

Kompartimentierung des Energiestoffwechsels  
und Proteinimport in Hydrogenosomen  
bei *Trichomonas vaginalis*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Verena Zimorski

aus Oberhausen

März 2010

---

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

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

Erstgutachter: Professor Dr. William Martin  
Zweitgutachterin: Privatdozentin Dr. Katrin Henze

Tag der mündlichen Prüfung: 29. April 2010

---

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

## **Publikationen**

**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* 7:1750-1757.

## **Tagungsbeiträge**

**Zimorski, V., Mentel, M., Pereira-Bras, X., Martin, W., Henze, K.** (2008) Targeting signals in hydrogenosomal proteins. SFB TR1: "Endosymbiosis: From Prokaryotes to Eukaryotic Organelles", München/Martinsried, Deutschland. Posterpräsentation.

**Martin, W., Henze, K., Zimorski, V., Mentel, M.** (2009) Targeting signals in hydrogenosomal matrix proteins. SFB TR1, Marburg, Deutschland. Posterpräsentation.

**Martin, W., Henze, K., Zimorski, V., Major, P.** (2009) N-terminal targeting signals in hydrogenosomal matrix proteins. SFB TR1, Marburg, Deutschland. Posterpräsentation.

**Martin, W., Henze, K., Zimorski, V., Cheung, K. M., Hoffmann, K.** (2009) Internal targeting signals in hydrogenosomal matrix proteins. SFB TR1, Marburg, Deutschland. Posterpräsentation.

**Mentel, M., Zimorski, V., Major, P., Hoffmann, K., Haferkamp, P., Martin, W., Henze, K.** (2009) Protein import into hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* involves both N-terminal and internal targeting signals – a case study of thioredoxin reductases. XIII International Congress of Protistology, Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brasilien. Posterpräsentation.



**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
3.1 Die Kompartimentierung der Eukaryoten .....	5
3.2 Die Glykolyse und ihre Assoziation an Mitochondrien .....	8
3.3 Die Glykolyse bei <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	10
3.4 Die Verwandtschaft von Mitochondrien und Hydrogenosomen .....	14
3.5 Der Proteinimport in Hydrogenosomen .....	17
3.6 Ziele dieser Dissertation .....	22
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
4.1 Chemikalien .....	27
4.2 Enzyme .....	27
4.3 Antibiotika .....	27
4.4 Oligonukleotide .....	27
4.5 Reagenzsätze .....	28
4.6 Vektoren .....	29
4.7 Kulturen .....	29
4.7.1 <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	29
4.7.2 Anzucht von <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	29
4.7.3 Dauerkulturen von <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	30
4.7.4 Transformation von <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	30
4.7.5 Isolation von Hydrogenosomen aus <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	31
4.7.6 Immunofluoreszenz-Mikroskopie .....	32
4.7.7 <i>Escherichia coli</i> .....	33

4.7.8	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	33
4.8	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	33
4.8.1	Isolation genomischer DNA aus <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	34
4.8.2	Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	34
4.8.3	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ...	35
4.8.3.1	PCR .....	35
4.8.3.2	nestedPCR .....	35
4.8.3.3	Overlap extension PCR .....	36
4.8.4	Herstellung von Vektorkonstrukten mittels Rekombinationen .....	38
4.8.5	Sequenzierung von DNA-Fragmenten .....	39
4.9	Arbeiten mit Proteinen .....	40
4.9.1	Extraktion von Membranproteinen aus Hydrogenosomen .....	40
4.9.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	40
4.9.3	Elektrophoretische Trennung von Proteinen (SDS-PAGE) .....	40
4.9.4	Färben von Polyacrylamidgelen .....	41
4.9.5	Western Transfer .....	41
4.9.6	Immunodetektion von Proteinen .....	41
4.9.7	Messen enzymatischer Aktivitäten .....	42
4.10	Bioinformatische Methoden .....	42
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>45</b>
5.1	Lokalisation der glykolytischen Enzyme in Zellen von <i>Trichomonas vaginalis</i> ...	45
5.1.1	Herstellung von Expressionsvektoren für die homologe Expression glykolytischer Enzyme in <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	45
5.1.1.1	Isolation genomischer DNA aus <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	45
5.1.1.2	Amplifikation der glykolytischen Enzyme .....	46
5.1.1.3	Amplifikation des di-Hämagglutinins .....	47
5.1.1.4	Herstellung der Expressionsvektoren mittels Rekombinationen .....	48
5.1.2	Homologe Expression in <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	48

---

5.1.2.1	Transformation von <i>Trichomonas vaginalis</i> mittels Elektroporation	48
5.1.2.2	Ermittlung von Markerenzymaktivitäten – Reinheitsbestimmungen	49
5.1.3	Lokalisationsstudien mittels Western Blot Analysen	50
5.1.3.1	Elektrophoretische Trennung von Proteinen (SDS-PAGE)	51
5.1.3.2	Immunodetektion von Proteinen im Western Blot	52
5.1.4	Lokalisationsstudien mittels Immunofluoreszenz	54
5.1.5	Isolation der hydrogenosomalen Membranen aus Phosphofruktokinase exprimierenden Zellen von <i>Trichomonas vaginalis</i>	57
5.1.6	Messungen der Phosphofruktokinase-Aktivität	57
5.1.7	Sequenzvergleiche der Phosphofruktokinasen aus <i>Trichomonas vaginalis</i>	59
5.1.8	Phylogenetische Analyse der Phosphofruktokinasen aus <i>Trichomonas vaginalis</i>	61
5.2	Interne Targetingsignale hydrogenosomaler Matrixproteine	63
5.2.1	Einteilung der auszutauschenden Sequenzblöcke	63
5.2.2	Reziproker Austausch der Sequenzblöcke zwischen TrxRh1- $\Delta$ 10 und TrxRh2 mittels Overlap extension PCR	65
5.2.3	Herstellung der Expressionsvektoren mittels Rekombinationen	67
5.2.4	Homologe Expression der Thioredoxin Reduktase Konstrukte in <i>Trichomonas vaginalis</i>	67
5.2.4.1	Transformation von <i>Trichomonas vaginalis</i> mittels Elektroporation	67
5.2.4.2	Lokalisationsstudien mittels Western Blot Analysen	68
5.2.4.3	Elektrophoretische Trennung von Proteinen (SDS-PAGE)	69
5.2.4.4	Western Blot mit Immunodetektion des HA-Tags	69
5.2.5	Untersuchungen zu Sekundärstrukturen in den Thioredoxin Reduktasen TrxRh2 und TrxRh1- $\Delta$ 10	71
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
6.1	Der evolutive Ursprung der Glykolyse	76

6.2	Lokalisation der Glykolyse in Zellen von <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	78
6.2.1	Phosphofruktokinase .....	83
6.2.2	Phosphofruktokinase – assoziiert mit der hydrogenosomalen Membran? .....	84
6.3	Proteinimport in Organellen .....	89
6.3.1	Diversität von Targetingsignalen .....	91
6.3.2	Targetingsignale hydrogenosomaler Proteine .....	92
6.3.3	Interne Targetingsignale hydrogenosomaler Matrixproteine .....	95
6.4	Der Proteinimportmechanismus bei Hydrogenosomen .....	102
6.5	Ausblick auf weiterführende Experimente .....	107
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>113</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>119</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>123</b>

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Mit der Evolution der Eukaryoten entwickelten sich aus einem Eubakterium, das von einem Wirt aufgenommen wurde, der unter der einfachsten Annahme ein Archaeobakterium war, die vielfältigen Formen der energieliefernden Organellen eukaryotischer Zellen: aerobe Mitochondrien, anaerobe Mitochondrien, Mitosomen oder Hydrogenosomen. Neben der sich entwickelnden Kompartimentierung des Stoffwechsels zeichnete sich während der Evolution dieser Organellen eine Entwicklung des Organellengenoms ab, die bis zum teilweisen oder völligen Verlust führte; die Gene wurden im Zuge des endosymbiontischen Gentransfers an den Zellkern des Wirts übertragen oder gingen verloren. Während Mitochondrien noch Teile des Genoms besitzen, fehlt es den Mitosomen und den meisten Hydrogenosomen. Der endosymbiontische Gentransfer bedingte die Entwicklung einer Proteinimportmaschinerie, damit im Cytosol exprimierte Proteine in die Organellen importiert werden können. Für den Transport der hydrogenosomalen Proteine in das Organell tragen die Präproteine in der Regel N-terminale Verlängerungen, die dem reifen Protein nach dem Import fehlen. Neueste Untersuchungen zeigen, dass die N-terminalen Extensionen für einen Import in die Hydrogenosomen nicht zwingend erforderlich sind. Es wurden Anzeichen dafür festgestellt, dass es auch interne Signale für den Import geben könnte. In dieser Dissertation wurde die Existenz eines internen Transitsignals in der Thioredoxin Reduktase TrxRh2, einem Matrixprotein der Hydrogenosomen des mikroaerophilen Protisten *Trichomonas vaginalis*, nachgewiesen. Dieses Ergebnis resultierte aus homologer Expression von Fusionsproteinen, die aus reziprok ausgetauschten Blöcken zweier sich im Importverhalten unterscheidenden Thioredoxin Reduktasen bestanden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das interne Signal – wie bei der mitochondrialen Adenylat Kinase – mit Sekundärstrukturen (amphipathische  $\alpha$ -Helices) verbunden sein könnte.

Der Stoffwechsel der Eukaryoten ist durch die Existenz mehrerer Zellräume kompartimentiert und somit einer Strukturierung unterlegen. Auch die Enzyme, die

an Stoffwechselwegen im Cytosol der Zelle beteiligt sind, diffundieren nicht frei in der Zelle, sondern strukturieren sich zu einem Netzwerk. Bei diesem Prozess entstehen auch Interaktionen mit Makromolekülen und Bindungen an Zellstrukturen, wie Membranen. Eine Proteomanalyse der Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* zeigte die Möglichkeit auf, dass die typischerweise im Cytosol der Zelle lokalisierten glykolytischen Enzyme mit diesen Organellen assoziiert sein könnten. Zur subzellulären Lokalisation der Glykolyse in dem Protisten wurden in dieser Dissertation acht der zehn glykolytischen Enzyme erfolgreich homolog exprimiert. Bei diesen Experimenten konnte ausschließlich für die Phosphofruktokinase eine Lokalisation in der hydrogenosomalen Membranfraktion nachgewiesen werden. Der experimentelle Nachweis, ob dieses Enzym eine aktive Phosphofruktokinase ist, die an der Glykolyse beteiligt ist, steht noch aus. Es konnte in dieser Dissertation keine Assoziation der Glykolyse mit den Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* festgestellt werden, wie sie für aerobe Mitochondrien einiger Organismen beschrieben worden ist.

## 2. SUMMARY

During the evolution of eukaryotes a eubacterium came to reside within a host, under the simplest assumption an archaeobacterium. That symbiont gave rise to various forms of energy producing organelles of eukaryotic cells: aerobic mitochondria, anaerobic mitochondria, mitosomes or hydrogenosomes. In addition to the compartmentalisation of the metabolism, the organellar genome was relinquished in parts or completely during the evolution; genes were either lost or transferred into the host nucleus. While mitochondria still contain genomes, mitosomes and the most hydrogenosomes lost them completely. Endosymbiotic genetransfer required the development of a protein import machinery, so that proteins expressed in the cytosol could be imported into the organelles. Hydrogenosomal preproteins usually carry an N-terminal extension for transport into the organelles, which is absent from the mature protein. Recent studies revealed that these N-terminal extensions are not always necessary for import. There is evidence that internal targeting signals in the mature protein could exist. In this dissertation an internal targeting signal in the hydrogenosomal matrix protein thioredoxin reductase TrxRh2 from the microaerophilic protist *Trichomonas vaginalis* was identified. This was done by homologous expression of fusion proteins with reciprocally exchanged sequence blocks from two highly conserved thioredoxin reductases, which differ in their import behaviour. The results suggest, that this internal targeting signal might be associated with secondary structures (amphipathic  $\alpha$ -helices) as in the mitochondrial adenylat kinase from yeast.

The metabolism of eukaryotes is compartmentalised. The enzymes that are involved in cytosolic metabolic pathways do not freely diffuse in the cell, but are arranged in a network as well. They interact with macromolecules and are bound to cell structures (membranes). A proteomic survey of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes demonstrated the possibility, that the typically cytosolic localised glycolytic enzymes could be associated with these organelles. In this thesis eight of ten

glycolytic enzymes of this protist were homologously expressed to study the sub-cellular localisation of the glycolytic pathway. Only the phosphofructokinase was localised in the hydrogenosomal membrane fraction. Whether this enzyme is an active phosphofructokinase and involved in glycolysis, remains to be proven experimentally. Association of the enzymes of the glycolytic pathway with hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*, as it was described for mitochondria before, was not observed.

### 3. EINLEITUNG

#### 3.1 Die Kompartimentierung der Eukaryoten

Die rezenten Lebensformen lassen sich in zwei verschiedenartige Gruppen einteilen: Prokaryoten (Bakterien und Archaeobakterien) und Eukaryoten (alle übrigen Lebewesen). Die wichtigsten Unterscheidungsmerkmale zwischen diesen beiden Arten von Leben sind offenbar (Doolittle, 1998): Im Wesentlichen besitzen alle Eukaryoten einen membranumgebenen Zellkern, ein komplexes Endomembransystem und ein Cytoskelett, Prokaryoten hingegen nicht. Zahlreiche Merkmale, die exklusiv den Eukaryoten zugeordnet wurden, sind jedoch auch in Prokaryoten entdeckt worden: Bei einigen Bakterien wurde von einem Zellkern berichtet (Fuerst und Webb, 1991), bei anderen von einer cytoskelett-ähnlichen Struktur (Margolin, 1998); manche Prokaryoten besitzen ein lineares Chromosom (Baril *et al.*, 1989), Introns (Ferat und Michel, 1993), einen Genregulationsmechanismus, der dem der Eukaryoten vergleichbar erscheint (Errington, 1993), membrangebundene Strukturen (Komeili *et al.*, 2006; Seufferheld *et al.*, 2003; 2004) oder mehrere Chromosomensätze (Battista, 1997). Obwohl es so scheint, als ob Prokaryoten viele der Merkmale komplexer Zellen entwickelten, gibt es mindestens zwei verschiedene Merkmale, welche die Eukaryoten charakterisieren: energieproduzierende Organellen, d.h. Kompartimentierung des Energiemetabolismus, und Endocytose (Vellai und Vida, 1999).

Mit einigen Ausnahmen (Abbott und Boraston, 2008; Geyer und Helms, 2006; Davies und Whittenbury, 1970), ist die metabolische Kompartimentierung ein Attribut, das spezifisch für Eukaryoten gilt. Sie basiert auf dem endosymbiontischen Ursprung der Chloroplasten und Mitochondrien (Mereschkowsky, 1905; Wallin, 1927). Chloroplasten waren einst freilebende Cyanobakterien und unterliefen eine evolutionäre Transformation zum metabolischen Kompartiment der Photosynthese innerhalb der Eukaryoten (Douglas, 1998; Delwiche, 1999; McFadden und van Dooren, 2004; Matsuzaki *et al.*, 2004; Archibald, 2006; Gould *et al.*, 2008; Lane und Archibald, 2008; Kleine *et al.*, 2009). Mitochondrien waren einst freilebende Proteo-

bakterien und wurden im Laufe der Evolution zum metabolischen Kompartiment des sauerstoff-abhängigen und sauerstoff-unabhängigen Abbaus von Pyruvat innerhalb der Eukaryoten (Martin und Müller, 1998; Tielens *et al.*, 2002; Embley *et al.*, 2003; Embley und Martin, 2006; van der Giezen, 2009). Beide Organellen behielten ihre eigene DNA, aber beide Genome sind im Verhältnis ihrer heutigen freilebenden Verwandten reduziert (Martin *et al.*, 2002; Archibald, 2006; Deusch *et al.*, 2008; Martin, 2010). Plastidäre Genome besitzen zwischen 20 und 200 Gene; Mitochondrien besitzen zwischen 3 und 63 Gene (Timmis *et al.*, 2004) oder sie verloren ihr Genom gänzlich, wie es bei Mitosomen (Tovar *et al.*, 2003; van der Giezen und Tovar, 2005) und den meisten Hydrogenosomen festgestellt wurde (van der Giezen, 2009). Die einzige bislang bekannte Ausnahme von Hydrogenosomen, die ein Genom enthalten, ist bei dem anaeroben Ciliaten *Nyctotherus ovalis* zu finden (Akhmanova *et al.*, 1998). Während die Organellen auf der einen Seite weniger Gene besitzen als ihre Vorläufer, ist die Anzahl verschiedener Proteine im Organell annähernd gleich der der freilebenden Vorläufer (Richly und Leister, 2004). Eine Erklärung für den Unterschied zwischen der Anzahl der Gene und der Anzahl der Proteine ist der endosymbiontische Gentransfer (Martin *et al.*, 1993): Im Zuge der Evolution übertrugen die Vorfahren der Organellen viele Gene an den Kern des Wirts. Eine Hypothese ist, dass die Gene jedoch nicht transferiert, sondern kopiert wurden (Allen, 2003), da eine funktionelle Kopie solange im Organell verbleiben mußte, bis eine nukleare Kopie entstand, dessen Produkt sich gegen die Organellenkopie behaupten konnte. Sofort nach dem Gentransfer könnte dann eine Phase begonnen haben, in der die Kernkopie des Gens unter stark reduzierten funktionellen Zwängen Mutationen anhäufte, bis das kodierte Produkt exprimiert, durch vorhandene Signale in das Organell importiert und schließlich selektiert wurde. Die Organellenkopie ging verloren. Dieser Prozeß setzt die Entwicklung eines Proteinimportapparats voraus, der den Transport des Proteins in das Organell ermöglichte (Allen, 2003; Dolezal, 2006).

Durch den endosymbiontischen Ursprung der Organellen ist der eukaryotische Stoffwechsel kompartimentiert. Im Gegensatz zu den Prokaryoten ist bei Eukaryoten

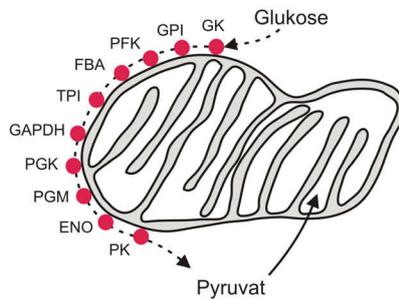
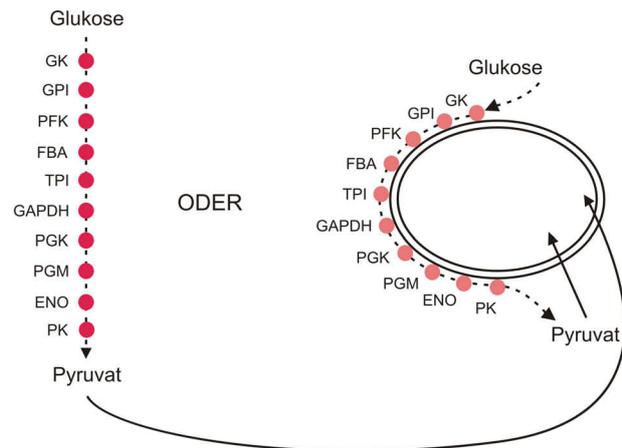
der Zellinnenraum unterteilt: Das Cytoplasma besteht aus dem Cytosol und enthält das Cytoskelett und die Organellen. Eine vorherrschende Vorstellung von Proteinen im Cytosol der Zelle behauptet, dass diese gelöst vorliegen (Kopac, 1938). Experimente in den 1960er Jahren ließen jedoch Zweifel an dieser Annahme aufkommen (Srere, 2000). Während einer Zentrifugation intakter *Neurospora*- oder *Euglena*-Zellen lagerten sich die Zellbestandteile in Schichten an, die annähernd den Zellkomponenten entsprachen, die durch eine differentielle Zentrifugation von Zellhomogenaten erhalten werden (z.B. Zellkerne, Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum und Cytosol). Überraschenderweise befanden sich keine Enzyme des zentralen metabolischen Stoffwechsels in der Schicht, die als Cytosol identifiziert wurde. Eine Folgerung dieser Experimente war, dass die meisten Proteine *in situ* an große Strukturen (Makromoleküle) gebunden sind (Zalokar, 1960; Kempner und Miller, 1968). Weiterführende Arbeiten zeigten zudem die Existenz eines organisierten Netzwerks innerhalb der Zellen (Schliwa *et al.*, 1981, 1987), das als Gerüst für die Zellorganisation dienen könnte (Penman, 1995). Enzyme komplexer Stoffwechselwege sind oft aneinander gebunden (Clegg und Jackson, 1990; Negrutskii und Deutscher, 1991; Ovadi und Srere, 2000). Eine Konsequenz dieser Verbindung ist, dass die Prozesse in der Zelle effizienter ablaufen als durch gelöste Enzyme *in vitro* (Hudder *et al.*, 2003). Die Interaktionen zwischen Enzymen untereinander und zwischen Enzymen und subzellulären Strukturen haben deswegen eine hohe biologische Signifikanz (Keleti *et al.*, 1977; Clarke und Masters, 1976; Masters, 1978; Yu und Steck, 1975).

Die Anzahl der Hinweise, dass Enzyme des Cytosols mit dem zellulären Grundgerüst interagieren geht weit in die Literatur zurück (Masters und Wilson, 1981). Es gibt diverse Experimente, die die Assoziation sogenannter löslicher Enzyme des Cytosols mit einer Vielfalt an zellulären Komponenten in verschiedenen Zelltypen zeigen (Amberson *et al.*, 1965; Arnold und Pette, 1968; Ginsburg und Stadtman, 1970; Masters, 1978; Wilson, 1972). Green *et al.* konnten 1965 demonstrieren, dass isolierte Membranfraktionen der Erythrocyten und der Hefe fähig sind, den vollständigen

Reaktionsablauf der Glykolyse zu katalysieren. Die spezifische Aktivität war sogar höher als in den jeweiligen Gesamtzellextrakten. In den darauffolgenden Jahren wurden die Studien zur Assoziation des glykolytischen Stoffwechsels an Membranen durch detaillierte Versuche mit einzelnen glykolytischen Enzymen intensiviert. Dabei wurden die Bindung der Hexokinase an Mitochondrien (Rose und Warme, 1967; Wilson, 1972, 1973), die Assoziation zwischen der Laktat Dehydrogenase und zellulären Strukturen (Ehmann und Hultin, 1973), die Bindung der Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase, der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase, der Pyruvat Kinase und der Phosphofruktokinase an partikuläre Elemente verschiedener Gewebe beobachtet (Arnold und Pette, 1968; Yu und Steck, 1975; Masters, 1978). Einige glykolytische Enzyme sind folglich *in vivo* nicht frei diffusionsfähig (Clegg und Jackson, 1988), sondern mit Zellstrukturen assoziiert (Humphreys und Masters, 1986).

### **3.2 Die Glykolyse und ihre Assoziation an Mitochondrien**

Bei Eukaryoten werden die glykolytischen Enzyme üblicherweise als im Cytosol lokalisierte Enzyme betrachtet (Brandina *et al.*, 2006), die jedoch mit Zellstrukturen assoziiert sind (Humphrey und Masters, 1986). Ausnahmen gibt es bei einigen Protisten, wie z.B. *Chlamydomonas reinhardtii*, wo die glykolytische Aktivität in den Chloroplasten liegt (Hannaert *et al.*, 2000) oder bei den Kinetoplastida, bei denen Teile der Glykolyse in Glykosomen lokalisiert sein können (Opperdoes und Borst, 1997; Hannaert und Michels, 1994; Clayton und Michels, 1996). Für andere Eukaryoten wurde beschrieben, dass einige, wenn nicht sogar alle, der im Cytosol der Zelle lokalisierten glykolytischen Enzyme mit den Mitochondrien assoziiert sind (Abbildung 3.1; Eldan und Blum, 1973; Srere, 1987; Giegé *et al.*, 2003; Brandina *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007).

a *Arabidopsis thaliana*b *Trichomonas vaginalis*

**Abbildung 3.1:** Subzelluläre Lokalisation der Glykolyse. a: Assoziation der Glykolyse an Mitochondrien in Zellen von *Arabidopsis thaliana*. Die Assoziation der Glykolyse an Mitochondrien wurde auch für die Hefe und *Tetrahymena* beschrieben (Conger *et al.*, 1971; Eldan und Blum, 1973; Srere, 1987; Giegé *et al.*, 2003; Brandina *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007). b: Subzelluläre Lokalisation der Glykolyse in Zellen von *Trichomonas vaginalis*. Der glykolytische Stoffwechsel könnte mit den Hydrogenosomen assoziiert sein oder nicht. ENO: Enolase; FBA: Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase; GK: Glukokinase; GPI: Glukose-6-phosphat Isomerase; PFK: Phosphofruktokinase; PGK: 3-Phosphoglycerat Kinase; PGM: Phosphoglycerat Mutase; PK: Pyruvat Kinase; TPI: Triosephosphat Isomerase.

Brandina *et al.* (2006) zeigten durch enzymatische Assays, dass bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* alle glykolytischen Enzyme mit den Mitochondrien assoziiert sind. Desweiteren wurde durch Isolation der Mitochondrien und spätere Koimmunopräzipitation die Enolase als ein Protein beschrieben, das in einem großen makromolekularen Komplex an die Organellen assoziiert ist (Brandina *et al.*, 2006).

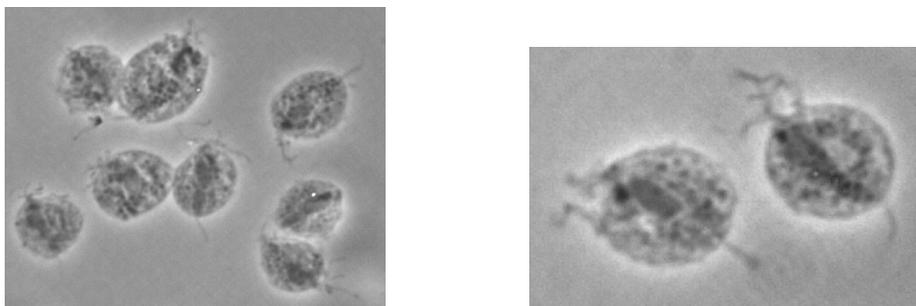
Auch bei *Arabidopsis thaliana* wurden sieben der zehn glykolytischen Enzyme in mitochondrialen Fraktionen detektiert (Giegé *et al.*, 2003). Vier von ihnen (Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase, Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase, Phosphoglycerat Mutase und Enolase) wurden in der Fraktion, die aus dem mitochondrialen Intermembranraums und der äußeren mitochondrialen Membran bestand, gefunden. Untersuchungen ergaben, dass diese Enzyme mit der äußeren mitochondrialen Membran assoziiert sind. Die Lokalisation der Glykolyse an den Mitochondrien garantiert die Bereitstellung von Pyruvat und somit auch die mitochondriale Atmungskette (Giegé *et al.*, 2003).

Bei dem Ciliaten *Tetrahymena pyriformis* scheint etwa die Hälfte aller Moleküle der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (Conger *et al.*, 1971) und 75% der Phosphofruktokinase-Moleküle (Eldan *et al.*, 1973) an Mitochondrien gebunden zu sein (Srere, 1987; Smith *et al.*, 2007).

Aufgrund des gemeinsamen  $\alpha$ -proteobakteriellen Vorläufers der Mitochondrien und Hydrogenosomen (Esser *et al.*, 2004; Embley, 2006) könnte auch eine Assoziation glykolytischer Enzyme mit Hydrogenosomen bestehen (Abbildung 3.1). Erste Anzeichen dafür lieferten die Charakterisierungen der hydrogenosomalen Proteome von *Trichomonas vaginalis* (Pütz, 2007; Henze, 2008) und *Neocallimastix frontalis* (Gelius-Dietrich, 2008), bei denen glykolytische Enzyme gefunden wurden.

### 3.3 Die Glykolyse bei *Trichomonas vaginalis*

Der mikroaerophile Flagellat *Trichomonas vaginalis* (Abbildung 3.2) ist der Erreger der häufigsten, nicht-viralen, sexuell übertragenen Krankheit bei Menschen, der Trichomoniasis (Pterin *et al.*, 1998; Schwebke und Burgess, 2004; Miller *et al.*, 2008). Er besitzt Hydrogenosomen, eine anaerobe Form der Mitochondrien (Lindmark und Müller, 1973). Hydrogenosomen sind, wie die Mitochondrien aerober Eukaryoten, am Energiestoffwechsel beteiligt.



**Abbildung 3.2:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von *Trichomonas vaginalis*. Die Zellen haben eine Größe von ungefähr 10  $\mu\text{m}$  (Petrin *et al.*, 1998).

Statt durch oxidative Phosphorylierung, wie bei aeroben Mitochondrien, wird die Energie in den Hydrogenosomen über Substratkettenphosphorylierung synthe-

tisiert (Müller, 1993). Ausgangspunkt des Energiestoffwechsels in den Hydrogenosomen ist Pyruvat, das durch die Glykolyse im Cytosol gebildet und dann ins Hydrogenosom transportiert wird. Durch Studien von *Trichomonas vaginalis*-Zell-extrakten konnte die Existenz aller glykolytischen Enzyme des Embden-Meyerhof-Parnas-Typs in der Zelle nachgewiesen werden (Wirtschafter und Jahn, 1956; Wirtschafter *et al.*, 1956; Wellerson und Kupferberg, 1962; Arese und Cappuccinelli, 1974). Weitere Analysen zeigten, dass einige glykolytische Enzyme in *Trichomonas vaginalis* signifikante Unterschiede in ihrer Biochemie und ihrer Sequenz zu ihren Analogen in Vertebraten und Pilzen aufweisen (Keeling und Palmer, 2000; Mertens *et al.*, 1992; Mertens und Müller, 1990, Viscogliosi und Müller, 1998).

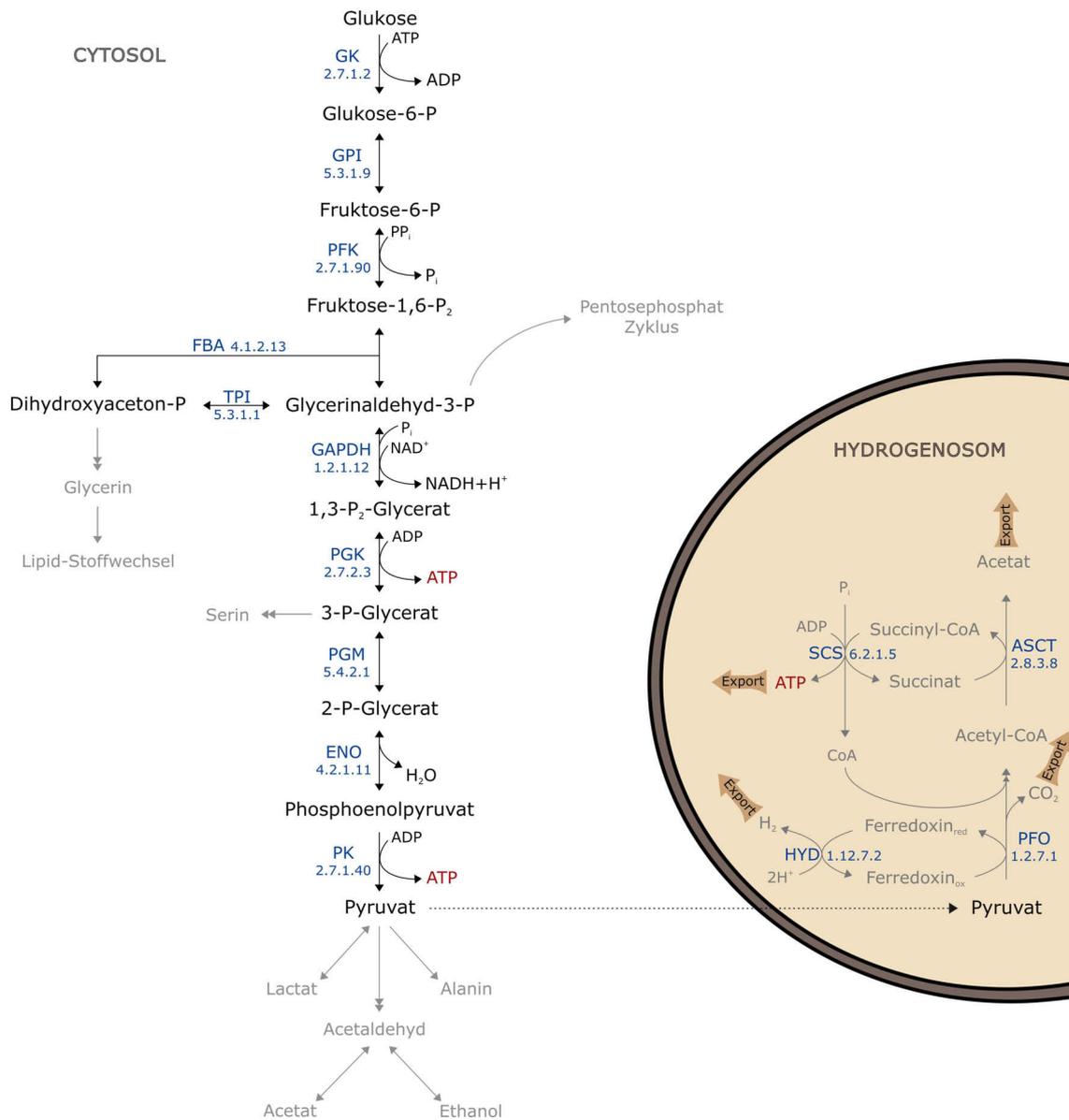
Die Glykolyse (Embden-Meyerhof-Parnas-Typ) beschreibt den oxidativen Abbau von Glukose zu Pyruvat in einer von zehn Enzymen katalysierten Reaktionsfolge (Abbildung 3.3). Die Ausgangssubstanz Glukose wird zuerst durch Phosphorylierung in ihre aktive Form – Glukose-6-phosphat – überführt (Wilson, 2003). Diese Reaktion katalysiert die Hexokinase (HK; EC 2.7.1.1) bzw. Glukokinase (GK; EC 2.7.1.2). Die Hexokinase phosphoryliert Hexosen, Glukokinasen wirken spezifisch auf Glukose und besitzen eine geringere Aktivität als Hexokinasen (Kawai *et al.*, 2005). Glukose-6-phosphat wird dann durch die Glukose-6-phosphat Isomerase (GPI; EC 5.3.1.9) zu Fruktose-6-phosphat reversibel isomerisiert (Achari *et al.*, 1981). Fruktose-6-phosphat wird anschließend am C<sub>1</sub>-Atom durch die Phosphofruktokinase (PFK; EC 2.7.1.90) irreversibel zu Fruktose-1,6-bisphosphat phosphoryliert. Diese Reaktion ist exergon, da für die Knüpfung einer Esterbindung eine energiereiche Anhydridbindung des ATPs gespalten wird (Mansour, 1972). Durch die Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBA; EC 4.1.2.13) wird Fruktose-1,6-bisphosphat in zwei Triosen gespalten (Aldolspaltung): Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat (Rutter, 1964).

Die Aldotriose (Glycerinaldehyd-3-phosphat) und die Ketotriose (Dihydroxyacetonphosphat) stehen über eine gemeinsame Enolform miteinander im Gleichgewicht. Das Gleichgewicht liegt weit auf der Seite des Dihydroxyacetonphosphats.

Zum weiteren Ablauf der Glykolyse wird jedoch Glycerinaldehyd-3-phosphat benötigt. Die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts auf die Seite des Glycerinaldehyd-3-phosphats wird durch die Triosephosphat Isomerase (TPI; EC 5.3.1.1) beschleunigt (Meyerhof und Kießling, 1935; Rieder und Rose, 1959). Glycerinaldehyd-3-phosphat wird durch die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH; EC 1.2.1.12) am C<sub>1</sub>-Atom oxidiert. NAD<sup>+</sup> dient dabei sowohl als Wasserstoffakzeptor als auch als allosterischer Aktivator. Gleichzeitig wird anorganisches Phosphat in einer energiereichen Säureanhydridbindung fixiert (Substratkettenphosphorylierung). Es entsteht 1,3-Bisphosphoglycerat, das am C<sub>1</sub>-Atom eine energiereiche Säureanhydridbindung und am C<sub>3</sub>-Atom eine energiearme Phosphorsäureesterbindung enthält.

Der Phosphatrest, der energiereich am C<sub>1</sub>-Atom gebunden ist, kann direkt auf ADP übertragen werden (Substratkettenphosphorylierung) (Harrigan und Trentham, 1973; Duggleby und Dennis, 1974; Fothergill-Gilmore und Michels, 1993). Durch das Enzym 3-Phosphoglycerat Kinase (PGK; EC 2.7.2.3) entsteht 3-Phosphoglycerat (Bücher, 1947; Fothergill-Gilmore und Michels, 1993). Der Phosphatrest am C<sub>3</sub>-Atom (Phosphorsäureester) muss, bevor er auf ADP übertragen werden kann, aktiviert werden. Dies geschieht durch Umlagerung des Phosphats (Phosphoglycerat Mutase; PGM; EC 5.4.2.1) und anschließende Wasserabspaltung (Enolase; ENO; EC 4.2.1.11) (Lohman und Meyerhof, 1934; Fothergill-Gilmore und Watson, 1989). Die Energie wird bei der Wasserabspaltung so umverteilt, dass am C<sub>2</sub>-Atom eine energiereiche Bindung entsteht. Es entsteht Phosphoenolpyruvat, ein energiereicher Enolester, der seinen Phosphatrest auf ADP übertragen kann. Phosphoenolpyruvat wird unter ATP-Bildung durch die Pyruvat Kinase (PK; EC 2.7.1.40) irreversibel in Pyruvat umgewandelt (Bücher und Pfeleiderer, 1955).

Pyruvat ist Ausgangsstoff für die weiteren energieliefernden Stoffwechselreaktionen, die Substratkettenphosphorylierung, in einer anaeroben Form der Mitochondrien, den Hydrogenosomen.



**Abbildung 3.3:** Schematische Darstellung der Glykolyse und damit zusammenhängender Stoffwechselreaktionen, wie die Energiegewinnung in den Hydrogenosomen, bei *Trichomonas vaginalis*. ADP: Adenosindiphosphat; ASCT: Acetat:Succinat-CoA Transferase; ATP: Adenosin-triphosphat; CoA: Coenzym A; ENO: Enolase; FBA: Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase; GK: Glukokinase; GPI: Glukose-6-phosphat Isomerase; HYD: Hydrogenase; NAD<sup>+</sup>: Nicotinamidadenindinukleotid; P: Phosphat; P<sub>2</sub>: Bisphosphat; PFK: Phosphofruktokinase; PFO: Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase; PGK: 3-Phosphoglycerat Kinase; PGM: Phosphoglycerat Mutase; Pi: anorganisches Phosphat; PK: Pyruvat Kinase; SCS: Succinyl-CoA Synthetase; TPI: Triosephosphat Isomerase. Die EC-Nummern (engl. *enzyme commission*) der Enzyme sind nach den Enzymnamen angegeben.

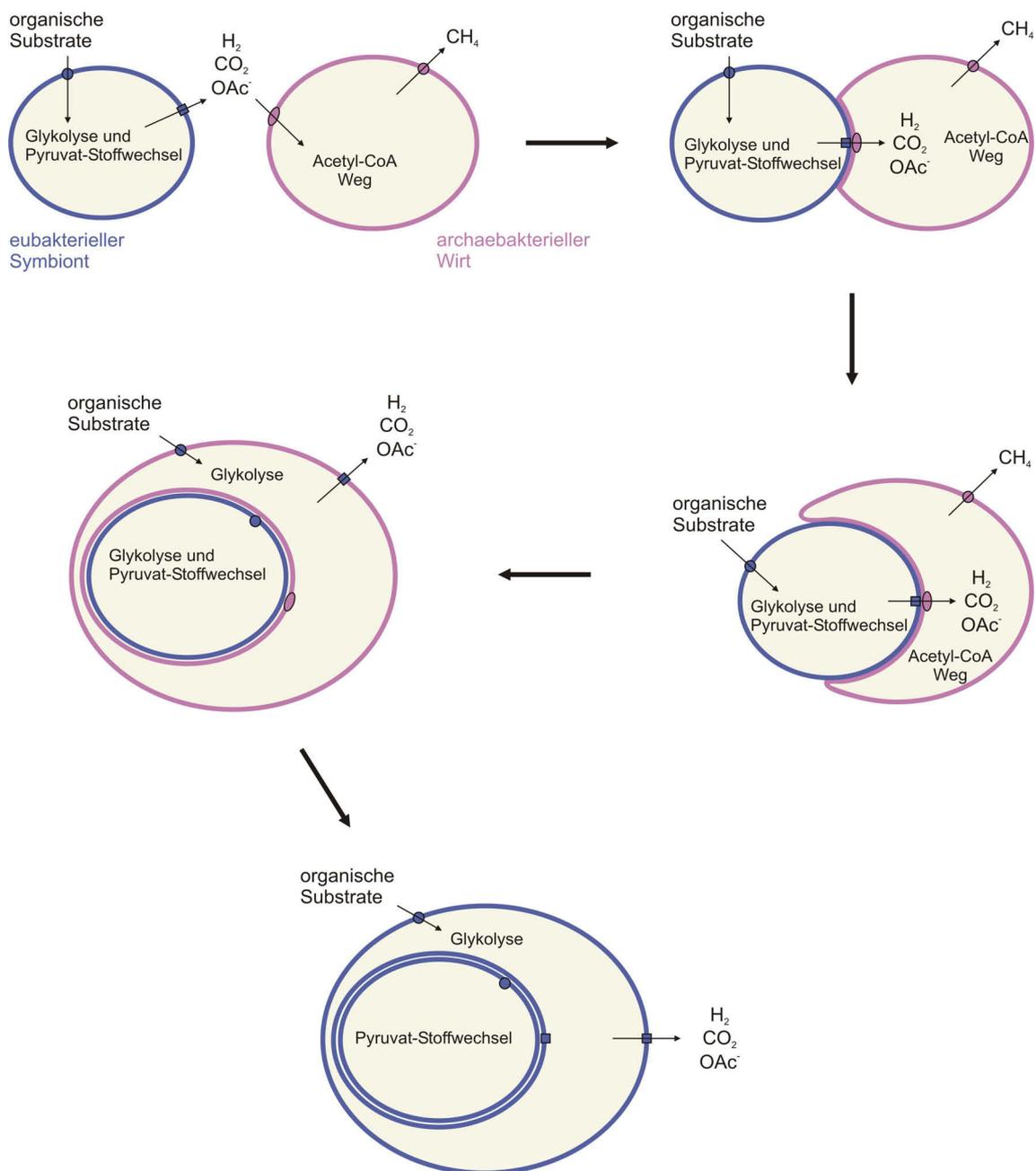
### **3.4 Die Verwandtschaft von Mitochondrien und Hydrogenosomen**

Neben den klassischen, sauerstoffabhängigen Organellen existieren noch andere Formen der Mitochondrien, die ATP ohne den Verbrauch von Sauerstoff bilden können: die anaeroben Mitochondrien, die andere terminale Elektronenakzeptoren als Sauerstoff nutzen können (Tielens *et al.*, 2002) und die Hydrogenosomen, anaerobe Mitochondrien, die ATP durch Substratkettenphosphorylierung ohne Protonengradienten produzieren (Martin und Müller, 1998). Ein stark reduziertes Mitochondrium ist das Mitosom (Tovar *et al.*, 1999), das hauptsächlich an der Synthese von Eisen-Schwefel-Proteinen beteiligt ist (Lill und Mühlenhoff, 2005; Tachezy *et al.*, 2001).

Die Entstehung dieser Organellen wird durch ein einziges Endosymbioseereignis beschrieben (Martin und Müller, 1998; Müller und Martin, 2007). Es wird vermutet, das Endosymbioseereignis resultiere aus einer intrazellulären Vereinigung zweier Organismen. Über den Wirt gibt es kontroverse Aussagen: einige Hypothesen geben einen ursprünglichen, amitochondriaten Eukaryoten an (Moreira und Lopez-Garcia, 1998; Cavalier-Smith, 2002, 2004; Lake *et al.*, 2005; Margulis *et al.*, 2005); andere vermuten einen archaebakteriellen Wirt und stellen die Entstehung der Eukaryoten als Folge der Endosymbiose dar (Martin und Müller, 1998; Searcy, 1992; Vellai *et al.*, 1998). Während der Wirt den Symbionten ernährt, wird es dem Wirt durch verwertbare Stoffwechselprodukte des Symbionten ermöglicht, neue Lebensräume zu besiedeln. So ziehen beide Organismen ihren Nutzen aus der Endosymbiose. Eine Hypothese, die dieses Szenario der Entstehung der energieliefernden Organellen beschreibt, ist die von Martin und Müller 1998 postulierte Wasserstoffhypothese (Abbildung 3.4). Sie erklärt die Entstehung der Kompartimentierung des Energiestoffwechsels durch die Aufnahme eines freilebenden, anaeroben Eubakteriums durch ein anaerobes, autotrophes Archaebakterium. Durch lateralen Gentransfer im Laufe der Evolution erhielt das Archaebakterium vom Symbionten insbesondere Gene der Transporter für organische Substrate und Gene der Glykolyse und umschloss ihn dann vollständig. Dadurch war der Wirt nicht mehr vom Wasserstoff, den der Sym-

biont produzierte, abhängig, sondern ist seither selbst fähig, seinen Energiebedarf durch die nun mögliche Glykolyse zu decken. Wasserstoff, Kohlendioxid und Acetat werden als Abfallprodukte ausgeschieden. Die Vorgänge beim Energiestoffwechsel in der Zelle sind nun räumlich getrennt: sie laufen in unterschiedlichen Kompartimenten ab. Die Glykolyse findet bis zur Bildung von Pyruvat im Cytosol (Wirt) statt, während die weitere Fermentation von Pyruvat im Symbionten stattfindet.

Die Wasserstoffhypothese postuliert somit für Hydrogenosomen (wasserstoffproduzierende, anaerobe Mitochondrien), Mitochondrien (aerobe und anaerobe) und Mitosomen einen gemeinsamen Vorfahren: das vom Methanbildner aufgenommene Eubakterium. Im Zuge der Entwicklung zu den verschiedenen Arten der Mitochondrien hat ein gravierender Genverlust stattgefunden, der größtenteils auf den endosymbiotischen Gentransfer in den Zellkern zurückzuführen ist, aber auch auf den gänzlichen Verlust von nicht mehr relevanten Genen (Henze, 2008). Bei Hydrogenosomen ging der Genverlust sogar soweit, dass alle Gene in den Zellkern transferiert wurden (Clemens und Johnson, 2000; van der Giezen *et al.*, 1997b). Bislang sind nur für den Ciliaten *Nyctotherus ovalis* Hydrogenosomen mit eigenem Genom beschrieben worden (Akhmanova *et al.*, 1998; Boxma *et al.*, 2005). Sämtliche hydrogenosomalen Proteine werden deswegen im Zellkern kodiert, im Cytosol synthetisiert und dann in das Organell importiert.



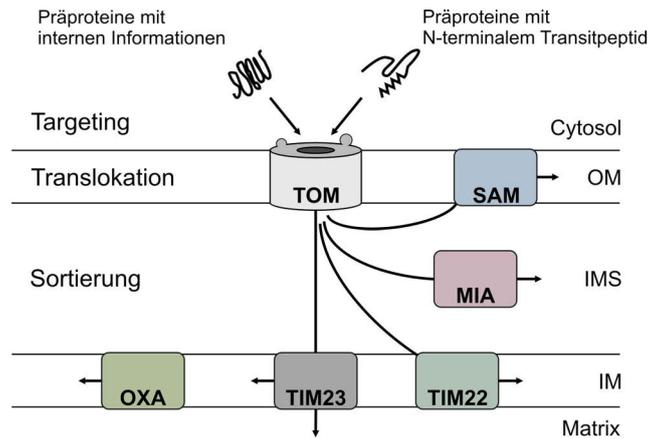
**Abbildung 3.4:** Modell zur möglichen Entstehung der Mitochondrien. Bei der von Martin und Müller 1998 postulierten Wasserstoffhypothese handelt es sich bei dem Wirt um ein methanogenes Archaeobakterium. In der letzten Phase ist der Austausch der Zusammensetzung der Membranen von archaebakteriellen Lipiden (Glycerolester aus Isoprenen) durch eubakterielle Lipide (Glycerolester aus Fettsäuren) bedingt durch den Verlust des Lipidbiosynthesewegs des Wirts gezeigt (Martin und Müller, 1998).  
Abbildung verändert nach Martin und Müller (1998) und Martin und Russell (2003).

### 3.5 Der Proteinimport in Hydrogenosomen

Zuvor im Cytosol der Zelle synthetisierte hydrogenosomale Matrixproteine müssen über beide Membranen in das Organell transportiert werden. Bislang wurde davon ausgegangen, dass der Proteinimport bei Hydrogenosomen dem der Mitochondrien ähnelt (Bradley *et al.*, 1997). Gewöhnlich werden Proteine, die für den Transport in ein Mitochondrium bestimmt sind, innerhalb weniger Minuten nach der Freisetzung vom Polyribosom aus dem Cytosol aufgenommen (Alberts *et al.*, 1997). Dabei werden die Proteine von bestimmten Proteinimportkomplexen an den Organellenmembranen anhand eines Transitpeptids erkannt (Roise und Schatz, 1988). Diese Komplexe werden bei Mitochondrien als TOM (*translocase in the outer mitochondrial membrane*) und TIM (*translocase in the inner mitochondrial membrane*) bezeichnet (Neupert, 1997; Rassow und Pfanner, 2000). Auch bei Chloroplasten gibt es für den Proteinimport Translokatoren in den Membranen; sie werden durch TOC und TIC abgekürzt (Jarvis und Soll, 2001).

Mitochondriale Proteine werden durch verschiedene Import- und Sortierungswege zum Ort ihrer submitochondrialen Lokalisation geleitet (Abbildung 3.5). Das Transitpeptid und ein Teil der angrenzenden Polypeptidkette werden beim Proteinimport in die Mitochondrien zuerst in den TOM-Komplex inseriert, der aus mehreren Präprotein-Rezeptoren, sieben verschiedenen Untereinheiten und einem Kanal („*general import pore*“ (GIP)) besteht (Wiedemann *et al.*, 2004). Dabei binden Präproteine mit internen Importsignalen an andere TOM-Komponenten als Präproteine mit N-terminalen Transitpeptiden. Danach folgen die Präproteine verschiedenen Sortierungswegen (Abbildung 3.5). Proteine der äußeren mitochondrialen Membran werden über eine Sortierungs- und Assemblierungsmaschinerie (SAM-Komplex) in diese integriert (Chacinska *et al.*, 2009). Proteine des Intermembranraums werden über den MIA-Komplex (*mitochondrial intermembrane space assembly*) in den Raum zwischen den Membranen geleitet und gefaltet (Stojanovski *et al.*, 2008). Proteine der inneren Membran und mitochondriale Matrixproteine werden zum TIM-Komplex geleitet, der einen Kanal über die innere Membran formt und mit dem Hitzeschock-

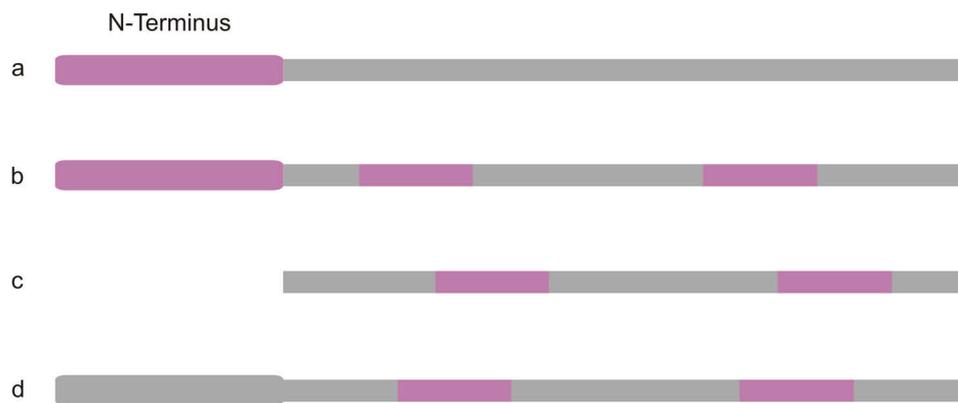
protein mtHsp70 der mitochondrialen Matrix kooperiert (Rassow und Pfanner, 2000). Mitochondriale Membranproteine der inneren Membran werden über TIM22 durch einen bislang unbekanntem Mechanismus in die Lipidphase entlassen und dann assembliert (Chacinska *et al.*, 2009). Auch der OXA-Komplex (*insertase/export machinery of the inner mitochondrial membrane*) ist für die Insertion mitochondrialer Proteine in die innere Membran verantwortlich. Er interagiert jedoch mit mitochondrialen Ribosomen und inseriert folgedessen mitochondrial kodierte Proteine (Hell *et al.*, 1998; Nargang *et al.*, 2002). Mitochondriale Matrixproteine werden durch TIM23 in diese entlassen. Den Kern des mit der Präsequenz-Translokase (TIM23) assoziierten Motors (PAM) stellt das molekulare Chaperon mtHsp70 dar, welcher den Abschluss des Proteintransports in die Matrix steuert (Wiedemann *et al.*, 2004). Es bindet an die Polypeptidkette und hält sie in einem ungefalteten Zustand, in dem sie in die Matrix entlassen wird (Glaser *et al.*, 1998). Erst dort wird das Protein gefaltet (Hartl *et al.*, 1989). Für diesen Transport ist ein elektrochemischer Gradient über die innere Membran notwendig (Rassow und Pfanner, 2000; Chacinska *et al.*, 2009). Die Vorläufer vieler hydrophober Proteine der inneren Membran (z.B. Metabolitransporter) folgen einem anderen Importweg, der über Chaperon-ähnliche Komponenten des Intermembranraums und die Proteinimportmaschinerie der inneren Membran (TIM22) verläuft (Wiedemann *et al.*, 2004).



**Abbildung 3.5:** Import- und Sortierungswege für die korrekte submitochondriale Lokalisation mitochondrialer Proteine. Die Mehrheit mitochondrialer Präproteine wird an cytosolischen Ribosomen synthetisiert und nachfolgend in die Organellen importiert: Der TOM-Komplex (*translocase in the outer mitochondrial membrane*) ist der Komplex, durch den der Eintritt in der Regel erfolgt. Danach folgen die Präproteine verschiedenen Sortierungswegen. Vorläufer der  $\beta$ -Barrel-Proteine der äußeren Membran (OM, *outer membrane*) werden durch den TOM-Komplex in den Intermembranraum (IMS, *intermembrane space*) geführt und für ihre Einsortierung und Integration in die äußere mitochondriale Membran zum SAM-Komplex (*sorting and assembly machinery*) weitergeleitet. Kleine Cystein-reiche Vorläuferproteine des Intermembranraums gelangen durch den TOM-Komplex in die Mitochondrien und werden dann durch den MIA-Komplex (*mitochondrial intermembrane space assembly*) redox-reguliert in den Intermembranraum importiert. Präproteine mit N-terminalen Transitpeptiden werden von TIM23 (*translocase in the inner mitochondrial membrane*) in Abhängigkeit eines Membranpotentials einsortiert. Die komplette Translokation in die mitochondriale Matrix ist ein ATP-getriebener Prozess. Nach dem Eintritt in die Matrix wird das N-terminale Transitpeptid entfernt und das Protein zur Funktionalität gefaltet. Hydrophobe Proteine (Carrier) der inneren Membran (IM, *inner membrane*), die interne Transitpeptide besitzen, werden zum TIM22-Komplex geleitet und von diesem in die innere Membran inseriert (Membranpotential-abhängig). Der OXA-Komplex (*insertase/export machinery of the inner membrane*) interagiert mit mitochondrialen Ribosomen und inseriert im Mitochondrium gebildete Proteine in die innere mitochondriale Membran. Abbildung verändert nach Chacinska *et al.* (2009).

Transitpeptide haben für den Proteinimport in Organellen eine zentrale Bedeutung. Sie bestimmen, dass ein Protein in ein Organell importiert werden soll und ermöglichen den Import, indem sie von den Translokatoren in der Organellenmembran erkannt werden. Die Annahme, dass der Proteinimport bei Hydrogenosomen dem der Mitochondrien ähnelt, ließen den durch Experimente überprüften Schluss zu, dass bei hydrogenosomalen Matrixproteinen ein N-terminales Transitpeptid dem Protein eine Importkompetenz ermöglicht (Bradley *et al.*, 1997). Mit vorhandenem N-Terminus wurde Ferredoxin in die Hydrogenosomen importiert, ohne diesen kam es nicht zu einem Import. Einen weiteren Hinweis darauf,

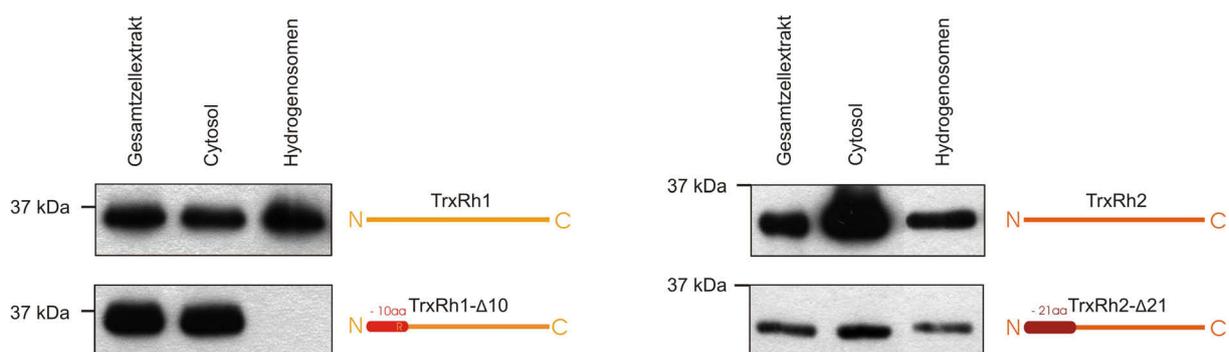
dass sich die Proteinimporte bei Mitochondrien und Hydrogenosomen ähneln, brachte die heterologe Expression des hydrogenosomalen Malat Enzyms von *Neocallimastix frontalis* in der Hefe *Hansenula polymorpha*. Das Enzym konnte mit einem 27 Aminosäuren langen Transitpeptid in die Mitochondrien importiert werden; ohne Transitsequenz verblieb das Protein im Cytosol (van der Giezen *et al.*, 1998).



**Abbildung 3.6:** Vermutete Lokalisation von Importsignalen hydrogenosomaler Matrixproteine von *Trichomonas vaginalis*. Importsignale sind violett dargestellt. a: Sie können entweder nur im N-Terminus des Proteins liegen (Ferredoxin; Bradley *et al.*, 1997), b: sowohl im N-Terminus als auch im internen Bereich des reifen Proteins vorhanden sein (SCS $\alpha$ ; Lahti *et al.*, 1994; Mentel *et al.*, 2008), c: intern lokalisiert sein, da es keinen verlängerten N-Terminus gibt (Thioredoxin Reduktase TrxRh2; Mentel *et al.*, 2008). d: Bismal noch nicht beobachtet wurde, ob sie trotz eines typischen N-Terminus nur intern vorhanden sein können. Die Anzahl und die Verteilung der internen Signale sind hier nur rein hypothetisch dargestellt.

Mehrere Studien gaben Hinweise darauf, dass es bei hydrogenosomalen Matrixproteinen aus *Trichomonas vaginalis* den klassischen Transitpeptid-Typ (Abbildung 3.6a), ein N-Terminus, der dem Protein eine Importkompetenz verleiht, gibt (Abbildung 3.7; Bradley *et al.*, 1997; van der Giezen *et al.*, 1998; Mentel *et al.*, 2008). Neueste Untersuchungen deuten jedoch auf verschiedene Importsignale sowohl bei hydrogenosomalen Matrixproteinen als auch bei mitochondrialen Proteinen der Membranen und des Intermembranraums hin (Hartl *et al.*, 1998; Rassow und Pfanner, 2000; Schrickler *et al.*, 2002; Mentel *et al.*, 2008). Neben den N-terminalen Transitpeptiden, die nicht immer für einen Import notwendig zu sein scheinen,

könnte es auch interne Signale für den Organellenimport geben. Erste Hinweise darauf lieferte die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der SCS $\alpha$  bei *Trichomonas vaginalis*. Dieses hydrogenosomale Matrixprotein wurde auch nach Deletion der N-terminalen acht Aminosäuren in die Hydrogenosomen transportiert (Abbildung 3.6b; Mentel *et al.*, 2008). Der entfernte N-Terminus wurde in früheren Studien als Transitpeptid identifiziert, das beim Transport durch die Membranen der Hydrogenosomen prozessiert wird (Lahti *et al.*, 1994). Ein prozessierendes Enzym in den Hydrogenosomen – die „*hydrogenosomal processing peptidase*“ (HPP) – wurde erst kürzlich charakterisiert (Brown *et al.*, 2007). Mentel *et al.* konnten 2008 weiterhin zeigen, dass auch bei einer Thioredoxin Reduktase interne Signale vorhanden sein müssen, da diese keinen verlängerten N-Terminus aufweist, aber in den Hydrogenosomen lokalisiert ist (Abbildung 3.6c). Bei einer N-terminalen Verkürzung das Protein, das keinen verlängerten N-Terminus trägt, um 21 Aminosäuren, konnte ebenfalls eine Lokalisation in den Organellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.7; Mentel *et al.*, 2008). Interne Signale für mitochondriale Proteine wurden bisher nur bei Membranproteinen nachgewiesen (Schricker *et al.*, 2002).



**Abbildung 3.7:** Subzelluläre Lokalisation der Thioredoxin Reduktasen TrxRh1 und TrxRh2 sowie der beiden Proteine ohne N-Terminus. Während TrxRh1 ohne N-Terminus nicht mehr in die Hydrogenosomen importiert wird, wird TrxRh2 (das keinen verlängerten N-Terminus aufweist) auch ohne die ersten 21 Aminosäuren in die Hydrogenosomen importiert. Abbildung aus Mentel *et al.* (2008).

Hydrogenosomale N-terminale Transitpeptide sind in der Regel 5 bis 15 Aminosäuren lang (Dyall und Johnson, 2000b). Damit sind sie im Gegensatz zu mitochondrialen Transitpeptiden signifikant kürzer, die eine Länge von 15 bis 85 Aminosäuren haben (von Heijne *et al.*, 1989; Glaser *et al.*, 1998). Ausnahmen gibt es aber auch bei mitochondrialen Proteinen, so wurden z.B. für *Trypanosoma brucei* Transitpeptide beschrieben, die aus 7 bzw. 9 Aminosäuren bestehen (Häusler *et al.*, 1997). Charakteristische Merkmale hydrogenosomaler N-terminaler Transitpeptide sind ein konserviertes Leucin an Position 1 nach dem Startkodon und Arginin an Position 2 oder 3 vor der Prozessierungsstelle. Die Relevanz des Leucins wurde 1997 durch Bradley *et al.* mittels Mutationsversuchen bestätigt. So führte der Austausch gegen Glycin zu einem Verlust der Importkompetenz (Bradley *et al.*, 1997). Hydrogenosomale Transitpeptide zeichnen sich auch durch existente hydrophobe und hydroxylierte Aminosäuren aus. Desweiteren sind sie oft serinreich und haben eine positive Nettoladung (van der Giezen *et al.*, 2003). Für mitochondriale Transitpeptide wurden ähnliche Eigenschaften beschrieben (Hendrick *et al.*, 1989).

Im 2007 publizierte Genom von *Trichomonas vaginalis* sind keine Homologen zu den TOM-Komponenten identifiziert worden. Existente sind jedoch Homologe zu den TIM-Komponenten TIM17 und TIM23 (Carlton *et al.*, 2007). Auch ein Homolog des Protein Import Motors Pam18 der mitochondrialen Matrix konnte gefunden werden (Dolezal *et al.*, 2005). Diese Informationen sind allerdings zur Beschreibung eines Proteinimportmechanismus bei Hydrogenosomen nicht ausreichend.

### **3.6 Ziele dieser Dissertation**

Neben den klassischen aeroben Mitochondrien gibt es noch weitere Formen dieser energieliefernden Organellen: anaerobe Mitochondrien, Mitosomen und Hydrogenosomen. Alle Formen resultieren aus einem gemeinsamen Vorläufer (Bui *et al.*, 1996; Germot *et al.*, 1996; Roger *et al.*, 1996; Martin und Müller, 1998). Der in den Organellen stattfindende Energiestoffwechsel startet bei allen Formen mit Pyruvat,

das bei der Glykolyse gebildet wird und dann zum Ort der Energieproduktion transportiert werden muß (Embden *et al.*, 1993; Fernie *et al.*, 2004). Um den Transportweg des Pyruvats vom Cytosol in das Organell zu verkürzen, gibt es bei aeroben Mitochondrien Anzeichen dafür, dass die glykolytischen Enzyme mit den Mitochondrienmembranen assoziiert sind (Conger *et al.*, 1971; Eldan und Blum, 1973; Srere, 1987; Giegé *et al.*, 2003; Brandina *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007). Erste Hinweise darauf, dass bei Hydrogenosomen des humanen Parasiten *Trichomonas vaginalis* ebenfalls glykolytische Enzyme an den Membranen assoziiert sein könnten, lieferte eine Proteomanalyse der Hydrogenosomen. Dort wurden die glykolytischen Enzyme Enolase und Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase und Homologe zu bakteriellen Phosphofruktokinasen identifiziert (Pütz, 2007; Henze, 2008).

Ziel dieser Dissertation ist es, die intrazelluläre Lokalisation der glykolytischen Enzyme in dem mikroaerophilen Humanparasiten *Trichomonas vaginalis* durch Versuche *in vivo* zu ermitteln. Dazu dienen sowohl molekularbiologische Methoden wie die Amplifikation aller glykolytischen Enzyme aus isolierter genomischer DNA von *Trichomonas vaginalis*, die Herstellung und Vermehrung von Expressionsvektoren und die Transformation von *Trichomonas vaginalis* zur homologen Proteinexpression, als auch proteinbiochemische Methoden, wie die subzelluläre Fraktionierung transformierter Trichomonaden und die Immunodetektion der exprimierten und markierten glykolytischen Enzyme in gelelektrophoretisch getrennten Proteomen der isolierten Fraktionen. Die Ergebnisse der Immunodetektion des Western Blots sollen durch *in situ*-Analysen mittels Immunofluoreszenz untermauert werden. Die Ergebnisse sollen das Auftreten glykolytischer Enzyme bei der Proteomanalyse der Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* bestätigen oder widerlegen. Auch kann eine weitere Gemeinsamkeit oder ein weiterer Unterschied zwischen aeroben Mitochondrien und Hydrogenosomen festgestellt werden.

Nicht nur das für den Energiestoffwechsel benötigte Pyruvat muß in die Hydrogenosomen transportiert werden. Aufgrund der Beobachtung, dass Hydrogenosomen in der Regel kein eigenes Genom besitzen (Turner und Müller, 1983; Clemens

und Johnson, 2000), sondern alle hydrogenosomalen Proteine kernkodiert sind, müssen auch sämtliche hydrogenosomalen Proteine in das Organell transportiert werden. Dazu tragen die Proteine Erkennungssequenzen, sogenannte Transitpeptide, die einen gerichteten Transport ermöglichen und sich am N-Terminus des jeweiligen Proteins befinden (Dyall und Johnson, 2000a,b).

Von den vier 2008 von Mentel *et al.* untersuchten hydrogenosomalen Matrixproteinen bei *Trichomonas vaginalis* (TrxRh1 und TrxRh2 (Abbildung 3.7), SCS $\alpha$ , PFO A) folgte jedoch nur TrxRh1 der als klassisch geltenden Vorhersage, dass der Import in Hydrogenosomen von einem N-terminalen Transitpeptid abhängig ist (Abbildung 3.7). Die anderen hatten entweder keine N-terminale Verlängerung (TrxRh2; Abbildung 3.7), wurden jedoch trotzdem in die Organellen transportiert, oder die N-terminale Verlängerung hatte bei Fusionsproteinen keine hinreichende Importkompetenz (Transitpeptide von SCS $\alpha$  und PFO A mit TrxRh1- $\Delta$ 10) oder die N-terminale Verlängerung war erst gar nicht für den Import erforderlich (SCS $\alpha$ ) (Mentel *et al.*, 2008). Diese Untersuchungen deuten neben den absplittbaren N-terminalen Verlängerungen auch auf interne Signale für den Transport zum Organell hin, die in einigen Fällen sogar für den Import ausreichend sind (Mentel *et al.*, 2008).

Aufgrund des unterschiedlichen Importverhaltens der hydrogenosomalen Thioredoxin Reduktasen (Abbildung, 3.7; Mentel *et al.*, 2008) eignet sich diese Proteinfamilie optimal für die Untersuchung der noch nicht identifizierten internen hydrogenosomalen Targetingsignale. Ein reziproker Austausch von Sequenzblöcken zwischen TrxRh2 (wird importiert) und TrxRh1- $\Delta$ 10 (wird nicht importiert) könnte zur Identifizierung von Importsignal-tragenden Domänen im Protein TrxRh2 führen. Anhand von Overlap extension PCRs kann dieser Austausch vollzogen werden (Wurch *et al.*, 1998). Eine spätere Erstellung von *Trichomonas vaginalis* Expressionsvektoren und eine homologe Expression der konstruierten Proteine, verbunden mit deren intrazellulärer Lokalisation, soll zur Eingrenzung der Lage der Transitsignale führen. So ist die Identifizierung der bislang noch nicht differenziert beschriebenen

internen Targetingsignale bei hydrogenosomalen Matrixproteinen ein weiteres Ziel dieser Dissertation.



## 4. MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien lagen in höchster Reinheit und Qualität (*p.a.*) vor. Puffer, Medien und andere Lösungen wurden mit entmineralisiertem Wasser angesetzt und durch Dampfdruck-Sterilisation autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert.

### 4.2 Enzyme

BP Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen
LR Clonase II Plus Enzyme Mix	Invitrogen
<i>Pfu</i> -Polymerase	Fermentas
Platinum <i>Pfx</i> -Polymerase	Invitrogen
<i>Taq</i> -Polymerase	Eppendorf

### 4.3 Antibiotika

Ampicillin	Sigma
Geneticin (G418)	Roth
Kanamycin	Sigma
Penicillin/Streptomycin-Lösung	MP Biochemicals
Tetracyclin	Fluka

### 4.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

B1_Adapter	5' GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT 3'
B5r_Adapter	5' GGG GAC AAC TTT TGT ATA CAA AGT TG 3'
B5_Adapter	5' GGG GAC AAC TTT GTA TAC AAA AGT TG 3'
B2_Adapter	5' GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT 3'
ENO_B1_FOR	5' AAA AAG CAG GCT ATG AAC GCC GAG CAC GAC GCT 3'
ENO_B5r_REV	5' TAT ACA AAG TTG CTC CTC AGC GAG CAT ATC GTG 3'
FBA_B1_FOR	5' AAA AAG CAG GCT ATG GCT GTT TCA TAC AAG TCA 3'

FBA_B5r_REV	5' TAT ACA AAG TTG GTC GAA AGC ATG GCC TG 3'
GAPDH_B1_FOR	5' AAA AAG CAG GCT ATG GTA GTT AAA GTT GCT ATC 3'
GAPDH_B5r_REV	5' TAT ACA AAG TTG AAG GTA CTT CTC AAG GCG 3'
GK_B1_FOR	5' AAA AAG CAG GCT ATG TTC GAC ATC GAA CTC GT 3'
GK_B5r_REV	5' TAT ACA AAG TTG TTC TGG CTT ATT GGC AAT A 3'
GPI_B1_FOR	5' AAA AAG CAG GCT ATG GCG ACA ACC TAC TAC 3'
GPI_B5r_REV	5' TAT ACA AAG TTG TTT AGA GAA GTC GAA ATA GTA 3'
GPM_B1_FOR	5' AAA AAG CAG GCT ATG ATT TCT TCT GTT TTC CG 3'
GPM_B5r_REV	5' TAT ACA AAG TTG TTC GTT CTT AAT TGA AAC CTT 3'
HA_B5_FOR	5' ATA CAA AAG TTG TAC CCA TAC GAT GTT CCA 3'
HA_B2_REV	5' AGA AAG CTG GGT TTA AGC GTA ATC TGG AAC A 3'
PFK_B1_FOR	5' AAA AAG CAG GCT ATG AAG TCT ATC GGT ATC TTA 3'
PFK_B5r_REV	5' TAT ACA AAG TTG TTG TTC GAG TTG TTT GTA TAA 3'
PGK_B1_FOR	5' AAA AAG CAG GCT ATG TTA GGC AAC AAG CTT ACA 3'
PGK_B5r_REV	5' TAT ACA AAG TTG CTG CTT ATC AGA AAG GGC 3'
PGM_B1_FOR	5' AAA AAG CAG GCT ATG TCT GCT CTT CGC AAA G 3'
PGM_B5r_REV	5' TAT ACA AAG TTG ATC TGT GTG CTT AAG GTT GTA 3'
PK_B1_FOR	5' AAA AAG CAG GCT ATG CAG ACA AAG AGA ACA AAG 3'
PK_B5r_REV	5' TAT ACA AAG TTG GAC GGC TAC ACT AAG GTA 3'
TPI_B1_FOR	5' AAA AAG CAG GCT ATG AGA ACA TTC TTT GTC GGA 3'
TPI_B5r_REV	5' TAT ACA AAG TTG CTT AGA GTG GAC ATT GGA G 3'
TrxR-211.1_B1_FOR	5' AAA AAG CAG GCT ATG TCG GGT GAC ATT GAT T 3'
TrxR-211.2_REV	5' ACG ACC GGT AGC AAC GAT AAC AGA GCG TGC 3'
TrxR-211.3_FOR	5' GCT ACC GGT GCA AAC CC 3'
TrxR-211.4_B5r_REV	5' TAT ACA AAG TTG AAT AGC TTT CAC TTG TGA TAT AT 3'
TrxR-121.4_REV	5' TCT CTT TAC TTC GTT TGT GAC AAC ATT TTT AAC 3'
TrxR-112.3_FOR	5' GAA GTC AGC GAA ATC CCA 3'
TrxR-122.1_B1_FOR	5' AAA AAG CAG GCT ATG TAC TCT ACC GAC GAT 3'
TrxR-122.2_REV	5' AGC ACC TGT TGC AAT AAT AAT TGA ATG AGC TAA ATA 3'
TrxR-122.3_FOR	5' GCA ACA GGT GCT AAG G 3'
TrxR-122.4_B5r_REV	5' TAT ACA AAG TTG GTC CGT TAA ATA TTT CTC AG 3'
TrxR-212.2_REV	5' TGC ACC GGT AGC AAC GAT AAC AGA GCG TGC 3'
TrxR-212.4_REV	5' TTC GCT GAC TTC TCC TGT CTT GGA ATT CTT C 3'
TrxR-212.5_FOR	5' TCC AAG ACA GGA GAA GTC AGC GAA ATC CCA 3'
TrxR-221.3_FOR	5' GAA GTA AAG AGA TAT AAA CTA TC 3'

#### 4.5 Reagenzsätze

Gateway® Vector Conversion System	Invitrogen
MultiSite Gateway® Pro	Invitrogen
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen

## 4.6 Vektoren

Für die Klonierungen von DNA wurden die Vektoren pDONR™ P1-P5r und pDONR™ P5-P2 (Invitrogen) verwendet. Für die homologe Expression in *Trichomonas vaginalis* wurde der Vektor pTagvag2 verwendet, freundlicherweise von Prof. J. Tachezy, Prag, Tschechien, zur Verfügung gestellt (Hrdy *et al.*, 2004). Bei Klonierungen mit dem MultiSite Gateway® Pro-System wurde der Vektor pTagvag2 mit Hilfe des „Gateway® Vector Conversion Systems“ modifiziert; es wurden entsprechende Erkennungsstellen für die Rekombinationen eingefügt.

## 4.7 Kulturen

### 4.7.1 *Trichomonas vaginalis*

*Trichomonas vaginalis* Stamm T1 wurde freundlicherweise von J.-H. Tai vom Institute of Biomedical Sciences, Taipeh in Taiwan zur Verfügung gestellt.

### 4.7.2 Anzucht von *Trichomonas vaginalis*

*Trichomonas vaginalis* wurde in 15 ml-Kulturröhrchen mit 12 ml TYM-Medium pH 6,2 (2,222% (w/v) Tryptose; 1,111% (w/v) Hefeextrakt; 15 mM Maltose; 9,16 mM L-Cystein; 1,25 mM L(+)-Ascorbinsäure; 0,77 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3,86 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Diamond, 1957; Diamond, 1983; Clark und Diamond, 2002) mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem Pferdeserum (Gibco) und 0,71% (v/v) Eisenlösung (1% (w/v) Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O und 0,1% (w/v) 5-Sulfosalicylsäure) bei 37°C angezogen. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung (MP Biomedicals) und 40 µg/ml Tetracyclin hinzugegeben. Die Kulturen wurden nach zwei Tagen in 37°C warmes Medium überimpft. Dabei wurden in 12 ml Medium 100 µl Kultur überführt. Für die Anzucht größerer Mengen wurden 45 ml Medium mit 5 ml Kultur inokuliert. Nach Inkubation über Nacht diente diese Kultur als Starterkultur für 500 ml Medium.

Zum Medium von transformierten *Trichomonas vaginalis*-Zellen wurden zusätzlich 100 µg/ml G418 (Roth) gegeben.

#### **4.7.3 Dauerkulturen von *Trichomonas vaginalis***

Zur Anlage von Dauerkulturen wurden zu 0,5 ml TYM-Medium mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem Pferdeserum, 0,71% (v/v) Eisenlösung (Kapitel 4.7.2) und 20% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO; Roth) in 2 ml Cryo-Röhrchen (Roth) 0,5 ml einer Kultur von *Trichomonas vaginalis* gegeben. Die Röhrchen wurden für 1 bis 2 Stunden auf Eis gelagert, dann für 1 bis 2 Stunden bei -20°C inkubiert und schließlich bei -80°C weggefroren.

Zur erneuten Anzucht wurden die Dauerkulturen rasch im 37°C-Wasserbad aufgetaut und in 12 ml 37°C-warmes Medium mit den entsprechenden Antibiotika gegeben (Kapitel 4.7.2).

#### **4.7.4 Transformation von *Trichomonas vaginalis***

Die Transformation von *Trichomonas vaginalis*-Zellen zur homologen Expression glykolytischer Enzyme oder Thioredoxin Reduktase Konstrukten erfolgte modifiziert nach Land *et al.* (2004) und Delgadillo *et al.* (1997). Es wurden 50 ml einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen *Trichomonas vaginalis* T1-Kultur verwendet. Die Zellen wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 1500×g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde pro Gramm in 1,5 ml eiskaltem TYM-Medium resuspendiert und viermal durch eine 23G-Kanüle gezogen. Die Elektroporation erfolgte mit 300 µl Zellsuspension und 50 µg Plasmid in einer 0,4 cm Elektroporationsküvette (Molecular BioProducts) mit einer Spannung von 350 V und einer Kapazität von 960 µF. Auf den Puls folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurden die Zellen in 12 ml 37°C-warmes TYM-Medium mit Penicillin/Streptomycin (Kapitel 4.7.2) gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 4 Stunden wurden 100 µg/ml G418 zur Selektion hinzugegeben. Nach zwei Tagen wurde die Kultur bei 1000×g und RT für 10 min zentrifugiert und das Pellet in frischem TYM-Medium mit Penicillin/Strepto-

mycin und G418 (Kapitel 4.7.2) aufgenommen. Die weitere Anzucht erfolgte wie im Kapitel 4.7.2 beschrieben mit Zugabe von G418.

#### **4.7.5 Isolation von Hydrogenosomen aus *Trichomonas vaginalis***

Die Isolation von Hydrogenosomen aus *Trichomonas vaginalis* erfolgte nach Bradley *et al.* (1997) mit Modifikationen nach Pütz *et al.* (2005) und Mentel *et al.* (2008).

Alle verwendeten Geräte und Lösungen hatten eine Temperatur von 4°C. Auch die Zentrifugationen wurden bei dieser Temperatur durchgeführt. Das Volumen der *Trichomonas vaginalis*-Kultur zur Isolation der Hydrogenosomen betrug 2 Liter. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000×g für 10 min pelletiert und mit 200 ml SMB-Puffer (250 mM Saccharose; 10 mM MOPS pH 7,2; 10 mM β-Mercaptoethanol) gewaschen. Das Waschen wurde zweimal wiederholt. Das Pellet wurde in 30 ml SMDI-Puffer (250 mM Saccharose; 10 mM MOPS/KOH pH 7,2; 50 µg/ml TLCK; 10 µg/ml Leupeptin; 10 mM DTT) resuspendiert und mit Glasperlen (Ø 400-600 nm) 20 min gemörsert. Der Gesamtzellextrakt entstand, nachdem unlysierte Zellen, Glasperlenüberreste, Membranen und Zellkerne durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 755×g entfernt wurden. Die Organellen wurden durch Zentrifugation bei 7500×g für 10 min vom Cytosol getrennt. Das Organellenpellet wurde in 18,1 ml SMDI-Puffer gelöst und mit demselben Volumen einer 90%igen Percoll-Lösung (90% (v/v) Percoll (GE Healthcare); 10% (v/v) isotonische Saccharose (2,5 M Saccharose; 100 mM MOPS/KOH pH 7,2); 10 mM DTT; 50µg/ml TLCK; 10 µg/ml Leupeptin) versetzt. Der Ansatz wurde luftblasenfrei in Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann Optiseal Polyallomer Tubes) gegeben und im Vertikalrotor VTi50 (Beckmann) bei 66226×g (30000 rpm) für 45 min mit Bremsen bis 800 rpm zentrifugiert (L7-55 Ultrazentrifuge, Beckmann). Die entstandene hydrogenosomale Bande wurde mit einer langen Pasteur-Pipette abgenommen, 1:10 mit SMDI <sup>1</sup>/<sub>10</sub>-Puffer (250 mM Saccharose; 10 mM MOPS/KOH pH 7,2; 5 µg/ml TLCK; 1 µg/ml Leupeptin; 10 mM DTT) verdünnt und für 15 min bei 3000×g zentrifugiert. Die pelletierten Hydrogenosomen wurden in 50 ml SMDI-Puffer resuspendiert und 10 min bei 7500×g zentrifugiert. Die

sedimentierten Organellen wurden luftblasenfrei in 500 µl SMDI-Puffer aufgenommen und auf Eis bei 4°C aufbewahrt. Für langfristige Lagerungen wurden die Hydrogenosomen bei -80°C eingefroren. Die Reinheit der hydrogenosomalen und cytosolischen Fraktion wurde durch Enzymaktivitätstests von Markerenzymen (Kapitel 4.9.7) überprüft.

#### **4.7.6 Immunofluoreszenz-Mikroskopie**

Zur Visualisierung von Immunofluoreszenzen diente die Konfokale Mikroskopie. Dazu wurden *Trichomonas vaginalis*-Zellen verwendet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Ca. 2 ml der Kultur wurden auf einen silanierten Objektträger (Electron Microscopy Sciences) pipettiert und für 15 min bei 37°C in einer anaeroben Kammer inkubiert. Danach wurde der Objektträger bei RT fast vollständig trocknen gelassen. Es folgte die Fixierung der Zellen durch zwei aufeinanderfolgende Inkubationen bei -20°C in Methanol (5 min) und Aceton (5 min). Anschließend wurden die fixierten Zellen 1 h mit Blocking-PBS (0,25% (w/v) Gelatine und 0,25% (w/v) BSA in PBS (8% (w/v) NaCl; 0,2% (w/v) KCl; 1,44% (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4)) bei RT in einer feuchten Kammer behandelt. Danach wurden die Objektträger mit beiden primären Antikörpern (Maus Anti-Hämagglutinin Monoklonaler AK (Sigma) und Kaninchen Anti-ASCT Polyklonaler AK (van Grinsven *et al.*, 2008)) in einer 1:500 Verdünnung in PBS bedeckt und 1 h in der feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min in PBS folgte die Behandlung mit den Zweitantikörpern (Alexa Fluor-488 Esel Anti-Maus (grün fluoreszierend) und Alexa-Fluor-594 Esel Anti-Kaninchen (rot fluoreszierend) (beide von Invitrogen) in einer 1:1000 Verdünnung in PBS für 1 h bei RT in der feuchten Kammer. Es folgte ein 10-minütiges Waschen in PBS, das zweimal wiederholt wurde. Der Objektträger wurde bei RT getrocknet, mit einem Tropfen Vectashield mit DAPI (Vector Laboratories) versehen, mit einem Deckgläschen bedeckt und mit Nagellack luftdicht versiegelt. Bis zur Aufnahme der Bilder an einem LSM 510 Meta Konfokalen Mikroskop (Zeiss) am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-

Universität Düsseldorf unter Verwendung der Software Image Browser (Zeiss) wurden die Objektträger bei 4°C dunkel gelagert.

#### 4.7.7 *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF' (Stratagene)	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> Z_M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ (Bethesda Research Laboratories)	supE44, $\Delta\text{lacU169}$ ( $\Phi 80$ lacZ $\Delta\text{M15}$ ), hsdR17 (rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ), recA1, endA1 gyrA96, thi-1, relA1

#### 4.7.8 Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme auf Fest- und in Flüssigmedium und die Herstellung der Medien erfolgten nach den Standardprotokollen von Sambrook *et al.* (1989). Zur Kontrolle von Transformationen wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit 0,1 mg/ml Ampicillin, 0,1 mM X-Gal und 0,2 mM IPTG kultiviert.

### 4.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Die Arbeiten mit Nukleinsäuren erfolgten, falls nicht anders angegeben, anhand von Standardprotokollen nach Sambrook *et al.* (1989). Folgende Methoden wurden angewendet:

- Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* nach den Herstellerangaben von Macherey-Nagel (NucleoSpin® Plasmid),
- Phenolextraktion und Isopropanol- oder Ethanol-fällung zur Reinigung und Präzipitation gelöster Nukleinsäuren,
- Trennung von Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese,
- Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach Herstellerangaben von Qiagen (QIAquick® Gel Extraction Kit),
- Modifikationen von Vektoren nach Herstellerangaben von Invitrogen (Gateway® Vector Conversion System).

#### **4.8.1 Isolation genomischer DNA aus *Trichomonas vaginalis***

Zur Isolation von genomischer DNA aus *Trichomonas vaginalis* wurde die von Riley und Krieger (1992) entwickelte Methode zur Isolation von DNA aus nukleasereichen Protozoen verwendet. Aus 500 ml *Trichomonas vaginalis* T1-Kultur wurden 1 bis 5 µg/µl genomische DNA isoliert, zu einer Konzentration von 100 ng/µl in TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

#### **4.8.2 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Reinheit isolierter Nukleinsäuren wurde anhand photometrischer Messungen bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte (OD) der Probe bei 230 nm (Polysaccharide), 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteine) ermittelt. Eine Nukleinsäure-Probe wird als »rein« angesehen, wenn folgendes Verhältnis vorliegt:

$$OD_{230} : OD_{260} : OD_{280} = 1 : 2 : 1$$

Außerdem sollte der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der  $OD_{260}$ , dem Verdünnungsfaktor (VF) und einem für die Nukleinsäure spezifischen Multiplikationsfaktor (MF). Es resultiert daraus folgende Gleichung:

$$c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \cdot VF \cdot MF$$

Der für die Nukleinsäuren spezifische Multiplikationsfaktor ist folgender:

für ssRNA: 40 µg/ml (da 1  $OD_{260}$  = 40 µg/ml)

für dsDNA: 50 µg/ml (da 1  $OD_{260}$  = 50 µg/ml)

Alternativ konnte die Konzentration der Nukleinsäure in DNA-Proben gelelektrophoretisch abgeschätzt werden. Die Abschätzung erfolgte mit Mengenstandards auf einem Agarosegel (Kapitel 4.8). Es wurden ein Aliquot der Nukleinsäure und linearisierter Vektor bekannter Konzentration aufgetragen. Anhand der Intensität der Probenbanden unter UV-Licht konnte die Nukleinsäure-Konzentration der Probe durch visuellen Vergleich mit den Vektoren bekannter Konzentration bestimmt werden.

### 4.8.3 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 4.8.3.1 PCR

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen mittels PCR (Mullis *et al.*, 1992) wurden 100 ng genomische DNA oder 100 ng Plasmid-DNA in 50  $\mu$ l PCR-Ansätzen verwendet. Ein Ansatz beinhaltete folgende Substanzen: 1 $\times$  Polymerase-Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 200  $\mu$ M dNTPs, 2  $\mu$ M je Oligonukleotid (Kapitel 4.4) und 1 U Polymerase. Ein Standard-PCR-Programm im PCR-Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf) hatte folgenden Ablauf:

98°C	10 min	} 30 Zyklen
94°C	30 sec	
50 $\pm$ 10°C	1 min	
68°C bzw. 72°C	1 min/500 bp	
68°C bzw. 72°C	10 min	

Die Reaktionsansätze wurden nach der Amplifikation mit 1 $\times$  Ladepuffer versetzt und in einem 1- bzw. 2%igen (w/v) Agarosegel getrennt (Kapitel 4.8).

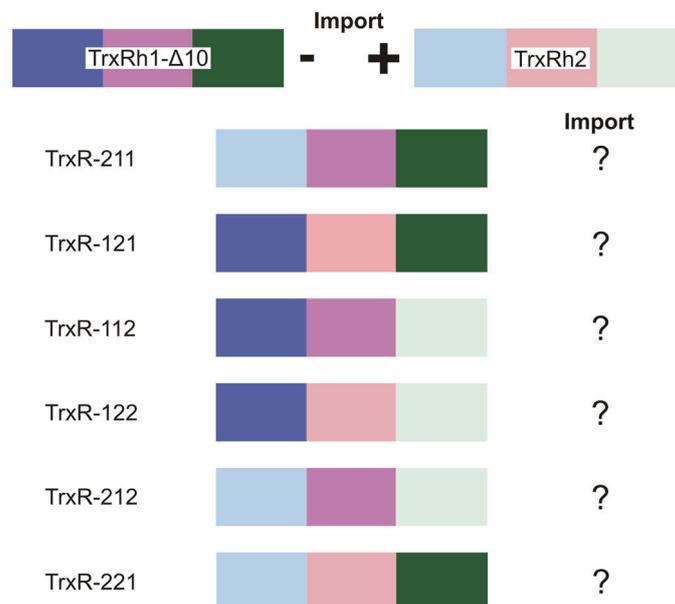
#### 4.8.3.2 nestedPCR

Zur Amplifikation von DNA, die für Rekombinationen (Herstellung von Vektor-konstrukten, Kapitel 4.8.4) verwendet werden sollte, wurde eine nestedPCR durchgeführt. Dabei diente das Produkt einer ersten PCR als Ausgangsmaterial für eine zweite PCR. Die erste PCR wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Kapitel 4.8.3.1). Der 50  $\mu$ l umfassende Reaktionsansatz der zweiten PCR setzte sich wie folgt zusammen: 1 $\times$  Polymerase-Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 200  $\mu$ M dNTPs, 8  $\mu$ M je Oligonukleotid (Kapitel 4.4) und 1 U Polymerase. Das PCR-Programm, welches im Mastercycler gradient (Eppendorf) durchgeführt wurde, hatte folgende Parameter:

95°C	2 min	} 5 Zyklen
94°C	15 sec	
45°C	30 sec	
68°C bzw. 72°C	1 min/500 bp	
68°C bzw. 72°C	5 min	
95°C	2 min	} 20 Zyklen
94°C	15 sec	
55°C	30 sec	
68°C bzw. 72°C	1 min/500 bp	
68°C bzw. 72°C	5 min	

#### 4.8.3.3 Overlap extension PCR

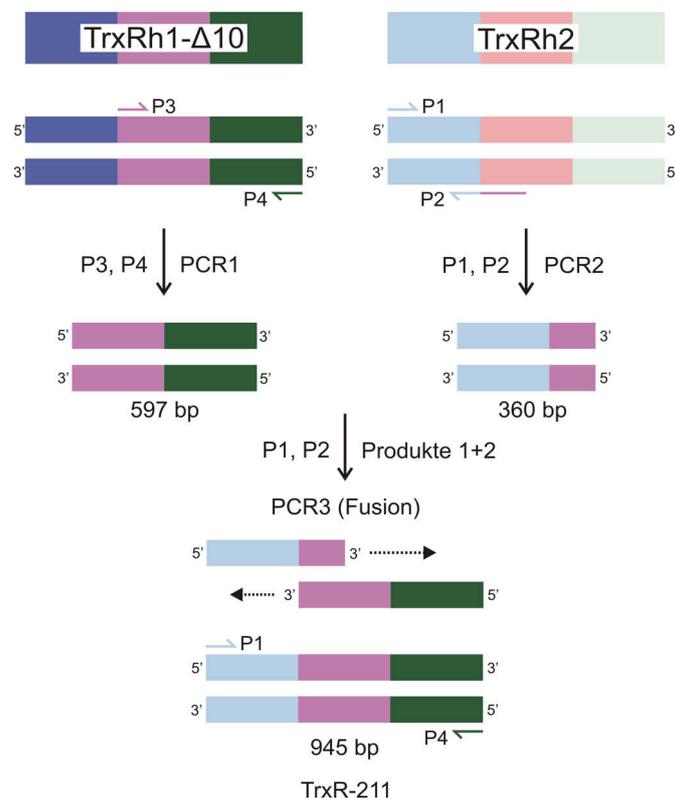
Zum reziproken Austausch von Sequenzblöcken (Abbildung 4.1) zwischen den Proteinen TrxRh1-Δ10 und TrxRh2 (Mentel *et al.*, 2008) wurde die Overlap extension PCR verwendet (Wurch *et al.*, 1998).



**Abbildung 4.1:** Resultierende Konstrukte mit den Blöcken der Proteinsequenzen, die zwischen den Proteinen TrxRh1-Δ10 und TrxRh2 (Mentel *et al.*, 2008) zur Überprüfung einer Importeigenschaft in die Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* reziprok ausgetauscht werden sollen.

Die Overlap extension PCR (Abbildung 4.2) besteht aus mindestens drei PCRs, abhängig davon, welche Sequenzblöcke getauscht werden sollen. Die erste PCR ist eine konventionelle PCR, bei der die Oligonukleotide an ihrem 5' Ende partiell komplementär zu den angrenzenden Fragmenten sind, die fusioniert werden sollen. Die

zweite PCR besteht aus der Fusion der PCR-Produkte, die bei der ersten PCR amplifiziert wurden, unter Verwendung der komplementären Verlängerungen der Oligonukleotide. Die abschließende dritte PCR entspricht der Amplifikation des fertigen Fusionsprodukts. Das endgültige PCR-Produkt ist eine Fusion der verschiedenen PCR-Produkte, die zuvor amplifiziert worden sind (Wurch *et al.*, 1998). Alle PCRs wurden wie im Kapitel 4.8.3.1 beschrieben durchgeführt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden für Rekombinationen (Herstellung von Vektorkonstrukten, Kapitel 4.8.4) verwendet und wurden deswegen noch einer nestedPCR unterzogen (Kapitel 4.8.3.2).



**Abbildung 4.2:** Overlap extension PCR. Das Konstrukt TrxR-211 wurde durch Fusion der entsprechenden Sequenzblöcke durch die Overlap extension PCR konstruiert. Das Produkt wurde dann in den *Trichomonas vaginalis* Expressionsvektor pTagvag2 rekombiniert (Kapitel 4.8.4). Die Herstellung der anderen Konstrukte erfolgte analog.

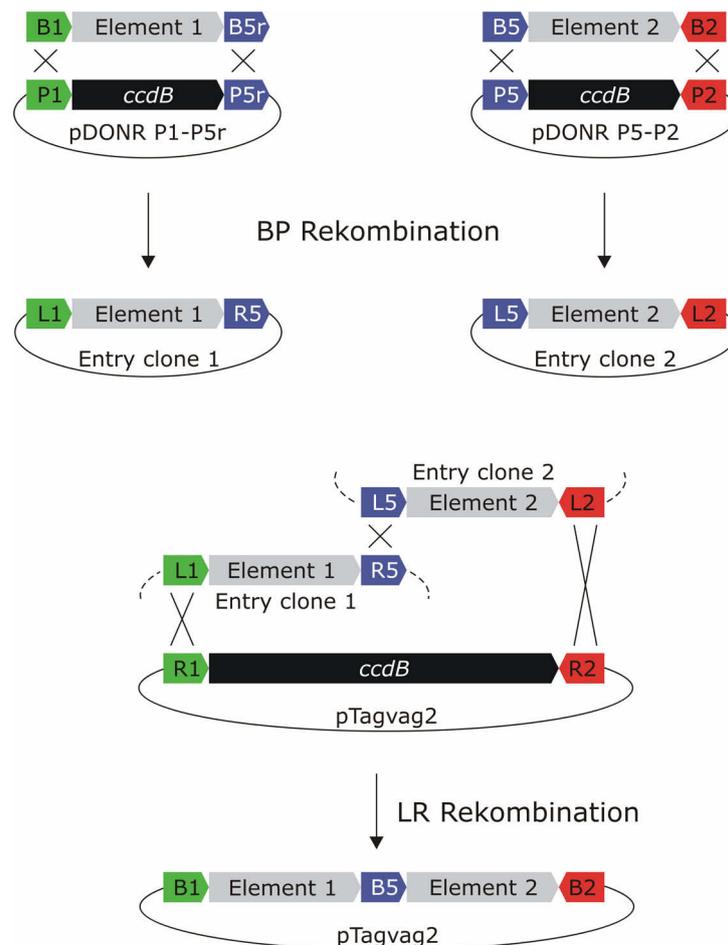
#### 4.8.4 Herstellung von Vektorkonstrukten mittels Rekombinationen

Zur Herstellung der Expressionsvektoren für die homologe Expression in *Trichomonas vaginalis* wurde die MultiSite Gateway® Pro Technologie der Firma Invitrogen verwendet. Diese universelle Klonierungsmethode beruht auf den spezifischen Rekombinationseigenschaften zur Integration und Excision des Bakteriophagen Lambda (Landy, 1989) und dient der gleichzeitigen Klonierung mehrerer DNA-Fragmente in einer definierten Richtung und Orientierung (Hartley *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2005, 2004). Es können Expressionsklone mit zwei frei wählbaren, separaten DNA-Elementen erstellt werden.

Die Rekombinationen des Bakteriophagen treten zwischen spezifischen Bindungsstellen auf der Phagen-DNA (*attP*; att: *attachment* (engl.), P: Phage) und auf dem bakteriellen Chromosom (*attB*; B: Bakterium) auf. Die resultierende Stelle auf der DNA ist nach der Rekombination von *attL* (L: links) und *attR*-Seiten (R: rechts) flankiert. Die durch das Enzym Integrase (phagenkodiert) und dem bakteriellen Integrations-Wirt-Faktor (IHF, *integration host factor*) vermittelte initialisierende Integrations-Reaktion wird als BP Rekombination bezeichnet. Die Excisions-Reaktion benötigt zusätzlich die Excisionase (phagenkodiert) und heißt LR Reaktion (Katzen, 2007).

Die durch nestedPCR amplifizierte DNA (Kapitel 4.8.3.2) wurde durch die Oligonukleotide mit Rekombinationsseiten flankiert. Es folgte eine BP Rekombination der amplifizierten DNA des zu exprimierenden Proteins (Element 1, Abbildung 4.3) in den Vektor pDONR™ P1-P5r (Invitrogen) mit Hilfe des „MultiSite Gateway® Pro“ Kits (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Eine ebenfalls amplifizierte di-Hämagglutinin-Sequenz (Element 2, Abbildung 4.3) wurde auf dieselbe Weise in den Vektor pDONR™ P5-P2 (Invitrogen) rekombiniert. Die so entstandenen Plasmide wurden als „Entry clones“ bezeichnet. Durch die Wahl der Vektoren und damit verbunden auch der Bestimmung der Flankierungen bei der PCR wurde festgelegt, dass bei einer gemeinsamen Rekombination (LR) der entstandenen „Entry clones“ von Element 1 und Element 2 in den Expressionsvektor das Element 1 C-terminal mit dem Element 2

(einem HA-Tag) zusammengesetzt wurde. Die LR Rekombination erfolgte ebenfalls mit Hilfe des „MultiSite Gateway® Pro“ Kits (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Es wurden jeweils 10 fmol der Element 1- und Element 2-Plasmide und 20 fmol des mittels des Kits „Gateway® Vector Conversion System“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben für die Rekombination vorbereiteten pTagvag2-Vektors verwendet.



**Abbildung 4.3:** Prinzip des MultiSite Gateway® Pro Klonierungssystems von Invitrogen. Überblick über die 2-Fragmente Rekombination in einen *attR1-attR2* Klonierungsvektor (pTagvag2) durch die MultiSite Gateway® Pro Klonierung. Es wird die Entstehung der entsprechenden „Entry clones“ durch die BP Rekombination gezeigt. Der Expressionsklon resultiert aus einer einzigen LR Rekombination, bei der zwei „Entry clones“ und der pTagvag2-Vektor verwendet werden. Element 1 kennzeichnet dabei stets die Sequenz, die mit dem di-Hämagglutinin (Element 2) C-terminal in dem pTagvag2-Vektor fusioniert werden soll  
Abbildung modifiziert nach Katzen (2007).

#### 4.8.5 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Sequenzierungen von DNA-Fragmenten in Plasmiden wurden von der Firma GATC Biotech AG, Konstanz, durchgeführt.

## **4.9 Arbeiten mit Proteinen**

### **4.9.1 Extraktion von Membranproteinen aus Hydrogenosomen**

Die Extraktion der Membranproteine aus den Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* erfolgte aus 2 mg Hydrogenosomen nach der von Fujiki *et al.* (1982) entwickelten Natriumcarbonat-Methode. Die Konzentration der Hydrogenosomen wurde zuvor nach Bradford (1976) bestimmt (Kapitel 4.9.2) Die Membranproteine wurden durch einstündige Ultrazentrifugation bei  $149000\times g$  (45000 rpm) und  $4^{\circ}\text{C}$  im Type 70Ti Rotor (L7-55 Ultrazentrifuge, Beckmann) von den löslichen Matrixproteinen getrennt. Die pelletierten Membranproteine wurden zweimal mit  $100\ \mu\text{l}$  eiskaltem  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **4.9.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Dazu wurde 1 ml einer 1:5-Verdünnung des Farbreagenzes (Bio-Rad Protein Assay) erstellt, mit  $1\ \mu\text{l}$  der Proteinlösung versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Extinktion gegen eine Referenz gemessen. Zur Kalibrierung der Messung wurde eine Regressionsgerade mit definierten Proteinkonzentrationen von Rinderserumalbumin erstellt. Aus der Geradengleichung konnte eine unbekannte Proteinkonzentration bestimmt werden. Die Messungen wurden computergesteuert (Software: Swift/Quantification/ der Firma Biochrom Ltd.) bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt.

### **4.9.3 Elektrophoretische Trennung von Proteinen (SDS-PAGE)**

Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) getrennt. Es wurden die Standardprotokolle von Sambrook *et al.* (1989) für 12- bzw. 15%ige Trenngele verwendet. Es kamen vertikale Hoefer-Kammern der Firma GE Healthcare aus der Serie SE600 zum Einsatz. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit  $\frac{1}{5}$  Volumen  $5\times$  Laemmli-Probenpuffer versetzt und 10 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  denaturiert.

#### 4.9.4 Färben von Polyacrylamidgelen

Durch SDS-Gele (Kapitel 4.9.3) getrennte Proteine wurden nach Heukeshoven und Dernick (1988) und Neuhoff *et al.* (1985) mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Dazu wurde eine Tablette PhastGel™Blue R-350 (GE Healthcare) in 80 ml Wasser gelöst, die Lösung mit 120 ml Methanol aufgefüllt, filtriert und bei 4°C gelagert. Zum Anfärben der Proteine wurde die Lösung 1:10 mit 10%iger (v/v) Essigsäure verdünnt und auf 90°C erhitzt. Die SDS-Gele wurden 1 h in der Färbelösung geschwenkt und zur Entfärbung des Hintergrunds in 10%ige (v/v) Essigsäure überführt. Dort verblieben sie bis zum gewünschten Kontrast der Banden.

#### 4.9.5 Western Transfer

Der Transfer von in einer SDS-PAGE (Kapitel 4.9.3) getrennten Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran wurde nach Gershoni und Palade (1983) in einer Halbtrockenzelle (Multiphor II NovaBlot™, GE Healthcare) durchgeführt. Dazu wurde die Anode mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> angefeuchtet, drei Lagen in Transferpuffer (40 mM Glycin; 50 mM Tris-Puffersubstanz; 1 mM SDS; 20% (v/v) Methanol) getränktes Whatman 3MM-Papier, die gewässerte Nitrocellulosemembran (Hybond™-C Extra, GE Healthcare) und das Trenngel gefolgt von drei weiteren in Transferpuffer getränkten Lagen Whatman 3MM-Papier luftblasenfrei aufgestapelt und mit der mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> angefeuchteten Kathode bedeckt. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,82 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche innerhalb von 60 min. Zur Kontrolle wurde die Membran nach dem Transfer mit Ponceau S (0,5% (w/v) Ponceau S; 1% (v/v) Essigsäure) reversibel angefärbt. Die Färbung wurde durch Waschen mit deionisiertem Wasser zunächst differenziert und dann entfernt.

#### 4.9.6 Immunodetektion von Proteinen

Zum Absättigen der Nitrocellulosemembran aus Kapitel 4.9.5 wurde sie für 1 h in TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) mit 3% (w/v) proteasefreiem BSA geschwenkt. Die Hybridisierung mit dem 1:5000 in TBS mit 3% (w/v) proteasefreiem

BSA verdünnten primären Antikörper (Maus Anti-HA Monoklonaler AK (Sigma)) erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min in TBS gewaschen und danach mit dem 1:10000 in TBS mit 10% (w/v) Magermilchpulver verdünnten sekundären Antikörper (Anti-Maus IgG (H+L)/Meerrettich Peroxidase Konjugat (ImmunoPure® Ziege, Pierce)) für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem Waschvorgang, wie zuvor durchgeführt und beschrieben, erfolgte eine Nachweisreaktion mit 4 ml Lösung A (1,25 mM Luminol (Sigma) in 0,1 M Tris-HCl pH 8,6), 400 µl Lösung B (6 mM para-Hydroxycoumarinsäure (Sigma) in DMSO) und 1,2 µl 30% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Signale wurden auf Lumi-Film Chemilumineszenz Detektionsfilme (Roche) übertragen.

#### **4.9.7 Messen enzymatischer Aktivitäten**

Die Reinheit von Proteinfractionen (Kapitel 4.7.5) wurde anhand der spezifischen Aktivität von Markerenzymen überprüft. Als hydrogenosomales Markerenzym diente das decarboxylierende Malat Enzym (Kremer *et al.*, 1989). Die Malat Dehydrogenase diente als Marker für das Cytosol (Stams *et al.*, 1984).

Die Aktivität der Phosphofruktokinase in den jeweiligen subzellulären Fraktionen von *Trichomonas vaginalis*-Zellen (Kapitel 4.7.5), die dieses Enzym exprimierten, erfolgte nach Mertens *et al.* (1989).

#### **4.10 Bioinformatische Methoden**

Sequenzvergleiche und Datenbanksuchen erfolgten mit BLAST (Altschul *et al.*, 1997) in der nicht-redundanten Sequenzdatenbank (nr) vom *National Center for Biotechnology and Information* NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und TIGR (<http://www.tigr.org/>) bzw. TrichDB bei EuPathDB (<http://www.trichdb.org>, Aurrecoechea *et al.*, 2009). Die Untersuchungen wurden sowohl mit Nukleotid- als auch mit Proteinsequenzen durchgeführt. Das Translatieren von DNA und die Berechnung des Molekulargewichts von Proteinen wurden mit dem EMBOSS-Paket

(Rice *et al.*, 2000) durchgeführt.

Die Einteilung der Sequenzblöcke der Proteine TrxRh1- $\Delta$ 10 und TrxRh2 (Mentel *et al.*, 2008), die reziprok ausgetauscht werden sollten, erfolgte anhand von Sekundärstrukturen, die zuvor mit den Programmen PredictProtein (Rost *et al.*, 2004) und Jpred (Cole *et al.*, 2008) ermittelt wurden.

Globale multiple Alignments wurden mit Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) erstellt. Das Programm needle des EMBOSS-Pakets (Rice *et al.*, 2000) wurde für paarweise Alignments verwendet.

Mittels des Programms SplitsTree4 (Huson, 1998) wurden auf der Basis von Clustal W-Alignments (Thompson *et al.*, 1994) phylogenetische Analysen durchgeführt. Distanzen wurden mit der Methode LogDet (Thollesson, 2004) berechnet, wobei Lücken im Alignment von der Analyse ausgeschlossen wurden. Aus den Distanzen wurde mit NeighborNet (Bryant und Moulton, 2004), einer Variante des Neighbor-Joining Algorithmus (Saitou und Nei, 1987), ein Netzwerk abgeleitet. In das Netzwerk eingegangene Proteinsequenzen wurden der NCBI-Datenbank entnommen.

Hydrophobe, transmembrane Bereiche von Proteinen ( $\alpha$ -Helices) wurden mit dem Programm HMMTOP (Tusnády und Simon, 1998, 2001) vorausgesagt. Ob es sich bei den  $\alpha$ -Helices um amphipathische Helices handelt, wurde durch eine graphische Darstellung der  $\alpha$ -Helix überprüft. Dazu diente das Programm PROTEAN<sup>TM</sup> der Software Lasergene 8 von DNASTAR. Das Programm gibt eine graphische Darstellung der  $\alpha$ -Helix aus (*helical wheel*), bei dem die verschiedenen Aminosäuren aus denen die  $\alpha$ -Helix aufgebaut ist, mit unterschiedlichen Farben markiert und die Lage der hydrophoben und polaren Aminosäurereste ersichtlich sind.



## 5. ERGEBNISSE

### 5.1 Lokalisation der glykolytischen Enzyme in Zellen von *Trichomonas vaginalis*

Für aerobe Mitochondrien von Vertretern der Pilze, Pflanzen und Ciliaten (Conger *et al.*, 1971; Eldan und Blum, 1973; Srere, 1987; Giegé *et al.*, 2003; Brandina *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007) wurde eine Assoziation mit glykolytischen Enzymen beschrieben. Da sich Mitochondrien und Hydrogenosomen im Laufe der Evolution aus demselben Vorläufer entwickelt haben (Martin und Müller, 1998; Esser *et al.*, 2004; Embley, 2006), könnte auch bei Hydrogenosomen eine Assoziation mit der Glykolyse festzustellen sein, zumal auch bei hydrogenosomalen Proteomanalysen glykolytische Enzyme detektiert worden sind (Pütz, 2007; Gelius-Dietrich, 2008).

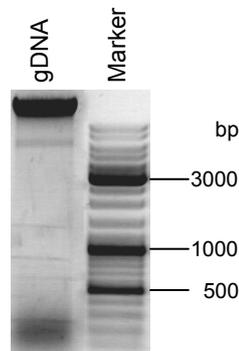
Zur Bestimmung der Lokalisation der Glykolyse bei dem Hydrogenosomen besitzenden Protisten *Trichomonas vaginalis* wurden die glykolytischen Enzyme homolog in *Trichomonas vaginalis* T1-Zellen exprimiert. Der *Trichomonas vaginalis* Expressionsvektor pTagvag2 (Hrdy *et al.*, 2004) vermittelte dem Zielprotein dabei einen C-terminalen HA-Tag, der zum einen bei einer Immunodetektion eines Western Blots genutzt wurde und zum anderen bei einer Lokalisationsstudie mittels Immunofluoreszenzfärbungen *in situ* als Ziel Fluorophor-markierter Antikörper diente.

#### 5.1.1 Herstellung von Expressionsvektoren für die homologe Expression glykolytischer Enzyme in *Trichomonas vaginalis*

##### 5.1.1.1 Isolation genomischer DNA aus *Trichomonas vaginalis*

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *Trichomonas vaginalis* wurden 500 ml Kultur des Stamms T1 von *Trichomonas vaginalis* verwendet (Kapitel 4.8.1). Zum Nachweis der erfolgreichen Isolation wurde eine Probe in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid elektrophoretisch getrennt (Abbildung 5.1). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (Kapitel 4.8.2). Dazu wurde die Probe 1:50 verdünnt. Es wurde eine Absorption bei 260 nm von 0,8 gemessen. Da für dsDNA gilt, dass 1 OD<sub>260</sub> 50 µg dsDNA/ml entspricht, ergab sich eine Konzentration von

2 mg dsDNA/ml. In dem Probenvolumen von insgesamt 1 ml lag eine Gesamtmenge von 2 mg genomischer DNA vor. Die genomische DNA wurde mit einer Konzentration von 100 ng/ $\mu$ l in TE-Puffer verwendet.

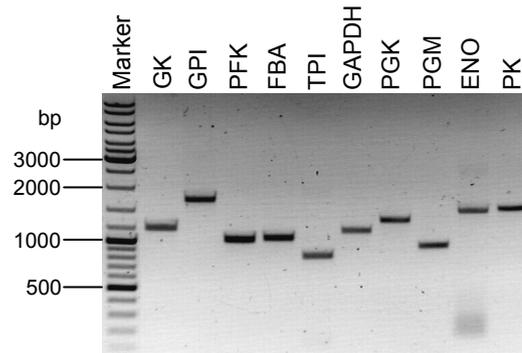


**Abbildung 5.1:** Genomische DNA von *Trichomonas vaginalis* getrennt in einem 1%igen Agarosegel. gDNA: 2  $\mu$ g genomische DNA; Marker: 500 ng DNA-Größenmarker [bp] (Fermentas).

#### 5.1.1.2 Amplifikation der glykolytischen Enzyme

Die Sequenzen aller zehn glykolytischen Enzyme von *Trichomonas vaginalis* wurden aus genomischer DNA (Kapitel 5.1.1.1) mit den entsprechenden Oligonukleotiden (Kapitel 4.4) mittels PCR (Kapitel 4.8.3.1) amplifiziert. Das Volumen des PCR-Ansatzes betrug 50  $\mu$ l. Es wurden 100 ng genomische DNA eingesetzt. Zur Kontrolle der PCR wurden die Proben in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid getrennt (Abbildung 5.2). Es konnten DNA-Fragmente mit erwarteter Größe nachgewiesen werden.

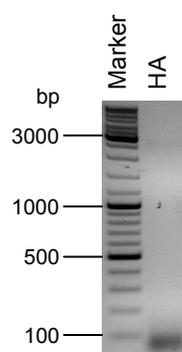
Durch eine zweite PCR – als Matrize wurden dabei die Produkte der ersten PCR (Abbildung 5.2) verwendet – wurden den DNA-Fragmenten spezielle Bindungsstellen für die späteren Rekombinationen angehängen (Kapitel 4.3.8.2). Die erhaltenen Produkte wurden in den Vektor pDONR™ P1-P5r rekombiniert (Kapitel 4.8.4) und sequenziert (Kapitel 4.8.5). Dabei ergab sich, dass alle Sequenzen mit denen in der Genomdatenbank von *Trichomonas vaginalis* ([www.trichdb.org](http://www.trichdb.org)) annotierten übereinstimmten. Die Zugangsnummern zu den Nukleotidsequenzen sind in der Tabelle 7.1 im Anhang zu finden.



**Abbildung 5.2:** Amplifikation der glykolytischen Enzyme aus genomischer DNA von *Trichomonas vaginalis*. Marker: 500 ng DNA-Größenmarker (Fermentas) [bp]; GK: Glukokinase (1128 bp); GPI: Glukose-6-phosphat Isomerase (1626 bp); PFK: Phosphofruktokinase (975 bp); FBA: Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase (984 bp); TPI: Triosephosphat Isomerase (756 bp); GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (1083 bp); PGK: 3-Phosphoglycerat Kinase (1257 bp); PGM: Phosphoglycerat Mutase (861 bp); ENO: Enolase (1449 bp); PK: Pyruvat Kinase (1449 bp).

### 5.1.1.3 Amplifikation des di-Hämagglutinins

Die Sequenz des di-Hämagglutinins wurde aus Plasmid-DNA mit den entsprechenden Oligonukleotiden (Kapitel 4.4) mittels PCR (Kapitel 4.8.3.1) amplifiziert. Das Volumen des PCR-Ansatzes betrug 50  $\mu$ l. Es wurden 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Zur Kontrolle der PCR wurde die Probe in einem 2%igen Agarosegel getrennt (Abbildung 5.3). Es konnte ein DNA-Fragment mit erwarteter Größe nachgewiesen werden. Durch eine zweite PCR mit dem Produkt als Matrize, das Abbildung 5.3 zeigt, wurden dem DNA-Fragment spezielle Bindungsstellen für die späteren Rekombinationen angehängen (Kapitel 4.8.3.2).



**Abbildung 5.3:** Amplifikation des di-Hämagglutinins aus Plasmid-DNA. Marker: 500 ng DNA-Größenmarker [bp] (Fermentas); HA: di-Hämagglutinin (54 bp).

Das erhaltene Produkt wurde in den Vektor pDONR™ P5-P2 rekombiniert (Kapitel 4.8.4) und sequenziert (Kapitel 4.8.5); daraus resultierte, dass die Sequenz mit dem Hämagglutinin des humanen Influenza-Virus übereinstimmte.

#### **5.1.1.4 Herstellung der Expressionsvektoren mittels Rekombinationen**

Zur Herstellung von *Trichomonas vaginalis* Expressionsvektoren zur homologen Expression der glykolytischen Enzyme dienten Rekombinationsansätze von je 10 fmol des jeweiligen Plasmids mit dem entsprechenden glykolytischen Enzym zusammen mit 10 fmol des sich im Vektor pDONR™ P5-P2 befindlichen di-Hämagglutinins in den Expressionsvektor pTagvag2 (Kapitel 4.8.4). Aufgrund dieses Vorgangs entstanden Expressionsvektoren, in denen ein glykolytisches Enzym mit einem C-terminalen HA-Tag vorlag. Der Vektor trug ein Neomycin-Resistenzgen zur Selektion von transformierten Trichomonaden. Ebenso war ein selbstinduzierender Promotor aus *Trichomonas vaginalis* vorhanden (SCS $\alpha$ ).

Der Erfolg der Rekombination wurde anhand einer PCR überprüft (Kapitel 4.8.3.1). Es wurde stets die Sequenz eines glykolytischen Enzyms mit seinem C-terminalen HA-Tag mithilfe der entsprechenden Oligonukleotide (Kapitel 4.4) amplifiziert. Bei einer Trennung der PCR-Produkte in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid ergab sich für das jeweilige Enzym ein Bild, das die Abbildung 5.2 zeigt. Somit war von einer erfolgreichen Rekombination und folgedessen auch mit einer C-terminalen Markierung der Sequenz mit dem HA-Tag auszugehen.

### **5.1.2 Homologe Expression in *Trichomonas vaginalis***

#### **5.1.2.1 Transformation von *Trichomonas vaginalis* mittels Elektroporation**

Jedes einzelne glykolytische Enzym von *Trichomonas vaginalis* wurde in *Trichomonas vaginalis* T1-Zellen homolog exprimiert. Die Transformation der Zellen erfolgte durch Elektroporation (Kapitel 4.7.4). Der Transformationserfolg wurde anhand einer PCR überprüft, bei der aufgeschlossene *Trichomonas vaginalis*-Zellen als Matrize dienten (Kapitel 4.8.3.1). Der Zellaufschluß erfolgte mit 1,5 ml Kultur, die pelletiert wurde, in

H<sub>2</sub>O aufgenommen und durch wiederholtes schnelles Erhitzen und Abkühlen in einem Thermocycler aufgeschlossen wurde. Von der Zellsuspension wurde 1 µl als Matrize verwendet. Aus dem Expressionsvektor pTagvag2, der durch die Elektroporation in die Zellen hineingeschleust werden sollte, wurde die Sequenz eines glykolytischen Enzyms mit seinem C-terminalen HA-Tag mithilfe der entsprechenden Oligonukleotide (Kapitel 4.4) amplifiziert. Die Produkte der PCR wurden in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid getrennt. Bei einer erfolgreichen Einschleusung des pTagvag2-Vektors und damit einer Transformation der *Trichomonas vaginalis* T1-Zellen entsprach das Trennungsmuster für das entsprechende Enzym demjenigen, das die Abbildung 5.2 zeigt.

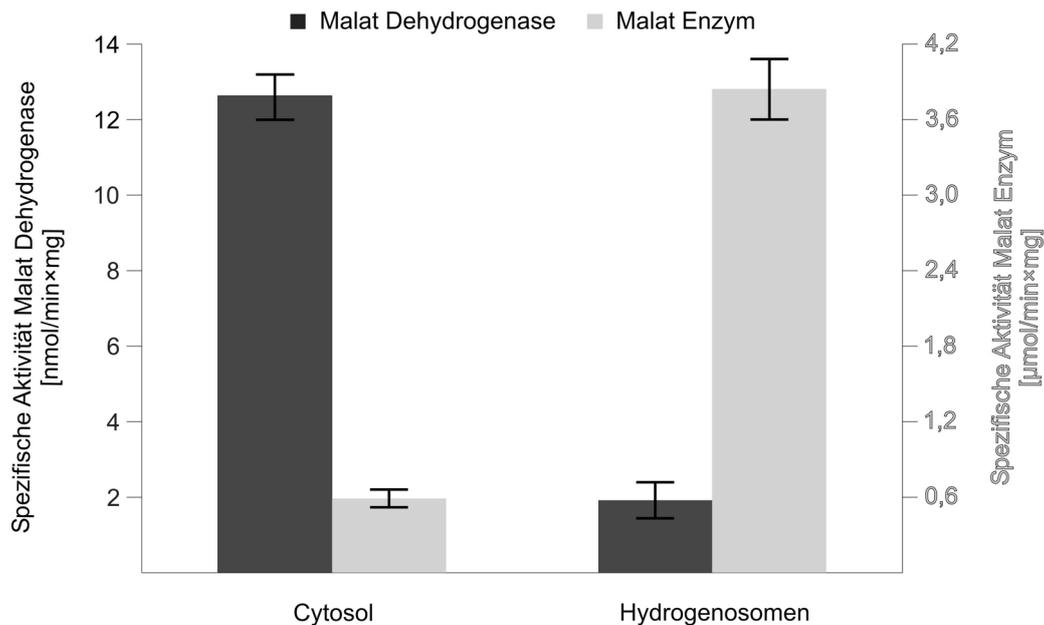
Der Transformationserfolg konnte für acht glykolytische Enzyme nachgewiesen werden. Der Versuch der homologen Expression der Triosephosphat Isomerase und der Phosphoglycerat Mutase in *Trichomonas vaginalis* erbrachte keine lebensfähigen Transformanden.

#### **5.1.2.2 Ermittlung von Markerenzymaktivitäten – Reinheitsbestimmung**

Die transformierten Trichomonaden wurden subzellulär fraktioniert (Kapitel 4.7.5). Die dabei erhaltenen cytosolischen und hydrogenosomalen Fraktionen wurden über eine enzymatische Bestimmung der Aktivität von Markerenzymen auf ihre Reinheit überprüft (Kapitel 4.9.7). Abbildung 5.4 stellt die ermittelten spezifischen Aktivitäten der Enzyme graphisch dar. Die bei jeder subzellulären Fraktionierung bestimmten Enzymaktivitäten unterschieden sich kaum voneinander.

Die Malat Dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37) diente als cytosolisches Markerenzym und wies mit ungefähr 13 nmol/min×mg die höchste spezifische Aktivität in der cytosolischen Fraktion auf. In der hydrogenosomalen Fraktion ist mit knapp 2 nmol/min×mg eine geringere spezifische Aktivität festzustellen; dieses Resultat deutet auf eine geringe Kontamination der hydrogenosomalen Fraktion mit cytosolischen Anteilen hin.

Das Malat Enzym (ME, EC: 1.1.1.40) wurde als hydrogenosomales Markerenzym verwendet. Die höchste spezifische Aktivität ist in der hydrogenosomalen Fraktion mit circa 4  $\mu\text{mol}/\text{min}\times\text{mg}$  zu messen. In der cytosolischen Fraktion ist ein geringer Anteil an Aktivität (0,6  $\mu\text{mol}/\text{min}\times\text{mg}$ ) vorhanden, der auf fragmentierte Hydrogenosomen zurückzuführen ist.



**Abbildung 5.4:** Spezifische Enzymaktivitäten [nmol/min\*mg für Malat Dehydrogenase und  $\mu\text{mol}/\text{min}\times\text{mg}$  für Malat Enzym] in subzellulären Fraktionen von *Trichomonas vaginalis*.

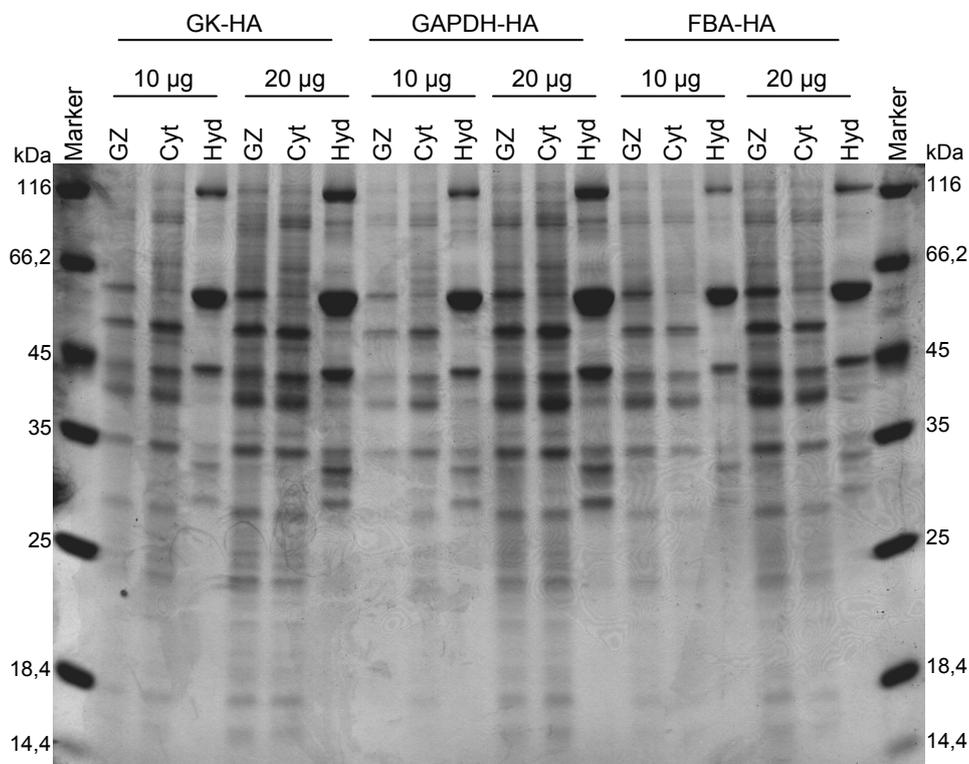
### 5.1.3 Lokalisationsstudien mittels Western Blot Analysen

Die Lokalisation der homolog exprimierten glykolytischen Enzyme bei dem Protisten *Trichomonas vaginalis* wurde durch Western Blot Analysen bestimmt. Dazu wurden transformierte *Trichomonas vaginalis*-Kulturen, die jeweils ein glykolytisches Enzym mit einem C-terminalen HA-Tag homolog exprimierten, subzellulär fraktioniert (Kapitel 4.7.5). Die erhaltenen Fraktionen (Gesamtzellextrakt, Cytosol und Hydrogenosomen) wurden auf ihre Reinheit mittels Enzymaktivitätstests von Markerenzymen überprüft (Kapitel 4.9.7; Abbildung 5.4) und in einer SDS-PAGE getrennt (Kapitel 4.9.3). Die getrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Kapitel 4.9.5) und der C-terminale HA-Tag der homolog exprimierten

glykolytischen Enzyme wurde durch eine Immunodetektion nachgewiesen (Kapitel 4.9.6). Durch diese Analyse konnte ermittelt werden, in welcher Fraktion das markierte glykolytische Enzym vorhanden war.

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

Die Proteine der drei Fraktionen (Gesamtzellextrakt, Cytosol und Hydrogenosomen), die bei der subzellulären Fraktionierung der transformierten Trichomonaden erhalten wurden (Kapitel 4.7.5), wurden in 12%igen SDS-Gelen getrennt (Kapitel 4.9.3).



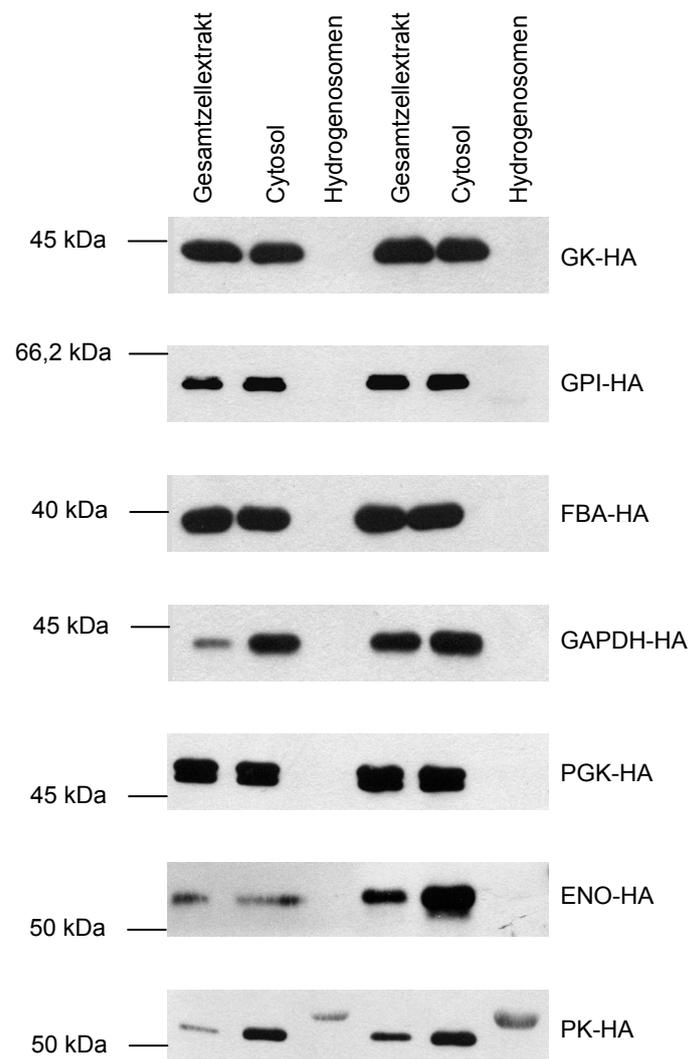
**Abbildung 5.5:** 12%ige, Coomassie-gefärbte SDS-PAGE subzellulärer Fraktionen von Glukokinase-HA (GK-HA; 42 kDa), Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase-HA (GAPDH-HA; 40 kDa) und Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase-HA (FBA-HA; 37 kDa) exprimierenden Zellen von *Trichomonas vaginalis*. Es wurden von jeder Fraktion jeweils 10 und 20 µg Protein aufgetragen. Cyt: Cytosol; GZ: Gesamtzellextrakt; Hyd: Hydrogenosomen; Marker: Protein-Größenmarker (Fermentas) [kDa].

Da in Coomassie-gefärbten SDS-Gelen (Kapitel 4.9.4) nicht die Bande des überexprimierten Proteins zu beobachten und festzustellen war, zeigt Abbildung 5.5 beispielhaft eine SDS-PAGE von *Trichomonas vaginalis*-Kulturen, die jeweils ein anderes glykolytisches Enzym exprimieren. Die restlichen Gele sind im Anhang zu finden (Abbildungen 7.1 bis 7.3).

### **5.1.3.2 Immunodetektion von Proteinen im Western Blot**

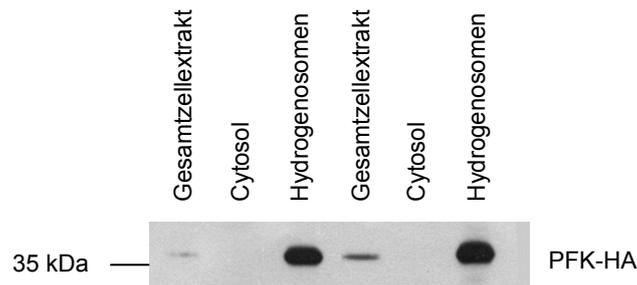
Die zuvor in SDS-Gelen getrennten Proteine der durch subzelluläre Fraktionierung transformierter Zellen von *Trichomonas vaginalis* (Kapitel 4.7.5) erhaltenen drei Fraktionen wurden auf Nitrocellulosemembranen übertragen (Kapitel 4.9.5) und der C-terminale HA-Tag des exprimierten Proteins immunologisch nachgewiesen (Kapitel 4.9.6). Es handelte sich dabei um Zellen von *Trichomonas vaginalis*, die ein glykolytisches Enzym exprimierten. Abbildung 5.6 zeigt die bei der Immunodetektion mit anschließendem Luminolnachweis erhaltenen Signale.

Die Immunodetektion des HA-Tags, des jeweiligen exprimierten Proteins, ergab, dass alle exprimierten Proteine (Enolase (ENO), Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBA), Glukokinase (GK), Glukose-6-phosphat Isomerase (GPI), Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH), 3-Phosphoglycerat Kinase (PGK) und Pyruvat Kinase (PK)) im Cytosol der Zelle lokalisiert sind, denn es wurden ausschließlich Signale im Gesamtzellextrakt und in der cytosolischen Fraktion detektiert. Die Ergebnisse für die exprimierten glykolytischen Enzyme ließen sich in zwei unabhängigen Versuchen reproduzieren.



**Abbildung 5.6:** Immunodetektion subzellulärer Fraktionen von transformierten *Trichomonas vaginalis*-Kulturen mit Antiserum gegen den C-terminalen HA-Tag des exprimierten Proteins. Es wurden jeweils 10 und 20 µg der drei Fraktionen (Gesamtzell-extrakt, Cytosol und Hydrogenosomen) aufgetragen. ENO-HA: Enolase-HA (54,29 kDa); FBA-HA: Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase-HA (39,26 kDa); GK-HA: Glukokinase-HA (44,78 kDa); GAPDH-HA: Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase-HA (42,15 kDa); GPI-HA: Glukose-6-phosphat Isomerase-HA (64,16 kDa); PGK-HA: 3-Phosphoglycerat Kinase-HA (48,34 kDa); PK-HA: Pyruvat Kinase-HA (55,82 kDa).

Für die in *Trichomonas vaginalis* exprimierte Phosphofruktokinase zeigte sich ein anderes Bild (Abbildung 5.7): Hier konnte in der cytosolischen Fraktion kein Signal für einen vorhandenen HA-Tag detektiert werden. Signale zeigten sich im Gesamtzell-extrakt und in der hydrogenosomalen Fraktion. Auch dieses Ergebnis konnte in zwei unabhängigen Versuchen reproduziert und so gesichert werden.

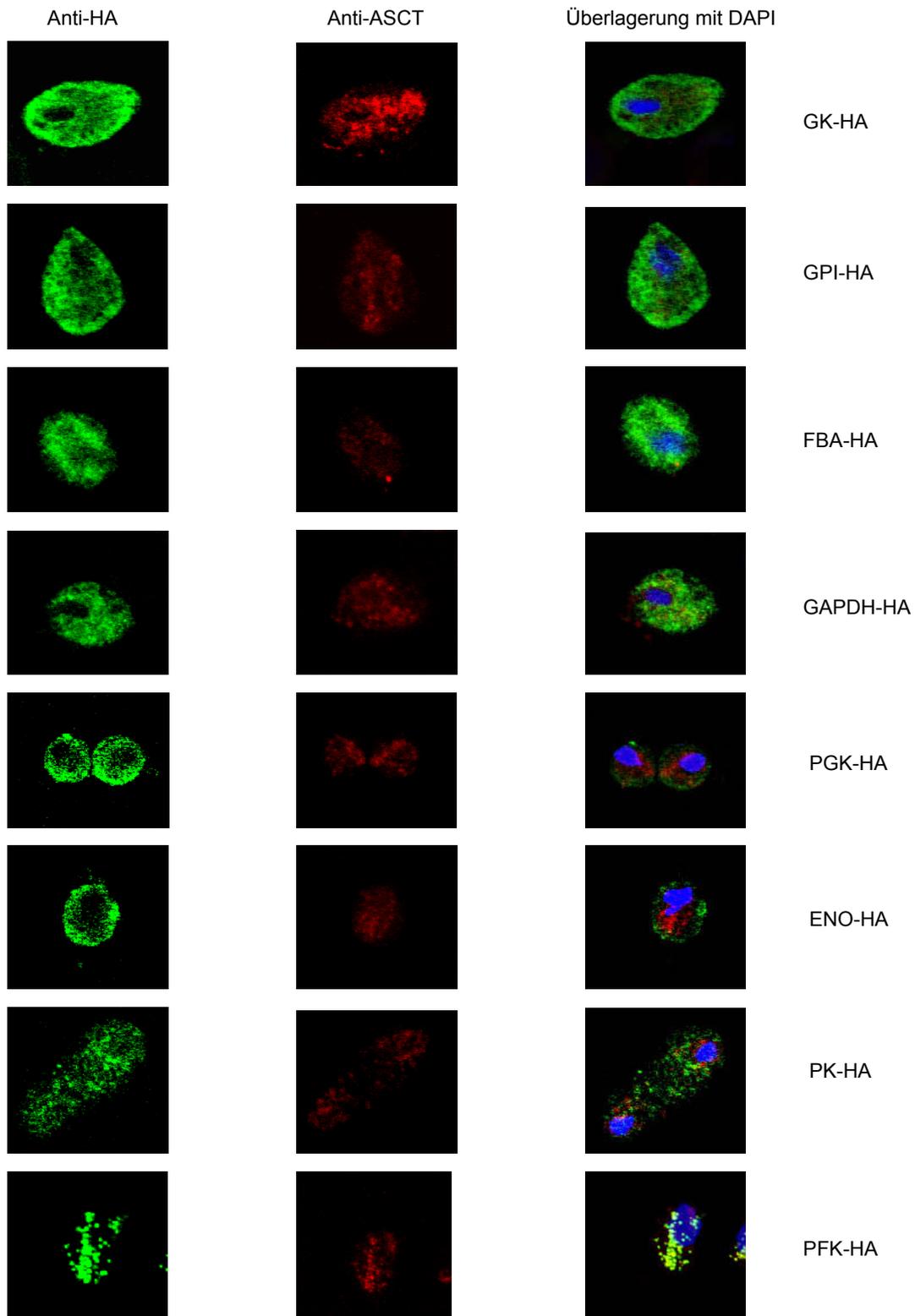


**Abbildung 5.7:** Immunodetektion subzellulärer Fraktionen von Phosphofruktokinase exprimierenden *Trichomonas vaginalis*-Kulturen mit Antiserum gegen den C-terminalen HA-Tag des exprimierten Proteins. Es wurden jeweils 25 und 50  $\mu\text{g}$  der drei Fraktionen (Gesamtzellextrakt, Cytosol und Hydrogenosomen) aufgetragen. PFK-HA: Phosphofruktokinase-HA (37,76 kDa).

#### 5.1.4 Lokalisationsstudien mittels Immunofluoreszenz

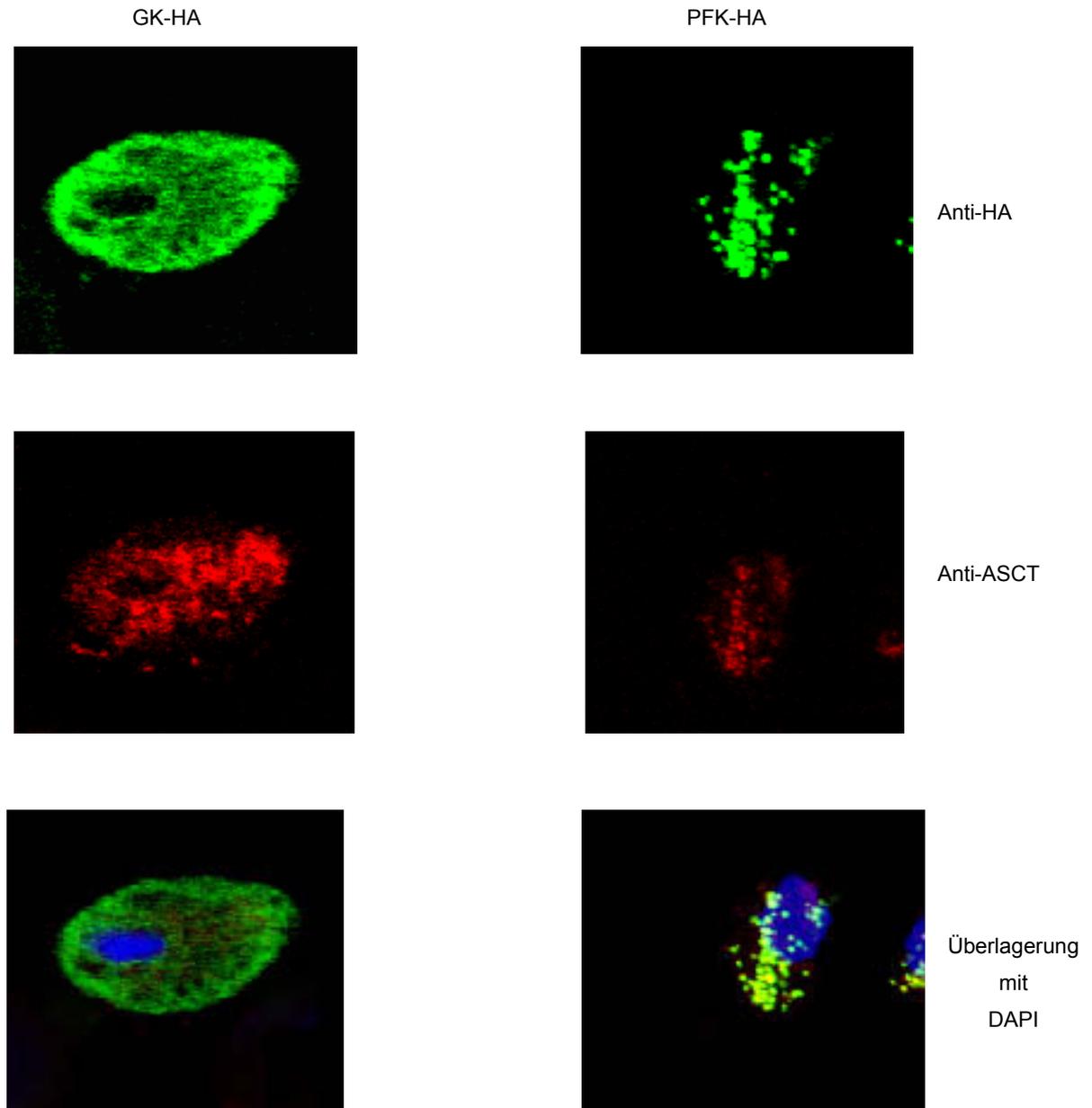
Neben den Lokalisationen der exprimierten glykolytischen Enzyme in *Trichomonas vaginalis* mittels Western Blot Analysen wurden die HA-markierten Proteine auch *in situ* mittels Immunofluoreszenzen lokalisiert (Kapitel 4.7.6). Neben dem markierten Enzym, das mit grün-fluoreszierenden Antikörpern angefärbt wurde, wurden als hydrogenosomaler Marker ASCT-Moleküle mit rot-fluoreszierenden Antikörpern und die DNA (der Zellkern) mit DAPI (blau fluoreszierend) angefärbt.

In den transformierten Zellen von *Trichomonas vaginalis* wurden – bis auf die Phosphofruktokinase – alle exprimierten glykolytischen Enzyme als gleichmäßig in der Zelle verteilte Proteine ausgemacht. Es konnte keine Co-Lokalisation mit den Hydrogenosomen festgestellt werden (Abbildung 5.8). Für die Phosphofruktokinase konnte eine Co-Lokalisation mit den Hydrogenosomen festgestellt werden. Die rote Fluoreszenz der Antikörper, die die ASCT markierten, ließen sich mit der grünen Fluoreszenz des angefärbten HA-Tags der PFK zur Deckung bringen (Abbildung 5.8).



**Abbildung 5.8:** Immunofluoreszenzfärbung des C-terminalen HA-Tags des jeweiligen exprimierten Proteins in Zellen von *Trichomonas vaginalis*. Die Antikörper gegen den HA-Tag des jeweils exprimierten Proteins fluoreszieren grün (Anti-HA). Als hydrogenosomale Kontrolle wurde die Acetat:Succinat-CoA Transferase (ASCT) mit rot-fluoreszierenden Antikörpern nachgewiesen (Anti-ASCT). Die DNA im Zellkern wurde mit DAPI angefärbt (blaue Fluoreszenz) und ist in der Überlagerung der beiden anderen Fluoreszenzen zu sehen. ENO-HA: Enolase-HA; FBA-HA: Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase-HA; GK-HA: Glukokinase-HA; GAPDH-HA: Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase-HA; GPI-HA: Glukose-6-phosphat Isomerase-HA; PFK-HA: Phosphofruktokinase-HA; PGK-HA: 3-Phosphoglycerat Kinase-HA; PK-HA: Pyruvat Kinase-HA.

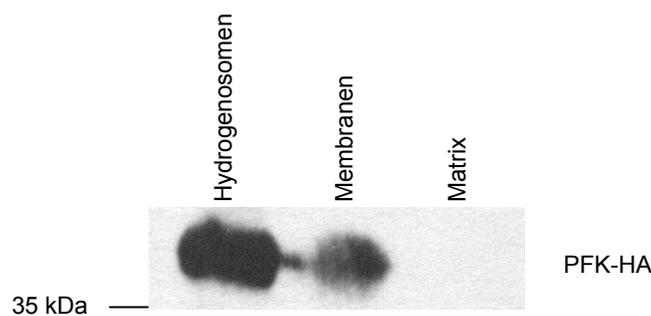
In Abbildung 5.9 sind die durch Immunfluoreszenzen ermittelten cytosolischen und hydrogenosomalen Lokalisationen am Beispiel der Glukokinase und der Phosphofruktokinase vergrößert dargestellt.



**Abbildung 5.9:** Immunfluoreszenzfärbung des C-terminalen HA-Tags eines cytosolisch lokalisierten (GK-HA) und eines hydrogenosomal lokalisierten (PFK-HA) Proteins in Zellen von *Trichomonas vaginalis*. Die Antikörper gegen den HA-Tag des jeweils exprimierten Proteins fluoreszieren grün (Anti-HA). Als hydrogenosomale Kontrolle wurde die Acetat:Succinat-CoA Transferase (ASCT) mit rot-fluoreszierenden Antikörpern nachgewiesen (Anti-ASCT). Die DNA im Zellkern wurde mit DAPI angefärbt (blaue Fluoreszenz) und ist in der Überlagerung der beiden anderen Fluoreszenzen zu sehen. GK-HA: Glukokinase-HA; PFK-HA: Phosphofruktokinase-HA.

### 5.1.5 Isolation der hydrogenosomalen Membranen aus Phosphofruktokinase exprimierenden Zellen von *Trichomonas vaginalis*

Aufgrund der Lokalisation der Phosphofruktokinase in der hydrogenosomalen Fraktion von *Trichomonas vaginalis* (Abbildung 5.7) wurden isolierte Hydrogenosomen in ihre Membran- und Matrixproteine separiert (Kapitel 4.9.1). Die Proteine der beiden Fraktionen wurden in 12%igen SDS-Gelen getrennt (Kapitel 4.9.3), anschließend auf Nitrocellulosemembranen übertragen (Kapitel 4.9.5) und der HA-Tag der exprimierten PFK immunologisch nachgewiesen (Kapitel 4.9.6). Abbildung 5.10 zeigt das Ergebnis des Western Blots mit anschließender Immunodetektion. Die PFK konnte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen ausschließlich in der Membranfraktion der Hydrogenosomen nachgewiesen werden.

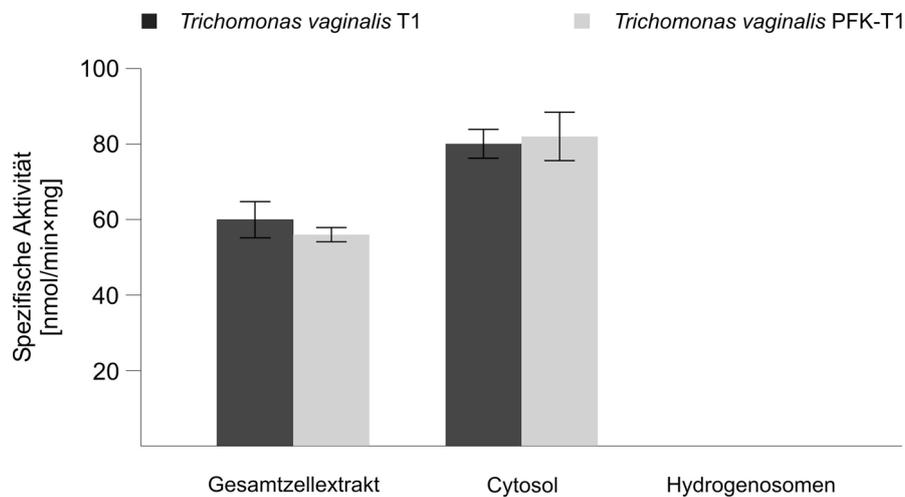


**Abbildung 5.10:** Immunodetektion des C-terminalen HA-Tags der Phosphofruktokinase (37,76 kDa), die Zellen von *Trichomonas vaginalis* exprimieren, in verschiedenen Fraktionen dieser Zellen. Es wurden jeweils 25 µg Protein der Hydrogenosomen, der hydrogenosomalen Membranen und der Matrix der Hydrogenosomen aufgetragen.

### 5.1.6 Messungen der Phosphofruktokinase-Aktivität

In den verschiedenen subzellulären Fraktionen (Kapitel 4.7.5) von *Trichomonas vaginalis*-Zellen, die die Phosphofruktokinase exprimierten, wurde die Aktivität der Phosphofruktokinase photometrisch bestimmt (Kapitel 4.9.7). Als Vergleichswerte dienten die Fraktionen des untransformierten Stamms (*Trichomonas vaginalis* T1). Die Messungen wurden mit  $PP_i$  als Substrat durchgeführt (Kapitel 4.9.7). Abbildung 5.11 zeigt die ermittelten spezifischen Aktivitäten der Phosphofruktokinase. Die im Kapitel 5.1.2.2 ermittelten prozentualen Kontaminationen in den jeweiligen Frak-

tionen wurden bei der Berechnung der spezifischen Enzymaktivitäten berücksichtigt.

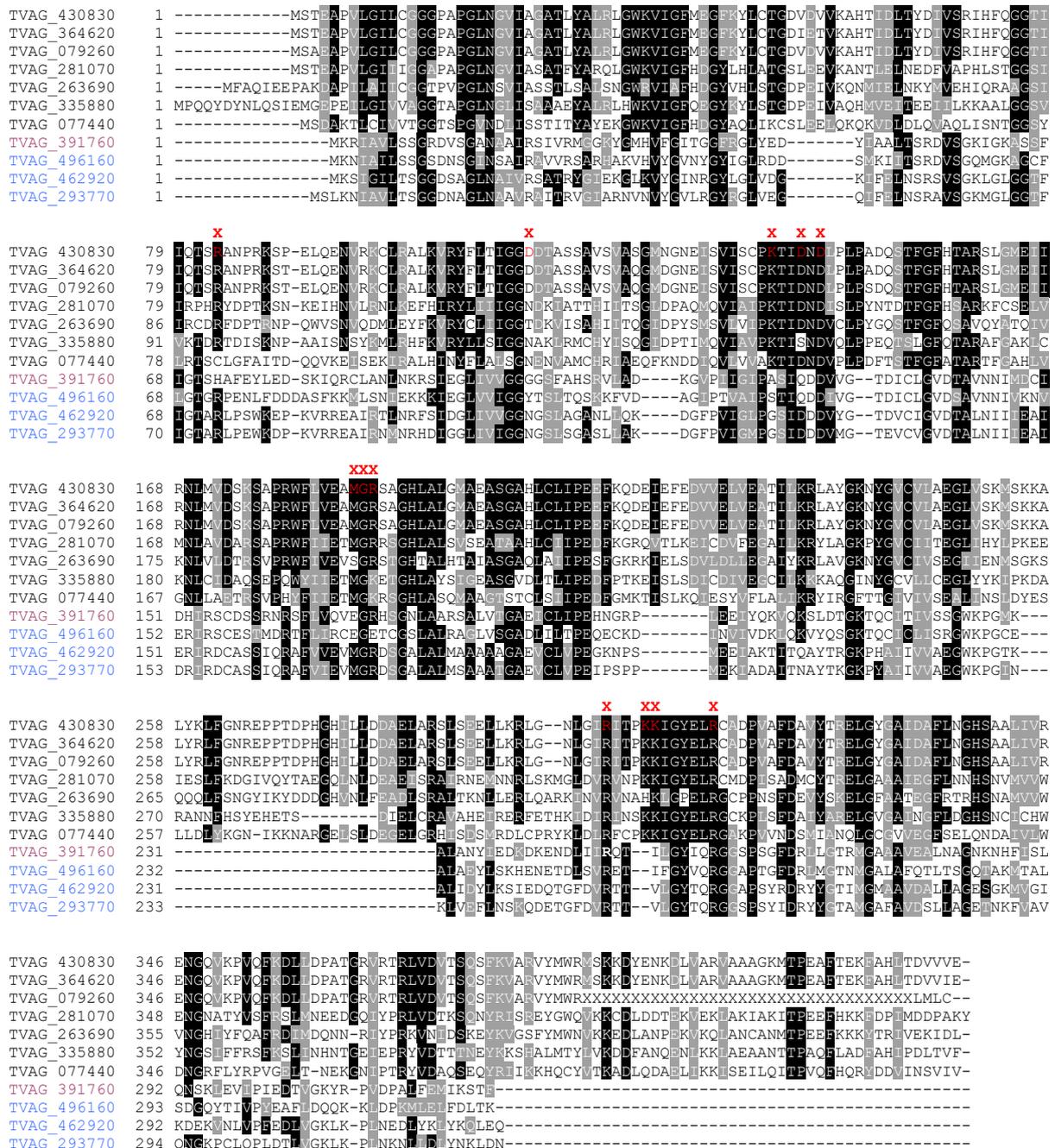


**Abbildung 5.11:** Spezifische Enzymaktivitäten der PP<sub>i</sub>-abhängigen Phosphofruktokinase [nmol/min×mg] in subzellulären Fraktionen von untransformierten Zellen von *Trichomonas vaginalis* T1 und von Phosphofruktokinase-exprimierenden Zellen von *Trichomonas vaginalis* T1 (PFK-T1).

Die Aktivität der PP<sub>i</sub>-abhängigen Phosphofruktokinase (EC 2.7.1.90) war im Gesamtzellextrakt bei dem untransformierten Wildtypstamm und bei dem die PFK (TVAG\_391760) exprimierenden Stamm von *Trichomonas vaginalis* annähernd gleich hoch (60 nmol/min×mg). Im Cytosol war eine höhere spezifische Aktivität der PFK als im Gesamtzellextrakt vorhanden. Auch für diese spezifische Aktivität der PFK war in beiden Zelllinien kaum ein Unterschied festzustellen. Sie betrug bei beiden cytosolischen Fraktionen etwa 80 nmol/min×mg. Weder in den Hydrogenosomen des *Trichomonas vaginalis* Stamms T1 noch bei den Hydrogenosomen der *Trichomonas vaginalis* Zellen, die die PFK exprimierten, war eine PFK-Aktivität meßbar. Eine Enzymaktivität der Phosphofruktokinase in Ansätzen, in denen ATP als Substrat diente, war nicht meßbar.

### 5.1.7 Sequenzvergleiche der Phosphofruktokinasen aus *Trichomonas vaginalis*

In der Genomdatenbank von *Trichomonas vaginalis* (www.trichdb.org) sind elf Isoformen der Phosphofruktokinase annotiert.



**Abbildung 5.12:** Clustal W-Alignment der beim *Trichomonas vaginalis* Genomprojekt ermittelten Aminosäuresequenzen der Phosphofruktokinasen. Gleiche Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren sind grau hinterlegt. Die in dieser Arbeit verwendete und von Pütz (2007) im hydrogenosomal Proteom gefundene Sequenz ist violett markiert. Die restlichen von Pütz (2007) als hydrogenosomal identifizierten PFKs sind blau gekennzeichnet. Die Zugangsnummern der PFKs sind die der Genomdatenbank (www.trichdb.org). Aminosäuren, die für die katalytische Aktivität der Isoform TVAG\_430830 von Bedeutung sind, sind durch ein **x** kenntlich gemacht (Mertens *et al.*, 1998).

Vier der annotierten Phosphofruktokinasen sind bei einer Proteomanalyse der Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* (Stamm T1) identifiziert worden (Pütz, 2007). Abbildung 5.12 zeigt ein Clustal W-Alignment der elf annotierten PFKs (Kapitel 4.10). Das Alignment der im Genomprojekt ermittelten PFK-Sequenzen beinhaltet 22 identische Positionen. Auffallend ist, dass es keine großen konservierten Bereiche zwischen den PFKs gibt. Offensichtlich ist auch, dass die vier bei der Proteomanalyse der Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* identifizierten vier PFKs (Pütz, 2007) deutlich kürzer sind, als die übrigen Isoformen der PFK. Deswegen wurde auch ein Clustal W-Alignment dieser vier Isoformen erstellt (Abbildung 5.13).



**Abbildung 5.13:** Aminosäure-Alignment (Clustal W) der bei der Proteomanalyse der Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* identifizierten Phosphofruktokinasen (Pütz, 2007). Gleiche Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren sind grau hinterlegt. Die in dieser Arbeit zur homologen Expression verwendete Sequenz ist violett markiert. Die Zugangsnummern der PFKs sind die der Genomdatenbank ([www.trichdb.org](http://www.trichdb.org)).

Das Alignment der vier als hydrogenosomal identifizierten PFKs zeigt, dass diese relativ gut konserviert sind. Die Gesamtzahl der Positionen in dem Alignment ist 327. Die Anzahl identischer Positionen in dem Alignment beträgt 90 (27,5%).

Da die in dieser Dissertation untersuchte Phosphofruktokinase (TVAG\_391760) als ein hydrogenosomal lokalisiertes Enzym identifiziert wurde, wurden in dem Protein hydrophobe Bereiche gesucht (Kapitel 4.10). Mit diesen könnte das Protein in der Hydrogenosomenmembran verankert sein. Es wurde eine transmembrane  $\alpha$ -

Helix ermittelt, die in Abbildung 5.14 in der Sequenz der PFK farblich gekennzeichnet ist.

```
>TVAG_391760
MKRIAVLSSGRDVSANAAIRSIVRMGGKYGMHVFGITGGFRGLYEDYIAALTSRDVSGKIGKASSFIGTSHAFE
YLEDISKIQRCLANLNKRSIEGLIVVGGGGSFAHSRVLADKGVPIIGIPASIQDDVVGTDICLGVDTAVNNIMDCI
DHIRSCDSSRNRSFLVQVEGRHSGNLAARSALVTGAEICLIPEHNGRPLEEIIYQKVQKSLDTGKTQCITIVSSGW
KPGMKALANYIEDKDKENDLIIRQTILGYIQRGGSPSGFDRLLGTRMGAAAVEALNAGNKNHFISLQNSKLEVIP
IEDTVGKYRPVDPALFEMIKSTF
```

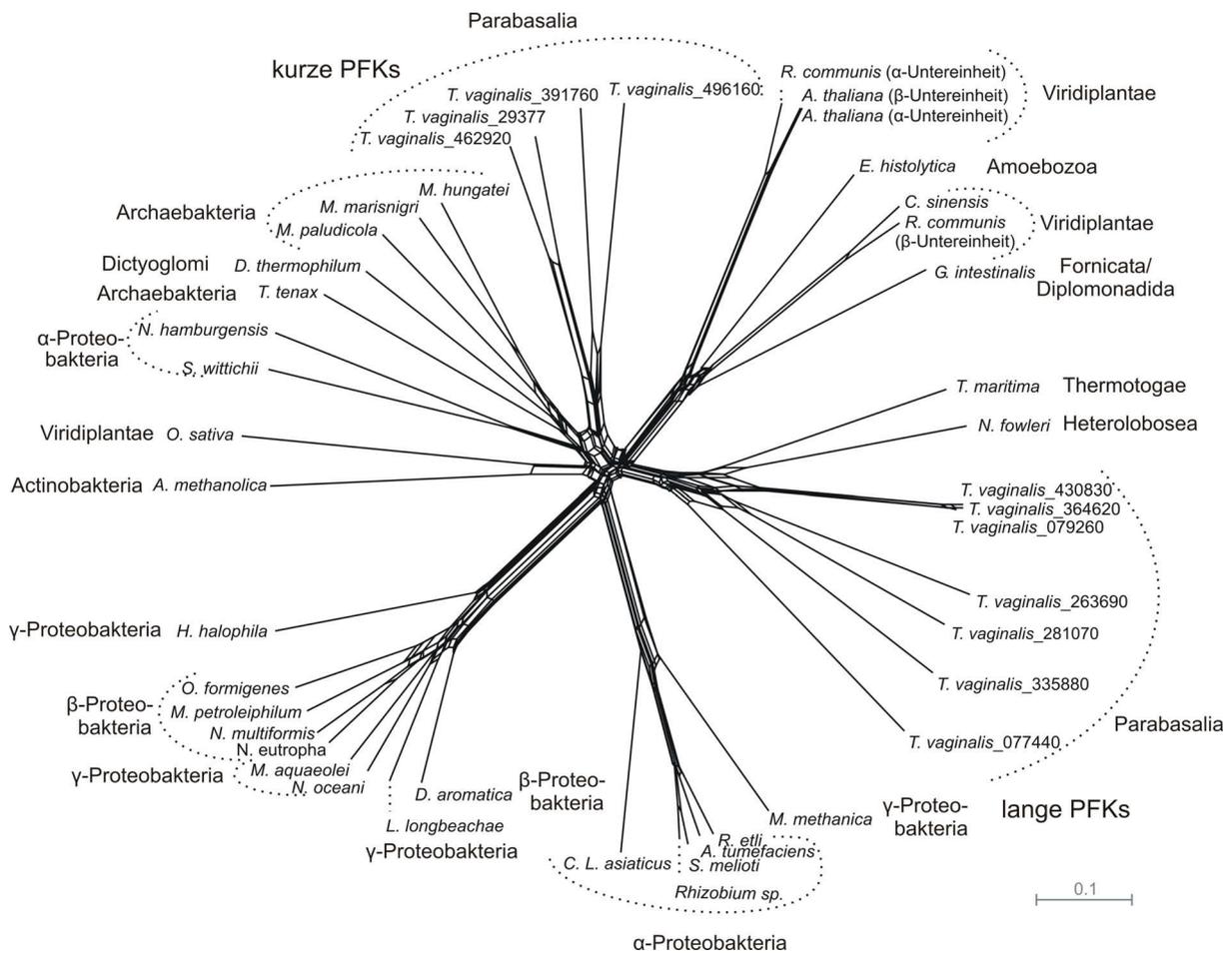
**Abbildung 5.14:** Position des von dem Programm HMMTOP ([www.enzim.hu/hmmtop/](http://www.enzim.hu/hmmtop/)) ermittelten transmembranen Bereichs (violett hinterlegt) in der Sequenz der PFK, die in dieser Arbeit untersucht wurde (TVAG\_391760; Zugangsnummer der Genomdatenbank [www.trichdb.org](http://www.trichdb.org)). Das Programm wurde von Tusnády und Simon (1998, 2001) entwickelt.

Abbildung 5.14 zeigt die mögliche Position der transmembranen Helix (violett hinterlegt) in der Sequenz der PFK an, die in dieser Arbeit homolog in *Trichomonas vaginalis* exprimiert wurde. Sie fängt an der Position 34 in Relation zum N-Terminus an und reicht bis zu der Position 53. Es ergibt sich somit eine Länge für die Helix von 19 Aminosäuren. Der Bereich vor der Helix wurde als putativ innen liegende Sequenz ausgegeben. Der Aminosäure-Abschnitt nach der Helix bis zum C-Terminus als möglicher außen liegender Bereich. Somit befände sich der größte Abschnitt des Proteins außerhalb des Hydrogenosoms.

### 5.1.8 Phylogenetische Analyse der Phosphofruktokinasen aus *Trichomonas vaginalis*

Mit den elf in der Genomdatenbank von *Trichomonas vaginalis* annotierten Aminosäuresequenzen der Phosphofruktokinasen wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt. In das Netzwerk gingen Aminosäuresequenzen von PP<sub>i</sub>-abhängigen Phosphofruktokinasen von Vertretern der Archaeobakterien, Proteobakterien, Actinobakterien, Pflanzen und Protisten ein. Das Netzwerk (Abbildung 5.15) zeigt, dass sich die elf Phosphofruktokinasen aus *Trichomonas vaginalis* in zwei Gruppen einteilen lassen können. Dabei gruppieren die PFKs, die eine Länge von 425 bis 434 Aminosäuren aufweisen zu einer Gruppe: „lange PFKs“. Die andere Gruppe machen die deutlich kürzeren PFKs aus (323 bis 326 Aminosäuren). Sie werden daher als

„kurze PFKs“ bezeichnet. Beide Gruppen der PFKs sind anderen Gruppen ähnlicher als sie es untereinander sind. So sind die kurzen PFKs denen aus Archaeobakterien ähnlich und die langen PFKs denen aus Pflanzen und  $\alpha$ -Proteobakterien.



**Abbildung 5.15:** Phylogenetisches Netzwerk von Sequenzen von PPi-abhängigen Phosphofruktokinase. Die wissenschaftlichen Namen der ins Netzwerk eingegangenen Organismen und die Zugangsnummern sind im Anhang in der Tabelle 7.2 zu finden.

## 5.2 Interne Targetingsignale hydrogenosomaler Matrixproteine

Neueste Studien zum Proteinimport von Matrixproteinen in Hydrogenosomen zeigen, dass der Import nicht dem klassischen Proteinimportmuster entspricht, wie es z.B. bei Mitochondrien der Fall ist. So scheinen nicht nur N-terminale, sondern auch interne Signale für den Import in die Organellen verantwortlich zu sein (Mentel *et al.*, 2008). Um die internen Targetingsignale besser charakterisieren zu können, wurden zwischen zwei sich im Importverhalten unterscheidenden Thioredoxin Reduktase Proteinen Sequenzblöcke durch Overlap extension PCR ausgetauscht. Dabei handelte es sich um TrxRh1- $\Delta$ 10 und TrxRh2. TrxRh1- $\Delta$ 10 wird mit entferntem N-Terminus nicht mehr in die Hydrogenosomen importiert, andererseits aber wird TrxRh2 ohne erkennbare N-terminale Verlängerung in die Hydrogenosomen importiert. So scheint TrxRh2 interne Targetingsignale zu besitzen (Mentel *et al.*, 2008). Um die Targetingsignale näher eingrenzen zu können, wurden Sequenzblöcke anhand vorhandener Sekundärstrukturen ermittelt, die miteinander getauscht wurden. Die erstellten Konstrukte wurden in *Trichomonas vaginalis* homolog exprimiert. Anhand der Lokalisation in der Zelle sollte eine Importkompetenz ermittelt werden, d.h. ob das TrxR-Fusionsprodukt in die Hydrogenosomen transportiert wird oder nicht.

### 5.2.1 Einteilung der auszutauschenden Sequenzblöcke

Die zwischen den Thioredoxin Reduktasen TrxRh1- $\Delta$ 10 (wird nicht importiert; Abbildung 3.7, links) und TrxRh2 (wird importiert; Abbildung 3.7, rechts) auszutauschenden Sequenzblöcke wurden anhand von Sekundärstrukturen ermittelt. Ein internes Targetingsignal könnte über die komplette Sequenz verteilt vorliegen, es könnte aber auch assoziiert mit einem definierten Bereich oder in einer Sekundärstruktur vorliegen. Die Adenylat Kinase des mitochondrialen Intermembranraums der Hefe hat ein internes Targetingsignal, das assoziiert mit einer amphipathischen Helix in einem 40 Aminosäuren langen Bereich ist. Diese Helix ist für den Transport in die Mitochondrien ausreichend, aber nicht für eine korrekte submitochondriale

Lokalisierung (Schricker *et al.*, 2002). Ein ähnliches Motiv in hydrogenosomalen Matrixproteinen könnte ebenfalls ein Importsignal beinhalten.

Sekundärstrukturen in den Sequenzen der Thioredoxin Reduktasen TrxRh1- $\Delta$ 10 und TrxRh2 wurden mit den Programmen PredictProtein (Rost *et al.*, 2004) und Jpred (Cole *et al.*, 2008) ermittelt (Kapitel 4.10). Dabei lieferten beide Programme sehr ähnliche Voraussagen über die Positionen von  $\alpha$ -Helices (Abbildung 5.16).

TrxRh1- $\Delta$ 10	MYSTDDDDDEMFWGDISKKFQPKSIDWSKAPLYDVIILGSGPAGSTAALYSARAALKTLVFHGHLLGGQLT
TrxRh2	-----MSGDIDWTKAETVDIAIIGSGPEGSTAALYAARAGFKVIVLHGEVPGGQLT
TrxRh1- $\Delta$ 10	TTTEIENFPFGFTGTGTNLVNKIQTQATAAGAIYKKEsitKVNLTSPKRIETDLGNAYLAHSII IATGANPR
TrxRh2	TTTELENFPGWKGTGPEGLVEAIEKQATEAGAELYKEVVTKVDFSVNPKLLSTDM DTHYKARSVIVATGAKAL
TrxRh1- $\Delta$ 10	FLSLKNEENFRNRGLCVCATCDGALYANKDVAVVGGGDSAVHESIYLSNICSSVKLFVRSSELRASAAAMKQV
TrxRh2	YLGLPNEERLKGKGVSGCATCDGPLYKGDVVVGGGDAAAEEAIFLSKICKSVKLVHRRDQLRASLPMPKR
TrxRh1- $\Delta$ 10	LAKSTVEVIYNTEIKGYLGQQFLTAVDTKNSKTGEVKRYKLSAVFLAIGQN PATKEFEGQLELDKNKYIVLK
TrxRh2	VEASSIQMIWNTVIEDVLGENKVTGVKVNVTNEVSEIPCDGLFVAIGHKPATEVFKDYLTDEQGYFLTN
TrxRh1- $\Delta$ 10	NGAETSVKGVFAAGDVANPEYRQAIYAAGTGCQAALQAEKYISQVKAI
TrxRh2	GTPVTSIPGVFVCGDCADRHYRQAITSaatGCQAALLAEKYLTD----
TrxRh1- $\Delta$ 10	MYSTDDDDDEMFWGDISKKFQPKSIDWSKAPLYDVIILGSGPAGSTAALYSARAALKTLVFHGHLLGGQLT
TrxRh2	-----MSGDIDWTKAETVDIAIIGSGPEGSTAALYAARAGFKVIVLHGEVPGGQLT
TrxRh1- $\Delta$ 10	TTTEIENFPFGFTGTGTNLVNKIQTQATAAGAIYKKEsitKVNLTSPKRIETDLGNAYLAHSII IATGANPR
TrxRh2	TTTELENFPGWKGTGPEGLVEAIEKQATEAGAELYKEVVTKVDFSVNPKLLSTDM DTHYKARSVIVATGAKAL
TrxRh1- $\Delta$ 10	FLSLKNEENFRNRGLCVCATCDGALYANKDVAVVGGGDSAVHESIYLSNICSSVKLFVRSSELRASAAAMKQV
TrxRh2	YLGLPNEERLKGKGVSGCATCDGPLYKGDVVVGGGDAAAEEAIFLSKICKSVKLVHRRDQLRASLPMPKR
TrxRh1- $\Delta$ 10	LAKSTVEVIYNTEIKGYLGQQFLTAVDTKNSKTGEVKRYKLSAVFLAIGQN PATKEFEGQLELDKNKYIVLK
TrxRh2	VEASSIQMIWNTVIEDVLGENKVTGVKVNVTNEVSEIPCDGLFVAIGHKPATEVFKDYLTDEQGYFLTN
TrxRh1- $\Delta$ 10	NGAETSVKGVFAAGDVANPEYRQAIYAAGTGCQAALQAEKYISQVKAI
TrxRh2	GTPVTSIPGVFVCGDCADRHYRQAITSaatGCQAALLAEKYLTD----

**Abbildung 5.16:** Von den Programmen PredictProtein (Rost *et al.*, 2004) und Jpred (Cole *et al.*, 2008) vorausgesagte Sekundärstrukturen ( $\alpha$ -Helices) für die beiden Thioredoxin Reduktasen TrxRh1- $\Delta$ 10 und TrxRh2 (Mentel *et al.*, 2008). Von PredictProtein vorausgesagte  $\alpha$ -Helices sind grün hinterlegt, während die von Jpred vorausgesagten violett hervorgehoben sind.

Die Positionen der von beiden Programmen vorausgesagten Sekundärstrukturen unterscheiden sich kaum, so dass aus beiden Voraussagen ein Konsensus gebildet werden konnte. Abbildung 5.17 zeigt ein Alignment beider Thioredoxin Reduktase Sequenzen, in denen die  $\alpha$ -Helices grau hinterlegt sind. Aufgrund der Verteilung der

$\alpha$ -Helices wurden drei auszutauschende Sequenzblöcke gewählt und in dem Alignment mit verschiedenen Farben markiert.

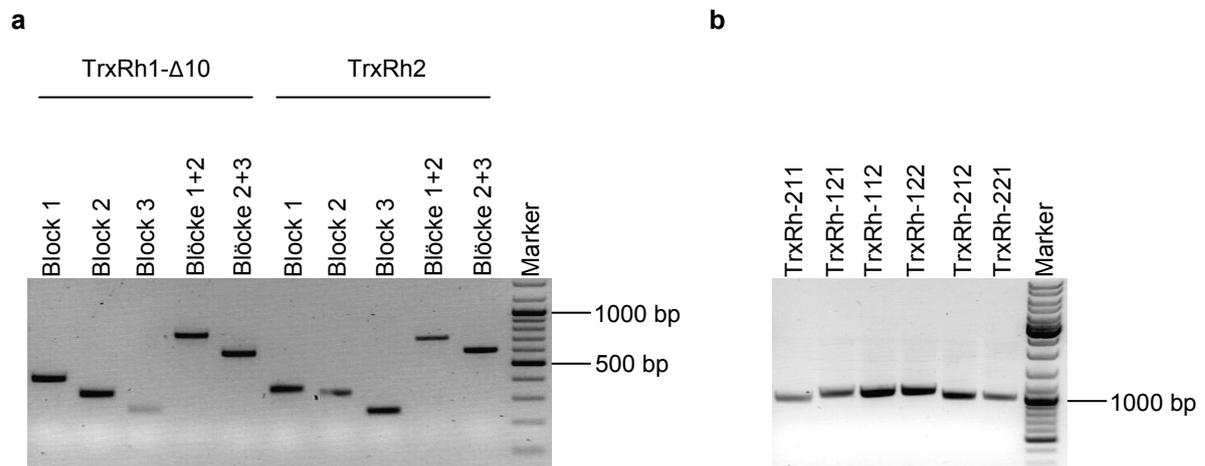
TrxRh1- $\Delta$ 10	MYSTDDDDDEMFVWGDISKKFQPKSIDWSKAPLYDVIILGSGPAGSTAAL	050
TrxRh2	-----MSGDIDWTKAETVDIAIIGSGPGGSTAAL	029
	. .***:** * : * :****.*****	
TrxRh1- $\Delta$ 10	YSARAALKTLVFHGHLLGGQLTTTTEIENFPGFCTGTNLVNKIQTQATA	100
TrxrH2	YAARAGFKVIVLHGEVPGGQLTTTTELENFPGWKGTGPGLEAIEKQATE	079
	*:***.:*.:*:*:*.: *****:*****:***.***:*.***	
TrxRh1- $\Delta$ 10	AGAIYKESITKVNLTTSKRIETDLGNAYLAHSIIATGANPRFLSLKN	150
TrxRh2	AGAELYKVEVTKVDFSVNPKLLSTDMETHYKARSVIVATGAKALYLGLPN	129
	*** ** * :***:..** :.***:. * * :*:*:*****:. :*. * *	
TrxRh1- $\Delta$ 10	EENFRNRGLCVCATCDGALYANKDVAVVGGGDSAVHESIYLSNICSSVKL	200
TrxRh2	EERLKGKGVSGCATCDGPLYKGDVVVGGGDAAAEEAIFLSKICKSVKL	179
	**..:..*:. *****.*.***.*****:*. * :*:*:*.***	
TrxRh1- $\Delta$ 10	FVRSSELASAAMKQVLAKSTVEVIYNTEIKGYLGQOFLTAVDTKNSKTG	250
TrxRh2	VHRRDQLRASLPMRKRVEASSIQMIWNTVIEDVLGENKVTGVKKNVVTN	229
	. * :****. * : : * : : : * : * * : * : : * : * . * . * *	
TrxRh1- $\Delta$ 10	EVKRYKLSAVFLAIGQNPATKEFEGQLELDKNKYIVLKNGAETSVKGVFA	300
TrxRh2	EVSEIPCDGLFVAIGHKPATEVFKDYLOTDEQGYFLTNGTPVTSIPGVFV	279
	**.. ..*:***:***: *:. * : * : : * : : .. * : * * .	
TrxRh1- $\Delta$ 10	AGDVANPEYRQAIYAAGTGCQAALQAEKYISQVKAI	336
TrxRh2	CGDCADRHYRQAITSAAATGCQAALLAEKYLTD----	311
	.** * : .***** :*.***** *****:..	

**Abbildung 5.17:** Clustal W-Alignment der Thioredoxin Reduktasen TrxRh1- $\Delta$ 10 (wird in das Hydrogenosom nicht importiert; Abbildung 3.7) und TrxRh2 (wird in das Hydrogenosom importiert; Abbildung 3.7). Potentielle  $\alpha$ -Helices, die mithilfe der Programme PredictProtein und Jpred vorhergesagt wurden, sind grau markiert. Drei Sequenzblöcke, die gegeneinander ausgetauscht werden sollen, um Segmente in der Sequenz von TrxRh2 zu ermitteln, die interne hydrogenosomale Targetingsignale enthalten, sind farbig hinterlegt. \* kennzeichnet identische Aminosäuren, während : sehr ähnliche und . ähnliche Aminosäuren markieren.

### 5.2.2 Reziproker Austausch der Sequenzblöcke zwischen TrxRh1- $\Delta$ 10 und TrxRh2 mittels Overlap extension PCR

Es wurden sechs Fusionsproteine durch den Austausch der ermittelten Sequenzblöcke (Abbildung 5.17) zwischen den Thioredoxin Reduktasen TrxRh1- $\Delta$ 10 und TrxRh2 erstellt. Dazu wurde die Overlap extension PCR verwendet (Kapitel 4.8.3.3). Die erstellten sechs Konstrukte wurden wie folgt benannt: TrxRh-211, TrxRh-121,

TrxRh-112, TrxRh-122, TrxRh-212 und TrxRh-221. Die Bezeichnung TrxRh-211 bedeutet, dass bei diesem Fusionsprotein der erste Sequenzblock, ausgehend vom N-Terminus, von TrxRh2 mit dem zweiten und dritten Sequenzblock von TrxRh1- $\Delta$ 10 fusioniert wurde (Abbildung 4.1). Die Bezeichnung der anderen Konstrukte erfolgte analog. Durch PCRs (Kapitel 4.8.3.1) mit den entsprechenden Oligonukleotiden (Kapitel 4.4) wurden die Sequenzblöcke von TrxRh1- $\Delta$ 10 und TrxRh2 aus schon vorliegender Plasmid-DNA (Mentel *et al.*, 2008) amplifiziert. Ebenso wurden aus beiden Thioredoxin Reduktase Sequenzen die Blöcke 1 und 2 bzw. 2 und 3 zusammenhängend fusioniert. Durch zweckmäßige Auswahl der Oligonukleotide wurden an den Blöcken bei der PCR Überhänge angehängen, die homolog zu dem Block waren, mit dem sie fusioniert werden sollten. Durch weitere PCRs wurden die Blöcke fusioniert (Kapitel 4.8.3.3). Abbildung 5.18a zeigt die Trennung der einzelnen Blöcke. Die bei der Fusion der einzelnen Blöcke entstandenen Konstrukte sind in Abbildung 5.18b dargestellt.



**Abbildung 5.18:** Amplifizierte Sequenzblöcke aus den Thioredoxin Reduktase-Sequenzen TrxRh1- $\Delta$ 10 und TrxRh2 (Mentel *et al.*, 2008).

a: Einzelne Sequenzblöcke beider Thioredoxin Reduktasen getrennt in einem 2%igen Agarosegel. TrxRh1- $\Delta$ 10: Block 1 (411 bp); Block 2 (339 bp); Block 3 (258 bp); Blöcke 1+2 (750 bp) und Blöcke 2+3 (597 bp). TrxRh2: Block 1 (348 bp); Block 2 (339 bp); Block 3 (246 bp); Blöcke 1+2 (687 bp) und Blöcke 2+3 (585 bp); Marker: DNA-Größenmarker [bp] (Fermentas).

b: Die durch Fusion der entsprechenden Blöcke aus Abbildung 5.18a entstandenen Konstrukte getrennt in einem 1%igen Agarosegel. TrxRh-211 (945 bp); TrxRh-121 (1008 bp); TrxRh-112 (996 bp); TrxRh-122 (996 bp); TrxRh-212 (933 bp); TrxRh-221 (945 bp); Marker: DNA-Größenmarker [bp] (Fermentas).

Durch eine nestedPCR (Kapitel 4.8.3.2) – als Matrize wurden die Fusionsprodukte der Abbildung 5.18b verwendet – wurden dem DNA-Fragment spezielle Bindungsstellen für die späteren Rekombinationen in den *Trichomonas vaginalis* Expressionsvektor pTagvag2 (Kapitel 4.8.4) angehängen. Die Sequenzen der Fusionsprodukte wurden überprüft (Kapitel 4.8.5). Die Auswertungen der Sequenzierungen ergaben, dass alle Sequenzen richtig waren.

### **5.2.3 Herstellung der Expressionsvektoren mittels Rekombinationen**

Die Herstellung von *Trichomonas vaginalis* Expressionsvektoren zur homologen Expression der Thioredoxin Reduktase Konstrukte erfolgte analog zur Herstellung von Expressionsvektoren, die glykolytische Enzyme enthielten (Kapitel 5.1.1.4). Dadurch lagen die Thioredoxin Reduktase Konstrukte mit einem C-terminalen HA-Tag in dem Vektor Tagvag2 vor.

Die Herstellung der Expressionsvektoren wurde anhand einer PCR überprüft (Kapitel 4.8.3.1). Die Sequenz eines Thioredoxin Reduktase Konstrukts wurde stets mit seinem C-terminalen HA-Tag mithilfe der entsprechenden Oligonukleotide (Kapitel 4.4) amplifiziert. Bei einer Trennung der PCR-Produkte in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid ergab sich für das jeweilige Enzym ein Bild, das Abbildung 5.18b zeigt. Daher war von einer erfolgreichen Rekombination und folgedessen auch mit einer C-terminalen Markierung der Sequenz mit dem HA-Tag auszugehen.

### **5.2.4 Homologe Expression der Thioredoxin Reduktase Konstrukte in *Trichomonas vaginalis***

#### **5.2.4.1 Transformation von *Trichomonas vaginalis* mittels Elektroporation**

Jedes hergestellte HA-markierte Thioredoxin Reduktase Konstrukt (Kapitel 5.2.3) wurde in *Trichomonas vaginalis* T1-Zellen homolog exprimiert. Die Transformation der Zellen erfolgte durch Elektroporation (Kapitel 4.7.4). Der Transformationserfolg wurde anhand einer PCR überprüft, bei der aufgeschlossene Zellen von *Trichomonas*

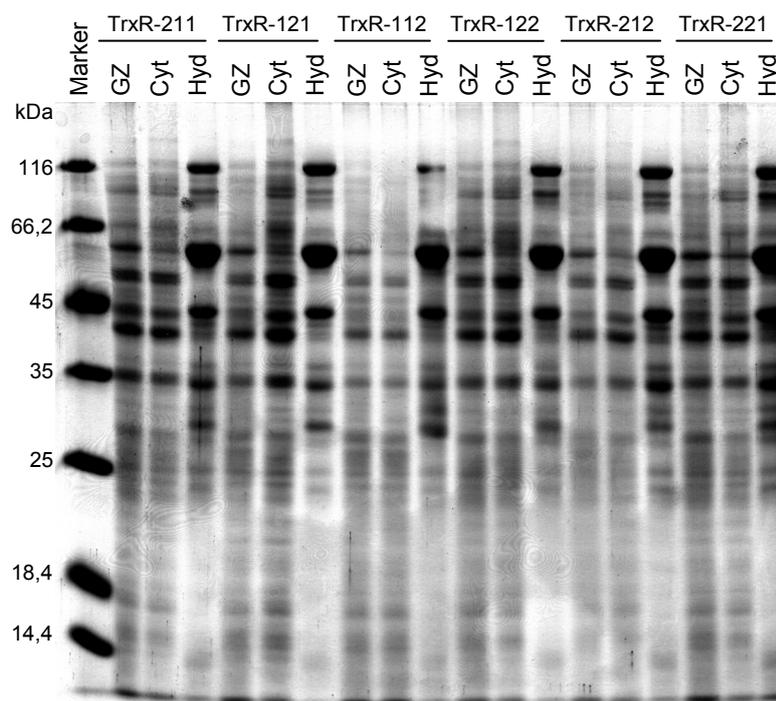
*vaginalis* als Matrize dienten (Kapitel 4.8.3.1). Der Zellaufschluß erfolgte mit 1,5 ml Kultur, die pelletiert wurde, in H<sub>2</sub>O aufgenommen und durch wiederholtes schnelles Erhitzen und Abkühlen in einem Thermocycler aufgeschlossen wurde. Von der Zellsuspension wurde 1 µl als Matrize verwendet. Aus dem Expressionsvektor pTagvag2, der durch die Elektroporation in die Zellen hineingeschleust werden sollte, wurde die Sequenz eines Thioredoxin Reduktase Konstrukts mit seinem C-terminalen HA-Tag mithilfe der entsprechenden Oligonukleotide (Kapitel 4.4) amplifiziert. Die Produkte der PCR wurden in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid getrennt. Bei einer erfolgreichen Einschleusung des pTagvag2-Vektors und damit einer Transformation der *Trichomonas vaginalis* T1-Zellen entsprach das Trennungsmuster für das entsprechende Enzym demjenigen in Abbildung 5.18b. Das Ergebnis konnte für jedes Thioredoxin Reduktase Konstrukt erzeugt und beobachtet werden.

#### **5.2.4.2 Lokalisationsstudien mittels Western Blot Analysen**

Die Lokalisation der Thioredoxin Reduktase Konstrukte bei *Trichomonas vaginalis* wurde durch Western-Blot Analysen bestimmt. Dazu wurden transformierte *Trichomonas vaginalis*-Kulturen, die jeweils ein Thioredoxin Reduktase Konstrukt mit einem C-terminalen HA-Tag homolog exprimierten, subzellulär fraktioniert (Kapitel 4.7.5). Die erhaltenen Fraktionen (Gesamtzellextrakt, Cytosol und Hydrogenosomen) wurden auf ihre Reinheit mittels Enzymaktivitätstests von Markerenzymen überprüft (Kapitel 4.9.7) und in einer SDS-PAGE getrennt (Kapitel 4.9.3). Die getrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Kapitel 4.9.5) und der C-terminale HA-Tag der homolog exprimierten Thioredoxin Reduktase Konstrukte wurde durch eine Immunodetektion nachgewiesen (Kapitel 4.9.6). Auf dieser experimentellen Basis konnte ermittelt werden, in welcher Fraktion das markierte Thioredoxin Reduktase Konstrukt vorhanden war.

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

Die durch subzelluläre Fraktionierung (Kapitel 4.7.5) von ein Thioredoxin Reduktase Konstrukt mit C-terminalem HA-Tag exprimierenden *Trichomonas vaginalis*-Zellen erhaltenen drei Fraktionen (Gesamtzellextrakt, Cytosol und Hydrogenosomen) wurden in 12%igen SDS-Gelen getrennt (Kapitel 4.9.3). Von jeder erhaltenen Fraktion wurden je 20 µg aufgetragen (Abbildung 5.19).

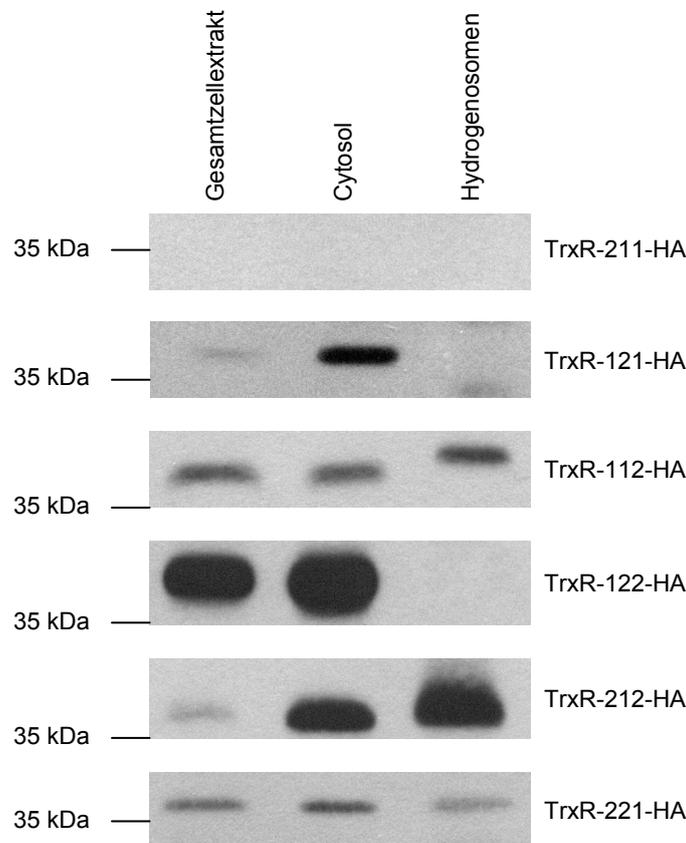


**Abbildung 5.19:** 12%ige, Coomassie-gefärbte SDS-PAGE subzellulärer Fraktionen von TrxR-211-HA (36,6 kDa), TrxR-121-HA (39,1 kDa), TrxR-112-HA (38,6 kDa), TrxR-122-HA (38,6 kDa), TrxR-212-HA (36,1 kDa) und TrxR-221-HA (36,6 kDa) exprimierenden *Trichomonas vaginalis*-Zellen. Es wurden von jeder Fraktion jeweils 20 µg Protein aufgetragen. Cyt: Cytosol, GZ: Gesamtzellextrakt, Hyd: Hydrogenosomen; Marker: Protein Größenmarker (Fermentas) [kDa].

### 5.2.4.4 Western Blot mit Immunodetektion des HA-Tags

Die in 12%igen SDS-Gelen (Kapitel 4.9.3) getrennten Proteine von Fraktionen von ein Thioredoxin Reduktase Konstrukt mit C-terminalem HA-Tag exprimierenden *Trichomonas vaginalis*-Zellen (Gesamtzellextrakt, Cytosol und Hydrogenosomen) wurden auf Nitrocellulosemembranen transferiert (Western Blot, Kapitel 4.9.5) und anschließend mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen den C-terminalen HA-Tag

detektiert. Die Signale wurden mit Chemilumineszenzfilmen detektiert (Abbildung 5.20)



**Abbildung 5.20:** Immunodetektion subzellulärer Fraktionen von transformierten *Trichomonas vaginalis*-Kulturen mit Antiserum gegen den C-terminalen HA-Tag des exprimierten Proteins. Es wurden jeweils 20 µg der drei Fraktionen (Gesamtzellextrakt, Cytosol und Hydrogenosomen) aufgetragen. TrxR-211-HA (36,6 kDa); TrxR-121-HA (39,1 kDa); TrxR-112-HA (38,6 kDa) TrxR-122-HA (38,6 kDa); TrxR-212-HA (36,1 kDa); TrxR-221-HA (36,6 kDa).

Es konnte ausschließlich für die Konstrukte TrxR-212 und TrxR-221 ein Import in die Hydrogenosomen nachgewiesen werden. Denn nur hier konnten in der hydrogenosomalen Fraktion Signale gegen den C-terminalen HA-Tag detektiert werden. Das erhaltene Signal für das Konstrukt TrxR-112 in der hydrogenosomalen Fraktion ist um einige kDa größer als die für das Konstrukt als wahrscheinlich angenommene Größe (38,6 kDa) und wird daher als unspezifisches Signal gewertet. Dieses Artefakt eines Signals, das bei einem größeren Molekulargewicht auftrat, zeigte sich auch bei der Immunodetektion der Pyruvat Kinase (vgl. Kapitel 6.2 und Abbildung 5.6) Für das Konstrukt TrxR-211 konnte bislang kein Signal detektiert

werden. Die restlichen Konstrukte wurden ausschließlich im Gesamtzellextrakt und im Cytosol lokalisiert. Abbildung 5.21 faßt alle relevanten Ergebnisse der Western Blot Analyse graphisch zusammen.



**Abbildung 5.21:** Importkompetenzen in die Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* der durch reziproken Austausch von Sequenzblöcken konstruierten Thioredoxin Reduktasen. Die Konstrukte TrxR-121, TrxR-112 und TrxR-122 werden nicht in die Hydrogenosomen importiert, die Konstrukte TrxR-212 und TrxR-221 werden in das Organell transportiert. Für TrxR-211 konnte bislang noch keine definierte Aussage formuliert werden. + Import in die Hydrogenosomen; - kein Import in die Hydrogenosomen zu beobachten.

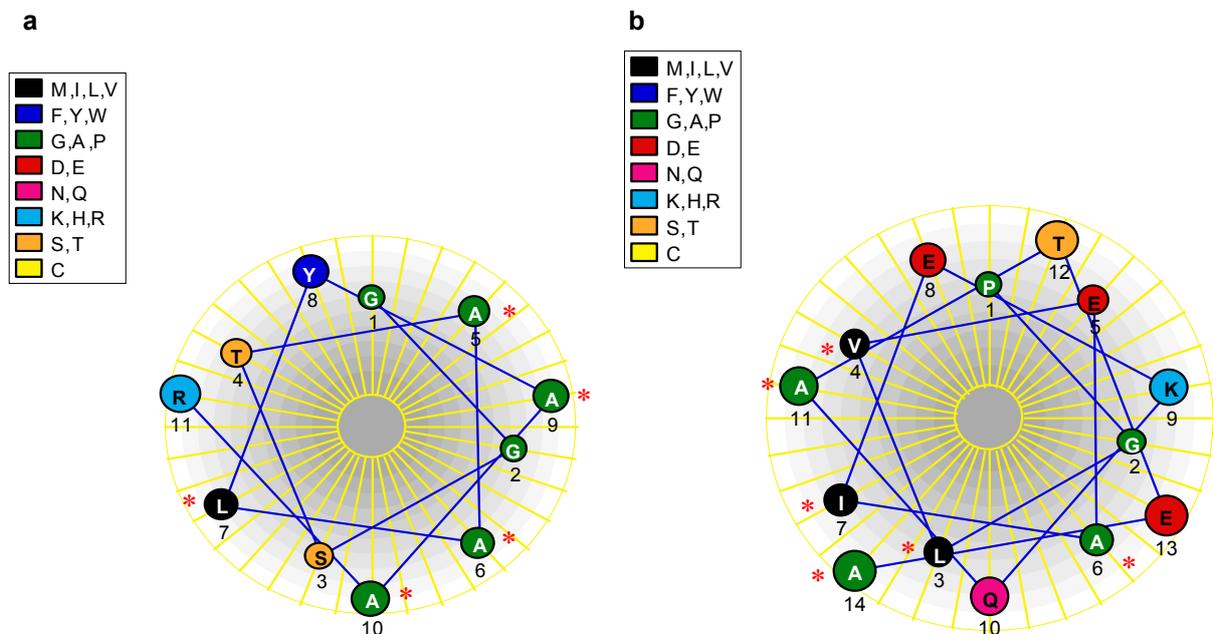
### 5.2.5 Untersuchungen zu Sekundärstrukturen in den Thioredoxin Reduktasen TrxRh2 und TrxRh1-Δ10

In Anlehnung an Schrickler *et al.* (2002) wurde der erste Sequenzblock des Proteins TrxRh2 auf amphipathische  $\alpha$ -Helices überprüft. Diese gelten als Signale für den Import in Mitochondrien und durch Mitochondrienmembranen (Schrickler *et al.*, 2002). Es wurden mit den Programmen PredictProtein (Rost *et al.*, 2004) und Jpred (Cole *et al.*, 2008) zwei Helices ermittelt (Kapitel 5.2.1). Die Ergebnisse unterschieden sich kaum (Abbildung 5.16), so dass ein Konsensus von beiden Resultaten gebildet werden konnte. Abbildung 5.22 zeigt die Aminosäuresequenz des Sequenzblocks 1 von TrxRh2 mit den ermittelten  $\alpha$ -Helices.

MSGDIDWTKAETVDIAIIGSGP **GGSTAALYAAR**AGFKVIVLHGEVPGGQLTTTTELENFPGWKGTG **PGLVEAIEK**  
**QATEA**GAEYKYEVVTKVDFSVNPKLLSTDM DTHYKARSVIV

**Abbildung 5.22:** Positionen der  $\alpha$ -Helices in dem Sequenzblock 1 der Thioredoxin Reduktase TrxRh2, die mit den Programmen PredictProtein (Rost *et al.*, 2004) und Jpred (Cole *et al.*, 2008) ermittelt wurden. Die Helices sind grau hinterlegt.

Ob es sich bei den  $\alpha$ -Helices um amphipathische Helices handelt, in der positiv geladene Reste an einer Seite der Helix liegen und ungeladene hydrophobe Aminosäuren auf der gegenüberliegenden Seite angeordnet sind, wurde mit dem Programm DNASTAR (PROTEAN™) untersucht (Kapitel 4.10). Abbildung 5.23 zeigt die graphische Darstellung der  $\alpha$ -Helices, das „*helical wheel*“.



**Abbildung 5.23:** *Helical wheel*-Projektion der Aminosäuresequenzen der beiden identifizierten  $\alpha$ -Helices im Sequenzblock 1 des Proteins TrxRh2 (Abbildung 5.22). a: *Helical wheel* der ersten identifizierten Helix. b: *Helical wheel* der zweiten identifizierten Helix.

In beiden graphischen Darstellungen befindet sich der N-Terminus der Helices bei Position 1. Die unterschiedlichen Aminosäuren sind gemäß der Legende gefärbt. Hydrophobe Aminosäurereste sind durch ein Sternchen (\*) markiert. Die Projektionen wurden mit dem Programm PROTEAN™ der Software Lasergene 8 von DNASTAR erstellt.

Die erste identifizierte  $\alpha$ -Helix ist amphipatisch und wird von elf Aminosäuren ausgebildet. Sie reicht von Aminosäure 23 bis zur Aminosäure 33, ausgehend vom N-Terminus. Die entsprechende Struktur der zweiten  $\alpha$ -Helix ist weniger amphipa-

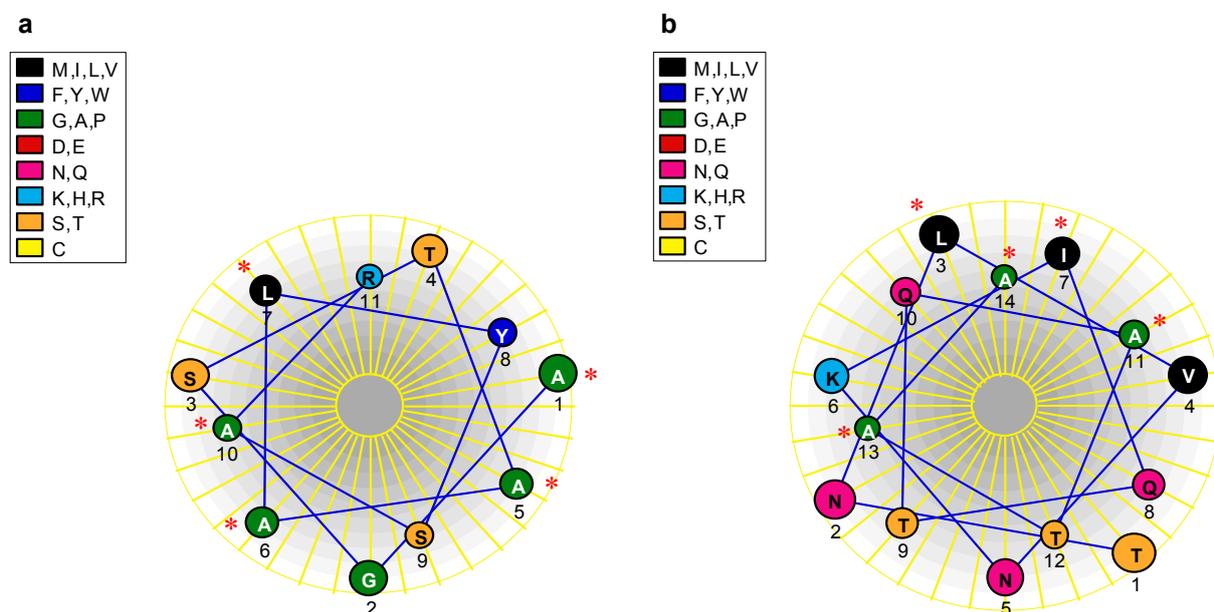
thisch als die der ersten und drei Aminosäuren länger. Sie erstreckt sich von Aminosäure 67 bis zur Aminosäure 80, ausgehend vom N-Terminus.

Auch der erste Sequenzblock des Proteins TrxRh1- $\Delta$ 10 wurde auf amphipathische  $\alpha$ -Helices überprüft. Mit den Programmen PredictProtein (Rost *et al.*, 2004) und Jpred (Cole *et al.*, 2008) wurden zwei  $\alpha$ -Helices ermittelt (Kapitel 5.2.1). Ein Konsensus der beiden Resultate zeigt Abbildung 5.24.

```
MYSTDDDDDEMFWGDISKKFQPKSIDWSKAPLYDVIILGSGPAGSTAALYSARAALKTLVFGHLLGGQLTTTT
EIEFPGFTGTGTNLVNKIQTQATAAGAIYKKEISITKVNLTTSFKRIETDLGNAYLAHSIII
```

**Abbildung 5.24:** Positionen der  $\alpha$ -Helices in dem Sequenzblock 1 der Thioredoxin Reduktase TrxRh1- $\Delta$ 10, die mit den Programmen PredictProtein (Rost *et al.*, 2004) und Jpred (Cole *et al.*, 2008) ermittelt wurden. Die Helices sind grau hinterlegt.

Die vorhergesagten  $\alpha$ -Helices wurden analog zu denen aus TrxRh2 auf Amphipathizität überprüft. Abbildung 5.25 zeigt die von dem Programm ausgegebenen graphischen Darstellungen der  $\alpha$ -Helices.



**Abbildung 5.25:** Helical wheel-Projektion der Aminosäuresequenzen der beiden identifizierten  $\alpha$ -Helices im Sequenzblock 1 des Proteins TrxRh1- $\Delta$ 10 (Abbildung 5.24). a: Helical wheel der ersten identifizierten Helix. b: Helical wheel der zweiten identifizierten Helix.

Hydrophobe Aminosäurereste sind durch ein Sternchen (\*) markiert. Die Projektionen wurden mit dem Programm PROTEAN<sup>TM</sup> der Software Lasergene 8 von DNASTAR erstellt.

Die erste identifizierte  $\alpha$ -Helix wird von elf Aminosäuren ausgebildet und ist nicht amphipatisch. Sie reicht von Aminosäure 44 bis zur Aminosäure 54, ausgehend vom N-Terminus. Die zweite vorausgesagte  $\alpha$ -Helix ist dagegen amphipatisch. Sie erstreckt sich von Aminosäure 85 bis zur Aminosäure 101, ausgehend vom N-Terminus, und ist somit um drei Aminosäuren länger als die erste  $\alpha$ -Helix.

## 6. DISKUSSION

Durch den endosymbiontischen Ursprung der verschiedenen Formen der Mitochondrien (aerobe und anaerobe Mitochondrien, Hydrogenosomen und Mitosomen) ist die eukaryotische Zelle kompartimentiert. Ihr Zellinnenraum ist in weitere Räume unterteilt, in denen verschiedene Stoffwechselwege ablaufen. So läuft beispielsweise die Glykolyse im Cytosol der Zelle ab, und Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, wird in die Mitochondrien transportiert, wo es Ausgangspunkt des Energiestoffwechsels ist. Im Cytosol der Zelle lokalisierte Enzyme liegen jedoch nicht, wie lange Zeit angenommen (Kopac, 1938) gelöst vor, sondern interagieren oft mit dem zellulären Grundgerüst oder sind zu Multienzymkomplexen zusammengefaßt (Masters und Wilson, 1981). Besonders für den glykolytischen Stoffwechsel gibt es mehrere Berichte über eine Interaktion mit zellulären Bestandteilen. Glykolytische Enzyme interagieren mit den Membranen der Erythrocyten (Green *et al.*, 1965), mit Mikrofilamenten des Cytoplasmas (Masters, 1984) oder sind an die muskuläre Ultrastruktur angeheftet (Amberson *et al.*, 1965; Clarke und Masters, 1976). Auch für Mitochondrienmembranen sind Assoziationen mit glykolytischen Enzymen beschrieben worden (Conger *et al.*, 1971; Eldan und Blum, 1973; Srere, 1987; Giegé *et al.*, 2003; Brandina *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007).

Neben dem Energiestoffwechsel zeichnen sich die Mitochondrien durch das Vorhandensein einer Proteinimportmaschinerie aus. Während der Evolution vom Prokaryoten zum eukaryotischen Organell kam es zu einem teilweisen oder völligen Verlust des Organellengenoms; die Gene wurden an den Zellkern übertragen oder gingen verloren. Um dennoch weiterhin Proteine in dem Organell bereitstellen zu können, mußte sich vor dem Verlust eine Proteinimportmaschinerie entwickelt haben, die einen Transport von Proteinen in das Organell ermöglicht. Proteine, die in die Organellen importiert werden sollen, tragen Signalsequenzen, die den Import ermöglichen.

In dieser Dissertation wurde untersucht, ob die beschriebene Assoziation

glykolytischer Enzyme mit mitochondrialen Membranen auch bei den anaeroben Formen der Mitochondrien des Protisten *Trichomonas vaginalis* – den Hydrogenosomen – zu finden ist. Zudem wurden die Targetingsignale hydrogenosomaler Matrixproteine näher analysiert.

## **6.1 Der evolutive Ursprung der Glykolyse**

Das Bestreben eines jeden Organismus ist die Aufrechterhaltung von energie-liefernden Stoffwechselreaktionen. Bei diesem Prozess sind vor allem die Kohlenstoff-Verbindungen wichtig. Sie sind im Stoffwechsel der heterotrophen Lebewesen die häufigste Energiequelle: ihre oxidative Umsetzung liefert letztendlich ATP, den universellen Energieträger, welcher der Zelle zur Verfügung gestellt wird. Bei allen Eukaryoten ist die initialisierende Reaktionsfolge des Kohlenhydratabbaus die Glykolyse (Embden-Meyerhof-Parnas-Typ). Bei der Glykolyse werden zwei Moleküle des Energiespeichers ATP über die Oxidation von Glukose zu Pyruvat gewonnen (Fothergill-Gilmore und Michels, 1993; Hannaert *et al.*, 2000). Dieser anaerobe Prozeß, der im Cytosol der Zelle stattfindet, wurde bereits 1929 von Embden, Meyerhof und Parnas entdeckt (Cori, 1983), jedoch erst 1940 nahezu lückenlos erklärt (Cori, 1983; Planxton, 1996). Trotz des gleichartigen Embden-Meyerhof-Parnas-Typs der Glykolyse können bei Eukaryoten bestimmte, formal identische Reaktionen durch Enzyme katalysiert werden, die sich voneinander unterscheiden (Fothergill-Gilmore und Michels, 1993; Müller, 1998; Michels *et al.*, 2000; Henze *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001). Bei Prokaryoten ist die Diversität jedoch höher. Bei ihnen können verschiedene andere Stoffwechselreaktionen die Glykolyse ersetzen: so z.B. ein modifizierter Embden-Meyerhof-Weg, der Entner-Doudoroff-Weg, ein modifizierter Entner-Doudoroff-Weg („nicht-phosphorylierend“ oder „semi-phosphorylierend“) oder der Pentosephosphat-Weg (Verhees *et al.*, 2003; Siebers und Schönheit, 2005). Die Glykolyse kann bei Prokaryoten auch vollständig oder zumindest teilweise fehlen (Dandekar *et al.*, 1999) bzw. durch andere Wege

ersetzt werden (Martin und Russell, 2003).

Die fermentative ATP-Synthese – der glykolytische Stoffwechselweg – im Cytosol der Zelle wird klassischerweise als ursprünglichste Form des eukaryotischen Energiestoffwechsels verstanden (Margulis, 1970). Diese Annahme ist jedoch nur mit der nicht belegten Vermutung vereinbar, dass die Wirtszelle bei der Endosymbiose – aus welcher die Mitochondrien hervorgingen – ein heterotropher, anaerober und fermentierender Eukaryot war, der aus Archaeobakterien entstand (Doolittle, 1998). Neueste Untersuchungen zeigten jedoch, dass alle glykolytischen Enzyme, die bislang untersucht wurden, ihren eubakteriellen Homologen ähnlicher sind als ihren archaeobakteriellen (Liaud *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die kernkodierte glykolytischen Enzyme Errungenschaften von mitochondrialen Genomen sind, wobei die Gene zum Kern transportiert wurden, aber die Proteine nicht mehr in das Organell reimportiert werden, von dem sie ihre Gene erhielten (Liaud *et al.*, 2000). Die Beobachtung, dass die Gene der Glykolyse eubakteriellen Ursprungs sind, kann jedoch nur unter der Voraussetzung als wahrscheinlich verifiziert und als plausibel gelten, wenn der Wirt der mitochondrialen Symbiose nicht heterotroph, sondern strikt autotroph war und durch endosymbiontischen Gentransfer sowohl seinen glykolytischen Stoffwechsel als auch seine Heterotrophie von dem mitochondrialen Symbionten aufgrund von Selektion erlangte (Martin und Müller, 1998). Fragwürdig erscheint aber, weshalb keine Relikte der Glykolyse in dem Donororganell vorhanden sind (Fothergill-Gilmore und Michels, 1993). Es wurde nur die schon beschriebene Assoziation glykolytischer Enzyme mit der äußeren mitochondrialen Membran beobachtet (Conger *et al.*, 1971; Eldan und Blum, 1973; Srere, 1987; Giegé *et al.*, 2003; Brandina *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007).

Das relevante Ergebnis dieser Arbeit ist: Für die untersuchten glykolytischen Enzyme konnte nur für die Phosphofruktokinase eine Assoziation mit den hydrogenosomalen Membranen bei *Trichomonas vaginalis* nachgewiesen werden, die Ursache und Funktion dieser Assoziation bleiben jedoch offen.

## 6.2 Lokalisation der Glykolyse in Zellen von *Trichomonas vaginalis*

Unter dem Begriff »Glykolyse« wird ein klassischerweise im Cytosol der Zelle lokalisierter Stoffwechselweg verstanden (Brandina *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte eine cytosolische Lokalisation für die untersuchten glykolytischen Enzyme Glukokinase, Glukose-6-phosphat Isomerase, Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase, Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat Kinase, Enolase und Pyruvat Kinase bestätigt werden (Abbildung 5.6).

Das erste Enzym im Verlauf der Glykolyse in *Trichomonas vaginalis*, die Glukokinase (Wirtschaftler, 1954), hat als Heterodimer mit einem Molekulargewicht der Untereinheiten von 38 kDa und 40 kDa (Mertens und Müller, 1990) eine geringere Masse als typisch eukaryotische Hexokinasen. Die Masse dieser liegt bei 50 bis 100 kDa (Cárdenas *et al.*, 1998). Diese Masse der Glukokinase aus *Trichomonas vaginalis* steht in einem ähnlichen Verhältnis zu Glukokinasen und Fruktokinasen einiger Eubakterien (Bork *et al.*, 1993). Die Glukokinase von *Trichomonas vaginalis* kennzeichnet eine enge Substratspezifität. Eine ungewöhnliche Eigenschaft des Enzyms besteht darin, dass es nicht durch Verbindungen, die typische Hexokinasen regulieren, beeinflusst wird, sondern durch solche, die auf die Glukokinase von *Escherichia coli* einwirken (Mertens und Müller, 1990). Analysen von Aminosäuresequenzen zeigen, dass die Glukokinase aus *Trichomonas vaginalis* nah mit prokaryotischen Glukokinasen verwandt und kein Mitglied der eukaryotischen Hexokinase-Familie ist. Somit scheint, dass *Trichomonas vaginalis* das Enzym auf eine andere Art erworben hat als die meisten Eukaryoten (Wu *et al.*, 2001). In dieser Dissertation konnte eine cytosolische Lokalisierung der Glukokinase von *Trichomonas vaginalis* nachgewiesen werden (Abbildung 5.6).

Das zweite Enzym des glykolytischen Stoffwechsels in *Trichomonas vaginalis* ist die Glukose-6-phosphat Isomerase. Auch dieses Enzym konnte im Cytosol der Zelle lokalisiert werden (Abbildung 5.6). Sie ist 61,1 kDa groß und zeigt zu ihren Homologen in *Spironucleus barkhanus* und *Giardia intestinalis* 45% bzw. 40% Sequenzidentität (Henze *et al.*, 2001). Das Enzym ist der Gruppe II der von Nowitzki

*et al.* (1998) definierten drei Gruppen von Glukose-6-phosphat Isomerasen am ähnlichsten. Die Gruppe II umfaßt cyanobakterielle und chloroplastidäre (Spinat) Glukose-6-phosphat Isomerasen; die Gruppe I dagegen enthält Gene cytosolischer Glukose-6-phosphat Isomerasen der Eukaryoten und vieler Eubakterien. Gruppe III repräsentiert Glukose-6-phosphat Isomerasen mehrerer gram-positiver Eubakterien und deren Homologe im Genom des Archaeobakteriums *Methanococcus jannaschii*.

Samuel K. Wirschafter beschrieb 1954 erstmals die Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase in *Trichomonas vaginalis*. Das Enzym gehört zu den Metall-abhängigen FBAs (Baernstein, 1955) und kann – wie die FBA aus *Giardia lamblia* (Henze *et al.*, 1998) – der Klasse II der FBAs zugeordnet werden, die unter Beteiligung koordinierter zweiwertiger Metallionen (meistens  $Zn^{2+}$ ) agieren (Sánchez *et al.*, 2002). Bei Enzymen der Klasse I spielt ein konserviertes Histidin eine wichtige Rolle im Reaktionsmechanismus (Marsh und Lebherz, 1992). Im Gegensatz zu der Proteomanalyse der Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* (Pütz, 2007; Henze, 2008) konnte die FBA in dieser Dissertation nicht in der hydrogenosomalen Fraktion detektiert werden. Sie wurde ausschließlich in der cytosolischen Fraktion identifiziert (Abbildung 5.6). Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, dass es sich bei der FBA, die in der hydrogenosomalen Proteomanalyse gefunden wurde, um eine cytosolische Kontamination handelt.

Die Triosephosphat Isomerase ist ein Enzym, das keinen Kofaktor benötigt. Alle bislang untersuchten TPIs erwiesen sich als dimere Proteine mit identischen Untereinheiten von ca. 27 kDa (Fothergill-Gilmore und Michels, 1993). Wiederholte Versuche einer homologen Expression der Triosephosphat Isomerase in *Trichomonas vaginalis* blieben ohne Resultat; die Transformanden waren nicht lebensfähig. Die Zellen könnten das Plasmid bei dem Elektroschock nicht aufgenommen haben und somit keine Resistenz gegen das Antibiotikum zur Selektion (G418) aufgebaut haben und dann durch Zugabe von G418 abgetötet worden sein.

Bei *Trichomonas vaginalis* ist die PFK nicht ATP-abhängig wie bei den meisten Organismen, sondern Pyrophosphat ( $PP_i$ )-abhängig (Mertens *et al.*, 1989). Neben

*Trichomonas vaginalis* besitzen z.B. auch *Giardia lamblia* (Mertens, 1990), *Entamoeba histolytica* (Reeves *et al.*, 1974) und *Isotricha prostoma* (Mertens *et al.*, 1989) diesen PFK-Typ. PP<sub>i</sub>-PFKs katalysieren eine physiologisch reversible Reaktion (Mertens, 1991) und können im Gegensatz zu ATP-PFKs nur schwer eine entscheidende Funktion in der Regulation der Glykolyse ausüben (Fothergill-Gilmore und Michels, 1993). Für die in dieser Dissertation exprimierte Isoform der Phosphofruktokinase in *Trichomonas vaginalis* konnte keine Lokalisation im Cytosol ausgemacht werden (Abbildung 5.7). Dieses Ergebnis steht im Einklang zu der Proteomanalyse der Hydrogenosomen, in der PFKs identifiziert wurden (Pütz, 2007; Henze, 2008). In subzellulären Fraktionen transformierter Zellen konnte die PFK lediglich in der hydrogenosomalen Fraktion und im Gesamtzellextrakt nachgewiesen werden. Eine Detektion im Cytosol der Zelle war nicht möglich. Um Aussagen darüber machen zu können, ob die PFK in der Membranfraktion oder in der hydrogenosomalen Matrix vorhanden ist, wurden die Hydrogenosomen in Membranen und Matrix separiert. Eine Trennung der erhaltenen Proteinfractionen in einer SDS-PAGE mit anschließender Western Blot Analyse mit Immunodetektion zeigte, dass die PFK nicht in der Matrixfraktion vorhanden ist (Abbildung 5.10). Es wurde lediglich ein Signal in der Membranfraktion detektiert. So ergibt sich die Frage, ob die hier untersuchte Isoform der Phosphofruktokinase von *Trichomonas vaginalis* in den hydrogenosomalen Membranen verankert ist oder ob sie so stark mit der äußeren hydrogenosomalen Membran assoziiert ist, dass sie nicht durch die hier verwendete harsche Methode der Membranisolation von dieser gelöst werden konnte.

Die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase aus *Trichomonas vaginalis* ist spezifisch für NAD<sup>+</sup> und ähnelt in ihren katalytischen Eigenschaften denen glykolytischer GAPDHs anderer Organismen. Sie zeigt eine große Ähnlichkeit zu eubakteriellen und eukaryotischen GAPDH-Sequenzen, steht jedoch näher zu Homologen von Eubakterien als zu Homologen von Eukaryoten, unabhängig davon, ob sie Mitochondrien besitzen. Diese unerwartete direkte Relation kann auf einen horizontalen Gentransfer nach der Abzweigung des Asts der Parabasalia von dem der

Eukaryoten zurückzuführen sein (Markoš *et al.*, 1993). Es wurde in dieser Dissertation gezeigt, dass die GAPDH bei *Trichomonas vaginalis* ein im Cytosol der Zelle lokalisiertes Enzym ist (Abbildung 5.6).

Ein Monomer mit einer molekularen Masse von ca. 44 kDa ist die 3-Phosphoglycerat Kinase (Fothergill-Gilmore und Michels, 1993). Alle bislang untersuchten PGKs der höchsten phylogenetischen Gruppen, die Archaeobakterien eingeschlossen, sind Homologe (Fothergill-Gilmore und Michels, 1993) mit konservierten Aminosäuren in Bereichen, die für die Substratbindung und Katalyse relevant sind (Watson und Littlechild, 1990). In dieser Dissertation wurde die PGK im Cytosol von *Trichomonas vaginalis*-Zellen detektiert (Abbildung 5.6).

Es sind zwei Formen der Phosphoglycerat Mutase bekannt, die sich in ihrer Abhängigkeit von 2,3-Bisphosphoglycerat als Kofaktor unterscheiden. Diese beiden PGM-Typen sind weder von der Struktur her ähnlich, noch haben sie denselben Reaktionsmechanismus. Es gibt auch keine Sequenzähnlichkeiten zwischen den 2,3-Bisphosphoglycerat-abhängigen und -unabhängigen Typen (Fothergill-Gilmore und Watson, 1989, 1990; Stechmann *et al.*, 2006; Johnson und Schönheit, 2007). *Trichomonas vaginalis* besitzt eine Kofaktor-abhängige Phosphoglycerat Mutase (Carlton *et al.*, 2007). In einer phylogenetischen Analyse steht die PGM von *Trichomonas vaginalis* nahe zu ihren Homologen der Tiere (Hurtz, 2007). Der Versuch einer homologen Expression der Phosphoglycerat Mutase in *Trichomonas vaginalis* blieb erfolglos; es konnte keine Kultur etabliert werden. Die Zellen könnten bei der Transformation mittels Elektroporation das Plasmid nicht aufgenommen oder es relativ schnell wieder abgestoßen haben und konnten somit keine Resistenz zur Selektion aufbauen.

Die Enolase von *Trichomonas vaginalis* ist ein Enzym, dessen Aminosäuresequenz Ähnlichkeit zu anderen Enolasen von verschiedenen Gruppen von Organismen zeigt (Protisten, Hefen, Eubakterien und Metazoen). Ein besonderes Merkmal des Enzyms ist eine 38 Aminosäuren betragende Verlängerung am Aminoterminal, die keine Homologien zu anderen bekannten Enolase-Sequenzen zeigt (Mundodi *et al.*, 2008). Die homologe Expression der Enolase in *Trichomonas vaginalis* ließ keine Assoziation

des Enzyms mit den Hydrogenosomen erkennen (Abbildung 5.6). Dieses Ergebnis widerspricht der Proteomanalyse (Pütz, 2007; Henze, 2008), bei der die Enolase im hydrogenosomalen Proteom gefunden wurde. Hierbei muß es sich um eine cytosolische Kontamination gehandelt haben.

Die Pyruvat Kinase ist ein Tetramer mit einem Molekulargewicht von ungefähr 266 kDa und besteht aus Untereinheiten mit einer Größe von 53 und 56 kDa in äquivalenten Mengen. Sie wird bei *Trichomonas vaginalis* allosterisch reguliert und hat andere positive Effektoren (Ribose-5-phosphat und Glycerat-3-phosphat) als in anderen eukaryotischen Zellen (1,6-Bisphosphat und Fruktose-2,6-bisphosphat) (Mertens *et al.*, 1992). Für dieses Enzym wurde in dieser Dissertation eine rein cytosolische Lokalisation ermittelt. In der Western Blot Analyse wurde auch in der hydrogenosomalen Fraktion ein Signal detektiert (Abbildung 5.6). Dieses Signal ist jedoch bei einem größeren Molekulargewicht zu finden als die HA-markierte Pyruvat Kinase aufweist. Da dieser Artefakt auch bei der Immunodetektion des HA-Tags eines Fusionsproteins der Thioredoxin Reduktase auftrat (Abbildung 5.20), wurde das Signal auf unspezifische Antikörperbindung zurückgeführt.

Von den in dieser Dissertation erfolgreich in *Trichomonas vaginalis* homolog exprimierten glykolytischen Enzymen zeigte sich nur für die Phosphofruktokinase ein Signal in der hydrogenosomalen Fraktion. Die PFK konnte sogar ausschließlich in dieser Fraktion detektiert werden. Ein Signal im Cytosol wurde nicht registriert (Abbildung 5.5). Die Ergebnisse der Enzymassays (Reinheitsbestimmung; Abbildung 5.4) lassen sich nicht in den Western Blot Analysen wiederfinden. Die Enzymassays, bei denen die spezifischen Aktivitäten eines cytosolischen (Malat Dehydrogenase) und eines hydrogenosomalen Markerenzym (Malat Enzym) bestimmt wurden, zeigten eine Kontamination von cytosolischen Anteilen in der hydrogenosomalen Fraktion von ungefähr 15% auf. Der Grad der hydrogenosomalen Kontamination in der cytosolischen Fraktion lag ebenfalls bei 15%. In den Western Blot Analysen wurden jedoch für die cytosolisch lokalisierten Enzyme keine schwachen Signale in der hydrogenosomalen Fraktion und für die hydrogenosomal lokalisierte PFK kein schwaches

Signal in der cytosolischen Fraktion festgestellt. Um Aussagen darüber treffen zu können, ob die Reinheitsbestimmung mithilfe der Enzymaktivitätstests den tatsächlichen Reinheitsgrad widerspiegelt, hätten Western Blot Analysen, in denen die Malat Dehydrogenase und das Malat Enzyme detektiert werden, durchgeführt werden müssen.

Im Einklang zu den Ergebnissen der Western Blot Analyse mit anschließender Immunodetektion des durch den Expressionsvektor vermittelten C-terminalen HA-Tags (Abbildung 5.6 und Abbildung 5.7) steht der Nachweis des HA-Tags mithilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper (Abbildungen 5.8 und 5.9). Auch in diesen Experimenten konnte von den in dieser Dissertation untersuchten glykolytischen Enzymen nur für die Phosphofruktokinase eine hydrogenosomale Lokalisation gezeigt werden.

### 6.2.1 Phosphofruktokinase

Die Glykolyse ist der zentrale Stoffwechselweg im Kohlenhydratstoffwechsel, der in den meisten Lebewesen vorhanden ist. Bei Eukaryoten ist eine der bedeutsamen Veränderungen der klassischen Glykolyse (Embden-Meyerhof-Parnas-Typ) der Austausch der weitverbreiteten Phosphofruktokinase, die ATP als Phosphatdonor benutzt (ATP-PFK; EC 2.7.1.11), gegen die Form, die anorganisches Pyrophosphat verwendet (PP<sub>i</sub>-PFK; EC 2.7.1.90) (Mertens, 1991). Während die ATP-PFK die erste irreversible Reaktion der Glykolyse katalysiert und der wichtigste Kontrollpunkt des Stoffwechselwegs ist, kann die PP<sub>i</sub>-PFK im Gegensatz dazu keine Kontrolle über die Glykolyse ausüben, da ihre Reaktion reversibel ist (Mertens, 1991).

PP<sub>i</sub>-PFKs wurden zuerst 1974 bei *Entamoeba histolytica* entdeckt (Reeves *et al.*, 1974) und später auch in dem Bakterium *Propionibacterium shermanii* (Mertens, 1991), in dem photosynthetischen Protisten *Euglena gracilis* (Miyatake *et al.*, 1986) und in höher entwickelten Pflanzen (Carnal und Black, 1983). Außerdem wurden auch in den parasitären Protisten *Giardia intestinalis* (Mertens, 1990), *Tritrichomonas foetus* und *Trichomonas vaginalis* (Mertens *et al.*, 1989) PP<sub>i</sub>-PFKs nachgewiesen.

Vermutlich wird ATP durch  $PP_i$  als Phosphatdonor ersetzt, da bei der Glykolyse dadurch weniger ATP verbraucht wird und somit der Nettogewinn an ATP erhöht wird. Dieses ist für „Amitochondriate“, zu denen *Trichomonas vaginalis* zählt (Müller, 1993), besonders wichtig, weil sie auf die Glykolyse als Hauptenergiequelle angewiesen sind (Mertens, 1993).

Die  $PP_i$ -PFKs lassen sich in zwei Gruppen klassifizieren: allosterisch regulierte  $PP_i$ -PFKs und  $PP_i$ -PFKs, die nicht von allosterischen Effektoren kontrolliert werden. Erstere sind in Organismen zu finden, die zudem noch ATP-PFKs und oft auch Fruktose-1,6-bisphosphatase (FBPase) besitzen, letztere dagegen kommen in Organismen vor, die wenig bis keine ATP-PFK und FBPase Aktivitäten aufweisen. *Trichomonas vaginalis* gehört zu der Organismengruppe, die ausschließlich über eine  $PP_i$ -PFK verfügt, die nicht allosterisch beeinflusst wird. Als allosterischer Effektor für  $PP_i$ -PFKs fungiert in der Regel Fruktose-2,6-bisphosphat (Mertens, 1991), ein Befund, der in *Trichomonas vaginalis* nicht nachgewiesen werden konnte (Mertens *et al.*, 1989).

### **6.2.2 Phosphofruktokinase – assoziiert mit der hydrogenosomalen Membran?**

Das Genom von *Trichomonas vaginalis* (Stamm G3) wurde 2007 veröffentlicht (Carlton *et al.*, 2007). Dabei wurden elf Isoformen der Phosphofruktokinase annotiert. Sieben dieser Isoformen weisen eine Länge zwischen 425 und 434 Aminosäuren auf und werden daher als „lange“ PFKs bezeichnet. Die vier anderen PFKs sind mit einer Größe von 323 bis 326 Aminosäuren deutlich kürzer und werden daher als „kurze“ PFKs bezeichnet. Die vier kurzen PFKs sind bei einer Proteomanalyse der Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* (Stamm T1) identifiziert worden (Pütz, 2007; Henze, 2008). Die Sequenzen aller Isoformen der Phosphofruktokinasen wurden in dieser Dissertation miteinander verglichen: Dazu wurde ein Clustal W-Alignment erstellt (Abbildung 5.12). Das Alignment beinhaltet zu 4,98% identische Positionen. Es gibt keine großen konservierten Bereiche zwischen den PFKs. Die vier bei der Proteomanalyse der Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* identifizierten PFKs (Pütz, 2007; Henze, 2008) sind auffallend kürzer als die übrigen Isoformen der PFK.

Ein Alignment der vier kürzeren PFK-Sequenzen zeigt, dass sie relativ gut konserviert sind (Abbildung 5.13). Es sind 27,51% identische Positionen ermittelt worden. Eine phylogenetische Analyse der Phosphofruktokinasen (Abbildung 5.15) läßt erkennen, dass die kurzen und die langen Formen der Phosphofruktokinasen entweder einen unterschiedlichen Ursprung haben oder den selben Ursprung hatten, sich dann aber durch starke Sequenzveränderungen in zwei Gruppen aufgespalten haben. Die Gruppen wurden aufgrund der unterschiedlichen Größe der darin enthaltenen Proteine als „lange“ und „kurze“ PFKs bezeichnet. Interessanterweise stehen die kurzen PFKs in dem phylogenetischen Netzwerk nahe denen aus Archaeobakterien.

In dieser Dissertation wurde die Lokalisation einer kurzen Phosphofruktokinase, die in der Arbeit von Pütz (2007) als hydrogenosomal detektiert worden ist, *in vivo* überprüft (TVAG\_391760). Es konnte eine hydrogenosomale Lokalisation festgestellt werden. Durch eine genauere Untersuchung konnte ermittelt werden, dass das exprimierte Protein in der hydrogenosomalen Membranfraktion vorhanden war. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Dissertation wurden im Zuge einer Diplomarbeit am Institut für Ökologische Pflanzenphysiologie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) die restlichen von Pütz (2007) im hydrogenosomalen Proteom identifizierten kurzen PFKs *in vivo* untersucht. Erste Ergebnisse zeigen eine hydrogenosomale Lokalisation *in vivo* (persönliche Mitteilung).

Die Tatsache, dass die in dieser Dissertation untersuchte, kurze PFK nur in den hydrogenosomalen Membranen, nicht aber in der Matrix detektiert werden konnte (Abbildung 5.10), wirft die Frage auf, ob das Enzym in der Membran verankert ist oder lediglich an die äußere Membran assoziiert ist. Um diese Frage zu klären, wurde die Sequenz in dieser Dissertation mit dem Programm HMMTOP ([www.enzim.hu/hmmtop/](http://www.enzim.hu/hmmtop/); Tusnády und Simon, 1998, 2001) auf transmembrane Bereiche überprüft. Das Programm ermittelte eine transmembrane Helix (Abbildung 5.14). Das Vorhandensein eines solchen hydrophoben Bereichs wäre eine Erklärung, warum die kurze PFK in der hydrogenosomalen Membranfraktion detektiert werden

konnte und auch dafür, warum ein klassischerweise cytosolisches Enzym wie die PFK bei der Isolation der Membranen nicht abgewaschen wurde. Wäre sie nur lose mit der äußeren Membran assoziiert, wäre sie höchstwahrscheinlich von der Membran abgelöst worden und nicht mehr detektierbar gewesen. Das Ergebnis des Programms HMMTOP bezüglich des Vorhandenseins einer transmembranen Domäne innerhalb der PFK-Sequenz ist jedoch mit Vorsicht zu betrachten. Andere Programme, die transmembrane Regionen innerhalb einer Proteinsequenz ermitteln können, liefern gegensätzliche Ergebnisse. Die Programme SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998) und TMHMM (Krogh *et al.*, 2001) detektieren keine hydrophoben Bereiche und gaben das Protein als lösliches Protein an. Die Programme PredictProtein (Rost *et al.*, 2004) und TMPred (Hofmann und Stoffel, 1993) können zwei transmembrane Domänen ermitteln.

Bei *Tetrahymena thermophila* und *Tetrahymena pyriformis* (Ciliata) wurde eine Assoziation der ATP-abhängigen Phosphofruktokinase mit den Mitochondrien beschrieben (Eldan und Blum, 1973; Srere, 1987; Smith *et al.*, 2007). Im Genom von *Tetrahymena thermophila* sind drei Phosphofruktokinasen kodiert, von denen zwei in einer Proteomanalyse von Mitochondrien detektiert wurden (Smith *et al.*, 2007). Mit einer Länge von 543 bzw. 885 Aminosäuren sind diese beiden Sequenzen deutlich länger als die in dieser Arbeit untersuchte und in der hydrogenosomalen Fraktion detektierte kurze PP<sub>i</sub>-PFK von *Trichomonas vaginalis* (323 aa). Ein Alignment der drei Aminosäure-Sequenzen (Abbildung 6.1) lässt erkennen, dass sich die Sequenzen von *Tetrahymena thermophila* und *Trichomonas vaginalis* in einigen Bereichen ähnlich sind. Es ist mehr Ähnlichkeit zwischen der kurzen PFK aus *Trichomonas vaginalis* und den beiden PFKs aus *Tetrahymena thermophila* vorhanden als zwischen einer langen PFK (426 aa) und den beiden Sequenzen aus *Tetrahymena thermophila*. Das Alignment einer langen PFK mit denen aus *Tetrahymena thermophila* ist im Anhang dargestellt (Abbildung 7.4).

```

TTherm_00170320 1 -----
TTherm_00338270 1 MRSFQIQMFIIFLSMIKININKNYQVKESEEFMRMHFYFKQPSRNKKRIISPYESYNITSVLKSIENENTYKIIQOVNKQPKFAINSQKLFKFNKQSE
TVAG_391760 1 -----

TTherm_00170320 1 -----M LQKSLT N K F F V A G L A L G
TTherm_00338270 101 EFQSYRSHESLEGLSNLQHNMMNKIKEYLRVYVNVSSKLSNSRINLGANKSYNTQNTKTNSTIDRMSQMLNYQTNASIVSQADQVCIENEFQLRQNFK
TVAG_391760 1 -----

TTherm_00170320 21 SGLITSL L K Q F T E E K V E R K G S K T V K R K E K K Q R T V F L H Q D N T P K E I L N -- A S N T L M E E V N L E S R T C N I L K V P N L T E P Q D E P C L S L S Y L G
TTherm_00338270 201 M Q T E N D D K T L N L N E Q Q E N K K Y Q V S T E N C Q K L N K S E I Y S K L R F S S I N S K N P S E F Q E L N I F K T N R S D A Q N E N I E N R K N T H K K F N K D D L L K E I L I Q
TVAG_391760 1 -----

TTherm_00170320 118 E N N Y R E V F G G G F L P D T A F V Y T G S Y V L S D A V L G K N Q S L D Q S K R Y V R A G P R H N Y F N P Q Q V L A L V L C C L C F C L N V V L E P L M C L Y F N Y G V R T I Y G I K Y
TTherm_00338270 301 K D D R Q T D Q S E E K V Y N S Q E N K H I N H T T N Q I I H P I E H N S H N E E T Q E E N S K I I E H L K K Q D T L V N M K R N S I K T E T P N K E E Y I G D N E S K Q Q A S K G
TVAG_391760 1 -----M K R I A V L S C R D S C A N A A L S E V E V G E K Y G M H V F G I F G S

TTherm_00170320 218 Y K G F Y Q Y D W Q E L T V K D V R E I Q R L G G V I G S S R C -----G F D K D R I D N E V K H G T H Y C G G D E H R G I C A L F N E V S R K N I S I G I P -----
TTherm_00338270 401 T F C A S S K K K S D C R I S K Q L R N I E N Q N E N N I S - Q E Y Q P K O K S E D I R R L S Y C G I V H Y S I K N S L Q K C I Q I E K N N F K N S K D V P E D P N N F L E F K A
TVAG_391760 41 E F G L Y E D Y I A A L S R D V S G K I G K S S F G S S H F E Y L E D S I Q C L A N I N K S I G I V G G G S F A H S R L A D K G -----V F G I P

TTherm_00170320 302 -----K I D N T P I I K S F C F T S V E E A K P L O S
TTherm_00338270 500 Q K E I E K Q I K I N K E Q I F L L E K K E E F Q K L I Q Q Q N Q I P Q N K S D R K N V H S S M Q Y R S E H R Q K N P R Q I Y S R I S D A N I G D L S T K N Q O S P L O Q N N I N R P L D S
TVAG_391760 124 -----A E I C D E V V G T I C L G V L A V N N I M D C I O R

TTherm_00170320 331 A E V E A -----H C A E Y G L V R L M G R Y A C F T A M E A T N A S R D A H C L V P E F K F N L -----Y G E E C T L E
TTherm_00338270 600 I D A K K E L H A D I N Q T S S P N K K I S S D K Q L N I I D O S Q N I Q K K S K S K Y E F Q K N D A S I T T L N E K N E N E I K N E N N E T L E H N L S A Q A T N E S I Q I O K E
TVAG_391760 153 E R S C D -----S R R N S F L V Q I E G H S C N I A A S A L V I - G A E C L I P E H N G -----R P L E E T Y Q

TTherm_00170320 387 Y V O R L L R K N C I V I A E S A G E A L D A Q F A N T G E K D A S G N A K N D E G A E Q K E I V D Y G K K K G M E T L Y I N P T Y L E T V P A N L D R K C T C Q Q N A V H G
TTherm_00338270 700 I K O L S F Q E E S F N C A R N N K I E S L E K Q N P V K N N I S N E D S P N K P Q R N R O D N Q - F Q L E N S I C S L O N D S A N A Q O K A N N S V I T E K L E T Q Y E R R V L A D
TVAG_391760 205 K V O K S I D I G K I C I T I V S S C -----W K P G K A L A N V E E -----K P K E N D I I I Q T I L C Y I O R G G S P S F D R L I G F R M A A A V E E

TTherm_00170320 486 A M A G F T G F T V G -----H V N N E L O Y T E -----L D E I C K E G S G R I A E D A W O R L A S T G Q P S F L K K I N -----
TTherm_00338270 799 R N K N R S Y S V R Q S Q E E C L A C E N K O E R Q Q K F Q I E Y D L O K K T E S H I I D M I K S R D Y K F K K S K K D F K G K Q V T F Q L T E S Q L N S D
TVAG_391760 280 I N A G N N H F S -----L N S R L E V I F -----E D T I G -----K R P I D A L F E M K S T F -----

```

**Abbildung 6.1:** Clustal W-Alignment der bei der Proteomanalyse der Mitochondrien von *Tetrahymena thermophila* identifizierte Phosphofruktokinase (Smith *et al.*, 2007) und der in dieser Arbeit untersuchten PFK von *Trichomonas vaginalis*. Gleiche Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren sind grau hinterlegt. Die Zugangsnummern der PFKs sind die der Genomdatenbank von *Tetrahymena thermophila* bzw. *Trichomonas vaginalis* ([www.ciliate.org](http://www.ciliate.org) bzw. [www.trichdb.org](http://www.trichdb.org)).

Da die ATP-abhängigen PFKs bei *Tetrahymena thermophila* mit den Mitochondrien assoziiert sind (Smith *et al.*, 2007), wurden sie mit dem Programm HMMTOP ([www.enzim.hu/hmmtop/](http://www.enzim.hu/hmmtop/); Tusnady und Simon, 1998, 2001) auf transmembrane Bereiche hin untersucht (Abbildung 6.2), um auf eventuelle Parallelen zu der in der hydrogenosomalen Membranfraktion aus *Trichomonas vaginalis* detektierten kurzen PFK zu schließen. Bei beiden PFKs aus *Tetrahymena thermophila* wurden mit dem Programm HMMTOP (Tusnady und Simon, 1998, 2001) transmembrane Domänen ermittelt (Abbildung 6.2). Auch die kurze PFK aus *Trichomonas vaginalis*, die in dieser Dissertation untersucht wurde, weist einen putativen transmembranen Bereich auf (Abbildung 5.14), mit dem das Protein in der hydrogenosomalen Membran verankert sein könnte.

```
>THERM_00170320
MDLQKSLTDNKFFVAGLALGSLITSLLIKQFNTEEEKVERKGS�KTVKRKEVKQRTVFLHQTDNTIPKEILNA
SNTLMEEVKNLERSRTCNIKVPNLIIIEVPQDEIPCHLSPLYGENNYREVFGGGGFLPDTAFVYTGSYVLSDAVIG
KNQSLDQSKRYVRAGPRKHNYFNPQQVKAAIVTCGGGLCPGLNVVIREIFMCLYFNYGVRTIYGIKYGYKGFYQYD
WQELTVKDVKEIQRLGGTVLGGSSRGGFDKDKIVDNLVKHGITHVYCLGGDGTHRGIQALFNEVRSRKLNISIVGI
PKTIDNDIPIIDKSFQFETSVEEAVKAIQSAHVEAHCAEYGVGLVRLMGRYAGFIAMEATNASRDAHVCLVPEFK
FNLYGEEGVLEYVYQRLLSKRNCIVVVAEGAGEAVLDAQFANTGEKDASGNAKLNDIGAFLOKEIVDYGKKKGME
VTLKYINPTYMIRTVPANALDRKMCTQLAQNVAHVHAGAMAGFTGFTVGHVNNRLCYIPLDEICKEGSGRRIKAEDRA
WQRLLASTGQPSFLKKN
```

```
>THERM_00338270
MRSFQIQMFIIFLFSMIKKNKNYQVKESEEFMHHFYFKQSPRNKKRIISPYESYNITSVLKSI SNENTYKKI I
QQVKNQPKFAINSQKLFKFTNAKQSEEFQSYRHESLEGLSNLQHNMMNKIKEYLRVYNVNSSKLSNSRINLGANK
SYNTQNTKTNSTIDRMSQMLNYQTNASIVSQEADQVCIENEYFQLRQNFQMOTENDDMKTNLQNEQQQENRKYQV
STENCQKLNKSEIYSKLRSFSSINSKNPSEFQEDNIFKTNRRDAQNRNIENRKNTHKLFINKDDVLLKKEILIQ
KDDRQTDQSEEKVVNSQENKHINHTTNQIIHLPIIEHNSHNEETQEENSKRIEHLKQDTLLVNMNKRNSLIKTQ
ETPKNKYHEYIGDYNIESKQQASKGTFCASESKKKSIDQKISKKQLKNIENQVNENNISQEYQPKQKSEGDIRR
LSYDGDIVHYSIKNSLQKQIIQIEKKNFMKINSKMPEDPNNFLEFKAQKEIEKQKIKINKEQIFLLEKKKEEF
QKLIQQQQNQIPQNKSDRKNVHSSMQYRSEHRQKNRQIYSRISDANLGDQLSTKNQQISPLQQINNINKLLDSL
DAKKEKLHADINQQTSSPNKKISKSDKKQLNILDQSQKNIQKKSJKSKQYEFQKNDASITTLNNEKNENEIKNEN
NETLEHNLQAATNESKHLQELKEIKQLSFQEESTNCAKLNNKIESLEIKQNQPVKNNISNEDSPNKFQPPQKNRQ
DNQFQLENKSICSIQNDSANAQKQANNSVITEKQLFTQQYERRVLKDRNKNQKSYSVRQSQEECLNQENLQKQIR
RQQKFQQIMEYDTQKKFTEISKIIDRMTKSRDYKFKKSKDKDFKQVTFQLTESQLNSD
```

**Abbildung 6.2:** Positionen der von dem Programm HMMTOP ([www.enzim.hu/hmmtop/](http://www.enzim.hu/hmmtop/)) ermittelten transmembranen Helices (violett hinterlegt) in den Sequenzen der PFKs aus *Tetrahymena thermophila* (THERM\_00170320 und THERM\_00338270; Zugangsnummer der Genomdatenbank [www.ciliate.org](http://www.ciliate.org)). Dieses Programm entwickelten Tusnády und Simon in den Jahren 1998 und 2001.

Bei *Tetrahymena pyriformis* wurde durch Enzymaktivitätstest gezeigt, dass mindestens 75% der in der Zelle vorhandenen Phosphofruktokinasen an die Mitochondrien gebunden sind (Eldan und Blum, 1973). Bei *Trichomonas vaginalis* wurde durch Bestimmung der Aktivität der PPI-PFK gezeigt, dass an den Hydrogenosomen keine Aktivität der in dieser Dissertation exprimierten kurzen Phosphofruktokinase vorhanden ist (Abbildung 5.11). Das läßt darauf schließen, dass es sich bei dieser Isoform der Phosphofruktokinase um keine enzymatisch aktive Phosphofruktokinase handelt. Ein Grund für die nicht vorhandene Aktivität könnte das Fehlen einiger für die Katalyse wichtiger Aminosäuren sein, die für eine Form der langen PFKs beschrieben wurden (Mertens *et al.*, 1998). Ein Alignment aller PFKs aus *Trichomonas vaginalis* läßt erkennen, dass nicht alle Aminosäuren, die an der Katalyse beteiligt sind, bei der kurzen PFK vorhanden sind (Abbildung 5.12). Die genaue Funktion dieser mit den Hydrogenosomen assoziierten Phosphofruktokinase kann somit nicht beschrieben werden und muß auch in Hinblick auf die Entstehung der

kurzen Formen der PFKs erforscht werden.

Durch den eubakteriellen Ursprung der Glykolyse und der Entstehung der energieliefernden Organellen (Mitochondrien und ihre weiteren Formen) lässt sich die bei einigen Organismen beobachtete Lokalisation der glykolytischen Enzyme an diesen Organellen erklären. Bei *Trichomonas vaginalis* konnte keine Assoziation der glykolytischen Enzyme mit den Hydrogenosomen gezeigt werden (Abbildung 5.6). Lediglich eine kurze Form der Phosphofruktokinase, deren Funktion nicht bekannt ist und die sich möglicherweise aus den Archaeobakterien entwickelt haben könnte, konnte in der hydrogenosomalen Membranfraktion detektiert werden (Abbildung 5.7). Obwohl einige Autoren behaupteten, dass der vollständige glykolytische Stoffwechsel in einigen Mitochondrien beobachtet werden könnte (Gallagher *et al.*, 1956; Hochstein, 1957), ist allgemein anerkannt, dass die Glykolyse im Cytosol lokalisiert ist. Sie wurde von ihrem eubakteriellen Vorfahren in seinen Wirt transferiert (Markoš *et al.*, 1993; Henze *et al.*, 1995; Keeling und Doolittle, 1997; Henze *et al.*, 1998; Mertens *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2002). Das Endprodukt dieses Stoffwechselwegs (Pyruvat) wird jedoch weiterhin in dem aus dem Eubakterium entstandenen Organell verstoffwechselt. Somit könnte für die Beobachtungen über eine nahe Lokalisation der Glykolyse an den Mitochondrien (Conger *et al.*, 1971; Eldan und Blum, 1973; Srere, 1987; Giegé *et al.*, 2003; Brandina *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007) der kurze Weg für das Pyruvat eine Erklärung sein.

### 6.3 Proteinimport in Organellen

Eukaryoten zeichnen sich dadurch aus, dass sie einen Zellkern und weitere Zellbestandteile (Organellen) besitzen, die vom Cytosol durch mindestens eine Membran getrennt sind (Lunn, 2006) – ihre Zelle ist, bedingt durch den endosymbiontischen Ursprung der Organellen, kompartimentiert. Einige Organellen sind von zwei oder mehr Membranen umschlossen: Mitochondrien und Chloroplasten. Während Formen der Mitochondrien bei allen Eukaryoten zu finden sind,

fehlen Chloroplasten bei Tieren, Pilzen und einigen Einzellern (Martin *et al.*, 1998, 2001). Über die Entstehung der Eukaryoten und damit auch die der Mitochondrien und Chloroplasten gibt es divergente Theorien und Hypothesen, die kontrovers diskutiert werden (Martin *et al.*, 2001; Embley und Martin, 2006; Gould *et al.*, 2008; Björn und Godvindjee, 2009). Allgemein anerkannt ist, dass Chloroplasten einst freilebende Cyanobakterien und Mitochondrien einst freilebende Proteobakterien waren, die im Laufe der Evolution von einem Wirt aufgenommen wurden und sich zu den entsprechenden Organellen formten (Martin und Herrmann, 1998). Beide Organellen haben viel mehr ihrer eubakteriellen Biochemie beibehalten, als es ihre Genome widerspiegeln. Diese Differenz zwischen der Anzahl plastidär beziehungsweise mitochondrial kodierter Gene und der Anzahl der verschiedenen eubakteriellen Proteine des Proteoms entstand durch den endosymbiontischen Gentransfer, der zwischen dem Wirt und dem Symbionten stattgefunden hat (vgl. Kapitel 3.1). Während der Evolution exportierten die Organellen ihre Gene zum Kern, reimportieren die Produkte jedoch mit der Hilfe von Transitpeptiden und einer Proteinimportmaschinerie (Martin und Herrmann, 1998).

Die meisten mitochondrialen Proteine werden an cytosolischen Ribosomen synthetisiert und müssen über eine oder beide mitochondrialen Membranen importiert werden, je nach Lokalisation im Mitochondrium. Es gibt vielfältige Maschinerien, Mechanismen, Importsignale und mindestens vier verschiedene Wege für den Import und die Sortierung mitochondrialer Präproteine. Die Translokasen, die diese Prozesse katalysieren, werden durch das Membranpotential, durch ATP oder durch Redoxreaktionen gesteuert und kooperieren mit molekularen Chaperonen und Assemblierungskomplexen, um mitochondriale Proteine zu ihrem korrekten Bestimmungsort zu leiten (Chacinska *et al.*, 2009). Auch der Proteinimport in Chloroplasten verläuft in der Regel post-translational und erfordert eine komplexe Proteinimportmaschinerie, welche die Proteine über die multiplen Membranen leitet und richtig zuordnet (van Dooren *et al.*, 2001).

Auch für hydrogenosomale Matrixproteine gibt es unterschiedliche Import-

signale. Beobachtungen von Mentel *et al.* (2008) deuten darauf hin, dass der Proteinimport nicht strikt von N-terminalen Extensionen abhängt, sondern dass auch interne Signale für den Import verantwortlich sind. In dieser Dissertation konnte für das hydrogenosomale Matrixprotein Thioredoxin Reduktase aus *Trichomonas vaginalis* ein internes Targetingsignale näher beschrieben werden.

### 6.3.1 Diversität von Targetingsignalen

Untersuchungen N-terminaler Verlängerungen (Transitpeptide) zahlreicher mitochondrialer Proteine zeigten, dass es keine signifikanten Sequenzhomologien zwischen ihnen gibt (Hartl *et al.*, 1998). Noch nicht einmal zwischen den Transitpeptiden zweier Isoformen mitochondrialer Proteine, wie z.B. der Untereinheit 9 der F<sub>0</sub> ATPase des Rindes, deren Isoformen des reifen Proteins exakt dieselben Aminosäuresequenzen haben (Gay und Walker, 1985). Trotzdem können universelle Merkmale festgestellt und beschrieben werden: So sind die Transitpeptide reich an positiv geladenen Aminosäureresten (zumeist Arginin); ihnen fehlen saure Aminosäurereste; sie haben in den meisten Fällen einen hohen Gehalt an hydroxylierten Aminosäuren und viele Transitpeptide zeigen die Tendenz, amphipathische  $\alpha$ -Helices auszubilden (Hartl *et al.*, 1998).

Aufgrund der Annahme, dass der mitochondriale Proteinimport hoch selektiv zu sein scheint, ist es erstaunlich, dass es auch Sequenzen gibt, die nicht spezifisch für den mitochondrialen Proteinimport sind, jedoch Proteine in das Organell leiten können (Hartl *et al.*, 1998). Ergebnisse verschiedener Arbeiten zeigen, dass potentielle mitochondriale Targetingsequenzen versteckt in nicht-mitochondrialen Proteinen liegen (Banroques *et al.*, 1987; Hurt und Schatz, 1987) und eventuell auch im reifen Teil mitochondrialer Proteine (Hartl *et al.*, 1998). So wird beispielsweise die Häm Lyase durch ein internes Signal, das sowohl positive als auch negative Ladungen aufweist, in die Mitochondrien transportiert (Rassow und Pfanner, 2000).

Der Proteinimport in primäre Chloroplasten geschieht post-translational und ist von abspaltbaren Transitpeptiden abhängig, wobei es sich um positiv geladene N-

terminale Regionen handelt, die reich an hydroxylierten Aminosäuren sind (Dooren *et al.*, 2001). Transitpeptide wurden bei Proteinen gefunden, die in die Chloroplasten von Grünalgen, Rotalgen, höheren Pflanzen und Cyanellen von Glaucocystophyten transportiert werden.

Auch bei Chloroplastenproteinen gibt es Ausnahmen, bei denen der Import nicht von der abspaltbaren N-terminalen Extension abhängt. So ist beispielsweise ein Protein der inneren Chloroplastenhüllmembran bekannt (ceQORH, *chloroplast envelope quinone oxidoreductase homologue*), das ein N-terminales Transitpeptid trägt, das während des Targetings in die innere Chloroplastenhüllmembran nicht abgespalten wird (Miras *et al.*, 2002a). Weder der N- noch der C-Terminus scheinen für die plastidäre Lokalisation von Bedeutung zu sein. Experimente deuten daraufhin, dass die Lokalisation dieses Proteins in den Chloroplasten von einer essenziellen, jedoch für die Lokalisation nicht hinreichenden, internen Domäne abhängt. Für die plastidäre Lokalisation scheinen zusätzlich Regionen in der Nähe des N- und C-Terminus notwendig zu sein (Miras *et al.*, 2002a). Zudem benötigt der Import von ceQORH ATP und ist abhängig von Rezeptoren an der Chloroplastenoberfläche (Miras *et al.*, 2002b). Für das 32 kDa große Protein der inneren Chloroplastenmembran IEP32 ist ebenfalls beschrieben worden, dass der N-Terminus nicht abspaltbar ist, aber Targetinginformationen in ihm liegen (Nada und Soll, 2004). Für diese Proteine der inneren Chloroplastenmembran, die nicht-abspaltbare N-Termini tragen, scheint es spezielle Importmechanismen zu geben (Miras *et al.*, 2002b).

Transitpeptide von Proteinen der Cyanellen – primitive Chloroplasten – von *Cyanophora paradoxa* (Glaucocystophyta) unterscheiden sich von Targetingsignalen chloroplastidärer Stromaproteine insofern, dass in ihrer N-terminalen Domäne ein konservierter Phenylalanin-Rest liegt, der entscheidend über den Import ist (Steiner *et al.*, 2005; Wunder *et al.*, 2007).

### **6.3.2 Targetingsignale hydrogenosomaler Proteine**

Das erste charakterisierte Gen, das für ein hydrogenosomales Protein (*Trichomonas*

*vaginalis* Ferredoxin) kodiert, enthält eine kurze Präsequenz, die dem reifen Protein fehlt (Johnson *et al.*, 1990). Nachfolgende Arbeiten zeigen ähnlich kurze Präsequenzen in vielen hydrogenosomalen Proteinen von *Trichomonas vaginalis* (Hrdy und Müller, 1995a,b; Lahti *et al.*, 1992; Lahti *et al.*, 1994; Länge *et al.*, 1994; Pütz *et al.*, 2005, 2006; Richards und van der Giezen, 2006; Mentel *et al.*, 2008; Smutná *et al.*, 2008; van Grinsven *et al.*, 2008). Interessanterweise deutet eine molekulare Charakterisierung des Ferredoxins bei *Psalteriomonas lanterna* auf die Existenz einer ähnlichen Präsequenz bei diesem hydrogenosomalen Protein des freilebenden Amoeboflagellaten hin (Brul *et al.*, 1994).

Die Targetingsignale hydrogenosomaler Proteine des Protisten *Trichomonas vaginalis* bestehen – ähnlich wie die der Mitochondrien – hauptsächlich aus hydrophoben und hydroxylierten Aminosäuren, wobei die Aminosäuren Arginin, Leucin und Serin überwiegen. Direkt nach Methionin am Anfang des N-Terminus scheint es ein konserviertes Leucin zu geben, da mehr als 90% aller hydrogenosomalen Transitpeptide von *Trichomonas vaginalis* mit Methionin und Leucin (ML) beginnen. Bei 50% von ihnen folgt auf Leucin ein Serin (MLS). Bei den restlichen Transitsequenzen ist Leucin gegen Serin ausgetauscht. An den Positionen 2 oder 3 vor der Prozessierungsstelle des Transitpeptids befindet sich in der Regel Arginin. Am C-terminalen Ende des Targetingsignals ist Asparagin oder Phenylalanin zu finden. Hydrogenosomale Transitsignale aus *Trichomonas vaginalis* sind 5 bis 14 Aminosäuren lang und somit deutlich kürzer als die mitochondrialen, die eine Länge von 15 bis 85 Aminosäuren aufweisen (von Heijne *et al.*, 1989; Bradley *et al.*, 1997; Glaser *et al.*, 1998). Auch hydrogenosomale Transitpeptide zeichnen sich durch eine serinreiche Sequenz und eine positive Nettoladung aus.

Obwohl mehrere Arbeitsgruppen die Prozessierung hydrogenosomaler Transitpeptide zeigten (Lahti *et al.*, 1994; Hrdy und Müller, 1995a), wurde ihre tatsächliche Rolle bei dem Targeting zu den Hydrogenosomen bislang nicht beschrieben (van der Giezen, 2009). Bradley *et al.* entwickelten 1997 ein Importsystem *in vitro* für Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis*. Sie beschrieben, dass – ähnlich zum mitochon-

drialen Proteinimport – die Präsequenz des Ferredoxins essenziell für den Import in die Hydrogenosomen ist und der Import von der Temperatur und von der ATP-Konzentration abhängt. Jedoch konnte Major 2009 eine dieser Annahmen durch Versuche mit *Trichomonas vaginalis in vivo* widerlegen: auch die Transitpeptide der PFO A und der SCS $\alpha$  konnten Ferredoxin in die Hydrogenosomen leiten.

Die Notwendigkeit hydrogenosomaler Transitpeptide für den Import in die Organellen wurde auch durch Experimente von Häusler *et al.* (1997) gezeigt. Sie belegten, dass die putativen Präsequenzen von Ferredoxin, SCS $\beta$  und PFO aus *Trichomonas vaginalis in vivo* fähig sind, Dihydrofolat Reduktasen in Mitochondrien der Hefe und von *Trypanosoma brucei* zu transportieren. Der Import von SCS war weniger effizient als der von Ferredoxin und der PFO (Häusler *et al.*, 1997).

Auch für den Hydrogenosomen besitzenden, anaeroben Pilz *Neocallimastix frontalis* wurden N-terminale Transitsequenzen beschrieben. Diese bestehen weitestgehend aus den Aminosäuren Alanin, Leucin, Serin und Arginin (Brondijk *et al.*, 1996; Voncken *et al.*, 2002). Auch diese Transitsequenzen werden prozessiert (Akhmanova, 1999). An Position 2 vor der Prozessierungsstelle ist ein konserviertes Arginin zu finden. Im Vergleich zu den Transitpeptiden hydrogenosomaler Proteine von *Trichomonas vaginalis* sind die von *Neocallimastix frontalis* signifikant länger. So hat das Malat Enzym ein Transitpeptid mit einer Länge von 27 Aminosäuren. Somit ähneln die Transitsequenzen von Proteinen aus *Neocallimastix frontalis* eher denen der Mitochondrien als die aus *Trichomonas vaginalis* (van der Giezen *et al.*, 1997a). Für das Malat Enzym konnte zudem gezeigt werden, dass es in Mitochondrien importiert werden kann. Außerdem ist die Transitsequenz für den Import von Notwendigkeit, denn bei ihrer Deletion verblieb das Protein ausschließlich im Cytosol der Zelle (van der Giezen *et al.*, 1998).

Neuere Arbeiten zeigen, dass der hydrogenosomale Proteinimport nicht ausschließlich durch Transitpeptide zu erklären ist. Studien mit der hydrogenosomalen Thioredoxin Reduktase aus *Trichomonas vaginalis* deuten auf multiple Signale hin, die den Proteinimport lenken (Mentel *et al.*, 2008).

### 6.3.3 Interne Targetingsignale hydrogenosomaler Matrixproteine

In bisherigen Studien zur intrazellulären Lokalisation hydrogenosomaler Matrixproteine bei *Trichomonas vaginalis* (TrxRh1, TrxRh2, SCS $\alpha$ , PFO A und Fd) folgen nur TrxRh1 und Ferredoxin der klassischen Vermutung, dass der Import in die Hydrogenosomen von N-terminalen Transitpeptiden abhängig sei (Bradley *et al.*, 1997; Mentel *et al.*, 2008; Major, 2009). Die anderen untersuchten Proteine haben entweder keine N-terminale Verlängerung (TrxRh2) oder sie ist nicht in allen Fällen ausreichend, Fusionsproteinen eine Importkompetenz zu verleihen (Transitpeptide von SCS $\alpha$  und PFO A vor TrxRh1- $\Delta$ 10 und Ferredoxin), oder sie sind für den Import nicht notwendig (SCS $\alpha$ ). Bei dem letzten hydrogenosomalen Protein, für das der Import in die Hydrogenosomen bislang untersucht wurde, wird die N-terminale Verlängerung für den Import nicht benötigt (Hmp31, ein Membranprotein mit einem prozessierten N-Terminus (Dyall *et al.*, 2000)).

Die natürlicherweise ohne verlängerten N-Terminus vorkommende Isoform der hydrogenosomalen Thioredoxin Reduktase TrxRh2 wird in die Hydrogenosomen importiert, während die Thioredoxin Reduktase TrxRh1, die einen verlängerten N-Terminus besitzt, ohne diesen (TrxRh1- $\Delta$ 10) nicht in die Organellen transportiert wird. Auch waren die Transitpeptide der SCS $\alpha$  und der PFO A (beides bekannte hydrogenosomale Proteine) nicht fähig, TrxRh1- $\Delta$ 10 eine Importkompetenz zurückzugeben (Mentel *et al.*, 2008). Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass die Präsequenzen von SCS $\alpha$  und PFO A nicht alle Informationen für einen Import von Proteinen in die Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* tragen, obwohl sie nach dem Import prozessiert werden. Es müssen demnach noch ergänzende Informationen innerhalb der importierten Untereinheiten des Proteins lokalisiert sein (Mentel *et al.*, 2008). So lässt sich auch erklären, dass SCS $\alpha$  auch trotz eines entfernten N-Terminus in die Organellen importiert wird (Mentel *et al.*, 2008).

Aufgrund dieser Beobachtungen kann mit der Annahme argumentiert werden, dass der Proteinimport in Hydrogenosomen bei *Trichomonas vaginalis* nicht strikt abhängig von N-terminalen Verlängerungen ist, sondern vielmehr von internen

Signalen innerhalb des Proteins abhängt. Diese internen Signale sind – in manchen Fällen – für dessen Import in das Organell ausreichend (Mentel *et al.*, 2008).

Zur detaillierten Untersuchung der internen Targetingsignale eignen sich zwei nah verwandte hydrogenosomale Thioredoxin Reduktasen optimal (Mentel *et al.*, 2008), die in *Trichomonas vaginalis* an Schutzmechanismen der Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt sind (Coombs *et al.*, 2004; Mentel *et al.*, 2008). Eine der beiden hydrogenosomalen Isoformen (TrxRh1) besitzt eine N-terminale Verlängerung, wie sie von hydrogenosomalen Proteinen bekannt ist. Eine Expression von HA-markierter TrxRh1 in transformierten Zellen von *Trichomonas vaginalis* zeigte, dass ihre N-terminale Extension für den Import in das Organell notwendig ist, denn TrxRh1- $\Delta$ 10 wurde nicht importiert (Mentel *et al.*, 2008). Die zweite hydrogenosomale Isoform (TrxRh2) hat kein N-terminales Targetingsignal, wird aber dennoch in die Hydrogenosomen transportiert (Mentel *et al.*, 2008). Zwischen TrxR- $\Delta$ 10 (kein Import in die Hydrogenosomen) und TrxRh2 (Import in die Hydrogenosomen) wurden in dieser Dissertation drei Sequenzblöcke reziprok ausgetauscht (Kapitel 5.2.2). Die resultierenden sechs Fusionsproteine wurden mit einem C-terminalen HA-Tag homolog in *Trichomonas vaginalis* exprimiert und auf ihre intrazelluläre Lokalisation überprüft (Kapitel 5.2.4.4). Bei diesem Experiment sollten mindestens ein einziger oder möglicherweise mehrere Sequenzblöcke ermittelt werden, die über Importsignale verfügen. Es wurde festgestellt, dass das interne Signal für den Import in die Hydrogenosomen nur in dem ersten Sequenzblock von TrxRh2 liegen kann. Denn nur die Konstrukte, bei denen der erste Sequenzblock von dem Protein TrxRh2 stammt, wurden in die Hydrogenosomen transportiert (Abbildung 5.20). Alle anderen Konstrukte wurden nicht in die Organellen importiert, obwohl sie Blöcke aus dem Protein TrxRh2 enthielten, das in die Hydrogenosomen transferiert wird. Zur eindeutigen Bestimmung, dass der erste Sequenzblock von TrxRh2 ein internes Targetingsignal enthält, muß jedoch der Import des Fusionsprodukts TrxR-211 in das Organell nachgewiesen werden. Die Expression dieses Fusionsproteins in *Trichomonas vaginalis* verlief bislang ohne Erfolg (Abbildung 5.20). Die Zellen wuchsen

unter dem Selektionsdruck des Antibiotikums, dessen Resistenz durch den Expressionsvektor vermittelt wurde, eine Expression des Fusionsproteins konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine Verschiebung des offenen Leserasters, so dass der C-terminale HA-Tag, der nachgewiesen werden sollte, nicht gebildet werden konnte, wurde durch Sequenzierung des Expressionsvektors ausgeschlossen. Möglicherweise könnte der C-terminal gelegene HA-Tag eine korrekte Faltung des Proteins inhibiert haben und ein N-terminaler Tag wäre geeigneter gewesen.

Bei der mitochondrialen Adenylat Kinase der Hefe, die im Intermembranraum lokalisiert ist und keinen N-Terminus enthält, der vergleichbar mit mitochondrialen Transitpeptiden ist, wurde ebenfalls ein internes Importsignal ermittelt (Schrickler *et al.*, 2002). Es ist in einem Segment des Proteins vorhanden, das eine amphipathische Helix aus 13 Aminosäuren beinhaltet. Die Region um diese Helix beeinflusst neben dem Import auch die submitochondriale Einsortierung. Die Kristallstruktur der Adenylat Kinase läßt erkennen, dass die Helix und der N-Terminus in nächster Nachbarschaft angeordnet sind. Diese Erkenntnis erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die Importspezifität der Adenylat Kinase von einer Interaktion zwischen der Helix und dem N-terminalen Peptid bestimmt wird. Haarnadelinteraktionen zwischen dem N-Terminus und internen amphipathischen Helices gibt es auch bei dem Protein BCS 1 des mitochondrialen Intermembranraums. Auch dort sind sie für den Proteinimport essentiell. BCS 1 besitzt, wie die mitochondriale Adenylat Kinase, keine abspaltbare Präsequenz (Fölsch *et al.*, 1996). Auch die hydrogenosomale Isoform TrxRh2 der Thioredoxin Reduktase aus *Trichomonas vaginalis* besitzt keinen abspaltbaren N-Terminus, wie er für andere hydrogenosomale Matrixproteine wie SCS $\alpha$ , PFO A, Ferredoxin, aber auch die Thioredoxin Reduktase TrxRh1 bekannt ist (Lahti *et al.*, 1994; Hrdy und Müller, 1995a; Bradley *et al.*, 1997; Mentel *et al.*, 2008).

Der erste Sequenzblock des Proteins TrxRh2, für den ermittelt wurde, dass er ein internes Importsignal trägt, wurde auf  $\alpha$ -Helices überprüft. Die Programme PredictProtein (Rost *et al.*, 2004) und Jpred (Cole *et al.*, 2008) ermittelten zwei Helices (Abbildung 5.22). Ob es sich bei den  $\alpha$ -Helices um amphipathische Helices handelt,

wurde mit dem Programm DNASTAR (PROTEAN™) untersucht (Abbildung 5.23). Beide  $\alpha$ -Helices sind als amphipathische Helices dargestellt worden. Möglicherweise könnte das interne Signal, das der Sequenzblock 1 des hydrogenosomalen Matrixproteins TrxRh2 enthält, in den Bereichen der amphipathischen Helix vorhanden sein. In den ersten 21 Aminosäuren des Sequenzblocks 1 kann das Signal nicht liegen, denn ohne diese Aminosäuren wird TrxRh2 auch in die Hydrogenosomen transportiert (Mentel *et al.*, 2008). In dem Protein TrxRh1- $\Delta$ 10, das nicht in die Hydrogenosomen importiert wird, sind in dem ersten Sequenzblock ebenfalls zwei  $\alpha$ -Helices ermittelt worden, von denen jedoch nur die zweite als amphipathisch angegeben wurde (Abbildung 5.25). In dem Unterschied des Aufbaus der beiden ersten  $\alpha$ -Helices (amphipathisch in TrxRh2 und nicht amphipathisch in TrxRh1- $\Delta$ 10) der beiden hoch-konservierten Isoformen der Thioredoxin Reduktase könnte der Grund liegen, warum TrxRh2 in die Organellen importiert wird und TrxRh1- $\Delta$ 10 nicht. Das interne Signal für den Proteinimport könnte mit der ersten amphipathischen  $\alpha$ -Helix in dem Sequenzblock 1 verknüpft sein und wie bei der Adenylat Kinase der Hefe den Import beeinflussen (Schrickler *et al.*, 2002). Diese Vermutung basiert jedoch nur auf der Analyse der für die Vorhersage der Sekundärstrukturen und für die Darstellungen der Helices verwendeten Programme. Sie ist nicht experimentell belegt.

Die Frage, ob diese Bereiche Haarnadelinteraktionen mit dem für hydrogenosomale Proteine untypischen N-Terminus des Proteins eingehen, kann aufgrund der bislang nicht ermittelten Kristallstruktur der Thioredoxin Reduktase TrxRh2 noch nicht beantwortet werden. Es sind Kristallstrukturen der Thioredoxin Reduktasen aus *Escherichia coli* und *Arabidopsis thaliana* bekannt (Waksman *et al.*, 1994; Dai *et al.*, 1996). Beide Enzyme sind strukturell ähnlich. Möglicherweise ist die Struktur der Thioredoxin Reduktasen konserviert und die aus *Trichomonas vaginalis* könnte Ähnlichkeiten zu denen von *Escherichia coli* und *Arabidopsis thaliana* aufweisen. Bevor die Kristallstruktur der TrxR aus *Trichomonas vaginalis* nicht aufgeklärt ist, können jedoch keine Rückschlüsse auf Ähnlichkeiten gezogen werden und somit auch nicht

darauf, ob eine Haarnadelinteraktion vorliegt.

Sowohl der zweite als auch der dritte Sequenzblock von TrxRh2 können keine internen Targetingsignale enthalten. Wären in ihnen Signale für den Import in die Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* enthalten, so würden diejenigen Fusionsproteine in das Hydrogenosom importiert, die mindestens einen dieser zwei Sequenzblöcke enthalten (TrxR-121, TrxR-112, TrxR-122 und TrxR-221). Da von diesen Fusionsproteinen nur das Fusionsprotein TrxR-221 in die Hydrogenosomen importiert wird (Abbildung 5.20), kann ausgeschlossen werden, dass der zweite oder der dritte Sequenzblock interne Targetingsignale tragen könnten. Somit kann für das hydrogenosomale Matrixprotein TrxRh2 aus *Trichomonas vaginalis* aufgrund der Ergebnisse dieser Dissertation auch festgestellt werden, dass es keine Targetingsequenz am Carboxyl-Ende (im dritten Sequenzblock) trägt – ein Resultat, das für einige mitochondriale Proteine beschrieben wurde (Beilharz *et al.*, 2003; Setoguchi *et al.*, 2006; Kemper *et al.*, 2008). Doch sind dies Proteine der äußeren mitochondrialen Membran des  $\beta$ -barrel Typs. Das Targetingsignal wird von dem letzten  $\beta$ -Strang des Proteins gebildet und wird spezifisch von der Sortierungs- und Assemblierungsmaschinerie (SAM) der äußeren mitochondrialen Membran erkannt (Kutik *et al.*, 2008).

Interne Targetingsignale bei hydrogenosomalen Matrixproteinen von *Trichomonas vaginalis* wurden bislang noch nicht beschrieben. Es wurde lediglich vermutet, dass hydrogenosomale Matrixproteine interne Targetingsignale tragen könnten: Die Thioredoxin Reduktase Isoform TrxRh2 und die Succinyl-CoA Synthetase SCS $\alpha$  (Mentel *et al.*, 2008). Die Isoform der Thioredoxin Reduktase besitzt keinen durch bioinformatische Methoden erkennbaren N-Terminus, ist jedoch in den Hydrogenosomen lokalisiert. SCS $\alpha$  besitzt einen erkennbaren N-Terminus, der auch prozessiert wird (Lahti *et al.*, 1994). Das Protein wird jedoch auch nach Entfernung des N-Terminus noch in das Organell importiert, was auf interne Signale schließen lässt (Mentel *et al.*, 2008). Es lässt sich somit kein eindeutiges Motiv erkennen, wann ein hydrogenosomales Matrixprotein ein internes Importsignal trägt. Es kann jedoch vermutet

werden, dass interne Signale mit  $\alpha$ -Helices verknüpft sind, wie es für die mitochondriale Adenylat Kinase der Hefe beschrieben wurde (Schricker *et al.*, 2002). TrxRh2 (Abbildung 5.16), Hmp31 (Abbildung 6.4) und SCS $\alpha$  (Abbildung 6.3) – hydrogeno-somale Proteine mit internen Targetingsignalen – weisen  $\alpha$ -Helices auf, in denen mögliche Transitsignale liegen könnten.

```

MLSSSFERNLHQPLLFDKDKTKVVIQGIQNGQFHSRLMROYGTKVVGAVHPKKAGSIIAGLPIFKNKEVVKRRTDANASLIF
VPAPGAAAACIEAACAGMGLVVCITEHIPCHDMIKVKKVMKETGCQLIGPNCPGLIQPGTHTKLGIIPTNIFNNGKIGIVSRS
GTLTYEAAYATTLAGLGQSTVVGIGGDPFAGQLHTDVVKRFAADPQTEGILIGEIGGTSEEDAAEWIAKTKLTQEKPVVAFI
AGATAPFKRMCHAGAIVSGGKGTAEGKYKALEAAGVRIARHPCNMGKFIFEEMKRMGKI

```

**Abbildung 6.3:** Vorausgesagte Sekundärstrukturen ( $\alpha$ -Helices) für das hydrogenosomale Protein SCS $\alpha$  aus *Trichomonas vaginalis* (TVAG\_165340; [www.trichodb.org](http://www.trichodb.org)). Putative  $\alpha$ -Helices sind violett hinterlegt.

Dagegen ist bei mitochondrialen Proteinen auffällig, dass bei einer Existenz eines internen Importsignals meist kein typischer N-Terminus vorhanden ist. Als mitochondriale Proteine, die interne Importsignale beinhalten, sind der ADP/ATP Carrier (Pfanner *et al.*, 1987), die 5-Aminolevulinat Synthetase (Volland und Urban-Grimal, 1988), das Protein BCS1 (Fölsch *et al.*, 1996) und die Cytochrom c und c<sub>1</sub> Häm Lyasen zu nennen (Dumont *et al.*, 1991; Lill *et al.*, 1992; Steiner *et al.*, 1995; Diekert *et al.*, 1999). Sie sind feststellbar bei Proteinen der äußeren mitochondrialen Membran, des Intermembranraums, bei zahlreichen membran-durchspannenden Proteinen der inneren mitochondrialen Membran und wenigen mitochondrialen Matrixproteinen (Chacinska *et al.*, 2009). Außer der Existenz einer amphipathischen  $\alpha$ -Helix, gibt es zwischen den internen Signalen keine Sequenzähnlichkeiten (Schricker *et al.*, 2002).

Es ist möglich, dass interne Targetingsignale bei hydrogenosomalen Proteinen verbreitet sind, denn beispielsweise Rubrerythrin und die Thiol Peroxidase besitzen auch keine ersichtlichen N-terminalen Transitpeptide (Pütz *et al.*, 2005). Ein internes Targetingsignal wurde auch für das hydrogenosomale Membranprotein Hmp31 vorgeschlagen (Dyall *et al.*, 2000), ein Homolog mitochondrialer Carrier Proteine, die ebenfalls interne Importsignale tragen (Rehling *et al.*, 2003). Mit SCS $\alpha$  vergleichbar, besitzt Hmp31 ebenfalls eine N-terminale Verlängerung, die prozessiert wird, aber

für den Import nicht notwendig ist (Dyall *et al.*, 2000). Aufgrund der möglichen Verknüpfung interner Targetingsignale mit Sekundärstrukturen wurde Hmp31 mit dem Programm Jpred (Cole *et al.*, 2008) auf  $\alpha$ -Helices überprüft. Es wurden elf mögliche  $\alpha$ -Helices detektiert (Abbildung 6.4). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass ein internes Targetingsignal in Hmp31 mit einer  $\alpha$ -Helix verknüpft vorliegen könnte.

```

MAQPAEQIL IATSPKPSLS E VERLSVGF IAGT LSR T L T S P L D V V K M L M Q V S S R G G S A K D T I A Q L W K E Q G I A G F W R G N W A A C I R
L G P Q S A I K F Y A Y E E L E K R I G K G K P L V G I Q R T V F G S L S G V I S Q V L T Y P L D V I R T R I T V Y S G K Y T G I F N C A F T M L K E E G F T S L F A
G I V P T V M G V I P Y E G A Q F Y A Y G G L K Q L Y T T K I A P G K P I S P W A N C L I G A A A G M F S Q T F S Y P F D V I R K R M M I K D E K G K P I Y S G M M Q
A F S T V Y A K E G V A G L Y R G V G L N L I K V V P F A A L Q F T I L E E T R R A F F K V R A A I D Q K K V E E I K G K V A P K K K

```

**Abbildung 6.4:** Von dem Programm Jpred (Cole *et al.*, 2008) vorausgesagte Sekundärstrukturen ( $\alpha$ -Helices) für das hydrogenosomale Membranprotein Hmp31 aus *Trichomonas vaginalis* (TVAG\_237680; www.trichdb.org). Putative  $\alpha$ -Helices sind violett hinterlegt.

Der hydrogenosomale Proteinimport spiegelt in einem begrenzten Umfang den der Mitochondrien wieder. Hydrogenosomen und Mitochondrien sind homologe Organellen, die von demselben eubakteriellen Endosymbionten abstammen (Martin und Müller, 2007; Tachezy, 2008) und deren Transport über Membranen und deren Proteinimportmechanismen konserviert sind (Bradley *et al.*, 1997; Dyall *et al.*, 2000; van der Giezen *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2007). Der Import von Matrixproteinen in Mitochondrien ist oft von abspaltbaren N-terminalen Präsequenzen abhängig. Der Import von mitochondrialen Membranproteinen scheint dagegen von mehreren internen Signalen abzuhängen (Bolender *et al.*, 2008; Neupert und Herrmann, 2007; Rehling *et al.*, 2004). Es wurden jedoch zahlreiche Ausnahmen bezüglich der Verteilung und dem Erfordernis von mitochondrialen Targetingsignalen beschrieben: N-terminale Präsequenzen, die nicht als Targetingsignale fungieren, aber für die Solubilisierung des Präproteins verantwortlich sind, was den Faltungszustand bestimmt (Zara *et al.*, 2003); N-terminale Präsequenzen, die weder für den Import noch die Assemblierung des Proteins notwendig sind (Zara *et al.*, 1992); die Coexistenz interner und N-terminaler Targetingsignale, wobei die N-terminale, abspaltbare Extension den Proteinimport bestimmt (Murcha *et al.*, 2005); und ein C-terminales, abspaltbares mitochondriales Targetingsignal, wie es für die DNA Helicase Hmi1p

beschrieben wurde (Lee *et al.*, 1999). Obwohl die ersten drei Beispiele bei mitochondrialen Proteinen der Carrier-Familie vorkommen, die voraussichtlich multiple interne Signale tragen, wurden unkonventionelle Importwege auch für mitochondriale Matrixproteine beschrieben, speziell für den kernkodierte mitochondrialen Transkriptionsfaktor Mtf1p (Biswas und Getz, 2002). Seine Translokation scheint unabhängig von abspaltbaren N-terminalen Präsequenzen zu sein und er scheint fähig zu sein, alternative Importsignale zu nutzen, die in verschiedenen Regionen des Proteins lokalisiert sind (Biswas und Getz, 2004).

Die Ergebnisse dieser Dissertation und die einbezogenen Resultate von Mentel *et al.* (2008), deuten darauf hin, dass der Proteinimport in Hydrogenosomen in einigen Fällen, neben der N-terminalen Verlängerung, auch interne Importsignale erfordert. Da diese Erfordernis bei mehreren hydrogenosomalen Matrixproteinen festgestellt wurde (SCS $\alpha$ , TrxRh2, Ferredoxin; Mentel *et al.*, 2008; Major, 2009), ist es möglich, dass diese Eigenschaft bei hydrogenosomalen Proteinen verbreiteter ist als bei Proteinen typischer Mitochondrien (Mentel *et al.*, 2008). Trotz der gemeinsamen Abstammung der Mitochondrien und Hydrogenosomen, sind manche Unterschiede bei ihren Proteinimporten zu konstatieren.

#### **6.4 Der Proteinimportmechanismus bei Hydrogenosomen**

Die Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* haben kein eigenes Genom (Turner und Müller, 1983; Clemens und Johnson, 2000); deswegen sind alle hydrogenosomalen Proteine kernkodiert und müssen in das Organell importiert werden. Informationen über den Import von Proteinen in die Hydrogenosomen sind nach jetzigem Forschungsstand noch immer nicht ausreichend, um den Importmechanismus vollständig zu beschreiben. Es scheint so, als sei der Mechanismus ähnlich, aber nicht so komplex wie die Translokation bei Mitochondrien (Mentel *et al.*, 2008). Experimente mit hydrogenosomalen Proteinen zeigten zumindest einen mitochondrialen Charakter der hydrogenosomalen Proteinimportmaschinerie (van der Giezen, 2009).

Mitochondrien sind – ebenso wie die Hydrogenosomen – von zwei Membranen umgeben, in denen jeweils eine, von der anderen unabhängige, Proteinimportmaschinerie lokalisiert ist (Rassow und Pfanner, 2000). Fast alle mitochondrialen Proteine sind kernkodiert, werden an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert und dann anhand spezifischer Targetingsignale post-translational in die Mitochondrien transportiert (Wienhues *et al.*, 1991; Hönlinger *et al.*, 1995; Pfanner *et al.*, 1996, 1997; Bömer *et al.*, 1997; Neupert, 1997). Es sind jedoch Indizien feststellbar, dass der Import auch co-translational geschieht. So z.B. bei Hefen und Säugetieren, bei denen Ribosomen an die Mitochondrien gebunden sind und die Proteine während der Translation in die Organellen transportiert werden (Kellems *et al.*, 1975; Ades und Butow, 1980; Verner, 1993; Marc *et al.*, 2002; MacKenzie und Payne, 2004).

Die Mehrheit der mitochondrialen Matrixproteine besitzt N-terminale Targetingsignale, die etwa 20 Aminosäuren lang sind, wobei alle Aminosäuren positiv geladene Seitenketten aufweisen. Die Präsequenzen haben die Tendenz, amphipathische  $\alpha$ -Helices auszubilden, bei denen die basischen Aminosäuren zu der einen und die hydrophoben Aminosäuren zu der anderen Seite der Helix gerichtet sind (Roise und Schatz, 1988). Diese N-terminalen Transitpeptide interagieren mit den Proteinimportkomplexen der äußeren mitochondrialen Membran (TOM) TOM20 und TOM22. Dabei zeigen die hydrophoben Reste der Targetingsequenz Interaktionen mit TOM20; die basischen Reste der Targetingsequenz zeigen dagegen Interaktionen mit TOM22 (Brix *et al.*, 1997, 1999). TOM20 erkennt jedoch auch Proteine, die keine N-terminalen Verlängerungen besitzen (Diekert, 1999; Kurz, 1999; Rapaport und Neupert, 1999; Schleiff, 1999). Die zumeist hydrophoben und präsequenzlosen Carrierproteine der inneren mitochondrialen Membran gehen über interne Targetingsignale Interaktionen mit TOM70 ein und finden in ihm ihren Importrezeptor. TOM70 erkennt zudem auch interne Signale von Carrierproteinen, die sowohl hydrophobe als auch hydrophile Aminosäureseitenketten besitzen (Brix *et al.*, 1999). Der Import eines Proteins kann auch von beiden Rezeptoren, TOM20 und TOM70, abhängen, wie es für den ADP/ATP-Carrier gezeigt wurde (Steger *et al.*,

1990). Die nach der Interaktion mit einem TOM folgende Insertion in die äußere mitochondriale Membran wird zumeist durch einen Kanal – „*general import pore*“ (GIP) – vermittelt, der sowohl aminoterminal als auch interne Targetingsignale erkennt (Pfaller *et al.*, 1988).

Bei den Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* wurden bislang noch keine Homologen zu dem Proteinimportkomplex der äußeren mitochondrialen Membran (TOM) identifiziert (Carlton *et al.*, 2007). Daher scheint der Transport von Proteinen über die äußere hydrogenosomale Membran nach einem anderen Mechanismus zu funktionieren als bei Mitochondrien, zumindest nicht durch Transporter, die denen der Mitochondrien ähneln. Heterologe Targetingexperimente mit dem hydrogenosomalen ADP/ATP Carrier, ein Membranprotein aus *Trichomonas vaginalis* (Dyall *et al.*, 2000) und aus Chytridiomyceten (van der Giezen *et al.*, 2002) wiesen jedoch daraufhin, dass zumindest der Importmechanismus von Membranproteinen zwischen Mitochondrien und Hydrogenosomen konserviert zu sein scheint.

Hydrogenosomale Matrixproteine müssen – wie die der Mitochondrien – nicht nur über die äußere, sondern auch über die innere hydrogenosomale Membran transportiert werden. Mitochondriale Matrixproteine besitzen dazu positiv geladene N-terminale Verlängerungen und gelangen über den Proteinimportkomplex der inneren mitochondrialen Membran (TIM) TIM23 und dem homologen TIM17 in die innere mitochondriale Membran (Kübrich *et al.*, 1994; Maarse *et al.*, 1994; Ryan *et al.*, 1994; Dekker *et al.*, 1997; Rassow und Pfanner, 2000). TIM23 und TIM17 sind miteinander assoziiert, besitzen beide vier membrandurchspannende Segmente und sowohl der Amino- als auch der Carboxyterminus sind zum Intermembranraum hin orientiert (Rassow und Pfanner, 2000). In enger Homologie zu TIM23 und TIM17 steht TIM22 (Rassow und Pfanner, 2000), ist jedoch von TIM23 unabhängig (Sirrenberg *et al.*, 1996) und hat TIM54 (Kerscher *et al.*, 1997), TIM12 (Koehler *et al.*, 1998; Sirrenberg *et al.*, 1998) und TIM18 als Partner (Kerscher *et al.*, 2000; Koehler *et al.*, 2000). An die innere Seite des TIM23 Komplexes ist das hydrophile Protein TIM44 gebunden, das als Adapter für das mitochondriale Hitzeschockprotein Hsp70

fungiert und den Transfer von Hsp70 zum importierten Protein leistet (Maarse *et al.*, 1992; Scherer *et al.*, 1992; Kronidou *et al.*, 1994; Rassow *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1994; Geissler *et al.*, 2000). Die Interaktion von Hsp70 mit dem importierten Protein ist für den Importmechanismus in die mitochondriale Matrix von zentraler Bedeutung (Kang *et al.*, 1990; Gambill *et al.*, 1993). Für die Proteintranslokation durch die Komplexe TIM22 und TIM23 ist der elektrochemische Gradient, der durch das Pumpen von Protonen in den Mitochondrien erzeugt wird, notwendig (Dolezal *et al.*, 2005; Neupert und Herrmann, 2007). Die Energie, die für die Translokation der mitochondrialen Matrixproteine über den Komplex TIM23 benötigt wird, wird durch den PAM Komplex („*presequence translocase-associated motor*“) bereitgestellt (Dolezal *et al.*, 2005). Nach der Translokation werden die N-terminalen Präsequenzen durch eine in der mitochondrialen Matrix lokalisierten Prozessierungspeptidase (MPP) abgeschnitten (Gakh *et al.*, 2002).

Bei den Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* sind Homologe zu den Hauptkomponenten des Proteinimportkomplexes der inneren mitochondrialen Membran TIM23 und TIM17 gefunden worden (Carlton *et al.*, 2007). Daher ist es durchaus wahrscheinlich, dass zumindest der Proteintransport über die innere hydrogenosomale Membran ähnlich wie der Proteintransport über die innere mitochondriale Membran abläuft. Auch Homologe zum mitochondrialen Hitzeschockprotein Hsp70 sind in *Trichomonas vaginalis* identifiziert worden (Germot *et al.*, 1996). Auch hier könnte Hsp70 die Funktion erfüllen, Proteine über die Membranen der Hydrogenosomen zu transportieren und reife Proteine korrekt zu falten. Es ist auch ein Protein, das homolog zum Proteinimportmotor der mitochondrialen Matrix, Pam18, ist, gefunden worden (Dolezal *et al.*, 2005). Kürzlich wurde zudem eine hydrogenosomale Prozessierungspeptidase (HPP) charakterisiert (Brown *et al.*, 2007). Viele hydrogenosomale Proteine haben kurze, abspaltbare, N-terminale Verlängerungen, die an mitochondriale Tragetingsequenzen erinnern (Lahti *et al.*, 1994; Hrdy und Müller, 1995a; Bradley *et al.*, 1997). Diese Präsequenzen tragen Abspaltungsstellen, die durch die HPP erkannt und abgespalten werden. Ein elektrochemischer

Gradient, wie er für die Translokation durch TIM22 und TIM23 der Mitochondrien benötigt wird (Dolezal *et al.*, 2005; Neupert und Herrmann, 2007), fehlt bei den Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis*, denen Cytochrome und auch ein Membran-assoziiertes Elektronentransport fehlen (Müller, 1993). Obwohl Forschungsberichte behaupten, dass die Hydrogenosomen der Trichomonaden ein transmembranes Potential entwickeln können (Humphreys *et al.*, 1998), bleibt der Mechanismus, wie dieses letztendlich aufgebaut wird, rätselhaft (Mentel *et al.*, 2008). Der Import von Ferredoxin in isolierte Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* konnte durch das Protonophor m-Chlorophenylhydrazon inhibiert werden; jedoch lag die Konzentration 10-fach höher als bei einer Inhibition des mitochondrialen Proteinimport erforderlich war (Bradley *et al.*, 1997).

Bei den Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* besteht die Möglichkeit eines co-translationalen Proteinimports. Hinweise darauf erbrachte eine Analyse des hydrogenosomalen Proteoms (Pütz, 2007; Henze, 2008). Bei der Proteomanalyse wurden 17 eukaryotische 40S und 60S ribosomale Proteine identifiziert (Pütz, 2007). Da frühere Untersuchungen zeigten, dass die Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* kein Genom besitzen (Clemens und Johnson, 2000) und hydrogenosomale Proteine an freien Ribosomen im Cytosol gebildet werden (Lahti und Johnson, 1991), ließen diese Identifikationen auf eine Kontamination mit dem rauhen endoplasmatischen Retikulum schließen. Jedoch konnte diese Kontamination durch vielfältige Experimente ausgeschlossen werden (Pütz, 2007). Ebenso deutet die Existenz weiterer an der Translation beteiligter Proteine in der hydrogenosomalen Proteomanalyse auf einen co-translationalen Proteinimport hin: ein Protein des NAC (*nascent chain associated complex*), ein Protein mit NAC-Domäne, ein poly-A bindendes Protein und der Elongationsfaktor EF-1 $\alpha$  (Pütz, 2007). Der NAC-Komplex ist ein Heterodimer, welcher reversibel an eukaryotische Ribosomen bindet und in direkter Nachbarschaft zu neu synthetisierten Polypeptidketten lokalisiert ist (Rospert *et al.*, 2002). NAC-Komplexe fungieren in Mitochondrien als positive Regulatoren der Translokation von Proteinen (George *et al.*, 1998, 2002; Rospert *et al.*, 2002). Poly-A

bindende Proteine sind an der Stabilisierung und Translation von mRNA beteiligt (Gorlach *et al.*, 1994). Der Elongationsfaktor EF-1 $\alpha$  ist mit den Ribosomen assoziiert und reguliert die spezifische Interaktion von Aminoacyl-tRNA mit den Ribosomen während der Elongationsphase der Proteinbiosynthese (Janssen *et al.*, 1994). Die erfolgreiche Isolation von mRNA aus gereinigten Organellen ist ein weiterer Hinweis auf einen co-translationalen Proteinimport bei Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* (Pütz, 2007).

Dass generell bei Hydrogenosomen ein co-translationaler Proteinimport vorliegen könnte, zeigte auch eine Proteomanalyse der Hydrogenosomen des anaeroben Pilzes *Neocallimastix frontalis* (Gelius-Dietrich, 2008). Bei der Untersuchung des Proteoms wurden eukaryotische 40S und 60S ribosomale Proteine identifiziert. Zudem wurden weitere an der Proteinbiosynthese und Proteinfaltung beteiligte Proteine gefunden (Elongationsfaktoren, Hitzeschockproteine).

Der co-translationaler Proteinimport wäre jedoch keine Besonderheit der Hydrogenosomen, denn für die Hefe und für Säugetiere ist bekannt, dass Ribosomen an Mitochondrien binden und es zu einem Proteinimport in die Organellen während der Translation kommt (Ades und Butow, 1980; Marc *et al.*, 2002; MacKenzie und Payne, 2004).

Nach allen bisher verfügbaren Informationen über den Proteinimport bei Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* gibt es Parallelen zum mitochondrialen Proteinimport; jedoch scheint der hydrogenosomale Proteinimportapparat nicht so komplex zu sein wie er bei Mitochondrien festzustellen ist. Allerdings hat sich durch die bisherigen Experimente gezeigt, dass der Proteinimport bei Hydrogenosomen eine größere Komplexität kennzeichnet als bislang vermutet.

## 6.5 Ausblick auf weiterführende Experimente

Die bei dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Lokalisation des als Phosphofruktokinase annotierten Proteins in Zellen von *Trichomonas vaginalis* und die nähere Eingrenzung der Position interner Targetingsignale bei hydrogeno-

somalen Matrixproteinen von *Trichomonas vaginalis* sollen Ausgangspunkte für weiterführende Experimente sein.

Eine Assoziation glykolytischer Enzyme an die Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* – wie sie bei einigen Mitochondrien vorkommt (Conger *et al.*, 1971; Eldan und Blum, 1973; Srere, 1987; Giegé *et al.*, 2003; Brandina *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007) – konnte in dieser Dissertation nicht gezeigt werden. Eine kurze Form der Phosphofruktokinase, die vermutlich eine andere Funktion hat als katalytisch an der Glykolyse beteiligt zu sein, wurde in der hydrogenosomal Fraktion von *Trichomonas vaginalis* detektiert. Doch die Frage, ob die kurze PFK an die Hydrogenosomen assoziiert oder fest gebunden ist, oder sogar im Intermembranraum lokalisiert ist, blieb offen. Es wurde eine transmembrane Helix in dem Protein identifiziert, die der Verankerung des Proteins in dem Organell dienen könnte. Eine Entfernung des transmembranen Bereichs aus der Sequenz und eine Expression des so veränderten Proteins in *Trichomonas vaginalis* sollte eine präzisierte Aussage darüber zulassen, ob der Bereich für die Assoziation/Bindung an die Hydrogenosomen relevant ist. Glykolytische Enzyme binden an die Membranen von roten Blutkörperchen (Gillies, 1982). So binden die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase, die Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase und die Phosphofruktokinase an das Protein Band 3 der Erythrocytenmembran. Die Bindung der GAPDH und der FBA kann durch Substrate ( $P_i$ , NAD) inhibiert werden. Studien von Solti *et al.* (1981) mit markiertem Iodoacetamid wiesen nach, dass die GAPDH jedoch nur in unmittelbarer Nähe der Membran lokalisiert ist. Auch Crosslinking-Experimente bestätigten diesen Nachweis (Keokitichai und Wrigglesworth, 1980). Andere Studien berichteten, dass unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (Ionenstärke) die GAPDH nicht mehr an die Erythrocytenmembran gebunden war (Kliman und Steck, 1980). Für die an Mitochondrien bindende PFK wurde berichtet, dass sie durch Ultraschallbehandlung von Zellen von *Tetrahymena pyriformis* vollständig gelöst werden konnte, bei einem mechanischen Zellaufschluß jedoch in der mitochondrialen Fraktion verblieb (Eldan und Blum, 1973). Diese exemplarischen Untersuchun-

gen könnten Muster für weiterführende Studien der kurzen Phosphofruktokinase aus *Trichomonas vaginalis* sein. So sollte auch dort überprüft werden, unter welchen experimentellen Bedingungen eine vollständige Solubilisierung erreicht werden kann. Daraus könnten Rückschlüsse auf die Assoziation oder Bindung an die Hydrogenosomen gezogen werden. Behandlungen isolierter intakter Organellen mit Proteinase K, wie sie bei Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana* vorgenommen wurden (Giegé *et al.*, 2003), sollten Erkenntnisse über eine Lokalisation der kurzen PFK im Intermembranraum liefern.

Die in dieser Arbeit lokalisierte kurze Phosphofruktokinase ist eine Isoform von elf bei der Sequenzierung des Genoms von *Trichomonas vaginalis* identifizierten PFKs (Carlton *et al.*, 2007). Aus dem Aminosäure-Alignment der elf PFKs (Abbildung 5.12) und der phylogenetischen Analyse (Abbildung 5.15) wird ersichtlich, dass die Enzyme untereinander wenige konservierte Bereiche aufweisen, sie sich in ihrer Länge unterscheiden und in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Eine Homologiesuche in der Proteindatenbank des NCBI ergab sowohl für die langen als auch für die kurzen PFK-Sequenzen beste Treffer zu Phosphofruktokinasen aus Eubakterien. Trotz der hohen Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei diesen Treffern nicht um zufällige Treffer handelt, sollte experimentell belegt werden, ob es sich bei diesen elf annotierten Proteinen um katalytisch aktive Phosphofruktokinasen handelt, dabei sollte auch die Lokalisation aller PFKs in der Zelle von *Trichomonas vaginalis* ermittelt werden. Mertens *et al.* zeigten bereits 1998, dass es sich bei einer der langen PFKs (TVAG\_430830) um eine PP<sub>i</sub>-PFK handelt und dass es mindestens fünf sehr ähnliche Genkopien in *Trichomonas vaginalis* gibt, die genaue Lokalisation der PP<sub>i</sub>-PFK in der Zelle wurde jedoch nicht ermittelt.

Die Vermutung, dass das hydrogenosomale Matrixprotein TrxRh2 ein internes Targetingsignal trägt (Mentel *et al.*, 2008), konnte in dieser Dissertation bestätigt werden. Außerdem konnte die Lokalisation des Signals in der Proteinsequenz eingegrenzt werden. Das Signal befindet sich in den ersten 116 Aminosäuren ausgehend vom N-Terminus des Proteins. Weiterführende Experimente sollten die Lage

des Signals näher eingrenzen. Dazu müsste der erste Sequenzblock in mehrere Segmente eingeteilt werden, die dann mit Sequenzblöcken des Proteins TrxRh1- $\Delta$ 10 (das nicht in die Hydrogenosomen importiert wird) reziprok ausgetauscht werden. Mithilfe dieser Methode lässt sich präzise ermitteln, ob das interne Signal für den Proteinimport von TrxRh2 in die Hydrogenosomen mit der amphipathischen  $\alpha$ -Helix verknüpft ist. Die Vermutung, dass Import-relevante Informationen mit Sekundärstrukturen ( $\alpha$ -Helices) verknüpft sein könnten, kann mithilfe von Mutationen, die direkt die  $\alpha$ -Helix beeinträchtigen, verifiziert werden: Zerstörung der kompletten Struktur, Veränderung der Anzahl der Ladungen, Verhinderung der Helixausbildung oder Unterbrechung der Helix durch den Einbau eines nicht helikalen Sequenzbereichs (Schricker *et al.*, 2002).

Durch die Aufklärung der Kristallstruktur der Thiothoxin Reduktase Isoform TrxRh2 ist feststellbar, ob die identifizierten amphipathischen  $\alpha$ -Helices Haarnadelaktionen mit dem N-Terminus eingehen, wie es für einige mitochondriale Proteine gezeigt wurde (Fölsch *et al.*, 1996; Schricker *et al.*, 2002). Diese Interaktionen könnten für einen Import in die Organellen eine entscheidende Ursache bilden. Durch gezielte Inhibierung der Interaktionen kann belegt werden, ob sie tatsächlich zum Import beitragen.

Falls die in dieser Dissertation untersuchte Phosphofruktokinase von *Trichomonas vaginalis* in weiterführenden Studien als ein hydrogenosomales Membranprotein identifiziert werden sollte, sollte sie zur näheren Charakterisierung interner Targetingsignale bei hydrogenosomalen Proteinen als Beispiel für ein Membranprotein herangezogen werden. Ein Aminosäure-Alignment dieses putativen hydrogenosomalen Membranproteins mit Sequenzen anderer (cytosolischer) PFKs aus *Trichomonas vaginalis* (Abbildung 5.12) lässt Bereiche erkennen, in denen Signale für einen Import in die Organellen vorhanden sein könnten. Hier sollten reziproke Austausche von Sequenzblöcken zwischen cytosolisch und hydrogenosomal lokalisierten PFKs, wie sie in dieser Dissertation an der Thiothoxin Reduktase vorgenommen wurden, zur Identifizierung interner Importsignale führen.

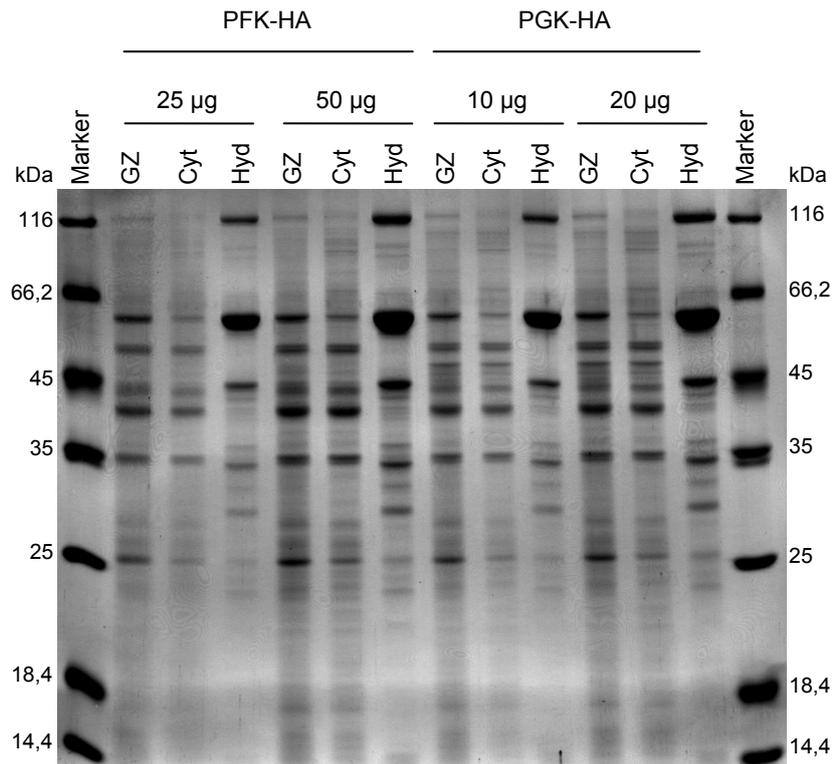
Das Ziel für die nahe Zukunft sollte die Aufklärung des Importwegs in die Organellen für hydrogenosomale Proteine sein. Bisher konnten darüber nur Vermutungen aufgestellt werden. Sobald der Importmechanismus vollständig aufgeklärt ist, können Rückschlüsse auf Homologien zum mitochondrialen Proteinimport gezogen und neue Erkenntnisse über die Schwesterorganellen gewonnen werden.



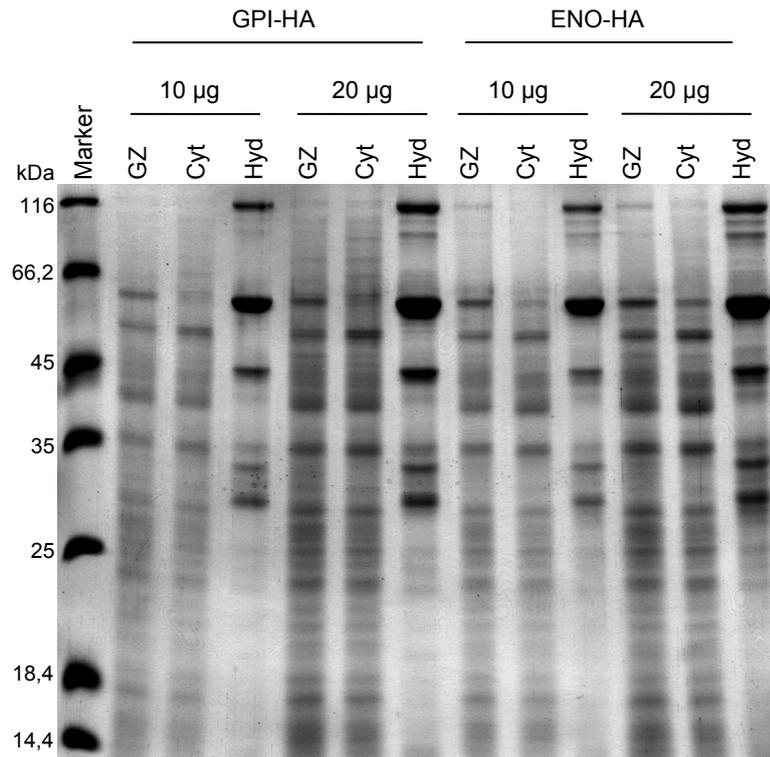
## 7. ANHANG

**Tabelle 7.1:** Zur *Trichomonas vaginalis* Genomdatenbank ([www.trichdb.org](http://www.trichdb.org)) gehörende Zugangsnummern zu den Nukleotidsequenzen der glykolytischen Enzyme, die in dieser Dissertation aus genomischer DNA von *Trichomonas vaginalis* amplifiziert wurden.

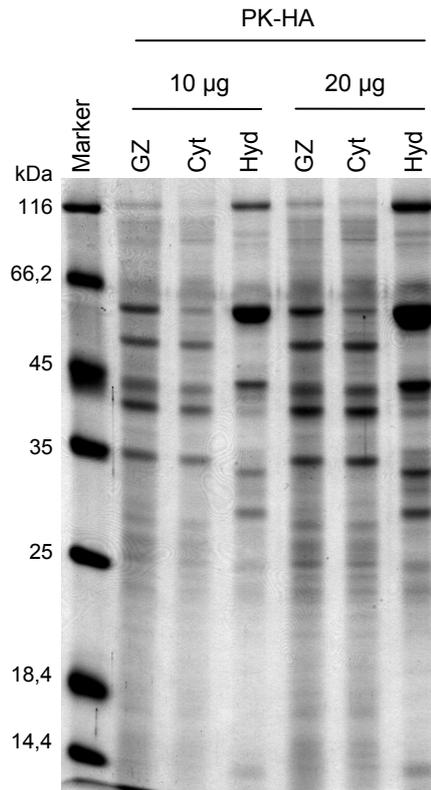
Gen	Zugangsnummer
Enolase	TVAG_043500
Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase	TVAG_043170
Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase	TVAG_475220
Glukokinase	TVAG_023840
Glukose-6-phosphat Isomerase	TVAG_061930
Phosphofruktokinase	TVAG_391760
3-Phosphoglycerat Kinase	TVAG_268050
Pyruvat Kinase	TVAG_373720
Phosphoglycerat Mutase	TVAG_209020
Triosephosphat Isomerase	TVAG_096350



**Abbildung 7.1:** 12%ige SDS-PAGE subzellulärer Fraktionen von Phosphofruktokinase-HA (PFK-HA; 37,76 kDa) und 3-Phosphoglycerat Kinase-HA (PGK-HA; 48,34 kDa) exprimierenden *Trichomonas vaginalis*-Zellen. Es wurden von jeder Fraktion von PFK-HA jeweils 25 und 50 µg Protein und von jeder Fraktion von PGK-HA jeweils 10 und 20 µg aufgetragen. Cyt: Cytosol; GZ: Gesamtzellextrakt; Hyd: Hydrogenosomen; Marker: Protein Größenmarker (Fermentas) [kDa].



**Abbildung 7.2:** 12%ige SDS-PAGE subzellulärer Fraktionen von Glukose-6-phosphat Isomerase-HA (GPI-HA; 64,16 kDa) und Enolase-HA (Enolase-HA; 54,29 kDa) exprimierenden *Trichomonas vaginalis*-Zellen. Es wurden von jeder Fraktion jeweils 10 und 20 µg Protein aufgetragen. Cyt: Cytosol; GZ: Gesamtzellextrakt; Hyd: Hydrogenosomen; Marker: Protein Größenmarker (Fermentas) [kDa].



**Abbildung 7.3:** 12%ige SDS-PAGE subzellulärer Fraktionen von Pyruvat-Kinase-HA (PK-HA; 55,82 kDa) exprimierenden *Trichomonas vaginalis*-Zellen. Es wurden von jeder Fraktion jeweils 10 und 20 µg Protein aufgetragen. Cyt: Cytosol; GZ: Gesamtzellextrakt; Hyd: Hydrogenosomen; Marker: Protein Größenmarker (Fermentas) [kDa].

**Tabelle 7.2:** Überblick über die Zugangsnummern aus der NCBI-Datenbank der in das phylogenetische Netzwerk (Abbildung) eingegangenen Proteinsequenzen der PP<sub>i</sub>-abhängigen Phosphofruktokinasen. Die Zugangsnummern der Sequenzen aus *Trichomonas vaginalis* (www.trichdb.org) sind dem Clustal W-Alignment (Abbildung 5.12) zu entnehmen.

Organismus	Zugangsnummer
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	GI:159185054
<i>Amycolatopsis methanolica</i>	GI:17432243
<i>Arabidopsis thaliana</i> ( $\alpha$ -Untereinheit)	GI:16648971
<i>Arabidopsis thaliana</i> ( $\beta$ -Untereinheit)	GI:4836893
<i>Camelia sinensis</i>	GI:241911785
<i>Candidatus liberibacter asiaticus</i> str. psy62	GI:254039904
<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	GI:71848438
<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	GI:8810218
<i>Entamoeba histolytica</i>	GI:2317746
<i>Giardia intestinalis</i>	GI:520572
<i>Halorhodospira halophila</i> SL1	GI:121590501
<i>Legionella longbeachae</i> NSW150	GI:289164576
<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8	GI:120325163
<i>Methanocella paludicola</i> SANAE	GI:282162873
<i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1	GI:125862108
<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	GI:88602740
<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1	GI:124260736
<i>Methylomonas methanica</i>	GI:63034350
<i>Naegleria fowleri</i>	GI:511231
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	GI:91799394
<i>Nitrosococcus oceani</i> ATCC19707	GI:76884611
<i>Nitrosomonas eutropha</i> C91	GI:114307814
<i>Nitrospira multiformis</i> ATCC25196	GI:82409938
<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	GI:51854456
<i>Oxalobacter formigenes</i> OXCC13	GI:237747522
<i>Rhizobium etli</i> GR56	GI:218673807
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	GI:227822665
<i>Ricinus communis</i> ( $\alpha$ -Untereinheit)	GI:483547
<i>Ricinus communis</i> ( $\beta$ -Untereinheit)	GI:483536
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	GI:15965943
<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1	GI:148501111
<i>Thermoproteus tenax</i>	GI:3087896
<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	GI:15643058

```

THERM_0017032 001 -----DLQKSLTDNKKFFACGLALSSGLITSLL
TVAG_430830 001 -----SISAPVLCGCGPPLGLNGVAG
THERM_00338270 001 MRSFQIQMFIFLFSMIKININKNYQVKESEEFMRHFYFKQPSRNKKRIISPYESYNITSVIKSISNNTYKRIQQNKQPKFAINSQK

THERM_00170320 030 KQNTTEEEKVRRKGSITVRRKEVKKQRTFHHQDNNPKPEIINASNTLMEEVKNESRTONILKVN-----
TVAG_430830 027 ATLYALALGKVKVIGTEGFFLYLCTGDVVKKATIDLLY---DIVSIFHQGGTQSRANPRKTE-----
THERM_00338270 091 LKGTNAQSEFPQSRRBSLEGSNNQHNNNKKEYRVYNNSSILSNRNIGANKGYNTQNKTNSTIDRMSQMLNYQTNASIVS

THERM_00170320 099 -----LIEVPQDETPCHISPLYGENNYEVFGGCGFLDFAFYVTISYVLSDAVI
TVAG_430830 091 -----IQENIRKCLRALKRYEFLICGDDTASAWSVESGNGNIS
THERM_00338270 181 QEADQVCIENEYFQLRQNFQMKTENDMDKTLNQNEQQENRKYQVSTENCQINRSEIYSKRSSESSNSKNSEFQEDNIFKTNRRQAQ

THERM_00170320 150 GINQSLDQSKYVAGPQKHNYFNQQKAAVTCGLCP-----GNVVIREPF
TVAG_430830 134 -----VISCKTDDIDPLPDDOST-----FGFHTARSIG
THERM_00338270 271 NNINENRKNTRKRFINDDVILKKEIITKDDRQTDOSEEKVYNSQENKHNHTNQIHLPIEHNHNEETQEENSKRPHKQDT

THERM_00170320 200 MCYFNNGVRFYVYIKGYKGYODWQETIKDVKEIQRGGTIGSS--GGFDKDIIDNVKKGITVYCLGSDGTGRIQALFNEV
TVAG_430830 164 MEHIRNLMVSKSPRIFLVEAMGRSGHIALGMAEASGHLLEPEEFQIEIEFEDVLEVEATILRLAYC-----
THERM_00338270 361 LLNMRKNSLRTQETPKNKHEITIDYNIESKQASAKTFCASESKKSIQKISKQKNNENQNNENNISQEQYQPKKSEGDIRR

THERM_00170320 289 RRKLNISIVGPKTINDPTIKRSPGQETSVEEAKAIQSSHEEACBAYVGLVRLGRYAQTAMEATN-----
TVAG_430830 238 -----KNYCVLAEGLSKSKKALKLFGNREPTDPHHLDDAPLRSISEELKRLGNLITRIP-----
THERM_00338270 451 LYDGDVHNSKNTLQKQIQTEKKNNEMKINSKDNEDPNNFEEAQAKEIEKQKIKNKEQIELELKKEEFQKLIQQQONQIPQNK

THERM_00170320 362 -----ASR-DAVILVPEEFKNTNYG-----ECCLEYVYRRLISRNCTVVAEAG
TVAG_430830 304 -----KKIGVLRGADPVAFDAVH-----REGYCAIDAFVNGSAAVVRNEC-
THERM_00338270 541 SRKNVHSSMQYRSRHRKNERQISRIISDANLGDQLSTRNQIISPLQQINNINKLLDSDLARERKHEIDNNTQTSPPNKRKSKSKKQL

THERM_00170320 408 EAVLDAQFANTGKIDASGNARLNDGAEVQKEIVYGGKKGMEVTLKYNPTYHRTVPAARDRKCTQLAQNVAHGAGFTGFTVGH
TVAG_430830 350 --YKPVQEKDLLPAGRYVETRLDVNSQFKVARVYMMMSKKYENNDLARVAAAKTPEAFTEKFAHLTIVVE-----
THERM_00338270 631 NIIDQSINKIQKSKSKRYEFKNDASITLNNKKNENEINENNETEENNSAATNESKHLQKKEIKQLSFQESTNCAKLNKIE

THERM_00170320 498 VNNRLCYIPDEICKEGSGRRIKAEDAWRLLASTGPFPLKKE-----
TVAG_430830 -----
THERM_00338270 721 SLEIKQNFKNNISNEDSPNKFQPNRDNQFQLEKIKICIONDSANAQQKQANNSVITEKQLFTQQYERRVLKDRNKQKYSVRO

THERM_00170320 -----
TVAG_430830 -----
THERM_00338270 811 SQEECLNQENLQIRRQQKFQQIMEYDTQKKFTEISKIIDRMTKSRDYKFKKSKDKDFKQVTFQLTESQLNSD

```

**Abbildung 7.4:** Clustal W-Alignment der bei der Proteomanalyse der Mitochondrien von *Tetrahymena thermophila* identifizierten Phosphofruktokinasen (Smith *et al.*, 2007) und einer langen Form der PFK von *Trichomonas vaginalis*. Gleiche Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren sind grau hinterlegt. Die Zugangsnummern der PFKs sind die der Genomdatenbank von *Tetrahymena thermophila* bzw. *Trichomonas vaginalis* ([www.ciliate.org](http://www.ciliate.org) bzw. [www.trichdb.org](http://www.trichdb.org)).

## 8. ABKÜRZUNGEN

A	Ampere
aa	Aminosäuren (engl. <i>amino acids</i> )
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AK	Antikörper
ASCT	Acetat:Succinat-CoA Transferase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>att</i>	<i>attachment</i> , Bindungsstellen
bidest.	doppeltdestilliert
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines (Rinder-)Serumalbumin
°C	Grad Celsius
c	Zenti 10 <sup>2</sup>
C	Cytosin
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EC	engl. <i>Enzyme Commission number</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENO	Enolase
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i>
FBA	Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase

## Abkürzungen

---

FBPase	Fruktose-1,6-bisphosphatase
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Eisen(II)-Ammoniumsulfat
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (engl. <i>gravity</i> ) [9,81 m/s <sup>2</sup> ]
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GK	Glukokinase
GPI	Glukose-6-phosphat Isomerase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HK	Hexokinase
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPP	engl. <i>hydrogenosomal processing peptidase</i>
Hsp	Hitzeschock Protein
HYD	Hydrogenase
IHF	engl. <i>integration host factor</i>
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktosid
k	Kilo 10 <sup>3</sup>
kb	Kilobase = 1000 Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
m	Meter
m	milli- (10 <sup>-3</sup> )
M	Molar mol/l

---

MDH	Malat Dehydrogenase, EC 1.1.1.37
ME	Malat Enzym, EC 1.1.1.40
MF	Multiplikationsfaktor
min	Minute
mol	Mol ( $6,3 \times 10^{23}$ Teilchen)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten ( <i>messenger</i> )-RNA
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD	optische Dichte
P <sub>2</sub>	Diphosphat-Rest
<i>p.a.</i>	<i>per analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFK	Phosphofruktokinase
PFO	Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase
PGK	3-Phosphoglycerat Kinase
PGM	Phosphoglycerat Mutase
pH	pH-Wert; $\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$
P <sub>i</sub>	anorganischer Phosphat-Rest
PP <sub>i</sub>	anorganischer Diphosphat-Rest (Pyrophosphat)
PK	Pyruvat Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i> )

RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SCS	Succinyl-CoA Synthetase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumlaurylsulfat
SMB	Saccharose MOPS $\beta$ -Mercaptoethanol
SMDI	Saccharose MOPS DTT Protease-Inhibitoren
ssRNA	einzelsträngige RNA
T	Thymin
TBS	Tris-Puffer Natrium
TE	Tris EDTA
TIC	engl. <i>translocase in the inner chloroplastidal membrane</i>
TIM	engl. <i>translocase in the inner mitochondrial membrane</i>
TLCK	$N_{\alpha}$ -Tosyl-L-Lysin Chloromethyl Keton Hydrochlorid
$T_m$	Schmelztemperatur
TOC	engl. <i>translocase in the outer chloroplastidal membrane</i>
TOM	engl. <i>translocase in the outer mitochondrial membrane</i>
TPI	Triosephosphat Isomerase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrxRh1	hydrogenosomale Thioredoxin Reduktase 1
TrxRh1- $\Delta$ 10	TrxRh1 ohne die ersten 10 Aminosäuren des N-Terminus
TrxRh2	hydrogenosomale Thioredoxin Reduktase 2
U	Enzymaktivität kommerzieller Enzyme
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	Volumen
VF	Verdünnungsfaktor
w	Gewicht
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbott, D. W., Boraston, A. B.** (2008) Structural biology of pectin degradation by Enterobacteriaceae. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**:301-316.
- Achari, A., Marshall, S. E., Muirhead, H., Palmieri, R. H., Noltmann, E. A.** (1981) Glucose-6-phosphate isomerase. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **293**:145-157.
- Ades, I. Z., Butow, R. A.** (1980) The products of mitochondria-bound cytoplasmic polysomes in yeast. *J. Biol. Chem.* **255**:9918-9924.
- Akhmanova, A., Voncken, F. G., van Alen, T., van Hoek, A., Boxma, B., Vogels, G., Veenhuis, M., Hackstein, J. H.** (1998) A hydrogenosome with a genome. *Nature* **396**:527-528.
- Akhmanova, A., Voncken, F. G., Hosea, K. M., Harhangi, H., Keltjens, J. T., op den Camp, H. J., Vogels, G. D., Hackstein, J. H.** (1999) A hydrogenosome with pyruvate formate-lyase: anaerobic chytrid fungi use an alternative route for pyruvate catabolism. *Mol. Microbiol.* **32**:1103-1114.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D.** (1997) Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage, 1. korrigierter Nachdruck, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo S. 671.
- Allen, J. F.** (2003) The function of genomes in bioenergetic organelles. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **358**:19-37.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang Z., Miller, W. Lipman D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Amberson, W. R., Roisen, F. J., Baver, A. L.** (1965) The attachment of glycolytic enzymes to muscle ultrastructure. *J. Cell. Comp. Physiol.* **66**:71-90.
- Aurrecoechea, C., Brestelli, J., Brunk, B. P., Carlton, J. M., Dommer, J., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gingle, A., Grant, G., Harb, O. S., Heiges, M., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J. C., Kraemer, E., Li, W., Miller, J. A., Morrison, H. G., Nayak, V., Pennington, C., Pinney, D. F., Roos, D. S., Ross, C., Stoeckert, C. J. Jr., Sullivan, S., Treatman, C., Wang, H.** (2009) GiardiaDB and TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Nucl. Acids Res.* **37**:D526-D530.

- Archibald, J. M.** (2006) Algal genomics: exploring the imprint of endosymbiosis. *Curr. Biol.* **16**:R1033-R1035.
- Arese, P., Cappuccinelli, P.** (1974) Glycolysis and pentose phosphate cycle in *Trichomonas vaginalis*: I. Enzyme activity pattern and the constant proportion quintet. *Int. J. Biochem.* **5**:859-865.
- Arnold, H., Pette, D.** (1968) Binding of glycolytic enzymes to structure proteins of the muscle. *Eur. J. Biochem.* **6**:163-171.
- Baernstein, H. D.** (1955) Aldolase in *Trichomonas vaginalis*. *Exptl. Parasitol.* **4**:323-334.
- Banroques, J., Perea, J., Jacq, C.** (1987) Efficient splicing of two yeast mitochondrial introns controlled by a nuclear-encoded maturase. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* **6**:1085-1091.
- Baril, C., Richaud, C., Baranton, G., Saint-Girons, I. S.** (1989) Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. *Rs. Microbiol.* **140**:570-576.
- Battista, J. R.** (1997) Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**:203-224.
- Beilharz, T., Egan, B., Silver, P. A., Hofmann, K., Lithgow, T.** (2003) Bipartite signals mediate subcellular targeting of tail-anchored membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**:8219-8223.
- Biswas, T. K., Getz, G. S.** (2002) Import of yeast mitochondrial transcription factor (Mtf1p) via a nonconventional pathway. *J. Biol. Chem.* **277**:45704-45714.
- Biswas, T. K., Getz, G. S.** (2004) Requirement of different mitochondrial targeting sequences of the yeast mitochondrial transcription factor Mtf1p when synthesized in alternative translation systems. *Biochem. J.* **383**:383-391.
- Björn, L. O., Govindjee** (2009) The evolution of photosynthesis and chloroplasts. *Curr. Sci.* **96**:1466-1474.
- Bömer, U., Meijer, M., Guiard, B., Dietmeier, K., Pfanner, N., Rassow, J.** (1997) The sorting route of cytochrome b<sub>2</sub> branches from the general mitochondrial import pathway at the preprotein translocase of the inner membrane. *J. Biol. Chem.* **272**:30439-30446.
- Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., Pfanner, N.** (2008) Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *Eur. Mol. Biol. Org. Rep.* **9**:42-49.

- Bork, P., Sander, C., Valencia, A.** (1993) Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: The hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Prot. Sci.* **2**:31-40.
- Boxma, B., de Graaf, R. M., van der Staay, G. W., van Alen, T. A., Ricard, G., Gabaldón, T., van Hoek, A. H., Moon-van der Staay, S. Y., Koopman, W. J., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G. M., Friedrich, T., Veenhuis, M., Huynen, M. A., Hackstein, J. H.** (2005) An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* **434**:74-79.
- Bradford, M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-252.
- Bradley, P. J., Lahti, C. J., Plümper, E., Johnson, P. J.** (1997) Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist *Trichomonas*: similarities with mitochondrial protein import. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* **16**:3484- 3493.
- Brandina, I., Graham, J., Lemaitre-Guillier, C., Entelis, N., Krasheninnikov, I., Sweetlove, L., Tarassov, I., Martin, R. P.** (2006) Enolase takes part in a macromolecular complex associated to mitochondria in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**:1217-1228.
- Brix, J., Dietmeier, K., Pfanner, N.** (1997) Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *J. Biol. Chem.* **272**:20730-20735.
- Brix, J., Rüdiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J., Pfanner, N.** (1999) Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *J. Biol. Chem.* **274**:16522-16530.
- Brondijk, T. H., Durand, R., van der Giezen, M., Gottschal, J. C., Prins, R. A., Fèvre, M.** (1996) *scsB*, a cDNA encoding the hydrogenosomal beta subunit of succinyl-CoA synthetase from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Mol. Gen. Genet.* **253**:315-323.
- Brown, M. T., Goldstone, H. M. H., Bastida-Corcuera, F., Delgadillo-Correa, M. G., McArthur, A. G., Johnson, P. J.** (2007) A functionally divergent hydrogenosomal peptidase with protomitochondrial ancestry. *Mol. Microbiol.* **64**:1154-1163.
- Brul, S., Veltman, R. H., Lombardo, M. C. P., Vogels, G. D.** (1994) Molecular cloning of hydrogenosomal ferredoxin cDNA from the anaerobic moeboflagellate *Psalteriomonas lanterna*. *Biochim. Biophys. Acta* **1183**:544-546.

- Bryant, D., Moulton, V.** (2004) Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol.* **21**:255-265.
- Bücher, T.** (1947) Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment. *Biochim. Biophys. Acta* **1**:292-314.
- Bücher, T., Pfeleiderer, G.** (1955) Pyruvate kinase from muscle: Pyruvate phosphokinase, pyruvic phosphoferase, phosphopyruvate transphosphorylase, phosphate-transferring enzyme II, etc. Phosphoenolpyruvate + ADP  $\leftrightarrow$  Pyruvate + ATP. *Methods Enzymol.* **1**:435-440.
- Bui, E. T., Bradley, P. J., Johnson, P. J.** (1996) A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:9651-9656.
- Cárdenas, M. L., Cornish-Bowden, A., Ureta, T.** (1998) Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1401**:242-264.
- Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J. R., Bidwell, S. L., Alsmark, U. C., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C. J., Dacks, J. B., Foster, P. G., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J., Westrop, G. D., Müller, S., Dessi, D., Fiori, P. L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F. D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M. T., Hayes, R.D., Mukherjee, M., Okumura, C. Y., Schneider, R., Smith, A. J., Vanacova, S., Villalvazo, M., Haas, B. J., Perteza, M., Feldblyum, T. V., Utterback, T. R., Shu, C. L., Osoegawa, K., de Jong, P. J., Hrdy, I., Horvathova, L., Zubacova, Z., Dolezal, P., Malik, S. B., Logsdon, J. M. Jr., Henze, K., Gupta, A., Wang, C. C., Dunne, R. L., Upcroft, J. A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S. L., Tang, P., Chiu, C. H., Lee, Y. S., Embley, T. M., Coombs, G. H., Mottram, J. C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C. M., Johnson, P. J.** (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* **315**:207-212.
- Carnal, N. W., Black, C. C.** (1986) Phosphofructokinase activities in photosynthetic organisms. The occurrence of pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase in plants and algae. *Plant Physiol.* **71**:150-155.
- Cavalier-Smith, T.** (2002) The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:297-354.
- Cavalier-Smith, T.** (2004) Only six kingdoms of life. *Proc. Biol. Sci.* **271**:1251-1262.
- Chacinzka, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T., Pfanner, N.** (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**:628-644.

- Clark, C.G., Diamond, L. S. (2002) Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:329-341.
- Clarke, F. M., Masters, C. J. (1976) Interactions between muscle proteins and glycolytic enzymes. *Int. J. Biochem.* **7**:359-365.
- Clayton, C. E., Michels, P. (1996) Metabolic compartmentation in African trypanosomes. *Parasitol. Today* **12**:465-471.
- Clegg, J. S., Jackson, S. A. (1988) Glycolysis in permeabilized L-929 cells. *Biochem. J.* **255**:335-344
- Clegg, J. S., Jackson, S. A. (1990) Glucose metabolism and the channeling of glycolytic intermediates in permeabilized L-929 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **278**:452-460.
- Clemens, D. L., Johnson, P. J. (2000) Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. *Mol. Biochem. Parasitol.* **106**:307-313.
- Cole, J., Barber, J. D., Barton, G. J. (2008) The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucl. Acids Res.* **36**:W197-W201.
- Conger, N. E., Fields, R. D., Feldman. C. T. (1971) Purification and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Tetrahymena pyriformis*. *Fed. Proc.* **30**:1158.
- Coombs, G. H., Westrop, G. D., Suchan, P., Puzova, G., Hirt, R. P., Embley, T. M., Mottram, J. C., Müller, S. (2004) The amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis* contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system. *J. Biol. Chem.* **279**:5249-5256.
- Cori, C. F. (1983) Embden and the glycolytic pathway. *Trends Plant Sci.* **8**:257-259.
- Dai, S., Saarinen, M., Ramaswamy, S., Meyer, Y., Jacquot, J.-P., Eklund, H. (1996) Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* NADPH dependent thioredoxin reductase at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **264**:1044-1057.
- Dandekar, T., Schuster, S., Snel, B., Huynen, M., Bork, P. (1999) Pathway alignment: application to comparative analysis of glycolytic enzymes. *Biochem. J.* **343**:115-124.
- Davies, S. L., Whittenbury, R. (1970) Fine structure of methane and other hydrocarbon-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61**:227-232.

- Dekker, P. J. T., Martin, F., Maarse, A. C., Bömer, U., Müller, H., Guiard, B., Meijer, M., Rassow, J., Pfanner, N.** (1997) The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70/Tim44. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* **16**:5408-5419.
- Delgadillo, M. G., Liston, D. R., Niazi, K., P. J. Johnson** (1997) Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:4716-4720.
- Delwiche, C.** (1999) Tracing the thread of plastid diversity through the tapestry of life. *Am. Nat.* **154**:164-177.
- Deusch, O., Landan, G., Roettger, M., Gruenheit, N., Kowallik, K. V., Allen, J. F., Martin, W., Dagan, T.** (2008) Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. *Mol. Biol. Evol.* **25**:748-761.
- Diamond, L. S.** (1957) The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* **43**:488-490.
- Diamond, L. S.** (1983) Lumen dwelling protozoa: *Entamoeba*, trichomonads, and *Giardia*, S. 67-109. in: Jensen, J. B. (Hrsg.) *In vitro* cultivation of protozoan parasites. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Diekert, K., Kispal, G., Guiard, B., Lill, R.** (1999) An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:11752-11757.
- Dolezal, P., Smíd, O., Rada, P., Zubáková, Z., Bursač, D., Suták, R., Nebesárová, J., Lithgow, T., Tachezy, J.** (2005) *Giardia* mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:10924-10929.
- Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J., Lithgow, T.** (2006) Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* **313**:314-318.
- Doolittle, W. F.** (1998) A paradigm gets shifty. *Nature* **392**:15-16.
- Dooren, G. G., Schwartzbach, S. D., Osafune, T., McFadden, G. I.** (2001) Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. *Biochim. Biophys. Acta* **1541**:34-53.
- Douglas, S. E.** (1998) Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**:655-661.

- Duggleby, R. G., Dennis, D. T.** (1974) Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Pisum sativum*. Assay and steady state kinetics. *J. Biol. Chem.* **249**:167-174.
- Dumont, M. E., Cardillo, T. S., Hayes, M. K., Sherman, F.** (1991) Role of cytochrome c heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **11**:5487-5496.
- Dyall, S. D., Johnson, P. J.** (2000a) The trichomonad hydrogenosome. In: Tschudi, C., Pearce, E. J. (Hrsg.) *Biology of parasitism. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht* S. 169-193.
- Dyall, S. D., Johnson, P. J.** (2000b) Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:404-411.
- Dyall, S. D., Koehler, C. M., Delgadillo-Correa, M. G., Bradley, P. J., Plümper, E., Leuenberger, D., Turck, C. W. und Johnson, P. J.** (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**:2488-2497.
- Ehmann, J. D., Hultin, H. O.** (1973) Substrate inhibition of soluble and bound lactate dehydrogenase (isoenzyme 5). *Arch. Biochem. Biophys.* **154**:471-475.
- Eldan, M., Blum, J. J.** (1973) Localization of phosphofructokinase on the mitochondria of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Biol. Chem.* **248**:7445-7448.
- Embden, G., Deuticke, H. J., Kraft, G.** (1933) Über die intermediären Vorgänge bei der Glykolyse in der Muskulatur. *Klinische Wochenschrift* **12**:213-215.
- Embley, T. M., van der Giezen, M., Horner, D. S., Dyal, P. L., Foster, P.** (2003) Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. *Phil. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **358**:191-201.
- Embley, T. M.** (2006) Multiple secondary origins of the anaerobic lifestyle in eukaryotes. *Phil. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **361**:1055-1067.
- Embley, T. M., Martin, W.** (2006) Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* **440**:623-630.
- Errington, J.** (1993) *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**:1-33.

- Esser, C., Ahmadinejad, N., Wiegand, C., Rotte, C., Sebastiani, F., Gelius-Dietrich, G., Henze, K., Kretschmann, E., Richly, E., Leister, D., Bryant, D., Steel, M. A., Lockhart, P. J., Penny, D., Martin, W. (2004) A genome phylogeny for mitochondria among  $\alpha$ -proteobacteria and a predominantly eubacterial ancestry of yeast nuclear genes. *Mol. Biol. Evol.* **21**:1643-1660.
- Ferat, J.-L., Michel, F. (1993) Group II self-splicing introns in bacteria. *Nature* **364**:358-361.
- Fernie, A. R., Carrari, F., Sweetlove, L. J. (2004) Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **7**:254-261.
- Fölsch, H., Guiard, B., Neupert, W., Stuart, R. A. (1996) Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* **15**:479-487.
- Fothergill-Gilmore, L. A., Watson, H. C. (1989) The phosphoglycerate mutases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **62**:227-313.
- Fothergill-Gilmore, L. A., Watson, H. C. (1990) Phosphoglycerate mutases. *Biochem. Soc. Trans.* **18**:190-193.
- Fothergill-Gilmore, L. A., Michels, P. A. M. (1993) Evolution of glycolysis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**:105-235.
- Fujiki, Y., Hubbard, A. L., Fowler, S., Lazarow, P. B. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **93**:97-102.
- Fuerst, J. A., Webb, R. I. (1991) Membrane-bounded nucleoid in the eubacterium *Gemmata obscuriglobus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:8184-81188.
- Gakh, O., Cavadini, P., Isaya, G. (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**:63-77.
- Gallagher, C. H., Judah, J. H., Rees, K. R. (1956) Glucose oxidation by brain mitochondria. *Biochem. J.* **62**:436-440.
- Gambill, D., Voos, W., Kang, P. J., Miao, B., Langer, T., Craig, E. A., Pfanner, N. (1993) A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins. *J. Cell Biol.* **123**:109-117.

- Gay, N. J., Walker, J. E.** (1985) Two genes encoding the bovine mitochondrial ATP synthase proteolipid specify precursors with different import sequences and are expressed in a tissue-specific manner. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* **4**:3519-3524.
- Geissler, A., Krimmer, T., Schönfisch, B., Meijer, M., Rassow, J.** (2000) Biogenesis of the yeast frataxin homolog Yfh1p: Tim44-dependent transfer to mtHsp70 facilitates folding of newly imported proteins in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **267**:3167-3180.
- Gelius-Dietrich, G.** (2008) Charakterisierung der Hydrogenosomen des anaeroben Pilzes *Neocallimastix frontalis* – Proteomanalyse und EST-Sequenzierung. Inaugural Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- George, R., Beddoe, T., Landl, K., Lithgow, T.** (1998) The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:2296-2301.
- George, R., Walsh, P., Beddoe, T., Lithgow, T.** (2002) The nascent polypeptide-associated complex (NAC) promotes interaction of ribosomes with the mitochondrial surface *in vivo*. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* **516**:213-216.
- Germot, A., Philippe, H., Le Guyader, H.** (1996) Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:14614-14617.
- Gershoni, J. M., Palade, G. E.** (1983) Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* **131**:1-15.
- Geyer, T., Helms, V.** (2006) A spatial model of the chromatophore vesicles of *Rhodobacter sphaeroides* and the position of the cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex. *Biophys. J.* **91**:921-926.
- Giegé, P., Heazlewood, J. L., Roessner-Tunali, U., Millar, A. H., Fernie, A. R., Leaver, C. J., Sweetlove, L. J.** (2003) Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* **15**:2140-2151.
- Gillies, R. J.** (1982) The binding site for aldolase and G3PDH in erythrocyte membranes. *Trends Biochem. Sci.* **7**:41-42.
- Ginsburg, A., Stadtman, E. R.** (1970) Multienzyme systems. *Annu. Rev. Biochem.* **39**:429-472.

- Glaser, E., Sjoling, S., Tanudji, M., Whelan, J.** (1998) Mitochondrial protein import in plants – signals, sorting targeting, processing and regulation. *Plant Mol. Biol.* **38**:311-338.
- Gorlach, M., Burd, C. G., Dreyfuss, G.** (1994) The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance, and RNA-binding specificity. *Exp. Cell Res.* **211**:400-407.
- Gould, S. B., Waller, R. F., McFadden, G. I.** (2008) Plastid evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**:491-517.
- Graham, J. W. A., Williams, T. C. R., Morgan, M., Fernie, A. R., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J.** (2007) Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *Plant Cell* **19**:3723-3738.
- Green, D. E., Murer, E., Hultin, H. O., Richardson, S. H., Salmon, B., Brierley, G. P., Baum, H.** (1965) Association of integrated metabolic pathways with membranes. I. Glycolytic enzymes of red blood corpuscle and yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **112**:635-647.
- Häusler, T., Stierhof, Y. D., Blattner, J., Clayton, C.** (1997) Conservation of mitochondrial targeting sequence function in mitochondrial and hydrogenosomal proteins from the early-branching eukaryotes *Crithidia*, *Trypanosoma* and *Trichomonas*. *Eur. J. Cell Biol.* **73**:240-251.
- Hannaert, V., Michels, P. A.** (1994) Structure, function, and biogenesis of glycosomes in kinetoplastida. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**:205-212.
- Hannaert, V., Brinkmann, H., Nowitzki, U., Lee, J. A., Albert, M. A., Sensen, C. W., Gaasterland, T., Müller, M., Michels, P., Martin, W.** (2000) Enolase from *Trypanosoma brucei*, from the amitochondriate protist *Mastigamoeba balamuthi*, and from the chloroplast and cytosol of *Euglena gracilis*: pieces in the evolutionary puzzle of the eukaryotic glycolytic pathway. *Mol. Biol. Evol.* **17**:989-1000.
- Hartl, F.-U., Pfanner, N., Nicholson, D., Neupert, W.** (1989) Mitochondrial protein import. *Biochim. Biophys. Acta* **988**:1-45.
- Hartley, J. L., Temple, G. F., Brasch, M. A.** (2000) DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Res.* **10**:1788-1795.
- Harrigan, P. J., Trentham, D. R.** (1973) Kinetic studies of the acylation of pig muscle D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by 1,3-Diphosphoglycerate and of proton uptake and release in the overall enzyme mechanism. *Biochem. J.* **135**:695-703.

- Hell, K., Herrmann, J. M., Pratje, E., Neupert, W., Stuart, R. A.** (1998) Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:2250-2255.
- Hendrick, J. P., Hodges, P. E., Rosenberg, L. E.** (1989) Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: Leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:4056-4060.
- Henze, K., Badr, A., Wettern, M., Cerff, R., Martin, W.** (1995) A nuclear gene of eubacterial origin in *Euglena gracilis* reflects cryptic endosymbioses during protist evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:9122-9126.
- Henze, K., Morrison, H. G., Sogin, M. L., Müller, M.** (1998) Sequence and phylogenetic position of a class II aldolase gene in the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *Gene* **222**:163-168.
- Henze, K., Horner, D. S., Suguri, S., Moore, D. V., Sánchez, L. B., Müller, M., Embley, T. M.** (2001) Unique phylogenetic relationships of glucokinase and glucosephosphate isomerase of the amitochondriate eukaryotes *Giardia intestinalis*, *Spironucleus barkhanus* and *Trichomonas vaginalis*. *Gene* **281**:123-131.
- Henze, K.** (2008) The proteome of *T. vaginalis* hydrogenosomes. In: Tachezy, J. (Hrsg.) Hydrogenosomes and mitosomes: Mitochondria of anaerobic eukaryotes, Microbiology Monographs Band 9, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg S. 163-178.
- Heukeshoven, J., Dernick, R.** (1988) Increased sensitivity for coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem development unit. *Electrophoresis* **9**:60-61.
- Hirokawa T., Boon-Chieng S., Mitaku S.** (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14**:378-379.
- Hochstein, P.** (1957) Glycolysis by tumor mitochondria and the action of insulin. *Science* **125**:496-498.
- Hönlinger, A., Keil, P., Nelson, R. J., Craig, E. A., Pfanner, N.** (1995) Posttranslational mitochondrial protein import in a homologous yeast *in vitro* system. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **376**:515-519.
- Hofmann, K., Stoffel, W.** (1993) Tmbase – A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**:166.

- Hrdy, I., Müller, M.** (1995a) Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *J. Mol. Evol.* **41**:388-396.
- Hrdy, I., Müller, M.** (1995b) Primary structure of the hydrogenosomal malic enzyme of *Trichomonas vaginalis* and its relationship to homologous enzymes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**:593-603.
- Hrdy, I., Hirt, R. P., Dolezal, P., Bardonová, L., Foster, P. G., Tachezy, J., Embley, T. M.** (2004) *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* **432**:618-622.
- Hudder, A., Nathanson, L., Deutscher, M. P.** (2003) Organization of mammalian cytoplasm. *Mol. Cell. Biol.* **23**:9318-9326.
- Humphreys, L., Masters, C.** (1986) On the differential release of glycolytic enzymes from cellular structure. *Biochem. Int.* **13**:71-77.
- Humphreys, M., Ralphs, J., Lloyd, D.** (1998) Confocal laser scanning microscopy of trichomonads: hydrogenosomes store calcium and show a membrane potential. *Eur. J. Parasitol.* **34**:356-362.
- Hurt, E. C., Schatz, G.** (1987) A cytosolic protein contains a cryptic mitochondrial targeting signal. *Nature* **325**:499-503.
- Hurtz, C.** (2007) Entwicklung des glykolytischen Stoffwechsels. Bachelorarbeit im Fach Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Huson, D. H.** (1998) SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* **14**:68-73.
- Janssen, G. M. C., van Damme, H. T. F., Kriek, J., Amons, R., Möller, W.** (1994) The subunit structure of elongation factor 1 from *Artemia*. *J. Biol. Chem.* **269**:31410-31417.
- Jarvis, P., Soll, J.** (2001) Toc, Tic, and chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta* **1541**:64-79. 2002 korrigiert in: *Biochim. Biophys. Acta* **1590**:177-189.
- Johnson, U., Schönheit, P.** (2007) Characterization of cofactor-dependent and cofactor-independent phosphoglycerate mutases from archaea. *Extremophiles* **11**:647-657.

- Johnson, P. J., D'Oliveira, C. E., Gorrell, T. E., Müller, M.** (1990) Molecular analysis of the hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:6097-6101.
- Kang, P. J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E. A., Pfanner, N.** (1990) Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* **348**:137-143.
- Katzen, F.** (2007) Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin. Drug Discov.* **2**:571-589.
- Kawai, S., Mukai, T., Mori, S., Mikami, B., Murata, K.** (2005) Hypothesis: structures, evolution, and ancestor of glucose kinases in the hexokinase family. *J. Biosc. Bioeng.* **99**:320-330.
- Keeling, P. J., Doolittle, W. F.** (1997) Evidence that eukaryotic triosephosphate isomerase is of alpha-proteobacterial origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:1270-1275.
- Keeling, P. J., Palmer, J. D.** (2000) Parabasal flagellates are ancient eukaryotes. *Nature* **405**:635-637.
- Keleti, T., Batke, J., Ovádi, J., Jancsik, V., Bartha, F.** (1977) Macromolecular interactions in enzyme regulation. *Adv. Enzyme Regul.* **15**:233-265.
- Kellems, R. E., Allison, V. F., Butow, R. A.** (1975) Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *J. Cell Biol.* **65**:1-14.
- Kemper, C., Habib, S. J., Engl., G., Heckmeyer, P., Dimmer, K. S., Rapaport, D.** (2008) Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components. *J. Cell Sci.* **121**:1990-1998.
- Kempner, E. S., Miller, J. H.** (1968) The molecular biology of *Euglena gracilis*. V. Enzyme location. *Exp. Cell Res.* **51**:150-156.
- Keokitichai, S., Wrigglesworth, J. M.** (1980) Association of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the membrane of the intact human erythrocyte. *Biochem. J.* **187**:837-841.
- Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R. S., Jensen, R. E.** (1997) The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* **139**:1663-1675.

- Kerscher, O., Sepuri, N. B., Jensen, R. E.** (2000) Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol. Biol. Cell* **11**:103-116.
- Kleine, T., Maier, U.-G., Leister, D.** (2009) DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**:115-138.
- Kliman, H. J., Steck, T. L.** (1980) Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with the human red cell membrane. A kinetic analysis. *J. Biol. Chem.* **10**:6314-6321.
- Koehler, C. M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R. J., Schatz, G.** (1998) Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science* **279**:369-373.
- Koehler, C. M., Murphy, M. P., Bally, N. A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G., Or, E.** (2000) Tim18, a new subunit of the Tim22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol. Cell Biol.* **20**:1187-1193.
- Komeili, A., Li, Z., Newman, D. K., Jensen, G. J.** (2006) Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. *Science* **311**:242-245.
- Kopac, M. J.** (1938) The Deveaux effect at oil-protoplasm interfaces. *Biol. Bull.* **75**:372-383.
- Kremer, D. R., Nienhuis-Kuiper, H. E., Timmer, C. J., Hansen, T. A.** (1989) Catabolism of malate and related dicarboxylic acids in various *Desulfovibrio* strains and the involvement of an oxygen-labile NADPH dehydrogenase. *Arch. Microbiol.* **151**:34-39.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E. L.** (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**:567-580.
- Kronidou, N. G., Oppliger, W., Bolliger, L., Hannavy, K., Glick, B. S., Schatz, G., Horst, M.** (1994) Dynamic interaction between Isp45 and mitochondrial hsp70 in the protein import system of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:12818-12822.

- Kübrich, M., Keil, P., Rassow, J., Dekker, P. J. T., Blom, J., Meijer, M., Pfanner, N.** (1994) The polytopic mitochondrial inner membrane proteins MIM17 and MIM23 operate at the same preprotein import site. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* **349**:222-228.
- Kurz, M., Martin, H., Rassow, J., Pfanner, N., Ryan, M. T.** (1999) Biogenesis of Tim proteins of the mitochondrial carrier import pathway: differential targeting mechanisms and crossing over with the main import pathway. *Mol. Biol. Cell* **10**:2461-2474.
- Kutik, S., Stojanovski, D., Becker, T., Meinecke, M., Krüger, V., Prinz, C., Meisinger, C., Guiard, B., Wagner, R., Pfanner, N., Wiedemann, N.** (2008) Dissecting membrane insertion of mitochondrial  $\beta$ -barrel protein. *Cell* **132**:1001-1024.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Länge, S., Rozario, C., Müller, M.** (1994) Primary structure of the hydrogenosomal adenylate kinase of *Trichomonas vaginalis* and its phylogenetic relationships. *Mol. Biochem. Parasitol.* **66**:297-308.
- Lake, J., Moore, J. E., Simonson, A., Rivera, M. C.** (2005) Fulfilling Darwin's dream. In Sapp, J. (Hrsg.) *Microbial Phylogeny and Evolution: Concepts and Controversies*, Kapitel 9. *Oxford University Press*, Oxford, SS.184.
- Land, K. M., Delgadillo-Correa, M. G., Tachezy, J., Vanacova, S., Hsieh, C. L., Sutak, R., Johnson, P. J.** (2004) Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. *Mol. Microbiol.* **51**:115-122.
- Landy, A.** (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **58**:913-949.
- Lane, C. E., Archibald, J. M.** (2008) The eukaryotic tree of life: endosymbiosis takes its TOL. *Trends. Ecol. Evol.* **23**:268-275.
- Lahti, C. J., Johnson P. J.** (1991) *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal proteins are synthesized on free polyribosomes and may undergo processing upon maturation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **46**:307-310.
- Lahti, C. J., D'Oliveira, C. E., Johnson, P. J.,** (1992)  $\beta$ -succinyl-coenzyme A synthase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. *J. Bacteriol.* **174**:6822-6830.

- Lahti, C. J., Bradley, P. J., Johnson, P. J.** (1994) Molecular characterization of the  $\alpha$ -subunit of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal succinyl CoA synthetase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **66**:309-318.
- Lee, C. M., Sedman, J., Neupert, W., Stuart, R. A.** (1999) The DNA helicase, Hmi1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. *J. Biol. Chem.* **274**:20937-20942.
- Liaud, M.-F., Lichtlé, C., Apt, K., Martin, W. and Cerff, R.** (2000) Compartment-specific isoforms of TPI and GAPDH are imported into diatom mitochondria as a fusion protein: evidence in favor of a mitochondrial origin of the eukaryotic glycolytic pathway. *Mol. Biol. Evol.* **17**:213-223.
- Lill, R., Stuart, R. A., Drygas, M. E., Nargang, F. E., Neupert, W.** (1992) Import of cytochrome c heme lyase into mitochondria: a novel pathway into the intermembrane space. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* **11**:449-456.
- Lill, R., Mühlenhoff, U.** (2005) Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **30**:133-141.
- Lindmark, D. G., Müller, M.** (1973) Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* **248**:7724-7728.
- Lohman, K., Meyerhof, O.** (1934) Über die enzymatische Umwandlung von Phosphoglyzerinsäure in Brenztraubensäure und Phosphorsäure. *Biochem. Z.* **273**:60-72.
- Lunn, J. E.** (2006) Compartmentation in plant metabolism. *J. Exp. Bot.* **58**:35-47.
- Maarse, A. C., Blom, J., Grivell, L. A., Meijer, M.** (1992) MPI1, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria. *Eur Mol. Biol. Org. J.* **11**:3619-3628.
- Maarse, A. C., Blom, J., Keil, P., Pfanner, N., Meijer, M.** (1994) Identification of the essential yeast protein MIM17, an integral mitochondrial inner membrane protein involved in protein import. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* **394**:215-221.
- MacKenzie, J. A., Payne, R. M.** (2004) Ribosomes specifically bind to mammalian mitochondria via protease-sensitive proteins on the outer membrane. *J. Biol. Chem.* **279**:9803-9810.

- Major, P.** (2009) Die Funktion der N-terminalen Extension für die intrazelluläre Lokalisierung des hydrogenosomalen Ferredoxins aus *Trichomonas vaginalis*. Diplomarbeit im Fach Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Mansour, T. E.** (1972) Phosphofruktokinase. *Curr. Top. Cell Regul.* **5**:1-46.
- Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinski, M., Jacq, C.** (2002) Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *Eur. Mol. Biol. Org. Rep.* **3**:159-164.
- Margolin, W.** (1998) A green light for the bacterial cytoskeleton. *Trends Microbiol.* **6**:233-238.
- Margulis, L.** (1970) Origin of eukaryotic cells. *Yale University Press*, New Haven.
- Margulis, L., Dolan, M. E., Whiteside, J. H.** (2005) "Imperfections and oddities" in the origin of the nucleus. *Paleobiology* **31**:175-191.
- Markoš, A., Miretsky, A., Müller, M.** (1993) A glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with eubacterial features in the amitochondriate eukaryote, *Trichomonas vaginalis*. *J. Mol. Evol.* **37**:631-643.
- Marsh, K., Lebherz, H. G.** (1992) Fructose-bisphosphate aldolases; an evolutionary history. *Trends Biochem. Sci.* **17**:110-118.
- Martin, W., Brinkmann, H., Savonna, C., Cerff, R.** (1993) Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes: Eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:8692-8696.
- Martin, W., Müller, M.** (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**:37-41.
- Martin, W., Herrmann, R. G.** (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol.* **118**:9-17.
- Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hapsmann, S., Hasegawa, M., Kowallik, K. V.** (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**:162-165.
- 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**:1521-1539.

- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M., Penny, D.** (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:12246-12251.
- Martin, W., Russell, M. J.** (2003) On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotroph prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Phil. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **358**:59-83.
- Martin, W., Müller, M.** (Hrsg.) (2007) Origin of mitochondria and hydrogenosomes. *Springer Verlag*, Heidelberg, Deutschland.
- Martin, W.** (2010) Evolutionary origins of metabolic compartmentalization in eukaryotes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **365**:847-855.
- Masters, C. J.** (1978) Interactions between soluble enzymes and subcellular structure. *Trends Biochem. Sci.* **3**:206-208.
- Masters, C. J., Wilson, J. E.** (1981) Interactions between soluble enzymes and subcellular structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **11**:105-143.
- Masters, C. J.** (1984) Interactions between glycolytic enzymes and components of the cytomatrix. *J. Cell Biol.* **99**:222s-225s.
- Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-I, T., Maruyama, S., Takahara, M., Miyagishima, S.-Y., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., Nishida, K., Yoshida, Y., Nishimura, Y., Nakao, S., Kobayashi, T., Momoyama, Y., Higashiyama, T., Minoda, A., Sano, M., Nomoto, H., Oishi, K., Hayashi, H., Ohta, F., Nishizaka, S., Haga, S., Miura, S., Morishita, T., Kabeya, Y., Terasawa, K., Suzuki, Y., Ishii, Y., Asakawa, S., Takano, H., Ohta, N., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Shimizu, N., Sugano, S., Sato, N., Nozaki, H., Ogasawara, N., Kohara, Y., Kuroiwa, T.** (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioshizon merolae* 10D. *Nature* **428**:653-657.
- McFadden, G. I., van Dooren, G. C.** (2004) Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Curr. Biol.* **14**:R514-R516.
- 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**:1750-1757.

- Mereschkowsky, C.** (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Zentralbl.* **25**:593-604. [English translation (1999) in *Eur. J. Phycol.* **34**:287-295.]
- Mertens, E., van Schaftingen, E., Müller, M.** (1989) Presence of a fructose-2,6-bisphosphate-insensitive pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase in the anaerobic protozoa *Tritrichomonas foetus*, *Trichomonas vaginalis* and *Isotricha prostoma*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **37**:183-191.
- Mertens, E.** (1990) Occurrence of pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase in *Giardia lamblia* trophozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **40**:147-150.
- Mertens, E., Müller, M.** (1990) Glucokinase and fructokinase of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *J. Protozool.* **37**:384-388.
- Mertens, E.** (1991) Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, an anaerobic glycolytic enzyme? *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* **285**:1-5.
- Mertens, E., van Schaftingen, E., Müller, M.** (1992) Pyruvate kinase from *Trichomonas vaginalis*, an allosteric enzyme stimulated by ribose 5-phosphate and glycerate 3-phosphate. *Mol. Biochem. Parasitol.* **54**:13-20.
- Mertens, E.** (1993) ATP versus pyrophosphate: Glycolysis revisited in parasitic protists. *Parasitol. Today*, **9**:122-126.
- Mertens, E., Lador, U. S., Lee, J. A., Miretsky, A., Morris, A., Rozario, C., Kemp, R. C., Müller, M.** (1998) The pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of the protist, *Trichomonas vaginalis*, and the evolutionary relationships of protist phosphofructokinases. *J. Mol. Evol.* **47**:739-750.
- Meyerhof, O., Kießling, W.** (1935) Über die enzymatische Umwandlung von Glycerinaldehydphosphorsäure in Dioxyacetonphosphorsäure. *Biochem. Z.* **279**:40-48.
- Michels, P. A. M., Hannaert, V., Bringaud, F.** (2000) Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae – new data and views. *Parasitol. Today* **16**:482-489.
- Miller, M., Liao, Y., Gomez, A. M., Gaydos, C. A., D'Mellow, D.** (2008) Factors associated with the prevalence and incidence of *Trichomonas vaginalis* infection among African American women in New York city who use drugs. *J. Infect. Dis.* **197**:503-509.

- Miras, S., Salvi, D., Ferro, M., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J., Rolland, N.** (2002a) Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. *J. Biol. Chem.* **227**:47770-47778.
- Miras, S., Salvi, D., Piette, L., Seigigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Reinbothe, C., Joyard, J., Reinbothe, S., Rolland, N.** (2002b) Toc159- and Toc75-independent import of a transit sequence-less precursor into the inner envelope of chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **282**:29482-29492.
- Miyatake, K., Enomoto, T., Kitaoka, S.** (1986) Fructose-2,6-bisphosphate activates pyrophosphate:D-Fructose 6-Phosphate 1-Phosphotransferase from *Euglena gracilis*. *Agric. Biol. Chem.* **50**:2417-2418.
- Moreira, D., Lopez-Garcia, P.** (1998) Symbiosis between methanogenic archaea and  $\delta$ -proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. *J. Mol. Evol.* **47**:517-530.
- Müller, M.** (1993) The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* **139**:2879-2889.
- Müller, M.** (1998) Enzymes and compartmentation of core energy metabolism of anaerobic protists – a special case in eukaryotic evolution? In: Coombs, G. H., Vickerman, K., Sleigh, M. A., Warren, A. (Hrsg.). *Evolutionary Relationships among Protozoa*, Kluwer, Dordrecht, S. 109-131.
- Müller, M., Martin, W.** (Hrsg.) (2007) *Origin of mitochondria and hydrogenosomes*. 1. Auflage. *Springer-Verlag*, Berlin/Heidelberg.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H.** (1992) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction 1986. *Biotechnology* **24**:17-27.
- Mundodi, V., Kucknoor, A. S., Alderete, J. F.** (2008) Immunogenic and plasminogen-binding surface-associated  $\alpha$ -enolase of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* **76**:523-531.
- Murcha, M. W., Millar, A. H., Whelan, J.** (2005) The N-terminal cleavable extension of plant carrier proteins is responsible for efficient insertion into the inner mitochondrial membrane. *J. Mol. Biol.* **351**:16-25.
- Nada, A., Soll, J.** (2004) Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *J. Cell Sci.* **117**:3975-3982.

- Nargang, F. E., Preuss, M., Neupert, W., Herrmann, J. M.** (2002) The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **277**:15846-12853.
- Negrutskii, B. S., Deutscher, M. P.** (1991) Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:4991-4995.
- Neuhoff, V., Stamm, R., Eibl, H.** (1985) Clear background and highly sensitive protein staining with coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* **6**:427-448.
- Neupert, W.** (1997) Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **66**:863-917.
- Neupert, W., Herrman, J. M.** (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**:723-749.
- Nowitzki, U., Flechner, A., Kellermann, J., Hasegawa, M., Schnarrenberger, C., Martin, W.** (1998) Eubacterial origin of nuclear genes for chloroplast and cytosolic glucose-6-phosphate isomerase from spinach: sampling eubacterial gene diversity in eukaryotic chromosomes through symbiosis. *Gene* **214**:205-213.
- Opperdoes, F. R., Borst, P.** (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* **80**:360-364.
- Ovadi, J., Srere, P. A.** (2000) Macromolecular compartmentation and channeling. *Int. Rev. Cytol.* **192**:255-280.
- Penman, S.** (1995) Rethinking cell structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:5251-5257.
- Pfaller, R., Steger, H. F., Rassow, J., Pfanner, N., Neupert, W.** (1988) Import pathways of precursor proteins into mitochondria: multiple receptor sites are followed by a common membrane insertion site. *J. Cell Biol.* **107**:2483-2490.
- Pfanner, N., Hoeben, P., Tropschug, M., Neupert, W.** (1987) The carboxyl-terminal two-thirds of the ADP/ATP carrier polypeptide contains sufficient information to direct translocation into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **262**:14851-14854.
- Pfanner, N., Douglas, M. G., Endo, T., Hoogenraad, N. J., Jensen, R. E., Meijer, M., Neupert, W., Schatz, G., Schmitz, U. K., Shore, G. C.** (1996) Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes. *Trends Biochem. Sci.* **21**:51-52.

- Pfanner, N., Craig, E. A., Hönlinger, A.** (1997) Mitochondrial preprotein translocase. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**:25-51.
- Plaxton, W. C.** (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**:185-214.
- Pterin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., Garber, G.** (1998) Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:300-317.
- Pütz, S., Gelius-Dietrich, G., Piotrowski, M. und Henze, K.** (2005) Rubrerythrin and peroxiredoxin: two novel putative peroxidases in the hydrogenosomes of the microaerophilic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **142**:212-223.
- Pütz, S., Dolezal, P., Gelius-Dietrich, G., Bohacova, L., Tachezy, J. und Henze, K.** (2006) Fe-hydrogenase maturases in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot. Cell* **5**:579-586.
- Pütz, S.** (2007) Charakterisierung des hydrogenosomal Proteoms aus dem mikroaerophilen Humanparasiten *Trichomonas vaginalis*. Inaugural Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Rapaport, D., Neupert, W.** (1999) Biogenesis of Tom40, core component of the TOM complex of mitochondria. *J. Cell Biol.* **146**:321-331.
- Rassow, J., Maarse, A. C., Krainer, E., Kübrich, M., Müller, H., Meijer, M., Craig, E. A., Pfanner, N.** (1994) Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J. Cell Biol.* **127**:1547-1556.
- Rassow, J., Pfanner, N.** (2000) The protein import machinery of the mitochondrial membranes. *Traffic* **1**:457-464.
- Reeves, R. E., South, D. J., Blytt, H. J., Warren, L. G.** (1974) Pyrophosphate:D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase. A new enzyme with the glycolytic function of 6-phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* **249**:7737-7741.
- Rehling, P., Pfanner, N., Meisinger, C.** (2003) Insertion of hydrophobic membrane proteins into the inner mitochondrial membrane – a guided tour. *J. Mol. Biol.* **326**:639-657.
- Rehling, P., Brandner, K., Pfanner, N.** (2004) Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**:519-530.

- Richards, T. A., van der Giezen, M.** (2006) Evolution of the ISd11/IscS complex reveals a single  $\alpha$ -proteobacterial endosymbiosis for all eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **23**:1341-1344.
- Rice, P., Longden, I., Bleasby, A.** (2000) EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* **16**:276-277.
- Richly, E., Leister, D.** (2004) An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of *Arabidopsis* and rice. *Gene* **329**:11-16.
- Rieder, S. V., Rose, I. A.** (1959) The mechanism of the triosephosphate isomerase reaction. *J. Biol. Chem.* **234**:1007-1010.
- Riley, D. E., Krieger, J. N.** (1992) Rapid and practical DNA isolation from *Trichomonas vaginalis* and other nuclease-rich protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* **51**:161-163.
- Roger, A. J., Clark, C. G. und Doolittle, W. F.** (1996) A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:14618-14622.
- Roise, D., Schatz, G.** (1988) Mitochondrial presequences. *J. Biol. Chem.* **263**:4509-4511.
- Rose, I. A., Warms, J. V. B.** (1967) Mitochondrial hexokinase. Release, rebinding and location. *J. Biol. Chem.* **242**:1635-1645.
- Rospert, S., Dubaquie, Y., Gautschi, M.** (2002) Nascent-polypeptide-associated complex. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**:1632-1639.
- Rost, B., Yachdav, G., Liu, J.** (2004) The PredictProtein server. *Nucl. Acids Res.* **32**:W321-W326.
- Rutter, W. J.** (1964) Evolution of aldolase. *Fed. Proc.* **23**:1248-1257.
- Ryan, K. R., Menold, M. M., Garrett, S., Jensen, R. E.** (1994) SMS1, a high-copy suppressor of the yeast mas6 mutant, encodes an essential inner membrane protein required for mitochondrial protein import. *Mol. Biol. Cell* **5**:529-538.
- Saitou, N., Nei, M.** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY* 2. Auflage.

- Sánchez, L. B., Horner, D. S., Moore, D. V., Henze, K., Embley, T. M., Müller, M.** (2002) Fructose-1,6-bisphosphate aldolases in amitochondriate protists constitute a single protein subfamily with eubacterial relationships. *Gene* **295**:51-59.
- Sasaki, Y., Sone, T., Yoshida, S., Yahata, S., Hotta, J., Chesnut, J. D., Honda, T., Imamoto, F.** (2004) Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system. *J. Biotechnol.* **107**:233-243.
- Sasaki, Y., Sone, T., Yahata, K., Kishine, H., Hotta, J., Chesnut, J. D., Honda, T., Imamoto, F.** (2005) Multi-gene gateway clone design for expression of multiple heterologous genes in living cells: Eukaryotic clones containing two or three ORF multi-gene cassettes expressed from a single promoter. *J. Biotechnol.* **136**:103-112.
- Scherer, P. E., Manning-Krieg, U. C., Jenö, P., Schatz, G., Horst, M.** (1992) Identification of a 45-kDa protein at the protein import site of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:11930-11934.
- Schleiff, E., Silvius, J. R., Shore, G. C.** (1999) Direct membrane insertion of voltage-dependent anion-selective channel protein catalyzed by mitochondrial Tom20. *J. Cell Biol.* **145**:973-978.
- Schliwa, M., van Blerkom, J., Porter, K. R.** (1981) Stabilization and the cytoplasmic ground substance in detergent-opened cells and a structural and biochemical analysis of its composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:4329-4333.
- Schliwa, M., Euteneuer, U., Porter, K. R.** (1987) Release of enzymes of intermediary metabolism from permeabilized cells: further evidences in support of a structural organization of the cytoplasmic matrix. *Eur. J. Cell Biol.* **44**:214-218.
- Schneider, H.-C., Berthold, J., Bauer, M. F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M., Neupert, W.** (1994) Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* **371**:768-774.
- Schricker, R., Angermayr, M., Strobel, G., Klinke, S., Korber, D., Bandlow, W.** (2002) Redundant mitochondrial targeting signals in yeast adenylate kinase. *J. Biol. Chem.* **277**:28757-28764.
- Schwebke, J. R., Burgess, D.** (2004) Trichomoniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:794-803.
- Searcy, D. G.** (1992) Origins of mitochondria and chloroplasts from sulfur-based symbioses. In: Hartman, H., Matsuni, K. (Hrsg.) Origins and evolution of prokaryotic and eukaryotic cells. *World Scientific Publishing*, Singapur, S. 47-78.

- Setoguchi, K., Otera, H., Mihara, K.** (2006) Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *Europ. Mol. Biol. Org. J.* **25**:5635-5647.
- Seufferheld, M., Vieira, M. C. F., Ruiz, F. A., Rodrigues, C. O., Moreno, S. N., Docampo, R.** (2003) Identification of organelles in bacteria similar to acidocalcisomes of unicellular eukaryotes. *J. Biol. Chem.* **278**:29971-29978.
- Seufferheld, M., Lea, C. R., Vieira, M., Oldfield, E., Docampo, R.** (2004) The H<sup>(+)</sup>-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* is predominantly located in polyphosphate-rich acidocalcisomes. *J. Biol. Chem.* **279**:51193-51202.
- Siebers, B., Schönheit, P.** (2005) Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:695-705.
- Sirrenberg, C., Bauer, M. F., Guiard, B., Neupert, W., Brunner, M.** (1996) Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* **384**:582-588.
- Sirrenberg, C., Endres, M., Fölsch, H., Stuart, R. A., Neupert, W., Brunner, M.** (1998) Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature* **391**:912-915.
- Smith, D. G., Gawryluk, R. M., Spencer, D. F., Pearlman, R. E., Siu, K. W., Gray, M. W.** (2007) Exploring the mitochondrial proteome of the ciliate protozoon *Tetrahymena thermophila*: direct analysis by tandem mass spectrometry. *J. Mol. Biol.* **374**:837-863.
- Smutná, T., Gonçalves, V. L., Saraiva, L. M., Tachezy, J., Teixeira, M., Hrdy, I.** (2008) Flavodiiron protein from *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes: the terminal oxygen reductase. *Eukaryot. Cell* **8**:47-55.
- Soliman, M. A., Ackers, J. P., Catterall, R. D.** (1982) Isoenzyme characterisation of *Trichomonas vaginalis*. *Br. J. Vener. Dis.* **58**:250-256.
- Solti, M., Bartha, F., Halász, N., Tóth, G., Sirokmán, F., Friedrich, P.** (1981) Localization of glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase in intact human erythrocytes. Evaluation of membrane adherence in autoradiographs at low grain density. *J. Biol. Chem.* **256**:9260-9265.
- Srere, P. A.** (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**:89-124.

- Srere, P. A.** (2000) Macromolecular interactions: tracing the roots. *Trends Biochem. Sci.* **25**:150-153.
- Stams, A. J. M., Kremer, D. R., Nicolay, C., Weenk, G. H., Hansen, T. A.** (1984) Pathway of propionate formation in *Desulfobulbus propionicus*. *Arch. Microbiol.* **139**:167-173.
- Stechmann, A., Baumgartner, M., Silberman, J. D., Roger, A. J.** (2006) The glycolytic pathway of *Trimastix pyriformis* is an evolutionary mosaic. *BioMed Central Evol. Biol.* **6**:101-117.
- Steiner, H., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W., Lill, R.** (1995) Biogenesis of mitochondrial heme lyases in yeast. Import and folding in the intermembrane space. *J. Biol. Chem.* **270**:22842-22849.
- Steiner, J. M., Yusa, F., Pompe, J. A., Löffelhardt, W.** (2005) Homologous protein import machineries in chloroplasts and cyanelles. *Plant J.* **44**:646-652.
- Steger, H. F., Söllner, T., Kiebler, M., Dietmeier, K. A., Pfaller, R., Trülzsch KS, Tropschug M, Neupert W, Pfanner N.** (1990) Import of ADP/ATP carrier into mitochondria: two receptors act in parallel. *J. Cell Biol.* **111**:2353-2363.
- Stojanovski, D., Müller, J. M., Milenkovic, D., Guiard, B., Pfanner, N., Chacinska, A.** (2008) The MIA system for protein import into the mitochondrial intermembrane space. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**:610-617.
- Sutak, R., Dolezal, P., Fiumera, H. L., Hrdy, I., Dancis, A., Delgadillo-Correa, M., Johnson, P. J., Müller, M. und Tachezy, J.** (2004) Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:10368-10373.
- Tachezy, J., Sánchez, L. B., 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**:1919-1928.
- Tachezy, J.** (Hrsg.) (2008) Hydrogenosomes and mitosomes: mitochondria of anaerobic eukaryotes. *Springer Verlag*, Heidelberg, Deutschland.
- Thollesson, M.** (2004) LDDist: a Perl module for calculating LogDet pair-wise distances for protein and nucleotide sequences. *Bioinformatics* **20**:416-418.

- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**:4673-4680.
- Tielens, A. G. M., Rotte, C., van Hellemond, J. J., Martin, W.** (2002) Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.* **27**:564-572.
- Timmis, J. N., Ayliffe, M. A., Huang, C. Y., Martin, W.** (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* **5**:123-135.
- Turner, G., Müller, M.** (1983) Failure to detect extranuclear DNA in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *J. Parasitol.* **69**:234-236.
- Tusnády, G. E., Simon, I.** (1998) Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: Application to topology prediction. *J. Mol. Biol.* **283**:489-506.
- Tusnády, G. E., Simon, I.** (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**:849-850.
- Tovar, J., Fischer, A., Clark, C. G.** (1999) The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* **32**:1013-1021.
- Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M., Lucocq, J. M.** (2003) Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* **426**:172-176.
- van der Giezen, M., Rechinger, K. B., Svendsen, I., Durand, R., Hirt, R. P., Fèvre, M., Embley, T. M., Prins, R. A.** (1997a) A mitochondrial-like targeting signal on the hydrogenosomal malic enzyme from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: support for the hypothesis that hydrogenosomes are modified mitochondria. *Mol. Microbiol.* **23**:11-21.
- van der Giezen, M., Sjollema, K. A., Artz, R. R., Alkema, W., Prins, R. A.** (1997b) Hydrogenosomes in the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* have a double membrane but lack an associated organelle genome. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* **408**:147-150.

- van der Giezen, M., Kiel, J. A. K. W., Sjollema, K. A., Prins, R. A.** (1998) The hydrogenosomal malic enzyme from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* is targeted to mitochondria of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr. Genet.* **33**:131-135.
- van der Giezen, M., Slotboom, D. J., Horner, D. S., Dyal, P. L., Harding, M., Xue, G. P., Embley, T. M., Kunji, E. R.** (2002) Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: a common origin for both organelles. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* **21**:572-579.
- van der Giezen, M., Birdsey, G. M., Horner, D. S., Lucocq, J., Dyal, P. L., Benchimol, M., Danpure, C. J., Embley, T. M.** (2003) Fungal hydrogenosomes contain mitochondrial heat-shock proteins. *Mol. Biol. Evol.* **20**:1051-1061.
- van der Giezen, M., Tovar, J.** (2005) Degenerate mitochondria. *Eur. Mol. Biol. Org. Rep.* **6**:525-530.
- van der Giezen, M.** (2009) Hydrogenosomes and mitosomes: conservation and evolution of functions. *J. Eukaryot. Microbiol.* **56**:221-231.
- van Grinsven, K. W. A., Rosnowsky, S., van Weelden, S. W. H., Pütz, S., van der Giezen, M., Martin, W., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G. M., Henze, K.** (2008) Acetate:succinate CoA-transferase in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: identification and characterization. *J. Biol. Chem.* **283**:1411-1418.
- Vellai, T., Takacs, K., Vida, G.** (1998) A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **56**:499-507.
- Vellai, T., Vida, G.** (1999) The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. *Proc. Biol. Sci.* **266**:1571-1577.
- Verhees, C. H., Kengen, S. W. M., Tuininga, J. E., Schut, G. J., Adams, M. W. W., de Vos, W. M., van der Oost, J.** (2003) The unique features of glycolytic pathways in archaea. *Biochem. J.* **375**:231-246.
- Verner, K.** (1993) Co-translational protein import into mitochondria: an alternative view. *Trends Biochem. Sci.* **18**:366-371.
- Viscogliosi, E., Müller, M.** (1998) Phylogenetic relationships of the glycolytic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, from parabasalid flagellates. *J. Mol. Evol.* **47**:190-199.
- Volland, C., Urban-Grimal, D.** (1988) The presequence of yeast 5-aminolevulinate synthase is not required for targeting to mitochondria. *J. Biol. Chem.* **263**:8294-8299.

- von Heijne, G., Steppuhn, J., Herrmann, R. G. (1989) Domain-structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* **180**:535-545.
- Voncken, F. G. J., Boxma, B., van Hoek, A. H. A. M., Akhmanova, A. S., Godfried D. Vogels, G. D., Huynen, M., Veenhuis, M., Hackstein, J. H. P. (2002) A hydrogenosomal [Fe]-hydrogenase from the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. L2. *Gene* **284**:103-112.
- Waksman, G., Krishna, T. S. R., William Jr., C. H., Kuriyan, J. (1994) Crystal structure of *Escherichia coli* thioredoxin reductase refined at 2 Å resolution. Implications for a large conformational change during catalysis. *J. Mol. Biol.* **236**:800-816.
- Watson, H. C., Littlechild, J. A. (1990) Isoenzymes of phosphoglycerate kinase: evolutionary conservation of the structure of this glycolytic enzyme. *Biochem. Soc. Trans.* **18**:187-90.
- Wallin, I. E. (1927) Symbiogenesis and the origin of species, p. 171. London, UK, Bailliere, Tindall und Cox.
- Wellerson, R., Kupferberg, A. B. (1962) On glycolysis in *Trichomonas vaginalis*. *J. Protozool.* **9**:418-424.
- Wiedemann, N., Frazier, A. E., Pfanner, N. (2004) The protein import machinery of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **279**:14473-14476.
- Wienhues, U., Becker, K., Schleyer, M., Guiard, B., Tropschug, M., Horwich, A. L., Pfanner, N., Neupert, W. (1991) Protein folding causes an arrest of preprotein translocation into mitochondria *in vivo*. *J. Cell Biol.* **115**:1601-1609.
- Wilson, J. E. (1972) The localization of latent brain hexokinase on synaptosomal mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **150**:96-104.
- Wilson, J. E. (1973) Studies on the molecular weight and lipoprotein nature of glucose-6-phosphate solubilized rat brain hexokinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **154**:332-340.
- Wilson, J. E. (2003) Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J. Exp. Biol.* **206**:2049-2057.
- Wirtschafter, S. K. (1954) Evidence for the existence of the enzymes hexokinase and aldolase in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.* **40**:360-362.

- Wirtschafter, S., Jahn, T. L.** (1956) The metabolism of *Trichomonas vaginalis*: The glycolytic pathway. *J. Protozool.* **3**:83-85.
- Wirtschafter, S., Saltman, P., Jahn, T. J.** (1956) The metabolism of *Trichomonas vaginalis*: The oxidative pathway. *J. Protozool.* **3**:86-88.
- Wu, G., Henze, K., Müller, M.** (2001) Evolutionary relationships of the glucokinase from the amitochondriate protist, *Trichomonas vaginalis*. *Gene* **264**:265-271.
- Wunder, T., Martin, R., Löffelhardt, W., Schleiff, E. Steiner, J. M.** (2007) The invariant phenylalanine of precursor proteins discloses the importance of Omp85 for protein translocation into cyanelles. *BioMed Central Evol. Biol.* **7**:236.
- Wurch, T., Lestienne, F., Pauwels, P. J.** (1998) A modified overlap extension PCR method to create chimeric genes in the absence of restriction enzymes. *Biotechnol. Tech.* **12**:653-657.
- Yu, J., Steck, T. L.** (1975) Isolation and characterization of band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **250**:9170-9175.
- Zalokar, M.** (1960) Cytochemistry of centrifuged hyphae of *Neurospora*. *Exp. Cell Res.* **19**:114-132.
- Zara, V., Palmieri, F., Mahlke, K., Pfanner, N.** (1992) The cleavable presequence is not essential for import and assembly of the phosphate carrier of mammalian mitochondria but enhances the specificity and efficiency of import. *J. Biol. Chem.* **267**:12077-12081.
- Zara, V., Ferramosca, A., Palmisano, I., Palmieri, F., Rassow, J.** (2003) Biogenesis of rat mitochondrial citrate carrier (CIC): the N-terminal presequence facilitates the solubility of the preprotein but does not act as a targeting signal. *J. Mol. Biol.* **325**:399-408.

## **DANK**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. William Martin für die herausfordernde Themenstellung und die begeisternde Forschungsaufgabe dieser Dissertation, für seine stete Diskussionsbereitschaft, sein konstantes Interesse an meiner Arbeit sowie seine hilfreiche Förderung. Seine Motivation, Begeisterung und Erfahrung haben meine Arbeit kritisch begleitet und gefördert.

Frau Privatdozentin Dr. Katrin Henze danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und für ihr aufmerksam-kritisches Interesse, das sie meiner Dissertation entgegengebracht hat, sowie für ihre kontinuierliche Diskussionsbereitschaft. Vor allem danke ich ihr für die kenntnisreiche Betreuung meiner Doktorarbeit, ihre motivierende Unterstützung und ihren kompetenten Rat.

Gabriel Gelius-Dietrich danke ich für seine kompetente Einführung in die Bioinformatik sowie für seine Hilfe und Unterstützung bei vielfältigen Problemen.

Den Mitarbeitern des Instituts für Botanik III der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danke ich für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre, ihre unterstützenden Informationen und die vielen nützlichen Tipps und die geleistete Hilfestellung bei meinen Experimenten.

Für manchen Tipp bedanke ich mich auch bei den Korrekturlesern, die meine Doktorarbeit aufmerksam durchgesehen haben.



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

Düsseldorf, den 29. März 2010

Verena Zimorski