1963. **17**:208–212.
- Rice, P., Longden, I. und Bleasby, A.** EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet*, 2000. **16**(6):276–277.
- Richly, E., Chinnery, P. F. und Leister, D.** Evolutionary diversification of mitochondrial proteomes: implications for human disease. *Trends Genet*, 2003. **19**(7):356–362.
- Roger, A. J., Clark, C. G. und Doolittle, W. F.** A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(25):14618–14622.
- Rokas, A., Williams, B. L., King, N. und Carroll, S. B.** Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature*, 2003. **425**(6960):798–804.
- Rotte, C., Stejskal, F., Zhu, G., Keithly, J. S. und Martin, W.** Pyruvate : NADP<sup>+</sup> oxidoreductase from the mitochondrion of *Euglena gracilis* and from the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*: a biochemical relic linking pyruvate metabolism in mitochondriate and amitochondriate protists. *Mol Biol Evol*, 2001. **18**(5):710–720.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(12):5463–5467.

- Sawers, G. und Watson, G.** A glycyl radical solution: oxygen-dependent interconversion of pyruvate formate-lyase. *Mol Microbiol*, 1998. **29**(4):945–954.
- Schofield, P. J., Edwards, M. R., Matthews, J. und Wilson, J. R.** The pathway of arginine catabolism in *Giardia intestinalis*. *Mol Biochem Parasitol*, 1992. **51**(1):29–36.
- Schönheit, P. und Schäfer, T.** Metabolism of hyperthermophiles. *World J Microbiol Biotechnol*, 1995. **11**(1):26–57.
- Searcy, D. G.** Origins of mitochondria and chloroplasts from sulfur-based symbioses. In **Hartman, H. und Matsuno, K.** (Herausgeber) *Origins and Evolution of Prokaryotic and Eukaryotic Cells*. World Scientific Publishing, Singapore, 1992. 47–78.
- Selig, M., Xavier, K. B., Santos, H. und Schönheit, P.** Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*. *Arch Microbiol*, 1997. **167**(4):217–232.
- Selmer, T. und Andrei, P. I.** p-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile*. A novel glycyl radical enzyme catalysing the formation of p-cresol. *Eur J Biochem*, 2001. **268**(5):1363–1372.
- Smith, D. G. S., Gawryluk, R. M. R., Spencer, D. F., Pearlman, R. E., Siu, K. W. M. und Gray, M. W.** Exploring the mitochondrial proteome of the ciliate protozoon *Tetrahymena thermophila*: direct analysis by tandem mass spectrometry. *J Mol Biol*, 2007. **374**(3):837–863.
- Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Jelene, P., Su, L., Lawton, L. und Efstratiadis, A.** Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(20):9228–9232.
- Söhling, B. und Gottschalk, G.** Molecular analysis of the anaerobic succinate degradation pathway in *Clostridium kluyveri*. *J Bacteriol*, 1996. **178**(3):871–880.
- Srere, P. A.** Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu Rev Biochem*, 1987. **56**:89–124.
- Stams, A. J. M., Kremer, D. R., Nicolay, C., Weenk, G. H. und Hansen, T. A.** Pathway of propionate formation in *Desulfobulbus propionicus*. *Arch Microbiol*, 1984. **139**:167–173.

- Stechmann, A. und Cavalier-Smith, T.** Rooting the eukaryote tree by using a derived gene fusion. *Science*, 2002. **297**(5578):89–91.
- Stechmann, A. und Cavalier-Smith, T.** The root of the eukaryote tree pinpointed. *Curr Biol*, 2003. **13**(17):R665–R666.
- Stempak, J. G. und Ward, R. T.** An improved staining method for electron microscopy. *J Cell Biol*, 1964. **22**:697–701.
- Strugger, S.** Die Uranylacetat-Kontrastierung für die elektronenmikroskopische Untersuchung von Pflanzenzellen. *Naturwissenschaften*, 1956. **43**(15):357–358.
- Sutak, R., Dolezal, P., Fiumera, H. L., Hrdy, I., Dancis, A., Delgadillo-Correa, M., Johnson, P. J., Müller, M. und Tachezy, J.** Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(28):10368–10373.
- Tachezy, J., Sánchez, L. B. und Müller, M.** Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. *Mol Biol Evol*, 2001. **18**(10):1919–1928.
- Teunissen, M. J., Op den Camp, H. J., Orpin, C. G., Huis in 't Veld, J. H. und Vogels, G. D.** Comparison of growth characteristics of anaerobic fungi isolated from ruminant and non-ruminant herbivores during cultivation in a defined medium. *J Gen Microbiol*, 1991. **137**(6):1401–1408.
- Thauer, R. K., Kirchniawy, F. H. und Jungermann, K. A.** Properties and function of the pyruvate-formate-lyase reaction in clostridia. *Eur J Biochem*, 1972. **27**(2):282–290.
- Theißen, U., Hoffmeister, M., Grieshaber, M. und Martin, W.** Single eubacterial origin of eukaryotic sulfide:quinone oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times. *Mol Biol Evol*, 2003. **20**(9):1564–1574.
- Thollesson, M.** LDDist: a Perl module for calculating LogDet pair-wise distances for protein and nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 2004. **20**(3):416–418.



- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994. **22**(22):4673–4680.
- Tielens, A. G. M., Rotte, C., van Hellemond, J. J. und Martin, W.** Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(11):564–572.
- Tovar, J., Fischer, A. und Clark, C. G.** The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol*, 1999. **32**(5):1013–1021.
- Tovar, J., Leon-Avila, G., Sanchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernandez, M., Müller, M. und Lucocq, J. M.** Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*, 2003. **426**(6963):172–176.
- Vellai, T., Takacs, K. und Vida, G.** A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes. *J Mol Evol*, 1998. **46**(5):499–507.
- Voncken, F. G. J., Boxma, B., van Hoek, A. H. A. M., Akhmanova, A. S., Vogels, G. D., Huynen, M., Veenhuis, M. und Hackstein, J. H. P.** A hydrogenosomal [Fe]-hydrogenase from the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. L2. *Gene*, 2002. **284**(1–2):103–112.
- Williams, B. A. P., Hirt, R. P., Lucocq, J. M. und Embley, T. M.** A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature*, 2002. **418**(6900):865–869.
- Williams, K., Lowe, P. N. und Leadlay, P. F.** Purification and characterization of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from the anaerobic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Biochem J*, 1987. **246**(2):529–536.
- Witkowski, A., Witkowska, H. E. und Smith, S.** Reengineering the specificity of a serine active-site enzyme. Two active-site mutations convert a hydrolase to a transferase. *J Biol Chem*, 1994. **269**(1):379–383.
- Woese, C. R., Kandler, O. und Wheelis, M. L.** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(12):4576–4579.

- Yamamoto, Y., Sato, Y., Takahashi-Abbe, S., Takahashi, N. und Kizaki, H.** Characterization of the *Streptococcus mutans* pyruvate formate-lyase (PFL)-activating enzyme gene by complementary reconstitution of the in vitro PFL-reactivating system. *Infect Immun*, 2000. **68(8):4773–4777.**
- Yarlett, N., Orpin, C. G., Munn, E. A., Yarlett, N. C. und Greenwood, C. A.** Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochem J*, 1986. **236(3):729–739.**
- Yarlett, N., Lindmark, D. G., Goldberg, B., Moharrami, M. A. und Bacchi, C. J.** Subcellular localization of the enzymes of the arginine dihydrolase pathway in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *J Eukaryot Microbiol*, 1994. **41(6):554–559.**
- Yarlett, N., Martinez, M. P., Moharrami, M. A. und Tachezy, J.** The contribution of the arginine dihydrolase pathway to energy metabolism by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*, 1996. **78(1-2):117–125.**
- Zapun, A., Darby, N. J., Tessier, D. C., Michalak, M., Bergeron, J. J. und Thomas, D. Y.** Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J Biol Chem*, 1998. **273(11):6009–6012.**

## Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. William Martin für die Möglichkeit in seinem Institut zu arbeiten. Seine Motivation, Begeisterung und Erfahrung haben meine Arbeit kritisch begleitet und gefördert.

Herrn Prof. Dr. Martin Lercher danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und sein meiner Dissertation entgegengebrachtes Interesse.

Frau PD Dr. Katrin Henze danke ich herzlich für das spannende Thema und für ihre hervorragende Betreuung meiner Dissertation, ihre motivierende Unterstützung und ihren kompetenten Rat.

Insbesondere danke ich Frau PD Dr. Katrin Henze und Frau Dr. Simone Pütz für die vielen Stunden am Massenspektrometer im BMFZ.

Für die Hilfe bei der funktionalen Kategorisierung der EST-Sequenzen danke ich Frau Dr. Tal Dagan.

Marion Nissen vom Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danke ich für die Einführung in die Elektronenmikroskopie.

Nathalie Walter und Isabell Fuchs danke ich für die Unterstützung bei den EST-Sequenzierungen.

Jay Yanke vom »Agriculture and Agri-Food Canada Lethbridge Research Center« in Kanada danke ich für die Überlassung der Kulturen von *Neocallimastix frontalis* SR4.

Herrn Prof. Dr. Thomas Happe von der Ruhr-Universität Bochum danke ich für die Bereitstellung des Antiserums gegen die [Fe]-Hydrogenase von *Chlamydomonas reinhardtii*.

Frau Diana Lehmann von Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln danke ich für die Herstellung der Phagen-Filter.

Verena Zimorski und Oliver Deusch danke ich ganz herzlich für ihre Geduld beim Korrekturlesen dieser Arbeit und für Tipps und Hinweise jeglicher Art.

Den Mitarbeitern des Instituts für Ökologische Pflanzenphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danke ich für die wunderbare, freundliche und motivierende Arbeitsatmosphäre, ihre hilfreichen Informationen zur Benutzung von Geräten und die vielen nützlichen Tipps und geleistete Hilfestellung bei meinen Experimenten.



Die vorliegende Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde weder in der vorgelegten noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 24. April 2008

.....  
(Gabriel Gelius-Dietrich)