

**[FeFe]-Hydrogenase-Maturasen und Acetat:Succinat-CoA-Transferase  
in den Hydrogenosomen des mikroaerophilen Humanparasiten  
*Trichomonas vaginalis***

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

**vorgelegt von  
Silke Rosnowsky**

**aus Kirchhellen  
November 2008**

---

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

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

Referent: PD Dr. Katrin Henze  
Korreferent: Prof. Dr. William Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2008

---

---

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

### **Publikationen**

**van Grinsven KWA, Rosnowsky S, van Weelden SW, Pütz S, van der Giezen M, Martin W, van Hellemond JJ, Tielens AG, Henze K (2008).** Acetate:succinate CoA-transferase in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: identification and characterization. *J Biol Chem* 283(3):1411-1418.

### **Tagungsbeiträge**

**Pütz S, Rosnowsky S, Dolezal P, Tachezy J, Henze K (2005).** Putative [Fe]-hydrogenase maturases in the hydrogenosomes of the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis*. FEBS Advanced Lecture Course, Wildbad Kreuth (D).

**Rosnowsky S, Henze K (2006).** Heterologous co-expression of [Fe] hydrogenases and putative maturases HydG, HydE and HydF of the anaerobic protozoan *Trichomonas vaginalis*. 16th Meeting of the International Society for Evolutionary Protistology (ISEP), Breslau (PL).

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>9</b>
1.1 DER MIKROAEROPHILE HUMANPARASIT <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> .....	9
1.2 DAS HYDROGENOSOM .....	10
1.2.1 DER HYDROGENOSOMALE STOFFWECHSEL VON <i>T. VAGINALIS</i> .....	12
1.2.2 DIE ACETAT:SUCCINAT-CO <sub>A</sub> -TRANSFERASE AUS <i>T. VAGINALIS</i> .....	13
1.4 HYDROGENASEN .....	15
1.4.1 KLASSIFIKATION VON HYDROGENASEN .....	15
1.4.1.1 STRUKTURELLER AUFBAU DER [NiFe]- UND [NiFeSe]-HYDROGENASEN .....	16
1.4.1.2 STRUKTURELLER AUFBAU DER [FeFe]-HYDROGENASEN .....	17
1.4.2 REIFUNG VON HYDROGENASEN .....	18
1.4.2.1 [NiFe]-HYDROGENASEN .....	18
1.4.2.2 [FeFe]-HYDROGENASEN .....	18
1.5 ZIELE DER VORLIEGENDEN ARBEIT .....	20
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>21</b>
2.1 CHEMIKALIEN .....	21
2.2 ENZYME .....	21
2.3 VEKTOREN .....	22
2.4 OLIGONUKLEOTIDE .....	22
2.5 ORGANISMEN .....	24
2.5.1 <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> .....	24
2.5.2 <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	24
2.6 ARBEITEN MIT <i>E. COLI</i> .....	24
2.6.1 HERSTELLUNG KOMPETENTER <i>E. COLI</i> -ZELLEN FÜR DIE PLASMIDTRANSFORMATION .....	24
2.6.2 TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> .....	25
2.6.3 ANAEROBE PROTEINEXPRESSION IN <i>E. COLI</i> .....	25
2.6.4 ZELLAUFSCHLUß VON <i>E. COLI</i> -EXPRESSIONSKULTUREN .....	25
2.7 ARBEITEN MIT <i>T. VAGINALIS</i> .....	25
2.7.1 ELEKTROPORATION VON <i>T. VAGINALIS</i> .....	26
2.7.2 HERSTELLUNG VON EINZELZELLKLONEN .....	26
2.7.3 ISOLIERUNG VON HYDROGENOSOMEN AUS <i>T. VAGINALIS</i> .....	27
2.7.4 HERSTELLUNG VON DELETIONSMUTANTEN FÜR DIE GENE DER MATURASEN HYDF UND HYDG..... AUS <i>T. VAGINALIS</i> DURCH HOMOLOGE REKOMBINATION .....	27
2.8 ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN .....	28
2.8.1 ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS <i>T. VAGINALIS</i> .....	28
2.8.2 PRÄPARATION VON GENOMISCHER DNA AUS <i>T. VAGINALIS</i> .....	29
2.8.3 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) .....	29
2.8.4 KLONIERUNG VON PCR-FRAGMENTEN .....	29
2.8.5 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS <i>E. COLI</i> .....	30
2.8.6 SEQUENZIERUNG .....	30
2.8.7 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-SONDEN .....	30

2.8.8 NORTHERN-ANALYSE .....	31
2.8.9 SOUTHERN-ANALYSE .....	31
2.9 BIOCHEMISCHE METHODEN.....	32
2.9.1 BESTIMMUNG VON PROTEINKONZENTRATIONEN .....	32
2.9.2 SDS-PAGE .....	32
2.9.3 FÄRBUNG VON PROTEINEN MIT COOMASSIE BRILLIANT BLAU.....	32
2.9.4 WESTERN BLOT .....	32
2.9.5 IMMUNODETEKTION .....	33
2.9.5.1 DETEKTION VON REKOMBINANTEN PROTEINEN MIT HIS-ANHANG.....	33
2.9.5.2 DETEKTION VON REKOMBINANTEN PROTEINEN MIT S-ANHANG .....	33
2.9.5.3 DETEKTION DER ASCT.....	34
2.10 HYDROGENASE-AKTIVITÄTSTEST .....	34
2.11 BIOINFORMATISCHE METHODEN .....	35
2.11.1 SEQUENZANALYSEN, DATENBANKVERGLEICHE UND PHYLOGENETISCHE NETZWERKE .....	35
2.11.2 VORAUSSAGEN ÜBER MÖGLICHE TRANSITPEPTIDE .....	36
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
3.1 KLONIERUNG UND HOMOLOGE ÜBEREXPRESSION DER ACETAT:SUCCINAT-CoA-TRANSFERASE AUS ... <i>T. VAGINALIS</i> .....	37
3.1.1 HERSTELLUNG DES VEKTORS P <sub>TAGVAG2</sub> /ASCT .....	37
3.1.2 WESTERN-ANALYSE DER REKOMBINANTEN STÄMME <i>TvT1ASCT</i> UND <i>TvT1FRATAXIN</i> .....	38
3.1.3 NORTHERN-ANALYSE DER REKOMBINANTEN STÄMME <i>TvT1ASCT</i> UND <i>TvT1FRATAXIN</i> .....	39
3.1.3 INTRAZELLULÄRE LOKALISIERUNG DER ASCT IN <i>T. VAGINALIS</i> .....	40
3.2 KLONIERUNG DER GENE FÜR DIE HYDROGENASEN UND MATURASEN AUS <i>T. VAGINALIS</i> FÜR DIE ..... HETEROLOGE EXPRESSION IN <i>E. COLI</i> .....	41
3.2.1 AMPLIFIKATION DER HYDROGENASEN AUS <i>T. VAGINALIS</i> .....	42
3.2.2 AMPLIFIKATION DER GENE FÜR DIE MATURASEN <i>HYDE</i> , <i>HYDF</i> UND <i>HYDG</i> AUS <i>T. VAGINALIS</i> ....	43
3.2.3 Co-EXPRESSION DER HYDROGENASEN UND DER MATURASEN <i>HYDE</i> , <i>HYDF</i> UND <i>HYDG</i> IN..... <i>E. COLI</i> .....	44
3.3 AKTIVITÄTSMESSUNG .....	45
3.3.1 BESTIMMUNG DER BASALAKTIVITÄTEN.....	45
3.3.2 BESTIMMUNG DER HYDROGENASE-AKTIVITÄT DER HYDROGENASEN UND IHRER MATURASEN ...	46
3.3.2.1 BESTIMMUNG DER HYDROGENASE-AKTIVITÄT DER HYDROGENASE/CYTOCHROM P450- REDUKTASE-FUSION.....	47
3.3.2.2 BESTIMMUNG DER HYDROGENASE-AKTIVITÄT DER 64kDa-HYDROGENASE .....	49
3.4 DELETION DER MATURASE-GENE <i>HYDF</i> UND <i>HYDG</i> .....	50
3.4.1 PLASMIDE FÜR DIE DELETION VON <i>HYDF</i> UND <i>HYDG</i> .....	50
3.4.2 TRANSFORMATION VON <i>T. VAGINALIS</i> FÜR DIE DELETION DER MATURASE-GENE <i>HYDF</i> UND <i>HYDG</i> .....	51
3.4.3 KONTROLLE EINER MÖGLICHEN DELETION DER MATURASE <i>HYDG</i> IN <i>T. VAGINALIS</i> MITTELS PCR .....	52
3.4.4 KONTROLLE EINER MÖGLICHEN DELETION DER MATURASE <i>HYDG</i> IN <i>T. VAGINALIS</i> MITTELS..... NORTHERN-ANALYSE .....	55
3.4.5 KONTROLLE EINER MÖGLICHEN DELETION DER MATURASE <i>HYDG</i> IN <i>T. VAGINALIS</i> MITTELS..... SOUTHERN-ANALYSE .....	56
3.4.6 HYDROGENASE-AKTIVITÄTSBESTIMMUNG EINER MÖGLICHEN DELETIONSMUTANTE DER ..... MATURASE <i>HYDG</i> IN <i>T. VAGINALIS</i> .....	57

---

<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>58</b>
4.1 DIE ACETAT:SUCCINAT-CoA-TRANSFERASE IN DEN HYDROGENOSOMEN VON <i>T. VAGINALIS</i> .....	58
4.2 [FeFe]-HYDROGENASEN UND IHRE MATURASEN AUS <i>T. VAGINALIS</i> .....	61
4.2.1 HETEROLOGE EXPRESSION DER [FeFe]-HYDROGENASEN UND MATURASEN AUS <i>T. VAGINALIS</i> .	61
4.2.2 DELETION DER [FeFe]-HYDROGENASE-MATURASEN AUS <i>T. VAGINALIS</i> .....	63
4.2.3 EVOLUTION DER [FeFe]-HYDROGENASEN UND MATURASEN .....	64
4.2.4 [FeFe]-HYDROGENASE-MATURASEN – EIN MÖGLICHES „DRUG TARGET“? .....	67
4.3 AUSBLICK.....	69
<b>5. LITERATUR.....</b>	<b>70</b>
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	83

## Zusammenfassung

*Trichomonas vaginalis* ist ein humanpathogener, mikroaerophiler Flagellat, der Hydrogenosomen, eine anaerobe Form der Mitochondrien, besitzt. In den Hydrogenosomen wird Pyruvat zu Acetat,  $H_2$ ,  $CO_2$  und ATP metabolisiert. Im Gegensatz zu Mitochondrien erfolgt die ATP-Produktion ausschließlich über Substratkettenphosphorylierung. Die Bildung von Acetat ist abhängig von der Acetat:Succinat-CoA-Transferase (ASCT), während  $H_2$  über Elektronenübertragung durch eine [FeFe]-Hydrogenase auf  $H^+$  entsteht.

In einer Proteomanalyse von Hydrogenosomen aus *T. vaginalis* wurde eine mögliche ASCT identifiziert. Dieses Protein ist ein Homologes der Acetyl-CoA-Hydrolase/Transferase Proteinfamilie, zeigt jedoch keine Ähnlichkeiten zu der bereits charakterisierten ASCT aus Mitochondrien von *Trypanosoma brucei*. Das identifizierte Gen einer ASCT aus *T. vaginalis* wurde erfolgreich kloniert und homolog in *T. vaginalis* und heterolog in CHO K1-Zellen exprimiert. Die heterologe Expression der TvASCT in CHO K1-Zellen zeigte eine geringe Aktivität. Die homologe Überexpression in *T. vaginalis* erhöhte den RNA- und Protein-Gehalt der TvASCT sowie die ASCT-Aktivität etwa 4-fach. Das Protein wurde über eine N-terminale Transitsequenz und Zellfraktionierung eindeutig als hydrogenosomales Enzym identifiziert. Damit wurde das letzte bisher fehlende Enzym des Pyruvat-Stoffwechsels in *T. vaginalis* Hydrogenosomen charakterisiert.

Die Reifung der [FeFe]-Hydrogenasen unterscheidet sich von dem bereits aus Bakterien bekannten Mechanismus der [NiFe]-Hydrogenasen. Im Genom von *T. vaginalis* wurden homologe Sequenzen zu den bereits in *Chlamydomonas reinhardtii* beschriebenen Maturase-Genen *hydE*, *hydG* und *hydF* identifiziert. Die Proteinsequenzen für HydE, HydF und HydG sind innerhalb der Eukaryoten hoch konserviert und in allen Organismen mit [FeFe]-Hydrogenasen zu finden. In *T. vaginalis* sind diese in den Hydrogenosomen lokalisiert. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass auch in *T. vaginalis* die Aktivität von [FeFe]-Hydrogenasen von der Co-Expression mit Maturasen abhängig ist. Fällt die Synthese der Komponenten des H-Clusters, der sich im aktiven Zentrum des Enzyms befindet, durch Deletion eines der beteiligten Maturase-Gene aus, scheint dies für *T. vaginalis* nicht kompensierbar zu sein. Eine Deletion von *hydG* bzw. *hydF* wäre somit letal. Im Gegensatz zu Metronidazol-resistenten *T. vaginalis* Stämmen, in denen der hydrogenosomale Pyruvat-Metabolismus vermindert ist, führt die Inaktivierung der [FeFe]-Hydrogenase zum Verlust des terminalen Elektronenüberträgers und Elektronen können nicht auf  $H^+$  übertragen und damit als  $H_2$  aus der Zelle entfernt werden.

## Abstract

*Trichomonas vaginalis* is a microaerophilic flagellate which possesses hydrogenosomes, anaerobic forms of mitochondria. Hydrogenosomal pyruvate metabolism results in the endproducts acetate, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and ATP. In contrast to mitochondria, ATP production in hydrogenosomes occurs exclusively via substrate level phosphorylation. Formation of acetate depends on acetate:succinate-CoA-transferase (ASCT) whereas H<sub>2</sub> is generated by electrontransfer of [FeFe]-hydrogenase to H<sup>+</sup>.

A possible ASCT was identified by analysis of the hydrogenosomal proteome. The ASCT is a homolog of the acetyl-CoA-hydrolase/transferase protein family, but shares no similarity to the recently characterized ASCT from *Trypanosoma brucei* mitochondria. The putative ASCT gene from *T. vaginalis* was successfully cloned. Heterologous expression of TvASCT in CHO K1 cells resulted in low ASCT activities whereas homologous overexpression in *T. vaginalis* showed a more than 4-fold increase of TvASCT RNA and protein levels and also ASCT activity. The TvASCT gene contains a N-terminal targeting signal. The localization of the ASCT protein in the hydrogenosomes was clearly demonstrated. In this work it could be proven that this protein functions as the missing ASCT of *T. vaginalis*, the last missing enzyme of hydrogenosomal pyruvate metabolism.

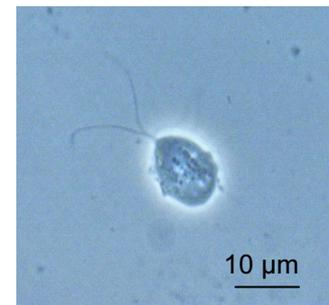
Maturation of [FeFe]-hydrogenases differs from the known bacterial mechanism of [NiFe]-hydrogenase maturation. Homologs of [NiFe]-hydrogenase maturation genes (*hyp*-genes) were not found in organisms bearing [FeFe]-hydrogenases. In the *T. vaginalis* genome homologs to sequences of accessory genes necessary for maturation of the *Chlamydomonas reinhardtii* [FeFe]-hydrogenase were identified. Protein sequences of HydE, HydF and HydG are highly conserved among organisms with [FeFe]-hydrogenases. In *T. vaginalis* these proteins are localized in hydrogenosomes. In this work it was demonstrated, that activity of *T. vaginalis* [FeFe]-hydrogenases is dependent on co-expression with the maturases HydE, HydF and HydG. *T. vaginalis* seems to be unable to survive the loss of the maturases HydE, HydF and HydG. *T. vaginalis* seems to be unable to survive the loss of the *hydG* or *hydF* genes. Deletion of *hydG* and *hydF*, respectively, seems to be lethal. In contrast to metronidazole-resistant *T. vaginalis* strains where hydrogenosomal pyruvate metabolism is absent, the inactivation of hydrogenases causes loss of the terminal electron carrier, and electrons cannot be transmitted to H<sup>+</sup> to be removed from the cell as H<sub>2</sub>.

## 1. Einleitung

### 1.1 Der mikroaerophile Humanparasit *Trichomonas vaginalis*

*Trichomonas vaginalis* ist ein einzelliger, humanpathogener Protist. Unter dem Begriff PROTISTA wurden bereits 1866 von Ernst Haeckel alle Einzeller beschrieben, da eine Differenzierung zwischen Pro- und Eukaryoten zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgt war. Heutzutage werden als Protisten Eukaryoten mit einzelliger Organisation ohne Zelldifferenzierung in Gewebe bezeichnet. Sowohl ihre Morphologie als auch ihre Ernährungsweise sind uneinheitlich – neben heterotrophen und phototrophen gibt es auch bewegliche und unbewegliche Vertreter mit unterschiedlichstem Erscheinungsbild (Hausmann *et al.*, 2003; Adl *et al.*, 2005). Protisten sind freilebend oder leben parasitär assoziiert an einem Wirt. Zu den anaeroben, pathogenen, parasitischen Protisten gehören z.B. *Giardia intestinalis* (Lamblienruhr), *Entamoeba histolytica* (Amöbenruhr), *Tritrichomonas foetus* (Trichomonaden-Seuche bei Rindern) und *Trichomonas vaginalis* (Trichomoniasis bei Menschen).

Der humanpathogene Flagellat *T. vaginalis* (Abb. 1.1) gehört zum Reich der Excavata (Cavalier-Smith, 2002) in die Gruppe Parabasalia. Innerhalb dieser heterogenen Gruppe ist *T. vaginalis* den Trichomonadida zugeordnet (Adl *et al.*, 2005). *T. vaginalis* ist 10-25 µm groß und *in vitro* in axenischer Kultur von runder bis ovaler Morphologie (Honigberg *et al.*, 1984; Nielsen, 1975). Vier der fünf Flagellen befinden sich am anterioren Pol der Zelle, während die fünfte als Schleppgeißel entlang einer undulierenden Membran verläuft. *In vivo* verändert sich die Morphologie bei Kontakt zu den Epithelzellen des Wirtes zu flachen, amöboiden Zellen, um den Oberflächenkontakt zu maximieren. Der Parasit ernährt sich phagocytotisch von Bakterien und Wirtszellen (Rendón-Maldonado *et al.*, 1998). Die Vermehrung erfolgt durch Zweiteilung. Cysten als Dauerstadien sind nicht bekannt (Mehlhorn und Piekarski, 1995).



**Abb. 1.1:** Trophozoit von *T. vaginalis*.

Das Genom von *T. vaginalis* ist etwa 160 Mb groß, haploid und in sechs Chromosomen organisiert (Drmota und Král, 1997; Yuh *et al.*, 1997; Zubáková *et al.*, 2008). Bisher wurden etwa 60.000 Protein-kodierende Gene identifiziert, wobei Introns nur in 65 Genen vorhanden sind. Für alle 20 proteinogenen Aminosäuren sind Transfer-RNAs vorhanden. Etwa 250 ribosomale DNA-Einheiten (rDNA), welche sich alle auf einem Chromosom befinden, konnten identifiziert werden (Carlton *et al.*, 2007). Die für Eukaryoten typischen Organellen - Mitochondrien und Peroxisomen - fehlen den Trichomonaden. Sie besitzen Hydrogenoso-

men, welche die anaeroben Formen der Mitochondrien sind (Embley *et al.*, 2003; Hrdy *et al.*, 2004).

*T. vaginalis* ist Erreger der weltweit häufigsten, nicht-viralen, sexuell übertragbaren Krankheit Trichomoniasis. In den USA werden jährlich 7,4 Millionen Neuinfektionen berichtet (Weinstock *et al.*, 2004), weltweit 170 Millionen Infektionen (WHO, 2001: <http://www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/006.htm>). Die Übertragung erfolgt ausschließlich durch sexuellen Kontakt und betrifft beide Partner. *Trichomonas*-Infektionen können mit 5-Nitroimidazol-Derivaten (z.B. Metronidazol, Tinidazol) behandelt werden. Diese Chemotherapeutika werden in den Hydrogenosomen von *Trichomonas* durch Elektronenübertragung der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFO) und Ferredoxin zu cytotoxischen Radikalen ( $R-NO_2^-$ ) abgebaut (Müller, 1986), die die DNA des Parasiten schädigen (Edwards, 1993). Allerdings wurden bereits Metronidazol-resistente Stämme isoliert (Meingassner und Thurner, 1979; Müller *et al.*, 1980; Kulda *et al.*, 1982; Lossik *et al.*, 1986).

## 1.2 Das Hydrogenosom

Hydrogenosomen wurden zuerst von Lindmark und Müller (1973) als „*Microbody*“-ähnliche Strukturen in *T. foetus* beschrieben. Diese Zellorganellen sind von einer doppelten Hüllmembran umgeben und von runder Gestalt. Hydrogenosomen sind in der Zelle nahe dem Axostyl lokalisiert und häufig mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert (Benchimol und De Souza, 1983; Benchimol *et al.*, 1996a).

Die Teilung der Hydrogenosomen erfolgt wie bei Mitochondrien durch zentrale Einschnürung und anschließende Segmentierung durch Bildung eines Septums von der inneren Membran (Benchimol *et al.*, 1996a und 1996b; Benchimol und Engelke, 2003). Hydrogenosomale Proteine werden an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert und post-translational mit Hilfe eines Transitpeptids in das Organell importiert. Allerdings sind bei *T. vaginalis* die Transitpeptide hydrogenosomaler Proteine mit 5-14 Aminosäuren deutlich kürzer als die Mitochondrien-spezifischer Proteine in höheren Eukaryoten. Die Aminosäurezusammensetzung in hydrogenosomalen und mitochondrialen Transitpeptiden ist aber vergleichbar und startet meist mit dem bei Mitochondrien bekannten Methionin-Leucin-Motiv und ist serinreich (Bradley *et al.*, 1997). Die Transitsequenzen werden wie in Mitochondrien von einer prozessierenden Peptidase entfernt (Brown *et al.*, 2007). Zusätzlich scheinen auch interne Signale für den Import ins Organell notwendig zu sein (Mentel *et al.*, 2008) und der Proteinimport in die Hydrogenosomen ist ATP-abhängig (Dyall *et al.*, 2000).

Die ATP-Produktion erfolgt in Hydrogenosomen und Mitochondrien aus Pyruvat – in Mitochondrien entstehen durch oxidative Phosphorylierung 15 Mol ATP pro Mol Pyruvat, in Hydrogenosomen durch Substratketten-Phosphorylierung jedoch nur ein Mol ATP. Die NADH-Dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>-Regeneration durch Komplex I) ist in beiden Organellen

vorhanden, allerdings wurden bisher die weiteren an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Komplexe III und IV, welche in Mitochondrien in der inneren Membran lokalisiert sind in Hydrogenosomen nicht nachgewiesen (Hrdy *et al.*, 2007; Dyall *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu Mitochondrien sind Zitronensäurezyklus (Müller, 1993; Tielens *et al.*, 2002; Embley und Martin, 2006) und Fettsäurestoffwechsel (Beach *et al.*, 1990) in Hydrogenosomen nicht vorhanden.

DNA konnte in Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus* (Müller, 1993; Clemens und Johnson, 2000) und *Neocallimastix frontalis* (van der Giezen *et al.*, 1999) nicht nachgewiesen werden; die einzige Ausnahme scheint der Ciliat *Nyctotherus ovalis* zu sein (Akhmanova *et al.*, 1997; van Hoek *et al.*, 2000).

Hydrogenosomen werden als anaerobe Homologe der Mitochondrien angesehen (Embley *et al.*, 1997, 2003b; Martin und Müller, 1998). Vermutlich sind beide Organellen aus einem gemeinsamen  $\alpha$ -proteobakteriellen Endosymbionten entstanden (Martin und Müller, 1998, 2007; Esser *et al.*, 2004; Embley, 2006), wofür auch einige Gemeinsamkeiten dieser Organellen in den unterschiedlichen Organismengruppen (u.a. Trichomonaden, Chytridiomyceten und Ciliaten) sprechen. Hydrogenosomen sind wahrscheinlich mehrfach unabhängig voneinander entstanden, da Organismen unterschiedlicher Gruppen Hydrogenosomen besitzen und innerhalb dieser Gruppen auch Organismen mit Mitochondrien oder Mitosomen existieren (Embley *et al.*, 1995; Embley und Martin, 1998; Yarlett und Hackstein, 2005). Der hydrogenosomale Stoffwechsel anderer Organismen kann sich jedoch von dem der Trichomonaden unterscheiden. Der Neocallimastigomycot *N. frontalis* (Hibbett *et al.*, 2007) z.B. besitzt keine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (s. 1.2.1). Pyruvat wird hier mit einer Pyruvat-Formiat Lyase (PFL) zu Acetyl-CoA und Formiat abgebaut (Gelius-Dietrich und Henze, 2004).

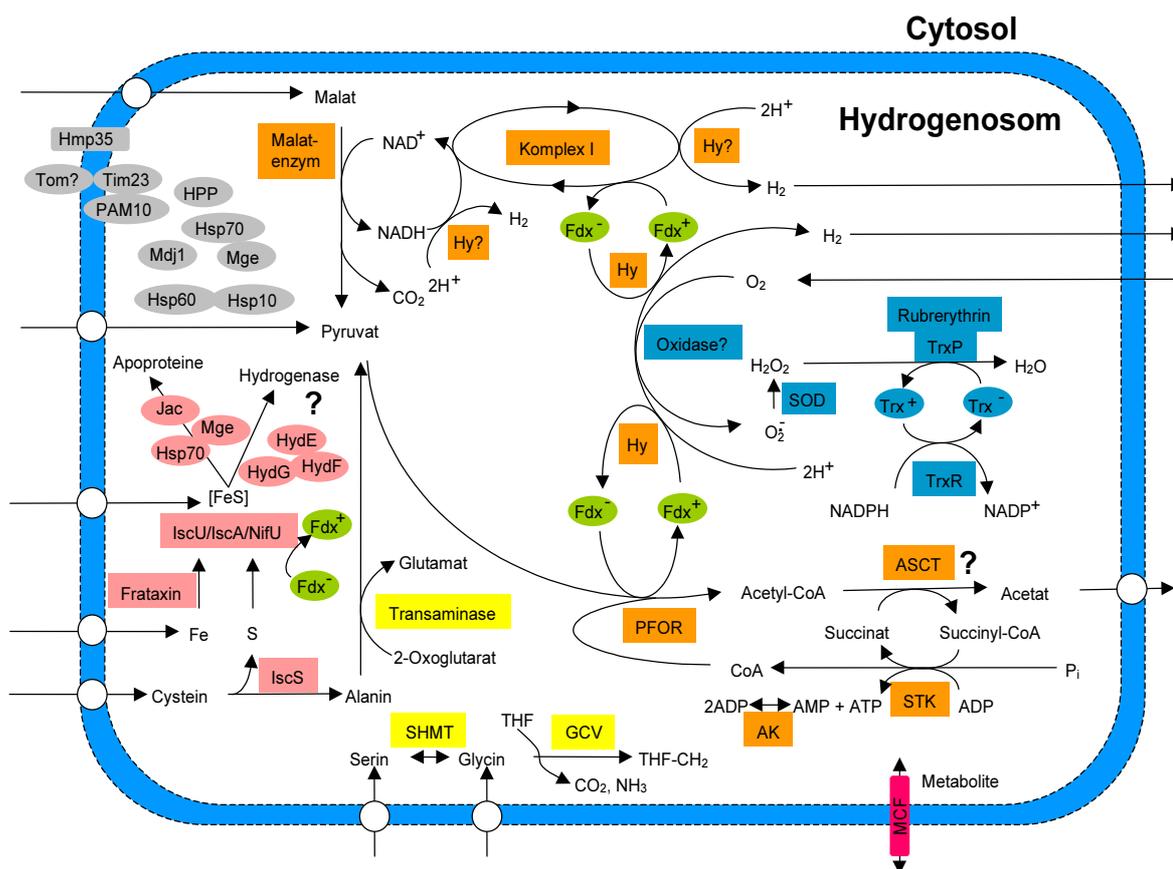
### 1.2.1 Der hydrogenosomale Stoffwechsel von *T. vaginalis*

Im Gegensatz zum Sauerstoff bei Mitochondrien sind bei Hydrogenosomen Protonen die terminalen Elektronenakzeptoren und es wird molekularer Wasserstoff gebildet (Müller, 1973; Lindmark *et al.*, 1975). Die Schlüsselenzyme in Hydrogenosomen sind hierbei die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFO) für die Decarboxylierung des durch die Glykolyse bereitgestellten Pyruvats und die H<sub>2</sub>:Ferredoxin-Oxidoreduktase (Hydrogenase) für die Bildung von molekularem Wasserstoff. Im Einzelnen lässt sich der hydrogenosomale Pyruvat-Stoffwechsel wie folgt zusammenfassen (s. Abb 1.2):

Pyruvat wird durch die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFO) zu Acetyl-CoA und CO<sub>2</sub> oxidiert. Hierbei werden Elektronen auf Ferredoxin übertragen. Vom reduzierten Ferredoxin werden die Elektronen von der Hydrogenase (H<sub>2</sub>:Ferredoxin-Oxidoreduktase) auf Protonen übertragen und es entsteht molekularer Wasserstoff. Mit Hilfe der Acetat-Succinat-CoA-Transferase (ASCT) kann das Coenzym A des Acetyl-CoA auf Succinat übertragen werden und Acetat wird als Endprodukt ausgeschieden. Die Succinyl-CoA-Synthase spaltet Succinyl-CoA, wobei über Substratkettenphosphorylierung ein ATP gebildet wird. Alternativ zu Pyruvat kann auch Malat im Hydrogenosom mit der decarboxylierenden Malat-Dehydrogenase (Malat-Enzym) zu Pyruvat decarboxyliert werden. Hierbei entstehende Elektronen werden auf NAD<sup>+</sup> übertragen und können dann von der NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase an Ferredoxin weitergeleitet werden (Steinbüchel und Müller, 1986; Müller, 1993; Embley und Martin, 1998; Martin und Müller, 1998; Martin *et al.*, 2001; Dyall und Johnson, 2000).

Mechanismen der Eisen-Schwefel-(FeS)-Cluster Synthese sowie die Reifung und Insertion von FeS-Zentren in FeS-Proteine finden sowohl in Mitochondrien (Li *et al.*, 1999; Lill und Kispal, 2000; Lill und Mühlenhoff, 2005) als auch in Hydrogenosomen statt (Tachezy *et al.*, 2001; Sutak *et al.*, 2004). Hierbei sind Homologe der bakteriellen Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängigen Cystein-Desulfurase (IscS) auch in den Mitochondrien von Eukaryoten ein essentielles Enzym der FeS-Cluster Synthese. In *T. vaginalis* konnten zwei Homologe zur mitochondrialen IscS identifiziert werden (TviscS-1; TviscS-2; Tachezy *et al.*, 2001). Diese Proteine besitzen ebenso wie Proteine zur FeS-Cluster Assemblierung N-terminale Transitsequenzen und sind ausschließlich in den Hydrogenosomen lokalisiert, während ihre Homologe aus Mitochondrien auch im Cytosol und im Nukleus nachgewiesen wurden (Land und Rouault, 1998; Nakai *et al.*, 2001).

Weitere hydrogenosomale Proteine, die Homologe in Mitochondrien besitzen sind z. B. die Transporter Hmp35 und Tim23 (Carlton *et al.*, 2007). Außerdem konnte ein Thioredoxin-gekoppeltes Peroxiredoxin System (eine Thiolperoxidase (Tpx) und Rubrerythrin (Rbr)), dass die Proteine vor Sauerstoff und entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies schützt, näher beschrieben werden (Pütz, 2007).

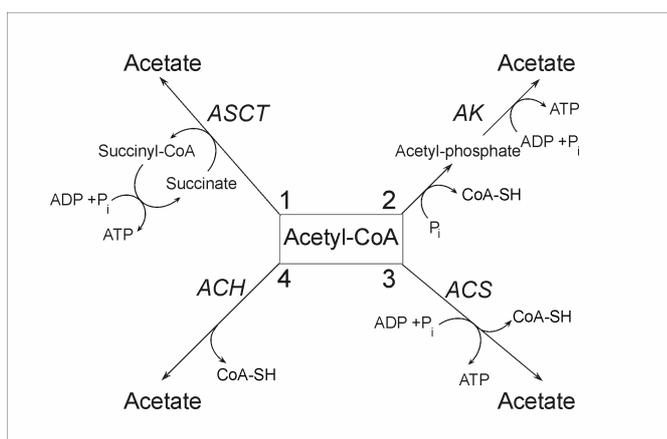


**Abb. 1.2:** Überblick der Stoffwechselprozesse im Hydrogenosom von *T. vaginalis* (nach: Carlton *et al.*, 2007). Orange: Energie-Metabolismus; grün: Ferredoxin; pink: FeS-Cluster Synthese und Hydrogenase-Reifung; blau: Sauerstoff-Detoxifizierung; gelb: Aminosäure-Metabolismus; grau: Proteintranslokation und Reifung; weiße Kreise: mögliche bisher unidentifizierte Transporter; AK: Adenylatkinase; ASCT: Acetat:Succinat-CoA-Transferase; Fdx: Ferredoxin; GCV: Glycin Spaltungssystem; Hy: Hydrogenase; Hy?: vermutlich NADH-unabhängige Hydrogenase; PFO: Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; SOD: Superoxid-Dismutase; STK: Succinat-Thiokinase (Succinat-CoA-Ligase; ADP-bildend); SHMT: Serin-Hydroxymethyl-Transferase; Trx: Thioredoxin; TrxP: Thioredoxin-Peroxidase; TrxR: Thioredoxin-Reduktase; THF-CH<sub>2</sub>: N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-CH<sub>2</sub>, Tetrahydrofolat.

### 1.2.2 Die Acetat:Succinat-CoA-Transferase aus *T. vaginalis*

Acetat:Succinat-CoA-Transferasen (ASCT) sind Acetat-produzierende Enzyme welche z. B. in den anaeroben Mitochondrien von Helminthen (McLaughlin *et al.*, 1986; Saz *et al.*, 1996) und in den aeroben Mitochondrien der Trypanosomen zu finden sind (van Hellemond *et al.*, 1998). Die Bildung von Acetat aus Acetyl-CoA als Endprodukt des Energiestoffwechsels ist sowohl bei Prokaryoten als auch bei einigen Eukaryoten aus anaeroben bzw. hypoxischen Lebensräumen bekannt (Tielens und van Hellemond, 1998; van Hellemond *et al.*, 2003). In *T. vaginalis* konnte zwar Enzymaktivität einer ASCT detektiert werden, jedoch wurde bisher kein entsprechendes Gen identifiziert (Steinbüchel und Müller, 1986). Für die Umwandlung von Acetyl-CoA zu Acetat sind vier unterschiedliche Stoffwechselwege bekannt (Abb.1.3). Die Umsetzung mit Hilfe einer ASCT ist Succinat-abhängig (Abb.1.3; Reaktion 1) und wird für Trichomonaden (Steinbüchel und Müller, 1986), den anaeroben Neocallimastigomycot *Neocallimastix* (Marvin-Sikkema *et al.*, 1993) und den Helminthen *Fasciola hepatica* (Barett

*et al.*, 1978; van Vugt *et al.*, 1979; Saz *et al.*, 1996) als Reaktionsweg angenommen. In Eubakterien ist Reaktion 2 bekannt, bei der Acetyl-Phosphat als Zwischenprodukt auftritt. Die beteiligten Enzyme sind eine Phosphat-Acetyl-Transferase und eine Acetat-Kinase (AK; Brown *et al.*, 1977). Bei *G. intestinalis*, *E. histolytica* und einigen Archaea wird die Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat durch die Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) katalysiert (Reeves *et al.*, 1977; Sanchez und Müller, 1996). Aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist eine Acetyl-CoA Hydrolase bekannt (ACH; Abb. 1.3, Reaktion 4; Lee *et al.*, 1990; Buu *et al.*, 2003).



**Abb.1.3:** Enzymatische Umwandlung von Acetyl-CoA zu Acetat (aus: van Grinsven *et al.*, 2008). ASCT: Acetat:Succinat-CoA-Transferase; AK: Acetat-Kinase; ACS: Acetyl-CoA-Synthetase; ACH: Acetyl-CoA-Hydrolase.

Für *Trypanosoma brucei* konnte bereits eine mitochondriale ASCT isoliert und charakterisiert werden (Riviere *et al.*, 2004). Diese Succinat-abhängige ASCT zeigt jedoch nur geringe Ähnlichkeit zu anderen eukaryotischen Enzymen (s. Abb. 4.1). Das charakterisierte Protein enthält jedoch zwei CoA-Transferase-Domänen, welche als Kennzeichen für eukaryotische CoA-Transferasen gelten (Bateman *et al.*, 2002).

Das Genom von *T. vaginalis* enthält keine zu mitochondrialen ASCTs verwandte Sequenz. Eine mögliche ASCT aus *T. vaginalis* wurde durch Analyse des hydrogenosomalen Proteoms identifiziert (Pütz, 2007). Dieses Protein weist Homologien zu Acetat:Succinat-CoA-Hydrolasen aus  $\delta$ -Proteobakterien und Ascomyceten auf. Einige Enzyme der Acetyl-CoA-Hydrolase/Transferase Familie können jedoch auch als CoA-Transferasen fungieren (Witkowski *et al.*, 1994; Söhling und Gottschalk, 1996), was die vermutete Transferase-Aktivität der möglichen ASCT aus *T. vaginalis* unterstützt.

## 1.4 Hydrogenasen

Hydrogenasen katalysieren die reversible Oxidation von molekularem Wasserstoff in Protonen und Elektronen (Stephenson und Stickland, 1931):



Hydrogenasen sind aus den unterschiedlichsten Organismen bekannt. Sie können *in vivo* - je nach Lebensbedingungen des Organismus - Wasserstoff bilden, Wasserstoff reduzieren oder die Reaktion in beide Richtungen katalysieren.

Bereits 1950 gelang es Joklik eine Hydrogenase aus *Escherichia coli* zu isolieren (Joklik, 1950a,b). Später wurden Hydrogenasen aus aeroben Wasserstoff-produzierenden Bakterien (Bowien und Schlegel, 1981; Vignais *et al.*, 1981), Cyanobakterien (Lambert und Smith, 1981; Houchins, 1984), photosynthetischen Bakterien (Meyer *et al.*, 1978; Vignais *et al.*, 1985), Rhizobia (Mayer, 1986; Evans *et al.*, 1987), Sulfatreduzierern (Odom und Peck, 1984; Fauque *et al.*, 1988), anaeroben Fermentierern (Adams *et al.*, 1981; Adams, 1990a) und Extremophilen (Adams, 1990b; Maier, 1996) näher untersucht. Unter den Archaea dient Wasserstoff vielen Organismen als Hauptenergiequelle (Vignais *et al.*, 2001). Bei den Eukaryoten kommen Hydrogenasen in den Hydrogenosomen von Protisten (Müller, 1993; Page-Sharp *et al.*, 1996) sowie in den Chloroplasten von Grünalgen (Happe und Naber, 1993; Schnackenberg *et al.*, 1993) vor.

### 1.4.1 Klassifikation von Hydrogenasen

Die Klassifikation der Hydrogenasen basierte ursprünglich auf der Verwendung unterschiedlicher Elektronen-Donoren und -Akzeptoren. Hierbei sind NAD<sup>+</sup> (Hydrogenasen der EC-Klasse 1.12.1.12), Cytochrome (EC 1.12.2.1), Coenzym F<sub>420</sub> (EC 1.12.99.1) und Ferredoxin (EC 1.18.99.1) zu nennen. Durch phylogenetischer Analysen scheint die Klassifikation der Hydrogenasen auf Grund ihres Metallgehalts in die drei Klassen [FeFe]-Hydrogenasen, [NiFe]-Hydrogenasen und metallfreie Hydrogenasen sinnvoll, da sie sich durch ein für die jeweilige Klasse charakteristisches aktives Zentrum unterscheiden. Alle anderen Unterscheidungsmerkmale wie z.B. Verwendung von Elektronen-Donoren oder Elektronen-Akzeptoren sind keine eindeutigen Kriterien (Vignais *et al.*, 2001).

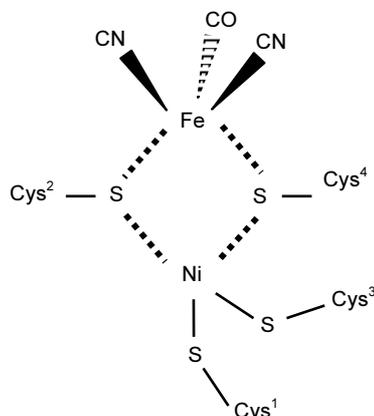
Die Mehrzahl der Hydrogenasen sind FeS-Proteine mit zwei Metallatomen im aktiven Zentrum. Dies können Nickel und Eisen bei den [NiFe]-Hydrogenasen (Volbeda *et al.*, 1995; Higuchi *et al.*, 1997) oder zwei Eisen-Atome bei den [FeFe]-Hydrogenasen (Peters *et al.*, 1998; Nicolet *et al.*, 1999) sein. [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen enthalten FeS-Cluster, über die Elektronen zwischen dem Wasserstoff-aktivierenden Zentrum und den Redoxpartnern der Hydrogenasen verschoben werden. Die Eisen-Schwefel-Cluster können

einen unterschiedlichem Gehalt an Eisen und Schwefel besitzen: [2Fe-2S], [3Fe-4S] oder [4Fe-4S]. [NiFe]-Hydrogenasen kommen nur in Bakterien vor, während die [FeFe]-Hydrogenasen in Bakterien, aber auch in Eukaryoten zu finden sind. Eukaryotische [FeFe]-Hydrogenasen, wie auch die von *T. vaginalis* oder *Chlamydomonas reinhardtii*, sind ausschließlich in den Organellen, d.h. Hydrogenosomen bzw. Chloroplasten, lokalisiert. Außer der Gemeinsamkeit FeS-Cluster zu besitzen, zeigen die aktiven Zentren der [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen jedoch keine Ähnlichkeiten – weder in der Aminosäuresequenz noch in der dreidimensionalen Struktur (Vignais *et al.*, 2001; Nicolet *et al.*, 2000, Frey *et al.*, 2001).

Die sogenannten metallfreien Hydrogenasen sind aus methanogenen Archaea bekannt. Diese Hmd (Methenylhydromethanopterin-Dehydrogenase) oder [Fe]-Hydrogenasen besitzen kein FeS-Cluster. Trotzdem gibt es Eisen im aktiven Zentrum des Enzyms, an welches CO-Liganden gebunden sind (Lyon *et al.*, 2004). Dieses Eisen-Atom ist allerdings nicht redoxaktiv (Vignais und Billoud, 2007). Die „metall-freien“ Hydrogenasen sind Wasserstoff-bildende Methenyltetrahydromethanopterin (Methenyl-H<sub>4</sub>MPT)-Dehydrogenasen (Hmd; EC 1.12.99.4), welche die reversible Reduktion von Methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> zu Methenyl-H<sub>4</sub>MPT katalysieren (Zirngibl *et al.*, 1992).

#### 1.4.1.1 Struktureller Aufbau der [NiFe]- und [NiFeSe]-Hydrogenasen

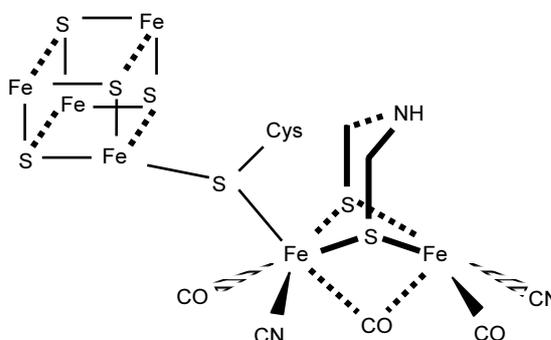
[NiFe]-Hydrogenasen sind heterodimere Proteine mit einer großen Untereinheit von 60-65 kDa und einer kleinen Untereinheit mit einer molekularen Masse zwischen 30 und 35 kDa (Przybyla *et al.*, 1992, Wu und Mandrand, 1993). Das aktive Zentrum der [NiFe]-Hydrogenasen ist in der großen Untereinheit lokalisiert. Das [NiFe]-Zentrum ist mit vier Cysteinen sowie zwei CN- und einem CO-Liganden koordiniert (Volbeda *et al.*, 1996; s. Abb. 1.4). In einigen Organismen ist der Cysteinrest 3 (Cys<sup>3</sup>; s. Abb. 1.4) durch ein Selenocystein ersetzt ([NiFeSe]-Hydrogenasen, z.B. bei *Methanococcus voltae*; Sorgenfrei *et al.*, 1993).



**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der [NiFe]-Hydrogenasen (nach: Böck *et al.*, 2006).

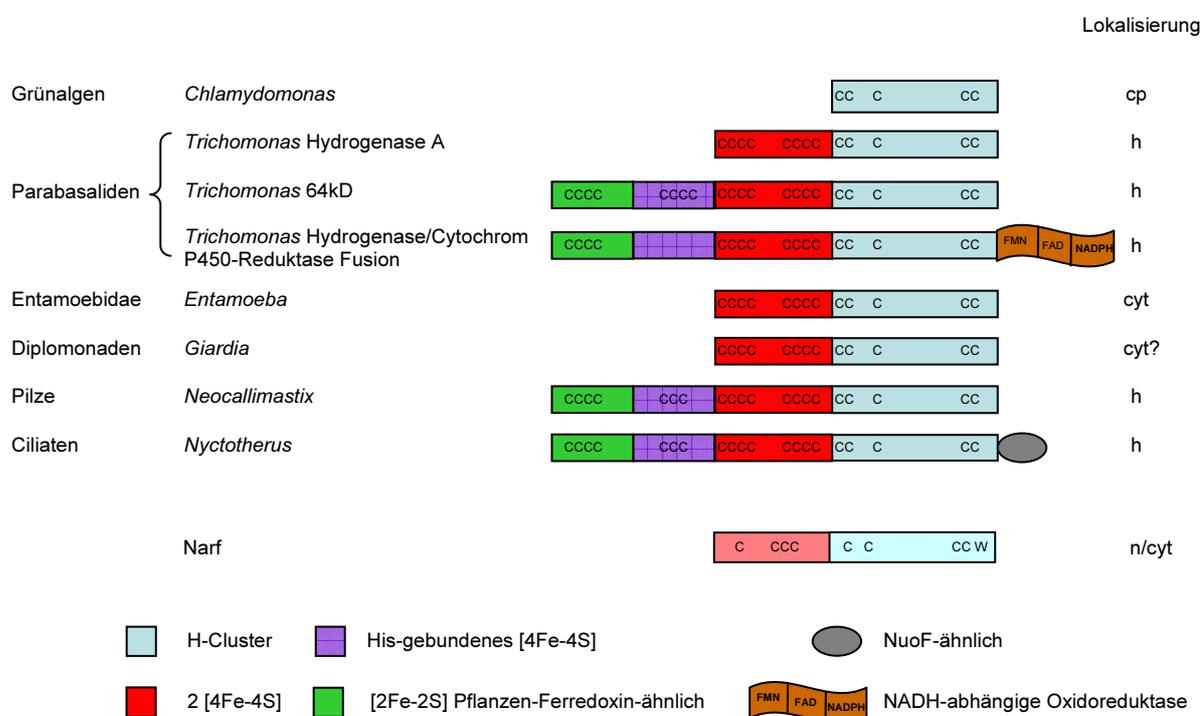
### 1.4.1.2 Struktureller Aufbau der [FeFe]-Hydrogenasen

[FeFe]-Hydrogenasen sind meist Monomere oder bestehen nur aus der katalytischen Domäne, dem sogenannten H-Cluster (s. Abb. 1.5). Dieser besteht aus einem [4Fe-4S]-Zentrum, welches über ein Cystein an ein Di-Eisen-Zentrum gebunden ist.



**Abb. 1.5:** Schematische Darstellung des H-Clusters der [FeFe]-Hydrogenasen. Ein 4Fe-Zentrum ist über ein Cystein an ein 2Fe-Zentrum gebunden (nach: Vignais und Billoud, 2007).

Die kleinsten bisher beschriebenen [FeFe]-Hydrogenasen stammen aus Grünalgen und haben ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa (Florin *et al.*, 2001; Winkler *et al.*, 2002; Forestier *et al.*, 2003). [FeFe]-Hydrogenasen existieren auch als Di-, Tri- oder Tetramere mit akzessorischen Domänen, welche zusätzlich zum H-Cluster weitere [FeS]-Zentren enthalten können (s. Abb. 1.6).



**Abb.1.6:** Organisation der Proteindomänen von eukaryotischen [FeFe]-Hydrogenasen. C: konserviertes Cystein; W: Tryptophan. Lokalisierung: cp: Chloroplast; h: Hydrogenosom; cyt: Cytosol; n: Nukleus (verändert nach Tachezy und Dolezal, 2007).

Die akzessorischen Domänen können z.B. Ferredoxin, Flavodoxin oder NuoF, eine Untereinheit aus Komplex I der Atmungskette, sein (s. Abb. 1.6) und sind z. T. auch aus anderen elektronen-übertragenden Proteinen (z.B. FMN/FAD/NADPH-Domäne aus der Sulfit-Reduktase von *Bacillus halodurans*) bekannt. Über diese akzessorischen Domänen werden Elektronen zum aktiven Zentrum hin und von diesem weg transportiert (Meyer, 2007).

### 1.4.2 Reifung von Hydrogenasen

Eine Gemeinsamkeit aller Hydrogenasen ist die Koordination des Eisens im aktiven Zentrum mit den Liganden CO und CN. Die Bildung dieser Metallzentren und ihre Integration in die Apoproteine erfordert das Zusammenspiel verschiedener akzessorischer Proteine, den sog. Maturasen, die für die unterschiedlichen Hydrogenase-Typen spezifisch sind.

#### 1.4.2.1 [NiFe]-Hydrogenasen

Die Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen wurde an *Escherichia coli*, *Ralstonia eutropha*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum* und *Azotobacter* sp. als Modellorganismen aufgeklärt. Die Synthese komplexer Enzyme mit Metallclustern erfordert die Koordination von Bildung des Apoproteins, Aufnahme und Bereitstellung der Metalle und die Anordnung und Einfügung des Zentrums in das Apoprotein. Dieser komplexe Prozess wird durch eine Reihe von akzessorischen Proteinen vermittelt, die z. B. bei *E. coli* durch die sogenannten *hyp*-Gene (*hypA-F*) kodiert werden. Hierbei vermittelt z. B. HypC die Insertion des Eisens mit den Liganden CO und CN in die große Untereinheit (Drapal und Böck, 1998; Magalon und Böck, 2000). Nickel wird vermutlich über HypB, welches zusätzlich eine GTPase-Aktivität aufweist, bereitgestellt (Maier *et al.*, 1995), und eine Endopeptidase entfernt am C-Terminus des Proteins ein kurzes Peptid, wodurch eine Konformationsänderung des Proteins bewirkt wird und somit das Metallzentrum in den katalytischen Kern rückt (Drapal und Böck, 1998; Fritsche *et al.*, 1999). Die Carbonyl- und Cyano-Gruppen der Liganden werden durch Carbamoylphosphat bereitgestellt (Paschos *et al.*, 2001). Homologe der *hyp*-Gene sind in allen Organismen mit [NiFe]-Hydrogenasen vorhanden.

#### 1.4.2.2 [FeFe]-Hydrogenasen

Homologe der für die Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen verantwortlichen *hyp*-Gene wurden in Organismen mit [FeFe]-Hydrogenasen nicht gefunden. Da auch die Anforderungen für die Reifung der [FeFe]-Hydrogenasen andere zu sein scheinen – es muß nur ein Metall inseriert werden, die Enzyme bestehen meist aus nur einer Untereinheit und es erfolgt in den meisten Fällen keine C-terminale Prozessierung – kann von unterschiedlichen akzessorischen Proteinen ausgegangen werden (Vignais *et al.*, 2001).

Die sogenannten Maturasen der [FeFe]-Hydrogenasen wurden in der Grünalge *C. reinhardtii* entdeckt (Posewitz *et al.*, 2004). In *C. reinhardtii* sind dies die S-

adenosylmethionin- (SAM; „radical SAM“; s.u.) abhängigen Enzyme HydEF und HydG, wobei es sich bei *hydEF* um eine Genfusion handelt. Dies ist in anderen Organismen nicht der Fall, obwohl die Proteinsequenzen für HydE, HydF und HydG unter den Eukaryoten hoch konserviert sind und in allen Organismen mit [FeFe]-Hydrogenasen zu finden sind (Posewitz *et al.*, 2004; Pütz *et al.*, 2006). Die Gene *hydEF* und *hydG* werden in *C. reinhardtii* unter anaeroben Bedingungen zusammen mit den [FeFe]-Hydrogenase-Genen transkribiert. Die von Posewitz *et al.* (2004) hergestellte  $\Delta$ *hydEF*-Mutante besitzt keine Hydrogenase-Aktivität. Co-Expression der Maturasen HydEF und HydG mit der Hydrogenase A1 aus *C. reinhardtii* in *E. coli* führten zu einer aktiven Hydrogenase, fehlte HydEF oder HydG, war die Hydrogenase inaktiv (Posewitz *et al.*, 2004). Die Co-Expression von Clostridien-[FeFe]-Hydrogenase Maturasen mit [FeFe]-Hydrogenasen aus Grünalgen führte ebenfalls zur Assemblierung einer aktiven Hydrogenase (Girbal *et al.*, 2005).

SAM-abhängige Enzyme sind an den unterschiedlichsten Stoffwechselfvorgängen beteiligt. Proteine dieser Familie sind sowohl Überträger von Methyl-, Amino-, Ribosyl- und Aminopropylgruppen als auch Quelle für 5'-Deoxyadenosyl-Radikale, welche durch die Abstraktion eines H-Atoms für viele Biosynthesewege als Initiator gelten. Diese radikalische Reaktion ist für die Bildung von Eisen-Schwefel-haltigen Systemen beschrieben und benötigt eine spezielles [4Fe-4S]-Zentrum mit einem konservierten C<sub>x</sub>3C<sub>x</sub>2C-Sequenzmotiv (Sofia *et al.*, 2001; für eine Zusammenfassung s. Fontecave *et al.*, 2004). Das S-adenosylmethionin-abhängige Enzym HydE enthält zwei [4Fe-4S]-Cluster, während das ebenfalls SAM-abhängige HydG ein [4Fe-4S]-Cluster und ein undefiniertes FeS-Cluster enthält (Rubach *et al.*, 2005). HydE und HydG enthalten das oben beschriebene Sequenzmotiv C<sub>x</sub>3C<sub>x</sub>2C. Die Mutation der Cysteine zu Serin bei HydE oder HydG aus *Clostridium acetobutylicum* zeigte die Notwendigkeit dieser konservierten [4Fe-4S]-Zentren für die *in vivo* Assemblierung der [FeFe]-Hydrogenase (King *et al.*, 2006). Die SAM-abhängigen Enzyme HydE und HydG scheinen außerdem für die Assemblierung des [4Fe-4S]-Clusters der GTPase HydF verantwortlich zu sein (Brazzolotto *et al.*, 2006; McGlynn *et al.*, 2008).

In Neighbor-Net-Analysen konnte eine phylogenetische Beziehung der Maturase-Gene aus *T. vaginalis* zu *C. reinhardtii* und bakteriellen Sequenzen gezeigt werden. Hierbei gruppierte HydG mit Sequenzen, die als ThiH-ähnlich annotiert sind und bei Prokaryoten in die Thiamin-Biosynthese involviert sind. HydE zeigt Ähnlichkeit zu einer anderen Gruppe von SAM-abhängigen Proteinen, den Biotin-Synthasen. Die GTPase HydF gruppierte in einer von zwei Gruppen von prokaryotischen GTPasen (Pütz *et al.*, 2006).

Die Wiederherstellung einer Hydrogenase-Aktivität durch Co-Expression mit den Maturasen von *C. reinhardtii* und eine hohe Sequenzähnlichkeit der [FeFe]-Hydrogenase-Maturasen HydE, HydF und HydG unterschiedlicher Organismen (Posewitz *et al.*, 2004; Pütz *et al.*, 2006) spricht für ein ähnlich spezifisches Maturasesystem der [FeFe]-Hydrogenasen wie das der Hyp-Proteine für die [NiFe]-Hydrogenasen.

## 1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

Nach der Entdeckung der Hydrogenosomen durch Lindmark und Müller 1973 konnte der hydrogenosomale Stoffwechsel in den letzten Jahrzehnten an unterschiedlichen Organismen weiter aufgeklärt werden (Steinbüchel und Müller, 1986; Yarlett *et al.*, 1986; Müller, 1993).

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tielens (Universität Utrecht, Niederlande) sollte das letzte bisher nicht charakterisierte Enzym des Pyruvat-Stoffwechsels aus *T. vaginalis*, die Acetat:Succinat-CoA-Transferase (ASCT; contig 93909.m00117, TIGR-Datenbank), kloniert und die bisher bekannte Enzymaktivität durch homologe und heterologe Expression des Proteins bestätigt und näher beschrieben werden.

Anhand einer Proteomanalyse von Hydrogenosomen aus *T. vaginalis* konnte das Protein HydG identifiziert werden. Dieses zeigt hohe Sequenzähnlichkeit zu einer bereits bekannten Hydrogenase-Maturase aus *C. reinhardtii* (Pütz *et al.*, 2006; Pütz, 2007). Im Genom von *T. vaginalis* konnten durch eine BLAST-Analyse auch Homologe zu den beiden anderen Hydrogenase-Maturase-Genen *hydE* und *hydF* aus *C. reinhardtii* identifiziert werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Maturase-Gene aus *T. vaginalis*-DNA zu amplifizieren und in Kombination mit zwei Hydrogenasen aus *T. vaginalis* in *E. coli* heterolog zu exprimieren, um die Maturase-Funktion dieser Proteine zu bestätigen.

Außerdem sollten von den Genen *hydG* und *hydF* über homologe Rekombination sogenannte *knockout*-Mutanten von *T. vaginalis* hergestellt werden, um die Auswirkungen des Fehlens einzelner Hydrogenase-Maturasen auf die Hydrogenase-Aktivität in *T. vaginalis* zu beschreiben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von den folgenden Firmen bezogen:

Acros Organics (Geel, Belgien), Applied Biosystems (Darmstadt), GE Healthcare Biosciences (München), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Bandelin (Berlin), Biomol GmbH (Hamburg), Bio-Rad (München), Biozym Diagnostik (München), Calbiochem (Schwalbach am Taunus), Clontech (Heidelberg), Difco Laboratories Inc. (Palo Alto, USA), Eppendorf AG (Hamburg), Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Fluka (Buchs SG, Schweiz), Genomed (Bad Oeynhausen), Gibco (Karlsruhe), Hartmann Analytik (Braunschweig), ICN Biomedicals Inc. (Eschwege), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Life Technologies (Karlsruhe), Macherey-Nagel (Düren), Merck Biosciences (Darmstadt), Millipore (Schwalbach), New England Biolabs Inc. (Frankfurt am Main), PeqLab (Erlangen), Promega (Mannheim), Qiagen GmbH (Hilden), Roche (Mannheim), Carl Roth GmbH & Co. (Nümbrecht), Serva (Heidelberg), Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen), Vector Laboratories Inc. (Burlingame, Kanada), VWR (Darmstadt), Whatman Ltd. (Maidstone, England)

### 2.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
DNaseI	Roche
Klenow Fragment	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Promega
<i>Pfu</i> Ultra DNA-Polymerase	Stratagene
<i>Pfx</i> DNA-Polymerase	Invitrogen
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, New England Biolabs
RNase A	Serva
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Eppendorf
Triple Master DNA Polymerase	Eppendorf

## 2.3 Vektoren

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide genannt:

pBluescript SK+	Stratagene
pGEM-TEasy	Promega
p $\alpha$ SCS-NEO	Delgadillo <i>et al.</i> , 1997
pCDF-Duet1	Novagen
pRSF-Duet1	Novagen
pTagvag2	Hrdy <i>et al.</i> , 2004

## 2.4 Oligonukleotide

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten und von der Firma Metabion synthetisierten Oligonukleotide aufgeführt.

Für die Sequenzierung von DNA-Fragmenten in den Vektoren pBluescript SK+ und pGEM-T Easy wurden folgende Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide verwendet

M13 (24) for	5'-IRD700-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3'	$T_m = 67,8 \text{ }^\circ\text{C}$
M13 (24) rev	5'-IRD800-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'	$T_m = 59,3 \text{ }^\circ\text{C}$

Oligonukleotide für die Amplifikation der Hydrogenase- und der Maturase-Gene aus *T. vaginalis*-DNA. Für die gerichtete Klonierung in die Expressionsvektoren wurden die gekennzeichneten Restriktionsschnittstellen eingefügt.

Tv64_for	5'-GGT GGT <u>GAG CTC</u> GAT GCT TGC AAC AGC ATC TGC-3' Sac I	$T_m = 60 \text{ }^\circ\text{C}$
Tv64_rev	5'-GGT GGT <u>GCG GCC GCT</u> TAG AAC TTT GGA TGA TGC TTG-3' Not I	$T_m = 60 \text{ }^\circ\text{C}$
Tvfus_for	5'-GGT GGT <u>GGC GCG CCT</u> GAT GCT CTC CGT CAC AAT TAA TG-3' Asc I	$T_m = 68 \text{ }^\circ\text{C}$
Tvfus_rev	5'-GGT GGT <u>GCG GCC GCT</u> TAG AAG GAT TCA ATG AAA TGC G-3' Not I	$T_m = 62 \text{ }^\circ\text{C}$
HydE_for	5'-GGT GGT <u>CAT ATG</u> ATG CAA CTC AAT ACA CTC AAT CC-3' Nde I	$T_m = 64 \text{ }^\circ\text{C}$
HydE_rev-stop	5'-GGT GGT <u>CTC GAG</u> AAC GGA CTT ACC TTC CTT C-3' Xho I	$T_m = 56 \text{ }^\circ\text{C}$
HydF_for	5'-GGT GGT <u>GAG CTC</u> GAT GCT CAC TTC AAT TGG GCG C-3' Sac I	$T_m = 68 \text{ }^\circ\text{C}$

HydF_rev	5'-GGT GGT <u>GCG GCC GCT</u> TAT TTC CAT GGC TTG AGA ACC-3'	T <sub>m</sub> = 62 °C
	Not I	
HydG_for	5'-GGT GGT <u>CAT ATG</u> ATG TTG GCT TCA TTA AGT CGC-3'	T <sub>m</sub> = 60 °C
	Nde I	
HydG_rev-stop	5'-GGT GGT <u>GGT ACC</u> GAA GTA AAG ATC ACG CTT TC-3'	T <sub>m</sub> = 56 °C
	Kpn I	

Oligonukleotide für die Amplifikation der 5'- und 3'- untranslatierten Bereiche (UTRs) der Maturase-Gene *hydG* und *hydF* aus *T. vaginalis*-DNA. Für die gerichtete Klonierung in den Vektor p $\alpha$ SCS-NEO wurden die gekennzeichneten Restriktionsschnittstellen eingefügt.

HydG 5'UTR forward	5'-ATT TCA <u>GAG CTC</u> CCA ATG AGA ATA TGT TAC GAA G-3'	T <sub>m</sub> = 60 °C
	Sac I	
HydG 5'UTR reverse	5'-CAA CAT <u>GGT ACC</u> TCT GAA TAT TTA TTT ACA ATG AGG-3'	T <sub>m</sub> = 60 °C
	Kpn I	
HydG 3'UTR forward	5'-TCT TTA <u>GGA TCC</u> CTT CTA AGC AAA AAA ACA ATT CC-3'	T <sub>m</sub> = 60 °C
	BamH I	
HydG 3'UTR reverse	5'-GAA CCT <u>CTC GAG</u> GAT TTT CTG ACA CGG TAG ATG-3'	T <sub>m</sub> = 60 °C
	Xho I	
HydF 5'UTR forward	5'-ACA TTC <u>GAG CTC</u> GTT CTG CTG TAT AAC TTC CTG-3'	T <sub>m</sub> = 60 °C
	Sac I	
HydF 5'UTR reverse	5'-GAG CAT <u>GGT ACC</u> CTG TCA CCT TTT AGA TTT TAG G-3'	T <sub>m</sub> = 60 °C
	Kpn I	
HydF 3'UTR forward	5'-GCC ATG <u>TGA TCA</u> GAA ATA AAT ACA TAA AAT GTT ATA G-3'	T <sub>m</sub> = 58 °C
	Bcl I	
HydF 3'UTR reverse	5'-CAC CAA <u>CTC GAG GAC</u> AGT CGC AAG AAT GTT AG-3'	T <sub>m</sub> = 54 °C
	PspX I	

Oligonukleotide für die Amplifikation des Neomycin-Phosphotransferase-Gens.

Neo_for	5'-GGT CAC TTC ACA TTA ATG ATT GAA CAA GAT GCA TTG C-3'	T <sub>m</sub> = 71 °C
Neo_rev	5'-TTT TAA AGT AAG CAG TAG ATT CAG AAG AAC TCG TCA AG-3'	T <sub>m</sub> = 72 °C

Oligonukleotide für die Amplifikation des Acetat:Succinat-CoA-Transferase-Gens aus *T. vaginalis*-DNA. Für die gerichtete Klonierung in den Vektor pTagvag2 wurden die gekennzeichneten Restriktionsschnittstellen eingefügt.

AcHydr_F_Nde	5'-TAT <u>ACA TAT G</u> TTG GTC ATC ATC TTC ACG TGC TAT C-3'	T <sub>m</sub> = 64 °C
	Nde I	
ASCT-stoppp_rev	5'- CCG CCG <u>GGA TCC</u> CCA GCT ATC GAG GTG CAT TG-3'	T <sub>m</sub> = 62 °C
	BamH I	

## 2.5 Organismen

### 2.5.1 *Trichomonas vaginalis*

*T. vaginalis* Donne C-1:NIH

ATCC 30001

*T. vaginalis* T-1

J.-H. Tai, Institute of Biomedical Sciences, Taipeh, Taiwan

### 2.5.2 *Escherichia coli*

*E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen)

*F-ompT hsd S<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-) gal dcm* (DE3)

*E. coli* K12 ER2925 (New England Biolabs)

*ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2*

*E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene)

*recA1 endA1 thi-1 hsdR17 gyrA96 supE44 relA1lac [F'proAB lacI<sub>q</sub>ZΔM15 Tn10 (Tetr)]*

## 2.6 Arbeiten mit *E. coli*

*E. coli*-Kulturen in LB-Medium (10 g/l NaCl; 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 ml oder 150 ml Kultur-Volumen) wurden mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft. Das Wachstum erfolgte unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm über Nacht. Die Bestimmung der optischen Dichte der Bakteriensuspension erfolgte in einem UV/VIS Spektrophotometer (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Hierbei entspricht 1 OD<sub>600</sub> etwa 8 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml.

### 2.6.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Plasmidtransformation

Die Fähigkeit zur Aufnahme freier DNA aus dem Medium erhalten logarithmisch wachsende *E. coli*-Zellen durch eine Kaliumchlorid-Behandlung. Hierbei wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer 5 ml-Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,4 und 0,6 kultiviert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde 15 min bei 4 °C und 1700 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 1/12,5 des Kulturvolumens FB-Puffer (100 mM KCl; 50 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM Kaliumacetat; 10 % (w/v) Glycerin; pH 6,4) resuspendiert. Aliquots hiervon wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.6.2 Transformation von *E. coli*

100 µl kompetente *E. coli*-Zellen (2.6.1) wurden mit 2 µl des Ligationsansatzes (s. 2.8) oder 1 µl Plasmid-DNA für 20 min auf Eis inkubiert. Nach 45 s Hitzeschock bei 42 °C und sofortigem Abkühlen auf Eis für 2 min wurden 900 µl LB-Medium hinzugegeben. Nach 60 min Inkubation bei 37 °C wurden jeweils 100 µl und 900 µl auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.6.3 Anaerobe Proteinexpression in *E. coli*

Für die heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* BL21(DE3) wurden die Zellen in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum unter aeroben Bedingungen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,0 angezogen. Anschließend wurde die Proteinexpression mit 0,4 mM IPTG induziert und 2 h bei 16 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen für 1-2 min mit N<sub>2</sub> begast, um vorhandenen Sauerstoff aus der Gasphase zu eliminieren und über Nacht in mit Septen verschlossenen Kulturflaschen bei 16 °C inkubiert.

### 2.6.4 Zellaufschluß von *E. coli*-Expressionskulturen

Die Aufarbeitung der *E. coli*-Expressionskulturen erfolgte in einem Anaerobenzelt (Glas-Col, Terre Haute; USA) unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre, um eine Schädigung der Proteine durch Sauerstoff zu verhindern.

Die Kulturen wurden 10 min bei 3345 x g pelletiert und in 1 ml Lysispuffer [50 mM Hepes, pH 7,5; 200 mM NaCl; 5 % (v/v) Glycerin; 1 % (v/v) Triton X-100; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT] pro 50 ml Kulturvolumen resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch sechsmalige Ultraschallbehandlung für 10 s bei 50 % Leistung (Sono Plus HD60, Bandelin). Die Zelllysate wurden 30 min bei 16000 x g zentrifugiert und die Überstände in luftdicht verschließbaren Flaschen entgast auf Eis aufbewahrt.

### 2.7 Arbeiten mit *T. vaginalis*

Die *T. vaginalis* Stämme Donne C1:NIH und T1 wurden in TYM-Medium, pH 6,2 (Clark und Diamond, 2002) supplementiert mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem Pferdeserum, 7 ‰ (w/v) Eisenammoniumsulfat und 12,5 µg/ml Tetracyclin oder 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin [10.000 U<sub>PEN</sub>/ml bzw. 10.000 µg<sub>STREP</sub>/ml, MP Biomedicals, Heidelberg], bei 37 °C angezogen.

Die Erhaltung der *T. vaginalis*-Kultur erfolgte in 15 ml Schraubdeckel-Kulturröhrchen in supplementiertem TYM-Medium. Von einer 2 Tage alten Kultur wurden 100 µl in 12 ml frisches Medium übertragen und bis zum nächsten Überimpfen 2 Tage bei 37 °C inkubiert. Zur Anzucht in größerem Maßstab wurden aus dieser Vorkultur 5 ml in 50 ml supplementiertes TYM-Medium gegeben, welches zusätzlich 12,5 µg/ml Tetracyclin oder

1 % Penicillin/Streptomycin enthält. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde diese Kultur für Nukleinsäure-Präparationen bzw. für die Inokulation größerer Kulturvolumina verwendet.

### 2.7.1 Elektroporation von *T. vaginalis*

500 ml TYM-Medium wurden mit 50 ml einer Übernacht-Vorkultur von *T. vaginalis* angeimpft (2.7). Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde die Kultur 15 min bei 1000 x *g* pelletiert. 1 g Zellen wurde in 1,5 ml eiskaltem Medium resuspendiert und vier Mal durch eine Kanüle (Sterican Gr. 14; Braun Melsungen AG, Melsungen) gezogen. 300 µl der vorbereiteten Zellsuspension wurden mit 30-100 µg Plasmid-DNA in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette (4 mm; Molecular BioProducts Inc., San Diego, USA) gemischt und einem Elektroschock unterzogen. Die Parameter der Elektroporation waren 1000 µF Kapazität und 345 V Spannung bei einer Zeitkonstante von etwa 200 ms. Nach dem Puls wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in vorgewärmtes (37 °C) TYM-Medium mit Penicillin/Streptomycin gegeben und bei 37 °C inkubiert. Die Selektion erfolgte nach 4 h mit 100 µg/ml G418 (Roth).

### 2.7.2 Herstellung von Einzelzellklonen

Nach der Transformation wurde die *T. vaginalis*-Kultur 24 h bei 37 °C inkubiert und die Zellen 15 min bei 1000 x *g* zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem TYM-Medium incl. 100 µg/ml G418 resuspendiert und 24 h weiter inkubiert. Die Kultur wurde erneut 15 min bei 1000 x *g* zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellpellet in ca. 1 ml TYM-Medium mit 100 µg/ml G418 resuspendiert. Die *T. vaginalis* Zellen wurden in 250 ml TYM-Medium mit 0,5 % Agar und 100 µg/ml G418 (45 °C) überführt und in Petrischalen gegossen. Diese wurden ca. 14 Tage in einem mit N<sub>2</sub> begasten Anaerobengefäß (Schütt Biotech GmbH, Göttingen) bei 37 °C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden in 250 µl TYM-Medium incl. 100 µg/ml G418 überführt und nach 24 h bei 37 °C das Kulturvolumen auf 12 ml erhöht.

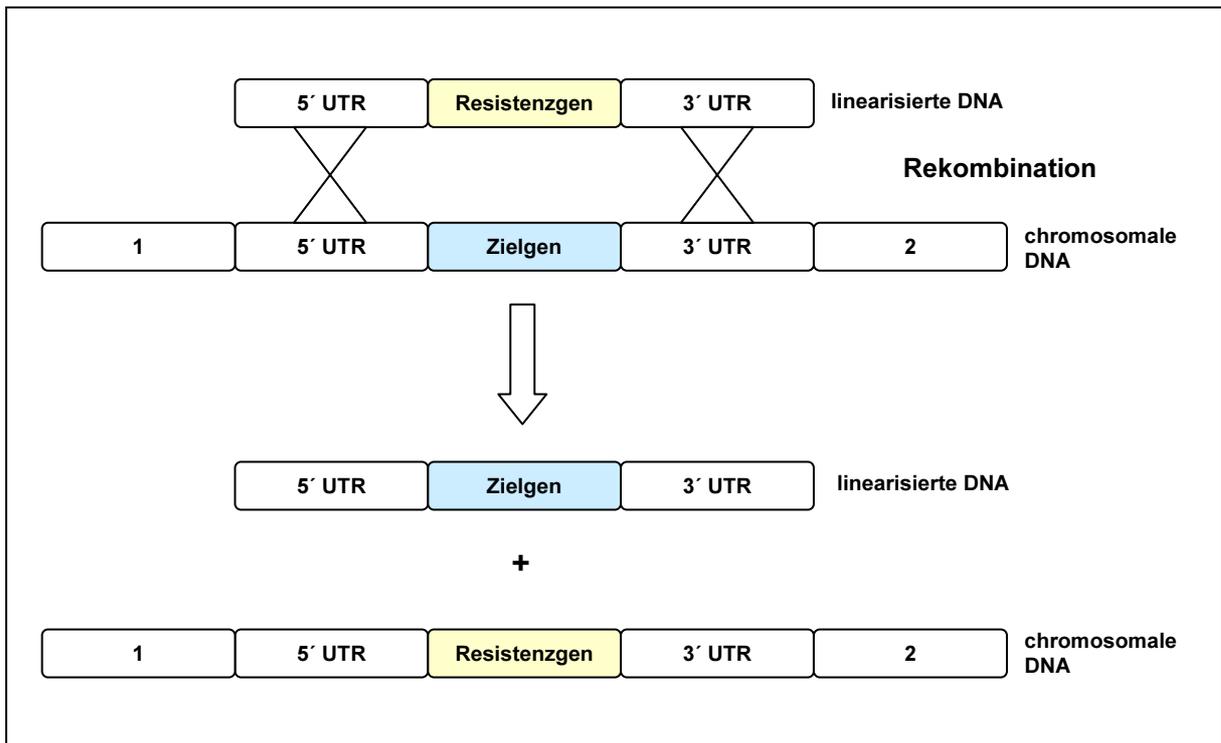
Bei erfolgreichem Wachstum nach zwei bis vier Tagen wurden die transformierten *T. vaginalis* Kulturen wie oben beschrieben (s. 2.7) in TYM-Medium mit 100 µg/ml G418 kultiviert (modifiziert nach Land *et al.*, 2004 und Delgadillo *et al.*, 1997).

### 2.7.3 Isolierung von Hydrogenosomen aus *T. vaginalis*

Hydrogenosomen wurden aus einem Kulturvolumen von 1-3 Litern isoliert. Die *T. vaginalis* Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000 x g und 4 °C für 10 min pelletiert und zweimal mit SMB (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS-KOH, pH 7,2, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) gewaschen. Das Pellet wurde in 30 ml SMDI (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS, pH 7,2, 10 mM DTT, 50  $\mu$ g/ml TLCK, 10  $\mu$ g/ml Leupeptin) resuspendiert und mit Glasperlen ( $\varnothing$  400-600 nm) auf Eis 25 min gemörstert. Durch 10 minütige Zentrifugation bei 755 x g und 4 °C wurden die Zelltrümmer, nicht lysierte Zellen und die Glasperlen von dem Cytosol und den Organellen abgetrennt. Der Überstand dieser Zentrifugation, das Gesamtzellextrakt, wurde 10 min bei 7500 x g zentrifugiert, um die Organellen (Lysosomen und Hydrogenosomen) vom Cytosol zu trennen. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurden die Organellen in 40 ml 45 % isotonischer Percoll-Lösung (45 % Percoll; 125 mM Saccharose / 5 mM MOPS-KOH, pH7,4; 5 mM DTT; 25  $\mu$ g/ml TLCK; 5  $\mu$ g/ml Leupeptin) resuspendiert und luftblasenfrei in Ultrazentrifugen-Gefäße (Optiseal, Beckman, Palo Alto, USA) gefüllt. Die Zentrifugation erfolgte in dem Vertikalrotor VTi50 (Beckman) bei 30000 rpm (ca. 75000 x g) für 45 min und 4 °C ohne Bremse (L8-70M Ultrazentrifuge, Beckman). Nach der Zentrifugation wurde die hydrogenosomale Bande abgenommen. Diese Hydrogenosomen-Fraktion wurde 1:10 mit SMDI ( $1/_{10}$  Leupeptin und TLCK) verdünnt und für 15 min bei 3000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml SMDI resuspendiert und für 10 min bei 7500 x g und 4 °C zentrifugiert und die Hydrogenosomen wurden in 500  $\mu$ l SMDI aufgenommen (modifiziert nach Bradley *et al.*, 1997).

### 2.7.4 Herstellung von Deletionsmutanten für die Gene der Maturasen HydF und HydG aus *T. vaginalis* durch homologe Rekombination

Zur Untersuchung von Genen unbekannter Funktion eignet sich in Organismen mit haploider Genorganisation wie *T. vaginalis* die Deletion dieser Gene durch homologe Rekombination. Hierbei wird ein Konstrukt erstellt, das einen Selektionsmarker sowie die flankierenden Bereiche (5'- und 3'-untranslatierte Bereiche; UTRs) des zu deletierenden Gens enthält. Dieses Konstrukt wird in die Zelle eingebracht, und durch Bindung homologer Bereiche kommt es zum Austausch des Zielgens gegen den Selektionsmarker und damit zur Deletion (s. Abb. 2.1).



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der homologen Rekombination. Ein Resistenzgen wird über Rekombination von Zielgen-flankierenden Bereichen (5'- und 3'-untranslatierter Bereich, UTR) gegen das Zielgen ausgetauscht und dient gleichzeitig als Selektionsmarker. 1 und 2 sind chromosomale Bereiche außerhalb der UTRs.

## 2.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren erfolgten nach Standardprotokollen nach Sambrook *et al.* (1989) und werden hier nicht ausführlich beschrieben:

- Phenolextraktion und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen durch Ethanol- oder Isopropanolextraktion
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Trennung von Nukleinsäuren und deren Größenbestimmung durch Agarose-Gelelektrophorese
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Ligationen von DNA-Fragmenten mit Vektoren mit Hilfe der T4-DNA-Ligase
- Dephosphorylierung von Vektoren mit der alkalischen Phosphatase

### 2.8.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *T. vaginalis*

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus *T. vaginalis* wurde eine 2 Tage alte 12 ml Kultur (s. 2.7) 10 min bei 1000 x *g* zentrifugiert und die pelletierten Zellen in 100 µl TRIZOL<sup>®</sup> Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) lysiert. Die Gesamt-RNA wurde nach Herstellerangaben isoliert, in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

### 2.8.2 Präparation von genomischer DNA aus *T. vaginalis*

Eine 500 ml *T. vaginalis*-Kultur (s. 2.7) wurde 5 min bei 900 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit Doran's PBS Puffer (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen und in 1 ml TE-Puffer, pH 8,0 mit 0,1 % (w/v) SDS und 50 µg/ml Proteinase K resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl DEPC wurde 5 min auf Eis inkubiert und zweimal mit 40 ml Triton X-100-RSB [10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM MgCl, 1 % (v/v) Triton-X-100, 0,04 % (v/v) DEPC] für 10 min bei 2879 x *g* und 4 °C gewaschen. Das Pellet wurde in 0,5 ml 10 mM EDTA mit 0,1 % (v/v) SDS gelöst und 15 min bei 65°C inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 5000 x *g* und 4°C wurde das Pellet in 0,5 ml TE mit 0,1 % (w/v) SDS und 50 µg/ml Proteinase K für 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 33 µl 5 M NaCl und 27 µl Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-Puffer [2 % (w/v) CTAB; 100 mM Tris-HCl, pH 8; 20 mM EDTA, pH 8,0; 1,4 mM NaCl] wurde die genomische DNA gefällt. Es wurde 10 min bei 65 °C inkubiert und die Lösung anschließend mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Nach Zentrifugation bei 5000 x *g* für 10 min bei Raumtemperatur wurde die wäßrige Phase mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde mit 0,6 Vol. Isopropanol versetzt und erneut zentrifugiert (s.o.), um die genomische DNA zu fällen. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst (Riley *et al.*, 1991).

### 2.8.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Sofern nicht anders angegeben, wurde ein PCR-Ansatz in einem Volumen von 25 oder 50 µl durchgeführt. Dieser Ansatz enthielt einen Polymerase-spezifischen Puffer in einfacher Konzentration, 0,2 mM je dNTP, 1 µM je Primer und 1 U *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase. Es wurden 10-100 ng Plasmid-DNA, cDNA oder lysierte *E. coli*-Zellen als Matrize eingesetzt. In einem Thermocycler der Firma Eppendorf wurden nach einer anfänglichen Denaturierung von 2 min bei 95 °C 25-30 Zyklen von 30 s bei 95 °C, 30 s bei 3-8 °C unter der jeweiligen Schmelztemperatur der eingesetzten Primer und 45 s bis 2,5 min bei 72 °C programmiert. Es folgten weitere 5 min bei 72 °C. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert.

### 2.8.4 Klonierung von PCR-Fragmenten

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten wurden diese zunächst auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der DNA-Fragmente aus dem Gel und die Ligation in die Vektoren (s. 2.3 und 2.8) erfolgten nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989).

### 2.8.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte aus 2 ml einer Übernachtskultur mit dem Nucleospin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit Wasser von der Säule eluiert.

### 2.8.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode von Sanger *et al.* (1977). Es wurde eine Laserfluoreszenz-Sequenzierung mit Hilfe eines DNA Sequencer Long ReadIR 4200 (Licor) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden 2-3 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 20 µl H<sub>2</sub>O eingesetzt. Die Sequenzierreaktionen wurden mit Hilfe des „Cycle Reader Auto DNA Sequencing Kit“ (Fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Primus 96 Plus Thermocycler der Firma MWG Biotech. Nach einmaliger Denaturierung bei 98 °C für 2,5 min wurde ein PCR-Programm mit 25 Zyklen mit 1 min bei 98 °C (Denaturierung), 35 s bei 68,5 °C (Hybridisierung) und 2 min bei 71 °C (Synthese) durchgeführt. Nach Abschluss der PCR wurden die Proben mit 7 µl Formamid-Ladepuffer (200 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0; 100 ml Paraosanilin 100 mg/ml; 9,5 ml Formamid) versetzt und für 3 min bei 70 °C denaturiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und jeweils 1,5 µl jeder Reaktion auf ein Sequenzgel (denaturierendes Polyacrylamid-Gel) aufgetragen. Die Zusammensetzung und der Aufbau des Gels erfolgten nach Herstellerangaben.

### 2.8.7 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

100 ng DNA wurden in 37 µl H<sub>2</sub>O suspendiert und 15 min auf 100 °C erhitzt. Nach sofortigem Abkühlen auf Eis wurden 5 µl 10 x Oligo-Mix (50 OD<sub>260</sub> p(dN)<sub>6</sub> (GE Healthcare); 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM Tris-HCl, pH 7,0; je 500 µM dATP, dGTP und dTTP; 70 mM β-Mercaptoethanol), 5 µl BSA (1 mg/ml), 3 µl α<sup>32</sup>P-dCTP (= 1,1 MBq) und 2,5 U Klenow-Fragment hinzugegeben und für 2-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sonde wurde über Sephadex-G50-Säulen gereinigt. Hierzu wurde in TE-Puffer vorgequollenes Sephadex-G50 als Matrixmaterial bis zur Einkerbung am oberen Ende in eine mit Watte verschlossene Pasteurpipette eingefüllt. Dem Markierungsansatz wurden 2 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0) hinzugegeben. Es wurde mit 600 µl TE-Puffer aufgefüllt und auf die Sephadex-Säule aufgetragen. Mit weiteren 400 µl TE-Puffer wurde die Sonde eluiert. Die spezifische Aktivität der Sonden betrug mindestens 10<sup>8</sup> cpm/µg DNA. Die Sonde wurde vor Zugabe zur Hybridisierungslösung mit 1/10 Volumen 1 M NaOH 2-5 min denaturiert und mit gleichem Volumen 1 M HCl neutralisiert.

### 2.8.8 Northern-Analyse

Die Trennung der RNA (s. 2.8.1) erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem 1 % Agarosegel mit Ethidiumbromid (1:80.000) in 1 x MOPS-Puffer (20 mM MOPS, pH 7,0; 5 mM Natriumacetat, pH 6,4; 1 mM EDTA, pH 8,0) und 6,6 % (v/v) Formaldehyd. Alle verwendeten Materialien wurden zum Schutz vor RNasen mit Na-Hypochlorit behandelt, und alle Lösungen wurden mit DEPC-Wasser (0,01 %) angesetzt. Pro Spur wurden 10 µg Gesamt-RNA mit Northern Ladepuffer (57 % (v/v) Formamid; 17,5 mM MOPS pH 7,0; 4,4 mM Natriumacetat pH 6,4; 0,8 mM EDTA pH 8,0; 8 % (v/v) Formaldehyd; 1,4 % (w/v) Ficoll 400; 90 µg/ml Bromphenolblau) versetzt. Je 2 µl Größenstandard (RiboRuler™ High Range RNA Ladder, Fermentas) wurden in 10 µl TE gelöst und mit 2 µl Northern Ladepuffer versetzt. Der Größenstandard und die RNA-Proben wurden für 15 min bei 60 °C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte für ca. 90 min bei 4 V/cm in 1 x MOPS-Puffer. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 3 x 20 min in DEPC-Wasser incl. Proteinase K gewaschen. Der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham Biosciences) erfolgte über Kapillartransfer in 20 x SSC Puffer nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989). Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran zur Fixierung der RNA für 3 min mit UV-Licht bestrahlt.

Die Vorhybridisierung der Membran erfolgte für mindestens 1 h bei 68 °C in 6 x SSPE mit 0,1 % (w/v) SDS; 0,02 % (w/v) PVP; 0,02 % Ficoll 400 und 100 µg/ml Fischsperma-DNA (Roche Applied Science). Danach wurde die Membran über Nacht bei 68 °C in 3 x SSPE mit 0,1 % (w/v) SDS; 0,02 % (w/v) PVP; 0,02 % Ficoll 400; 100 µg/ml Fischsperma-DNA und der Hybridisierungssonde (s. 2.9.7) hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran für dreimal 20 min bei 68 °C in 2 x SSPE mit 0,1 % (w/v) SDS gewaschen, getrocknet und auf XAR-Filmen (Kodak) über Nacht bei -80 °C mit Verstärkerfolie exponiert.

### 2.8.9 Southern-Analyse

Je 10 µg genomische DNA aus *T. vaginalis* (s. 2.8.2) wurden mit 50 U einer Restriktionsendonuklease geschnitten und auf einem 1 % Agarosegel bei 5 V/cm in 1X TAE-Puffer getrennt. Das Gel wurde bei Raumtemperatur unter Schütteln mit den folgenden Lösungen inkubiert: Depurinierung für 1 x 15 min in 0,25 M HCl, Denaturierung für 2 x 15 min in Southern I (0,5 M NaOH; 1 M NaCl), Neutralisierung für 2 x 15 min in Southern II (0,5 M Tris-HCl, pH 7,5; 3 M NaCl) und Äquilibration für 2 x 15 min in 20 x SSPE (3 M NaCl; 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 20 mM EDTA, pH 8,0). Danach wurde die DNA mit 20 x SSPE im Trockenblotverfahren nach Sambrook *et al.* (1989) auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham Biosciences) übertragen. Die Membran wurde mit 3 x SSPE gewaschen, getrocknet und zur Fixierung der DNA für 3 min mit UV-Licht bestrahlt. Die Hybridisierung erfolgte wie bei der Northern-Analyse (s. 2.8.8).

## 2.9 Biochemische Methoden

### 2.9.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Es wurden jeweils 0,5-20 µl der Probe mit 200 µl Bradfordreagenz (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, München) versetzt, der Ansatz mit H<sub>2</sub>O auf 1 ml aufgefüllt und für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gegen einen Nullwert bestimmt. Die Kalibrierungsgerade wurde mit Rinderserumalbumin als Standard erstellt.

### 2.9.2 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte durch eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Die Herstellung der Lösungen, das Gießen der Gele und die elektrophoretische Trennung erfolgten nach Sambrook *et al.* (1989). Die SDS-PAGE wurde mit 10 % Trenngelen in PerfectBlue Twin S oder M Systemen (Peqlab, Erlangen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit  $\frac{1}{5}$  Volumen Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 5 mM EDTA; 5 % (w/v) SDS; 25 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 50 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert.

### 2.9.3 Färbung von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blau

Die Coomassiefärbung von Proteingelen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Heukeshofen und Dernick (1988). Eine Tablette Phast Gel Blue R-350 (GE Healthcare Biosciences) wurde in 80 ml H<sub>2</sub>O unter Rühren gelöst. Nach Zugabe von 120 ml Methanol wurde die Lösung filtriert und bei 4 °C gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch wurde eine 1:10 Verdünnung (v/v) der Lösung mit 10 % (v/v) Essigsäure angefertigt und auf 90 °C erhitzt. Die Lösung wurde heiß auf das Gel gegeben und 60 min geschüttelt. Anschließend wurde der Hintergrund mit 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt.

### 2.9.4 Western Blot

Für einen immunologischen Nachweis wurden die Proteine aus der SDS-PAGE mittels elektrophoretischen Transfers auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (nach Gershoni und Palade 1983). Der Transfer erfolgte in einer Halbtrockenzelle (Nova Blot Multiphor II, GE Healthcare Biosciences). Die Nitrozellulosemembran (Hybond C Extra, GE Healthcare) wurde vor Verwendung 5 min in H<sub>2</sub>O äquilibriert. Die Anode der Halbtrockenzelle wurde mit H<sub>2</sub>O befeuchtet und anschließend 3 Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei aufgelegt, die zuvor mit Transferpuffer (39 mM Glycin; 48 mM Tris; 0,037 % (w/v) SDS; 20 % (v/v)

Methanol) getränkt wurden. Auf das Whatman-Papier wurde luftblasenfrei die Nitrozellulosemembran gelegt, gefolgt von dem in H<sub>2</sub>O gewaschenen Polyacrylamidgel. Zum Schluss wurden 3 weitere mit Transferpuffer getränkte Lagen Whatman-Papier aufgelegt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 0,82 mA/cm<sup>2</sup>. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S (0,5 % (w/v) Ponceau S; 1 % (v/v) Essigsäure) gefärbt und mit Wasser entfärbt.

## **2.9.5 Immunodetektion**

### **2.9.5.1 Detektion von rekombinanten Proteinen mit His-Anhang**

Zum Nachweis der rekombinanten Proteine diente ein monoklonaler Maus IgG anti-His Antikörper der Firma Novagen. Die Nitrozellulosemembran (s. 2.9.4) wurde für 1 h in Blockingpuffer (3 % (w/v) BSA in TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl)) geschwenkt. Die Inkubation mit dem Antikörper (0,1 µg/ml in Blockingpuffer) erfolgte für 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C auf einem 3D-Taumelschüttler (Multi 3D-Shaker, Peqlab). Anschließend wurde die Membran 2 x 10 min in TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween 20) sowie 1 x 10 min in TBS inkubiert. Der gebundene anti-His Antikörper wurde mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Maus Antikörper (ImmunoPure Goat Anti-Mouse IgG, (H + L) Peroxidase Conjugated, Pierce in einer 1:10.000 Verdünnung in TBS und 1,5 % (w/v) Magermilchpulver detektiert. Nach 1 h bei RT wurde die Membran 3 x in TBS-T gewaschen. Die Nachweisreaktion der Meerrettich-Peroxidase erfolgte durch Mischen von 3 ml Lösung A (0,1 M Tris-HCl, pH 8,6; 1,25 mM Luminol), 300 µl Lösung B (6 mM para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO) und 0,9 µl 30 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Das Gemisch wurde auf die Membran gegeben und für 2 min dort belassen. Je nach Signalstärke wurde die Membran für 1-10 min auf einem Film (Lumi-Film Chemiluminescent Film, Roche, Basel) exponiert.

### **2.9.5.2 Detektion von rekombinanten Proteinen mit S-Anhang**

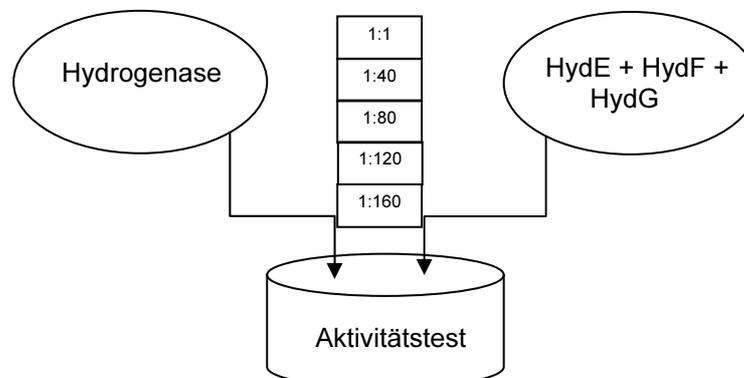
Für die Detektion rekombinanter Proteine mit S-Anhang wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h in 5 % Magermilchpulver in TBS-T geschwenkt. Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen und 1 h mit dem S-Protein HRP Conjugat (1:5000 in TBS-T) inkubiert. Die Detektion erfolgte wie in 2.9.5.1 beschrieben mit den Lösungen A und B und einem Chemiluminescent Film (Roche, Basel).

### 2.9.5.3 Detektion der ASCT

Nach der Inkubation der Nitrozellulosemembran mit 5 % BSA/TBST wurde die ASCT mit dem Erstantikörper anti-TvASCT (1:1000 in 1% BSA/TBS-T) und dem Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper gegen Kaninchen (1:10.000 in 1 % BSA/TBS-T) detektiert. Alternativ wurde der über den pTagvag2-Vektor angehängte Hämagglutinin-Tag mit einem anti-Hämagglutinin-Antikörper (H6908, Sigma) detektiert. Das Blocken und die Inkubation des anti-Hämagglutinin-Antikörpers erfolgten in 3% BSA/TBS (1:5000), während der Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper gegen Maus in 10 % Magermilchpulver inkubiert wurde. Die Detektion erfolgte wie in 2.9.5.1 beschrieben mit den Lösungen A und B und einem Chemiluminescent Film (Roche, Basel).

### 2.10 Hydrogenase-Aktivitätstest

Die Aktivität der Hydrogenase in Abhängigkeit von den Maturasen HydE, HydF und HydG wurde in Rohextrakten von exprimierenden *E. coli*-Zellen gemessen. Hierzu wurden *E. coli*-Rohextrakt mit heterolog exprimierter Hydrogenase in den Verhältnissen 1:1, 1:40, 1:80, 1:120 und 1:160 mit *E. coli*-Rohextrakt mit heterolog exprimierten Maturasen für den Aktivitätstest in der Messküvette gemischt (s. Abb. 2.2).

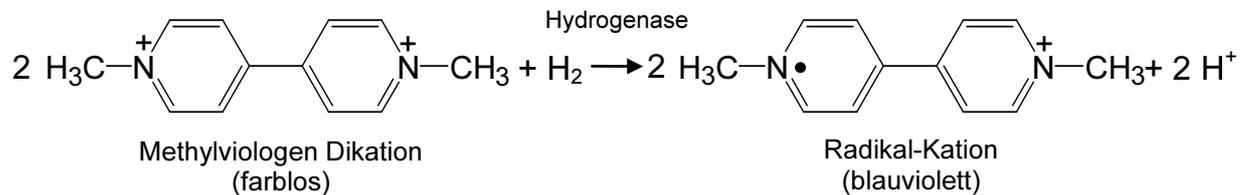


**Abb. 2.2:** Prinzip des Hydrogenase-Aktivitätstests. Hydrogenase und Maturase wurden für die Aktivitätsmessung in den Verhältnissen 1:1 bis 1:160 in die Messküvette gegeben.

Die Hydrogenase-Aktivität wurde indirekt über die Reduktion von Methylviologen gemessen. Methylviologen dient hierbei als Elektronenakzeptor bei der Umsetzung von  $H_2$  zu  $2 H^+$  durch die Hydrogenase. Die Reduktion von Methylviologen durch Wasserstoff (s. Abb. 2.3) in mit Septen verschlossenen Quarzküvetten (Hellma, Müllheim, Baden) wurde bei 604 nm in einem Genesis 10 UV Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) gemessen.

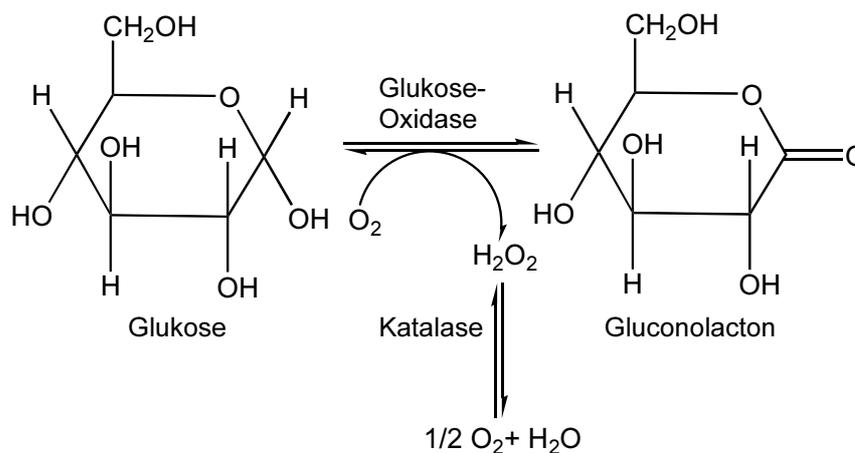
Ein 1 ml-Reaktionsansatz enthielt 10 mM Methylviologen, 5 mM DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 und wurde 1 min mit Wasserstoff begast. Die Reaktion wurde durch Zugabe der

Proteinlösungen mit gasdichten Hamilton-Spritzen gestartet und die Extinktionsänderung bei 604 nm verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient für Methylviologen wurde mit  $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  angenommen (Payne *et al.*, 1993).



**Abb. 2.3:** Reduktion von Methylviologen durch Wasserstoff

Da die Hydrogenase durch Sauerstoff reversibel gehemmt wird, wurde durch das Glukose-Oxidase/Katalase-System (Packard und Cullingford, 1978) der Sauerstoff aus der Reaktion entfernt. Bei dieser Reaktion wird Glukose unter Verbrauch von  $\text{O}_2$  durch die Glukose-Oxidase zu Gluconolacton oxidiert. Die Katalase reduziert das entstehende Wasserstoffperoxid zu Wasser und  $\frac{1}{2} \text{O}_2$  (s. Abb. 2.4).



**Abb. 2.4:** Entfernung von Sauerstoff aus einem Reaktionssystem mit Hilfe einer gekoppelten Glukose-Oxidase und Katalase-Reaktion (nach Packard und Cullingford, 1978).

## 2.11 Bioinformatische Methoden

### 2.11.1 Sequenzanalysen, Datenbankvergleiche und phylogenetische Netzwerke

Für die Analyse und Bearbeitung von Sequenzen wurde das GCG Programmpaket (Version 10.3) der *Genetics Computer Group*, Universität Wisconsin, USA, (<http://www.accelrys.com/about/gcg.html>; Devereux *et al.*, 1984) verwendet. Das GCG-Programmpaket steht auf einem SDI Origin 2000 Parallelrechner der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung. Es handelt sich hierbei um ein Programmpaket für die Analyse von Nukleinsäure- und Protein-Sequenzen, mit dem alle ermittelten Sequenzen bearbeitet wurden.

Für die Suche nach homologen Sequenzen in GenBank wurden die Programme BLASTN, BLASTX und BLASTP des BLAST (*basic local alignment search tool*)-Pakets am NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) verwendet (Altschul *et al.* 1990). In den TIGR (*the institute for genomic research*) Genom-Datenbanken von *T. vaginalis* ([www.tigr.org/tdb/e2k1/tvg/](http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tvg/)) wurden für die Suche nach homologen Sequenzen die Programme BLASTN, BLASTX und BLASTP des WU BLAST 2.08 verwendet (Gish, 1996, unveröffentlicht).

Globale, multiple Sequenz-Alignments wurden mit dem Programm Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) erstellt. Hierbei wurden mehrere Sequenzen über ihre gesamte Länge miteinander verglichen und Lücken eingefügt, um das Alignment zu optimieren. Das Programm Neighbor-Net (Bryant und Moulton, 2004) verwendet diese Distanzen, um mit einer Variante der Neighbor-joining-Algorithmen (Saitou und Nei, 1987) ein Netzwerk zu berechnen. Mit dem Programm SPLITTREE4 (Version 4.8; Huson und Bryant, 2006) wurden die Netzwerke graphisch dargestellt.

### **2.11.2 Voraussagen über mögliche Transitpeptide**

Mögliche Signalpeptide von Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe der Programme IPSORT ([hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/](http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/); Bannai *et al.*, 2001, 2002) und TARGETP ([www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/); Emanuelsson *et al.*, 2000) ermittelt.

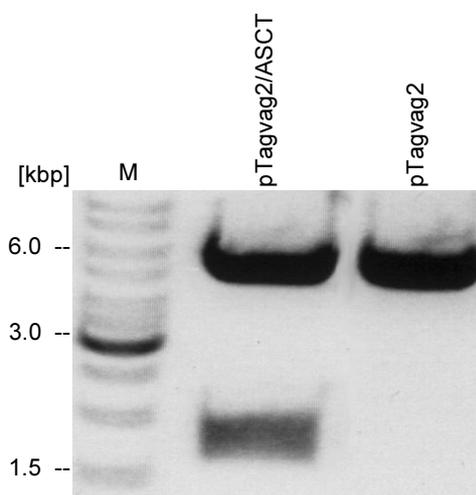
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung und homologe Überexpression der Acetat:Succinat-CoA-Transferase aus *T. vaginalis*

In *T. vaginalis* konnte zwar Enzymaktivität einer Acetat:Succinat-CoA-Transferase detektiert werden, jedoch wurde bisher kein entsprechendes Gen identifiziert (Steinbüchel und Müller, 1986). In der TIGR Genomdatenbank ist ein Gen, das für eine mögliche ASCT aus *T. vaginalis* kodiert, vorhanden (93909.M00117). Diese Sequenz sollte in dieser Arbeit kloniert und näher charakterisiert werden.

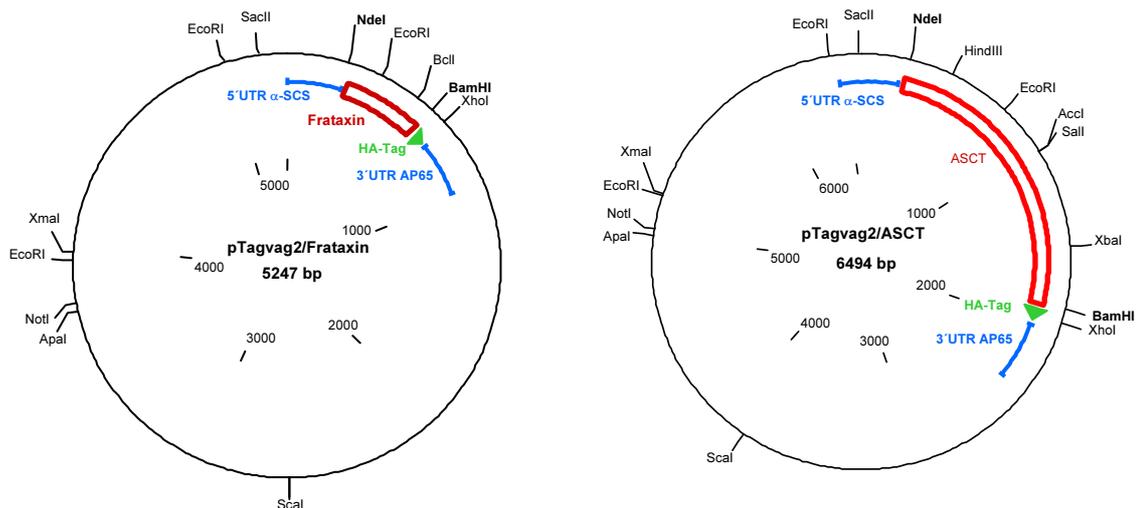
##### 3.1.1 Herstellung des Vektors pTagvag2/ASCT

Die Acetat:Succinat-CoA-Transferase (ASCT, 93909.M00117) wurde aus genomischer DNA von *T. vaginalis* mit den Oligonukleotiden AcHydr\_F\_Nde und ASCT-stopp\_rev amplifiziert, wodurch die Restriktionsschnittstellen NdeI am 5'-Ende und BamHI am 3'-Ende der Sequenz eingefügt wurden. Dieses 1572 bp Fragment wurde für Sequenzierungen in den Vektor pBluescript SK+ (Stratagene) kloniert. Nach Bestätigung, dass es sich um die ASCT aus *T. vaginalis* handelt, wurde dieses Fragment mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und BamHI aus dem Sequenzierungsvektor herausgeschnitten und gerichtet in den Expressionsvektor pTagvag2 (Hrdy *et al.*, 2004; s. Abb. 3.2) kloniert (s. Abb. 3.1).



**Abb. 3.1:** Klonierung der Acetat:Succinat-CoA-Transferase in den Tagvag2-Expressionsvektor. **M:** Größenstandard.

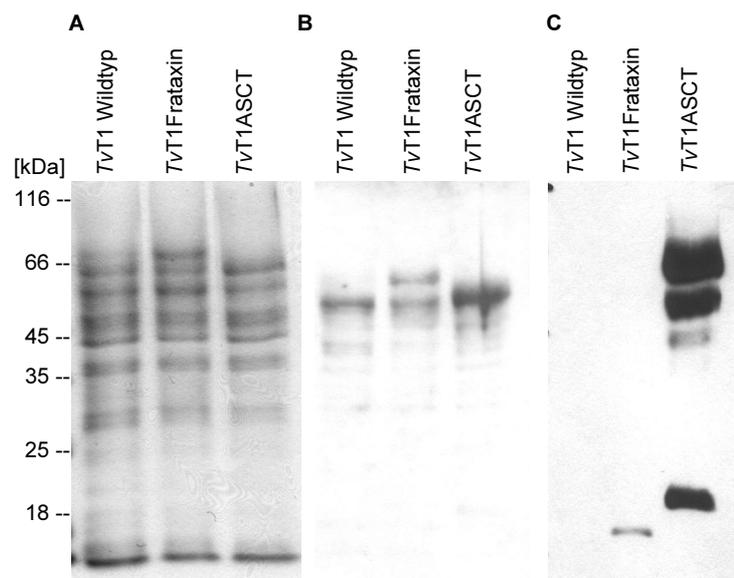
*T. vaginalis* T1-Zellen wurden mit 50 µg des Plasmids pTagvag2/ASCT bzw. pTagvag2/Frataxin (s. Abb. 3.2) als Kontrolle elektroporiert und in TYM-Medium mit 100 µg/ml G418 selektiert. Die resultierende Stämme *TvT1ASCT* und *TvT1Frataxin* wurden mittels Northern- und Western-Analysen verifiziert.



**Abb. 3.2:** Vektorkonstrukte pTagvag2/Frataxin (5247 bp) und pTagvag2/ASCT (6494 bp).

### 3.1.2 Western-Analyse der rekombinanten Stämme TvT1ASCT und TvT1Frataxin

In einer Western-Analyse wurde zunächst die Elektroporation von *T. vaginalis* T1 mit den Plasmiden pTagvag2/ASCT und pTagvag2/Frataxin überprüft. Hierzu wurden 2 ml der resultierenden Kulturen TvT1ASCT und TvT1Frataxin zentrifugiert und das Gesamtzell-extrakt auf einem 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel getrennt. Die Detektion erfolgte nach der Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran über einen anti-TvASCT Antikörper und einen anti-Hämagglutinin Antikörper.

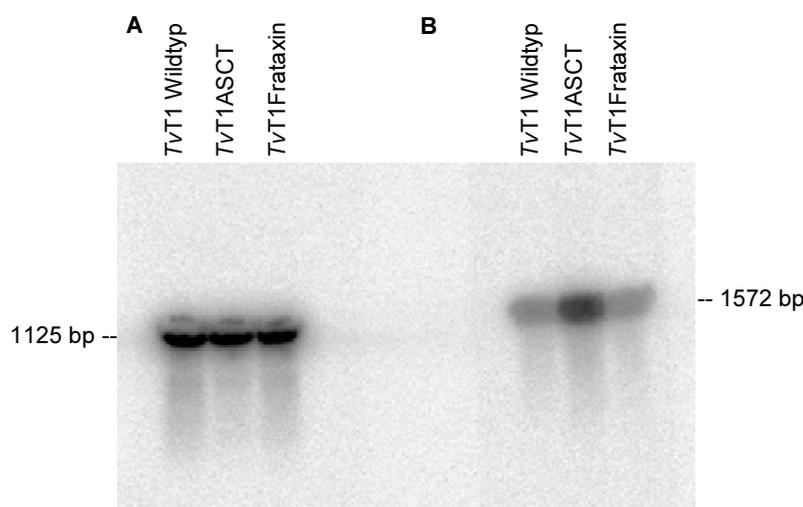


**Abb. 3.3:** Western-Analyse von *T. vaginalis* Gesamtzellextrakt zur Kontrolle der Transformation mit pTagvag2/ASCT und pTagvag2/Frataxin. Es wurden je Spur 25 µg Protein über eine 12 %ige SDS-PAGE getrennt. **A:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE; **B:** Detektion mit anti-TvASCT Antikörper; **C:** Detektion mit anti-Hämagglutinin Antikörper.

Mit dem Antikörper gegen die TvASCT konnten im Wildtyp und in TvT1Frataxin die ASCT (57 kDa) nachgewiesen werden. Im Stamm TvT1ASCT ist ein stärkeres Signal erkennbar (s. Abb. 3.3B). Bei der Detektion mit dem anti-Hämagglutinin Antikörper konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich hierbei um die überexprimierte TvASCT handelt, denn in den Kontrollstämmen *T. vaginalis* T1 Wildtyp wurde kein Protein detektiert und in TvT1Frataxin wurde das mit dem HA-Tag markierte Frataxin (15 kDa) detektiert (s. Abb. 3.3C). Allerdings wurden mit dem anti-Hämagglutinin Antikörper auch Abbauprodukte der ASCT im Stamm TvT1ASCT detektiert (s. Abb. 3.3C). Die Transformation und Überexpression der ASCT in *T. vaginalis* konnte mit beiden Antikörpern nachgewiesen werden.

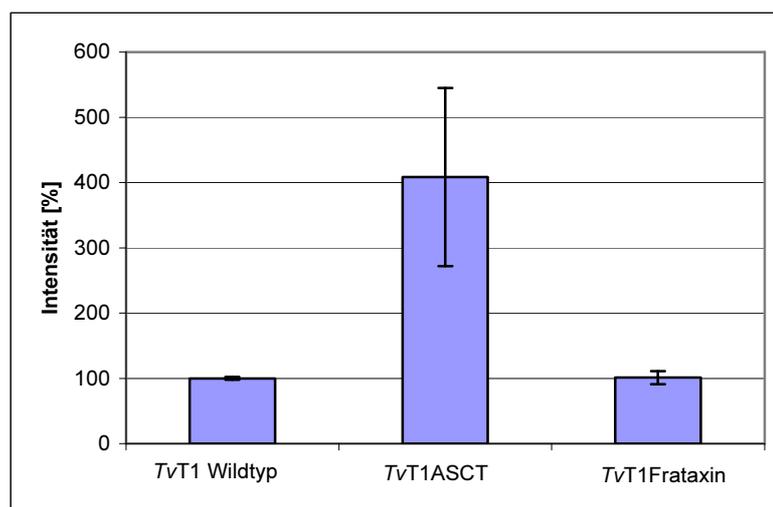
### 3.1.3 Northern-Analyse der rekombinanten Stämme TvT1ASCT und TvT1Frataxin

Für die Northern-Analyse (s. 2.8.8) wurde *T. vaginalis* Gesamt-RNA mit Hilfe des Trizol<sup>®</sup>-Reagenz (s. 2.8.1) isoliert. 10 µg der RNA wurden unter denaturierenden Bedingungen über ein 1 %iges Agarosegel in 1 x MOPS-Puffer getrennt und auf eine Hybond N+ Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde mit spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Sonden (s. 2.8.7) der offenen Leseraster der TvASCT bzw. TvAktin als Kontrolle hybridisiert (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4:** Northern-Analyse von *T. vaginalis* Gesamt-RNA. **A:** Hybridisierung mit spezifischer DNA-Sonde gegen TvAktin; **B:** Hybridisierung mit spezifischer DNA-Sonde gegen TvASCT.

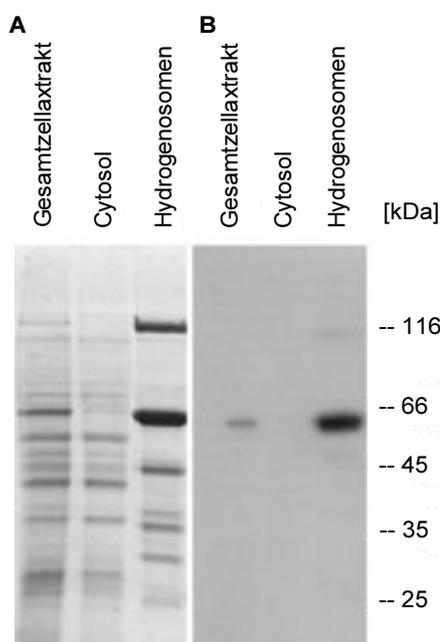
Die Intensität der bei der Northern-Analyse erhaltenen Signale wurde mit dem FLA3000 Fluorescence Scanner Version 1.8E detektiert und mit dem Programm *Image Gauge Software* (Version 3.0; Fuji Photo Film Co., Düsseldorf) quantifiziert. In TvT1ASCT konnte eine 4-fach erhöhte Intensität der ASCT-RNA im Vergleich zum untransformierten *T. vaginalis* T1 und zum mit dem Kontrollplasmid pTagvag2/Frataxin transformierten TvT1Frataxin festgestellt werden (s. Abb.3.5).



**Abb. 3.5:** Intensität der RNA-Expressionslevel bei ASCT Überexpression in *T. vaginalis* T1. Es wurden Signalintensitäten von Northern-Analysen mit der *Image Gauge Software* (Version 3.0; Fuji Photo Film Co.) quantifiziert (n=2).

### 3.1.3 Intrazelluläre Lokalisierung der ASCT in *T. vaginalis*

Die Lokalisierung der ASCT erfolgte über eine weitere Western-Analyse (s. 2.9.2/4). Hierzu wurden Hydrogenosomen aus *T. vaginalis* isoliert, die Proteine in einem 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel getrennt und auf eine Hybond C Extra Nitrozellulosemembran (GE Healthcare) übertragen. Die Detektion erfolgte über den anti-TvASCT Antikörper (s. Abb. 3.6).



**Abb. 3.6:** Lokalisierung der ASCT durch Western-Analyse nach der Zellfraktionierung von *T. vaginalis*. **A:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE; **B:** Westernblot, Detektion mit anti-TvASCT Antikörper. Es wurden je Spur 25 µg Protein auf einem 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel getrennt.

Die ASCT konnte nach Zellfraktionierung in der Hydrogenosomen-Fraktion, jedoch nicht in der cytosolischen Fraktion nachgewiesen werden. Die ASCT ist also in den Hydrogenosomen lokalisiert.

### 3.2 Klonierung der Gene für die Hydrogenasen und Maturasen aus *T. vaginalis* für die heterologe Expression in *E. coli*

Die Aktivität von [FeFe]-Hydrogenasen aus *T. vaginalis* sollte durch heterologe Co-Expression der Hydrogenasen mit den möglichen Maturasen hergestellt werden.

Für die Klonierung der Gene der Hydrogenasen und Maturasen aus *T. vaginalis* wurden die in Tabelle 3.1 genannten Sequenzen aus genomischer DNA von *T. vaginalis* amplifiziert. Es wurden zwei Hydrogenasen ausgewählt:

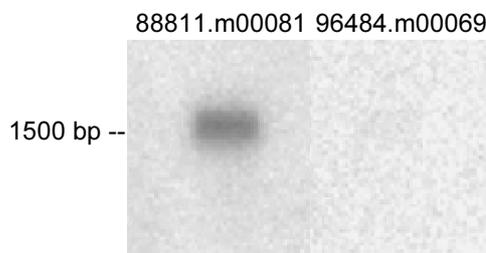
- Eine Hydrogenase/CytochromP450-Reduktase-Fusion, die in der TIGR Genomdatenbank annotiert ist (97007.m00150), zeigte in früheren Experimenten keine Hydrogenase-Aktivität, aber Homologien zu anderen [FeFe]-Hydrogenasen (Rosnowsky, 2004).
- Die Hydrogenaseaktivität der aus *T. vaginalis* gereinigten 64kDa-Hydrogenase wurde von Payne *et al.* bereits 1993 beschrieben und sollte als Vergleich dienen.

Für die Maturase HydE waren drei homologe Sequenzen in der TIGR-Datenbank annotiert. Die Sequenz 81202.m00098 wurde für die Amplifikation von *hydE* ausgewählt, weil diese bereits durch RT-PCR als tatsächlich exprimierte Sequenz verifiziert wurde (Pütz *et al.*, 2006). Die Maturase HydF ist nur mit einer Sequenz in der TIGR Genomdatenbank annotiert, wobei für die Maturase HydG zwei homologe Sequenzen gefunden wurden (s. Tab.3.1).

**Tab. 3.1:** Zugangsnummern, Größen und Expressionsvektor der verwendeten Sequenzen der Hydrogenase- und Maturase-Gene.

Protein	Zugangsnummer www.tigr.org	Vektor	Größe (bp)	Anzahl Aminosäuren	Größe (kDa)
Tv64kDa-Hydrogenase	81599.m00076 (NCBI: AF262401)	pRSF-Duet1 His-Tag MCS 1	1773	591	65
Hydrogenase/Cytochrom P450-Reduktase-Fusion	97007.m00150	pRSF-Duet1 His-Tag MCS 1	3309	1103	120
HydE	81202.m00098 93793.m00242 91566.m00125	pRSF-Duet1 S-Tag MCS 2	1176	392	43
HydF	87122.m00057	pCDF-Duet1 His-Tag MCS 1	1305	435	48
HydG	88811.m00081 96484.m00069	pCDF-Duet1 S-Tag MCS 2	1554	518	57

Für die Maturase HydG sind zwei homologe Sequenzen im Genom von *T. vaginalis* vorhanden: 88811.m00081 und 96484.m00069. Beide Sequenzen wurden amplifiziert und als DNA-Sonden für eine Northern-Analyse (s. 2.8.8) mit Gesamt-RNA aus *T. vaginalis* verwendet, wobei sich nur die Sequenz 88811.m00081 als tatsächlich exprimierte Sequenz darstellte (s. Abb. 3.7).



**Abb.3.7:** Northern-Analyse mit je 10 µg Gesamt-RNA aus *T. vaginalis*. Als DNA-Sonden wurden die zwei möglichen offenen Leserahmen der Maturase HydG aus *T. vaginalis* verwendet.

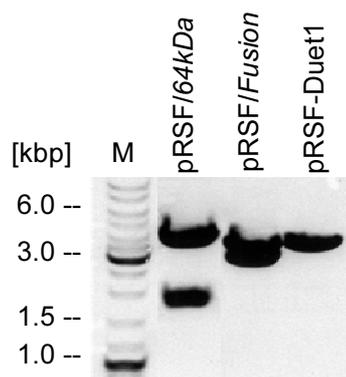
Für die Co-Expression von Proteinen in *E.coli* wurden Duet-Vektoren pRSF-Duet1 und pCDF-Duet1 (Novagen) verwendet, welche die Expression von mehreren Proteinen und deren Detektion über die Fusion mit unterschiedlichen Anhängen (N-terminaler His-Tag durch die Klonierung in die MCS1 oder C-terminaler S-Tag durch die Klonierung in die MCS2 des Vektors) ermöglichten (s. Tab. 3.1).

### 3.2.1 Amplifikation der Hydrogenasen aus *T. vaginalis*

Zur Überexpression in *E. coli* BL21(DE3) (s. 2.6.3) wurde die 64kDa-Hydrogenase (81599.m00079) aus *T. vaginalis* mit den Oligonukleotiden Tv64\_for und Tv64\_rev aus genomischer DNA von *T. vaginalis* amplifiziert (s.2.8.3), sequenziert (s. 2.8.6) und über die eingebrachten Schnittstellen SacI und NotI in die MCS1 des Vektors pRSF-Duet1 ligiert (s. 2.8), so dass ein N-terminaler His-Tag für die spätere Detektion in einer Western-Analyse (s.2.9.4) angehängt wurde.

Die Hydrogenase/CytochromP450 Reduktase-Fusion (97007.m00150) wurde mit Hilfe der Oligonukleotide Tvfus\_for und Tvfus\_rev aus genomischer DNA von *T. vaginalis* amplifiziert (s.2.8.3). Nach der Sequenzierung (s. 2.8.6) erfolgte die Klonierung (s. 2.8) in die MCS1 des Vektors pRSF-Duet1 über die Restriktionsschnittstellen AclI und NotI und es wurde hierdurch ein N-terminaler His-Tag für die spätere Detektion in einer Western-Analyse angehängt.

Die Konstrukte wurden durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen SacI und NotI für die 64kDa-Hydrogenase und BamHI und NotI für die Hydrogenase/CytochromP450-Reduktase-Fusion überprüft (s. Abb. 3.8).



**Abb. 3.8:** Klonierung von Hydrogenasen aus *T. vaginalis* für die heterologe Expression in *E. coli* in den Expressionsvektor pRSF-Duet1. **M:** Größenstandard; **pRSF/64kDa** (SacI/NotI-Restriktion; pRSF: 3829 bp; 64kDa-Hydrogenase: 1773 bp); **pRSF/Fusion** (BamHI/NotI-Restriktion; pRSF: 3829bp; Hydrogenase/CytochromP450-Reduktase-Fusion: 3309 bp); **pRSF-Duet1** (SacI-Restriktion; 3829 bp).

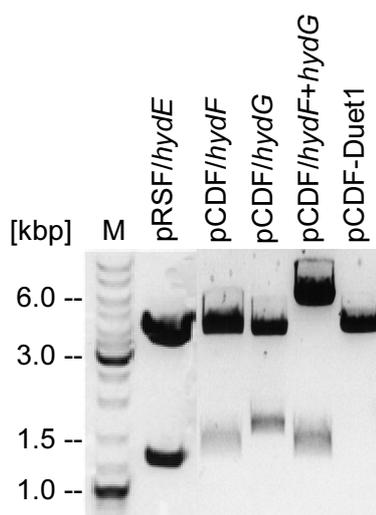
Die Gene für die 64kDa-Hydrogenase und die Hydrogenase/CytochromP450-Reduktase-Fusion konnten in den *E. coli*-Expressionsvektor pRSF-Duet1 in die MCS1 als resultierende Plasmide pRSF/64kDa und pRSF/Fusion kloniert werden.

### 3.2.2 Amplifikation der Gene für die Maturasen HydE, HydF und HydG aus *T. vaginalis*

Die zur Proteinfamilie der S-adenosylmethionin-(SAM)-abhängigen Proteine gehörende Maturase HydE (81202.m00098) wurde mit den Oligonukleotiden HydE\_for und HydE\_rev-stop aus genomischer DNA von *T. vaginalis* amplifiziert, sequenziert und über die Restriktionsschnittstellen NdeI und XhoI in die MCS2 des Vektors pRSF-Duet1 ligiert. Hierdurch wurde ein C-terminaler S-Tag angehängt (s. Abb 3.9).

Die GTPase HydF (87122.m00057) wurde über die Oligonukleotide HydF\_for und HydF\_rev amplifiziert und über SacI und NotI in die MCS1 des Vektors pCDF-Duet1 eingefügt.

Das SAM-abhängige Protein HydG (88811.m00081; Oligonukleotide HydG\_for und HydG\_rev-stop) wurde über die Restriktionsschnittstellen NdeI und KpnI in den Vektor pCDF-Duet1 in die MCS2 ligiert (s. Abb. 3.9).

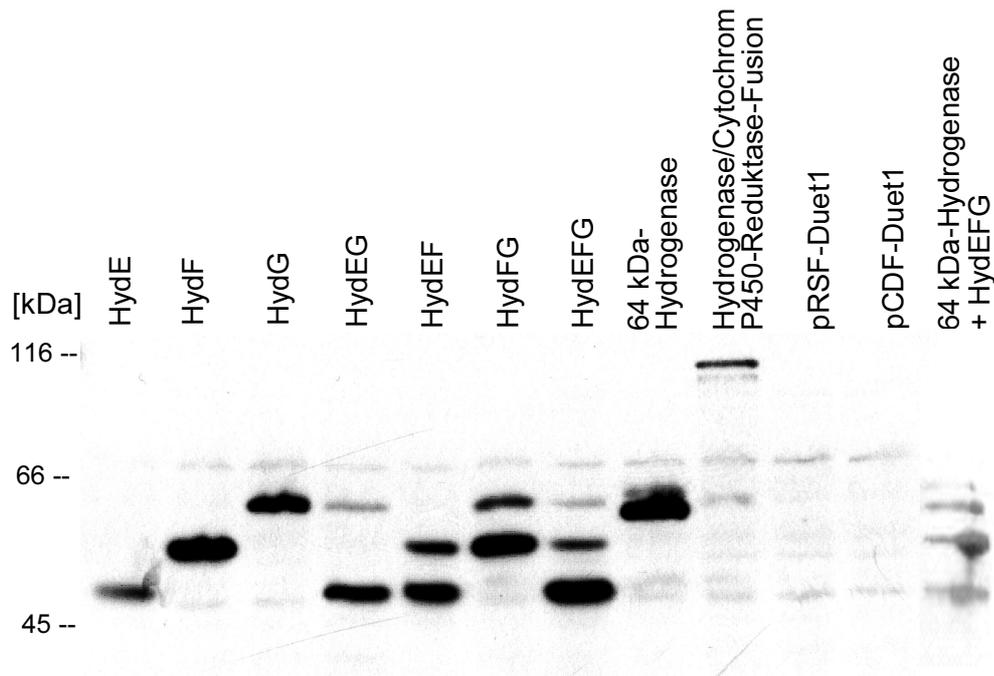


**Abb. 3.9:** Klonierung von Maturase-Genen aus *T. vaginalis* für die heterologe Expression in *E. coli* in die Expressionsvektoren pRSF-Duet1 und pCDF-Duet1. **M:** Größenstandard; **pRSF/hydE** (NdeI/XhoI-Restriktion; pRSF: 3829 bp; *hydE*: 1173 bp); **pCDF/hydF** (SacI/NotI-Restriktion; pCDF: 3781 bp, *hydF*: 1305 bp); **pCDF/hydG** (NdeI/KpnI-Restriktion; pCDF: 3751 bp; *hydG*: 1554 bp); **pCDF/hydF+hydG** (SacI/NotI-Restriktion; pCDF+*hydG*: 5479 bp; *hydF*: 1305 bp); **pCDF-Duet1** (NotI-Restriktion; 3781 bp).

Die Maturase-Gene *hydE*, *hydF* und *hydG* aus *T. vaginalis* wurden erfolgreich in die Vektoren pRSF-Duet1 und pCDF-Duet1 kloniert. Es resultierten die Plasmide pRSF/*hydE*, pCDF/*hydF*, pCDF/*hydG* und pCDF/*hydF+hydG* für die Co-Expression in *E. coli*.

### 3.2.3 Co-Expression der Hydrogenasen und der Maturasen HydE, HydF und HydG in *E. coli*

Die Hydrogenasen und ihrer Maturasen aus *T. vaginalis* wurden in anaerob kultivierten *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert (s. 2.6.3) und anschließend die Aktivität der Hydrogenase in Abhängigkeit von den Maturasen bestimmt (s. 2.10). Der Nachweis der Expression der rekombinanten Proteine konnte jedoch ausschließlich über die Immunodetektion erfolgen, da nur geringe Proteinmengen produziert wurden. Für die Immunodetektion wurden die auf einer Nitrozellulosemembran fixierten Proteine nacheinander mit den Antikörpern anti-His und anti-S inkubiert und zusammen detektiert (s. 2.9.5.1/2). Die Expression der Hydrogenasen alleine und der Maturasen alleine und in Kombination miteinander in anaerob kultivierten *E. coli* BL21(DE3) konnte nachgewiesen werden (s. Abb. 3.10).

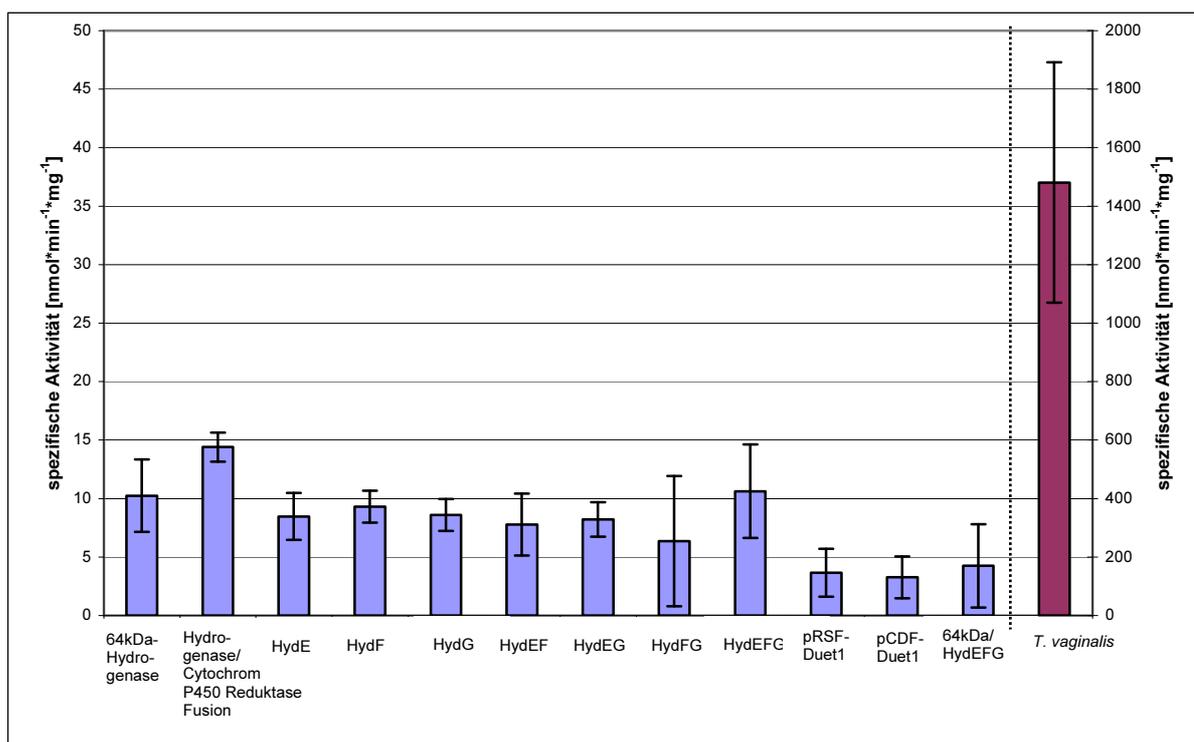


**Abb. 3.10:** Immunodetektion der Co-Expression von Hydrogenasen und Hydrogenase-Maturasen aus *T. vaginalis* in *E. coli* BL21(DE3). Pro Spur wurden 25 µg Protein aufgetragen, die Detektion erfolgte mit dem anti-His Antikörper und mit dem anti-S Antikörper.

### 3.3 Aktivitätsmessung

#### 3.3.1 Bestimmung der Basalaktivitäten

Für die Aktivitätsmessung der in *E. coli* BL21(DE3) überexprimierten Proteine (s. 2.6.2) wurden die Reduktion von Methylviologen und der damit verbundene Farbumschlag von farblos nach blau bei 604 nm verfolgt (s. 2.12). Hierzu wurde zunächst die Aktivität von 100 µg *E. coli*-Proteinrohextrakt der Hydrogenasen sowie der Maturasen HydE, HydF und HydG alleine sowie die Kombination der Maturasen miteinander gemessen. Außerdem wurde die Aktivität der *E. coli*-Rohextrakte mit leeren Expressionsvektoren pRSF-Duet1 und pCDF-Duet1 bestimmt. Die Hydrogenaseaktivitäten der *E. coli*-Extrakte lagen bei durchschnittlich  $10 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  (s. Abb. 3.11). Es konnte auch nur eine geringe Basalaktivität der in *E. coli* BL21(DE3) überexprimierten 64kDa-Hydrogenase gemessen werden, obwohl diese mit den Maturasen HydE, HydG und HydF co-exprimiert wurde (64kDa/HydEFG; s. Abb. 3.11). Als Positivkontrolle für den Hydrogenase-Aktivitätstest wurde *T. vaginalis*-Gesamtzellextrakt mit einer Aktivität von  $1480 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  gemessen (s. Abb. 3.11).



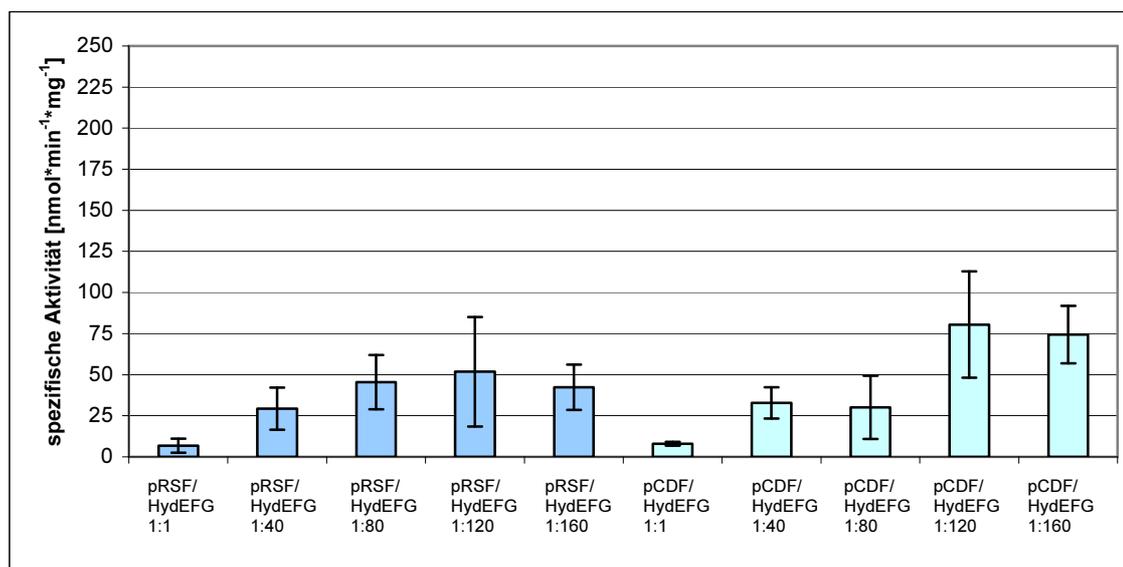
**Abb. 3.11:** Hydrogenase-Aktivitätstest der Proteinrohextrakte aus *E. coli* mit den heterolog exprimierten Hydrogenasen und Maturasen aus *T. vaginalis*. Die Messung erfolgte mit Methylviologen als Elektronenakzeptor und je 100 µg *E. coli*-Gesamtzellextrakt und 25 µg *T. vaginalis*-Gesamtzellextrakt (n=5).

### 3.3.2 Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität der Hydrogenasen und ihrer Maturasen

McGlynn *et al.* (2007) konnten zeigen, dass die [FeFe]-Hydrogenase HydA aus *Clostridium saccharobutylicum*, welche in *E. coli* überexprimiert wurde, nur in Abhängigkeit von der Konzentration der Maturasen aktiv ist. Außerdem war die *C. saccharobutylicum*-Hydrogenase nur aktiv, wenn die drei Maturasen in einem *E. coli*-Stamm zusammen exprimiert wurden. Die Kombination der *E. coli*-Extrakte der einzeln heterolog exprimierten Maturasen konnten die Aktivität der *C. saccharobutylicum*-Hydrogenase nicht wieder herstellen. Aus diesem Grund erfolgte die Aktivitätsmessung der in *E. coli* überexprimierten Hydrogenasen aus *T. vaginalis* in Abhängigkeit von der Maturase-Konzentration. Für die Messungen wurde ein Teil Rohextrakt der heterolog exprimierten Hydrogenasen in den Verhältnissen 1:1 bis 1:160 mit Maturase-Rohextrakt miteinander gemischt, wobei die Hydrogenasen alleine und die Maturasen in Kombination miteinander in einem *E. coli*-Stamm co-exprimiert wurden.

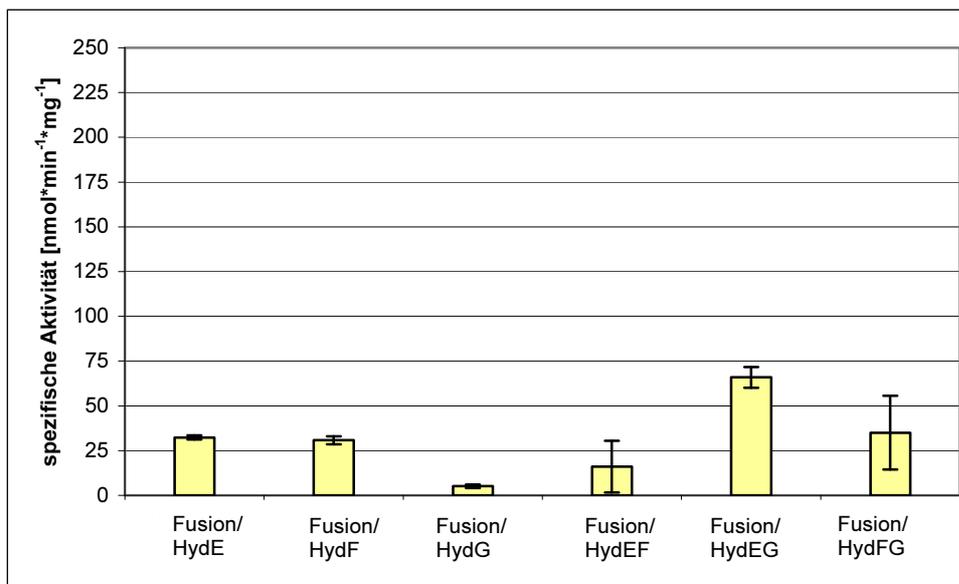
### 3.3.2.1 Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität der Hydrogenase/Cytochrom P450-Reduktase-Fusion

Um die Basal-Hydrogenaseaktivität der *E. coli*-Rohextrakte zu bestimmen, wurde die Hydrogenase-Aktivität von *E. coli*-Rohextrakt mit leeren Expressionsvektoren pRSF-Duet1 und pCDF-Duet1 mit den zusammen überexprimierten Maturasen HydE, HydF und HydG in den Verhältnissen 1:1 bis 1:160 gemessen. Hierbei wurde eine maximale Aktivität von  $80 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  gemessen (pCDF-Duet1; Verhältnis 1:120; s. Abb. 3.12). Es war also eine Basal-Hydrogenaseaktivität der *E. coli*-Rohextrakte in Abhängigkeit von der Maturase-Menge vorhanden.



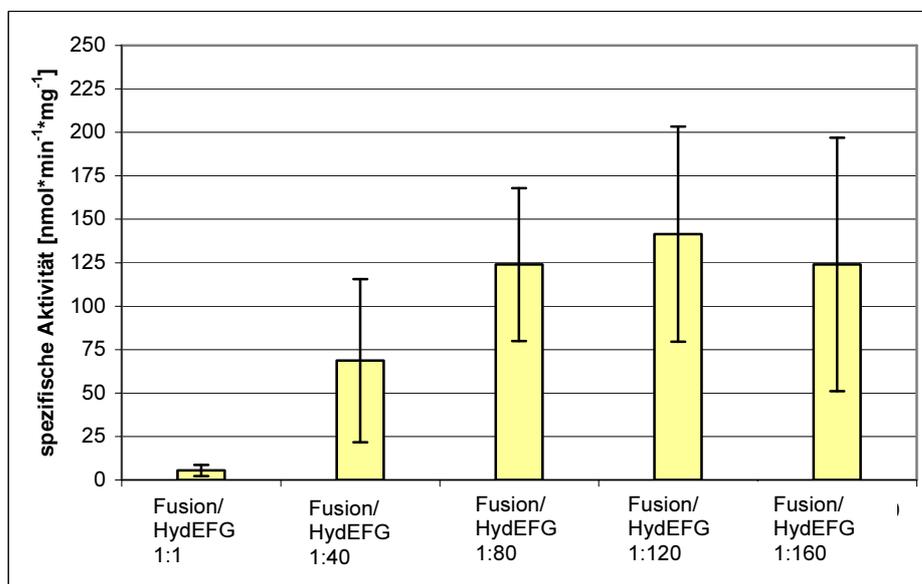
**Abb. 3.12:** Aktivitätsmessung der *E. coli* Rohextrakte mit den Leervektoren pRSF-Duet1 und pCDF-Duet1 in Abhängigkeit von der Maturasekonzentration. Es wurde ein Teil Rohextrakt mit Leervektor mit angegebenen Mengen überexprimierter Maturasen HydEFG gemessen (n=5).

Die Hydrogenase-Aktivität der Hydrogenase/CytochromP450-Reduktase-Fusion wurde zunächst in Kombination mit maximal zwei co-exprimierten Maturasen (HydEF, HydEG und HydFG) sowie den Maturasen alleine bestimmt. Es wurden Hydrogenase- und Maturase-Rohextrakte im Verhältnis 1:80 miteinander kombiniert, da dieses Verhältnis für die Reifung der *C. saccharobutylicum* Hydrogenase bereits beschrieben war (McGlynn *et al.*, 2007). Die maximale Aktivität betrug  $65 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  bei Kombination der Hydrogenase/Cytochrom P450-Reduktase-Fusion mit den co-exprimierten Maturasen HydEG, was als Hintergrundaktivität anzusehen ist (s. Abb. 3.13).



**Abb. 3.13:** Spezifische Aktivitäten der *E. coli*-Rohextrakte der Hydrogenase/CytochromP450-Reduktase-Fusion in Abhängigkeit von den Maturasen HydE, HydF und HydG. Es wurde ein Teil Rohextrakt mit angegebener Kombination überexprimierter Maturasen im Verhältnis 1:80 gemessen (n=2).

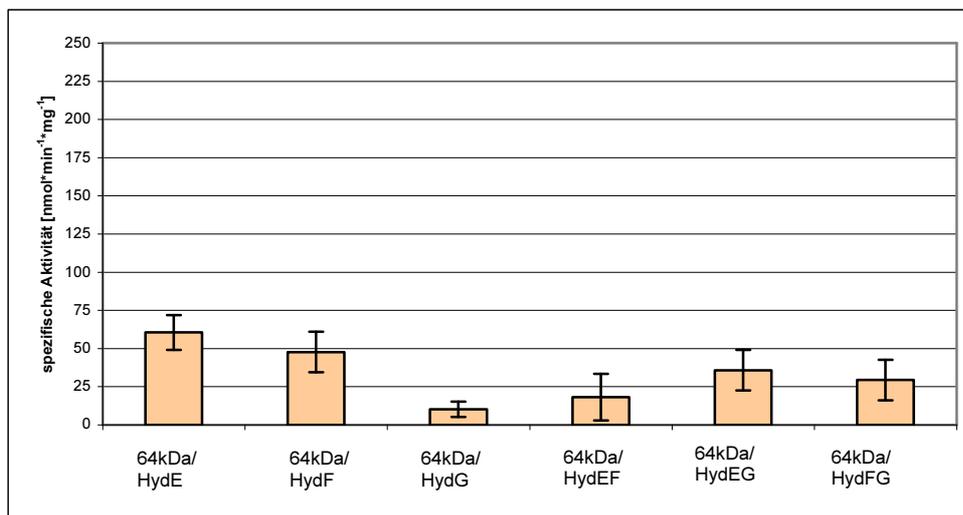
Bei Kombination der *E. coli*-Rohextrakte mit der überexprimierten Hydrogenase/CytochromP450-Reduktase-Fusion mit den zusammen co-exprimierten Maturasen HydEFG konnte bei einem Verhältnis von 1:120 eine spezifische Aktivität von 141 nmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup> gemessen werden (s. Abb. 3.14). Nur die Aktivitäten der Verhältnisse 1:1 und 1:40 liegen unterhalb der Hintergrundaktivität.



**Abb. 3.14:** Spezifische Aktivitäten der *E. coli*-Rohextrakte mit Hydrogenase/CytochromP450-Reduktase-Fusion in Abhängigkeit von der Maturasekonzentration. Es wurde ein Teil Rohextrakt mit überexprimierter Hydrogenase mit angegebenen Verhältnissen (1:1 bis 1:160) überexprimierter Maturasen HydEFG gemessen (n=5).

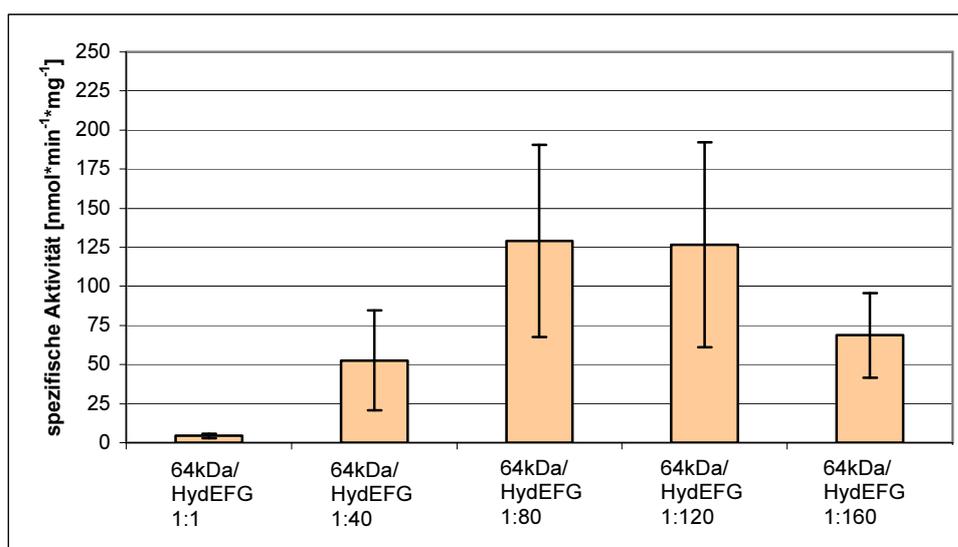
### 3.3.2.2 Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität der 64kDa-Hydrogenase

Die Hydrogenase-Aktivität der 64kDa-Hydrogenase wurde in Kombination mit maximal zwei co-exprimierten Maturasen im Verhältnis 1:80 gemessen. Hier war die maximale Hydrogenase-Aktivität  $60 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  bei Kombination mit der Maturase HydE (s. Abbildung 3.15).



**Abb. 3.15:** Spezifische Aktivität der Proteinrohextrakte aus *E. coli* in  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Hydrogenase-Rohextrakte wurden im Verhältnis 1:80 mit den einzeln exprimierten Maturase-Rohextrakten gemessen (n=2).

Wurden allerdings die Maturasen zusammen co-exprimiert und diese in den Verhältnissen 1:1 bis 1:160 in Kombination mit der überexprimierten 64kDa-Hydrogenase gemessen, konnte die höchste Hydrogenase-Aktivität bei den Verhältnissen 1:80 und 1:120 (Hydrogenase:Maturase) mit einer spezifischen Aktivität von  $129 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  und  $126 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  gemessen werden (s. Abb. 3.16).



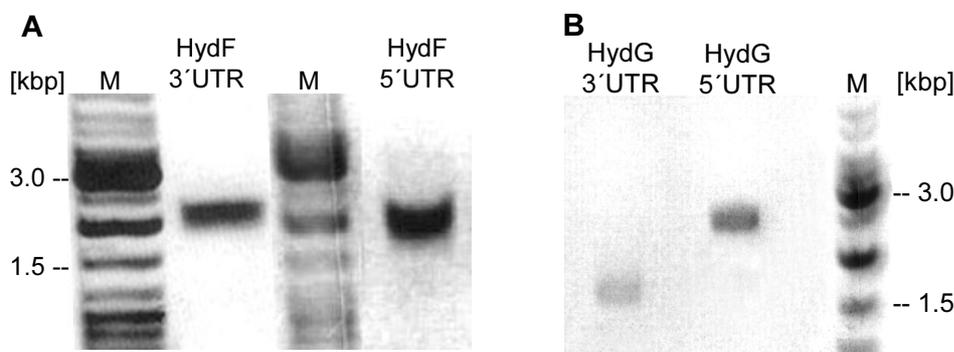
**Abb. 3.16:** Spezifische Aktivitäten der *E. coli* Rohextrakte mit der überexprimierten 64kDa-Hydrogenase gemessen in Abhängigkeit von der Maturasekonzentration. Es wurde ein Teil Rohextrakt mit überexprimierter Hydrogenase mit angegebenen Verhältnissen (1:1 bis 1:160) co-exprimierten Maturasen HydEFG gemessen (n=5).

### 3.4 Deletion der Maturase-Gene *hydF* und *hydG*

Die Deletion der Maturase-Gene *hydF* und *hydG* sollte den Einfluss der Maturasen auf die Reifung und damit die Aktivität der [FeFe]-Hydrogenasen aus *T. vaginalis* zeigen.

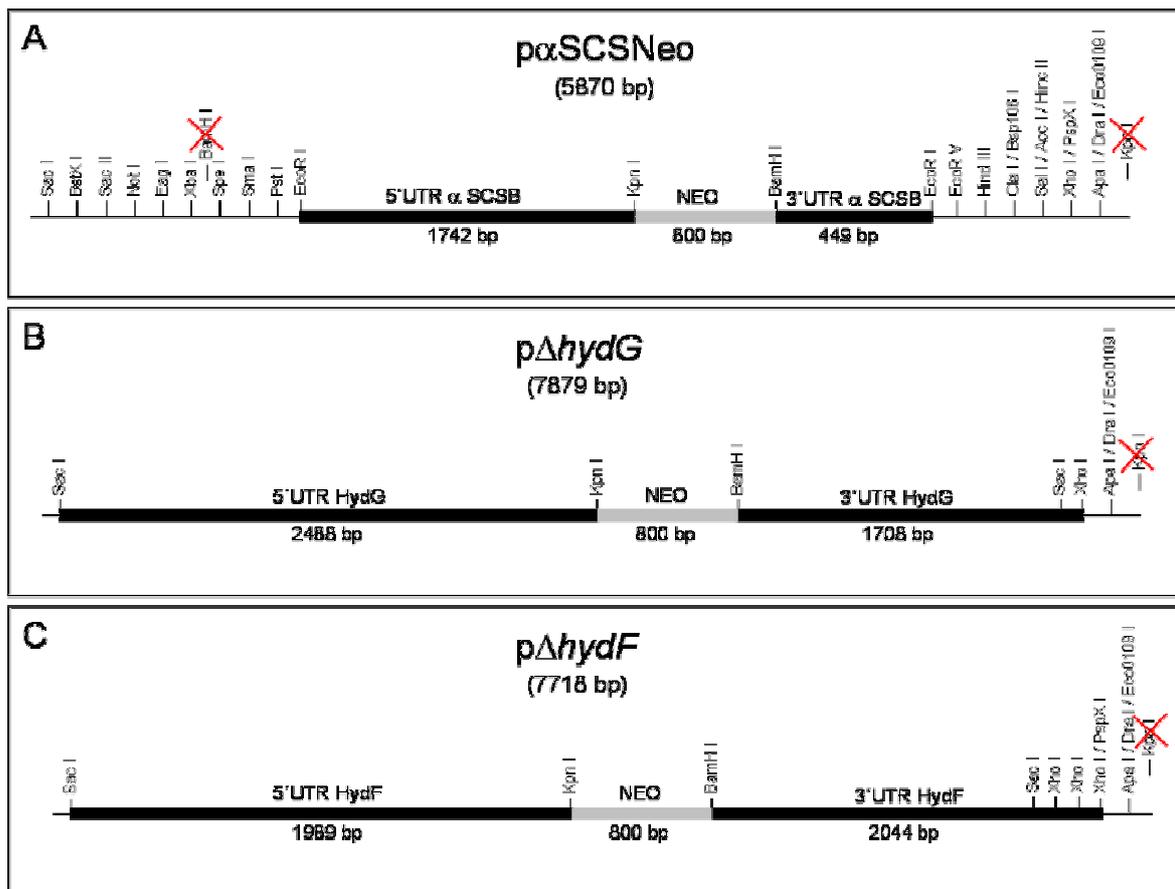
#### 3.4.1 Plasmide für die Deletion von *hydF* und *hydG*

Mit Hilfe der Oligonukleotide HydF\_5'UTR\_forward und HydF\_5'UTR\_reverse bzw. HydG\_5'UTR\_forward und HydG\_5'UTR\_reverse wurden die 5'-untranslatierten Bereiche der Maturase-Gene *hydF* (1989 bp; Zugangsnummer 87122.m00057) und *hydG* (2487 bp; Zugangsnummer 88811.m00081) amplifiziert. Mit den Oligonukleotiden HydF\_3'UTR\_forward und HydF\_3'UTR\_reverse und HydG\_3'UTR\_forward und HydG\_3'UTR\_reverse die 3'-untranslatierten Bereiche der Gene amplifiziert (*hydF*: 2044 bp; *hydG*: 1708 bp; s. Abb. 3.17).



**Abb. 3.17:** 1% Agarosegel der DNA-Fragmente der 3'- und 5'-untranslatierten Bereiche von *hydF* (A) und *hydG*. (B).

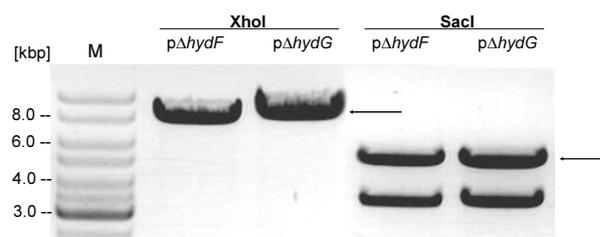
Nach der Sequenzierung wurden die Fragmente der 5'-untranslatierten Bereiche von *hydF* (1989 bp) und *hydG* (2487 bp) über die eingefügten Restriktionsschnittstellen *SacI* und *KpnI* in den Vektor p $\alpha$ SCS-NEO (Delgadillo *et al.*, 1997; s. Abb. 3.18A) ligiert. Die Fragmente der 3'-untranslatierten Bereiche von *hydF* (2044 bp) und *hydG* (1708 bp) wurden über die Restriktionsschnittstellen *BclI* und *PspXI* für *hydF* bzw. *BamHI* und *XhoI* für *hydG* in die mit den 5'-UTRs vorbereiteten Vektoren eingefügt. Es resultierten die in Abb. 3.18 dargestellten Plasmide p $\Delta$ *hydG* (s. Abb. 3.18B) und p $\Delta$ *hydF* (s. Abb. 3.18C), welche für die homologe Rekombination mit den Restriktionseendonukleasen *XhoI* oder *SacI* geschnitten wurden.



**Abb. 3.18:** Konstrukte für die Deletion der Maturase-Gene *hydF* und *hydG*. **A:** Vektor pαSCS-NEO (Delgadillo *et al.*, 1997). **B, C:** Vektor pΔ*hydF* bzw. pΔ*hydG*. 3'- und 5'-untranslatierte Bereiche des Zielgens flankieren das Neomycin-Resistenz-Gen. Es sind nur die multiplen Klonierungsstellen mit den relevanten Restriktionsschnittstellen abgebildet.

### 3.4.2 Transformation von *T. vaginalis* für die Deletion der Maturase-Gene *hydF* und *hydG*

Für die Transformation von *T. vaginalis* wurden die Plasmide pΔ*hydF* bzw. pΔ*hydG* mit der Restriktionsendonuklease *Xho*I linearisiert und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (Spur 1 und 2 in Abb. 3.19). Alternativ wurde mit der Restriktionsendonuklease *Sac*I das Resistenzgen mit den 3'- und 5'-untranslatierten Bereichen der Zielgene aus dem Vektor herausgeschnitten (Spur 3 und 4; Abb. 3.19) und diese Fragmente mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, bevor sie für die Transformation eingesetzt wurden.

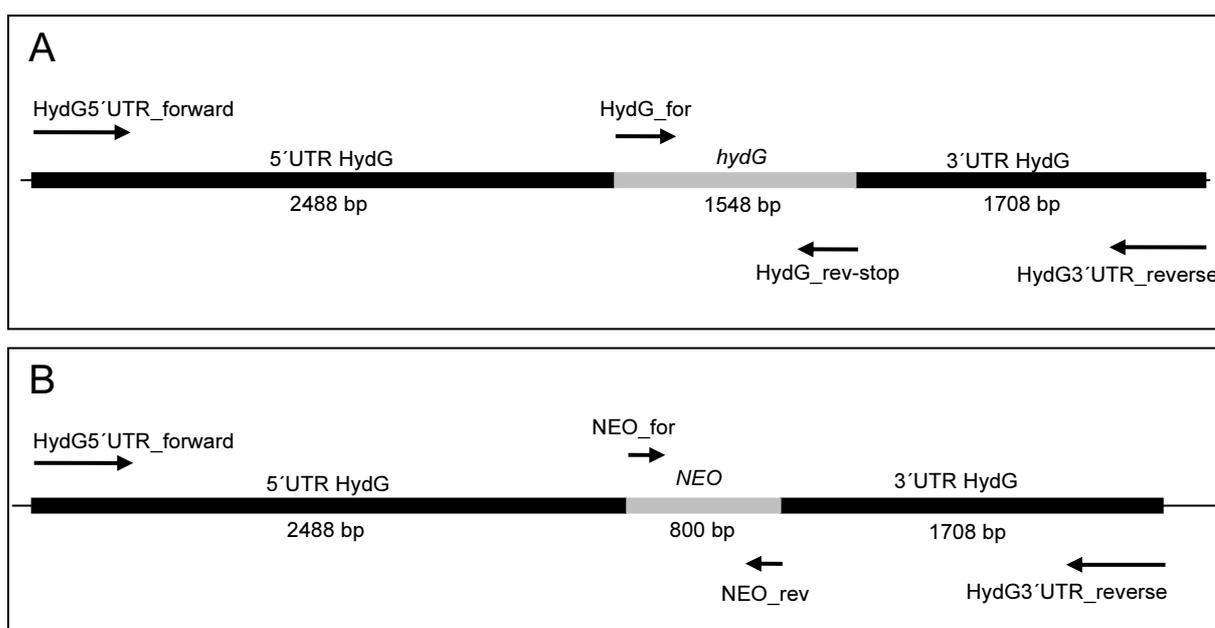


**Abb. 3.19:** DNA-Fragmente für die Transformation von *T. vaginalis*. **M:** Größenstandard; pΔ*hydF*, *Xho*I-Restriktion (7717 bp); pΔ*hydG*, *Xho*I-Restriktion (7879 bp); pΔ*hydF*, *Sac*I-Restriktion (4620 bp + 3097 bp); pΔ*hydG*, *Sac*I-Restriktion (4732 bp + 3147 bp). Für die Transformation von *T. vaginalis* wurden 50-100 µg der mit Pfeilen gekennzeichneten Fragmente eingesetzt.

### 3.4.3 Kontrolle einer möglichen Deletion der Maturase HydG in *T. vaginalis* mittels PCR

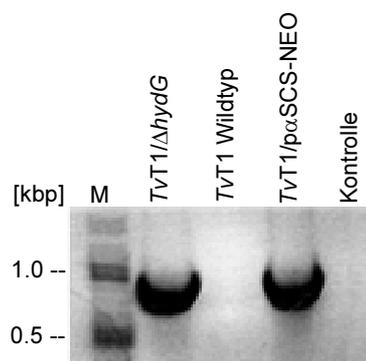
Insgesamt wurden je 60 Elektroporationen für die Deletion von *hydF* und *hydG* mit 50-100 µg mit den Restriktionsendonukleasen XhoI oder SacI geschnittener und dephosphorylierter DNA durchgeführt. Nach der Elektroporation (s. 2.7.1) konnten die Zellen 4 h bei 37 °C regenerieren und wurden anschließend zur Selektion mit 100 µg/ml G418 versetzt. Nach Elektroporationen mit so vorbereitetem  $p\Delta hydF$  ist keine *T. vaginalis* Kultur gewachsen. Nach Transformation mit XhoI-geschnittenem  $p\Delta hydG$  konnte eine Kultur nach mehrmaligem Passagieren in TYM-Medium mit 100 µg/ml G418 überleben. Von dieser Kultur wurden Einzelzellklone hergestellt (s. 2.7.2). Von einem Einzelzellklon dieser möglichen Deletionsmutante für *hydG* (im Folgenden *TvT1/ΔhydG* genannt) wurde genomische DNA isoliert.

Der Erfolg der Rekombination wurde durch PCRs mit den in Abb. 3.20 dargestellten Oligonukleotiden überprüft. Das Gen für die Neomycin-Phosphotransferase sollte in den Stämmen *TvT1/ΔhydG*, *TvT1/pΔhydG* und *TvT1/αSCS-NEO* nachgewiesen werden, während *hydG* in den Stämmen *TvT1/αSCS-NEO*, *TvT1/pΔhydG* und im Wildtyp *T. vaginalis* T1 amplifiziert werden sollte. Der indirekte Nachweis durch Ausbleiben eines PCR-Produkts wurde durch Verwendung der Oligonukleotide HydG5'UTR\_forward/HydG\_rev-stop getestet. Bei Verwendung der Oligonukleotide HydG5'UTR\_forward/ HydG3'UTR\_reverse sollte bei erfolgreicher Deletion von *hydG* ein um 748 bp kleineres PCR-Produkt als im Wildtyp entstehen.



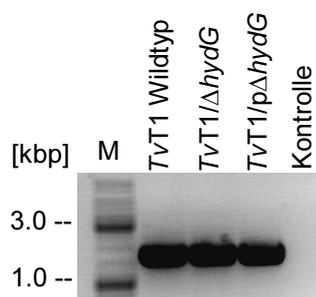
**Abb. 3.20:** Nachweis der Rekombination zur Deletion von *hydG*. Schematische Darstellung der Bindung der Oligonukleotide für PCRs zur Überprüfung der Rekombination. **A:** *T. vaginalis* T1 Wildtyp; **B:** *TvT1/ΔhydG*.

Mit den Oligonukleotiden Neo\_for und Neo\_rev konnte durch eine PCR aus genomischer DNA von *TvT1/ΔhydG* das Resistenzgen für die Neomycin-Phosphotransferase (800 bp; s. Abb. 3.20/21) nachgewiesen werden.



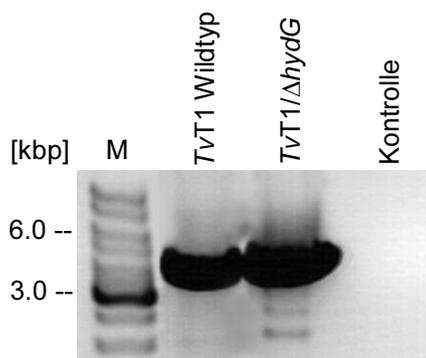
**Abb. 3.21:** Amplifikation des Gens für die Neomycin-Phosphotransferase aus genomischer DNA von *T. vaginalis*. **M:** Größenstandard.

Mit den Oligonukleotiden HydG\_for und HydG\_rev-stop sollte die Deletion von *hydG* in der Mutante *TvT1/ΔhydG* nachgewiesen werden (s. Schema Abb. 3.20). Es konnte in allen Proben *hydG* mit einer Größe von 1548 bp nachgewiesen werden (s. Abb. 3.22).



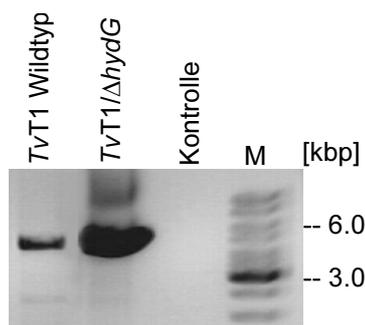
**Abb. 3.22:** Amplifikation des Gens für die Maturase HydG aus genomischer DNA von *T. vaginalis*. **M:** Größenstandard.

Um die Rekombination in dem transformierten *T. vaginalis* T1-Stamm zu bestätigen, wurden PCR-Analysen mit den Oligonukleotiden HydG5'UTR\_forward und HydG\_rev-stop durchgeführt (s. Abb. 3.20). Hierbei sollte beim Wildtyp *T. vaginalis* T1 ein Fragment der Größe 4033 bp amplifiziert werden (*hydG*-5'untranslatierter Bereich + *hydG*) und bei erfolgreicher Rekombination in der möglichen Deletionsmutante *TvT1/ΔhydG* kein Fragment erscheinen. Abbildung 3.23 zeigt jedoch ein Amplifikat der Größe 4033 bp in beiden Proben.



**Abb. 3.23:** Nachweis der Rekombination mittels einer PCR von genomischer DNA aus *T. vaginalis* T1 mit den Oligonukleotiden HydG5'UTR\_forward und HydG\_rev-stop. Erwartet wurde ein Fragment der Größe 4033 bp im Wildtyp *T. vaginalis* T1. **M:** Größenstandard.

Bei einer PCR mit den Oligonukleotiden HydG\_5'UTR\_forward und HydG\_3'UTR\_reverse sollte bei erfolgreicher Deletion im Stamm *TvT1/ΔhydG* ein um 748 bp kleineres Fragment amplifiziert werden, da *hydG* 1548 bp groß ist und das Neomycin-Resistenzgen nur 800 bp klein ist. Abbildung 3.24 zeigt jedoch gleich große Fragmente in Wildtyp und möglicher Deletionsmutante.



**Abb. 3.24:** Nachweis der Rekombination mittels einer PCR von genomischer DNA von *T. vaginalis* T1 mit den Oligonukleotiden HydG\_5'UTR\_forward und HydG\_3'UTR\_reverse. Erwartet wurde ein Fragment der Größe 5739 bp im Wildtyp *T. vaginalis* T1 und 4990 bp in der möglichen Deletionsmutante. **M:** Größenstandard.

Die Aufnahme des Resistenzgens für die Neomycin-Phosphotransferase konnte aufgrund des Wachstums der *T. vaginalis*-Zellen in mit G418 supplementiertem TYM-Medium und mit Hilfe von PCR-Analysen eindeutig nachgewiesen werden (s. Abb. 3.21). Die Integration in die genomische DNA von *T. vaginalis* und damit die Deletion von *hydG* konnte jedoch nicht gezeigt werden. PCRs zur Amplifikation von *hydG* aus genomischer DNA der möglichen Deletionsmutante *TvT1/ΔhydG* zeigten keine Unterschiede zu PCRs aus genomischer DNA vom Wildtyp *T. vaginalis* T1.

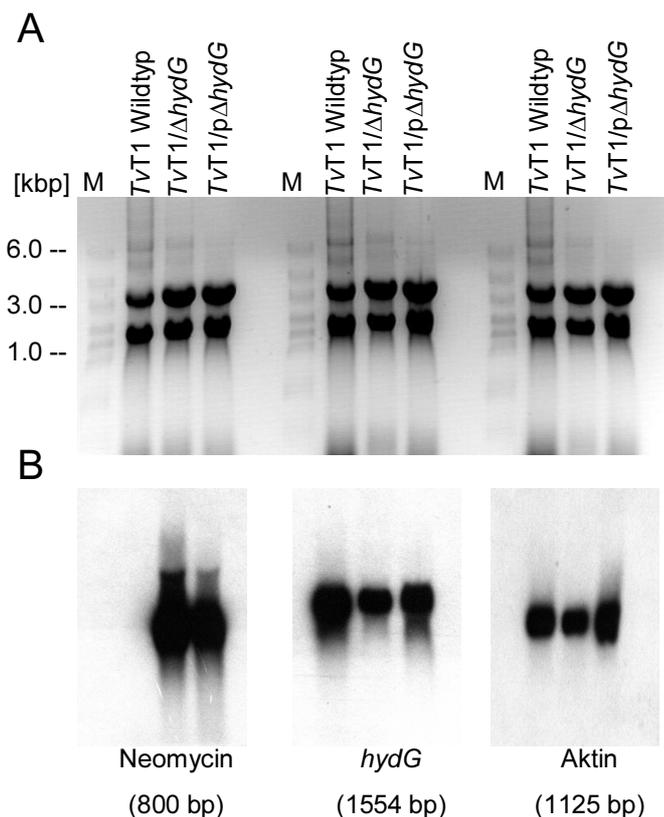
### 3.4.4 Kontrolle einer möglichen Deletion der Maturase HydG in *T. vaginalis* mittels Northern-Analyse

Mit einer Northern-Analyse sollte überprüft werden, ob das Gen für die Maturase HydG in der möglichen Deletionsmutante noch exprimiert wird. Hierzu wurden 5 µg Gesamt-RNA aus *T. vaginalis* über ein 1 %iges Agarosegel getrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit DNA-Sonden gegen die offenen Leseraster der Gene für die Neomycin-Phosphotransferase, *hydG* und Aktin als Kontrolle hybridisiert (s. 2.8.1/8).

Als Kontrolle wurde eine Hybridisierung der Gesamt-RNA mit einer spezifischen Sonde gegen Aktin durchgeführt. Wie erwartet konnte diese Sonde bei allen Proben binden (s. Abb. 3.25 D).

Die Sonde gegen die Neomycin-Phosphotransferase konnte nicht bei untransformiertem *T. vaginalis* T1 binden, jedoch bei der möglichen Deletionsmutante und bei dem mit dem ungeschnittenen Plasmid pΔ*hydG* transformierten *T. vaginalis* T1 (s. Abb 3.25 B).

Hybridisierung mit der spezifischen Sonde gegen *hydG* zeigte Signale bei allen Proben (s. Abb. 3.25 C).

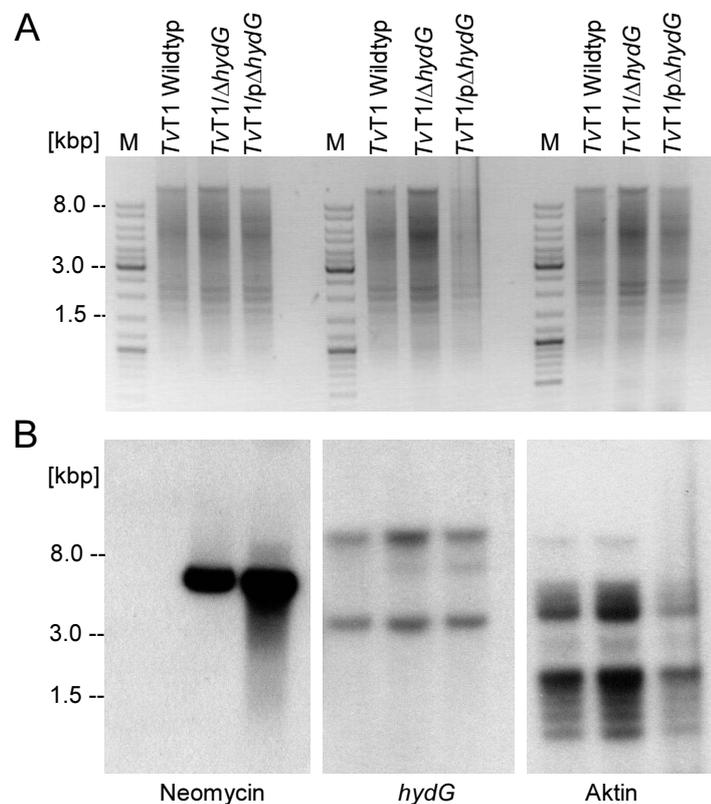


**Abb. 3.25:** Northern-Analyse von *T. vaginalis* Gesamt-RNA. **A:** Gesamt-RNA getrennt auf 1% Agarosegel **B:** Hybridisiert wurde mit den DNA-Sonden gegen die offenen Leseraster der Gene für Neomycin, *hydG* und Aktin; **M:** Größenstandard.

Mit Hilfe einer Northernblot-Analyse konnte zwar die Aufnahme des Resistenzgens (Neomycin-Phosphotransferase) nachgewiesen werden, es hat jedoch in der möglichen Deletionsmutante kein Austausch des Resistenzgens gegen *hydG* stattgefunden.

### 3.4.5 Kontrolle einer möglichen Deletion der Maturase HydG in *T. vaginalis* mittels Southern-Analyse

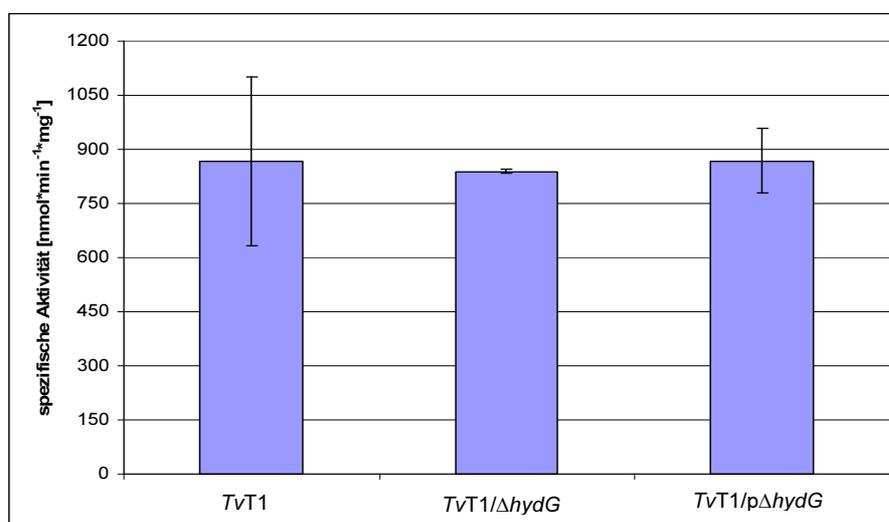
Für die Southern-Analyse wurden 10 µg genomische DNA von *T. vaginalis* T1 mit 50 U der Restriktionsendonuklease HindIII geschnitten und über ein 1 %iges Agarosegel in 1 x TAE-Puffer getrennt. Nach der Übertragung auf eine Nylonmembran (s. 2.8.9) wurde die Membran mit DNA-Sonden der offenen Leseraster der Gene für die Neomycin-Phosphotransferase, *hydG* und Aktin als Kontrolle hybridisiert. Wie bei der Northern-Analyse erfolgte bei der Sonde gegen die Neomycin-Phosphotransferase keine Hybridisierung bei *T. vaginalis* T1 Wildtyp (s. Abb. 3.26B). Die Signale in den Proben *TvT1/ΔhydG* und *TvT1/pΔhydG* entsprechen der Größe des mit HindIII linearisierten Vektors *pΔhydG*. Die Hybridisierung mit den Sonden gegen *hydG* (s. Abb. 3.26C) und Aktin (s. Abb. 3.26D) führte bei allen Proben zu Signalen.



**Abb. 3.26:** Southern-Analyse von *T. vaginalis* genomischer DNA, welche mit der Restriktionsendonuklease HindIII geschnitten wurde. **A:** 1% Agarosegel der HindIII-geschnittenen genomischen DNA von *T. vaginalis*. **B:** Hybridisiert wurde mit den DNA-Sonden spezifisch gegen die Gene für die Neomycin-Phosphotransferase, *hydG* und Aktin. **M:** Größenstandard.

### 3.4.6 Hydrogenase-Aktivitätsbestimmung einer möglichen Deletionsmutante der Maturase HydG in *T. vaginalis*

Die Hydrogenase-Aktivitätsmessung mit der möglichen Deletionsmutante für *hydG* (*TvT1/ΔHydG*) erfolgte wie unter 2.10 beschrieben. Die Messung von *T. vaginalis* T1 Wildtyp diente als Referenzmessung. Sowohl die Mutante *TvT1/pΔhydG*, die das ungeschnittene Plasmid *pΔhydG* enthält, mit einer spezifischen Aktivität von  $867 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , als auch die mögliche Deletionsmutante *TvT1/ΔhydG* mit einer spezifischen Aktivität von  $839 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , zeigten keine Veränderung in der Hydrogenase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp *T. vaginalis* T1 mit einer spezifischen Aktivität von  $866 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  (s. Abb. 3.27).



**Abb. 3.27:** Hydrogenase-Aktivitätstest. Gemessen wurde die Hydrogenase-Aktivität von Gesamtzellextrakten von *T. vaginalis* Wildtyp, *TvT1/ΔhydG* und *TvT1/pΔhydG* mit Methylviologen als Elektronenakzeptor.

*T. vaginalis* T1 konnte mit geschnittenem und ungeschnittenem *pΔhydG* transformiert werden. Bei einer möglichen Deletionsmutante *TvT1/ΔhydG* konnte zwar die Resistenz gegen Neomycin durch Wachstum auf mit G418 supplementiertem TYM-Medium nachgewiesen werden, allerdings zeigten ein Hydrogenase-Aktivitätstest und weitere PCR-, Northern- und Southern-Analysen, dass keine Deletion von *hydG* durch Rekombination stattgefunden hat.

## 4. Diskussion

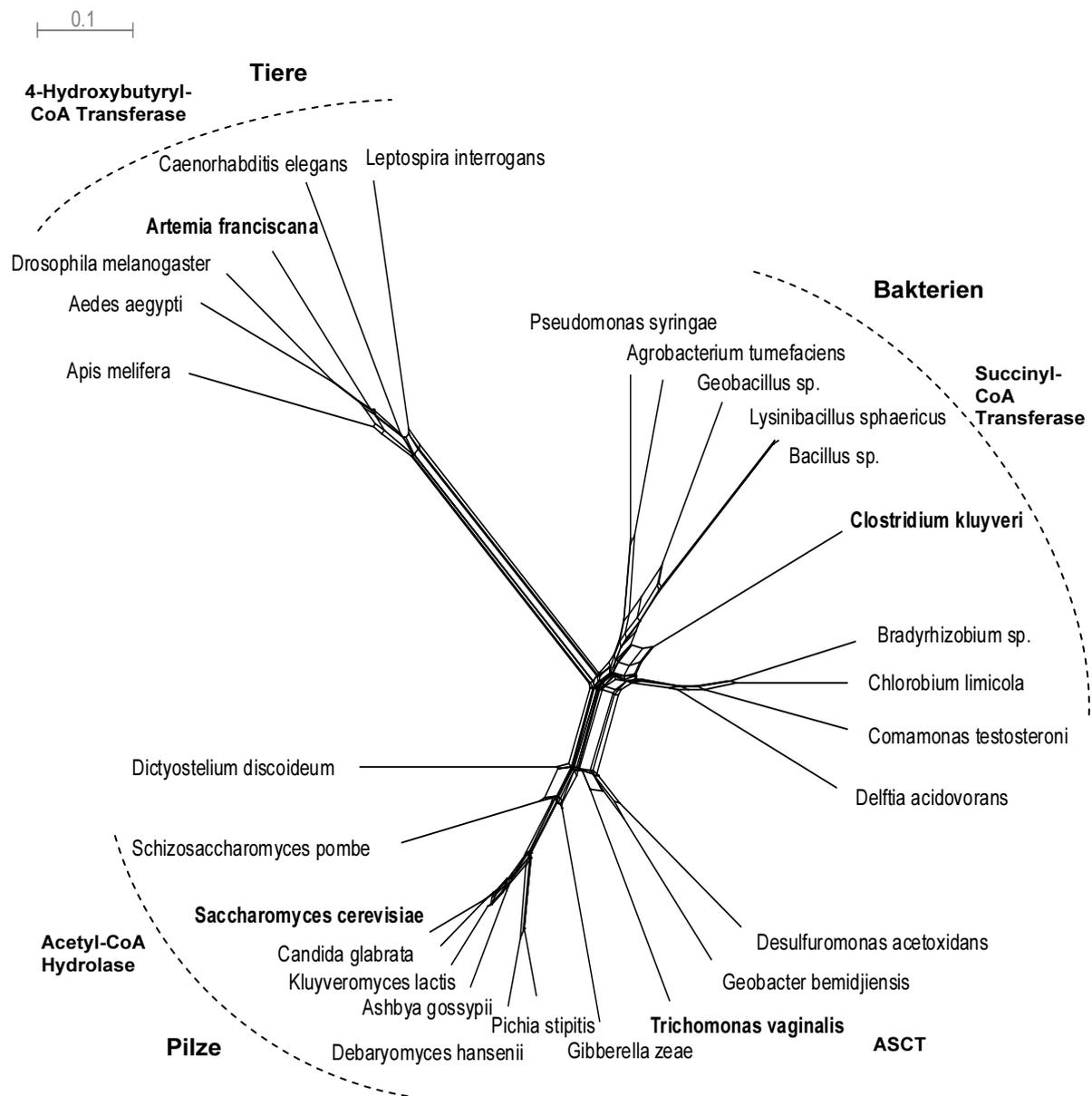
*Trichomonas vaginalis* ist ein humanpathogener, mikroaerophiler Flagellat, der Hydrogenosomen - anaerobe Formen der Mitochondrien - besitzt. Bei einer Analyse des hydrogenosomalen Proteoms von *T. vaginalis* wurden eine mögliche Acetat:Succinat-CoA-Transferase (ASCT) und die [FeFe]-Hydrogenase-Maturase HydG identifiziert (Pütz, 2007). Da im Genom von *T. vaginalis* Homologe zu den beiden anderen bereits aus Grünalgen bekannten [FeFe]-Hydrogenase Maturase-Genen *hydE* und *hydF* vorhanden sind, sollte die Reifung der [FeFe]-Hydrogenasen aus *T. vaginalis* anhand von heterolog co-exprimierten Hydrogenasen und Maturasen beschrieben werden. Die Charakterisierung der ASCT und damit des letzten bisher nicht näher beschriebenen Enzyms des Kohlenhydrat-Stoffwechsels in Hydrogenosomen sollte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Tielens (Utrecht, NL) erfolgen.

### 4.1 Die Acetat:Succinat-CoA-Transferase in den Hydrogenosomen von *T. vaginalis*

Hinweise auf die Lokalisierung der ASCT in den Hydrogenosomen von *T. vaginalis* sind bereits berichtet und eine ASCT-Aktivität wurde an isolierten Hydrogenosomen von *T. vaginalis* und *T. foetus* beschrieben (Steinbüchel und Müller, 1986; Pütz, 2007). Bisher konnte jedoch dieses letzte noch unbekannte Enzym des hydrogenosomalen Kohlenhydrat-Stoffwechsels nicht isoliert werden. Eine mögliche ASCT wurde nun durch 2D-Elektrophoresen und Massenspektrometrie der Hydrogenosomen von *T. vaginalis* identifiziert (Pütz, 2007). Die Sequenz 93909.m00117 ([www.tigr.org](http://www.tigr.org)) ist als hypothetisches Protein annotiert, zeigt jedoch immerhin 55 % Ähnlichkeit zu einer Acetyl-CoA-Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Allerdings konnten Homologien zu pro- und eukaryotischen Sequenzen der Proteinfamilie der Acetyl-CoA-Hydrolasen/Acetyl-CoA-Transferasen/Succinyl-CoA:CoA-Transferasen gezeigt werden (s. Abb. 4.1 und van Grinsven *et al.*, 2008). Nur die Sequenzen von *A. franciscana* (Oulton *et al.*, 2003), *C. kluveri* (Söhling und Gottschalk, 1996), *S. cerevisiae* (Buu *et al.*, 2003) und *T. vaginalis* (diese Arbeit, van Grinsven *et al.*, 2008) sind biochemisch charakterisiert. ASCT-Sequenzen anderer Hydrogenosomen besitzender Protisten wurden bisher nicht gefunden, obwohl auch diese in ihren Organellen Acetat produzieren (z. B. *Neocallimastix*; Marvin-Sikkema *et al.*, 1993). Kürzlich wurde eine weitere eukaryotische ASCT aus *Blastocystis* sp. beschrieben. Dieses Enzym ist in den Organellen (MLO, „mitochondrion-like organelle“) lokalisiert und zeigt 78 % Homologie zur ASCT aus *T. vaginalis* (Lantsman *et al.*, 2008).

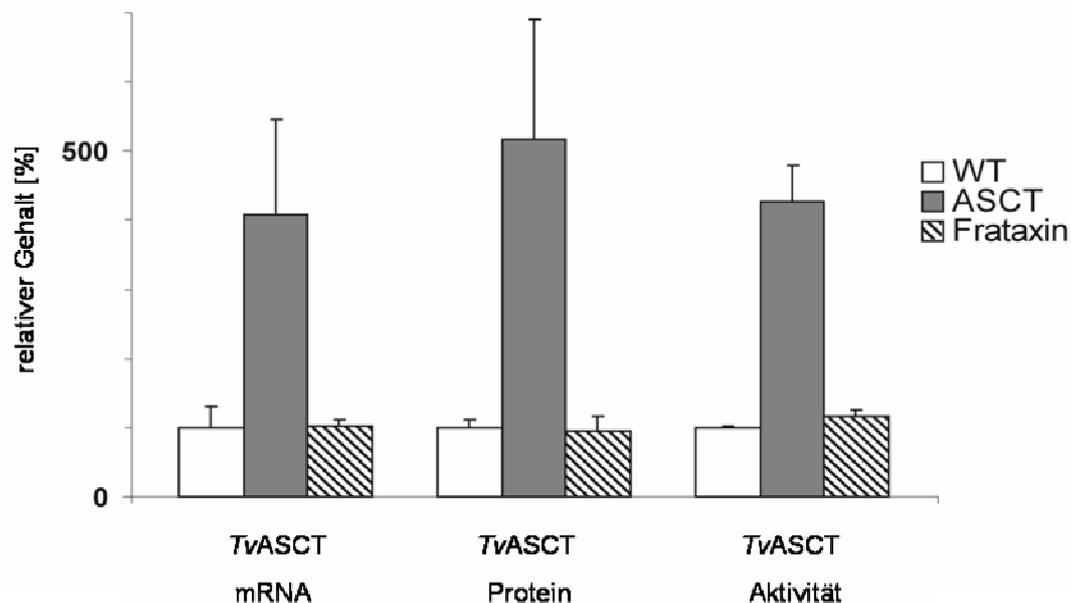
Eine ASCT-Aktivität wurde bereits an isolierten Hydrogenosomen gemessen (Steinbüchel und Müller, 1986). Da hydrogenosomale Proteine an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert und post-translational mit Hilfe eines Transitpeptids in das Organell importiert werden und hydrogenosomale und mitochondriale Transitpeptide vergleichbare

Aminosäurezusammensetzungen besitzen (Bradley *et al.*, 1997), wurde die ASCT-Proteinsequenz mit den Programmen TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000), WoLF Psort (Horton *et al.*, 2007) und MitoPred (Perella, 1988) analysiert. Die acht N-terminalen Aminosäuren (MLSSSSRA) der ASCT zeigten eindeutige Ähnlichkeiten zu bisher beschriebenen hydrogenosomalen Transitpeptiden (Carlton *et al.*, 2007). Eine Westernblot-Analyse nach einer subzellulären Zellfraktionierung von *T. vaginalis* mit einem anti-TvASCT Antikörper bestätigte eindeutig eine Akkumulation der TvASCT in der hydrogenosomalen Fraktion (s. Abb. 3.5). Die Sequenz 93909.m00117 der putativen TvASCT wird also exprimiert und ist in den Hydrogenosomen von *T. vaginalis* lokalisiert.



**Abb. 4.1:** Neighbor-Net Analyse von Sequenzen der Acetyl-CoA-Hydrolase/Transferase Familie. Die Sequenzen wurden nach einer BLASTP-Suche (Altschul *et al.*, 1990) gegen die *T. vaginalis* ASCT-Sequenz (93909.m000117) ausgewählt. Es wurde ein multiples Alignment mit CLUSTALW erstellt, welches mit SPLITSTREE (Huson und Bryant, 2006) visualisiert wurde. Zugangsnummern der verwendeten Sequenzen ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)): YP\_002139643.1; XP\_461160.1; XP\_447891.1; XP\_001385126.2; ZP\_01312081.1; NP\_594811.1; NP\_009538.1; NP\_985567.1; XP\_454427.1; XP\_388442.1; XP\_637164.1; ZP\_01520475.1; YP\_238084.1; YP\_001561117.1; ZP\_02912231.1; NP\_3534262; ZP\_01723249.1; YP\_001943079.1; YP\_001239077.1; YP\_001696583.1; P38946.1; AAP6883.1; XP\_001657212.1; NP\_651762.1; XP\_392705.2; NP\_495409.3; NP\_714799.1.

Die Expression der *TvASCT* wurde über Quantifizierung des RNA- (s. Abb. 3.2/3.3) und Protein-Gehalts überprüft. Als Kontrolle dienten *T. vaginalis* T1 Wildtyp und *T. vaginalis* T1 transformiert mit pTagvag2/Frataxin. Bezogen auf den Wildtyp *T. vaginalis* T1 (100 %) war im Stamm *TvT1ASCT* das RNA-Level auf  $409 \pm 136$  % erhöht und das Protein-Level auf  $518 \pm 171$  % erhöht, während diese in der *TvT1Frataxin*-Kontrolle nahezu unverändert blieben ( $101 \pm 10$  % RNA-Gehalt und  $95 \pm 21$  % Protein-Gehalt; s. Abb. 4.2).



**Abb. 4.2:** Überexpression von *TvASCT* in *T. vaginalis*. Die Stämme *T. vaginalis* T1 Wildtyp (WT), *TvT1/ASCT* (ASCT) und *TvT1/Frataxin* (Frataxin) wurden auf Expression von *TvASCT* überprüft. Es wurden das mRNA- und das Protein-Level sowie die ASCT-Aktivität analysiert (aus: van Grinsven *et al.*, 2008).

Die ASCT-Aktivitätsmessung wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Tielens (Utrecht, NL) durchgeführt. Die ASCT-Aktivität erhöhte sich von  $426 \pm 54$  % im Stamm *TvT1/ASCT* und blieb in der *TvT1/Frataxin*-Kontrolle nahezu unverändert ( $115 \pm 10$  %; s. Abb. 4.2). Die ASCT-Aktivität konnte durch homologe Überexpression in *T. vaginalis* 4-fach erhöht werden, während eine heterologe Expression in *E. coli* keine detektierbare ASCT-Aktivität zeigte. Die fehlende Aktivität der *TvASCT* aus *E. coli* kann jedoch z.B. durch einen fehlenden Cofaktor oder unkorrekte Faltung des Proteins bedingt sein, da dies ein häufiges Problem bei der Expression von eukaryotischen Proteinen in prokaryotischen Expressionssystemen ist (van Weelden, 2005). Durch heterologe Expression in einem eukaryotischen Expressionssystem mit CHO K1-Zellen (Hamster Ovarien Zellen) konnte eine, wenn auch geringe, ASCT-Aktivität gemessen werden (van Grinsven *et al.*, 2008)

Die hohe Sequenzähnlichkeit der *TvASCT* mit Acetyl-CoA-Hydrolasen/Transferasen lässt auf eine Succinat-Abhängigkeit des Proteins schließen. Hierzu wurde die Affinität zu Succinat von *T. vaginalis* Gesamtzellextrakt und über Anionen-Austausch-Chromatographie gereinigte *TvASCT* gemessen. Nur bei Anwesenheit von Succinat (50 mM) im Aktivitätstest

wurde Acetyl-CoA zu Acetat umgewandelt. Die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes von TvASCT in Abhängigkeit von der Succinat-Konzentration ergab eine hohe Abhängigkeit von Succinat ( $K_m = 0,75 \pm 0,05$  mM; AG Tielens, Utrecht; van Grinsven *et al.*, 2008). Dies zeigt, dass es sich bei der TvASCT tatsächlich um eine Acetat:Succinat-CoA-Transferase handelt und nicht um eine Hydrolase. Außerdem unterscheidet sich die Substrataffinität für Succinat der TvASCT deutlich von denen der mitochondrialen ASCTs. Die  $K_m$ -Werte für Succinat liegen bei den mitochondrialen ASCTs bei 2,3 mM für *T. brucei*, 3,5 mM für *Phytomonas* sp. und 4,9 mM für *F. hepatica* (van Hellemond *et al.*, 1998). Die TvASCT besitzt also eine deutlich höhere Substrataffinität zu Succinat als die mitochondrialen Enzyme.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der in der TIGR-Genom-Datenbank identifizierte ORF 93909.m00117 für eine mögliche Acetat:Succinat-CoA-Transferase das bisher fehlende letzte nicht charakterisierte Enzym des Pyruvat-Stoffwechsels in den Hydrogenosomen von *T. vaginalis* ist. Eine heterologe Expression der TvASCT zeigte eine geringe Aktivität in CHO K1-Zellen und eine homologe Überexpression in *T. vaginalis* erhöhte den RNA- und Protein-Gehalt sowie die ASCT-Aktivität etwa 4-fach. Das Protein wurde über N-terminale Transitsequenz und Zellfraktionierung eindeutig als erstes hydrogenosomales Acetat-produzierendes Enzym identifiziert und charakterisiert. Da es keine Sequenzähnlichkeiten zu den mitochondrialen ASCTs gibt und die Affinität zum Substrat Succinat der TvASCT deutlich höher ist als die der mitochondrialen ASCTs, kann angenommen werden, dass sich zwei unterschiedliche Succinat-abhängige Acetat-produzierende Enzyme unabhängig voneinander in Hydrogenosomen und Mitochondrien entwickelt haben.

## 4.2 [FeFe]-Hydrogenasen und ihre Maturasen aus *T. vaginalis*

Nachdem die Maturase HydG durch Analyse des hydrogenosomalen Proteoms von *T. vaginalis* identifiziert werden konnte (Pütz *et al.*, 2006) und im Genom von *T. vaginalis* Homologe zu den beiden anderen aus *C. reinhardtii* bekannten Maturase-Genen gefunden wurden, sollte untersucht werden, ob diese in der Lage sind, durch Co-Expression in *E. coli* die Aktivität von Hydrogenasen aus *T. vaginalis* wieder herzustellen. Eine Deletion der Maturase-Gene in *T. vaginalis* sollte zum Verlust der Hydrogenase-Aktivität führen.

### 4.2.1 Heterologe Expression der [FeFe]-Hydrogenasen und Maturasen aus *T. vaginalis*

In *T. vaginalis* sind im Gegensatz zu *C. reinhardtii* die Gene *hydE* und *hydF* nicht als Fusion vorhanden. Die heterologe Expression der Maturasen alleine und in Kombination miteinander in anaerob kultivierten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen konnte mit einer Western-Analyse bestätigt werden (s. Abb. 3.10). Die Co-Expression aller drei Maturasen zusammen

mit einer Hydrogenase aus *T. vaginalis* war jedoch nicht erfolgreich und es konnte keine Hydrogenase-Aktivität gemessen werden (s. Abb. 3.11).

Die Messung von *E. coli*-Extrakt mit den Leervektoren pRSF-Duet1 und pCDF-Duet1 zeigte eine steigende Aktivität bei steigender Maturasemenge (s. Abb.3.12). *E. coli* besitzt zwar anaerob induzierte Hydrogenasen (Ballantine und Boxer, 1985; Sawers *et al.*, 1985), es handelt sich hierbei jedoch um [NiFe]-Hydrogenasen, die einem anderen Reifungsmechanismus unterliegen als die [FeFe]-Hydrogenasen (Böck *et al.*, 2006). Eine Steigerung der Aktivität der endogenen Hydrogenasen aus *E. coli* ist daher durch die eukaryotischen Maturasen HydG, HydE und HydF nicht wahrscheinlich, wenngleich auch ein geringer Effekt zu beobachten ist (s. Abb. 3.12). Die in dieser Arbeit gemessenen Aktivitäten entsprechen trotz leicht steigender Grundaktivität bei steigender Maturasemenge jedoch den aus der Literatur bekannten Hydrogenase-Aktivitäten aus *E. coli* von etwa 70-90 nmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup> (Maeda *et al.*, 2007).

Die Hydrogenase-Aktivität von in anaerob kultivierten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen heterolog exprimierter 64kDa-Hydrogenase und Hydrogenase/CytochromP450-Reduktase-Fusion aus *T. vaginalis* war nur als Hintergrundaktivität messbar (10-15 nmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup>; s. Abb. 3.11). Erst die Kombination mit co-exprimierten Maturasen *in vitro* erzielte eine erhöhte Hydrogenase-Aktivität. Hierbei konnte die Hydrogenase-Aktivität im Vergleich zur Hintergrundaktivität etwa verdoppelt werden. Die Hydrogenase/CytochromP450-Reduktase-Fusion zeigte die höchste Hydrogenase-Aktivität bei einem Verhältnis Hydrogenase:Maturasen von 1:120 (141 nmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup>; s. Abb. 3.14). Die 64kDa-Hydrogenase zeigte die höchste Hydrogenase-Aktivität bei einem Verhältnis Hydrogenase:Maturasen von 1:80 (129 nmol\*min<sup>-1</sup>\*mg<sup>-1</sup>; s. Abb. 3.16). Die in *E. coli* heterolog exprimierte [FeFe]-Hydrogenase HydA aus *Clostridium saccharobutylicum* konnte *in vitro* durch Zugabe von co-exprimierten Hydrogenase-Maturasen aus *C. acetobutylicum* aktiviert werden. Für diese Messungen wurden ebenfalls *E. coli*-Rohextrakte verwendet und die höchste Hydrogenase-Aktivität wurde bei dem Verhältnis Hydrogenase:Maturasen von 1:80 gemessen (McGlynn *et al.*, 2007). Auch bei der heterologen Co-Expression der Hydrogenase HydA1 aus *C. reinhardtii* mit den Maturasen HydEF und HydG konnte eine aktive Hydrogenase nur bei Co-Expression mit allen Maturasen zusammen erzielt werden. Auch hier waren jedoch die Messungen großen Schwankungen ausgesetzt, da die Expression der Hydrogenase-Menge unter diesen Bedingungen stark variierte (Posewitz *et al.*, 2004). Die S-adenosylmethionin-abhängigen Proteine HydE und HydG und die GTPase HydF waren jedoch eindeutig für die Aktivität der *C. reinhardtii* [FeFe]-Hydrogenase verantwortlich (Posewitz *et al.*, 2004).

Die Ergebnisse der Co-Expressionsversuche dieser Arbeit lassen vermuten, dass auch in *T. vaginalis* die Aktivität von [FeFe]-Hydrogenasen von der Anwesenheit der drei Maturasen abhängig ist. Wie auch für [FeFe]-Hydrogenasen aus anderen Organismen gezeigt, kann eine funktionstüchtige Hydrogenase in Abhängigkeit von ihren Maturasen *in vitro* aus

Rohextrakten erhalten werden. Das *T. vaginalis* Hydrogenase/Maturase-System unterscheidet sich von dem aus anderen Organismen nur im Verhältnis der aktivierenden Maturasen zur Hydrogenase. Allerdings lässt sich kein absolutes Verhältnis angeben, da die Menge der co-exprimierten Maturasen in *E. coli* nicht quantifizierbar war. Die Maturasen lagen bei Co-Expression in *E. coli* in unterschiedlichen Mengen vor. Das kleinste Protein HydE (43 kDa) war deutlich stärker exprimiert als die beiden größeren Proteine HydF (48 kDa) und HydG (57 kDa; s. Abb. 3.10). Unter Umständen würde ein anderes Verhältnis der Maturasen untereinander zu erhöhter Hydrogenase-Aktivität führen. Die Übertragung auf die Verhältnisse *in vivo* bleibt offen. Da in der Proteom-Analyse der Hydrogensosomen von *T. vaginalis* nur HydG detektiert wurde (Pütz, 2007), sind die beiden anderen Maturasen HydE und HydF vermutlich deutlich geringer exprimiert oder mit dieser Methode nicht detektierbar. Die Expression der Maturasen *in vivo* ließe sich jedoch durch real-time PCR Experimente oder quantifizierte Northern-Analysen der mRNA überprüfen.

#### 4.2.2 Deletion der [FeFe]-Hydrogenase-Maturasen aus *T. vaginalis*

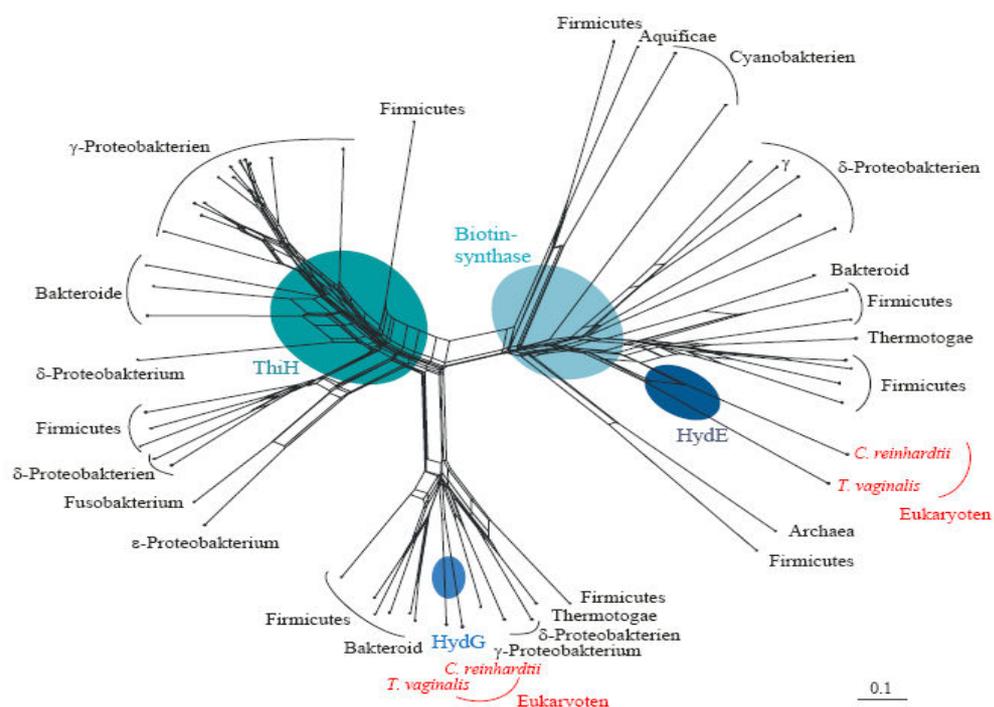
Da die Expressionsversuche und *in vitro* Aktivitätstests mit den kombinierten *E. coli*-Extrakten ein sehr artifizielles System sind und die Expression der Einzelkomponenten nicht gesteuert werden kann, konnten Artefakte durch unterschiedliche Gehalte an Hydrogenase und Maturasen bei den Messungen nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund sollten für die Hydrogenase-Maturase-Gene *hydG* und *hydF* über homologe Rekombination *knockout*-Mutanten von *T. vaginalis* hergestellt werden, um die Auswirkungen durch das Fehlen einzelner Hydrogenase-Maturasen auf die Hydrogenase-Aktivität in *T. vaginalis* zu beschreiben.

Das Wachstum des Stamms *TvT1/ΔhydG* unter selektiven Bedingungen in mit G418 supplementiertem TYM-Medium und PCR-, Northern- und Southern-Analysen bestätigten die Aufnahme des Neomycin-Resistenzgens. Allerdings konnten keine Unterschiede zu mit ungeschnittenem Plasmid *pΔhydG* transformierten *T. vaginalis* T1 festgestellt werden. Da das Gen für die Maturase HydG noch vorhanden war (s. Abb. 3.22), hat offensichtlich keine homologe Rekombination mit Deletion von *hydG* stattgefunden. Auch die Hydrogenase-Aktivität von *TvT1/ΔhydG* war vergleichbar mit der Aktivität des Wildtyps *T. vaginalis* T1 und *TvT1/pΔhydG* (s. Abb. 3.27). Es ist unwahrscheinlich, dass das linearisierte Plasmid *pΔhydG* trotz Dephosphorylierung rezirkularisieren konnte oder die linearisierte DNA länger in der *T. vaginalis*-Zelle persistent war. Auch die Insertion an anderer Stelle im Genom scheint unwahrscheinlich. Die Kontamination mit ungeschnittener Plasmid-DNA ist trotz Reinigung nicht auszuschließen. Auch die Deletion von *hydF* durch homologe Rekombination war nicht erfolgreich. Obwohl Land *et al.* (2004) ein Ferredoxin-Gen durch homologe Rekombination deletieren konnten, war diese Methode nicht für die Deletion der Maturase-Gene *hydG* und *hydF* übertragbar. Allerdings handelt es sich bei Ferredoxin um eine Multigenfamilie mit

sieben unterschiedlichen Genen (Carlton *et al.*, 2007), die Deletion des einen Ferredoxin-Gens wird vermutlich durch die anderen Genprodukte kompensiert. Hierfür spricht auch die hohe Transformationseffizienz von 30 % (Land *et al.*, 2004). Die Deletion der Maturase-Gene *hydF* und *hydG* war trotz jeweils 60 unabhängiger Transformationen nicht möglich. Da es sich bei dem Maturase-Gen *hydF* um ein Einzelgen handelt, während von den beiden möglichen Genen für *hydG* nur eine Sequenz exprimiert wird (s. Abb. 3.7), kann hier keine Kompensation stattfinden, sodass diese Gene vermutlich essentiell sind und eine Deletion damit letal wäre.

#### 4.2.3 Evolution der [FeFe]-Hydrogenasen und Maturasen

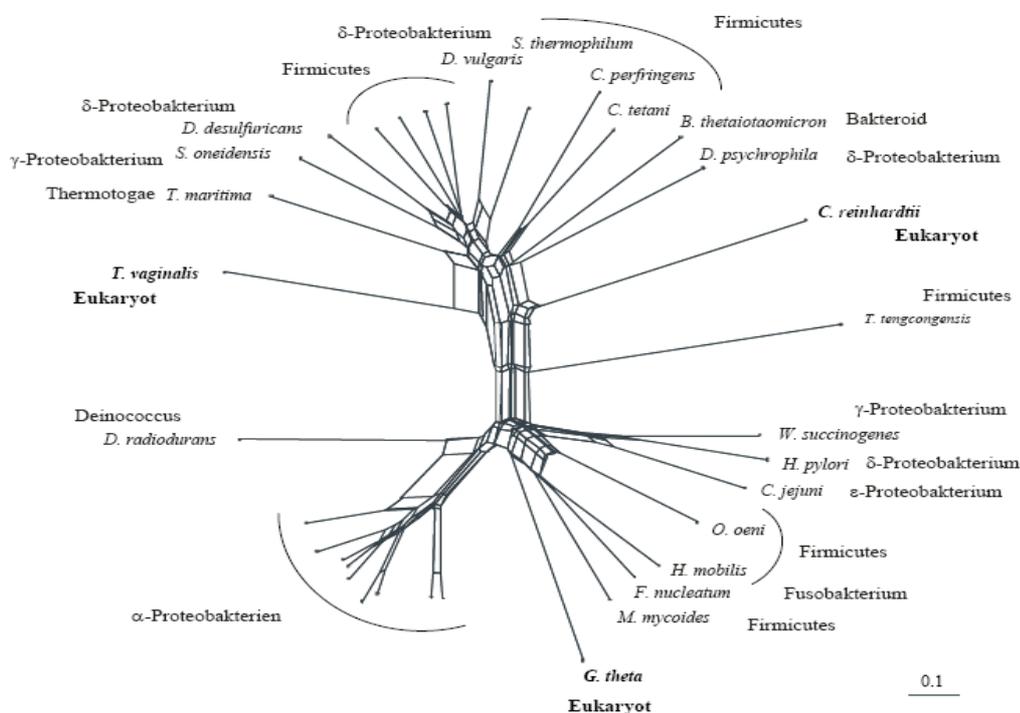
HydE, HydG und HydF sowie [FeFe]-Hydrogenasen sind eindeutig eubakteriellen Ursprungs (Pütz *et al.*, 2006). In einer Neighbor-Net-Analyse gruppierte die Maturase HydG in einer Gruppe von prokaryotischen Proteinen, die an der Thiamin-Biosynthese beteiligt sind. HydE gruppiert in einer unabhängigen Untergruppe von Biotin-Synthasen. Da alle Organismen dieser Gruppe auch [FeFe]-Hydrogenasen besitzen, fungieren die als ThiH annotierten Sequenzen in diesem Cluster vermutlich als Maturasen (Pütz *et al.*, 2006; Abb. 4.3).



**Abb. 4.3:** Neighbor-Net-Analyse der Maturasen HydG und HydE und verwandter prokaryotischer Proteine. Die eukaryotischen HydG Sequenzen gruppieren in einer monophyletischen Gruppe von als ThiH annotierten prokaryotischen Sequenzen während HydE in einer hiervon entfernten Gruppe von prokaryotischen Biotin-Synthasen zu finden ist (aus: Pütz *et al.*, 2006).

Die Maturase HydF gehört zu einer Proteinfamilie möglicher GTPasen. In einer Neighbor-Net-Analyse von HydF aus *T. vaginalis* gruppiert diese Sequenz zusammen mit eubakteriellen GTPasen, in der auch HydF aus *C. reinhardtii* liegt. Eine weitere eukaryotische Sequenz aus *Guillardia theta* ist in einer anderen Untergruppe des Netzwerks

zu finden. Da von *G. theta* bisher keine [FeFe]-Hydrogenase bekannt ist, kann angenommen werden, dass die GTPasen dieser Gruppe andere Funktionen besitzen als die GTPasen der anderen im Netzwerk vorhandenen Gruppe (Pütz *et al.*, 2006; Abb. 4.4).



**Abb. 4.4:** Neighbor-Net-Analyse von der Maturase HydF und verwandten GTPasen. Die HydF Sequenzen von *T. vaginalis* und *C. reinhardtii* gruppieren in einer Gruppe von eubakteriellen Sequenzen, bilden aber keine monophyletische Gruppe (aus: Pütz *et al.*, 2006).

Da die Aktivität der Hydrogenase von der der Maturasen abhängig ist und Homologe dieser Gene in Eubakterien häufig in Operons organisiert sind (Posewitz *et al.*, 2004; Meyer, 2007), ist anzunehmen, dass [FeFe]-Hydrogenasen zusammen mit den Maturase-Genen in der eukaryotischen Evolution gemeinsam erworben wurden. [FeFe]-Hydrogenasen sind aus anaerob lebenden Prokaryoten, wie z.B. *Clostridien* oder sulfatreduzierende Bakterien (Adams, 1990; Atta und Meyer, 2000; Meyer, 2000) bekannt. Sie sind zudem die einzigen auch aus Eukaryoten bekannten Hydrogenasen. Dort sind die Enzyme ausschließlich in Organellen (Chloroplasten oder Hydrogenosomen) lokalisiert. Im Gegensatz zu den [FeFe]-Hydrogenasen sind die hierzu nah verwandten sog. Narf- („*nuclear prelamina A recognition factor*“) Proteine bei Eukaryoten sehr verbreitet. Diese besitzen keine Hydrogenase-Aktivität mehr, da im H-Cluster ein konserviertes Cystein fehlt (s. Abb. 1.6, Barton und Worman, 1999; Balk *et al.*, 2004). Vermutlich sind die Narf-Gene durch Duplikation der [FeFe]-Hydrogenase-Gene entstanden. Ein anschließender Verlust der *hyd*-Gene erklärt den Verlust der Hydrogenase-Aktivität dieser Proteine und das Fehlen von Homologen zu den Maturase-Genen *hydE*, *hydG* und *hydF* (s. Abb. 4.5; rot dargestellte Organismen). Nur bei Organismen mit [FeFe]-Hydrogenasen konnten auch die Maturase-Gene *hydE*, *hydG* und *hydF* identifiziert werden (Abb. 4.5; dunkelblau dargestellte Organismen). In anderen



Hydrogenasen bekannt, die nur aus der den H-Cluster enthaltenden Domäne bestehen (Erbes *et al.*, 1979; Happe und Naber, 1993; Florin *et al.*, 2001; Winkler *et al.*, 2002), während bei *T. vaginalis* akzessorische Domänen an [FeFe]-Hydrogenasen häufig zu finden sind (Tachezy und Dolezal, 2007). Diese Domänen enthalten zusätzliche FeS-Cluster (Horner *et al.* 2000, 2002; Hackstein 2005). In den Hydrogenosomen konnten ein zu Mitochondrien homologes System der FeS-Cluster-Synthese (IscS; „iron sulfur cluster synthesis“; Tachezy *et al.*, 2001) identifiziert werden - Proteine des IscS-Systems sind an der Bildung des FeS-Clusters von Ferredoxin beteiligt (Sutak *et al.*, 2004). Da die nur aus einer das H-Cluster enthaltenden Domäne bestehenden [FeFe]-Hydrogenasen aus *C. reinhardtii* auch auf die Anwesenheit der Maturasen HydE, HydG und HydF für die Reifung einer aktiven Hydrogenase angewiesen sind (Posewitz *et al.*, 2004), ist anzunehmen, dass diese Maturasen spezifisch für die Assemblierung des FeS-Zentrums im H-Cluster verantwortlich sind, während das IscS-System für die Bildung der anderen FeS-Cluster, wie z. B. bei Ferredoxin (Sutak *et al.*, 2004), zuständig ist. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Maturase und GTPase HydF in der Lage ist, FeS-Cluster zu binden (Brazolotto *et al.*, 2007). Das mit den beiden anderen Maturasen HydE und HydG co-exprimierte und anschließend gereinigte Enzym ist in der Lage, die gereinigte und allein exprimierte [FeFe]-Hydrogenase HydA aus *C. saccharobutylicum* zu aktivieren (McGlynn *et al.*, 2008). Wurde HydF alleine in *E. coli* exprimiert und mit der gereinigten Hydrogenase zusammen gebracht, so konnte keine Hydrogenase-Aktivität hergestellt werden. Es wird vermutet, dass die beiden SAM-abhängigen Enzyme HydE und HydG einen Cluster-Vorläufer generieren und dieser dann von HydF auf die Hydrogenase übertragen wird (McGlynn *et al.*, 2008). Für *T. vaginalis* muß dies an Hydrogenase-Aktivitätstests mit gereinigter Hydrogenase in Kombination mit gereinigter Maturase HydF mit und ohne Co-Expression von HydE und HydG noch überprüft werden, der Reifungs-Mechanismus ist vermutlich aber vergleichbar.

#### 4.2.4 [FeFe]-Hydrogenase-Maturasen – ein mögliches „drug target“?

Eine Deletion der Maturase-Gene führt evtl. zum Zusammenbruch des hydrogenosomalen Pyruvatstoffwechsels, da die Elektronenweiterleitung durch inaktive Hydrogenasen verhindert wird. Es gibt jedoch *T. vaginalis*-Stämme, die ohne den hydrogenosomalen Pyruvat-Stoffwechsel überleben. Diese Stämme sind resistent gegen das Medikament Metronidazol (Kulda, 1999). 5-Nitroimidazole (z. B. Metronidazol) sind die einzigen gegen *Trichomonas*-Infektionen bekannten Medikamente. Diese Substanzen werden durch das Schlüsselenzym des hydrogenosomalen Pyruvat-Stoffwechsels, die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFO), und den Elektronenüberträger Ferredoxin aktiviert, indem Elektronen auf die Nitrogruppe des Medikaments übertragen werden und so freie Radikale entstehen (Edwards, 1993). In Metronidazol-resistenten *T. vaginalis*-Stämmen ist der hydrogenosomale Stoffwechsel durch das Fehlen von PFO und einer reduzierten Expression von Ferredoxin stark eingeschränkt. Metronidazol-resistente Stämme besitzen keine Hydrogenase-Aktivität

mehr (Lloyd und Kristensen, 1985). Stattdessen ist die Glykolyserate im Cytosol stark erhöht (Kulda *et al.*, 1988) und *T. vaginalis* geht über zur Laktat-Fermentation, um den Energieverlust des fehlenden hydrogenosomalen Stoffwechsels so gering wie möglich zu halten (Cerkasovova *et al.*, 1988; Kulda, 1999). Dies bedeutet, dass Trichomonaden grundsätzlich in der Lage sind, auf die hydrogenosomale Energiegewinnung zu verzichten, da cytosolische, fermentative Stoffwechselwege dies ausgleichen können. Eine Deletion der Hydrogenase-Maturasen sollte in inaktive Hydrogenasen und dadurch auch zu einer Reduktion bzw. zum Verlust der Wasserstoffproduktion in diesen Stämmen führen, da hierdurch die Hydrogenasen als terminale Elektronen-übertragende Enzyme ausgeschaltet werden sollten.

Die Hydrogenase-Maturasen HydE, HydG und HydF sind vermutlich für die Bildung eines Dithiolat-gebundenen [2Fe2S]-Clusters und für die Insertion der CO- und CN-Liganden in das FeS-Cluster der aktiven Domäne, das H-Cluster, verantwortlich. Das Dithiolat-gebundene [2Fe2S]-Cluster bleibt hierbei an eines der SAM-abhängigen Enzyme HydE oder HydG gebunden, während das andere ein Aminosäure-Radikal (z. B. Glycin) bildet, das direkt mit dem vorher gebildeten [2Fe2S]-Cluster reagiert und damit in einer Reaktion CO- und CN-Liganden in das H-Cluster einbringen kann (Peters *et al.*, 2006), ohne das freie CO oder CN die Zelle schädigen. Die GTPase HydF scheint dann für die Translokation und Insertion des FeS-Clusters in das Hydrogenase-Apoenzym verantwortlich zu sein (Peters *et al.*, 2006; McGlynn *et al.*, 2008). Die Biosynthese der anderen [4Fe4S]-Cluster allerdings geht vermutlich durch den auch in Mitochondrien bekannten FeS-Cluster-Syntheseweg (IscS) und vor der Insertion der [2Fe2S]-Zentren vonstatten (Johnson *et al.*, 2005).

Fällt die Synthese der Komponenten des H-Clusters durch Deletion eines der beteiligten Proteine aus, scheint dies für *T. vaginalis* nicht kompensierbar zu sein, die Deletion von *hydG* bzw. *hydF* scheint letal zu sein. Anders als z.B. bei Metronidazol-resistenten *T. vaginalis*-Stämmen, wo der hydrogenosomale Pyruvat-Stoffwechsel reduziert wird, fehlt bei Inaktivierung der Hydrogenase der terminale Elektronenüberträger und die Elektronen können nicht weitergeleitet bzw. durch Übertragung auf  $H^+$  aus der Zelle entfernt werden. Deshalb sind die Maturase-Gene für die Reifung einer aktiven Hydrogenase vermutlich essentiell und könnten als Ziel für Arzneimittel dienen zumal sie nur in niederen Eukaryoten zu finden sind.

### 4.3 Ausblick

Die Aktivierung von [FeFe]-Hydrogenasen aus *T. vaginalis* durch Kombination mit den heterolog co-exprimierten Maturasen HydE, HydG und HydF in *E. coli* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Da die Aktivitätsmessungen aus Rohextrakten hohen Schwankungen unterlagen, sollte versucht werden, die anaerobe Aufarbeitung der Proteine zu optimieren und zusätzlich die Proteine vor der Aktivitätsmessung über Affinitätschromatographie zu konzentrieren.

Die Rolle von HydF für die Insertion des FeS-Clusters in das Hydrogenase-Apoenzym wurde kürzlich für *Clostridien*-Hydrogenasen geklärt (McGlynn *et al.*, 2008). Die H-Cluster-Biosynthese der *Trichomonas*-[FeFe]-Hydrogenase verläuft vermutlich ähnlich und sollte mit dem *Clostridien*-System verglichen werden.

Davon ausgehend, dass die Methode der gerichteten Deletion eines Gens in *T. vaginalis* grundsätzlich funktioniert, sollte trotzdem die bereits von Land *et al.* (2004) beschriebene Deletion des Gens für Ferredoxin wiederholt werden. Hiermit soll sichergestellt werden, dass die Deletion von *hydG* und *hydF* tatsächlich letal für *T. vaginalis* und nicht auf einen internen Fehler zurückzuführen ist, obwohl die Transformation mit ungeschnittenen Plasmiden erfolgreich durchgeführt wurde. Alternativ zur Deletion der Maturase-Gene könnte durch Einsatz von siRNAs durch RNA Interferenz (RNAi) die Expression der Zielgene verringert und damit eine Auswirkung auf die Hydrogenase-Aktivität getestet werden.

---

## 5. Literatur

- Adams MWW, Mortenson LE, Chen JS (1980).** Hydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 594(2-3):105-176.
- Adams MWW (1990).** The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim Biophys Acta* 1020(2):115-145.
- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF (2005).** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52(5):399-451.
- Akhmanova A, Voncken F, van Alen T, van Hoek A, Boxma B, Vogels G, Veenhuis M, Hackstein JH (1998).** A hydrogenosome with a genome. *Nature* 396(6711):527-528.
- Akhmanova A, Voncken FGJ, Hosea KM, Harhangi H, Keltjens JT, op den Camp HJ, Vogels GD, Hackstein JH (1999).** A hydrogenosome with pyruvate formate-lyase: anaerobic chytrid fungi use an alternative route for pyruvate catabolism. *Mol Microbiol* 32(5):1103-1114.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.
- Arroyo R, Gonzalez-Robles A, Martinez-Palomo A, Alderete JF (1993).** Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Mol Microbiol* 7(2): 299-309.
- Atta M, Meyer J (2000).** Characterization of the gene encoding the [Fe]-hydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Biochim Biophys Acta* 1476(2):368-371.
- Balk J, Pierik AJ, Netz DJ, Mühlenhoff U, Lill R (2004).** The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *EMBO J* 23(10):2105-2015.
- Ballantine SP, Boxer DH (1985).** Nickel-containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 163(2):454-459.
- Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, Miyano S (2001).** Views: Fundamental building blocks in the process of knowledge discovery, In: *Proceedings of the 14th International FLAIRS Conference* AAAI Press 233-238.
- Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, Miyano S (2002).** Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18: 298-305.
- Barton RM, Worman HJ (1999).** Prenylated prelamin A interacts with Narf, a novel nuclear protein. *J Biol Chem* 274(42):30008-30018.

- Bateman KS, Brownie ER, Wolodko WT, Fraser ME (2002).** Structure of the mammalian CoA transferase from pig heart. *Biochemistry* 41(49):14455-14462.
- Beach DH, Holz GG Jr, Singh BN, Lindmark DG (1990).** Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol* 38(2): 175-190.
- Benchimol M, Almeida JC, de Souza W (1996a).** Further studies on the organization of the hydrogenosome in *Tritrichomonas foetus*. *Tissue Cell* 28(3): 287-299.
- Benchimol M, De Souza W (1983).** Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. *J Protozool* 30(2):422-425.
- Benchimol M, Engelke F (2003).** Hydrogenosome behavior during the cell cycle in *Tritrichomonas foetus*. *Biol Cell* 95(5): 283-293.
- Benchimol M, Johnson PJ, de Souza W (1996b).** Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study. *Biol Cell* 87(3):197-205.
- Böck A, King PW, Blokesch M, Posewitz MC (2006).** Maturation of hydrogenases. *Adv Microb Physiol* 51:1-71.
- Bowien B, Schlegel HG (1981).** Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria. *Annu Rev Microbiol* 35:405-452.
- Bradford MM (1976).** A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bradley PJ, Lahti CJ, Plümper E, Johnson PJ (1997).** Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist *Trichomonas*: similarities with mitochondrial protein import. *EMBO J* 16(12):3484-3493.
- Brazzolotto X, Rubach JK, Gaillard J, Gambarelli S, Atta M, Fontecave M (2006).** The [Fe-Fe]-hydrogenase maturation protein HydF from *Thermotoga maritima* is a GTPase with an iron-sulfur cluster. *J Biol Chem* 281(2):769-774.
- Broers CAM, Stumm CK, Vogels GD (1990).** *Psalteriomonas lanterna* gen. nov., sp. nov., a free-living amoeboflagellate isolated from freshwater anaerobic sediments. *Europ J Protistol* 25:369-380.
- Brown MT, Goldstone HM, Bastida-Corcuera F, Delgadillo-Correa MG, McArthur AG, Johnson PJ (2007).** A functionally divergent hydrogenosomal peptidase with protomitochondrial ancestry. *Mol Microbiol* 64(5):1154-1163.
- Brown TD, Jones-Mortimer MC, Kornberg HL (1977).** The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 102(2):327-336.
- Bryant D und Moulton V (2004).** NEIGHBOR-NET: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol Biol Evol* 21(2):255-265.
- Bui ET, Johnson PJ (1996).** Identification and characterization of [Fe]-hydrogenases in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 76(1-2):305-310

- 
- Buu LM, Chen YC, Lee FJ (2003).** Functional characterization and localization of acetyl-CoA hydrolase, Ach1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278(19):17203-9.
- Casalot L, Rousset M (2001).** Maturation of the [NiFe] hydrogenases. *Trends Microbiol* 9(5):228-237.
- Cerkasovova A, Novak J, Cerkasov J, Kulda J, Tachezy J (1988).** Metabolic properties of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole under anaerobic conditions. *Acta Univ Carolinae-Biol* 30:505-512.
- Clemens DL, Johnson PJ (2000).** Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. *Mol Biochem Parasitol* 106:307-313.
- Cavalier-Smith T (2002).** The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int J Syst Evol Microbiol* 52(Pt 2):297-354.
- Devereux J, Haeblerli P, Smithies O (1984).** A comprehensive set of sequence analysis programmes for the VAX. *Nucleic Acids Res* 2: 387-395.
- Drapal N, Böck A (1998).** Interaction of the hydrogenase accessory protein HypC with HycE, the large subunit of *Escherichia coli* hydrogenase 3 during enzyme maturation. *Biochemistry* 37(9):2941-2948.
- Drmota T, Král J (1997).** Karyotype of *Trichomonas vaginalis*. *Eur J Protistol* 33:131-135.
- Dyall SD, Johnson PJ (2000).** The trichomonad hydrogenosome. In *Biology of Parasitism* Tschudi C., Pearce E.J. (Hrsg). Kluwer Academic Publishers, S. 169-193.
- Dyall SD, Koehler CM, Delgadillo-Correa MG, Bradley PJ, Plümper E, Leuenberger D, Turck CW, Johnson PJ (2000).** Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Mol Cell Biol* 20(7):2488-2497.
- Dyall SD, Yan W, Delgadillo-Correa MG, Lunceford A, Loo JA, Clarke CF, Johnson PJ (2004).** Non-mitochondrial complex I proteins in a hydrogenosomal oxidoreductase complex. *Nature* 431:1103-1107.
- Edwards DI (1993).** Nitroimidazole drugs - action and resistance mechanisms, I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother* 31(1):9-20.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000).** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300:1005-1016.
- Embley TM (2006).** Multiple secondary origins of the anaerobic lifestyle in eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1470):1055-1067.
- Embley TM, Martin W (1998).** A hydrogen-producing mitochondrion. *Nature* 396(6711): 517-519.

- Embley TM, van der Giezen M, Horner DS, Dyal PL, Bell S, Foster PG (2003a).** Hydrogenosomes, mitochondria and early eukaryotic evolution. *IUBMB Life* 55: 387-395
- Embley TM, van der Giezen M, Horner DS, Dyal PL, Foster P (2003b).** Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:191-203.
- Erbes DL, King D, Gibbs M (1979).** Inactivation of hydrogenase in cell-free extracts and whole cells of *Chlamydomonas reinhardtii* by oxygen. *Plant Physiol* 63(6):1138-1142.
- Esser C, Ahmadinejad N, Wiegand C, Rotte C, Sebastiani F, Gelius-Dietrich G, Henze K, Kretschmann E, Richly E, Leister D, Bryant D, Steel MA, Lockhart PJ, Penny D, Martin W (2004).** A genome phylogeny for mitochondria among alpha-proteobacteria and a predominantly eubacterial ancestry of yeast nuclear genes. *Mol Biol Evol* 21(9):1643-1660.
- Evans HJ, Harker AR, Papen H, Russell SA, Hanus FJ, Zuber M (1987).** Physiology, biochemistry, and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. *Annu Rev Microbiol* 41:335-361.
- Fauque G, Peck HD Jr, Moura JJ, Huynh BH, Berlier Y, DerVartanian DV, Teixeira M, Przybyla AE, Lespinat PA, Moura I, LeGall J (1988).** The three classes of hydrogenases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*. *FEMS Microbiol Rev.* 4(4):299-344.
- Finlay BJ und Fenchel T (1989).** Hydrogenosomes in some anaerobic protozoa resemble mitochondria. *FEMS Microbiol Lett* 65:311-314.
- Florin L, Tsokoglou A, Happe T (2001).** A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain. *J Biol Chem* 276(9):6125-6132.
- Fontecave M, Atta M, Mulliez E (2004).** S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci* 29(5):243-249.
- Forestier M, King P, Zhang L, Posewitz M, Schwarzer S, Happe T, Ghirardi ML, Seibert M (2003).** Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions. *Eur J Biochem* 270(13):2750-2758.
- Frey M, Fontecilla-Camps JC, Volbeda A (2001).** Nickel-iron hydrogenases. In: Handbook of Metalloproteins. Messerschmidt A, Huber R, Poulos T, Wieghardt K (eds.), John Wiley & Sons, Chichester.
- Fouts AC, Kraus SJ (1980).** *Trichomonas vaginalis*: re-evaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. *J Infect Dis* 141(2):137-143.
- Fritsche E, Paschos A, Beisel HG, Böck A, Huber R (1999).** Crystal structure of the hydrogenase maturing endopeptidase HYBD from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 288(5):989-998.

- Gelius-Dietrich G, Henze K (2004).** 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* 51(4):456-463.
- Gershoni JM, Palade GE (1983).** Protein blotting: principles and application. *Anal Biochem* 131:1-15.
- Girbal L, von Abendroth G, Winkler M, Benton PM, Meynial-Salles I, Croux C, Peters JW, Happe T, Soucaille P (2005).** Homologous and heterologous overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. *Appl Environ Microbiol* 71(5):2777-2781.
- Happe T, Naber JD (1993).** Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* 214:475-481.
- Hausmann K, Hülsmann N, Radek R (2003).** Protistology. 3<sup>rd</sup> completely revised edition. E.Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Henze K (2007).** The proteome of *T. vaginalis* hydrogenosomes. In: Tachezy J (ED): Hydrogenosomes and mitosomes: mitochondria of anaerobic eukaryotes. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Heukeshoven J, Dernick R (1988).** Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels using PhastSystem Development Unit. *Electrophoresis* 9:60-61.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüssler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N (2007).** A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111(5):509-547.
- Higuchi Y, Yagi T, Yasuoka N (1997).** Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure* 5(12):1671-1680.

- Honigberg BM, Volkmann D, Entzeroth R, Scholtyssek E (1984).** A freeze-fracture electron microscope study of *Trichomonas vaginalis* Donne and *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller). *J Protozool* 31(1): 116-131.
- Horner DS, Foster PG, Embley TM (2000).** Iron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol Biol Evol* 17(11):1695-1709.
- Horner DS, Heil B, Happe T, Embley TM (2002).** Iron hydrogenases – ancient enzymes in modern eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 27(3):148-153.
- Houchins JP (1984).** The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta* 768:227-255.
- Hrdy I, Hirt RP, Dolezal P, Bardonova L, Foster PG, Tachezy J, Embley TM (2004).** *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* 432: 618-622.
- Huson DH, Bryant D (2006).** Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 23(2):254-267.
- Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK (2005).** Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* 74:247-281.
- Joklik WK (1950a).** The hydrogenase of *E. coli* in the cell-free state. I. Concentration, properties and activation. *Aust J Exp Biol Med Sci* 28(3):320-329.
- Joklik WK (1950b).** The hydrogenase of *E. coli* in the cell-free state. II. The effect of certain inhibitors on hydrogenase. *Aust J Exp Biol Med Sci* 28(3):331-338.
- King PW, Posewitz MC, Ghirardi ML, Seibert M (2006).** Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system. *J Bacteriol* 188(6):2163-2172.
- Kulda J, Kabickova H, Tachezy J, Cerkasovova A, Cerkasov J (1988).** Metronidazole resistant trichomonads: mechanisms of *in vitro* developed anaerobic resistance. In: Lloyd D, Coombs GH, Paget TA (eds.). *Biochemistry and molecular biology of anaerobic protozoa*. Chur:Harwood Academic.137-160.
- Kulda J (1999).** Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int J Parasitol* 29(2): 199-212.
- Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lambert GR und Smith GD (1981).** The hydrogen metabolism of cyanobacteria (blue-green algae). *Biol Rev* 56:589-660.
- Land T, Rouault TA (1998).** Targeting of a human iron-sulfur cluster assembly enzyme, nifs, to different subcellular compartments is regulated through alternative AUG utilization. *Mol Cell* 2(6):807-815.

- Land KM, Delgadillo-Correa MG, Tachezy J, Vanacova S, Hsieh CL, Sutak R, Johnson PJ (2004).** Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. *Mol Microbiol* 51(1):115-122.
- Lantsman Y, Tan KS, Morada M, Yarlett N (2008).** Biochemical characterization of a mitochondrial-like organelle from *Blastocystis* sp. subtype 7. *Microbiology* 154:2757-2766.
- Lee FJ, Lin LW, Smith JA (1990).** A glucose-repressible gene encodes acetyl-CoA hydrolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 265(13):7413-7418.
- Li J, Kogan M, Knight SA, Pain D, Dancis A (1999).** Yeast mitochondrial protein, Nfs1p, coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake, and iron distribution. *J Biol Chem* 274(46):33025-33034.
- Lill R und Kispal G (2000).** Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25(8):352-356.
- Lill R und Mühlenhoff U (2005).** Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 30(3):133-141.
- Lindmark DG und Müller M (1973).** Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J Biol Chem* 248(22): 7724-7728.
- Lindmark DG, Müller M, Shio H (1975).** Hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol* 61(3): 552-554.
- Lloyd D, Kristensen B (1985).** Metronidazole inhibition of hydrogen production in vivo in drug-sensitive and resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *J Gen Microbiol* 131(4):849-853.
- Lloyd D, Ralphs JR, Harris JC (2002).** Hydrogen production in *Giardia intestinalis*, a eukaryote with no hydrogenosomes. *Trends Parasitol* 18(4):155-156.
- Lyon EJ, Shima S, Boecher R, Thauer RK, Grevels FW, Bill E, Roseboom W, Albracht SP (2004).** Carbon monoxide as an intrinsic ligand to iron in the active site of the iron-sulfur-cluster-free hydrogenase H<sub>2</sub>-forming methylenetetrahydro-methanopterin dehydrogenase as revealed by infrared spectroscopy. *J Am Chem Soc* 126(43):14239-14248.
- Maeda T, Sanchez-Torres V, Wood TK (2007).** *Escherichia coli* hydrogenase 3 is a reversible enzyme possessing hydrogen uptake and synthesis activities. *Appl Microbiol Biotechnol* 76(5):1035-1042.
- Magalon A, Böck A (2000).** Analysis of the HypC-hycE complex, a key intermediate in the assembly of the metal center of the *Escherichia coli* hydrogenase 3. *J Biol Chem* 275(28):21114-21120.
- Maier RJ (1986).** Biochemistry, regulation, and genetics of hydrogen oxidation in *Rhizobium*. *CRC Crit Rev Biotechnol* 3:17-38.

- Maier RJ (1996).** Respiratory metabolism in hyperthermophilic organisms: hydrogenases, sulfur reductases, and electron transport factors that function at temperatures exceeding 100 ° C. *Adv Protein Chem* 48:35-99.
- Maier T, Lottspeich F, Böck A (1995).** GTP hydrolysis by HypB is essential for nickel insertion into hydrogenases of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 230(1):133-138.
- Martin W, Hoffmeister M, Rotte C, Henze K (2001).** An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biol Chem* 382(11):1521-1539.
- Martin W, Müller M (1998).** The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392 (6671): 37-41.
- Martin FW, Müller M (2007).** Origin of mitochondria and hydrogenosomes. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Marvin-Sikkema FD, Pedro Gomes TM, Grivet JP, Gottschal JC, Prins RA (1993).** Characterization of hydrogenosomes and their role in glucose metabolism of *Neocallimastix* sp. L2. *Arch Microbiol* 160(5):388-396.
- McGlynn SE, Ruebush SS, Naumov A, Nagy LE, Dubini A, King PW, Broderick JB, Posewitz MC, Peters JW (2007).** In vitro activation of [FeFe] hydrogenase: new insights into hydrogenase maturation. *J Biol Inorg Chem* 12(4):443-447.
- McGlynn SE, Shepard EM, Winslow MA, Naumov AV, Duschene KS, Posewitz MC, Broderick WE, Broderick JB, Peters JW (2008).** HydF as a scaffold protein in [FeFe]-hydrogenase H-cluster biosynthesis. *FEBS Lett* 582(15):2183-2187.
- McLaughlin GL, Saz HJ, deBruyn BS (1986).** Purification and properties of an acyl CoA transferase from *Ascaris suum* muscle mitochondria. *Comp Biochem Physiol B* 83(3):523-527.
- Mehlhorn H, Piekarski G (1995).** Grundriß der Parasitenkunde. Gustav Fischer
- Meingassner JG, Mieth H, Czok R, Lindmark DG, Müller M (1978).** Assay conditions and the demonstration of nitroimidazole resistance in *Trichomonas foetus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 13 (1): 1-3.
- Meingassner JG, Thurner J (1979).** Strain of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole and other 5-nitroimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother* 15: 254-257. Verlag Stuttgart, 4. Auflage.
- Mentel M, Zimorski V, Haferkamp P, Martin W, Henze K (2008).** Protein import into hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* involves both N-terminal and internal targeting signals - a case study of thioredoxin reductases. *Eukaryot Cell* 7(10):1750-1757.
- Meyer J (2000).** Clostridial iron-sulphur proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2(1):9-14.
- Meyer J (2007).** [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. *Cell Mol Life Sci* 64(9):1063-1084.

- Meyer J, Kelley BC, Vignais PM. (1978).** Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in photosynthetic bacteria. *Biochimie* 60(3):245-260.
- Müller M (1973).** Biochemical cytology of trichomonad flagellates. I. Subcellular localization of hydrolases, dehydrogenases, and catalase in *Tritrichomonas foetus*. *J Cell Biol* 57:453-474.
- Müller M (1986).** Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. *Biochem Pharmacol* 35 (1): 37-41.
- Müller M. (1993).** The hydrogenosome. *J Gen Microbiol* 139(12):2879-2889.
- Müller M, Meingassner JG, Miller WA, Ledger WJ (1980).** Three metronidazole resistant strains of *Trichomonas vaginalis* from the United States. *Am J Obstet Gynecol* 138: 808-812.
- Nakai Y, Nakai M, Hayashi H, Kagamiyama H (2001).** Nuclear localization of yeast Nfs1p is required for cell survival. *J Biol Chem* 276(11):8314-8820.
- Nicolet Y, Lemon BJ, Fontecilla-Camps JC, Peters JW (2000).** A novel FeS cluster in Fe-only hydrogenases. *Trends Biochem Sci* 25(3):138-143.
- Nicolet Y, Piras C, Legrand P, Hatchikian CE, Fontecilla-Camps JC (1999).** *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure* 7(1):13-23.
- Nielsen MH (1975).** The ultrastructure of *Trichomonas vaginalis* donne before and after transfer from vaginal secretion to Diamonds medium. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 83(6): 581-589.
- Nixon JE, Field J, McArthur AG, Sogin ML, Yarlett N, Loftus BJ, Samuelson J (2003).** Iron-dependent hydrogenases of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: activity of the recombinant entamoebic enzyme and evidence for lateral gene transfer. *Biol Bull* 204(1):1-9.
- Ogata H, Mizoguchi Y, Mizuno N, Miki K, Adachi S, Yasuoka N, Yagi T, Yamauchi O, Hirota S, Higuchi Y (2002).** Structural studies of the carbon monoxide complex of [NiFe]hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F: suggestion for the initial activation site for dihydrogen. *J Am Chem Soc* 124(39):11628-11635.
- Odom JM, Peck HD (1984).** Hydrogenase, electron-transfer proteins, and energy coupling in the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio*. *Annu Rev Microbiol* 38:551-592.
- Packard L, Cullingford W (1978).** Stoichiometry of H<sub>2</sub> production *in vitro* chloroplast, ferredoxin, hydrogenase reconstituted system. *Z Naturforsch* 33:113-115.
- Page-Sharp M, Behm CA, Smith GD (1996).** *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*: the pattern of inactivation of hydrogenase activity by oxygen and activities of catalase and ascorbate peroxidase. *Microbiology* 142:207-211.
- Paschos A, Glass RS, Böck A (2001).** Carbamoylphosphate requirement for synthesis of the active center of [NiFe]-hydrogenases. *FEBS Lett* 488(1-2):9-12.

- Peters JW, Lanzilotta WN, Lemon BJ, Seefeldt LC (1998).** X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* 282(5395):1853-1858. Erratum in: *Science* 283(5398):35; *Science* 283(5410):2102.
- Peters JW, Szilagyi RK, Naumov A, Douglas T (2006).** A radical solution for the biosynthesis of the H-cluster of hydrogenase. *FEBS Lett* 580(2):363-367.
- Posewitz MC, King PW, Smolinski SL, Zhang L, Seibert M, Ghirardi ML (2004).** Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *J Biol Chem* 279(24):25711-25720.
- Przybyla AE, Robbins J, Menon N, Peck HD Jr. (1992).** Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev* 8(2):109-135.
- Pütz S (2007).** Charakterisierung des hydrogenosomalen Proteoms aus dem mikroaerophilen Humanparasiten *Trichomonas vaginalis*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Pütz S, Dolezal P, Gelius-Dietrich G, Bohacova L, Tachezy J, Henze K (2006).** Fe-hydrogenase maturases in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell* 5(3):579-586.
- Reeves RE, Warren LG, Susskind B, Lo HS (1977).** An energy-conserving pyruvate-to-acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. Pyruvate synthase and a new acetate thiokinase. *J Biol Chem* 252(2):726-731.
- Rendón-Maldonado JG, Espinosa-Cantellano M, González-Robles A, Martínez-Palomo A (1998).** *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Exp Parasitol* 89(2):241-250.
- Rosnowsky S (2004).** Heterologe Expression und Charakterisierung einer Hydrogenase/CytochromP450 Reduktase Fusion aus *Trichomonas vaginalis*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Rubach JK, Brazzolotto X, Gaillard J, Fontecave M (2005).** Biochemical characterization of the HydE and HydG iron-only hydrogenase maturation enzymes from *Thermatoga maritima*. *FEBS Lett* 579(22):5055-5060.
- Saitou N, Nei M (1987).** The NEIGHBOR-JOINING method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4):406-425.
- Sanchez LB, Müller M (1996).** Purification and characterization of the acetate forming enzyme, acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) from the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *FEBS Lett* 378(3):240-244.
- Sawers RG, Ballantine SP, Boxer DH (1985).** Differential expression of hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli* K-12: evidence for a third isoenzyme. *J Bacteriol* 164(3):1324-1331.

- Saz HJ, deBruyn B, de Mata Z (1996).** Acyl-CoA transferase activities in homogenates of *Fasciola hepatica* adults. *J Parasitol* 82(5):694-696.
- Schnackenberg J, Schulz R, Senger H (1993).** Characterization and purification of a hydrogenase from the eukaryotic green alga *Scenedesmus obliquus*. *FEBS Lett.* 327(1):21-24.
- Schwebke JR, Burgess D (2004).** Trichomoniasis. *Clin Microbiol Rev* 17(4):794-803.
- Söhling B, Gottschalk G (1996).** Molecular analysis of the anaerobic succinate degradation pathway in *Clostridium kluyveri*. *J Bacteriol* 178(3):871-880.
- Sofia HJ, Chen G, Hetzler BG, Reyes-Spindola JF, Miller NE (2001).** Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res* 29(5):1097-1106.
- Sorgenfrei O, Linder D, Karas M, Klein A (1993).** A novel very small subunit of a selenium containing [NiFe] hydrogenase of *Methanococcus voltae* is postranslationally processed by cleavage at a defined position. *Eur J Biochem* 213(3):1355-1358.
- Steinbüchel A, Müller M (1986).** Anaerobic pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Mol Biochem Parasitol* 20(1):57-65.
- Stephenson M, Stickland LH (1931).** Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme. *Biochem J* 25(1):205-214.
- Sutak R, Dolezal P, Fiumera HL, Hrdy I, Dancis A, Delgadillo-Correa M, Johnson PJ, Müller M, Tachezy J (2004).** Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(28):10368-10373.
- Tachezy J, Sánchez LB, Müller M (2001).** 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* 18(10):1919-1928.
- Tachezy J, Dolezal P (2007).** Iron-sulfur proteins and iron-sulfur cluster assembly in organisms with hydrogenosomes and mitosomes. In: Origin of mitochondria and hydrogenosomes. Martin und Müller (eds.), Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Thauer RK, Klein AR, Hartmann GC (1996).** Reactions with molecular hydrogen in microorganisms: Evidence for a purely organic hydrogenation catalyst. *Chem Rev* 96(7):3031-3042.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994).** CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Tielens AG, Rotte C, van Hellemond JJ, Martin W (2002).** Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem Sci* 27(11):564-572.

- Tielens AG, van Hellemond JJ (1998).** The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* 1365(1-2):71-78.
- van der Giezen M, Sjollem KA, Artz RR, Alkema W, Prins RA (1997).** Hydrogenosomes in the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* have a double membrane but lack an associated organelle genome. *FEBS Lett* 408(2):147-150.
- van Hellemond JJ, Opperdoes FR, Tielens AG (1998).** Trypanosomatidae produce acetate via a mitochondrial acetate:succinate CoA transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(6):3036-3041.
- van Hellemond JJ, van der Klei A, van Weelden SW, Tielens AG (2003).** Biochemical and evolutionary aspects of anaerobically functioning mitochondria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1429):205-215.
- van Hoek AHAM, Akhmanova AS, Huynen MA, Hackstein JHP (2000).** A mitochondrial ancestry of the hydrogenosomes of *Nyctotherus ovalis*. *Mol Biol Evol* 17:202-206.
- van Weelden S (2005).** Bioenergetics of parasitic protozoa. Diplomarbeit. Department of Biochemistry and Cell Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Niederlande.
- Vignais PM, Billoud B (2007).** Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem Rev* 107(10):4206-4272.
- Vignais PM, Billoud B, Meyer J (2001).** Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev* 25(4):455-501.
- Vignais PM, Colbeau A, Willison JC, Jouanneau Y (1985).** Hydrogenase, nitrogenase, and hydrogen metabolism in the photosynthetic bacteria. *Adv Microb Physiol* 26 :155-234.
- Vignais PM, Henry MF, Sim E, Kell DB (1981).** The electron transport system and hydrogenase of *Paracoccus denitrificans*. *Curr Top Bioenerg* 12:115-196.
- Volbeda A, Charon MH, Piras C, Hatchikian EC, Frey M, Fontecilla-Camps JC (1995).** Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* 373(6515):580-587.
- Volbeda A, Garcin E, Piras C, de Lacey AL, Fernandez VM, Hatchikian EC, Frey M, Fontecilla-Camps JC (1996).** Structure of the [NiFe] hydrogenase active site: evidence for biologically uncommon Fe ligands. *J Am Chem Soc* 118: 12989-12996.
- Weinstock H, Berman S, Cates W Jr (2004).** Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health* 36(1):6-10.
- Witkowski A, Witkowska HE, Smith S (1994).** Reengineering the specificity of a serine active-site enzyme. Two active-site mutations convert a hydrolase to a transferase. *J Biol Chem* 269(1):379-383.

- 
- World Health Organization, Geneva (2001).** Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. <http://www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/006.htm>
- Winkler M, Heil B, Heil B, Happe T (2002).** Isolation and molecular characterization of the [Fe]-hydrogenase from the unicellular green alga *Chlorella fusca*. *Biochim Biophys Acta* 1576(3):330-334.
- Wu LF, Mandrand MA (1993).** Microbial hydrogenases: primary structure, classification, signatures and phylogeny. *FEMS Microbiol Rev* 10(3-4):243-269.
- Yarlett N, Hackstein JHP (2005).** Hydrogenosomes: one organelle, multiple origins. *BioScience* 55:657-667.
- Yarlett N, Orpin CG, Munn EA, Yarlett NC, Greenwood CA (1986).** Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochem J* 236(3):729-739.
- Yuh YS, Liu JY, Shaio MF (1997).** Chromosome number of *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol* 83(3):551-553. Erratum in: *J Parasitol* 1998. 84(1):28.
- Zirngibl C, Van Dongen W, Schwörer B, Von Büнау R, Richter M, Klein A, Thauer RK (1992).** H<sub>2</sub>-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea. *Eur J Biochem* 208(2):511-520.
- Zubáková Z, Cimbůrek Z, Tachezy J (2008).** Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *Mol Biochem Parasitol* 161(1):49-54.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, Ampere
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
ds DNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m * s <sup>-2</sup> )
g	Gramm
g/l	Gramm pro Liter
G	Guanin
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
IRD700/800	Infrarotfarbstoffe; Anregung bei 700 bzw. 800 nm
k	kilo- (10 <sup>3</sup> )
kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
m	milli- (10 <sup>-3</sup> )
μ	mikro- (10 <sup>-6</sup> )
M	molar (mol/l)
MBq	Megabequerel
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
n	nano- (10 <sup>-9</sup> )
NAD(P) <sup>+</sup>	Nicotinamadenindinucleotid(phosphat); oxidierte Form

---

NAD(P)H	Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat); reduzierte Form
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	scheinbare optische Dichte
ORF	„ <i>open reading frame</i> “, offenes Leseraster
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
s	Sekunde
s.	siehe
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur von dsDNA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
V	Volt
Vol.	Volumen
vgl.	vergleiche
v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent

---

## **Danke...**

an Frau Dr. Katrin Henze für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Vielen herzlichen Dank für die zahlreichen Diskussionen und Hilfestellungen auch wenn es aus räumlicher Distanz nicht immer einfach war.

an Herrn Prof. Martin für die Aufnahme in seinem Institut, für seine Diskussionsbereitschaft und das Interesse an dieser Arbeit und für die Übernahme des Korreferats.

an Claudia Kirberich und Margarete Stracke für ihre unermüdliche Unterstützung und Hilfe bei allen technischen Fragen des Laboralltags.

an das gesamte Institut für die nette Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank geht an Sara Tucci für die vielen Diskussionen und Gespräche nicht nur an der Laborbank. Danke auch an die ehemaligen Mit-Doktoranden Ursula Müller-Theissen und Simone Pütz, die die Anfänge dieser Arbeit mitverfolgt haben und mir auch heute noch freundschaftlich mit Rat und Tat zur Seite stehen. Herzlichen Dank an Verena Zimorski für's Korrekturlesen dieser Arbeit und an Christian Esser und Ovidiu Popa für die Hilfe beim Kampf gegen die Tücken von „word“. Danke an Britta Delvos für die angenehme Büroatmosphäre.

an Marianne Limpert und Doris Matthée für ihre hilfsbereite Unterstützung bei der Erledigung aller bürokratischen Vorgänge.

an meine Familie und Schwiegerfamilie für die seelische Unterstützung durch alle „Hochs und Tiefs“ während der letzten Jahre.

an Jens Schweitzer - Du hast mit dem größten Anteil an Motivation und liebevoller Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Jetzt ist es endlich geschafft!!

---

---

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

A handwritten signature in blue ink that reads "Silke Roswandy". The signature is written in a cursive style with a long, sweeping tail on the final letter.

Düsseldorf, 06.11.2008

---