

Deletion des hydrogenosomalen
Membranproteins HMP23 zur
funktionellen Analyse in
Trichomonas vaginalis

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

vorgelegt von

Xavier Pereira Brás
aus Düsseldorf

April 2012

Aus dem Institut für Molekulare Evolution
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2012

1. Zusammenfassung	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2. Summary.....	2
2. Einleitung	3
2.1 <i>Trichomonas vaginalis</i>	3
2.2 Hydrogenosomen und ihre Gemeinsamkeiten mit Mitochondrien	4
2.3 Membranproteine und Metabolitentransport	7
2.3.1 Die peripheren Membranproteine	7
2.3.2 Aufbau, Vorkommen und Funktionen der integralen Membranproteine	7
2.3.4 Metabolitentransport in die Mitochondrien.....	9
2.3.4 Metabolitentransport in die Hydrogenosomen	9
2.4 Gendeletion bei <i>Trichomonas vaginalis</i>	11
2.5 Zielsetzung.....	12
3. Ergebnisse	14
3.1 <i>In silico</i> Analysen von HMP23	14
3.1.1 Homologiesuche mittels BLAST	14
3.1.2 Gemeinsamkeiten zwischen HMP23 und seinen Homologen in <i>T. vaginalis</i>	15
3.1.3 Phylogenetische Analyse von HMP23.....	19
3.1.4 Identitäten und Ähnlichkeiten mit den MCF-Proteinen	20
3.2 Lokalisation von HMP23 in <i>T. vaginalis</i>	23
3.2.1 Subzelluläre Lokalisation.....	23
3.2.1 Intrazelluläre Lokalisation	25
3.2.1 Lokalisation der HMP23-Termini	26
3.3 Lokalisation des heterolog überexprimierten HMP23 in <i>S. cerevisiae</i>	28
3.4 Deletion von Ferredoxin 1 als Positivkontrolle	29
3.5 Die Deletion von HMP23.....	32
3.6 Wachstumsunterschiede zwischen Wildtyp und dem Stamm T1 Δ HMP23	34
3.7 Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	35
3.8 Proteomunterschiede zwischen Wildtyp und dem Stamm T1 Δ HMP23.....	38
3.9 Expressionsanalyse der HMP23 Homologen und anderer Transporter.....	40
4. Diskussion	45
4.1 <i>In silico</i> Analysen von HMP23	45
4.2 Lokalisation von HMP23	48
4.3 Gendeletion von HMP23.....	51
4.4 Phänotypische und molekulare Unterschiede zwischen Wildtyp und dem Stamm T1 Δ HMP23.....	52
4.5 Fazit	56
4.6 Ausblick.....	57
5. Material und Methoden	60
5.1 Chemikalien	60
5.2 Enzyme und Antibiotika	60
5.3 Oligonukleotide	61
5.4 Verwendete Stämme	62
5.5 Reagenzsätze	63
5.6 Vektoren.....	63
5.7 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	63
5.8 Arbeiten mit <i>Trichomonas vaginalis</i>	63

5.8.1 Anzucht von <i>T. vaginalis</i>	63
5.8.2 Elektroporation von <i>T. vaginalis</i>	64
5.8.4 Dauerkulturen <i>T. vaginalis</i>	64
5.8.4 Isolierung von Hydrogenosomen aus <i>T. vaginalis</i>	64
5.8.5 Fluoreszenzmikroskopie.....	65
5.8.6 Elektronenmikroskopie	66
5.8.7 Wachstumskurven.....	66
5.9 Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
5.9.1 Transfektion von <i>S. cerevisiae</i>	67
5.9.2 Heterologe Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i>	67
5.9.3 Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	68
5.10 Arbeiten mit DNA	68
5.10.1 Isolierung von RNA und genomischer DNA aus <i>T. vaginalis</i>	68
5.10.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	69
5.10.3 Klonierung mit dem MultiSite Gateway® Pro Kit.....	71
5.11 Arbeiten mit Proteinen	72
5.11.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	72
5.11.2 1D-SDS-PAGE	72
5.11.3 2D-SDS-PAGE	73
5.11.4 Coomassie-Färbung.....	74
5.11.5 Proteolyse von Proteinen im Gel.....	74
5.11.6 Behandlungen mit Proteinase K.....	75
5.11.7 Behandlung der Hydrogenosomen und Mitochondrien mit Na ₂ CO ₃	75
5.11.8 Solubilisierung der Membranproteine mit Triton X-114	76
5.11.9 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCS).....	76
5.11.10 Western-Transfer und Immunodetektion	76
5.12 Bioinformatische Methoden	77
5.12.1 Voraussage über die Konformation von Proteinen.....	78
5.12.2 Phylogenetische Untersuchungen.....	78
5.12.3 Identitäten und Ähnlichkeiten aus globalen Alignments	78
5.12.4 Berechnung von Flächen.....	79
6. Literatur	80
Geräte	92
Abkürzungsverzeichnis	93
Anhang 1	95
Anhang 2	96

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Trichomonas vaginalis ist ein mikroaerophiler humanpathogener Organismus, der statt Mitochondrien Hydrogenosomen besitzt. Diesen wasserstoffproduzierenden Organellen wird die fermentative ATP-Produktion, die Reifung von Eisen-Schwefel-Cluster Proteinen und der Metabolismus von einigen Aminosäuren zugeschrieben. Auf Grund des gemeinsamen evolutionären Vorfahren mit Mitochondrien ist anzunehmen, dass die Hydrogenosomen den Metaboliten-Transport ähnlich wie die Mitochondrien regulieren. Für *T. vaginalis* sind insgesamt nur fünf hydrogenosomale Membranproteine mit *mitochondrial carrier family* (MCF) Domänen bekannt, von denen eins als ein ADP/ATP Transporter charakterisiert wurde.

Um neue Erkenntnisse über die hydrogenosomalen Membranproteine in *T. vaginalis* und deren Funktion zu erlangen, wurde das hochexprimierte Membranprotein HMP23 zunächst *in silico* analysiert. Mit der Aminosäuresequenz wurde mittels BLAST-Suche ein Protein mit Homologie zu HMP23 in *Thalassiosira pseudonana* gefunden, das vermutlich ein MCF-Transporter ist. Mit der *in silico* Voraussage mehrerer transmembranen Domänen kann HMP23 von der Konformation her eine Funktion haben, die mit dem Transport der MCF-Transporter vergleichbar ist. Mittels Gendeletion durch homologe Rekombination in *T. vaginalis*, Lokalisationsstudien von homolog exprimierten amino- und carboxyterminal Hämagglutinin markierten HMP23-Varianten sowie eines Proteinase K Protektions-Assays wurde HMP23 molekular analysiert und auf eine mögliche Funktion als Transporter hin untersucht.

Die Deletion von HMP23 führte zu einer Vergrößerung der Hydrogenosomen in dem transgenen *T. vaginalis* Stamm T1 Δ HMP23. Die Expressionsunterschiede zwischen T1 Wildtyp und T1 Δ HMP23 in Bezug auf die zwei HMP23-Homologen TVAG_423530 und TVAG_087280 sowie auf die MCF-Transporter HMP31.1 und HMP31.2 deuten auf eine Kompensation der Deletion durch diese Gene hin. Die beiden HMP23-Homologen könnten somit, trotz geringer Sequenzkonservierung, durchaus als HMP23-Isoformen fungieren. Obwohl die Substratspezifität von HMP23 in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden konnte, deuten die Kompensation der Deletion von HMP23 durch die MCF-Transporter HMP31.1 und HMP31.2 und die Lokalisation von HMP23 in der inneren Membran der Hydrogenosomen und Mitochondrien stark auf eine Funktion von HMP23 als Transporter hin.

1.2. Summary

Trichomonas vaginalis is an microaerophilic human pathogenic organism, which possesses the hydrogen producing hydrogenosomes instead of mitochondria. The fermentative ATP-production, the maturation of iron-sulfur cluster proteins and the metabolism of some amino acids have been assigned to the hydrogenosomes. Due to a common evolutionary ancestor, the metabolite transport of hydrogenosomes is supposed to be comparable to that of mitochondria. There are only five hydrogenosomal membrane proteins in *T. vaginalis*, with a mitochondrial carrier family (MCF) domain. One of them was characterized as ADP/ATP carrier.

To learn more about hydrogenosomal membrane proteins in *T. vaginalis* and their function, the highly expressed membrane protein HMP23 was analyzed *in silico*. A Protein with homologies to HMP23 in *Thalassiosira pseudonana*, which could be a MCF-carrier, was found in a BLAST search using the amino acid sequence. The *in silico* predictions of multiple transmembrane domains point to a possible conformation of HMP23, that allows a function as a carrier comparable to an MCF-carrier. HMP23 was analyzed by various means to assess a possible function as a carrier: the HMP23 gene was knocked out by homologous recombination in *T. vaginalis*, localization experiments with amino- and carboxyterminal hemagglutinin tagged HMP23-variants were conducted and protease K protection assays were supposed to define the localization of HMP23.

The HMP23 knockout causes an increase of the hydrogenosomes in the transgenic *T. vaginalis* strain T1 Δ HMP23. The expression differences between the T1 wild type and T1 Δ HMP23 in reference to the two HMP23 homologues TVAG_423530 and TVAG_087280 and the MCF carrier HMP31.1 and HMP31.2 point to the compensation of the HMP23 knockout by these genes. Consequently these two HMP23 homologues could be HMP23 isoforms although displaying a lower identity. Even though the substrate specificity of HMP23 could not be determined in this work, the compensation of the HMP23 knockout by the MCF carrier HMP31.1 and HMP31.2 and the localization of HMP23 in the inner membrane of the hydrogenosomes and mitochondria point to a function of HMP23 as a carrier.

2. Einleitung

2.1 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis ist ein Eukaryot und gehört zur Gruppe der Excavata und dem Phylum Parabasalia (Adl *et al.*, 2005). Der anaerobe parasitische Protist ist 10-25 µm groß und besitzt fünf Geißeln, von denen vier als freie Flagellen anterior lokalisiert sind und eine als zurücklaufende Schleppgeißel mit der undulierenden Membran verbunden ist. *T. vaginalis* besitzt keine stabilisierende Zellwand und ist außerhalb des Wirts anfällig gegen Austrocknung. Während des Lebenszyklus werden keine Dauerstadien gebildet, es kommen nur Trophozoiten vor, die sich durch Zweiteilung im Wirt vermehren (Mehlhorn und Piekarski, 1998). Das 160 Mb große Genom von *T. vaginalis* ist haploid und auf sechs Chromosomen verteilt. Trotz 29 meiotischen Genen konnte bis jetzt keine sexuelle Vermehrung beschrieben werden (Carlton *et al.*, 2007). *T. vaginalis* hat keine Mitochondrien und keine Peroxisomen sondern besitzt Hydrogenosomen, die zu den Organellen mitochondrialen Ursprungs (OMO; *Organelles of mitochondrial origin*) der Klasse 4 gehören. Die OMOs der Klasse 4 produzieren unter anaeroben Bedingungen ATP und verwenden für die frei werdenden Elektronen Protonen als Endakzeptoren, wobei Wasserstoff produziert wird (Müller *et al.*, 2012).

T. vaginalis ist ein obligater Parasit, der einige Makromoleküle wie Pyrine, Pyrimidine und Lipide nicht selbst synthetisieren kann. Trichomonaden können in Kultur gehalten werden, in der die Zellen eine runde bis ovale Form annehmen, das Medium muss aber alle essentiellen Makromoleküle, Vitamine und Mineralien enthalten (Petrin *et al.*, 1998). Im Wirt bildet *T. vaginalis* bei Kontakt mit vaginalen Epithelzellen flache, amöboide Zellen (Lal *et al.*, 2006). Dort ernährt sich der Parasit durch Phagozytose über die Zelloberfläche von Wirtszellen und anderen Organismen der Vaginalflora (Street *et al.*, 1984; Pereira-Neves und Benchimol, 2007). *T. vaginalis* ist ein humanpathogener Organismus, der im Urogenitaltrakt Trichomoniasis auslösen kann (Tschudi und Pearce, 2000). Die Übertragung erfolgt nur durch Schleimhautkontakt von Mensch zu Mensch. Die Erkrankung erhöht die Anfälligkeit für eine HIV-Infektion und kann zu Frühgeburten und geringem Geburtsgewicht von Neugeborenen führen (Laga *et al.*, 1993; Cotch *et al.*, 1997). Trichomoniasis wird mit Nitroimidazol-Derivaten wie Metronidazol behandelt, das durch Diffusion in die Zelle gelangt. In den Hydrogenosomen überträgt die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFO) Elektronen über Ferredoxin auf Metronidazol und es entstehen cytotoxische Produkte, die die DNA-Stränge durch einen radikalen Angriff brechen (Müller, 1986; Petrin *et al.*, 1998). Bei dem *Trichomonas foetus* Stamm KV-1/MR100 wurde die Metronidazolresistenz unter anaeroben Bedingungen im Labor induziert, und eine stark reduzierte Expression der

hydrogenosomalen Proteine PFO, Ferredoxin, Hydrogenasen und der decarboxylierenden Malatdehydrogenase festgestellt (Kulda *et al.*, 1984; Land *et al.*, 2001). Für *T. vaginalis* (TV 10-02 und MRP-2) wurde unter anaeroben Bedingungen im Labor die Metronidazolresistenz induziert und ein Verlust der Aktivität von PFO, Hydrogenase, NAD-Ferredoxin Oxidoreduktase und dem NAD-abhängigen Malat-Enzym festgestellt (Kulda *et al.*, 1993; Kulda, 1999; Rasoloson *et al.*, 2001). Für Ferredoxin wurde eine reduzierte Expression gemessen (Quon *et al.*, 1992). Während die Hydrogenosomen bei der laborinduzierten Resistenz stark verkleinert sind, zeigten die Hydrogenosomen von *T. vaginalis*, die *in vivo* gegen Metronidazol resistent wurden, keine Größenveränderungen (Wright *et al.*, 2010).

2.2 Hydrogenosomen und ihre Gemeinsamkeiten mit Mitochondrien

Hydrogenosomen wurden zum ersten Mal in *Tritrichomonas foetus* beschrieben (Lindmark und Müller, 1973), und haben mit den Mitochondrien einige Gemeinsamkeiten. Bei der Umsetzung von Pyruvat zu Acetat in den Hydrogenosomen wird Kohlendioxid, Wasserstoff und ATP produziert (Martin *et al.*, 2001). Aufgrund der Wasserstoffproduktion und der Unterschiede bei der Energiegewinnung wurde zunächst kein gemeinsamer Ursprung der Hydrogenosomen und der Mitochondrien vermutet (Müller, 1988). Phylogenetische Analysen und die Lokalisation von typischen mitochondrialen Proteinen in den Hydrogenosomen weisen allerdings auf einen gemeinsamen Ursprung hin (Germot *et al.*, 1996; Roger *et al.*, 1996; Bui *et al.*, 1996; Horner *et al.*, 1999; Embley und Martin, 2006). Das Vorkommen von Hydrogenosomen in verschiedenen anaeroben Ciliaten und Chytridiomyceten deutet auf eine mehrfache Entstehung der Hydrogenosomen hin (van der Giezen *et al.*, 1997; Akhmanova *et al.*, 1998; Yarlett und Hackstein, 2005). Da es in diesen Gruppen auch aerobe Organismen mit Mitochondrien gibt, wird angenommen, dass diese Hydrogenosomen reduzierte Formen von Mitochondrien sind (Embley *et al.*, 2003).

Der Ursprung von Mitochondrien und Hydrogenosomen ist auf eine Endosymbiose zurückzuführen. Die Sequenzierung von mitochondrialen Genomen ermöglichte phylogenetische Analysen, die zu der Annahme führten, dass wahrscheinlich ein α -Proteobakterium der Vorläufer der Mitochondrien ist (Yang *et al.*, 1985; Gray *et al.*, 2001; Esser, 2004). In der Wasserstoffhypothese wird postuliert, dass der Wirt bei der Endosymbiose ein wasserstoffabhängiges autotrophes Archaeobakterium war. Als Symbiont wird ein fakultativ anaerobes α -Proteobakterium postuliert, dessen heterotropher Metabolismus als Abfallprodukt H_2 produzierte. Um mehr H_2 zu erhalten, vergrößerte der Wirt zunächst die Kontaktfläche zum Symbionten. Bevor es zur kompletten Aufnahme des Symbionten kam, mussten Gene des α -Proteobakteriums in das Genom des Archaeobakteriums transferiert worden sein, um den Import von organischen Substraten zu

gewährleisten. Durch weitere Gentransfers vom Symbionten in das Genom des Wirtes wurde die Lipidsynthese des Symbionts übernommen und Teile des Metabolismus in das Cytosol übertragen (Martin und Müller, 1998). Martin und Russel (2003) ergänzten die Hypothese um die Entwicklung der mitochondrialen Transporter, um ATP aus dem Symbionten zu exportieren. Im Laufe der Zeit wurde der Wirt heterotroph und unabhängig von H_2 . Aus dem Symbionten entwickelten sich als Anpassung auf eine anaerobe oder aerobe Umgebung die Hydrogenosomen oder die Mitochondrien.

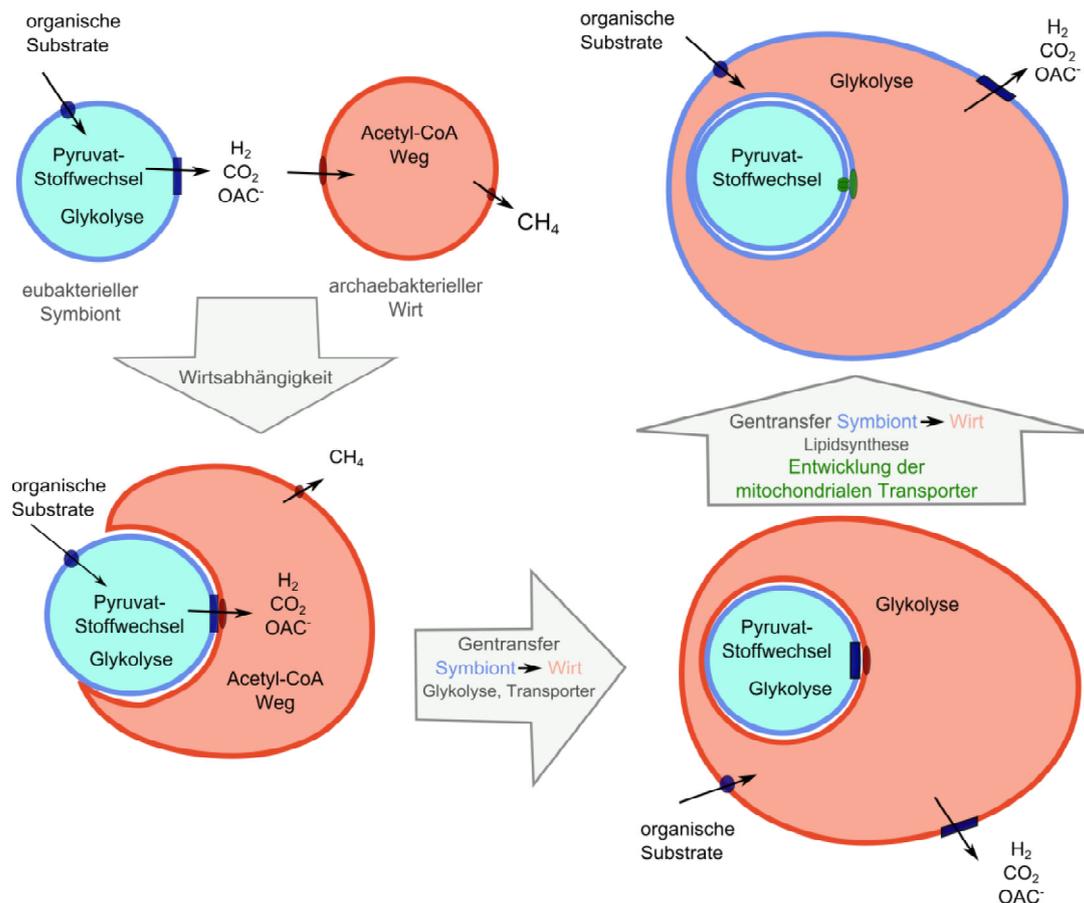


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Wasserstoffhypothese verändert nach Martin und Müller (1998) und Martin und Russel (2003).

Sowohl die Mitochondrien als auch die Hydrogenosomen sind von einer doppelten Membran umgeben, die das Phospholipid Cardiolipin enthält und beide können Ca^{2+} speichern (Benchimol *et al.*, 1982; Benchimol und de Souza, 1983; de Andrade *et al.*, 2006). Die Biogenese der Hydrogenosomen erfolgt als Zweiteilung unabhängig von der Zellzyklusphase (Benchimol *et al.*, 1996b; Benchimol und Engelke, 2003). Hydrogenosomen unterscheiden sich morphologisch von den Mitochondrien in der Form der inneren Membran, die keine Cristae ausbildet. Die innere und äußere Membran verlaufen parallel und zwischen diesen sind periphere Vesikel, die Ca^{2+} enthalten (Benchimol *et al.*, 1996a). Die Reifung von

FeS-Proteinen in den Hydrogenosomen erfolgt aufgrund der gefunden mitochondrialen Homologe vermutlich ähnlich wie in den Mitochondrien (Tachezy *et al.*, 2001; Sutak *et al.*, 2004; Dolezal *et al.*, 2007). Ein Teil des Aminosäuremetabolismus, der aus den Mitochondrien bekannt ist, konnte durch die Lokalisation und Charakterisierung von daran beteiligten Proteinen auch den Hydrogenosomen zugeordnet werden (Westrop, 2006; Mukherjee *et al.*, 2006b; Mukherjee *et al.*, 2006a; Schneider *et al.*, 2011; Rada *et al.*, 2011; Morada *et al.*, 2011). In beiden Organellen wird ATP gebildet, allerdings unterscheiden sich die jeweiligen Stoffwechselwege. Die Hydrogenosomen haben im Gegensatz zu den Mitochondrien keine Elektronentransportkette, keinen Zitronensäurezyklus und die Energie wird durch Substratkettenphosphorylierung anstatt durch oxidative Phosphorylierung gewonnen (Lloyd und Müller, 1979; Müller, 1993). So wie in den Mitochondrien wurde die β -Succinyl-CoA-Synthase und Frataxin in den Hydrogenosomen lokalisiert (Lahti *et al.*, 1992; Dolezal *et al.*, 2007). Die Anwesenheit von HSP10, HSP60, HSP70 (*heat shock protein*) und Komplex I der Atmungskette in beiden Organellen sind weitere Gemeinsamkeiten (Bui *et al.*, 1996; Hrdy *et al.*, 2004).

Anders als Mitochondrien haben Hydrogenosomen keine Fettsäuresynthese und keine DNA (Beach *et al.*, 1990; Clemens und Johnson, 2000). Abgesehen von der Ausnahme des anaeroben Ciliaten *Nyctotherus ovalis* wurde bislang keine hydrogenosomale DNA nachgewiesen (Akhmanova *et al.*, 1998). Alle hydrogenosomalen Proteine werden deshalb wie in den Mitochondrien, mit Ausnahme der wenigen in der *mtDNA* codierten Proteine, im Cytosol durch freie Polyribosomen synthetisiert und ATP abhängig posttranslational importiert (Lahti und Johnson, 1991; Bradley, 1997). In manchen Hydrogenosomen wurde auch ein Membranpotential festgestellt (Biagini *et al.*, 1997). Über die Proteinimportmaschinerie der Hydrogenosomen ist nur wenig bekannt. Bis jetzt wurden nur zwei hydrogenosomale Membranproteine (HMPs) aus *T. vaginalis* charakterisiert. HMP31 ist ein in der inneren Membran lokalisierter ADP/ATP Transporter, für HMP35 wird vermutet, dass es Poren in der äußeren Membran bildet, es ist aber keine eindeutige Homologie oder Funktion bekannt (Dyall *et al.*, 2000; Dyall *et al.*, 2003). Beide Proteine wurden heterolog in *S. cerevisiae* exprimiert. HMP31 wurde dabei in die innere, HMP35 in beide Membranen der Mitochondrien eingebettet. Bis vor kurzem waren nur Homologe für PAM18 (*presequence translocase-associated motor*), für die MPP (*mitochondrial processing peptidase*), für SAM50 (*sorting and assembly machinery*), für TIM17 (*translocase of the inner membrane*) und TIM23 bekannt (Dolezal *et al.*, 2005; Dolezal *et al.*, 2006; Carlton *et al.*, 2007; Šmíd *et al.*, 2008). Durch die Proteomanalyse der hydrogenosomalen Membranen konnten Homologe zu TOM40 (*translocase of the outer membrane*) der Proteinimportmaschinerie identifiziert werden (Rada *et al.*, 2011). Trotz dieser Gemeinsamkeiten gibt es dennoch Unterschiede zwischen beiden Importmaschinerien. Die bis jetzt gefundenen Homologe und die

Lokalisation von mehreren heterolog exprimierten hydrogenosomalen Proteinen in den Mitochondrien lassen eine ähnliche Proteinimportmaschinerie vermuten. Die neuesten Studien zum Import von Matrixproteinen in die Hydrogenosomen deuten darauf hin, dass sich die hydrogenosomale Proteinimportmaschinerie möglicherweise anders entwickelte und weniger komplex ist, da das N-terminale Transitpeptid nicht immer für den Import erforderlich ist (Mentel *et al.*, 2008).

2.3 Membranproteine und Metabolitentransport

Die Kompartimentierung in eukaryotischen Zellen ermöglicht den kontrollierten Ablauf verschiedener Reaktionen. So können z.B. Enzyme bei optimalem pH-Wert arbeiten und vor Sauerstoff geschützt werden. Außerdem können Konzentrationsgefälle aufgebaut und eine räumliche Nähe zwischen Substrat und Enzym aufrecht erhalten werden. Solche Kompartimente sind in der Regel durch eine einfache oder doppelte Membran aufgebaut, die aus Lipiden, peripheren und integralen Proteinen besteht.

2.3.1 Die peripheren Membranproteine

Es gibt viele Arten von peripheren Membranproteinen, die sich in ihrer Funktion und durch ihre Bindung mit der Membran unterscheiden. Diese Proteine können Enzyme sein und an Signalkaskaden und am Vesikeltransport beteiligt sein. Periphere Proteine können kovalent durch Fettsäuren oder einen GPI-Anker an einer Membran oder reversibel an Lipid-Kopfgruppen und integrale Proteine durch hydrophobe Eigenschaften, elektrostatische Kräfte oder Wasserstoffbrücken gebunden sein (Low, 1987; Johnson und Cornell, 1999; Seelig, 2004). Diese Bindungen können durch einen hydrophoben Anker, bestehend aus einer Acylierung oder Prenylierung, erleichtert werden (Khandelia *et al.*, 2008). Zu den peripheren Membranproteinen werden Proteine gezählt, die durch denaturierende Reagenzien wie 6 M Guanidiniumhydrochlorid und 0,1 M NaOH oder durch einen pH-Wert von 11,5 mit Hilfe von z.B. 0,1 M Na₂CO₃ von der Membran gelöst werden, ohne dass diese zerstört wird (Steck, 1974; Fujiki *et al.*, 1982).

2.3.2 Aufbau, Vorkommen und Funktionen der integralen Membranproteine

Integrale Proteine haben transmembrane Domänen, die in die Membran eingebettet sind. Diese Domänen können aus α -Helices oder β -Faltblättern bestehen, wobei ein Protein beide Strukturen enthalten kann. Diese Proteine haben in der Regel stark hydrophobe Domänen

und lassen sich nur unter Zerstörung der Membran mit z.B. nichtionischen Tensiden wie Triton X-100 solubilisieren (Fujiki *et al.*, 1982).

β -Faltblätter bestehen aus 10 bis 12 Aminosäuren. Die polaren Reste der Aminosäuren werden durch Wasserstoffbrücken neutralisiert (Paul und Rosenbusch, 1985; Kleffel *et al.*, 1985). Die typischen β -Faltblätter bestehen überwiegend aus den Aminosäuren Valin, Isoleucin, Threonin, Prolin, Tyrosin und Tryptophan (Chou und Fasman, 1974; Chou und Fasman, 1977; Smith *et al.*, 1994). β -Barrel-Proteine wurden als Monomere und Oligomere von 8 bis 24 β -Faltblättern gefunden (Vogt und Schulz, 1999; Huang *et al.*, 2009). β -Barrel-Proteine kommen in der äußeren Membran von Gram negativen Bakterien vor und haben unterschiedliche Funktionen als Porine, Transporter, Enzyme und Rezeptoren (Koebnik *et al.*, 2000). In den Eukaryoten sind β -Barrel-Proteine am Protein- und Metabolitentransport durch die äußere Membran von Chloroplasten und Mitochondrien beteiligt (Duy *et al.*, 2007; Wojtkowska *et al.*, 2012). In den Hydrogenosomen von *T. vaginalis* wurden auch β -Barrel-Proteine gefunden, die aufgrund ihrer Homologie zu denen der Mitochondrien wahrscheinlich die gleiche Funktion haben (Rada *et al.*, 2011).

α -Helices, die transmembrane Domänen von integralen Proteinen bilden, können 20 bis 25 Aminosäuren lang sein (Wallin und von Heijne, 1998). In der Mitte der Helix sind vorwiegend die hydrophoben Aminosäuren lokalisiert, wobei Phenylalanin stark vertreten ist. Zu den Seiten hin bilden sich polare Segmente, die reich an Threonin und Tyrosin sind und oft durch Asparagin und Glycin abgeschlossen werden (Henderson und Unwin, 1975; von Heijne, 1999). Die Ladungen der polaren Reste werden durch Wasserstoffbrücken ausgeglichen (Cowan und Rosenbusch, 1994). Die transmembranen Domänen können durch einen kurzen Loop oder eine große globuläre Domäne verbunden sein. Bevorzugt wird aber oft die erste Variante. Die Topologie von Proteinen folgt oft der so genannten *positive-inside* Regel. Die transmembranen hydrophoben Segmente der α -Helices werden bei Bakterien auf der cytoplasmatischen Seite oft von positiv geladenen Resten flankiert (von Heijne, 1986). Der gleiche Effekt wurde für die Proteine, die in der mitochondrialen DNA codiert und in der inneren Membran der Mitochondrien eingebettet sind, gefunden. Für die im Genom codierten Proteine wurde hingegen eine gleichmäßige Verteilung der Aminosäuren festgestellt (Gavel und von Heijne, 1992).

Proteine mit α -helikalen transmembranen Domänen kommen auch in der inneren Membran von Chloroplasten vor (Firlej-Kwoka *et al.*, 2008). Die integralen Proteine der inneren Mitochondrienmembran haben eine oder mehrere hydrophobe Helices (Becker *et al.*, 2009). Diese Proteine können Bestandteil der Atmungskette oder der F_1F_0 ATP Synthase sein. Außerdem können integrale Proteine Teil der Proteinimportmaschinerie oder Metabolitentransporter sein (Kuan und Saier, 1993; Abrahams *et al.*, 1994; Neupert und

Herrmann, 2007). Es gibt aber auch solche, die zu den Membranprotein-Familien der ABC-Transporter und AAA-Proteasen gehören (Jungwirth und Kuchler, 2006; Gerdes *et al.*, 2012).

2.3.4 Metabolitentransport in die Mitochondrien

In den Mitochondrien finden viele Stoffwechselprozesse statt, die einen konstanten Metabolitenaustausch erfordern. Metabolite können die äußere Membran durch spannungsregulierte VDAC (*voltage dependent anion channels*) Poren leicht durchqueren (Mannella *et al.*, 1992). Der Transport wird erst durch die innere Membran mit Hilfe einer Reihe von substratspezifischen Transportern, die zur *mitochondrial carrier family* (MCF) gehören reguliert. Bei vielen Transportern werden zwei verschiedene Moleküle in entgegengesetzter Richtung durch die Membran befördert. Die Anzahl kann je nach Organismus variieren. Für den *S. cerevisiae* Stamm ATCC 204508/S288c waren in der Datenbank UniProt (Januar 2012) 21 Transporter charakterisiert, die Metabolite transportieren und zwei, die am mitochondrialen Spleißen von *mtRNA* beteiligt sind. Charakteristisch für MCF-Transporter sind drei Wiederholungen aus ca. 100 AS, die jeweils zwei α -helikale transmembrane Domänen und ein konserviertes P X(D/E) X X (K/R) Motiv haben (Walker, 1992; Nelson *et al.*, 1998). Es wird angenommen, dass diese Transporter als Homodimere funktionieren (Schroers *et al.*, 1998). Bamber *et al.* (2007) postulierten aber für die ADP/ATP-Transporter unterstützt durch *in vitro* Experimente, die einen Metabolitentransport nachwiesen, und das Fehlen von offensichtlichen Protein-Schnittstellen in den Kristallstrukturen der Transporter, eine Funktion als Monomer.

Für die Mitochondrien in *S. cerevisiae* wurden nur wenige ABC-Transporter gefunden, die an dem Export von FeS-Clustern und Peptiden, die bei der Proteolyse von Matrixproteinen durch Proteasen der inneren mitochondrialen Membran entstehen, aus den Mitochondrien beteiligt sind (Young, 2001; Chloupková *et al.*, 2004). In Eukaryoten bestehen die meisten ABC-Transporter aus einem Protein mit zwei transmembranen Domänen und zwei ATP-Bindedomänen (Jones und George, 1999). Es gibt aber Ausnahmen bei denen die Transporter aus zwei Protein-Molekülen bestehen, die jeweils eine transmembrane Domäne und eine ATP-Bindedomäne haben (Taglicht und Michaelis, 1998).

2.3.4 Metabolitentransport in die Hydrogenosomen

Den Hydrogenosomen wird die fermentative ATP-Produktion, die Reifung von Eisen-Schwefel-Cluster Proteinen und der Metabolismus von einigen Aminosäuren zugeschrieben. Für die an der ATP-Produktion in den Hydrogenosomen beteiligten Metabolite Pyruvat, CoA, Succinat, ADP, ATP, P_i , Malat, NAD^+ H^+ sind in den Mitochondrien Transporter bekannt

(Müller, 1993; Tschudi und Pearce, 2000; Embley und Martin, 2006; Robinson *et al.*, 2008). Sutak *et al.* (2004) konnten zeigen, dass die Reifung von FeS-Proteinen in den Hydrogenosomen von *T. vaginalis* stattfindet. Wie das benötigte Eisen in die Hydrogenosomen importiert wird, konnte aber noch nicht geklärt werden. Über den Aminosäuremetabolismus in den Hydrogenosomen gibt es bislang nur sehr wenige wissenschaftliche Erkenntnisse. Es wurden zwar mehrere Proteine, die an dem Aminosäuremetabolismus beteiligt sein sollen, lokalisiert, aber nur die Proteine H und L des Glycin-Decarboxylase-Komplexes und die Serin-Hydroxymethyltransferase charakterisiert. (Mukherjee *et al.*, 2006b; Mukherjee *et al.*, 2006a). Transporter für Glycin oder Serin wurden nie identifiziert.

Bei einer Proteomanalyse der hydrogenosomalen Membranen von *T. vaginalis* durch Rada *et al.* (2011) wurden Proteine der äußeren und inneren Membran identifiziert. Die Unterscheidung zwischen innerer und äußerer Membran ist aktuell nur durch Homologensuche und einzelne Untersuchungen möglich, da es noch kein Verfahren gibt, beide hydrogenosomalen Membranen voneinander zu trennen. Der Transit der Metaboliten durch die äußere Membran erfolgt möglicherweise ähnlich wie in den Mitochondrien. Es wurden Homologe zu den mitochondrialen VDACs, die wahrscheinlich eine ähnliche Struktur haben, gefunden, der experimentelle Nachweis steht aber noch aus. Bis jetzt wurden nur fünf Homologe mit MCF Domänen und der für ADP/ATP Transporter typischen Signatur RRRMMM gefunden (Dyall *et al.*, 2000; Rada *et al.*, 2011). In *Trichomonas gallinae*, welches der Verursacher der Trichomoniasis bei Vögeln ist, wurde für ein HMP31.1 Homolog die Funktion als ADP/ATP Transporter experimentell bestätigt (Stabler, 1954; Tjaden *et al.*, 2004). Für die weiteren HMP31-Homologen ist trotz der enthaltenen charakteristischen Signatur für die ADP/ATP Transporter teilweise eine andere Funktion annotiert (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Übersicht der Proteine mit MCF Domänen in *T. vaginalis*.

	TrichDB Annotation / BLAST
HMP31.1 (TVAG_237680)	putatives ADP/ATP Transportprotein / HMP31-Präkursor
HMP31.2 (TVAG_051820)	putatives Tricarboxylat Transportprotein / HMP31-Präkursor
HMP31.3 (TVAG_164560)	putatives mitochondriales Transportprotein / Calcium-bindendes mitochondriales Transportprotein SCaMC-2-A
HMP31.4 (TVAG_196220)	putatives mitochondriales Transportprotein / Calcium-bindendes mitochondriales Transportprotein SCaMC-1-B
HMP31.5 (TVAG_262210)	putatives Tricarboxylat Transportprotein / HMP31-Präkursor

Bei der Veröffentlichung des Genoms von *T. vaginalis* durch Carlton *et al.* (2007) wurden 387 Transportproteine annotiert, die genaue Lokalisation und Funktion in *T. vaginalis* wurde

jedoch nie untersucht. Für die meisten Metabolite, die in den Hydrogenosomen an den oben erwähnten Stoffwechselprozessen beteiligt sind, konnten Transporter weder durch Homologensuche noch durch Charakterisierung von Proteinen zugeordnet werden.

Durch die Sequenzierung des Genoms von *T. vaginalis* wurde deutlich, dass viele codierte Proteine hypothetisch sind. So sind z.B. 38,4% (53 von 138) der vermeintlichen hydrogenosomalen Proteine, die ein Transitpeptid haben, und 80,1% (4122 von 5146) der in der TrichDB 1.3 Datenbank (Januar 2012) annotierten Gene für Proteine mit mindestens einer transmembranen Domäne hypothetisch (Carlton *et al.*, 2007; Aurrecochea *et al.*, 2009). Für einige davon wurden ESTs annotiert (20%) und die codierten Proteine in Proteomanalysen nachgewiesen, ihre Funktion ist aber weiterhin unbekannt. Eines dieser Proteine ist TVAG_455090 (HMP23). Unter den in der *T. vaginalis* Datenbank (TrichDB) als hypothetisch annotierten Proteinen mit komplettem ORF wurden TVAG_455090 die meisten ESTs (377) zugeordnet (Aurrecochea *et al.*, 2009). Das 22,6 kDa schwere Protein TVAG_455090 wurde in drei voneinander unabhängigen Proteomanalysen der Hydrogenosomen gefunden (Pütz, 2007; Rada *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2011). TVAG_455090 besitzt je nach Voraussage mehrere α -helikale transmembrane Domänen und wurde deshalb den HMPs zugeordnet.

Durch BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) Analysen können Homologien zu bekannten Proteinen in anderen Organismen gesucht und so Hinweise über eine mögliche Funktion gefunden werden (Altschul *et al.*, 1990). Da sich *T. vaginalis* aber phylogenetisch gesehen sehr früh in der Evolution isoliert hat, werden für viele Proteine keine Homologien gefunden (Sogin, 1991; Roger *et al.*, 1996).

Um hydrogenosomale Transporter in *T. vaginalis* zu identifizieren und zu charakterisieren, müssen die putativen Membranproteine in Hinsicht auf Sequenzcharakteristika, Lokalisation und Funktion untersucht werden. Proteine können, wenn Homologe bekannt sind, leichter biochemisch charakterisiert werden, indem die putative Funktion gezielt überprüft und nachgewiesen wird. Wenn keine Homologien bekannt sind, können durch eine Gendeletion und den anschließenden Vergleich zwischen Mutante und Wildtyp Hinweise auf die Funktion gewonnen werden.

2.4 Gendeletion bei *Trichomonas vaginalis*

Eine Möglichkeit, um die Funktion eines Proteins in einem Organismus aufzuklären, ist die Deletion des codierenden Genes. Die Ausschaltung eines Gens kann (a) letal sein, (b) einen Phänotyp verursachen, (c) eine Stresssituation hervorrufen, die z.B. mit verlangsamtem Wachstum einher geht, (d) sich nur unter bestimmten Bedingungen bemerkbar machen, (e)

durch eine Isoform oder einen alternativen Stoffwechselweg kompensiert werden (Glaever *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2003; Harrison *et al.*, 2007; Tohsatot *et al.*, 2010).

Bei *Trichomonas vaginalis* wurde bislang nur eine Gendeletion erfolgreich durchgeführt. Land *et al.* (2004) haben untersucht, ob die Deletion von Ferredoxin1 einen Einfluss auf die PFO (Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase) und somit auf die Metronidazol-Resistenz hat. Bei dieser Arbeit stellten die Autoren keinen Phänotyp der Mutante fest, was darin begründet ist, dass die Autoren nur eines der vorhandenen sieben Ferredoxin-Gene deletiert hatten. Für die Gene in *T. vaginalis* mit Isoformen kann mit einer Gendeletion untersucht werden, ob die Isoformen den Verlust durch eine Erhöhung der Expression kompensieren oder eine leicht veränderte Funktion haben.

Sofern es keine Isoformen des zu untersuchenden Proteins gibt, die den Ausfall kompensieren können, kann die Deletion eines Genes zu einer Stresssituation führen, die im optimalen Fall Hinweise auf die Funktion liefert. Sollte die Deletion nicht letal sein, dann kann anhand des Phänotyps, Expressionsanalysen und biochemischen Untersuchungen möglicherweise die Funktion ermittelt werden.

2.5 Zielsetzung

Mitochondrien und Hydrogenosomen haben zwar einen gemeinsamen Vorfahren, unterscheiden sich aber in der Art und Anzahl der Stoffwechselwege. Den Hydrogenosomen wurden bislang die fermentative ATP-Produktion, die Reifung von FeS-Cluster Proteinen und der Metabolismus von einigen Aminosäuren zugeordnet (Müller, 1988; Tachezy *et al.*, 2001; Sutak *et al.*, 2004; Westrop, 2006; Mukherjee *et al.*, 2006b; Mukherjee *et al.*, 2006a; Dolezal *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2011; Rada *et al.*, 2011; Morada *et al.*, 2011). Die Hydrogenosomen haben keine Fettsäuresynthese und keinen Zitronensäurezyklus (Lloyd und Müller, 1979; Beach *et al.*, 1990; Müller, 1993). Von den bei der Veröffentlichung des Genoms von *T. vaginalis* annotierten 387 Transportproteinen wurden nur fünf Membranproteine, die MCF Domänen enthalten, mit den Hydrogenosomen in Verbindung gebracht (Carlton *et al.*, 2007). Für eins davon wurde eine Funktion als ADP/ATP Transporter nachgewiesen (Tjaden *et al.*, 2004). Auch wenn die vier übrigen andere Metabolite transportieren, reichen sie vermutlich nicht aus, um den Metabolitentransport in und aus den Hydrogenosomen zu gewährleisten.

Die Lokalisation und Charakterisierung der hypothetischen Proteine mit transmembranen Domänen, die exprimiert werden, kann Erkenntnisse darüber bringen, ob sie mit den Hydrogenosomen assoziiert sind und welche Funktion sie haben.

Ziel dieser Arbeit ist es, das hochexprimierte hydrogenosomale Membranprotein TVAG_455090 (HMP23), das keine offensichtlichen Isoformen in *T. vaginalis* hat, mit drei

verschieden Ansätzen zu untersuchen und so Hinweise auf eine mögliche Funktion zu gewinnen. Zuerst sollten durch *in silico* Analysen erste Anhaltspunkte über die Funktion mit der Suche nach Homologen in anderen Genomen und die Voraussage über die räumliche Struktur erhalten werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob das Protein in der inneren oder äußeren hydrogenosomalen Membran lokalisiert ist. Im letzten Teil der Arbeit sollte das Gen mittels homologer Rekombination und Markerinsertion deletiert und - sofern kein letaler Phänotyp erzeugt wird - die Folgen der Deletion ultrastrukturell und molekular untersucht werden.

3. Ergebnisse

Im Fokus dieser Arbeit steht das Protein HMP23 (TVAG_455090). Es war von besonderem Interesse, da die hohe Anzahl an ESTs eine wichtige Funktion vermuten lässt und es für eine Gendeletion interessant ist, da HMP23 keine erkennbaren Isoformen in *T. vaginalis* hat, die den Verlust kompensieren könnten.

Ziel dieser Arbeit ist es, Hinweise über eine mögliche Funktion von HMP23 zu gewinnen. Im ersten Teil wurden mit der Aminosäuresequenz verschiedene *in silico* Analysen durchgeführt, um Anhaltspunkte bezüglich der räumlichen Struktur und mögliche Funktionen des Proteins zu finden. Außerdem wurde HMP23 markiert, homolog überexprimiert und in den subzellulären Fraktionen und *in situ* immunodetektiert. Zusätzlich wurde untersucht, ob HMP23 in der inneren oder äußeren Membran lokalisiert ist. Abschließend wurde das Gen für HMP23 im Genom von *T. vaginalis* mittels homologer Rekombination durch ein Resistenzgen ausgetauscht und die Auswirkungen der Deletion von HMP23 untersucht. Bei dem entstandenen Stamm *T. vaginalis* T1 Δ HMP23 wurden die Hydrogenosomen mittels Transmissionselektronenmikroskopie analysiert und das Wachstum der Kultur protokolliert. Mögliche Kompensationen wurden durch den Vergleich mit dem Wildtyp T1 mittels Proteomanalysen und qRT-PCR festgestellt.

3.1 *In silico* Analysen von HMP23

Durch *in silico* Analysen konnten erste Anhaltspunkte über die Funktion von HMP23 erhalten werden. Dessen Aminosäuresequenz ist in der Datenbank TrichDB Version 1.2 von *T. vaginalis* annotiert und wurde für die Suche nach Homologen in *T. vaginalis* und anderen Organismen sowie für die Voraussage der räumlichen Struktur und möglicher Funktionen genutzt (Aurrecochea *et al.*, 2009).

3.1.1 Homologiesuche mittels BLAST

Bei der BLAST-Suche (5.12) mit der Aminosäure-Sequenz von HMP23 wurden vier Homologe im Genom von *T. vaginalis* gefunden: TVAG_485120, TVAG_077910, TVAG_423530, TVAG_087280. Alle vier Homologen in *T. vaginalis* waren hypothetische Proteine, wobei TVAG_485120 die höchste Identität (41%) zu HMP23 und den besten E-value (Erwartungswert) ($3e^{-48}$) hat (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Übersicht der BLAST-Treffer von HMP23 (TVAG_455090) im Genom von *T. vaginalis*.

Organismus	NCBI Zg. Nr.	TrichDB Zg. Nr.	Id	E-value	Annotation
<i>T. vaginalis</i>	XP_001330530.1	TVAG_485120	41%	3e ⁻⁴⁸	hypothetical protein
<i>T. vaginalis</i>	XP_001308879.1	TVAG_077910	32%	4e ⁻²⁵	hypothetical protein
<i>T. vaginalis</i>	XP_001328523.1	TVAG_423530	33%	5e ⁻²⁴	hypothetical protein
<i>T. vaginalis</i>	XP_001318173.1	TVAG_087280	28%	8e ⁻²⁰	hypothetical protein

Die Ergebnisse sind nach dem E-value sortiert. **Zg. Nr.:** Zugangsnummer; **Id:** Identität.

Das erste nicht hypothetische Protein mit Ähnlichkeiten zu HMP23, das mit Ausschluss des Genoms von *T. vaginalis* bei der BLAST-Suche gefunden wurde, stammt aus der Kieselalge *Thalassiosira pseudonana* mit einer Identität von 26%, einem E-value von 9e⁻⁰⁵ und zwei Domänen der *mitochondrial carrier family* (MCF). Mit dieser Aminosäuresequenz wurden bei einer BLASTp Suche hauptsächlich Phosphat-Transporter gefunden, wobei das erste nicht hypothetische Protein ein Phosphat-Transporter in *Candida tropicalis* mit einer Identität von 34% und einem E-value von 4e⁻⁴⁹ war. Die BLAST-Treffer der HMP23 Homologen außerhalb von *T. vaginalis*, die keine hypothetischen Proteine waren, sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Die besten BLAST-Treffer von HMP23 und seinen Homologen (Tabelle 3.1) bei Ausschluss des *T. vaginalis* Genoms. Es wurden nur Treffer mit annotierter Funktion berücksichtigt.

TrichDB Zg. Nr.	Organismus	NCBI Zg. Nr.	Id	E-value	Annotation
TVAG_455090	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	XP_002293146.1	26%	9e ⁻⁰⁵	mitochondrial carrier protein-like protein
TVAG_485120	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	YP_002005573.1	25%	1e ⁻⁰⁶	transporter permease membrane region pf06826.2
TVAG_077910	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	YP_004242939.1	22%	5e ⁻⁰⁵	ATPase component of ABC-type transporters
TVAG_423530	<i>Gallus gallus</i>	P56673.1	28%	9e ⁻⁰⁶	Homeobox Protein
TVAG_087280	<i>gamma proteobacterium</i>	ZP_08270547.1	29%	1e ⁻⁰⁶	cation efflux system protein

Zg. Nr.: Zugangsnummer; **Id:** Identität.

3.1.2 Gemeinsamkeiten zwischen HMP23 und seinen Homologen in *T. vaginalis*

Um Gemeinsamkeiten zwischen den HMP23 und seinen Homologen in *T. vaginalis* herauszufinden, wurden mit Hilfe der Aminosäuresequenzen Voraussagen über transmembrane Domänen und Sequenzwiederholungen gemacht. Um konservierte Aminosäuren innerhalb dieser fünf Homologen zu ermitteln, wurden die Sequenzen mit

ClustalW2 aligniert (Larkin *et al.*, 2007). Mit den Programmen PRED-TMBB, TMB-Hunt und TMBETA-NET wurden mit den Aminosäuresequenzen der fünf Homologen keine β -Faltblätter, die eine transmembrane Domäne darstellen, gefunden (Bagos *et al.*, 2004; Gromiha und Suwa, 2005; Garrow *et al.*, 2005). Die Voraussage der α -helikalen transmembranen Domänen wurde mit den Programmen TMHMM, HMMTOP und SPOCTOPUS berechnet (5.12.1) (Tusnady und Simon, 2001; Krogh *et al.*, 2001; Viklund *et al.*, 2008). Es wurden für alle Proteine α -helikale transmembrane Domänen gefunden, wobei die Programme eine unterschiedliche Anzahl voraussagten (Tabelle 3.3). Unter Berücksichtigung der Hypothese, dass Membranproteine der Hydrogenosomen und Mitochondrien aufgrund des gemeinsamen Vorfahrens wahrscheinlich ähnliche Eigenschaften haben, kann HMP23 sowohl in der äußeren als auch in der inneren Membran lokalisiert sein, da es nur α -helikale transmembrane Domänen besitzt (Martin und Müller, 1998; Becker *et al.*, 2009).

Tabelle 3.3: Voraussagen der α -helikalen transmembranen Domänen von HMP23 und seiner Homologe in *T. vaginalis* (Tabelle 3.1) mit drei verschiedenen Programmen.

Gene ID	TMHMM	HMMTOP	SPOCTOPUS
TVAG_455090	2	6	3
TVAG_485120	3	6	1
TVAG_077910	4	5	1
TVAG_423530	1	2	1
TVAG_087280	2	3	1

Die mit den drei Programmen berechneten α -helikalen transmembranen Domänen von HMP23 und seinen Homologen in *T. vaginalis* sind im multiplen Alignments graphisch dargestellt (Abb. 3.1). Die mit den gleichen Programmen vorausgesagte Topologie für HMP23 ist in der Abb. 3.2 schematisch illustriert.

Für HMP23 wurden 2 bis 6 α -helikale transmembrane Domänen gefunden. Nur die transmembranen Domänen zwischen den Aminosäuren 40 und 63 sowie zwischen 81 und 103 von HMP23 wurden von allen drei verwendeten Programmen gefunden. Die Domäne zwischen den Aminosäuren 161 und 178 wurde zweimal vorausgesagt. Für die HMP23 Homologen in *T. vaginalis* wurde nur die Domäne, die im Bereich der Aminosäuren 80 bis 103 liegt dreimal vorausgesagt. Nur zweimal identifiziert wurden drei Domänen für TVAG_077910, zwei für TVAG_485120 und eine für TVAG_087280. Die meisten konservierten Aminosäuren befinden sich zwischen den Aminosäuren 81 und 103.

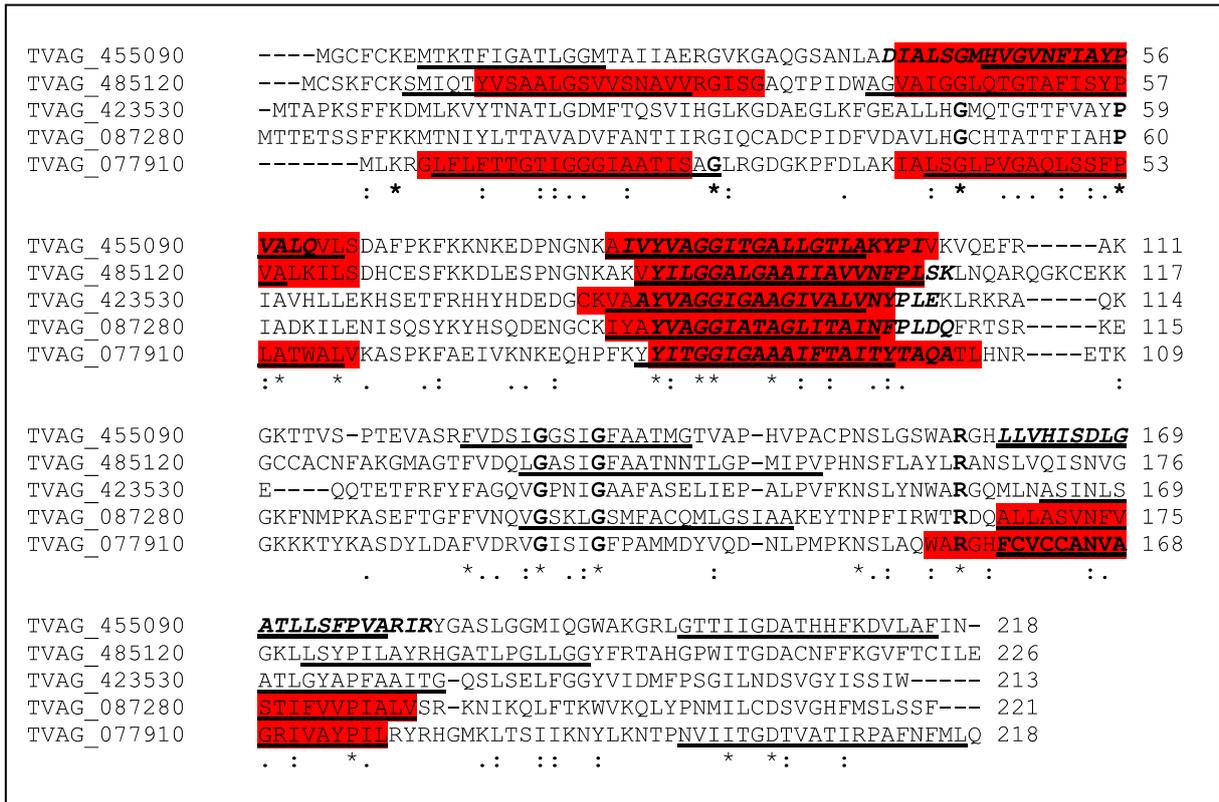


Abb. 3.1: ClustalW2 Alignment von HMP23 (TVAG_455090) und seiner vier Homologe in *T. vaginalis*. Die vorausgesagten transmembranen Domänen wurden mit **TMHMM**, **HMMTOP** und **SPOCTOPUS** vorausgesagt. Ein Stern (*) kennzeichnet eine konservierte Aminosäure in allen Sequenzen; ein Doppelpunkt (:) bzw. ein Punkt (.) steht für sehr bzw. nur. ähnliche Aminosäure.

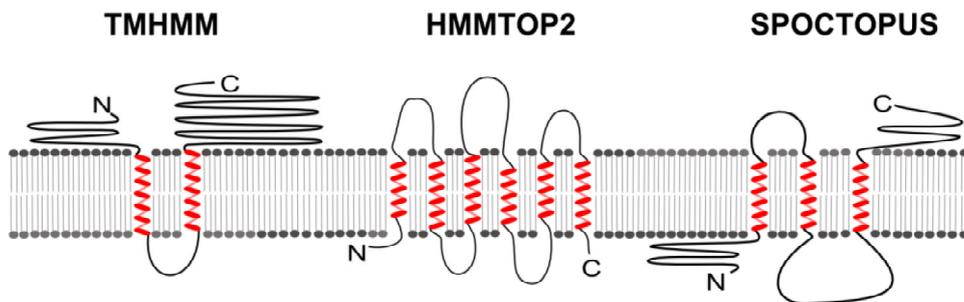


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der vorausgesagten α -helicalen transmembranen Domänen von HMP23 mit den Programmen TMHMM, HMMTOP und SPOCTOPUS.

Um die Genauigkeit der drei verwendeten Programme zu überprüfen, wurden mit den Aminosäuresequenzen der 34 MCF Proteine aus *S. cerevisiae* die α -helicalen transmembranen Domänen vorausgesagt. Die genaue Anzahl an α -helicalen transmembranen Domänen, die bei MCF-Transportern der Mitochondrien bei sechs liegt, sagte das Programm SPOCTOPUS voraus (Viklund *et al.*, 2008). Für 33 Proteine wurden sechs und für CMC1 wurden vier α -helikale transmembrane Domänen gefunden. Das

Homologen konnten mit einer BLAST-Suche keine signifikanten Homologien gefunden werden. Auch die Suche in PROSITE, einer Datenbank für Proteindomänen und funktionellen Merkmalen, lieferte keine Treffer (Sigrist *et al.*, 2010).

3.1.3 Phylogenetische Analyse von HMP23

Die phylogenetische Analyse (5.12.3) von HMP23 wurde mit den in *T. vaginalis* gefundenen Homologen, dem besten nicht hypothetischen BLAST-Treffer für HMP23 außerhalb von *T. vaginalis* (Tabelle 3.2), den 34 Proteinen von *S. cerevisiae* S288c, die zur mitochondrialen Carrierfamilie (MCF) gehören und HMP31 und seinen Homologen in *T. vaginalis*, die eine MCF Domäne haben, durchgeführt (Dyall *et al.*, 2000).

Mit dieser Analyse wurde überprüft, ob HMP23 mit den MCF-Transporter verwandt ist. Die Aminosäuresequenzen wurden mit MAFFT aligniert und mit Prottest LG+I+G+F als das beste Modell für die Proteinevolution bestimmt. Mit PhyML wurden *maximum likelihood* Bäume mit 100 Bootstrapreplikaten erzeugt (Guindon und Gascuel, 2003). Aus diesen wurden mit dem Programm Consensus aus dem Phylip Paket v3.6 ein Konsensusbaum nach der Mehrheitsregel bestimmt (Felsenstein, 1989). Im Gegensatz zu dem von PhyML erstellten Konsensusbaum werden hier nur Äste mit einer Unterstützung von über 50% dargestellt. In dem berechneten Baum (Abb. 3.4) konnte HMP23 keinem der MCF Proteine zugeordnet werden. HMP31 wurde, wie bereits durch Dyall *et al.* (2000) gezeigt, den ADP/ATP Antiportern zugeordnet. Die Homologen HMP31.2 und HMP31.5 wurden ebenfalls den ADP/ATP Antiportern zugeordnet. Die Homologen HMP31.3 und HMP31.4 bildeten alleine einen Ast ohne Verbindung zu den MCF-Proteinen von *S. cerevisiae*. Der beste nicht hypothetische BLAST-Treffer außerhalb von *T. vaginalis*, ein Protein mit zwei MCF Domänen von *Thalassiosira pseudonana*, wurde den Phosphat Transportern zugeordnet. HMP23 bildete mit den anderen gefunden Homologen, mit Ausnahme von TVAG_077910, einen gemeinsamen Ast. Phylogenetisch gesehen haben HMP23 und seinen Homologen vermutlich keine Gemeinsamkeiten mit den MCF-Proteinen.

Mit dieser Analyse ließ sich keine evolutionäre Verbindung zwischen HMP23 oder einem seiner homologen Proteine mit den MCF-Transportern feststellen.

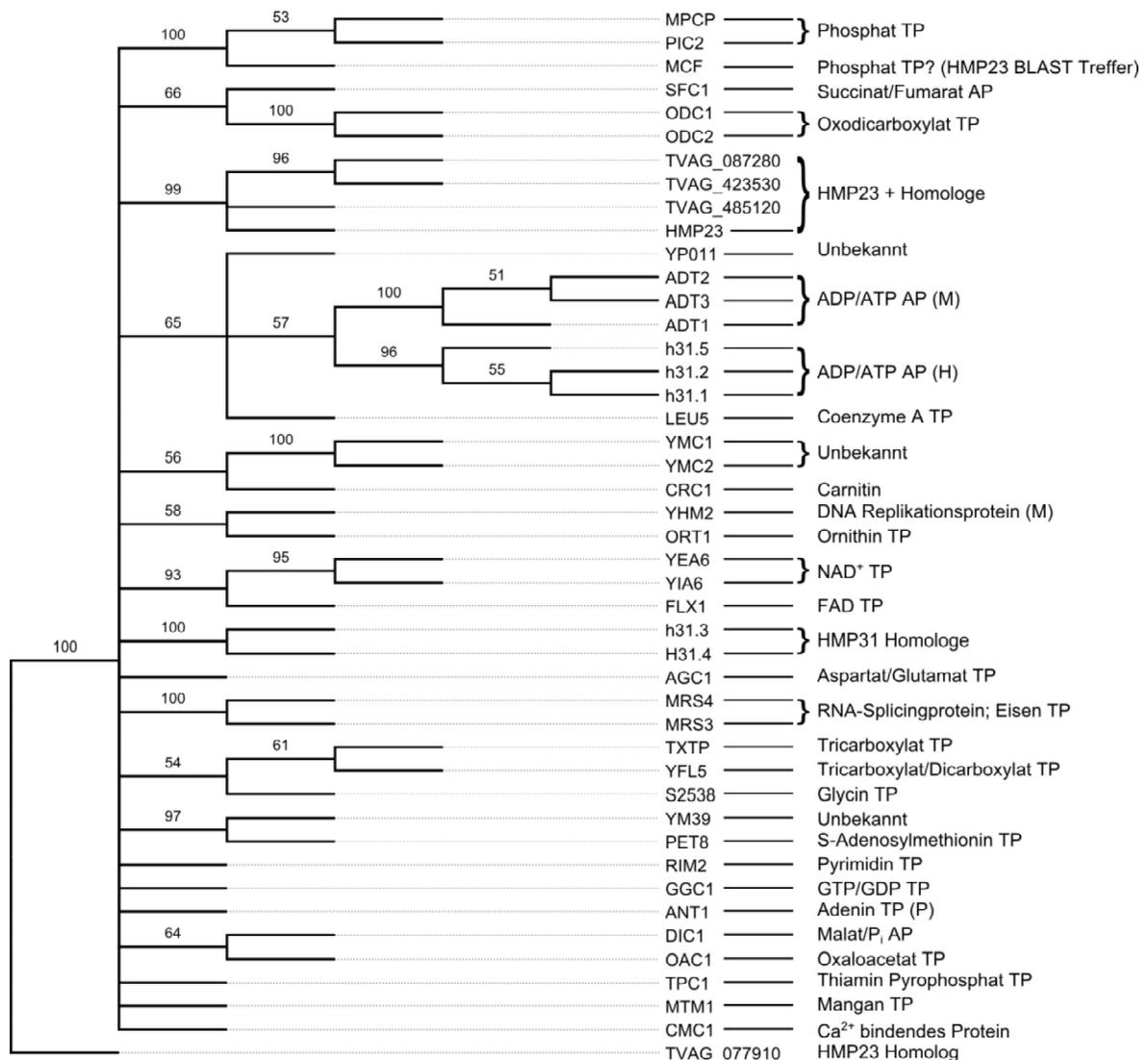


Abb. 3.4: Phylogenetische Analyse von HMP23 und Homologen. Die Aminosäuresequenzen wurden mit MAFFT aligniert und das beste Model für die Proteinevolution mit dem Programm Prottest 2.4 bestimmt: LG+I+G+F. Die Bootstrapanalyse wurde mit PhyML durchgeführt. Der Majority Consensus Baum wurde mit FigTree v.1.3.1 dargestellt. Die Zugangsnummern wurden im Anhang 1 aufgelistet. **TP:** Transporter; **AP:** Antiporter; **H:** hydrogenosomales, **M:** mitochondriales oder **P:** peroxisomales Protein.

3.1.4 Identitäten und Ähnlichkeiten mit den MCF-Proteinen

Da sich keine Verwandtschaft zwischen HMP23 und den MCF-Transportern festlegen ließ, wurden die Identitäten zwischen HMP23 und den bei der phylogenetischen Analyse verwendeten Proteinsequenzen ermittelt, um HMP23 in eine Transporter-Klasse einzustufen. Um die Identität zwischen HMP23, den HMP23 Homologen in *T. vaginalis*, dem besten nicht hypothetischen BLAST-Treffer für HMP23 außerhalb von *T. vaginalis* (Tabelle 3.2), HMP31 und seinen Homologen in *T. vaginalis*, und den 34 Proteinen aus *S. cerevisiae* S288c zu bestimmen, wurden die Aminosäuresequenzen mit dem Programm Needle aus dem

EMBOSS Paket global aligniert (Needleman und Wunsch, 1970; Rice *et al.*, 2000). Zum Vergleich wurde eine BLAST-Suche innerhalb der 45 Sequenzen durchgeführt, um identische Positionen zu ermitteln. Die Identitäten und Ähnlichkeiten aus den globalen Alignments und den Ergebnissen der BLAST-Suche wurden freundlicherweise mit einem Perlskript von Dr. Christian Eßer (Institut für Informatik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) ausgelesen und zum Teil graphisch zusammengefasst (Abb. 3.5).

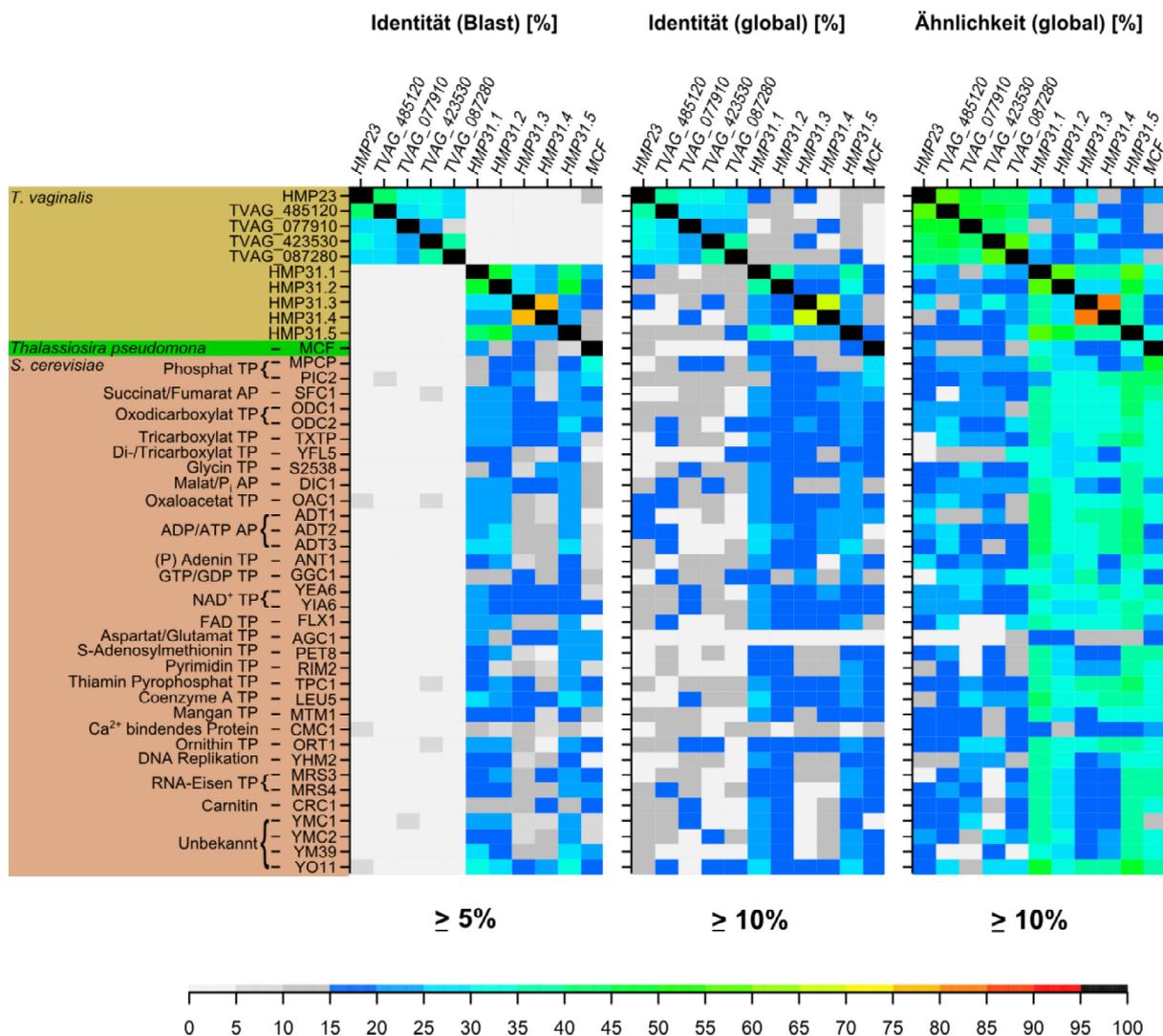


Abb. 3.5: Farbcodierte Darstellung der Identitäten und Ähnlichkeiten von HMP23 und seinen Homologen in *T. vaginalis*, von HMP31 und seinen Homologen in *T. vaginalis* und dem besten BLAST-Treffer für HMP23 außerhalb von *T. vaginalis*, gegenüber den der eigenen Sequenzen und den 34 *S. cerevisiae* Proteinen mit MCF Domänen in Prozent (0 bis 100). Der Schwellenwert für die Ergebnisse aus dem globalen Alignment wurde bei 10%, für die normalisierte BLAST-Suche bei 5% gesetzt. Die Anzahl der identischen Positionen zu dem besten lokalen Treffer in einer BLAST-Suche wurde auf die Länge der kürzeren Sequenz normalisiert. **TP:** Transporter; **AP:** Antiporter.

Die Proteine mit der höchsten Identität oder Ähnlichkeit wurden in der Tabelle 3.4 zusammengefasst. Die Identitäten der normalisierten BLAST-Suche sind zu niedrig, um eine Aussage zu treffen. Die Identitäten aus dem globalen Alignment sind bei allen MCF-Proteinen nahezu gleich (Anhang 1).

Tabelle 3.4: Übersicht der MCF-Proteine mit der höchsten Identität und Ähnlichkeit für HMP23 und Homologe, HMP31.3, HMP31.4 und dem Protein mit Homologie zu HMP23 in *T. pseudonana*.

	normalisierte Identität (BLAST) [%] ≥ 5%	Identität (Global) [%] ≥ 10%	Ähnlichkeit (Global) [%] ≥ 10%
HMP23	CMC1 (6,4) OAC1 (6,0) YP011 (5,5)	ADT1 (16,5) OAC1 (16,2) ADT2 (15,6)	ANT1 (26,5) ADT1 (26,1) OAC1 (24,9)
TVAG_485120	PIC2 (6,2)	GGC1 (17,8) OAC1 (17,2) ODC2 (17,2)	FLX1 (29,6) ODC2 (28,0) GGC1 (27,9)
TVAG_077910	YMC1 (6,9)	YMC1 (18,1) S2538 (17,8) LEU5 (17,8)	YMC1 (29,5) YEA6 (29,2) S2538 (28,9)
TVAG_423530	TPC1 (8,9) ORT1 (7,5) OAC1 (7,5)	YP011 (17,4) ORT1 (17,3) MPCP (16,5)	YP0011 (28,2) YMC2 (27,4) ORT1 (27,1)
TVAG_087280	-	GGC1 (17,5) ODC2 (16,9) YP011 (15,8)	YFL5 (30,8) GGC1 (30,5) FLX1 (29,0)
HMP31.3	PIC2 (22,1) SFC1 (19,1) MTM1 (18,7)	ODC2 (22,2) GGC1 (21,6) ADT1 (19,7)	YP011 (36,0) GGC1 (35,7) ADT1 (35,5)
HMP31.4	YP011 (21,6) S2538 (20,2) TXTP (19,1)	ADT3 (21) YEA6 (20,9) ADT1 (20,3)	ADT1 (37,9) YP011 (37,5) ORT1 (37,3)
MCF aus <i>T. pseudonana</i>	MPCP (31,5) PIC2 (27,7) LEU5 (23,4)	MPCP (29,5) PIC2 (25,6) SFC1 (22,2)	MPCP (47,1) PIC2 (44,8) PET8 (39,6)

Mit Hilfe der phylogenetischen Analyse und der Suche nach Identitäten und Ähnlichkeiten mit den MCFs von *S. cerevisiae* konnte HMP23 keiner Transporter-Klasse zugeordnet werden. Durch die Homologiesuche mittels BLAST und die Voraussage mehrerer α -helikalen transmembranen Domänen wurden erste Hinweise auf eine mögliche Transportfunktion und Lokalisation in der hydrogenosomalen Membran gewonnen. Das Protein mit Homologie zu HMP23 in *T. pseudonana* wurde in allen Analysen den Phosphat-Transportern zugeordnet.

3.2 Lokalisation von HMP23 in *T. vaginalis*

In den *in silico* Analysen wurden nur α -helikale transmembrane Domänen vorausgesagt. In den Mitochondrien können Proteine mit α -helikalen transmembranen Domänen sowohl in der inneren als auch in der äußeren Membran lokalisiert sein (Otera *et al.*, 2007). Durch die Lokalisationsstudien wurde untersucht, ob und in welche hydrogenosomalen Membran HMP23 lokalisiert ist.

3.2.1 Subzelluläre Lokalisation

Zur Herstellung von zwei Konstrukten zur Analyse der subzellulären Lokalisation wurde HMP23 aus der genomischen DNA von *T. vaginalis* mit den entsprechenden Oligonukleotiden (Tabelle 5.1) mittels PCR (5.10.2.1) amplifiziert. Anschließend wurden HMP23 und ein Di-Hämagglutinin Anhang mit Hilfe der bei der PCR eingebetteten Rekombinationsstellen über zwei Schritte mit Hilfe des Gateway® Systems von Invitrogen in den Expressionsvektor pTagVag2 rekombiniert (5.10.3). Dabei wurde HMP23 einerseits mit einen Di-Hämagglutinin Anhang amino- (pHMP23N; Abb. 3.6A) und andererseits im carboxyterminal (pHMP23C; Abb. 3.6B) markiert. Die Klonierungsstelle der Vektoren wurde sequenziert, die Richtigkeit der Sequenzen festgestellt und *T. vaginalis* T1 mit dem Expressionsvektor transfiziert (5.8.2).

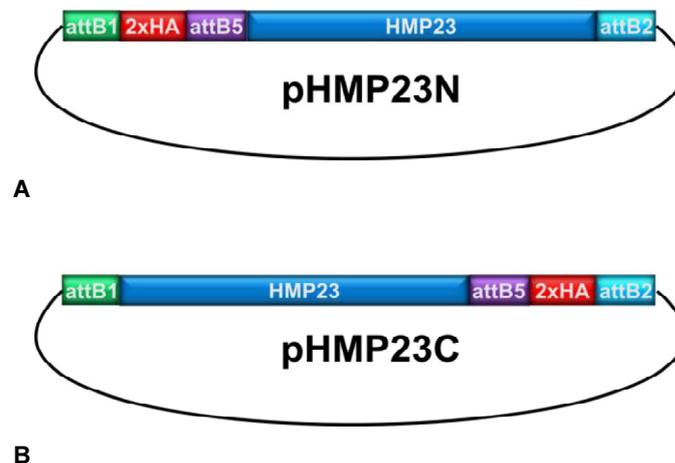


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der Klonierungsstelle in pTagVag2. **A:** amino- (HMP23N) und **B:** carboxyterminal (HMP23C) markiertes HMP23 mit einem Di-Hämagglutinin. Die *att* Stellen stehen für die verwendeten Rekombinationssequenzen (5.10.3).

HMP23 wird im Expressionsvektor pTagVag2 immer mit dem nativen und nicht induzierbaren Promotor von α SCS exprimiert. Die mit dem Vektor pHMP23N transfizierten exponentiell wachsenden *T. vaginalis* Zellen wurden fraktioniert, um das homolog

überexprimierte HMP23N zu lokalisieren. Im ersten Schritt (5.8.4) wurden die Fraktionen Gesamtzellextrakt (GZ), Cytosol (Cyt) und die Hydrogenosomen (Hyd) isoliert. Im zweiten Schritt wurden die Hydrogenosomen zweimal mit Natriumcarbonat behandelt (5.11.7), um die Membranen mit den integralen Proteinen (MP) von den löslichen Proteinen zu trennen. Hierbei wurden zwei Membran-Protein Fraktionen (MP1+2) und zwei Fraktionen mit löslichen Proteinen (LP1+2) gewonnen.

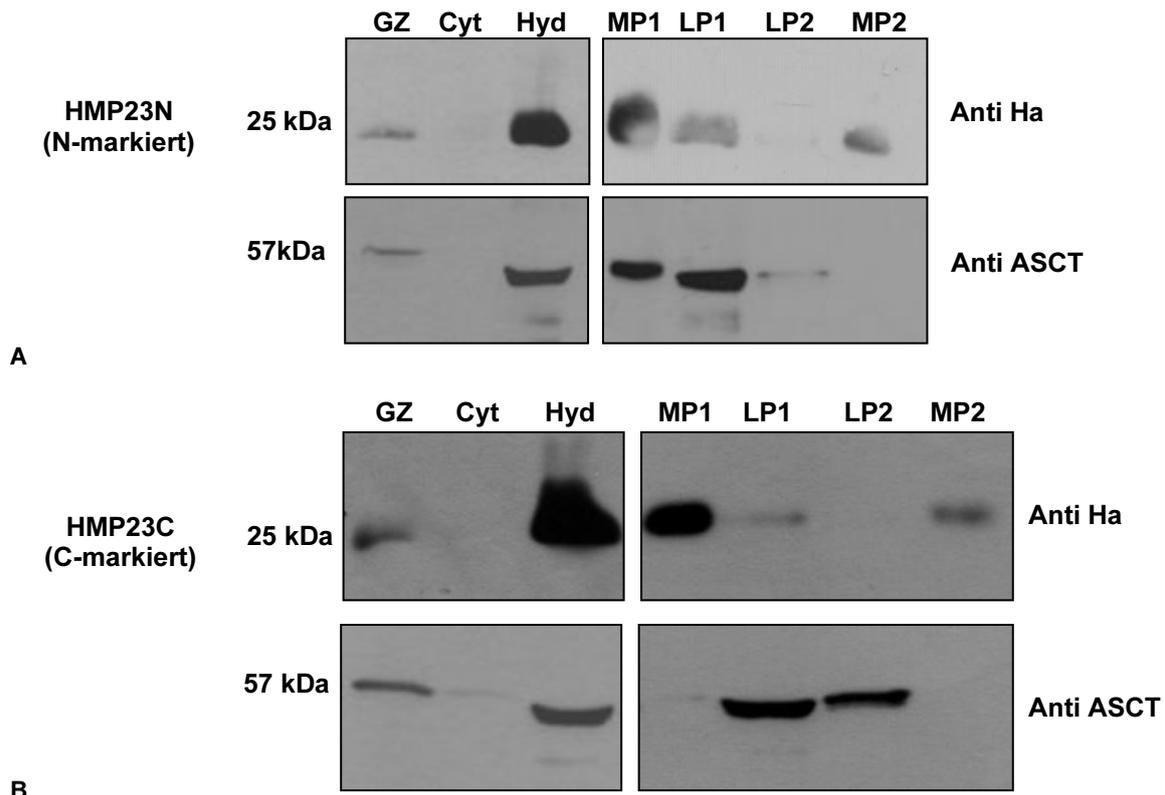


Abb. 3.7A: Subzelluläre Lokalisation von **A:** HMP23N (25 kDa) und **B:** HMP23C (25 kDa). In beiden Versuchen wurden **links** 100 µg der Fraktionen aus der subzellulären Fraktionierung und **rechts** ein Zehntel der vier Fraktionen aus der Na₂CO₃ Behandlung untersucht. Als Kontrolle für die hydrogenosomale Matrix wurde ASCT (57 kDa) detektiert. Bei der Detektion des Hämagglutinin Anhangs wurden sowohl bei den Proben mit dem HMP23N als auch mit dem HMP23C Signale in den Fraktionen Gesamtzellextrakt, Hydrogenosomen, MP1+2 und LP1 detektiert. Mit dem Antikörper gegen ASCT wurden deutliche Signale im Gesamtzellextrakt, den Hydrogenosomen und in den Fraktionen MP1 und LP1+2 detektiert. Nur im Cytosol und in der Fraktion MP1 der Zellen HMP23C wurden schwache Signale für ASCT gefunden. **GZ:** Gesamtzellextrakt; **Cyt:** Cytosol; **Hyd:** Hydrogenosomen; **MP:** Membran mit integralen Proteinen; **LP:** Lösliche Proteine; **HA:** Hämagglutinin.

Von den Fraktionen der subzellulären Fraktionierung wurden 100 µg Protein, von den vier Fraktionen aus der Na₂CO₃ Behandlung ein Zehntel der Probe in einem 12% SDS-Gel getrennt (5.11.2). Mittels Western-Transfer und anschließender Immunodetektion des an die Proteine gekoppelten HA-Anhangs (5.11.10) wurden Signale, die einer Größe von ca. 25

kDa entsprachen, im Gesamtzellextrakt, den Hydrogenosomen, in den Fraktionen MP1+2 und LP1 detektiert (Abb. 3.7). Die Antikörper wurden anschließend von den Nitrozellulosemembranen schonend entfernt (5.11.10) und das Markerprotein für die Matrix der Hydrogenosomen Acetat:Succinat-CoA Transferase (ASCT) immunodetektiert. Es wurden Signale, die einer Größe von ca. 57 kDa entsprachen, im Gesamtzellextrakt, den Hydrogenosomen, in den Fraktionen MP1 und LP1+2 detektiert (Abb. 3.7). Die Detektion von HMP23 in der Fraktion MP2 ohne Verunreinigung durch die Matrix weist auf die Lokalisation in der Membran hin.

Die Lokalisation von HMP23C wurde mit der gleichen Vorgehensweise durchgeführt. Die identischen Resultate unterstützen die Annahme, dass HMP23 in der Membran lokalisiert ist.

3.2.1 Intrazelluläre Lokalisation

Um die Detektionen der subzellulären Fraktionierung zu bestätigen, wurde der C-terminale HA-Anhang von HMP23 mittels Immunofluoreszenz (5.8.5) nachgewiesen.

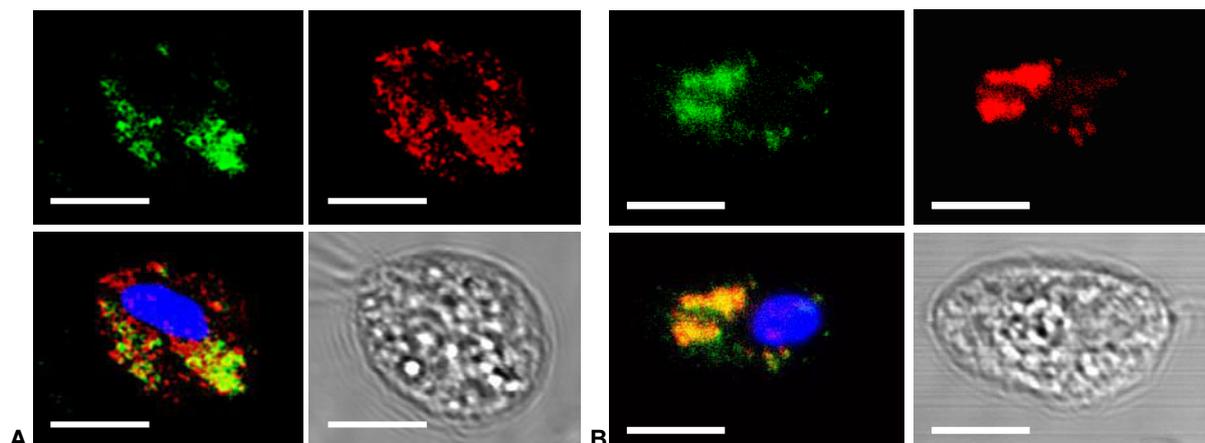


Abb. 3.8: Intrazelluläre Lokalisation von HMP23 mittels Fluoreszenz. In beiden Versuchen (**A**, **B**) wurde der C-terminale HA-Anhang (grün) von HMP23 mit dem Markerprotein α -SCS (rot) in den Hydrogenosomen colokalisiert (gelb). Die DNA im Kern wurde mit DAPI angefärbt (blau). Der Maßstab Balken (weiß) entspricht 5 μ m.

Liegt die Fokussierungsebene genau in der Mitte der Hydrogenosomen, dann wird nur HMP23 in der Membran in Form eines Ringes erkennbar, der im optimalen Fall die Fluoreszenz der α SCS umgibt. Das ist zum Teil in Abbildung 3.8A der Fall. Die Detektion des HA-Anhangs ist an manchen Hydrogenosomen kreisförmig, umgibt aber die α SCS nicht genau. Diese Art von Colokalisation ist nicht bei allen Hydrogenosomen in der Zelle zu beobachten, weil sie nicht genau in der gleichen Ebene verteilt sind. In Abbildung 3.8B sind keine ringförmigen Strukturen erkennbar, HMP23C zeigt dennoch eine deutliche

Colokalisation in den Hydrogenosomen. Die intrazelluläre Lokalisation konnte nicht genau reproduziert werden. Die Zellen waren nach der Fixierung anders verteilt und die durch den Laser angeregte Fluoreszenz verlor schnell an Leuchtkraft. HMP23 (grün) konnte mit dem hydrogenosomalen Matrixprotein α SCS (rot) in zwei unabhängigen Versuchen colokalisiert (gelb; Abb. 3.8) und somit eine Lokalisation in den Hydrogenosomen bestätigt werden.

3.2.1 Lokalisation der HMP23-Termini

Für HMP23 wurden in dieser Arbeit keine β -Faltblätter vorausgesagt (3.1.2), was ein typisches Merkmal für Membranproteine der äußeren Membran von Mitochondrien ist (Fairman *et al.*, 2011). Die in dieser Arbeit vorausgesagten α -helikalen transmembranen Domänen (3.1.2) hingegen können in beiden Membranen vorkommen. Für die Hydrogenosomen ist keine Methode etabliert, um die innere von der äußeren Membran zu trennen.

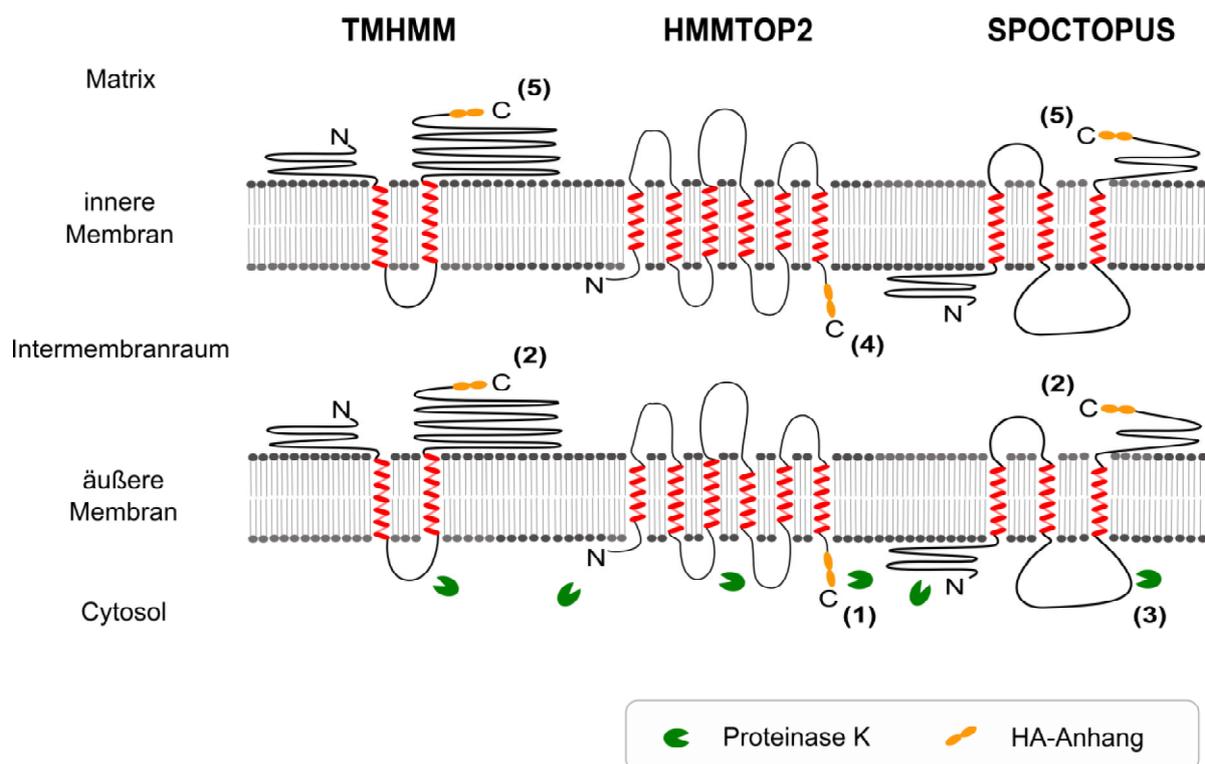


Abb. 3.9: Schematische Darstellung der mögliche Lokalisation der Termini anhand der berechneten α -helikalen transmembranen Domänen und Topologien der Programme TMHMM, HMMTOP2 und SPOCTOPUS (3.1.2), am Beispiel des C-terminal markierten HMP23s.

Durch die Behandlung von isolierten Hydrogenosomen mit Proteinasen K können periphere Proteine, oder die Termini von integralen Proteinen die auf der cytosolischen Seite lokalisiert

sind, abgebaut werden. Die Proteine des Intermembranraums, der inneren Membran und der Matrix sind durch die äußere Membran, die als Barriere wirkt, vor dem sofortigen Abbau geschützt. Durch die Immunodetektion des HA-Anhangs kann indirekt festgestellt werden, ob das markierte HMP23 in der inneren oder äußeren Membran lokalisiert ist. Bei einer Lokalisation in der äußeren Membran kann zusätzlich die Richtung der Termini bestimmt werden. Ist der markierte Terminus auf der cytosolischen Seite (1), wird der HA-Anhang abgebaut und eine Detektion nur in der Kontrolle ohne Proteinase K erwartet. Sollte der HA-Anhang im Intermembranraum liegen (2), kann dieser zwar detektiert werden, das Signal wird aber wahrscheinlich kleiner sein, falls eine Schleife in den cytosolischen Raum (3) ragt und abgebaut wird. Es kann nur das Fragment des Proteins detektiert werden, das mit dem HA-Anhang verbunden ist. Bei einer Lokalisation von HMP23 in der inneren Membran kann die Topologie der Termini nicht bestimmt werden, unabhängig davon ob der HA-Anhang in den Intermembranraum (4) oder in die Matrix (5) ragt, weil die äußere Membran eine Barriere für die Proteinase K darstellt (Abb. 3.8).

Die isolierten Hydrogenosomen (200 µg) wurden mit 50 und 100 µg Proteinase K (5.11.6) behandelt. Durch die Negativkontrolle ohne Proteinase K wurde gezeigt, dass die Solubilisierung der Membran durch die Inkubation mit 1% (v/v) Triton X-100 nicht zum Abbau von HMP23 führt. Durch die Kontrolle mit Proteinase K und 1% (v/v) Triton X-100 wurde die Funktionalität der Proteinase K bewiesen. Die Ansätze wurden mit TCS gefällt (5.11.8), in einem 12% SDS-Gel getrennt und mittels Western-Transfer mit anschließender Immunodetektion des HA-Anhangs detektiert (Abb. 3.9).

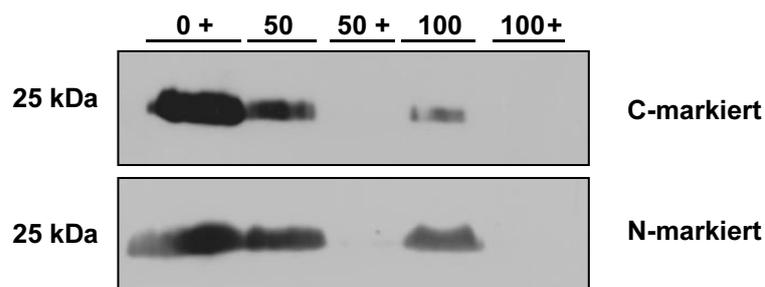


Abb. 3.10: Immunodetektion des HA-Anhangs an den Termini des in *T. vaginalis* homolog überexprimierten HMP23 in den mit Proteinase K behandelten Hydrogenosomen. In der Negativkontrolle ohne Proteinase K wurden die Hydrogenosomen nur mit Triton X-100 inkubiert (0 +). Die Hydrogenosomen wurden mit 50 und 100 µg Proteinase K behandelt. Die Kontrollen enthielten zusätzlich 1% (v/v) Triton X-100 (+). Die detektierten Signale mit dem Anti-HA Antikörper wurden mit ansteigender Proteinase K Konzentration schwächer. In den Kontrollen wurde kein Signal detektiert.

Sowohl für HMP23N als auch für HMP23C wurde die Stärke der Signale mit zunehmender Proteinase K Konzentration in den Ansätzen im Vergleich zur Kontrolle (0 +)

schwächer. In den Kontrollen mit 50 und 100 µg Proteinase K wurden keine Signale detektiert. Die Ergebnisse der Behandlung der Hydrogenosomen mit der Proteinase K weisen auf eine Lokalisation von HMP23 in der inneren Membran hin.

3.3 Lokalisation des heterolog überexprimierten HMP23 in *S. cerevisiae*

In einer Studie von Dyall *et al.* (2000) wurde das Protein HMP31 in *S. cerevisiae* heterolog überexprimiert und in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Das Ergebnis wurde zusammen mit phylogenetischen Untersuchungen als Konservierung der Protein Importmaschinerie in den Membranen der Hydrogenosomen und Mitochondrien und damit als Hinweis für einen gemeinsamen Vorfahren gedeutet.

Die in dieser Arbeit durchgeführte phylogenetische Untersuchung von HMP23 lieferte keine eindeutigen Ergebnisse. Die mittels BLAST-Suche in anderen Organismen gefundenen Proteine mit Ähnlichkeiten zu HMP23 oder seinen Homologen in *T. vaginalis* waren in der Regel Proteine, die an verschiedenen Transportsystemen beteiligt sind. Das erste nicht hypothetische Protein mit Ähnlichkeiten zu HMP23 hat zwei MCF Domänen, die ein typisches Merkmal für die Transporter der inneren mitochondrialen Membran sind. Um diese *in silico* Hinweise auf die Funktion von HMP23 zu unterstützen, wurde HMP23 heterolog in *S. cerevisiae* überexprimiert und lokalisiert.

HMP23 wurde aus der genomischen DNA von *T. vaginalis* amplifiziert und mit Hilfe der in den Oligonukleotiden H23_F_Sall und H23_R_Sall_st (Tabelle 5.1) eingebetteten Restriktionsstellen in den Expressionsvektor pGreg536 kloniert. Mit der Sequenzierung der Klonierungsstelle von pGreg536-HMP23 wurde die Korrektheit der DNA-Sequenz festgestellt. *S. cerevisiae* INVSc1 wurde mit pGreg536 ohne das zu untersuchende Gen (pGreg536-leer) als Kontrolle und mit pGreg536-HMP23 transfiziert (5.9.1; im folgenden Hefe-HMP23). Die heterologe Expression wurde durch die Anwesenheit von Galaktose im Medium in der exponentiellen Wachstumsphase induziert (5.9.2) und die Hefe-HMP23 Zellen einer subzellulären Fraktionierung unterzogen (5.9.3). Nach der Entfernung von nicht aufgeschlossenen Zellen wurden aus dem Gesamtzelllysat die Mitochondrien (Mit) von dem post-mitochondrialen Überstand (PMÜ), der die restlichen Zellbestandteile enthielt, getrennt.

Jeweils 50 µg beider Fraktionen wurden in einem SDS-Gel getrennt und das mit einem hepta HA-Anhang markierte HMP23 mittels Western-Transfer mit anschließender Immunodetektion bei ca. 33 kDa detektiert (Abb. 3.11A). Es wurde nur ein Signal in den Mitochondrien der Hefe-HMP23 Zellen detektiert. Die Mitochondrien aus den Hefe-HMP23 Zellen wurden mit Na₂CO₃ (5.11.7) behandelt, um die Membranen mit den integralen Proteinen (MP) von den löslichen Proteinen (LP) zu trennen. Außerdem wurden die Mitochondrien mit 100 µg Proteinase K bei 0 und 25°C behandelt (5.11.6). Die Proben

wurden mit TCS gefällt, in einem 12% SDS-Gel getrennt und der HA-Anhang mittels Western-Transfer mit anschließender Immunodetektion detektiert (Abb. 3.11B). Es wurde ein starkes Signal in der Membranfraktion und ein im Vergleich dazu schwaches Signal in der Fraktion mit den löslichen Proteinen detektiert. Die Proteinase K Behandlung bei 0°C war zu kurz, weil in der Kontrolle ein Signal detektiert wurde.

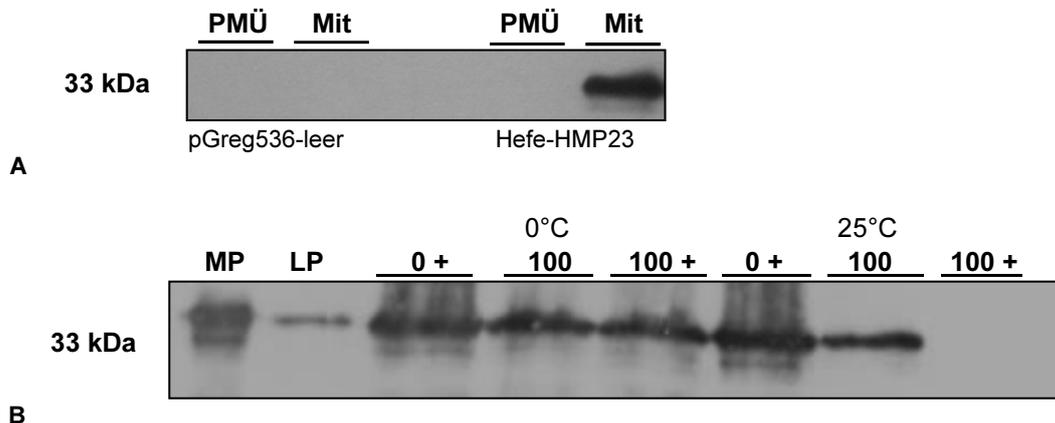


Abb. 3.11: Immunodetektion des HA-Anhangs des N-terminal markierten und heterolog in *S. cerevisiae* überexprimierten Proteins HMP23. **A:** In den mit der Kontrolle pGreg536-leer gewonnenen Fraktionen **PMÜ** (post-mitochondrialer Überstand) und Mitochondrien (**Mit**) wurden keine Signale detektiert. In den gleichen Fraktionen aus dem transfizierten Stamm Hefe-HMP23 wurde ein Signal bei ca. 33 kDa detektiert. **B:** Es wurde ein Signal in der mitochondrialen Membranfraktion (**MP**) und der Fraktion mit den löslichen Proteinen (**LP**) der Hefe-HMP23 detektiert. Bei der Behandlung der Mitochondrien (200 µg) mit Proteinase K bei 0°C und 25°C wurde nur in der Probe bei 25°C mit 100 µg/ml Proteinase K und 1% (v/v) Triton X-100 (+) kein Signal detektiert.

Die Ergebnisse der Behandlung bei 25°C zeigen, dass HMP23 vor dem Abbau geschützt war und deuten damit auf eine Lokalisation in der inneren mitochondrialen Membran hin. HMP23 enthält vermutlich ein konserviertes Importsignal in die innere Membran.

3.4 Deletion von Ferredoxin 1 als Positivkontrolle

Eine Gendeletion kann einen Phänotyp verursachen, der mit Hilfe molekularer und biochemischer Untersuchungen Hinweise auf die Funktion des codierten Proteins liefern kann. Eine nicht letale Gendeletion bei *Trichomonas vaginalis* ist im Vorfeld dieser Arbeit nur einmal gelungen (Land *et al.*, 2004). Um sicher zu stellen, dass die Methode im Rahmen dieser Arbeit funktioniert, wurde als Positivkontrolle die Deletion von Ferredoxin 1 (FD1; TVAG_003900) wie von Land *et al.* beschrieben, wiederholt.

Da die identische Reproduktion des Versuches aufgrund nicht korrekt beschriebener Oligonukleotide nicht möglich war, wurde die Sequenz für die FD1-Rekombinationskassette

mit Hilfe der annotierten Genomsequenz von *T. vaginalis* in der Datenbank TrichDB Version 1.2 (Aurrecochea *et al.*, 2009) erneut identifiziert. Die Sequenzen vor (F5) und nach (F3) dem Locus von FD1 wurden aus der genomischen DNA von *T. vaginalis* mit den in der Tabelle 5.2 aufgelisteten Oligonukleotiden amplifiziert (Abb. 3.12A). Die Fragmente F5 (2082 bp) und F3 (828 bp) wurden sequenziert und bei Übereinstimmung mit der Sequenz in der Datenbank sequenziell mit den Restriktionsstellen, die in den für die PCR verwendeten Oligonukleotiden eingebettet waren, vor und nach der NEO-Kassette in den Vektor paSCS-Neo (Delgadillo *et al.*, 1997) ligiert (Abb. 3.12B). Der Vektor wurde anschließend sequenziert und nach dem zu deletierenden Gen benannt (pFD1-NEO).

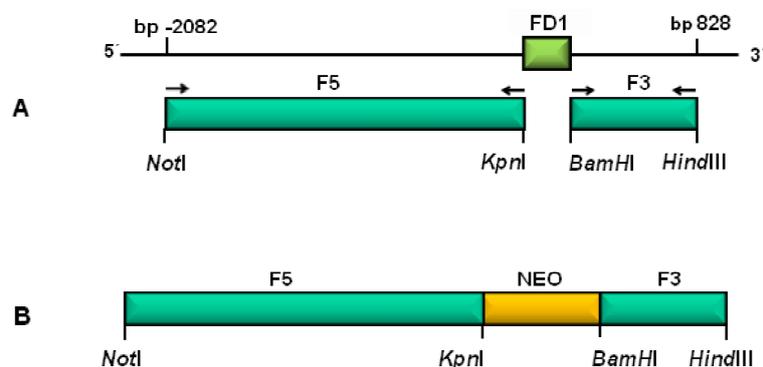


Abb. 3.12 A: Schematische Darstellung der amplifizierten Fragmente aus der gen. DNA von *T. vaginalis* für die Rekombinationskassette, um das Resistenzgen NEO in den Locus von Ferredoxin1 zu rekombinieren. Das F5 Fragment entspricht einer 2082 bp langen Sequenz vor dem FD1 Locus, das mit den Oligonukleotiden F5F_NotI und F5R_KpnI amplifiziert und mit den Restriktionsstellen *NotI* und *KpnI* flankiert wurde. Das F3 Fragment ist identisch mit den 828 bp nach dem FD1 Locus. Es wurde mit den Oligonukleotiden F3F_BamHI und F3R_HindIII amplifiziert und hat die Restriktionsstellen *BamHI* und *HindIII* eingebettet. **B:** Schematische Darstellung der Rekombinationskassette Fd1-NEO.

Um FD1 zu deletieren, wurden in den ersten Versuche, die erfolglos waren, Ansätze mit 100 µg des pFD1-Neo Vektors mit *NotI* und *HindIII* restringiert. Die Ansätze wurden entweder komplett für die Transfektion von *T. vaginalis* verwendet oder in einem 1% Agarose Gel getrennt, extrahiert und 50 µg der Rekombinationskassette für die Transfektion von *T. vaginalis* (5.8.2) verwendet.

Das Resistenzgen NEO wurde durch den nativen Promotor von FD1 transkribiert. Es stellte sich die Frage, ob genug von dem Protein Aminoglycosid 3'-Phosphotransferase (APH-3') produziert wurde, um die Selektionsdroge G418 zu inaktivieren. Mit dem Ziel den Selektionsdruck zu reduzieren, wurde untersucht, ab welcher Konzentration an G418 *T. vaginalis* T1 nicht wächst. Die Zellen waren nur in der Lage mit einer Konzentration von 20 µg/ml G418 zu wachsen. Mit 40, 60, 80 und 100 µg/ml G418 war kein Wachstum

festzustellen. Mit dem reduzierten Selektionsdruck von 80 statt 100 $\mu\text{g/ml}$ G418 wurde *T. vaginalis* mit dem kompletten Restriktionsansatz transfiziert. Bei einem von drei Versuchen erfolgte die homologe Rekombination, die mit der Amplifikation von FD1 und NEO aus der genomischen DNA des Wildtyps und dem neuen Stamm T1 ΔFD1 überprüft wurde. Das Gen für FD1 konnte nur aus der DNA des Wildtyps T1 amplifiziert werden, das für NEO nur aus der DNA von T1 ΔFD1 (Abb. 3.13).

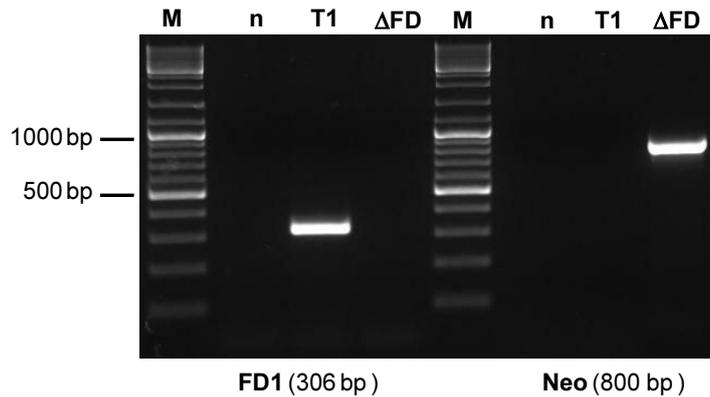
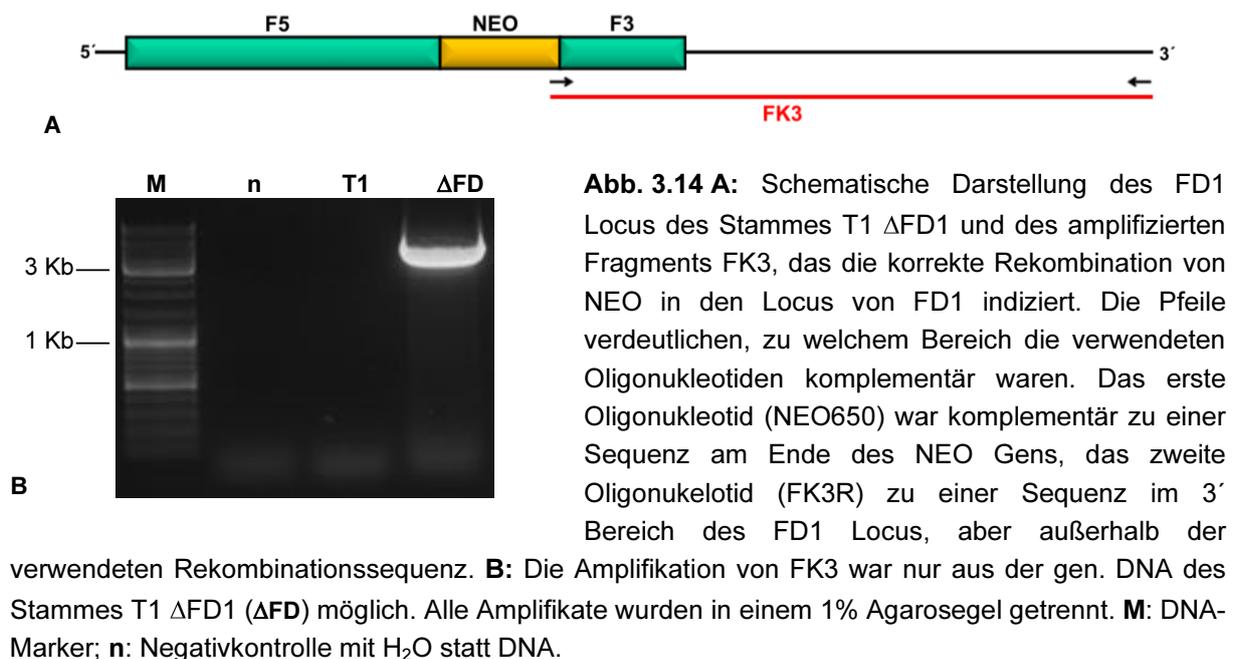


Abb. 3.13: Nachweis der FD1 Deletion und der Rekombination von NEO in das Genom von *T. vaginalis*. **Links:** FD1 (306 bp) konnte nur aus der gen. DNA des WT T1 (T1) amplifiziert werden. **Rechts:** Aus der gen. DNA des Stammes T1 ΔFD1 (ΔFD) konnte nur NEO (800 bp) amplifiziert werden. Alle Amplifikate wurden in einem 1% Agarosegel getrennt. **M:** DNA-Marker; **n:** Negativkontrolle mit H_2O statt DNA.



Um nicht nur die Anwesenheit des NEO-Locus in der Deletionsmutante nachzuweisen, sondern auch um die korrekte Lokalisation zu verifizieren, wurden Oligonukleotide designt, die dies durch eine PCR-Amplifikation ermöglichen. Die Amplifikation des Fragmentes FK3 aus der DNA des Stammes T1 Δ FD1 mit den Oligonukleotiden NEO646 und FK3R indizierte die Rekombination von NEO in den Locus von FD1. Das Fragment FK3 begann mit den letzten 150 bp der NEO-Sequenz, und endete 3848 bp nach dem FD1 Locus (Abb. 3.14A) Die Amplifikation von FK3 war nur aus der genomischen DNA des Stammes T1 Δ FD1 möglich (Abb. 14B). Unter Verwendung des nativen Promotors in *T. vaginalis* ist die erfolgreiche Deletion eines Genes von der Stärke des Promotors abhängig. Dem kann mit der Senkung des Selektionsdrucks auf bis zu 40 μ g/ml G418 entgegen gewirkt werden.

3.5 Die Deletion von HMP23

Mit Hilfe des annotierten Genoms von *T. vaginalis* wurden für die Deletion von HMP23 mittels homologe Rekombination die Sequenzen für die Rekombinationskassette vor (H5) und nach (H3) dem Locus von HMP23 identifiziert und aus der genomischen DNA von *T. vaginalis* mit den in Tabelle 5.4 aufgelisteten Oligonukleotiden amplifiziert (Abb. 5.15A). Die Fragmente H5 (1182 bp) und H3 (974 bp) wurden sequenziert, die Richtigkeit festgestellt und sequenziell mit den Restriktionsstellen, die in den für die PCR verwendeten Oligonukleotiden eingebetteten waren, vor und nach der NEO-Kassette in den Vektor p α SCS-Neo kloniert. Der Vektor wurde pHMP23-NEO benannt und die Klonierungsstelle (Abb. 3.15B) sequenziert.

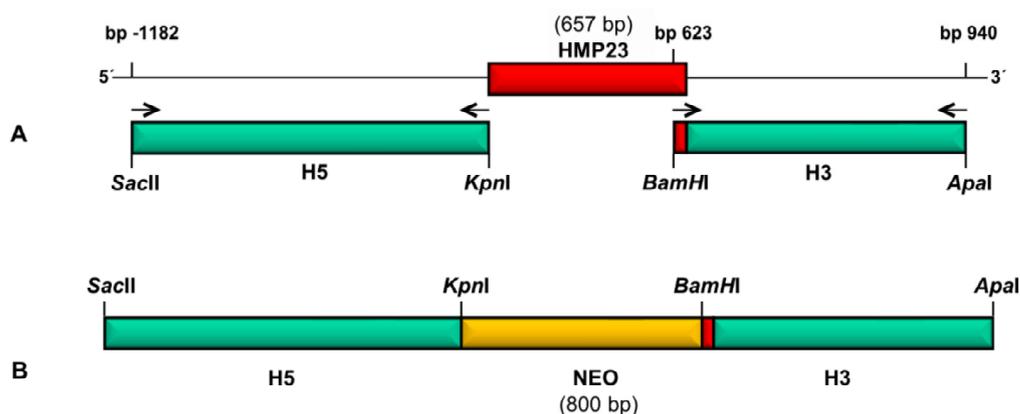


Abb. 3.15 A: Schematische Darstellung der amplifizierten Fragmente für die Rekombinationskassette. Das H5 Fragment entspricht der 1182 bp langen Sequenz vor dem HMP23 Locus und hat die Restriktionsstelle *SacII* und *KpnI* eingebettet. Das H3 Fragment beinhaltet die letzten 34 bp von HMP23 und endet 940 bp nach dem HMP23 Locus. Das Fragment ist von den Restriktionsstellen *BamHI* und *Apal* flankiert. **B:** Schematische Darstellung der HMP23 Rekombinationskassette.

Von dem Vektor pHMP23-Neo wurden 100 µg mit *Sac*II und *Apa*I restringiert, *T. vaginalis* T1 mit dem Ansatz transfiziert (5.8.2) und vier Stunden später mit 80 µg/ml G418 selektioniert. Die homologe Rekombination wurde durch die Amplifikation von HMP23 und NEO aus der genomischen DNA des Wildtyps T1 und des entstandenen Stammes T1 Δ HMP23 überprüft. HMP23 konnte nur aus der DNA des Wildtyps amplifiziert werden. Das Resistenzgen NEO wurde nur aus der genomischen DNA des Stammes T1 Δ HMP23 amplifiziert (Abb. 3.16).

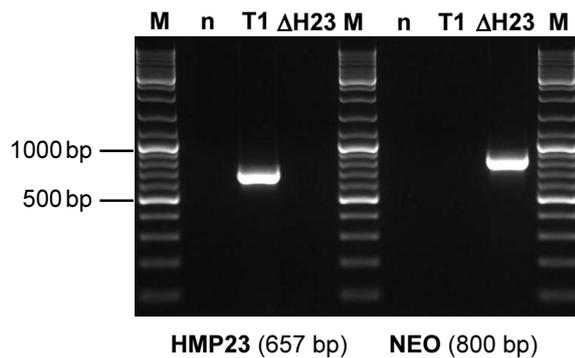


Abb. 3.16: Bestätigung der Deletion von HMP23 und der Rekombination von NEO in das Genom von *T. vaginalis*. HMP23 (**links**, 657 bp) konnte nur aus der gen. DNA des WT (**T1**), das NEO Gen (**rechts**, 800 bp) nur aus der gen. DNA des Stammes T1 Δ HMP23 (**Δ H23**) amplifiziert werden. Alle Amplifikate wurden in einem 1% Agarosegel getrennt. **M**: DNA-Marker; **n**: Negativkontrolle mit H₂O statt DNA.

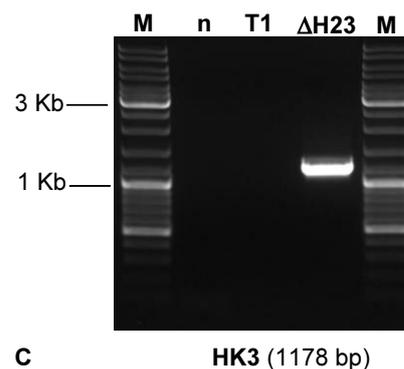
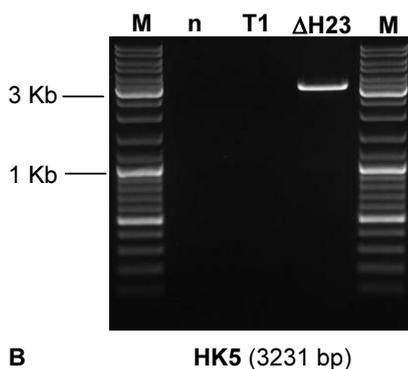
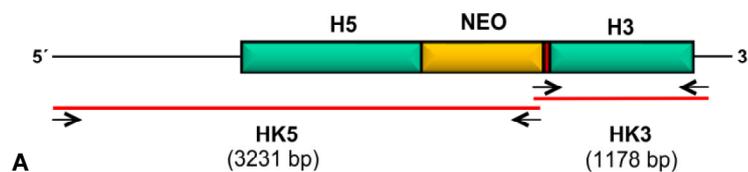


Abb. 3.17: Amplifikation von HK5 und HK3, die eine Rekombination von NEO in den HMP23 Locus indizieren. **A**: Schematische Darstellung des HMP23 Locus des Stammes T1 Δ HMP23. Die Pfeile verdeutlichen, zu welchem Bereich die verwendeten Oligonukleotide komplementär waren. Die Amplifikation von HK5 (**B**; 3231 bp) mit den Oligonukleotiden HK5F und NEO_REV und von HK3 (**C**: 1178 bp) mit den Oligonukleotiden NEO646 und HK3R war nur aus der gen. DNA des Stammes T1 Δ HMP23 (**Δ H23**) möglich. Alle Amplifikate wurden in einem 1% Agarosegel getrennt. **M**: DNA-Marker; **n**: Negativkontrolle mit H₂O statt DNA.

Zur Kontrolle wurden zwei Fragmente (HK5 und HK3, Abb. 4.17A) aus der genomischen DNA des Stammes T1 Δ HMP23 amplifiziert, die eine korrekte Rekombination des Resistenzgens in den Locus von HMP23 indizieren. HK5 (3241 bp) wurde mit den Oligonukleotiden HK5F und NEO_REV amplifiziert (3.17B). Die Sequenz startet 1239 bp vor dem 5' Bereich des HMP23 Locus, der für die Rekombination benutzt wurde und endet mit der NEO-Sequenz. HK3 (1178 bp) beginnt mit den letzten 150 bp der Neosequenz, und endet 60 bp nach dem 3' Bereich des HMP23 Locus, der für die Rekombination verwendet wurde. Die Amplifikation von HK3 erfolgte mit den Oligonukleotiden NEO646 und HK3R (Abb. 4.17C). Beide Fragmente, die nur aus der genomischen DNA des Stammes T1 Δ HMP23 amplifiziert werden konnten, wurden sequenziert und somit der Austausch von HMP23 durch NEO bestätigt. Die Deletion des hochexprimierten HMP23 im ersten Versuch bestätigt die Effektivität der Bedingungen, unter denen auch Ferredoxin deletiert wurde.

3.6 Wachstumsunterschiede zwischen Wildtyp und dem Stamm T1 Δ HMP23

Die möglichen Auswirkungen des Verlustes von HMP23 auf das Wachstum wurden durch eine Wachstumskurve (5.8.7) für den Wildtyp T1 und den Stamm T1 Δ HMP23 untersucht (Abb. 3.18).

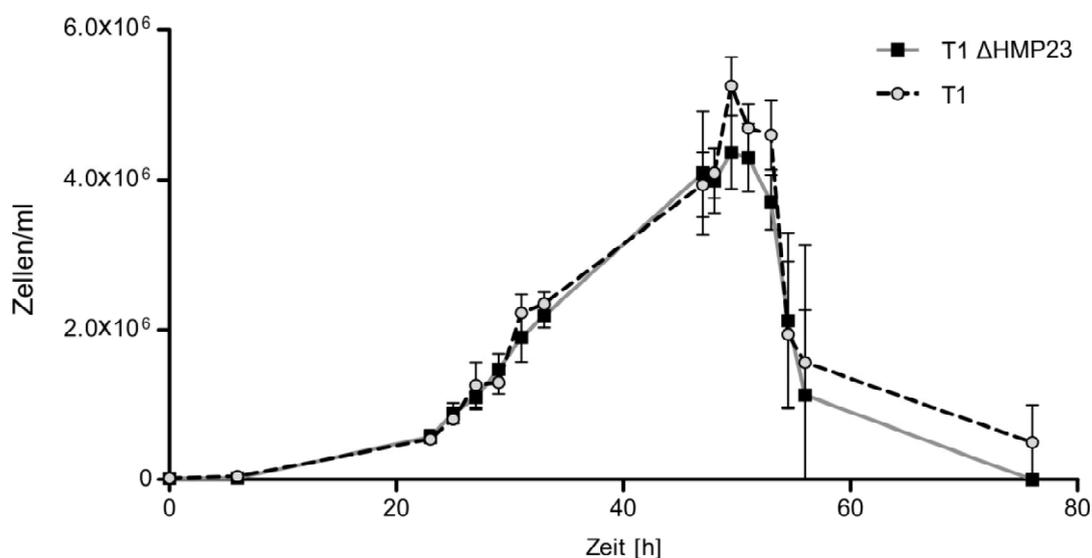


Abb. 3.18: Wachstumskurven des WT T1 und des Stammes T1 Δ HMP23.

Beide Kulturen erreichten die exponentielle Phase nach 23 Stunden und zeigten einen identischen Verlauf bis zur stationären Phase, die nach 49,5 Stunden erreicht wurde. Nach 49,5 Stunden wurde sowohl für den Wildtyp ($\bar{x} = 5,2 \times 10^6$ Zellen/ml, $\sigma = 0,7$) als auch für den

Stamm T1 Δ Hmp23 ($\bar{x} = 4,4 \times 10^6$ Zellen/ml, $\sigma = 0,8$) die höchste Anzahl an Zellen gezählt. Nach 53 Stunden begann die Absterbephase und nach 72 Stunden konnten bis auf eine Ausnahme keine Zellen mehr beobachtet werden (Anhang 2).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Deletion von HMP23 unter den gegebenen Kulturbedingungen das Wachstum von *T. vaginalis* nicht beeinflusst. Es bedarf weitere Analysen, um zu untersuchen, ob die Deletion von anderen Proteinen kompensiert wird.

3.7 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die phänotypischen Auswirkungen der Deletion von HMP23 wurden durch die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) visualisiert (Abb. 3.19).

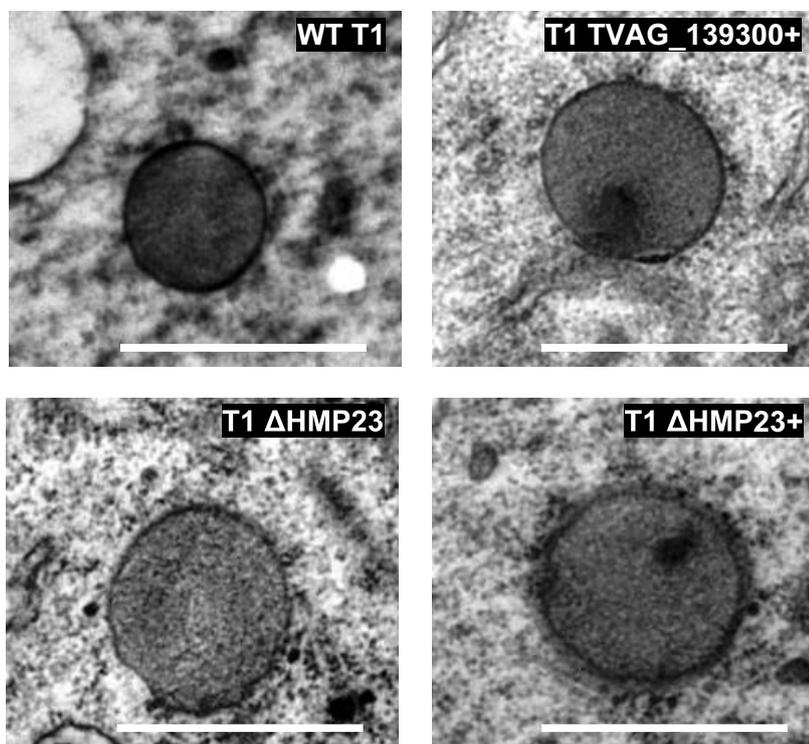


Abb. 3.19: Elektromikroskopische Aufnahmen der Hydrogenosomen der verschiedenen Präparate. Die Größe entspricht dem ermittelten Median. Der weiße Maßstabbalken entspricht 1 μ m. (+) mit G418.

Neben dem Wildtyp T1, wurden von dem Stamm T1 Δ HMP23 Zellen in An- und Abwesenheit der Selektionsdroge G418 präpariert (5.8.6). Zusätzlich wurden die mit dem pTagVag2-TVAG_139300 transfizierten und mit G418 kultivierten *T. vaginalis* Zellen (im folgenden T1 TVAG_139300) präpariert. TVAG_139300 (Phosphoenolpyruvat Carboxykinase) wurde im Cytosol lokalisiert und diente als Kontrolle, um mögliche Auswirkungen von G418 auf die Hydrogenosomen zu überprüfen (Burstein *et al.*, 2012). Es wurde kein hydrogenosomales

Protein als Kontrolle verwendet, um auszuschließen, dass der Import eines überexprimierten Proteins eine mögliche Veränderung der Hydrogenosomen im Vergleich zum Wildtyp verursacht. Um die verschiedenen Proben zu vergleichen, wurden die Zell- und Hydrogenosomenflächen berechnet.

Tabelle 3.5: Übersicht der quantitativen Analyse der Fläche der *T. vaginalis* Zellen.

	Zellengröße [μm^2]					n	\bar{x}	σ	σ_n
	Min.	25% Perzentile	\tilde{x}	75% Perzentile	Max.				
T1	33,0	42,2	85,1	93,6	95,3	5	71,3	27,6	12,4
T1 Δ HMP23	82,0	82,7	84,8	98,8	108,6	5	89,3	11,0	4,9
TVAG_139300+	60,2	66,7	89,0	93,1	93,7	4	82,9	15,5	7,7
T1 Δ HMP23+	63,7	70,4	85,3	98,2	99,6	9	86,6	13,6	4,5

\tilde{x} : Median; n: Anzahl; \bar{x} : Mittelwert; σ : Standardabweichung; σ_n : Standardfehler.

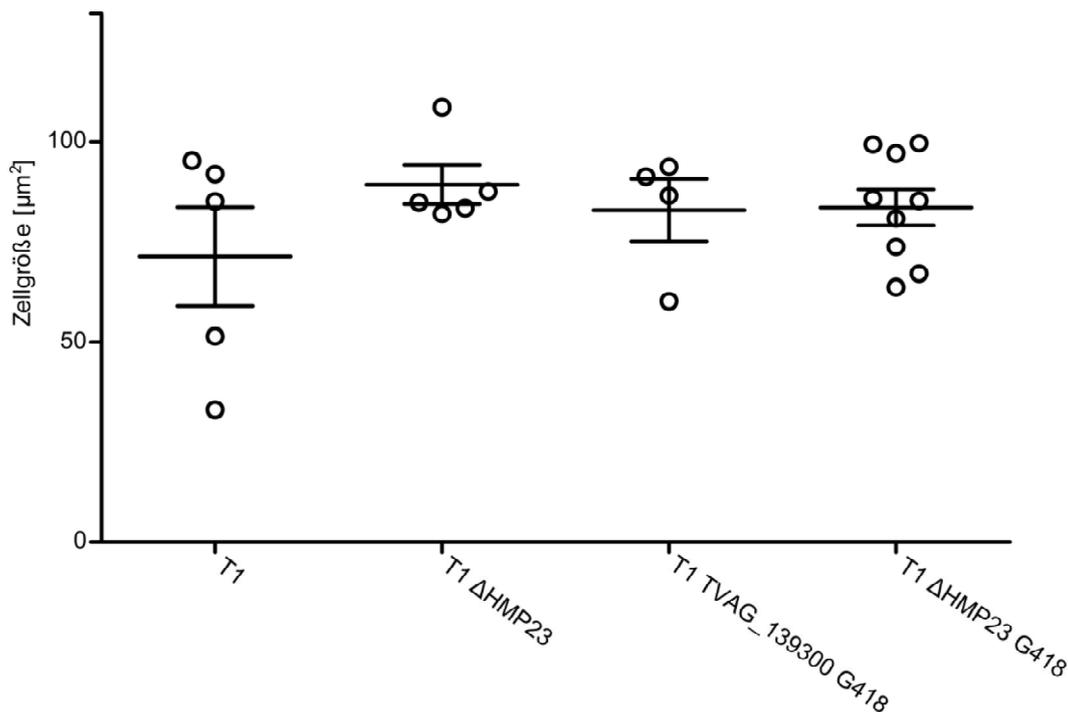


Abb. 3.20: Vergleich der *T. vaginalis* Zellgröße mit einem Streudiagramm. Dargestellt aufgrund der nicht-normalen Verteilung sind die Mediane samt 25-75% Perzentil.

Die Zellgröße war bei allen Präparaten unterschiedlich ($84,8 \mu\text{m}^2$ bis $89,0 \mu\text{m}^2$) (Tabelle 3.5; Abb. 3.20). Um die Hydrogenosomengröße zu ermitteln, wurden 100 Hydrogenosomen aus den verschiedenen Proben ausgewertet (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Übersicht der quantitativen Analyse der Fläche der *T. vaginalis* Hydrogenosomen.

	KS-Test	Hydrogenosomengröße [μm^2]					n	\bar{x}	σ	σ_n
		Min.	25% Perzentile	\tilde{x}	75% Perzentile	Max.				
T1	nein	0,11	0,21	0,29	0,41	0,65	100	0,31	0,13	0,01
T1 Δ HMP23	nein	0,18	0,29	0,50	0,72	1,49	100	0,54	0,26	0,03
TVAG_139300+	ja	0,16	0,31	0,42	0,51	0,84	100	0,43	0,15	0,01
T1 Δ HMP23+	nein	0,17	0,43	0,60	1,01	1,91	100	0,71	0,38	0,04

KS-Test: Kolmogorow-Smirnow-Test; \tilde{x} : Median; **n**: Anzahl; \bar{x} : Mittelwert; σ : Standardabweichung; σ_n : Standardfehler.

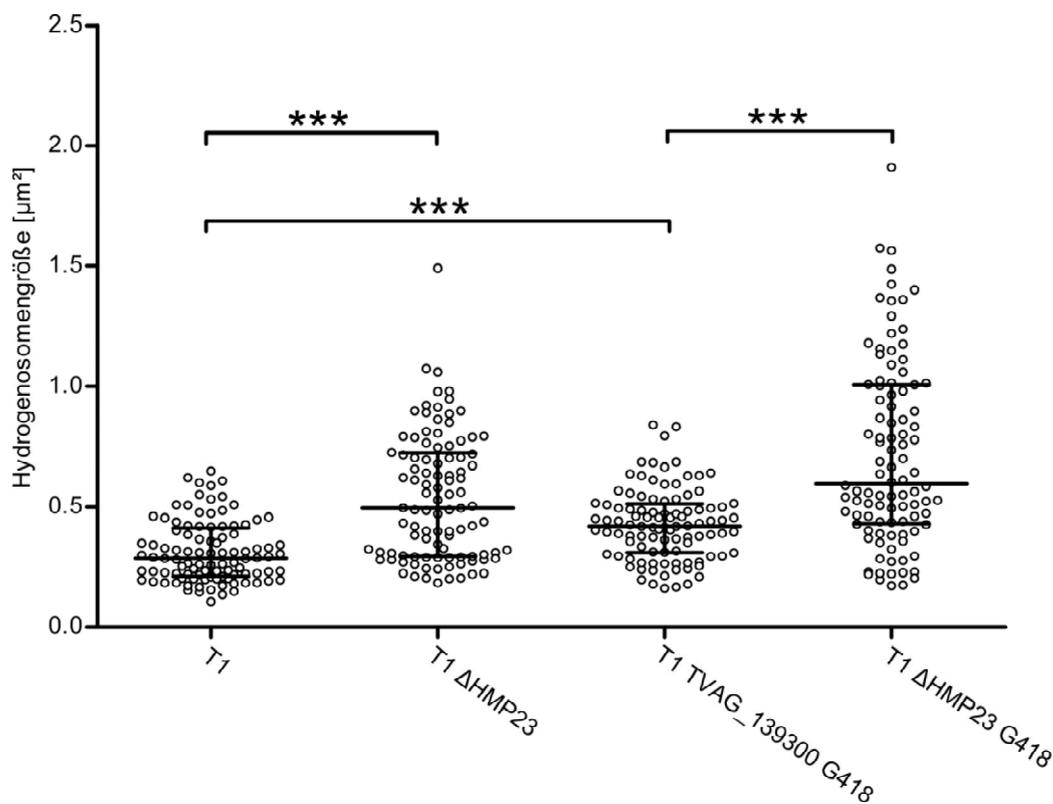


Abb. 3.21: Vergleich der Hydrogenosomenfläche mit einem Streudiagramm. Die Fläche der vier untersuchten Präparate steigt abhängig von der Deletion von HMP23 und der Kultivierung mit G418 (Tabelle 3.5). Der Unterschied zwischen T1 und T1 Δ HMP23, T1 TVAG_139300 G418 und T1 Δ HMP23 G418 und zwischen T1 und T1 TVAG_139300 G418 ist durch den Kruskal-Wallis Test (***) als signifikant eingestuft worden.

Die Verteilung der ermittelten Hydrogenosomengrößen wurde mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests als nicht normal eingestuft und deshalb die Größen der Hydrogenosomen mit Hilfe der Mediane verglichen. Die Hydrogenosomen des Stammes T1 Δ HMP23 ($\tilde{x} = 0,50 \mu\text{m}^2$) waren 72% größer als die des Wildtyps T1 ($\tilde{x} = 0,29 \mu\text{m}^2$). Die Hydrogenosomen des Stammes T1 Δ HMP23 mit G418 ($\tilde{x} = 0,60 \mu\text{m}^2$) hingegen waren nur

42% größer als die der T1 TVAG_139300 Zellen mit G418 ($\bar{x} = 0,42 \mu\text{m}^2$). Neben der Deletion von HMP23 verursacht auch G418 eine Zunahme der Größe, denn die Hydrogenosomen der T1 TVAG_139300 Zellen mit G418 sind 45% größer als die des Wildtyps T1. Für die drei Größenunterschiede wurde die Signifikanz durch den Kruskal-Wallis Test ($P < 0,0001$) mit dem Programm GraphPad Prism 5 (La Jolla) bestätigt. Die Hydrogenosomen des Stammes T1 Δ HMP23 wurden durch die Behandlung mit G418 20% größer, aber weniger signifikant ($P < 0,01$). Mit dem Streudiagramm (Abb. 3.21) wurde die Verteilung aller berechneten Hydrogenosomenflächen visualisiert. Die Streuung innerhalb des Wildtyps T1 ($0,11\text{--}0,65 \mu\text{m}^2$) und bei T1 TVAG_139300 mit G418 ($0,16\text{--}0,84 \mu\text{m}^2$) ist kleiner als bei T1 Δ HMP23 ohne ($0,18\text{--}1,49 \mu\text{m}^2$) und mit G418 ($0,17\text{--}1,91 \mu\text{m}^2$).

Bei den TEM Untersuchungen unterscheiden sich die Zellen des Wildtyps nicht von den Zellen der Mutante. Die Streuung der Hydrogenosomengröße verdeutlicht, dass die Deletion von HMP23 zu einer Vergrößerung der Fläche führt. Die Gegebenheit, dass es keine Wachstumsunterschiede zwischen dem Wildtyp und dem Stamm T1 Δ HMP23 gibt und die Hydrogenosomen durch die Deletion von HMP23 zum Teil größer sind, führt zur Frage, ob die Mutation durch die Flächenvergrößerung und andere Proteine kompensiert wird.

3.8 Proteomunterschiede zwischen Wildtyp und dem Stamm T1 Δ HMP23

Die Deletion von HMP23 führte zu keinen deutlichen Änderungen des Phänotyps und keinen Änderungen des Wachstumsverhaltens im Vergleich zum Wildtyp. Der Vergleich des Hydrogenosomen-Proteoms des Wildtyps mit dem des Stammes T1 Δ HMP23 sollte Hinweise auf eine veränderte Expression von Proteinen liefern.

Im ersten Versuch wurden Membranproteine der Hydrogenosomen mit Triton X-114 solubilisiert (5.11.8), in einem 12% SDS-Gel getrennt und mit Coomassie gefärbt (5.11.4). Erwartungsgemäß fehlt die Bande für HMP23 im T1 Δ HMP23 Stamm. Im Bereich zwischen 35 und 55 kDa sind bei dem Stamm T1 Δ HMP23 intensivere Banden zu sehen. Die oberste Banden sehen gleich intensiv aus. Die zweite Bande von oben im Stamm T1 Δ HMP23 ist stärker als im Wildtyp T1 (Abb. 3.22).

Die Trennung der Membranproteine nur nach dem Molekulargewicht gibt nur einen ersten Überblick, weil es viele Proteine gibt, die gleich schwer sind. Um die Unterschiede zwischen beide Stämme zu verdeutlichen, wurden das hydrogenosomale Proteom beider Stämme zuerst nach den isoelektrischen Punkt (pI), und anschließend nach dem Molekulargewicht getrennt (5.11.3).

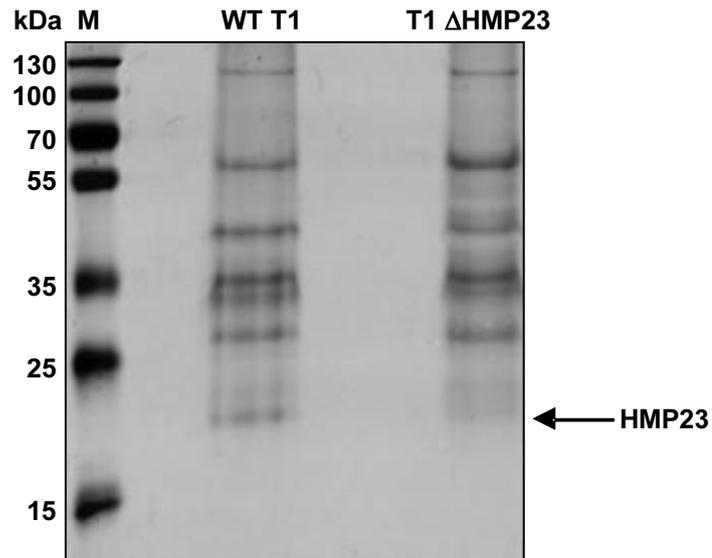


Abb. 3.22: Vergleich der mit Triton X-114 extrahierten Membranproteine aus den Hydrogenosomen des WT T1 und des Stammes T1 Δ HMP23.

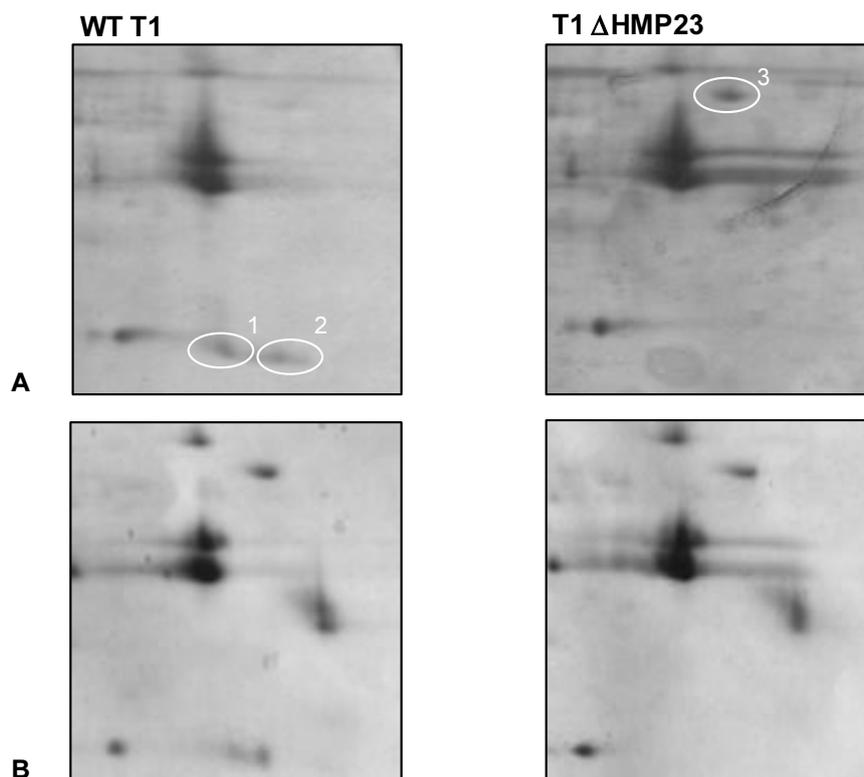


Abb. 3.23: Ausschnitt aus dem 2D-SDS-Gel pH 6-11. **A:** Die Spots von HMP23 (1+2) waren nur im WT zu sehen. In T1 Δ HMP23 war der HMP31.2 Spot (3) intensiver als im WT. **B:** Bei der Reproduktion der Ergebnisse war für den HMP32.2 Spot keine Unterschied sichtbar.

Im ersten Versuch waren drei Unterschiede deutlich erkennbar. Die mit 1 und 2 in der Abb. 4.23A gekennzeichneten Spots waren nur beim Wildtyp ersichtlich und der dritte markierte Spot war bei T1 Δ HMP23 stärker erkennbar. Bei der Reproduktion des Versuches war der dritte Spot in beiden Stämmen gleich intensiv (Abb. 3.23B). Durch massenspektrometrische Sequenzierung wurden die Spots 1 und 2 als HMP23 und der dritte als das 44,6 kDa schwere HMP31.2 (TVAG_051820) identifiziert (Abb. 3.24).

```

Spot 1+2: (TVAG 455090) HMP23
MGCFCKEMTKTFIGATLGGMTAIIAERGVKGAQGSANLADIALSGMHVGVNFIAYPVALQ
VLSDAFPKFKKNKEDPNGNKAIVYVAGGITCALLGLTAKYPIVKVQEFRAKGTTVSPTE
VASRFVDSIGGSIGFAATMGTVAPHVPACPNLSLGSWARGHLLVHISDLGATLLSFPVARI
RYGASLGGMIQGWAKGRLGGTTIIGDATHHFKDVLAFAIN

Spot 3: (TVAG_051820)
MATEADKVLIAATSPNGALPTWERLTCGFVAGAVARTATSPLDVVKLCLQVSSKGGS AKET
IDRLWKEGGIAAFWRGNTVAIMNQGPQSAIKFFCVDELTRRVAQFTKAPITTPQRAMIGG
AAGLIISQLIAFPFDLIHTRITIDPKGYTGMFQAARIVSEEGVFALWSGIIPITIGAVVY
EGSQYVISGGLKERFIQMYAKGGNLTWPQNLFVAAAAGAIGQTIISFPFDVIRKRMVNPG
DGKKVYKSMSECFAKTWANEGVAGFFRGIGLNMVKIVPYSALQFMINEEAKIAFERFNAY
MAQKDQKLPDLKLAKKKEVSKGALVEKVKDVLPQKEEKDKKDDKKDDKKDDKKDDKKDD
DKKDDKKDKKDDVKEEKKKKDKKDDKKDDKKDDKKDDKKDDKKDDKKDDKKDDKKDDKKDD

```

Abb. 3.24: Darstellung der gefundenen Peptide bei der MS Analyse für HMP23 und HMP31.2. In der ersten Sequenz (HMP23) sind die Peptide fett markiert und mit einem grauen Hintergrund hervorgehoben, die in den Spots 1 und 2 gefunden wurden. Peptide, die nur im zweiten Spot gefunden wurden, sind unterstrichen und fett markiert dargestellt. In der zweiten Sequenz sind die Peptide fett markiert, die in Spot 3 gefunden wurden.

Das Fehlen des Proteins HMP23 wurde durch den Versuch zwar bestätigt, eine erkennbare Erhöhung der Expression von anderen Proteinen im Stamm T1 Δ HMP23 konnte allerdings nicht beobachtet werden.

3.9 Expressionsanalyse der HMP23 Homologen und anderer Transporter

Durch die Proteomanalysen wurden keine Unterschiede gefunden, die auf eine Kompensation der HMP23 Deletion durch verstärkte Expression anderer Proteine hindeuten. Um feine Genexpressionsunterschiede zwischen dem Wildtyp T1 und den Stamm T1 Δ HMP23 festzustellen, wurde die Expression der vier HMP23 Homologen in *T. vaginalis* und der beiden ADP/ATP Transporter HMP31.1 und HMP31.2 mittels qRT-PCR (5.10.2.3) verglichen. Als Kontrolle wurde zusätzlich die Expression des Haushaltgens Aktin (TVAG_249200) verglichen.

Für die qRT-PCR Analysen wurde die aus beiden Stämmen isolierte RNA zuerst mit DNase behandelt und dann daraus cDNA synthetisiert. Zur Kontaminationskontrolle mit

genomischer DNA wurden die Ansätze für die cDNA Synthese auch ohne Reverser Transkriptase identisch prozessiert und als Matrize für die Amplifikation von cAktin mittels PCR eingesetzt. cAktin konnte nicht aus den cDNA Ansätzen ohne Reverser Transkriptase amplifiziert werden, weil die eingesetzte RNA DNA frei war (Abb. 3.25).

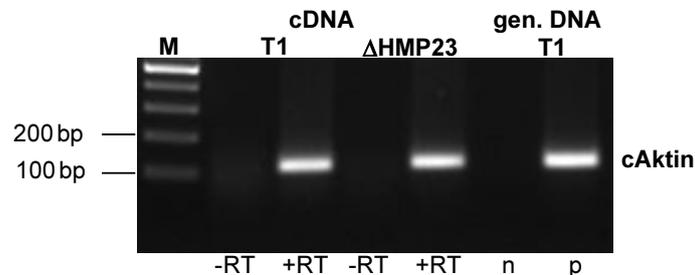


Abb. 3.25: Überprüfung der cDNA auf Rückstände von gen. DNA. Die Amplifikation des Fragmentes cAktin aus den Proben ohne das Enzym Reverse Transkriptase (**RT**) würde eine Kontamination der für die cDNA Synthese eingesetzten RNA mit gen. DNA indizieren. cAktin konnte nur aus den Proben mit RT und aus den Proben mit der gen. DNA des WT amplifiziert werden. Alle Amplifikate wurden in einem 2% Agarosegel getrennt. **M:** DNA-Marker; **n:** Negativkontrolle mit H₂O statt DNA; **p:** Positivkontrolle mit gen. DNA des Wildtyps T1 als Matrize.

Um festzustellen ob Aktin, HMP23, die HMP23 Homologe TVAG_485120, TVAG_077910, TVAG_423530 und TVAG_0872280, HMP31.1 und HMP31.2 exprimiert werden, wurde ein 100 bis 200 bp langer Sequenzabschnitt innerhalb des jeweiligen Gens festgelegt und aus der cDNA des Wildtyps und des Stammes T1 Δ HMP23 mittels PCR mit den entsprechenden Oligonukleotiden (Tabelle 5.5) amplifiziert. Um in der Nomenklatur zwischen den Genen und den festgelegten Sequenzabschnitten zu unterscheiden, wurden die Fragmente cHMP23, cAktin, cTVAG_077910, cTVAG_423530, cTVAG_0872280, cHMP31.1 und cHMP31.2 benannt. Die Funktionalität der Oligonukleotide wurde durch die Amplifikation der Sequenzen mittels PCR aus der genomischen DNA des Wildtyps T1 getestet. Das 191 bp lange cHMP23 konnte nur aus der cDNA des Wildtyps amplifiziert werden. Das Fragment cAktin (TVAG_249200), die HMP23 Homologen TVAG_423530 und TVAG_0872280 (Abb. 3.24), sowie HMP31.1 und HMP31.2 wurden in beiden Stämmen exprimiert (Abb. 3.25). Die HMP23 Homologen TVAG_485120 und TVAG_077910 konnten nicht aus der cDNA beider Stämme amplifiziert werden.

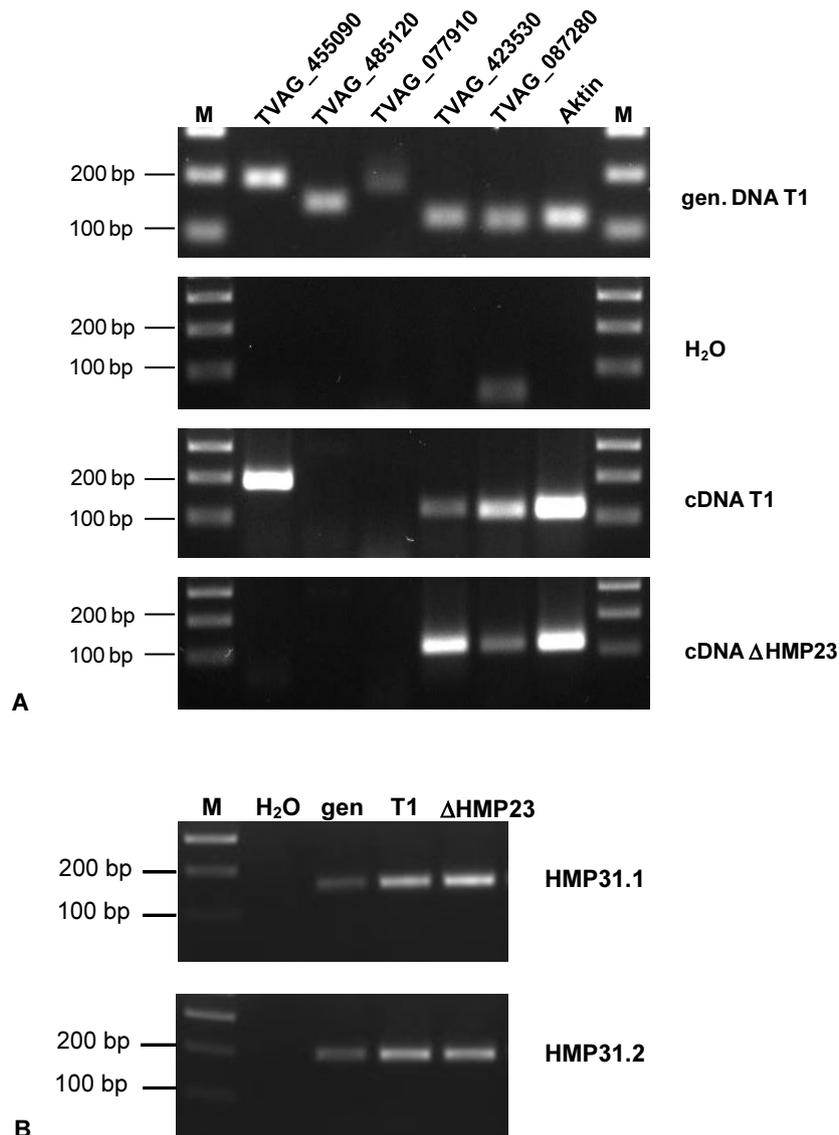


Abb. 3.26: Überprüfung der Funktion der Oligonukleotide mit gen. DNA des WT T1 als Matrize (**gen**) und der Expression der zu untersuchenden Gene im WT T1 und in T1 ΔHMP23 mit cDNA als Matrize. **A:** Amplifikation der Fragmente cTVAG_455090 (191 bp), cTVAG_485120 (147 bp), cTVAG_077910 (179 bp), cTVAG_423530 (119 bp) cTVAG_0872280 (112 bp) und cAktin (118 bp). **B:** Amplifikation von cHMP31 (194 bp) und cHMP31.2 (112 bp). **M:** DNA-Marker; **H₂O:** Negativkontrolle mit H₂O statt DNA; **gen:** Positivkontrolle mit gen. DNA des WT T1 als Matrize.

Für die Gene, die in beiden Stämmen exprimiert werden, wurde eine quantitative Expressionsanalyse mittels qRT-PCR durchgeführt. Die Effizienz (Eff.%) der entsprechenden Oligonukleotide wurde mit Hilfe einer Standardkurve bestimmt. Die Amplifikation der Fragmente, die als Matrize bei der Herstellung der Standardkurve eingesetzt wurden, erfolgte mit den in Tabelle 5.6 aufgelisteten Oligonukleotide. Für die Standardkurve von Aktin wurde eine Verdünnungsreihe der Matrize von 1 bis 1⁻⁰⁵ ng hergestellt. Für die restlichen Gene wurde die Matrize von 1⁻¹ bis 1⁻⁰⁶ ng verdünnt. Die ermittelte Effizienz der

Oligonukleotiden und der Korrelationskoeffizient (R^2) der Standardkurve wurden in der Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Tabelle 3.7: Übersicht der ermittelten Korrelationskoeffizienten (R^2) der Standardkurven, der Effizienz der Oligonukleotide für die qRT-PCR Analyse und der berechneten $\Delta\Delta C_t$ Werte mit der dazu gehörigen Standardabweichung (σ):

	cAktin	cTVAG_423530	cTVAG_0872280	cHMP31.1	cHMP31.2
R^2	0,999	1	0,997	0,999	0,999
Effizienz [%]	97,1	95,5	82,9	92,6	64,8
$\Delta\Delta C_t$	-	1,82	1,54	1,49	1,49
σ	-	0,23	0,17	0,17	0,04

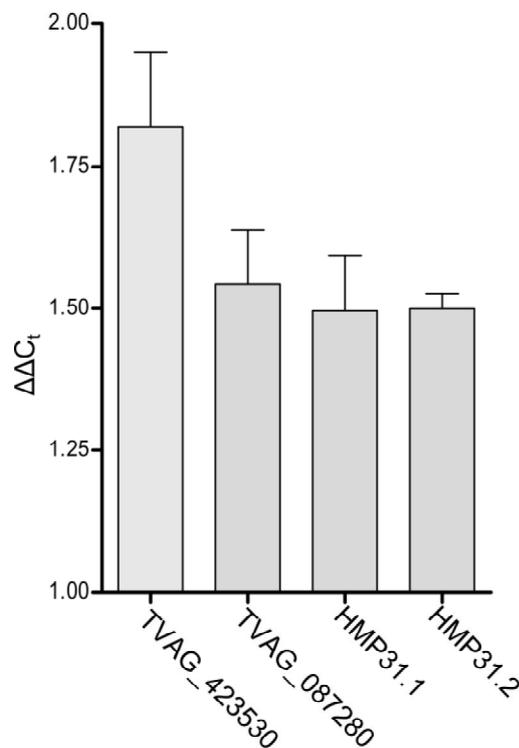


Abb. 3.27: Relative Expressionsanalyse im Stamm T1 Δ HMP23 im Vergleich zum Wildtyp T1. Die Genexpression von TVAG_423530 war um 82%, die von HMP31.1, HMP31.2 und TVAG_087280 jeweils um ca. 50% höher als im Wildtyp.

Nach der Normalisierung zwischen dem Wildtyp T1 und dem Stamm T1 Δ HMP23 mit Aktin wurden die $\Delta\Delta C_t$ -Werte für TVAG_423530 (1,82, $\sigma = 0,23$), TVAG_0872280 (1,54, $\sigma = 0,17$) HMP31.1 (1,49, $\sigma = 0,17$) und HMP31.2 (0,93 $\sigma = 0,63$) ermittelt (Tabelle 3.7; Abb. 3.27). Die ermittelten Expressionen waren bei allen untersuchten Genen leicht erhöht.

HMP23 wurde in der inneren Membran der Hydrogenosomen von *T. vaginalis* lokalisiert, heterolog überexprimiert in *S. cerevisiae* ist es wahrscheinlich in die innere Membran der Mitochondrien eingebettet. Die Deletion des hoch exprimierten Membranproteins HMP23 hat, bis auf eine Vergrößerung der Hydrogenosomen, mit den gewählten *in vivo* Analysen keine erkennbaren Auswirkungen auf die *T. vaginalis* Zellen. Die detektierten leichten Erhöhungen der Expression der HMP23-Homologen, HMP31.1 und HMP31.2 könnten aber auf eine Kompensation durch mehrere Proteine hindeuten. Die *in silico* Voraussagen für HMP23, die auf einen Transporter hindeuten, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht direkt überprüft, und somit weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

4. Diskussion

Auf Grund des gemeinsamen evolutionären Vorfahrens ist anzunehmen, dass die Hydrogenosomen den Metaboliten-Transport ähnlich wie die Mitochondrien regulieren. Über hydrogenosomale Membranproteine gibt es bislang nur sehr wenige wissenschaftliche Erkenntnisse. Für *T. vaginalis* wurden bislang nur die Proteine HMP31 und HMP35 näher untersucht (Dyall *et al.*, 2000; Dyall *et al.*, 2003). Insgesamt sind nur vier HMP31-homologe Membranproteine mit *mitochondrial carrier family* (MCF) Domänen bekannt (Carlton *et al.*, 2007). Sowohl für HMP31.2 und HMP31.5 als auch für HMP31.3 und HMP31.4 ist jeweils die gleiche Funktion annotiert und sie könnten deshalb Isoformen sein (2.3.4; Tabelle 2.1). Dem gegenüber stehen für *S. cerevisiae* 34 Gene, die für 21 verschiedene MCF-Transporter codieren. Die vier HMP31 Homologen, die noch nicht charakterisiert wurden und vermutlich nur zwei weitere Transporter-Typen darstellen, reichen vermutlich nicht aus, um den Transport der zahlreichen Metaboliten in die und aus den Hydrogenosomen zu gewährleisten.

Um hydrogenosomale Transporter in *T. vaginalis* zu identifizieren und charakterisieren, müssen die putativen Membranproteine in Hinsicht auf Sequenzcharakteristika, Lokalisation und Funktion untersucht werden.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Analyse des hydrogenosomalen Membranproteins HMP23. Dieses war von besonderem Interesse, da die hohe Anzahl an ESTs, die in der TrichDB Datenbank annotiert sind, eine wichtige Funktion vermuten lässt. Außerdem war HMP23 für eine Gendeletion interessant, da es keine erkennbaren Isoformen hat, die den Verlust kompensieren könnten.

Durch *in silico* Analysen, Lokalisationsstudien von HMP23 und die Deletion des entsprechenden Gens aus dem Genom sollten Hinweise auf eine mögliche Funktion gewonnen werden.

4.1 *In silico* Analysen von HMP23

Von HMP23 und seinen Homologen in *T. vaginalis* war HMP23 das Protein mit dem größten Potential für eine funktionelle Analyse. Die vorausgesagten transmembranen Domänen und der für Membranproteine typische hohe isoelektrische Punkt (pH 10,2) machen HMP23 zu einem potentiellen Kandidaten für ein neues Membranprotein.

Die Homologen von HMP23 in *T. vaginalis* sind vier weitere hypothetische Proteine mit Identitäten zwischen 28% und 41%. Bei Ausschluss des Genoms von *T. vaginalis* war der beste nicht hypothetische Treffer ein Protein aus der Kieselalge *Thalassiosira pseudonana*. Mit dieser Aminosäuresequenz wurden bei einer BLASTp-Suche fast ausschließlich

mitochondriale Phosphat-Transporter gefunden. Für alle HMP23-Homologen außer TVAG_042350 wurden außerhalb von *T. vaginalis* mit BLASTp Proteine gefunden, die an unterschiedlichen Transportsystemen beteiligt sind.

Für *in silico* Analysen von Proteinstrukturen steht eine Vielzahl von Programmen zur Verfügung. So lange jedoch keine Proteinkristallisationsdaten vorhanden sind, kann nicht sicher bestimmt werden, welches Programm die zuverlässigsten Vorhersagen macht. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit mehrere Programme verwendet, um maximale Informationen aus den verfügbaren Sequenzdaten zu erhalten.

Die α -Helices, die eine transmembrane Domäne von integralen Proteine bilden, können 20 bis 25 AS lang sein und bestehen in der Mitte hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren (Henderson und Unwin, 1975; Wallin und von Heijne, 1998). Zu den Seiten hin bilden sich polare Segmente, die reich an Threonin und Tyrosin sind und oft durch Asparagin und Glycin abgeschlossen werden (von Heijne, 1999). Für HMP23 wurden zwei bis sechs α -helikale transmembrane Domänen gefunden. Keine der für HMP23 vorausgesagten Domänen erfüllt alle diese Kriterien. Die These, dass es sich bei HMP23 um ein Membranprotein handelt, muss aber deshalb nicht verworfen werden. In *S. cerevisiae* wurden für die im Genom codierten Proteine, die in der inneren Membran der Mitochondrien eingebettet sind, eine einheitliche Verteilung der Aminosäuren festgestellt (Gavel und von Heijne, 1992).

Charakteristisch für MCF Transporter sind sechs α -helikale transmembrane Domänen (Walker, 1992). MCF-Transporter funktionieren in der Regel als Homodimere (Schroers *et al.*, 1998). Bamber *et al.* (2007) konnten jedoch für die ADP/ATP-Transporter die Funktionalität als Monomer nachweisen.

In Eukaryoten bestehen die meisten ABC-Transporter aus zwei transmembranen Domänen und zwei ATP-Bindedomänen (Jones und George, 1999). Es stellt sich die Frage, ob die vorausgesagte Konformation für HMP23 die Kriterien für einen dieser Transporter erfüllen.

Das Programm HMMTOP hat sechs Domänen vorausgesagt, die erste Domäne ist aber mit nur 13 AS zu kurz, um die Membran zu durchspannen. Davon ausgehend, dass die Voraussagen des Programms SPOCTOPUS die genauesten sind, kann HMP23 von der Konformation her eine Funktion haben, die mit dem Transport der MCF-Transporter vergleichbar ist, sollte es einen homologen Dimer mit je drei transmembranen Domänen pro Untereinheit bilden.

Mit dem Programm RADAR wurden sich wiederholende Sequenzabschnitte in der Aminosäuresequenz gesucht, die eine funktionelle oder strukturelle Bedeutung haben könnten (Andrade *et al.*, 2001). Die Gegebenheit, dass die in der HMP23-Sequenz gefundenen Abschnitte keine Hinweise auf eine Funktion lieferten, bedeutet nicht, dass sie

zufällig und bedeutungslos sind. Denn es ist auffällig, dass sich die Anzahl der Aminosäuren vor dem N-terminalen und nach dem C-terminalen Abschnitt nur um eine Aminosäure unterscheidet.

Mit Hilfe der phylogenetischen Analyse und der Suche nach Identitäten und Ähnlichkeiten mit den MCFs von *S. cerevisiae* konnten HMP23 und seinen Homologen keiner Transporter-Klasse zugeordnet werden. HMP31 wurde mit einer Identität von 25,6% und einer Ähnlichkeit von 42,2% dem ADP/ATP Antiporter 2 zugeordnet. Dieses Ergebnis bestätigt die Erkenntnisse von Dyll et al. (2000). Der HMP23 BLAST-Treffer in *Thalassiosira pseudonana* wurde sowohl bei der phylogenetischen Analyse als auch bei der Suche nach Identitäten und Ähnlichkeiten den Phosphat-Transportern zugeordnet. Dieses Ergebnis deckt sich mit den BLAST-Analysen.

Die gefundenen Homologien in anderen Organismen und die Identitäten und Ähnlichkeiten mit den MCF-Proteinen von *S. cerevisiae* sind mit Vorsicht zu betrachten und haben nur eine geringe Aussagekraft. Die Identitäten (22-29%) und die E-values für die Treffer der HMP23-Homologen außerhalb von *T. vaginalis* waren nicht hoch genug, um aus diesen Ergebnissen eindeutige Schlüsse zu ziehen. Die Funktion eines Proteins sollte nicht von einem anderen abgeleitet werden, wenn die Identität unter 40% liegt (Todd et al., 2001). Studien an Enzymen haben gezeigt, dass die Funktion bereits bei einer Identität unterhalb von 60% abweichen kann (Tian und Skolnick, 2003). Wenn ein Protein phylogenetisch einer Transporter-Gruppe zugeordnet wird, bedeutet es nicht, dass es das gleiche Substrat transportiert. In *Antonospora locustae* wurde ein in den Mitosomen lokalisierter ADP/ATP Transporter charakterisiert, der in einer phylogenetischen Analyse dem NAD⁺-Transporter von *S. cerevisiae* zugeordnet wurde (Williams et al., 2008). Dennoch können die verglichenen Proteine die gleiche Funktion ausüben, wenn die Identitäten niedrig sind. In den mitochondrialen Transportern der inneren Membran sind nur wenige Aminosäuren in den α -helikalen transmembranen Domänen für die Substratspezifität ausschlaggebend (Kunji und Robinson, 2006; Robinson et al., 2008). Der ADP/ATP Transporter von *T. gallinae*, der Verursacher der Trichomoniasis bei Vögeln, ist im Vergleich zu den mitochondrialen Äquivalenten mit einer Sequenzidentität von 25 bis 30% bzw. einer Ähnlichkeit von 40 bis 45% deutlich verschieden (Tjaden et al., 2004). Mit den für HMP23 gefundenen Identitäten oder Ähnlichkeiten lässt sich keine eindeutige Aussage bezüglich der Funktion machen. Das Protein mit Homologie zu HMP23 in *Thalassiosira pseudonana* und die vorausgesagten transmembranen Domänen sind vermutlich Hinweise auf eine Transporter-Funktion, wobei sich die Substratspezifität sich anhand dieser Ergebnisse nicht ableiten lässt. Durch die Analyse der Lokalisation von HMP23 und der Deletion von HMP23 aus dem Genom sollten Hinweise auf die Funktion gesucht werden, um diese Vermutung zu überprüfen.

4.2 Lokalisation von HMP23

Proteine mit α -helikalen transmembranen Domänen können sowohl in der inneren als auch in der äußeren Membran lokalisiert sein (Otera *et al.*, 2007). Die Vermutung über eine Transporter-Funktion kann mit der Lokalisation von HMP23 in der inneren Membran der Hydrogenosomen oder Mitochondrien bekräftigt werden. Bei einer Lokalisation in der äußeren Membran der Hydrogenosomen und Mitochondrien wäre eine Funktion als Transporter unwahrscheinlich. Denn in der Regel bestehen Proteine, die am Transport durch die äußere Membran beteiligt sind, aus β -Faltblättern und für HMP23 wurden nur α -helikale transmembrane Domänen vorausgesagt (Wojtkowska *et al.*, 2012).

Um die Lokalisation in *T. vaginalis* experimentell nachzuweisen, wurde HMP23 in verschiedenen Ansätze N- (HMP23N) und C-terminal (HMP23C) durch einen Di-Hämagglutinin-Anhang markiert. Beide HMP23-Varianten wurden homolog in *T. vaginalis* überexprimiert und in den subzellulären Fraktionen immunodetektiert. Die Detektion des HA-Anhangs in den Hydrogenosomen und in der Membranfraktion mit den integralen Proteinen (MP) war sehr deutlich. Die Signale in der Fraktion mit den löslichen Proteinen (LP) sind auf eine Verunreinigung zurückzuführen. Die Detektion von ASCT, einem löslichen Matrixprotein, zeigte bei den Proben mit HMP23N eine Verunreinigung der Membranfraktion durch Matrixproteine, die nach der zweiten Behandlung mit Na_2CO_3 nicht mehr vorhanden war. Für die Proben mit HMP23C wurde eine leichte Kontamination mit Hydrogenosomen in der Fraktion des Cytosols und der Fraktion MP1 mit Matrixproteinen festgestellt.

Für einige mitochondriale Transporter wurde gezeigt, dass die Termini in den Intermembranraum ragen (Palmieri *et al.*, 1993; Sluse, 1996). Für die Hydrogenosomen ist keine Methode etabliert, um die innere von der äußeren Membran zu trennen. Durch die Behandlung von isolierten Hydrogenosomen mit Proteinase K für 30 min kann indirekt festgestellt werden, ob das markierte HMP23 in der inneren oder äußeren Membran lokalisiert ist.

Die Beobachtung, dass beide Termini nicht sofort abgebaut wurden, bedeutet, dass HMP23 in der inneren Membran lokalisiert ist, da sie durch die äußere Membran geschützt sind (Abb. 4.1A). Aus diesem Grund kann die Topologie des Proteins nicht genau bestimmt werden. Um die Topologie von Proteinen, die in der inneren hydrogenosomalen Membran eingebettet sind, exakt zu bestimmen, muss eine Methode etabliert werden, um die äußere Membran zu zerstören, ohne die innere zu beschädigen.

Es lässt sich nur spekulieren, ob die nachlassende Stärke des Signals mit zunehmender Proteinase K-Konzentration ein Hinweis auf eine Lokalisation beider Termini im Intermembranraum ist. Mit zunehmender Zeit könnte die Proteinase K die Proteine der äußeren Membran zerstören (Abb. 4.1B), die eine natürliche Barriere darstellen. Die

markierten Termini wären nicht mehr geschützt und könnten verstärkt abgebaut werden (Abb. 4.1C). Das würde möglicherweise die Abschwächung der Signale mit zunehmender Proteinase K-Konzentration erklären. Bei einer Lokalisation der Termini in der Matrix (Abb. 4.1D) wären, unter Umständen zwei Signale zu erwarten, vorausgesetzt die Proteinase K könnte auch Proteine in der inneren Membran abbauen. Eins mit der richtige Größe und ein kleineres wegen des Abbaus der Schleifen, die - im Gegensatz zu den durch die Membran vor der Proteinase geschützten transmembranen Domänen - in den Intermembranraum ragen würden. Ein Signal mit richtiger Größe wäre auch zu erwarten, weil der Abbau im Vergleich zu einer Lokalisation in der äußeren Membran erst zeitverzögert eintritt. Es bedarf wahrscheinlich des Abbaus von mehreren Proteinmolekülen, bevor Phospholipide die entstehenden Lücken nicht mehr füllen können und die Stabilität der Membran nicht mehr gegeben ist. Außerdem werden Proteine unterschiedlich schnell abgebaut. Für die Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana* wurde z.B. gezeigt, dass TOM20 schneller abgebaut wird als die spannungsabhängigen VDACs (Lister *et al.*, 2007).

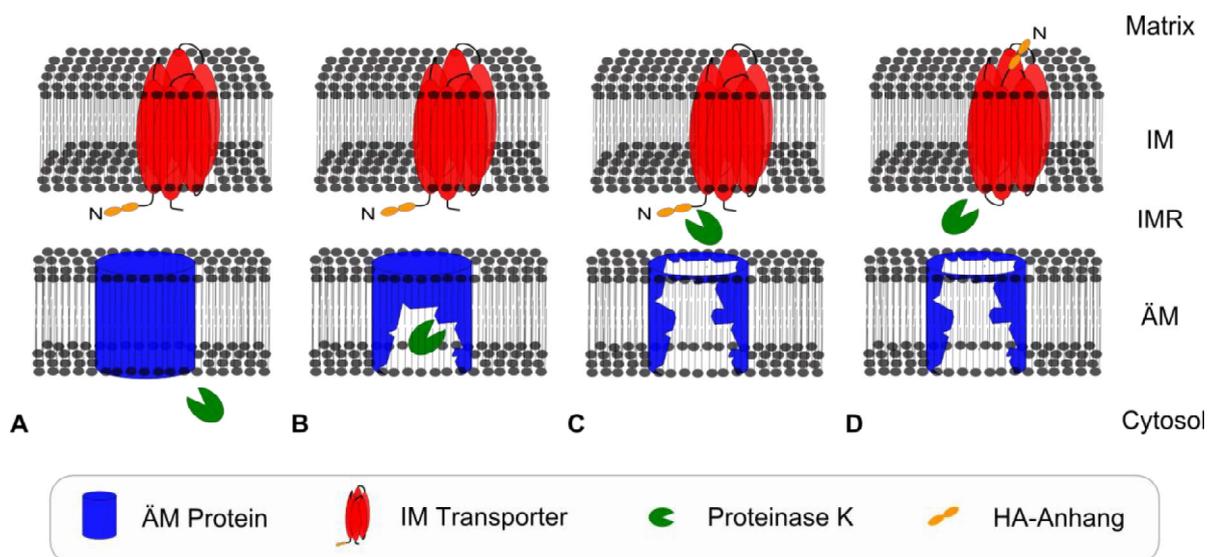


Abb. 4.1: Schematische Darstellung zur Proteolyse durch die Proteinase K mit zunehmender Zeit am Beispiel eines N-terminal markierten Transporters der inneren Membran (IM). **A:** Der HA-Anhang ist durch die äußere Membran (ÄM) geschützt. **B:** Die Proteinase K baut die Proteine der ÄM und **C:** den HA-Anhang am N-Terminus in dem Intermembranraum (IMR) ab. **D:** Die Termini sind in der Matrix, die in den IMR ragenden Schleifen können aber abgebaut werden.

In der Literatur konnten keine Beispiele für das Durchdringen der Proteinase K in den IMR gefunden werden. Möglicherweise wurde der Fokus nie darauf gerichtet, denn sowohl für Mitochondrien als auch für Chloroplasten gibt es Methoden, um die äußere Membran zu isolieren, ohne die Mitoplasten, bzw. die Thylakoide zu zerstören (Schnaitman und Greenawalt, 1968; Wojtczak *et al.*, 1971; Siegenthaler *et al.*, 1988). Um festzustellen, ob die

Proteinase K nach Abbau einiger Proteine durch die äußere Membran der Hydrogenosomen diffundieren kann, hätte die Inkubation verlängert und der Abbau als Vergleich in regelmäßigen Zeitintervallen überprüft werden müssen. Für ein Kontrollprotein, das durch die innere Membran geschützt ist, wäre der Abbau zeitverzögert zu erwarten, wenn auch die Proteine der inneren Membran ähnlich wie die Proteine der äußeren Membran abgebaut und so die Stabilität der Membran zerstört werden würde.

HMP23 wurde in der Fraktion mit den hydrogenosomalen integralen Proteinen lokalisiert. Die *in situ* Lokalisation des HA-Anhangs von HMP23 mittels Fluoreszenz bestätigte die Präsenz von HMP23 in den Hydrogenosomen und zum Teil auch in der Membran. Diese Ergebnisse wurden durch die von Rada *et al.* (2011) veröffentlichte Proteomanalyse der hydrogenosomalen Membranproteine, in der HMP23 auch *in situ* in der hydrogenosomalen Membran lokalisiert wurde, bestätigt.

Um die durch den Vergleich mit mitochondrialen Proteinen gewonnenen *in silico* Hinweise auf die Funktion von HMP23 zu bekräftigen, wurde HMP23 heterolog in *S. cerevisiae*, die als Modellorganismus für Studien an den Mitochondrien gilt, überexprimiert und lokalisiert. Die Behandlung der Mitochondrien mit Proteinase K erfolgte analog zu der oben beschriebenen Behandlung der Hydrogenosomen. Damit wurde geklärt, ob HMP23 in die innere Membran der Mitochondrien eingebettet werden kann.

Das markierte HMP23 wurde in den Mitochondrien, in der Fraktion mit Membranen und integralen Proteinen (MP) und in der Fraktion mit den löslichen Proteinen (LP) detektiert. Das Signal in der Membranfraktion war viel stärker als in der löslichen Fraktion. Auf Grund der identischen Beobachtungen in dem gleichen Versuch mit den Hydrogenosomen wird das schwache Signal der löslichen Fraktion als Kontamination mit Membranproteinen interpretiert. Diese Vermutung ließ sich nicht überprüfen, da keine Antikörper gegen mitochondriale Matrix- oder Membranproteine zur Verfügung standen. Die Behandlung der Mitochondrien mit Proteinase K zeigt, dass HMP23 geschützt war und deshalb vermutlich in die innere Membran eingebettet wurde.

Die Topologie hätte mit der Entfernung oder Beschädigung der äußeren Membran der Mitochondrien und der anschließenden Behandlung bestimmt werden können. Dies war aber nicht möglich, weil keine Antikörper gegen Markerproteine der dabei entstehenden Fraktionen zur Verfügung standen, um den Erfolg des Experiments zu beweisen.

HMP23 ist zweifelsohne in der inneren Membran der Hydrogenosomen lokalisiert und bekräftigt damit die Vermutung einer Transporter-Funktion. Über die Topologie der Termini kann anhand der Ergebnisse keine Schlussfolgerung gemacht werden und somit die *in silico* Voraussagen über die Topologie weder bestätigt noch widerlegt werden. Die Ergebnisse der heterologen Expression von HMP23 in *S. cerevisiae*, welches kein erkennbares N-terminales Transitpeptid besitzt, weisen auf ein konserviertes internes Importsignal und eine ähnliche

Proteinimportmaschinerie in die Membranen von Mitochondrien und Hydrogenosomen hin. Diese Ergebnisse unterstützen somit auch die Annahme, dass Hydrogenosomen und Mitochondrien einen gemeinsamen Vorfahren haben.

4.3 Gendeletion von HMP23

Die Charakterisierung von Proteinen, für die keine putativen Funktionen annotiert sind, kann durch eine Gendeletion und den Vergleich zwischen Mutante und Wildtyp erleichtert werden. Die durch die Deletion gewonnenen Hinweise auf eine Funktion kann anschließend gezielter überprüft werden. Bei der homologe Rekombination wird das zu deletierende Gen durch einen Selektionsmarker ausgetauscht. Unter Verwendung des nativen Promotors kann in *T. vaginalis* nicht jedes Gen deletiert werden. Der Erfolg ist wahrscheinlich von der Stärke des Promotors abhängig. Die Anzahl der ESTs ist nicht ausreichend, um die Stärke des Promotors zu definieren, so kann aber schnell eine Tendenz ermittelt werden. Für eine qualitative Aussage, muss mittels quantitativer RT-PCR die Anzahl der RNA-Kopien ermittelt werden.

Die Gendeletion bei *T. vaginalis* ist keine routinemäßige Methode. Deshalb sollte zunächst Ferredoxin wie von Land *et al.* (2004) beschrieben deletiert werden, um sicher zu stellen, dass die Gendeletion in *T. vaginalis* im Rahmen dieser Arbeit funktioniert. Die identische Reproduktion der Deletion von Ferredoxin war aufgrund unkorrekt beschriebener Oligonukleotide nicht möglich.

Die Sequenz für die FD1-Rekombinationskassette wurde erneut identifiziert und sequenziell vor und nach der NEO-Kassette in den Vektor p α SCS-Neo ligiert. Die Deletion war vermutlich nicht sofort erfolgreich, weil der Selektionsdruck zu hoch war. Der native Promotor von Ferredoxin ist möglicherweise nicht stark genug, um das NEO-Gen in ausreichender Menge zu transkribieren. Die Selektion gelingt nur, wenn die Zelle ausreichende Mengen des Proteins APH-3' produziert um G418 zu inaktivieren. Da für *T. vaginalis* bereits eine Konzentration von 40 μ g/ml G418 letal ist, war die Senkung des Selektionsdruckes von 100 auf 40 μ g/ml G418 möglich. Die Gegebenheit, dass die Deletion von Ferredoxin mit einer niedrigeren Konzentration der Selektionsdroge schon in den ersten drei parallel durchgeführten Versuche erfolgreich war, unterstützt die Vermutung, dass die Zelle in den ersten Versuchen mit höherer G418-Konzentration die Resistenz nicht bilden konnte.

Das Klonieren der Rekombinationskassette und die Deletion von HMP23 aus dem Genom von *T. vaginalis* erfolgten wie für FD1 beschrieben. Die Deletion von HMP23 im ersten Versuch betätigt die Effektivität der Bedingungen unter denen Ferredoxin deletiert wurde. Die Deletion von HMP23 wurde zweifelsohne bestätigt. Die Amplifikation und Sequenzierung von

zwei Fragmenten, die sowohl Bereiche des Neo-Gens als auch Bereiche außerhalb des für die Rekombination verwendeten Sequenzabschnittes beinhalten, bewies die Rekombination in den HMP23 Locus. Das Gen für HMP23 konnte weder aus dem Genom noch aus der cDNA des entstandenen Stammes T1 Δ HMP23 amplifiziert werden. Auch bei einem Proteomvergleich zwischen Wildtyp und T1 Δ HMP23 waren die Banden bzw. Spots für HMP23 erwartungsgemäß nicht zu sehen. T1 Δ HMP23 ermöglichte die Beobachtung von phänotypischen und molekularen Unterschieden zwischen Wildtyp und T1 Δ HMP23, um weitere Hinweise auf die Funktion von HMP23 zu gewinnen.

4.4 Phänotypische und molekulare Unterschiede zwischen Wildtyp und dem Stamm T1 Δ HMP23

Die HMP23 Homologen in *T. vaginalis* sind aufgrund der niedrigen Identität wahrscheinlich keine Isoformen. Basierend auf dieser Annahme war ein Unterschied zwischen Wildtyp und entstehender Mutante zu erwarten, womit Anhaltspunkte für eine mögliche Funktion hätten erhalten werden können.

Das Wachstumsverhalten des Wildtyps T1 und des Stammes T1 Δ HMP23 war identisch. Das unveränderte Wachstum der Zellen lässt sich nur damit erklären, dass der Verlust von HMP23 durch andere Proteine kompensiert wird oder die Funktion von HMP23 unter den untersuchten Bedingungen keine Rolle spielt. Allerdings deutet die starke Expression von HMP23 unter den in dieser Arbeit getesteten Bedingungen auf eine wesentliche Funktion hin. Darüber hinaus ist bekannt, dass *T. vaginalis* durchaus auf verschiedene Stresssituationen oder Umgebungen mit einer differentiellen Regulation der Genexpression reagiert, was eine Expression von HMP23 ohne jeglichen Nutzen oder Bedarf unwahrscheinlich erscheinen lässt (Kucknoor *et al.*, 2005; Pütz, 2007).

Mögliche morphologische Änderungen des Stammes T1 Δ HMP23 wurden durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Die Deletion von HMP23 führte zu keiner Veränderung der *T. vaginalis* Zellen. Es war kein Zusammenhang zwischen den geringen Größenunterschieden der Zellen der untersuchten Präparate und der Deletion von HMP23 oder der Behandlung durch G418 erkennbar.

Im Gegensatz zu den unveränderten Zellgrößen wird bei dem Vergleich der Hydrogenosomengrößen zwischen Wildtyp und T1 Δ HMP23 eine durch die Deletion von HMP23 induzierte Vergrößerung deutlich. G418 verursachte ebenfalls eine Vergrößerung der Hydrogenosomen, die bei dem Vergleich zwischen T1 TVAG_139300 und Wildtyp T1 erkennbar wird. Die zusätzliche Vergrößerung der Hydrogenosomen des Stammes T1 Δ HMP23 durch G418 lässt vermuten, dass die durch G418 induzierte Vergrößerung eine

andere Ursache hat. Die Vergrößerung der Hydrogenosomen durch G418 spielt bei der Suche nach der Funktion von HMP23 keine Rolle. Der Vollständigkeit halber sei bemerkt, dass diese Beobachtung Parallelen zu den Ergebnissen von Benchimol (2001) zeigt. Für die Hydrogenosomen von *T. vaginalis* und *T. foetus* wurde gezeigt, dass sie unter Stress größer werden. Benchimol erklärte in der gleichen Studie, dass die Zellen möglicherweise den Effekt der Droge überleben, indem die Hydrogenosomen aufgrund eines erhöhten Stoffwechsels vergrößert werden, wobei die genauen Mechanismen unbekannt sind. Wie sich die getesteten Drogen auf das Wachstum oder die Stoffwechselprozesse auswirken, wurde nicht untersucht. Inwieweit die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration an G418 die *T. vaginalis* Zellen stresst, wurde nicht nachgeprüft. Über die Ursache lässt sich nur spekulieren. Möglicherweise wird G418 nicht sofort inaktiviert und die kurzzeitige Toxizität durch die Vergrößerung der Hydrogenosomen überstanden, ohne jedoch die Wachstumsraten zu beeinflussen.

Um mögliche Kompensationen zu erkennen, wurde das hydrogenosomale Proteom des Wildtyps und des Stammes T1 Δ HMP23 mittels 2D-Gelen verglichen. Bei der Trennung war bei einem Versuch der Spot des 44,6 kDa schweren HMP31.2, welches als putatives Tricarboxylat Transportprotein annotiert ist, in den Stamm T1 Δ HMP23 intensiver. Dies korreliert mit den Beobachtungen aus dem Vergleich der Membranproteine zwischen Wildtyp und den Stamm T1 Δ HMP23. In dem Bereich zwischen 35 und 55 kDa sahen manchen Banden in der Mutante intensiver aus. In den gleichen Vergleich wurde in der Mutante eine stärkere Intensität für die Bande, die nach der Studie von Rada *et al.* (2011) dem Malat-Enzym entsprechen könnte, festgestellt. Dieser Unterschied war aber bei den 2D Analysen nicht erkennbar. Zusätzlich wurde bei der relativen Expressionsanalyse im Vergleich zum Wildtyp eine leichte Erhöhung der Expression von zwei HMP23 Homologen und von HMP31.1 und HMP31.2 im Stamm T1 Δ HMP23 festgestellt. Das Ergebnis der Expressionsanalyse suggeriert eine leichte Kompensation durch mehrere Proteine. Inwieweit die erhöhte Expression bedeutend ist, hängt von der absoluten Expression im Wildtyp ab. Wahrscheinlich ist die absolute Erhöhung für HMP31.1 am höchsten. Diese Annahme stützt sich darauf, dass das mitochondriale Äquivalent eines der häufigsten Proteine der inneren Membran ist (Klingenberg, 2008).

Die Vergrößerung der Hydrogenosomen steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Kompensation der HMP23-Deletion durch andere Proteine. Die Proteine, die den Verlust von HMP23 kompensieren, müssen vermutlich hochreguliert werden, um die zusätzliche Arbeit zu gewährleisten. Die Erhöhung der Expression ist möglicherweise von der Effizienz der Kompensation abhängig. Dadurch, dass die kompensierenden Proteine wahrscheinlich nicht die gleiche Leistung wie HMP23 haben, müssen mehr Proteinmoleküle in die Membran eingebettet werden, als durch die Deletion verloren gegangen sind. Um das Verhältnis

zwischen Phospholipiden und Proteinen aufrecht zu erhalten, werden mehr Phospholipide benötigt und deshalb die Hydrogenosomen vergrößert. Inwieweit eine damit verbundene Erhöhung der Expression der dafür gebrauchten Enzyme detektierbar wäre, lässt sich nur spekulieren. *T. vaginalis* synthetisiert im Vollmedium keine Phospholipide *de novo*. Sie werden nach der Aufnahme nur noch durch z.B. Acylierungen modifiziert. Die Zusammensetzung der Phospholipide wurde zwar ermittelt, das Verhältnis zwischen Proteinen und Phospholipiden wurde für die Hydrogenosomen aber nicht untersucht (Beach *et al.*, 1990). In der inneren Membran der Mitochondrien machen die Proteine 75% des Gesamtgewichtes aus (Guidotti, 1972). Wie die Mitochondrien das Verhältnis zwischen Phospholipiden und Proteinen aufrecht erhalten, ist nicht geklärt. Es wird vermutet, dass Phospholipide bei dem Import und der Funktion von mitochondrialen Proteinen eine Rolle spielen. Im Gegenzug regulieren diese Proteine die Synthese der Phospholipide (Gohil und Greenberg, 2009).

Für die Mitochondrien in dem Fettgewebe von *Calpodes ethlius* wurde in der Puppenphase zwar eine Vergrößerung beobachtet, sie hing aber mit der Erhöhung des Stoffwechsels aufgrund eines höheren Energiebedarfs zusammen (Larsen, 1970). Die Beobachtung, dass der ADP/ATP-Transporter HMP31 in dem Stamm T1 Δ HMP23 hochreguliert ist, könnte zwar ein Hinweis für einen erhöhten Energiebedarf sein, aber sowohl die Zellen als auch die Wachstumsraten unterscheiden sich kaum. Diese Begründung für eine Vergrößerung der Hydrogenosomen ist vermutlich unwahrscheinlich, denn beim Vergleich der hydrogenosomalen Proteome des Wildtyps T1 und des Stammes T1 Δ HMP23 wurden keine Proteine, die an der ATP-Produktion beteiligt sind erkennbar hochreguliert. In der Literatur wurden keine Studien gefunden, bei denen die Mitochondrien oder andere Organellen von mutanten Stämmen aufgrund der Deletion eines Genes größer wurden. Es gibt drei Möglichkeiten, wie der Verlust von HMP23 eventuell kompensiert wurde: durch die Verwendung nicht erkannter Isoformen, durch andere Proteine mit der gleichen Funktionsklasse oder durch alternative Stoffwechselwege.

Dass der Verlust von einem Protein durch Isoformen kompensiert werden kann, wurde bereits bewiesen. In *S. cerevisiae* z.B. wurde gezeigt, dass eine bis dahin unbekannte Isoform des P_i -Transporters, mit lediglich nur 40% Identität den Verlust des P_i -Transporters zum Teil kompensieren kann (Hamel *et al.*, 2004). Ein weiteres Beispiel ist die Kompensation der Deletion eines Malat-Transporters der Vakuole in *Arabidopsis thaliana* durch einen zweiten Malat-Transporter (Kovermann *et al.*, 2007).

Es gibt mitochondriale Transporter, die *in vitro* mehrere Substrate mit unterschiedlicher Effektivität transportieren können. Der ADP/ATP-Transporter ist hochspezifisch, kann aber kleine Mengen von Phosphoenolpyruvat transportieren (Shug und Shrago, 1973). Der Citrat-Oxoglutarat-Transporter kann zusätzlich nur minimal weniger effektiv Oxalacetat, Fumarat,

Succinat und in kleineren Mengen L-Malat und andere Tricarboxylate transportieren (Castegna *et al.*, 2010). Für den NAD⁺-Transporter von *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass er neben dem Hauptsubstrat NAD⁺ auch AMP und GMP transportieren kann (Todisco *et al.*, 2006). Die Kompensation durch andere Membranproteine ist theoretisch möglich.

Die Kompensation einer Gendeletion durch die Verwendung von alternativen Stoffwechselwegen wurde für *S. cerevisiae* mehrfach postuliert und nachgewiesen (Wagner, 2000; Papp *et al.*, 2004; Harrison *et al.*, 2007). In *Escherichia coli* wurde gezeigt, dass die Deletion des Genes für die Pyruvatkinase zu einer Erhöhung anderer Stoffwechselwege und einer Überregulation anderer Enzyme führte (Al Zaid Siddiquee *et al.*, 2004). Die durchgeführten Analysen lieferten zwar keine Ergebnisse, die eine solche Kompensation in *T. vaginalis* vermuten lassen, sie kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Die Deletion von HMP23 könnte durch alle drei beschriebenen Möglichkeiten kompensiert werden. So ließe sich die Überexpression der HMP23-Homologen, HMP31.1 und HMP31.2 erklären. Die hoch regulierten HMP23-Homologen können vermutlich den Verlust nicht vollständig ausgleichen. Die detektierte leichte Überexpression von HMP31.1 und HMP31.2 ist möglicherweise auf einen Bedarf von mehr Transporter-Molekülen zurückzuführen. Die zusätzlichen Transporter-Moleküle sind möglicherweise notwendig, um die HMP23-Funktion zu kompensieren. Ein weiterer Grund könnte der erhöhte Metaboliten-Transport sein, der durch die Erhöhung des alternativen Stoffwechselweges entsteht. *T. vaginalis* wäre somit in der Lage die Deletion von HMP23 zu kompensieren, ohne dass diese sich offensichtlich bemerkbar macht.

Die Kompensation einer Gendeletion in *T. vaginalis* durch die beschriebene Hypothese ist grundsätzlich möglich. In den Hydrogenosomen kann z.B. Pyruvat vermutlich direkt importiert werden – ein Transporter wurde bis jetzt nicht identifiziert – oder aus der Decarboxylierung von Malat gewonnen werden (Tschudi und Pearce, 2000). Die Deletion eines potentiellen Pyruvat-Transporters könnte möglicherweise durch wenige leistungsfähige Isoformen und erhöhten Malat-Import und -Decarboxylierung kompensiert werden. Inwieweit ein anderer Transporter, der keine Isoform ist, die Arbeit übernehmen könnte, bleibt hoch spekulativ.

Über die genaue Rolle von HMP31.1 und HMP31.2 bei der Kompensation der Deletion von HMP23 kann nur spekuliert werden. In *T. gallinae* wurde die Funktion eines HMP31.1 Homologs als ADP/ATP Transporter experimentell zwar bestätigt, aber es wurde nie untersucht, ob dieser Transporter in der Lage ist, andere Substrate wie Malat oder Pyruvat zu transportieren (Tjaden *et al.*, 2004). Die Annotation von HMP31.2 in der Datenbank TrichDB als ein putatives Tricarboxylat-Transportprotein basiert nur auf Homologien. Das Protein wurde nie charakterisiert und die Funktion ist weiterhin unbekannt.

Die Vergrößerung der Hydrogenosomen steht eindeutig im Zusammenhang mit der Deletion von HMP23 und ist möglicherweise auf den vermehrten Einbau von Proteinen, die für die Kompensation der HMP23-Deletion nötig sind, in die Membran zurückzuführen. Die molekularen Unterschiede zwischen Wildtyp und T1 Δ HMP23 beweisen eine Kompensation durch zwei Homologe, es kann aber durchaus weitere Kompensationswege geben. Die Überexpression von anderen Transportern ist ein Hinweis auf die Übernahme der HMP23-Funktion durch diesen Transporter oder auf eine Erhöhung eines alternativen Stoffwechselwegs. Die Überexpression von anderen Transportern bestärkt zudem die Hypothese, dass HMP23 auch ein Transporter sein könnte.

4.5 Fazit

HMP23 ist eines der am höchsten exprimierten integralen Membranproteine der Hydrogenosomen. Die Gegebenheit, dass die HMP23 Homologen in *T. vaginalis*, von der Sequenzidentität her offenbar keine Isoformen darstellen, führte zur Annahme, dass die Deletion von HMP23 mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Stresssituation in der Zelle führen würde, da seine Aufgaben nicht direkt von einer Isoform übernommen werden könnten. Ob eine Gendelektion zu einem erkennbaren Phänotyp führt oder nicht, ist aber kaum vorhersehbar. In *Arabidopsis thaliana* z.B. verursachten nur 2% der Gendelektionen einen Phänotyp unter normalen Bedingungen (Bouche und Bouchez, 2001). Durch den Vergleich des bei dieser Arbeit entstandenen Stammes T1 Δ HMP23 mit dem Wildtyp wurden kleine phänotypische und molekulare Unterschiede festgestellt, die auf eine Kompensation der Deletion von HMP23 hinweisen. Die Deletion hat aber keinen Einfluss auf das Wachstum.

Proteine, die *in silico* nicht als Isoformen erscheinen, können es funktionell doch sein. Nichtsdestotrotz bietet die Deletion von Genen auch Chancen. Eine Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass die *in silico* nicht als Isoformen erkannten HMP23-Homologe TVAG_423530 und TVAG_087280 möglicherweise doch HMP23-Isoformen sind. Für beide wurde in dem Stamm T1 Δ HMP23 eine leichte Erhöhung der relativen Expression detektiert. Bei Berücksichtigung der *in silico* Analysen ist das für TVAG_423530 durchaus realistisch. TVAG_423530 war das einzige HMP23-Homolog, das auch sich wiederholende Sequenzabschnitte in der Aminosäuresequenz hat.

Die Deletion von HMP23 führte zu keinem Phänotyp oder einer daraus resultierenden Kompensation, die zweifelsohne zur Bestimmung der Funktion von HMP23 ausreichen würde, die Ergebnisse dieser Arbeit deuten aber auf eine Funktion als Transporter hin. Über den Transporter-Typ und seine Topologie konnte nicht abschließend entschieden werden.

Für HMP23 wurden zwei bis sechs α -helikale transmembrane Domänen vorausgesagt. Unabhängig davon, welche Berechnung der richtigen Struktur von HMP23 am nächsten kommt, könnte HMP23 aufgrund der Anzahl der Transmembrandomänen sowohl ein ABC-Transporter als auch einen MCF ähnlicher-Transporter sein. So lange jedoch keine Proteinkristallisationsdaten vorhanden sind, kann nicht sicher bestimmt werden, welches Programm die zuverlässigsten Vorhersagen macht.

Sollte HMP23 ein Transporter sein, dann wahrscheinlich einer mit Ähnlichkeiten zu MCF-Transportern. Dafür sprechen folgende Erkenntnisse dieser Arbeit: 1. Die in den Stamm T1 Δ HMP23 detektierte leichte Überexpression von HMP31.1 und HMP31.2, die als MCF-Transporter gelten. 2. Die Lokalisation in der inneren Membran der Hydrogenosomen und Mitochondrien. 3. Das Protein mit Homologie zu HMP23 in *Thalassiosira pseudonana* ist vermutlich ein MCF-Transporter und 4. HMP23 hat mehrere transmembrane Domänen.

4.6 Ausblick

Die Deletion von Genen in *T. vaginalis* ist weiterhin keine routinemäßige Methode. Das Genom von *T. vaginalis* ist hochrepetitiv und Homologe, die *in silico* nicht als Isoformen erscheinen, können es funktionell doch sein. Nichtsdestotrotz bietet die Deletion von Genen auch Chancen, essentielle Informationen über die Funktionalität des untersuchten Genes zu erhalten, denn mutmaßliche Isoformen sind nicht immer in der Lage, einen Verlust vollständig zu kompensieren (Hamel *et al.*, 2004). Eine Einschränkung in der Methode ist die Verwendung des nativen Promotors und das Vorhanden sein von nur einem Selektionsmarker für *T. vaginalis*. Die Verwendung eines starken Promotors würde die Möglichkeit bieten, Gene zu deletieren, die nicht stark exprimiert werden. Wären weitere Selektionsmöglichkeiten vorhanden, könnten Kompensationsstudien für letale Deletionen durchgeführt werden. Dass die homologe Expression in *T. vaginalis* mit einem induzierbaren Promotor möglich ist, wurde bereits gezeigt (Ortiz und Johnson, 2003).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage für weiterführende Analysen. Der Proteomvergleich zwischen Wildtyp und dem Stamm T1 Δ HMP23 sollte mit dem 2D DIGE (*differential gel electrophoresis*) System wiederholt werden. Bei der 2D DIGE Analyse werden die Proteine der zu vergleichenden Proteome kovalent mit verschiedenen sogenannten CyDye Fluoreszenzfarbstoffen markiert und zusammen nach dem isoelektrischen Punkt und dem Molekulargewicht getrennt. Mit Hilfe von internen Standards können Konzentrationsunterschiede der zu vergleichenden Proben normalisiert werden. Mit dem Vergleich der Fluoreszenz können relative Unterschiede zwischen den Proteinmengen in einem Spot genau detektiert werden (Marouga *et al.*, 2005). Die Hinweise auf

Kompensationen durch andere Proteine oder alternative Stoffwechselwege könnten anschließend durch Expressionsanalysen mittels qRT-PCR verfolgt werden.

Eine weitere Möglichkeit, Unterschiede zwischen dem Wildtyp und dem Stamm T1 Δ HMP23 zu detektieren, ist die Herstellung von EST-Datenbanken mit anschließendem Vergleich. Die ermittelten Unterschiede sollten aber mittels qRT-PCR überprüft werden, denn EST-Datenbanken können fehlerhaft sein (Wang *et al.*, 2004).

Um die Funktion von HMP23 als Transporter zu bestätigen, müssen weitere Experimente folgen. In anderen Organismen wurden die Substrate von Transportern mit Hilfe von Liposomen ermittelt. Das Protein kann aus der nativen Membran solubilisiert werden. Nach der Entfernung der Detergentienmicellen und der Phospholipide kann das zu untersuchende Protein in Liposomen eingebaut werden und der Transport von den z.B. radioaktiv markierten Substraten in die Liposomen untersucht werden (Indiveri, 2010). Das zu untersuchende Protein kann alternativ *in vitro* exprimiert werden. Dazu gibt es z.B. kommerzielle Anwendungen, die es erlauben, Membranproteine ohne Markierung durch einen Anhang zu exprimieren. Die Expression erfolgt dabei *in vitro* mit bakteriellen Translationskomponenten (Zubay, 1973; Studier *et al.*, 1990).

Sollte die Funktion als Transporter bestätigt werden, kann mit der blauen nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) ermittelt werden, ob HMP23 ein Homodimer bildet (Schagger *et al.*, 1994). Eine Alternative dazu ist die Isolierung des markierten HMP23 unter nativen Bedingungen mittels Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC). Ein Ansatz dazu ist die von Rada *et al.* (2011) beschriebene Analyse von TOM40 aus den Hydrogenosomen von *T. vaginalis*.

Um die genaue Struktur von HMP23 zu bestimmen, muss das Protein kristallisiert werden. Das gestaltet sich in der Regel für Membranproteine als sehr schwierig, dennoch wurden im Laufe der Zeit immer mehr Membranproteine mit unterschiedlichen Methoden erfolgreich kristallisiert (Bill *et al.*, 2011).

Die Topologie der Termini von Membranproteinen der hydrogenosomalen inneren Membran kann nur bestimmt werden, wenn diese für Proteinase K zugänglich gemacht werden. Bei den Mitochondrien ist es möglich, die äußere Membran durch den Aufbau eines osmotischen Drucks zu zerstören (Wojtczak *et al.*, 1971). Dies könnte sich bei den Hydrogenosomen als schwierig gestalten, weil beide Membranen parallel verlaufen und der Abstand zwischen diesen kleiner ist als bei den Mitochondrien (Benchimol und de Souza, 1983). Alternativ kann die äußere Membran der Mitochondrien von der inneren mit dem nichtionischen Tensid Digitonin getrennt werden (Schnaitman und Greenawalt, 1968). Ob die Permeabilisierung der äußeren hydrogenosomalen Membran durch die Behandlung von nichtionischen Tensiden wie Digitonin gelingt, ohne die innere Membran zu zerstören, hängt von den biochemischen Unterschieden zwischen den beiden Membranen ab. Die Lipide der

Hydrogenosomen wurden zwar ermittelt, aber nicht für die einzelnen Membranen. Die Behandlung der Hydrogenosomen sollte mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt werden. Um den Erfolg zu protokollieren, müssen Antikörper gegen Proteine, die in der äußeren Membran und im Intermembranraum lokalisiert sind, hergestellt werden. Durch die Behandlung der entstandenen Hydrogenosomen ohne äußere Membran mit Proteinase K und anschließender Detektion eines Matrixproteines, das geschützt sein müsste, kann die Unversehrtheit der inneren Membran nachgewiesen werden.

Die Charakterisierung von weiteren hydrogenosomalen Membranproteinen ist wichtig, um den Metabolitentransport in und aus den Hydrogenosomen zu verstehen. Für die Suche nach neuen Membranproteinen sollte das Genom von *T. vaginalis* mit einem anderen Programm als TMHMM untersucht werden. Dieses Programm hatte die schlechteste Performance bei den Voraussagen für die MCF-Transporter von *S. cerevisiae* (3.1.2). Für HMP31, dessen Funktion als ADP/ATP Antiporter gezeigt wurde, hat das Programm keine einzige transmembrane Domäne gefunden.

In dieser Arbeit wurden Erkenntnisse über das Deletieren von Genen in *T. vaginalis* gewonnen, mit deren Hilfe zukünftige Studien erfolgversprechender durchgeführt werden können. Die Lokalisation von HMP23 in der inneren hydrogenosomalen Membran und die Indizien für eine Funktion als Transporter haben eine Grundlage für zielgenaue und weiterführende Analysen geschaffen.

5. Material und Methoden

5.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den folgenden Firmen bezogen:

Acros Organics (Geel, Belgien), AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Difco Laboratories Inc. (Palo Alto, USA), Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Fischer Chemical (Schwerte), Fluka (Buchs SG, Schweiz), GE Healthcare (München), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Merck Biosciences (Darmstadt), Serva (Heidelberg), SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH (Taufkirchen), VWR (Darmstadt).

5.2 Enzyme und Antibiotika

<i>Apal</i>	New England Biolabs
<i>BamHI</i>	New England Biolabs
BP Clonase II Enzyme mix	Invitrogen
CIAP	Fermentas
DNase	Fermentas
<i>HindIII</i>	New England Biolabs
<i>KpnI</i>	New England Biolabs
LR Clonase II Enzymee mix	Invitrogen
<i>NotI</i>	New England Biolabs
Proteinase K	Roth
<i>SacII</i>	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
<i>Taq</i> DNA Polymerase	5-Prime
Trypsin	Promega
Velocity DNA Polymerase	Bioline
Ampicilin	Roth
G418	Roth
Kanamycin	Roth
Penicillin/Streptomycin	MB Biomedicals

5.3 Oligonukleotide

Die in den Tabellen 5.1, 5.2, 5.3 und 5.4 aufgelisteten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Die Oligonukleotide in den Tabellen 5.5 und 5.6 wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

Tabelle 5.1: Übersicht der Oligonukleotide für die Lokalisationsstudien.

Name	Sequenz	T _m
M13F	5'-GTA A ACGACGGCCAG-3'	46°C
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	45°C
H23_F_Ndel_B1	5'-AAAAAAGCAGGCTCATATGGGTTGCTTCTGCAAGGAGAT-3'	55°C
H23_R_BamHI_Br5	5'-TATACAAAGTTGGGATCCGTTAATGAAGGCAAGAACATCCTTG-3'	54°C
H23_F_Ndel_B5	5'-ATACAAAAGTTGCATATGGGTTGCTTCTGCAAGGAGAT-3'	55°C
H23_R_BamHI_B2	5'-AGAAAAGCTGGGTGGATCCTTAGTTAATGAAGGCAAGAACATCCTTG-3'	54°C
AttB1_Adapter	5'-GGGGACAAGTTTGA A AAAAAGCAGGCT-3'	58°C
AttB5r_Adapter	5'-GGGGACAAC T TTTGTATACAAAGTTG-3'	55°C
AttB5_Adapter	5'-GGGGACAAC T TTTGTATACAAAGTTG-3'	55°C
AttB2_Adapter	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'	63°C
HA_F_attB1	5'-AAAAAAGCAGGCTATGTACCCATACGATGTTCCA-3'	50°C
HA_R_attBr5	5'-TATACAAAGTTGAGCGTAATCTGGAAC-3'	39°C
HA_B2_REV	5'-AGAAAAGCTGGGTTTAAAGCGTAATCTGGAACA-3'	45°C
H23_F_Sall	5'-GTCGACAGGTTGCTTCTGCAAGGAGAT-3'	52°C
H23_R_Sall_st	5'-GTCGACTTAGTTAATGAAGGCAAGAACATCCTTG-3'	56°C

Tabelle 5.2: Übersicht der Oligonukleotide für die Deletion von Ferredoxin1.

Name	Sequenz	T _m
F5F_NotI	5'-GACGTGCGGCCGGATTGTGAAAATACCGATGTCCACCACTAC-3'	63°C
F5R_KpnI	5'-GACGTGGTACCTCGCTAAAGAGAAGTGAAGTAAATATTTTGAATACAAA-3'	62°C
F3F_BamHI	5'-GACGTGGATCCATAATTGAAAGTTTATTAATGTTTTTGGATTTTTTCCAATACTTAAG-3'	62°C
F3R_HindIII	5'-GGTGGTAAAGCTTAATTAACATCGATATCTTTTTACTAGTAAAGTAAAATACTATAC-3'	62°C
NEO646	5'-GACCGCTATCAGGACATAG-3'	55°C
FK3R	5'-AAACAGCATTGACTGCTATTTGT-3'	54°C
FD_FOR	5'-AAAAAGCAGGCTATGCTCTCTCAAGTTTGCC-3'	49°C
FD_REV	5'-TATACAAAGTTGGAGCTCGAAAACAGCAC-3'	50°C
NEO_FOR	5'-ATGATTGAACAAGATGCATTGC-3'	49°C
NEO_REV	5'-TCAGAAGAACGCGTCAAGAAG-3'	52°C

Tabelle 5.3: Übersicht der Oligonukleotide für die Deletion von HMP23.

Name	Sequenz	T _m
H5F_SacII	5'-GGTGGTCCGCGGCGAGATTCTCCACCAGATA-3'	56°C
H5R_KpnI	5'-GGTGGTGGTACCTTGAAAGTGAAGTGA A AAAAACGATAC-3'	56°C
H3F_BamHI	5'-GGTGGTGGATCCCACTTCAAGGATGTTCTTGC-3'	57°C
H3R_ApaI	5'-GGTGGTGGGCCCGGGAATCGTTTTGAGTTGGGT-3'	57°C
HK5F	5'-CGAAGTCGAATTGAACGGTATC-3'	53°C
HK3R	5'-CGTGGTCGGAAATTCAACTCTT-3'	53°C

Tabelle 5.4: Übersicht der Oligonukleotide für qRT-PCR Analyse.

Name	Sequenz	T _m
cHmp23F	5'-TGGCGCTCTCCTTGGCACAC-3'	60°C
cHmp23R	5'-CGAGGCTGTTCGGGCAAGCT-3'	60°C
c485120F	5'-TTGGCGGCCTTCAGACAGGT-3'	58°C
c485120R	5'-CGCCAAGAGCACCACCGAGG-3'	60°C
c77910F	5'-TGGCCAAAATCGCACTTTCAGGA-3'	57°C
c77910R	5'-CGCGGTGAATATGGCTGCAGC-3'	59°C
c423530F	5'-GCTGGTGGTATTGGCGCAGCT-3'	60°C
c423530R	5'-TGGCCAGCAAAGTAGAAGCGG-3'	57°C
c087280	5'-AACGACGGCAGTAGCTGACGT-3'	59°C
c087280	5'-TGTGGCAGTGTGACAGCCGT-3'	59°C
cAktin249200F	5'-TGTCGCCCTCGACTTCGATGC-3'	59°C
cAktin249200R	5'-GCAGCGGAAGCGCTCATTGC-3'	58°C
cH31.2 F	5'-CCCCTAACGGTGCCTCCCA-3'	60°C
cH31.2 R	5'-GTTGCCACGCCAGAAAGCGG-3'	60°C
cH32.1 F	5'-GCGCCTTCCGTCGGCTTCA-3'	60°C
cH32.1 R	5'-CGGCGATGCCCTGCTCCTTC-3'	59°C

Tabelle 5.6: Übersicht der Oligonukleotide für die Herstellung der Standardkurven für die qRT-PCR.

Name	Sequenz	T _m
ST_423530_F	5'-CCACGGCCTTAAAGGTGATGCTG-3'	58°C
ST_423530_R	5'-ACATCTGGCCTCTTGCCAGT-3'	58°C
ST_087280_F	5'-ATGACAACAGAGACGAGTTCTTCTTCAA-3'	58°C
ST_087280_R	5'-ACCTAGCATCTGGCATGCAAACA-3'	57°C
ST_249200_Akt_F	5'-AACCTCGCTGGCCGTGATCT-3'	58°C
ST_249200_Akt_R	5'-GGAGCCACCGACCCAAACGG-3'	60°C
H31.1F_NdeI_B1	5'-AAAAAAGCAGGCTCATATGGCACAGCCAGCAGAACAGATCCT-3'	57°C
H31.1R_BamHI_Br5	5'-TATACAAAGTTGGGATCCCTTTCTTTGG AGCAACCTTCCCTTGATC-3'	60°C
H31.2F_KpnI_B1	5'-AAAAAAGCAGGCTGGTACCATGGCTACCGAAGCCGATAAGG-3'	57°C
H31.2R_BamHI_Br5	5'-TATACAAAGTTGGGATCCCTTTTCTTCTTATCCTTTTCTTGTCGTC-3'	56°C

5.4 Verwendete Stämme

Escherichia coli:

XL1-Blue MRF' (Stratagene): Δ (mcrA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIq Δ M15 Tn10 (Tetr)]

DH5 α (Bethesda Research Laboratories): supE44, Δ lacU169 (Φ 80 lacZ Δ M15), hsdR17 (rk-, mk+), recA1, endA1gyrA96, thi-1, relA1

Trichomonas vaginalis:

T1 (J.-H. Tai, Institute of Biomedical Sciences, Taipei, Taiwan)

Saccharomyces cerevisiae:

INVSc1 (Invitrogen): his3D1/his3D1 leu2/leu2 trp1-289/trp1-289 ura3-52/ura3-52

5.5 Reagenzsätze

Power SYBR [®] Green PCR Master Mix	Aplied Biosystems
Clone Jet [™]	Fermentas
DNAzol [®] Reagenz	Invitrogen
iScript [™] cDNA Synthesis Kit	Biorad
MultiSite GATEWAY [®] Pro	Invitrogen
Nucleospin Plasmid Kit Mini	Macherey-Nagel
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Quick Ligation [™] Kit	New England Biolabs
TRizol [®] Reagenz	Invitrogen
Ettan 2-D Clean-Up Kit	GE Healthcare

5.6 Vektoren

pDNOR [™] P1-P5r	Invitrogen
pDNOR [™] P5-P2	Invitrogen
pTagvag2	(Hrdy <i>et al.</i> , 2004)
pSCS-NEO	(Delgadillo <i>et al.</i> , 1997)
pJet1.2	Fermentas
pGreg536	(Jansen <i>et al.</i> , 2005)

5.7 Arbeiten mit *Escherichia coli*

Alle Arbeiten mit *Escherichia coli* wurden nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt.

5.8 Arbeiten mit *Trichomonas vaginalis*

5.8.1 Anzucht von *T. vaginalis*

T. vaginalis wurde in 15 ml Kulturröhrchen mit Schraubdeckel von Sarstedt in 12 ml TYM-Medium pH 6,2 (22,22% (w/v) Tryptose, 11,11% (w/v) Hefeextrakt, 5,55% (w/v) Maltose, 1,11% (w/v) L-Cystein, 0,22% (w/v) L(+)-Ascorbinsäure, 0,88% (w/v) KH₂PO₄ und 0,88%

(w/v) K_2HPO_4) mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem Pferdeserum (PAN Biotech), 0,71% (v/v) Eisenlösung (1% (w/v) $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ und 0,1% (w/v) 5-Sulfosalicylsäure) bei 37°C angezogen und alle 48 Stunden mit 100 µl der Vorkultur in frisches TYM-Medium umgesetzt (Clark und Diamond, 2002). Im Fall einer bakteriellen Kontamination wurde Penicillin [100 U/ml] und Streptomycin [100 U/µg] zugesetzt. Zur Anzucht in größeren Mengen wurden 45 ml TYM-Medium mit 5 ml bzw. 1 l TYM-Medium mit 100 ml einer Vorkultur beimpft.

5.8.2 Elektroporation von *T. vaginalis*

Für die Transfektion von *T. vaginalis* wurde eine 50 ml Kultur mit 1000 x g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert und in 1,5 ml TYM-Medium pro Gramm Zellen aufgenommen (Delgadillo *et al.* 1997). Die Zellen wurden resuspendiert und viermal durch eine 23G-Kanüle gezogen. Zu einer bei -20°C vorgekühlten 0,4 cm Elektroporationsküvette (Molecular BioProducts) wurden 300 µl der Zellsuspension und 50 µg DNA gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser von Biorad bei 350 V und 975 µF. Die Zeitkonstante sollte einen Wert zwischen 165 und 200 ms erreichen. Der Ansatz wurde 10 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend zu 12 ml 37°C warmem TYM-Medium, das bereits Penicillin/Streptomycin (100 U/100 µg) enthielt, gegeben. Nach vier Stunden Inkubation bei 37°C wurde zur Selektion das Antibiotikum G418 [100 µg/ml] hinzugegeben und 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur ohne die sedimentierten toten Zellen in ein neues Röhrchen überführt und mit 1000 x g bei RT pelletiert. Die pelletierten Zellen wurden in 12 ml TYM-Medium mit G418 aufgenommen und bei 37°C inkubiert.

5.8.4 Dauerkulturen *T. vaginalis*

In einem sterilen 2 ml Cryo-Röhrchen (Roth) wurde zu 0,5 ml TYM-Medium und 20% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) 0,5 ml von einer *T. vaginalis* Kultur hinzugegeben und 2 h auf Eis inkubiert. Nach weiteren 2 h bei -20°C wurden die Dauerkulturen bei -80°C aufbewahrt. Für die Wiederverwendung der Kulturen wurden diese bei 37°C aufgetaut und zu vorgewärmtem TYM-Medium gegeben.

5.8.4 Isolierung von Hydrogenosomen aus *T. vaginalis*

Die Hydrogenosomen wurden nach Bradley *et al.* (1997) mit Änderungen nach Pütz *et al.* (2005) und Mentel *et al.* (2008) isoliert. Die Isolierung erfolgte mit vorgekühlten Lösungen, Geräten und Gefäßen bei 4°C. 1 l TYM-Medium wurde mit 100 ml einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden *T. vaginalis* Vorkultur beimpft. Nach 24 h

Inkubation wurde die Kultur mit 1000 x g für 10 min pelletiert und anschließend zweimal mit 100 ml SMB (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS/KOH pH 7,2, 10 mM β -Mercaptoethanol) gewaschen. Das Pellet wurde in 20 ml SMDI (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS pH 7,2, 10 mM DTT, 50 μ g/ml TLCK (Bachem), 10 μ g/ml Leupeptin (AppliChem)) resuspendiert und in einem Mörser mit 0,5 mm \varnothing Glasperlen 20 min lang aufgeschlossen. Die Glasperlen, Zellkerne, Membranen und nicht aufgeschlossenen Zellen wurden mit 755 x g für 10 min vom Gesamtzellextrakt getrennt. Die Hydrogenosomen und Lysosomen wurden in der nächsten Zentrifugation (10 min; 7500 x g) vom Cytosol getrennt. Das Pellet mit den Hydrogenosomen und Lysosomen wurde in 19 ml SMDI resuspendiert und zu gleichem Volumen einer 90%igen Percoll-Lösung (90% (v/v) Percoll, 10% (v/v) isotonische Saccharose (2,5 M Saccharose, 100 mM MOPS/KOH pH 7,2), 10 mM DTT, 50 μ g/ml TLCK, 10 μ g/ml Leupeptin) gegeben. Die Probe wurde ohne Luftblasen in ein Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann Optiseal Polyallomer Tubes) überführt und mit dem Vertikalrotor VTi50 (Beckmann) bei 30.000 rpm für 45 min mit Bremsen bis 800 rpm zentrifugiert. Die hydrogenosomale Bande wurde mit einer Pasteur-Pipette gesammelt, mit SMDI_{1/10} (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS/KOH pH 7,2, 10 mM DTT, 5 μ g/ml TLCK, 1 μ g/ml Leupeptin) 1/10 verdünnt und für 15 min bei 3000xg zentrifugiert. Die Hydrogenosomen wurden mit 50 ml SMDI-Puffer gewaschen (10 min; 7500xg) und in 500-1000 μ l SMDI resuspendiert. Die temporäre Lagerung erfolgte je nach Folgeversuch bei 4°C oder -20°C, die dauerhafte bei -80°C.

5.8.5 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie der mit dem pH23C-Vektor transfizierten *T. vaginalis* Zellen am LSM 510 Meta Konfokalen Mikroskop von Zeiss am Institut für Genetik der HHU Düsseldorf wurden 12 ml einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Kultur verwendet. Alle Zentrifugationen erfolgten mit 1000 x g für 1 min bei 4°C. Die Zellen wurden pelletiert und mit 750 μ l PBS (8‰ (w/v) NaCl, 0,2‰ (w/v) KCl, 1,44‰ Na₂HPO₄, 0,24‰ (w/v) KH₂PO₄, pH7,4) gewaschen. Die pelletierten Zellen wurde in kaltem Methanol resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert, pelletiert, in kaltem Aceton resuspendiert und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet bei RT trockengelassen, in 1 ml Blocking-PBS (1% BSA (w/v) in PBS) resuspendiert und 15 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei RT pelletiert und mit dem ersten Antikörper (Maus Anti-Hämagglutinin monoklonaler AK (Sigma) und Kaninchen Anti- α SCS polyklonaler AK, beide 1:500 in 1 ml Blocking-Puffer verdünnt) 1h bei RT auf einem sich um 360° drehenden Rotator inkubiert. Nach drei Waschungen von je 10 min mit PBS wurden die Zellen mit den jeweiligen Zweitantikörpern (Alexa Fluor-488 Esel Anti-Maus (grün) und

Alexa-Fluor-594 Esel Anti-Kaninchen (rot), beide von Invitrogen 1:1000 in 1 ml Blocking-Puffer verdünnt) 1h bei RT und im Dunkeln wie beim ersten Antikörper inkubiert. Nach drei Waschungen mit PBS für 10 min im Dunkeln wurden die pelletierten Zellen in 1 Vol. Vectashield[®] mit DAPI (Vector Laboratories) resuspendiert. 10 µl der Suspension wurden auf einen silanisierten Objektträger (Electron Microscopy Sciences) pipettiert, ein großes Deckgläschen luftblasenfrei drauf gelegt und mit Glycerol Gelantine von Sigma versiegelt. Das Präparat wurde bis zur Untersuchung bei 4°C dunkel gelagert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der Software Image Browser (Zeiss).

5.8.6 Elektronenmikroskopie

Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie wurden 12 ml einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Kultur mit 1000 x g für 10 min pelletiert und dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in Fixativ (2,5% (v/v) Glutaraldehyd in 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer pH 7,3) resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden viermal je 10 min mit 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer gewaschen und in 2% (w/v) Osmiumtetroxid (OsO₄) (in 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer, 0,8% (w/v) Kaliumhexacyanoferrat III) resuspendiert. Nach der Osmierung für 2 Stunden wurden die Zellen erneut viermal mit 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer gewaschen. Der erste Teil der Entwässerung erfolgte für jeweils 15 min mit 50% (v/v) und 70% (v/v) Aceton. Bis zu diesen Schritt wurden die Proben am Institut für Zellbiologie an der Heinrich Heine Universität vorbereitet und die Lösungen freundlicherweise von Frau M. Nissen zur Verfügung gestellt. Der zweite Teil der Präparierung wurde freundlicherweise von Frau Dr. K. Bolte am Institut für Zellbiologie an der Philipps Universität Marburg durchgeführt. Nach der restlichen Entwässerung mit 80% (v/v), 90% (v/v) und absoluten Aceton erfolgte die Imprägnierung über Nacht in 1:1 Aceton-Epon Gemisch. Nach der Polymerisation für 48 h bei 60°C erfolgte die Nachkontrastierung der Ultradünnschnitte für 5 min mit gesättigter Uranylacetatlösung und weitere 5 min mit 0,5% Bleicitrat. Die TEM-Aufnahmen erfolgten mit dem Elektronenmikroskop JEOL 2100 TEM bei 80 kV in Kombination mit einer fast-scan 2K 62K CCD Kamera F214 (TVIPS, Gauting). Die Fläche der *T. vaginalis* Zellen und der Hydrogenosomen wurde anhand der Pixelanzahl mit dem Programm GIMP berechnet (5.12.2).

5.8.7 Wachstumskurven

Die Zellen des Wildtyps T1 und des Stammes T1 ΔHMP23 wurden parallel gezählt. Der Versuch wurde viermal wiederholt und mit den Messdaten eine Wachstumskurve hergestellt. 20.000 Zellen wurden in 12 ml TYM-Medium mit Penicillin/Streptomycin (100 U/100 µg)

überführt und bei 37°C inkubiert. Die Zählung erfolgte mit der Thoma neu Kammer von Superior-Marienfeld. Die Anzahl an Zellen pro ml wurde folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{n\text{Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1000 \mu\text{l}}{(0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} \times 16 \text{ kleine Quadrate} \times \text{ausgezählte Quadrate})}$$

5.9 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

5.9.1 Transfektion von *S. cerevisiae*

Die Träger-DNA (50 µg Heringssperma-DNA, Roche) wurde 10 min bei 95°C denaturiert und auf Eis gekühlt. Auf die gefrorenen kompetenten Hefe-Zellen wurde zuerst die Träger-DNA und anschließend 1 µg Plasmid-DNA pipettiert und die Zellen für 60 s bei 37°C in einem Thermomixer mit 300 rpm inkubiert. Es wurden 15 µl 100 mM CaCl₂ hinzugegeben und weitere 3 min geschüttelt. Nach der Zugabe von 75 µl 100 mM CaCl₂ und 1 ml Puffer 2 (40% (w/v) PEG 1000; 200 mM Bicin, pH 8,35) wurde das Reaktionsgefäß dreimal invertiert und 1 h bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 1 min bei 800 x g pelletiert, dreimal mit 500 µl Puffer 3 (150 mM NaCl, 10 mM Bicin, pH 8,35) gewaschen und in 200 µl Puffer 3 resuspendiert. Die Zellen wurden auf SC-Minimalmedium (0,67% (w/v) Yeast Nitrogen Base und 0,192% (w/v) Yeast Synthetic Dropout Medium Supplement ohne Uracil) mit 1,5% (w/v) Agar und 2% (v/v) steril filtrierter Glucose ausplattiert. Die anschließende Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 30°C.

5.9.2 Heterologe Proteinexpression in *S. cerevisiae*

Eine Kolonie der mit dem Vektor pGreg536-HMP23 transfizierten Hefe-Zellen wurde zu 50 ml SC-Minimalmedium mit Glucose (2%) gegeben und 2 Tage bei 30°C mit 200 rpm inkubiert. Das benötigte Volumen für das Animpfen von 500 ml Medium zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,4 wurde mit 1500 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml SC-Minimalmedium mit 2% Galaktose und 1% Raffinose resuspendiert und zu 500 ml SC-Minimalmedium mit 2% Galaktose und 1% Raffinose gegeben. Die Expressionskultur wurde über Nacht bei 30°C mit 200 rpm inkubiert. Der pGreg536 Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Ramezani Rad aus dem Institut für Mikrobiologie, Heinrich Heine Universität, zur Verfügung gestellt.

5.9.3 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung der Mitochondrien aus HMP23 heterolog exprimierenden Hefe-Zellen wurden 0,5 l der Expressionskultur mit 1000 x g bei RT für 5 min pelletiert und mit 20 ml H₂O gewaschen. Nach einer weiteren Waschung mit 20 ml Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl und 0,6 M Sorbitol) wurde das Pellet in 10 ml Waschpuffer resuspendiert und in ein 50 ml Kulturröhrchen mit Schraubdeckel überführt. Nach einer Zentrifugation mit 1000 x g bei RT für 5 min wurde das Pellet in 5 ml Waschpuffer resuspendiert, 1 µl/ml Yeast/Fungal Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) und 1/2 Vol. 0,5 mm Ø Glasperlen dazu gegeben. Nach einer Inkubation auf Eis für 5 min wurde die Probe dreimal 1 min gevortext. Zwischen den einzelnen Vortexschritten wurden die Zellen für jeweils 1 min auf Eis belassen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden 15 min bei 4°C mit 3345 x g zentrifugiert, um Zelltrümmer und Glasperlen abzutrennen. Der Überstand wurde 20 min mit 10.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet mit den Mitochondrien wurde in 200 µl Waschpuffer mit 1 µl/ml Protease Inhibitor resuspendiert und je nach Folgeversuch bei 4°C oder -20°C aufbewahrt. Es wurde auch einen Aliquot des post-mitochondrialen Überstandes (PMÜ) aufbewahrt.

5.10 Arbeiten mit DNA

Folgenden Standardmethoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt:

- Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA
- Restriktion von DNA
- Auftrennung von DNA und RNA Fragmenten durch Agarose-Gele

Folgenden Methoden wurden nach Herstellerangaben durchgeführt:

- Extraktion von DNA aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen
- Klonierung mit dem MultiSite Gateway® Pro Kit von Invitrogen
- Plasmid-Präparation aus *E. coli* mit dem NucleoSpin® Plasmid von Macherey-Nagel
- Ligation mit dem pJet-Vektor von Fermentas
- Ligation mit der Quick Ligase von NEB
- cDNA Synthese mit dem iScript™ cDNA Synthesis Kit von Bio-Rad

5.10.1 Isolierung von RNA und genomischer DNA aus *T. vaginalis*

Für die Isolierung von RNA mit Trizol® und genomischer DNA mit DNAzol® nach Herstellerangaben wurde eine 50 ml Kultur von *T. vaginalis* (5.2.2) 10 min bei 1000 x g und 4°C pelletiert.

5.10.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

5.10.2.1 PCR

Die Amplifikation von definierten DNA-Abschnitten mittels PCR (*polymerase chain reaction*) (Saiki *et al.*, 1988) erfolgte aus 100 ng genomischer oder Plasmid-DNA mit 1 x Polymerasen-spezifischem Puffer, je 0,2 mM dNTPs, je 0,4 µM Oligonukleotide und 1 U DNA-Polymerase. Nach der Initialdenaturierung von 5 min bei 95°C folgten 30 Zyklen von 30 s bei 95°C, 30 s bei 45-65°C (je nach Schmelztemperatur der Oligonukleotide) und 0,5-3 min (je nach Polymerase) bei 72°C und eine End-Elongation von 2-12 min bei 72°C. Der Erfolg der Reaktion wurde auf einem 1 oder 2%-igen Agarosegel kontrolliert. Als DNA-Marker wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix von Fermentas #SM0331 verwendet.

5.10.2.2 Nested PCR

Für die Klonierung von HMP23 mit dem MultiSite GATEWAY[®] Pro von Invitrogen (5.10.5) wurden die Rekombinationssequenzen mittels einer nested PCR vervollständigt. Die Reaktion wurde mit dem Produkt einer Standard-PCR, wie unter 5.10.2.1 beschrieben als Matrize durchgeführt. Der Ansatz enthielt außerdem 1 x Polymerasen-spezifischen Puffer, je 0,2 mM dNTPs, je 0,8 µM Oligonukleotide und 1 U DNA-Polymerase. Nach einer Denaturierung von 2 min bei 95°C folgten 5 Zyklen von 15 s bei 94°C, 30 s bei 45°C und 30 s bei 72°C. Nach einer Elongation von 5 min bei 72°C und einer Denaturierung von 2 min bei 94°C folgten 20 Zyklen von 15 s bei 94°C, 30 s bei 55°C und 30 s bei 72°C. Die End-Elongation dauerte 2 min bei 72°C.

5.10.2.3 Quantitative Real Time PCR

In der klassischen PCR erfolgt die Detektion der DNA-Amplifikation am Ende des letzten Zyklus. Bei der quantitativen real time PCR (qRT-PCR) hingegen wird die DNA-Amplifikation und -Detektion in Echtzeit quantifiziert. Fluoreszenz-Farbstoffe, wie z.B. SYBR[®] Green, interkalieren in das PCR-Produkt und können nach der Interkalation direkt detektiert werden. Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zur Anzahl der Moleküle der amplifizierten Zielsequenz. Mit diesem Vorteil kann in der exponentiellen Phase der PCR-Amplifikation die DNA-Konzentration bestimmt und damit die Anzahl der DNA-Kopien am Anfang der Reaktion berechnet werden (Wittwer *et al.*, 1997).

Die Größe des zu amplifizierenden Sequenzabschnitts liegt im Idealfall zwischen 80 und 250 bp. Die Oligonukleotide sollten ein GC Gehalt von ca. 50% haben, 18 bis 24 Nukleotide lang und komplementär zu einem Teil des Genes im 5'-Bereich sein. Die Oligonukleotide für

diese Arbeit wurden mit Hilfe des Online-Programms Primer BLAST¹ designt. Mit einer Standardkurve kann die Effizienz ermittelt werden, mit der die Zielsequenz mit den verwendeten Oligonukleotiden amplifiziert wird, wobei 100% den Idealwert darstellt. Die Matrizen-DNA wird vorher seriell verdünnt. Es wird der Logarithmus der Verdünnungsreihe (x-Achse) gegen den C_t-Wert (y-Achse) für die entsprechende Konzentration aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient (R²) für die Kurve ist ein Indikator für die Qualität der Kurve und sollte bei R²=1 oder R²=0,999 liegen. Die Effizienz der Oligonukleotide sollte zwischen 90-110% liegen (Ramakers *et al.*, 2003). Eine zusätzliche Kontrolle für den Versuch ist eine Schmelzkurve, mit der überprüft werden kann, ob verschiedene PCR-Produkte amplifiziert wurden, wenn vom Prinzip ausgegangen wird, dass Amplifikate unterschiedlicher Länge und Sequenz auch unterschiedliche Schmelzpunkte aufweisen. Im 10 µl Ansatz für die Reaktion befand sich 1 µl cDNA, 5 µl 2x Mastermix Power SYBR[®] Green (Applied Biosystems) und je 100 nM Oligonukleotid. Nach der Initialdenaturierung von 10 min bei 95°C folgten 40 Zyklen von 15 s bei 95°C und 60 s bei 60°C. Die unterschiedlichen DNA-Konzentrationen der eingesetzten cDNA wurden mit den Messungen für das Haushaltsgen Aktin normalisiert (Suzuki *et al.*, 2000).

Auswertung mittels relativer Quantifizierung: Vor der Auswertung müssen bestimmte Parameter festgelegt werden. Die Basislinie wird in den Punkt gesetzt, die dem die Hintergrundfluoreszenz in den ersten Zyklen (3-15) gemessen wurde. Der Schwellenwert (threshold) wird dort gesetzt, wo sich das Signal für die Fluoreszenz statistisch signifikant im Vergleich zur Basislinie erhöht. Der C_t-Wert (threshold cycle) ist der Zyklus, an dem die Fluoreszenzkurve den Schwellenwert kreuzt. Dieser kann benutzt werden, um die Anzahl der DNA-Kopien am Anfang der Reaktion zu bestimmen. In dieser Arbeit wurden alle Werte automatisch von der Software gesetzt und manuell auf Korrektheit überprüft.

Bei der relativen Quantifizierung wurde das Verhältnis zwischen dem Wildtyp T1 und dem Stamm T1 ΔHMP23 mit der ΔΔC_t-Methode bestimmt (Liu und Saint, 2002). Zuerst wird der C_t-Wert des Kontrollgens, dessen Expression als stabil postuliert wird, dem C_t-Wert des zu quantifizierenden Transkripts subtrahiert (ΔC_t). In einem zweiten Schritt werden die ΔC_t – Werte der Proben voneinander subtrahiert (ΔΔC_t-Wert).

$$C_{t \text{ WT}} - C_{t \text{ Aktin}} = \Delta C_{t \text{ WT}}$$

$$C_{t \text{ ΔH23}} - C_{t \text{ Aktin}} = \Delta C_{t \text{ ΔH23}}$$

$$\Delta C_{t \text{ WT}} - \Delta C_{t \text{ ΔH23}} = \Delta \Delta C_{t}$$

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Unter der Annahme, dass die DNA sich bei jedem Zyklus verdoppelt, bedeutet 1 C_t -Wert Unterschied die doppelte Menge Ausgangs-DNA in der Probe mit dem kleineren C_t -Wert. Um das Verhältnis zwischen zwei Proben zu bestimmen, wird demnach die Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ verwendet.

5.10.3 Klonierung mit dem MultiSite Gateway® Pro Kit

Das Klonieren mit dem MultiSite Gateway® Pro Kit von Invitrogen basiert auf spezifischen Rekombinationssequenzen (*att*) des Bakteriophagen Lambda und hat den Vorteil, dass bis zu vier Gene nach Belieben in unterschiedlicher Reihenfolge hintereinander kloniert werden können (Landy, 1989; Hartley *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2008).

Für die Markierung von HMP23 mit einem doppelten Hämagglutinin-Anhang sowohl N- als auch C-terminal wurden die in der Tabelle 5.7 zusammengefassten pDONR™-Vektoren und Oligonukleotide (Tabelle 5.1) verwendet. HMP23 wurde mittels PCR (5.10.2.1) mit genspezifischen Oligonukleotiden, die ein Teil der Rekombinationsstellen enthielten, aus der genomischen DNA von *T. vaginalis* amplifiziert. Durch eine Nested PCR (5.10.2.2) wurden die Rekombinationsstellen mit den entsprechen Oligonukleotiden vervollständigt. Die Amplifikation des HA-Anhangs mittels PCR erfolgte identisch aus einem Plasmid mit der Sequenz des doppelten Hämagglutinins.

Tabelle. 5.7: Übersicht der verwendeten pDONR™-Vektoren und Oligonukleotide für die Herstellung der Expressionvektoren mit N- (HMP23N) bzw. C-terminal markiertem HMP23 (HMP23C).

	Genspezifische Oligonukleotide		Vektor	Oligonukleotiden für die Rekombinationsstellen	
HMP23N	H23_F_NdeI_B5	H23_R_BamHI_B2	pDONR™ 221 P5-P2	AttB5_Adapter	AttB2_Adapter
HA Anhang für N-Markierung	HA_F_attB	HA_R_attBr5	pDONR™ 221 P1-P5r	AttB1_Adapter	AttB5r_Adapter
HMP23C	H23_F_NdeI_B1	H23_R_BamHI_Br5	pDONR™ 221 P1-P5r	AttB1_Adapter	AttB5r_Adapter

Die Fragmente wurden einzeln mit Hilfe des BP Clonase™ II Enzym-Mixes in dem entsprechenden pDONR-Vektor rekombiniert (BP-Rekombination). Die so entstandenen „Entry Clones“ wurden bei der LR-Rekombination mit Hilfe des LR Clonase™ II Plus Enzym-Mixes mit dem Destination-Vektor pTagVag2 rekombiniert (Abb. 5.1). Beide Reaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Für den Expressionsvektor pHMP23N wurden die pDONR™-Vektoren 221 P5-P2 [HMP23] und 221 P1-P5r [HA] verwendet. Für pH23C wurden die pDONR™-Vektoren 221 P1-P5r [HMP23] und 221 P5-P2 [HA] verwendet. Der Vektor pDONR™ 221 P5-P2 [HA] wurde freundlicherweise von Dr. Verena Zimorski zur

Verfügung gestellt. Der Zielvektor pTagVag2 wurde im Rahmen einer anderen Arbeit mit dem Kit „Gateway® Vector Conversion Systems“ vorbereitet.

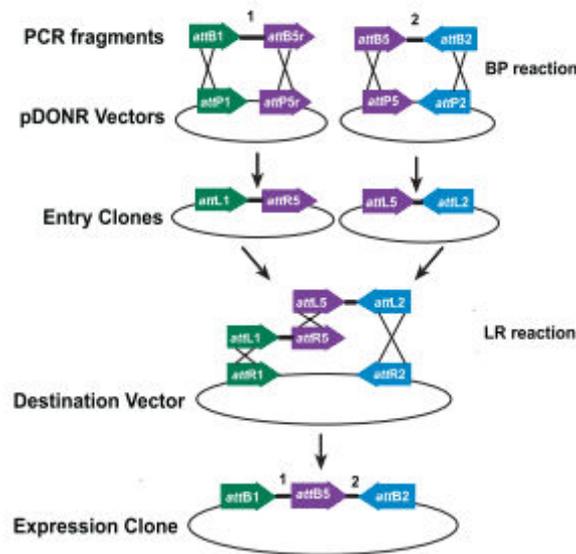


Abb. 5.1: Übersicht des Klonierungswegs mit dem MultiSite Gateway® Pro Kit von Invitrogen. Die Abbildung stammt aus dem Handbuch aus dem Jahr 2006, Version B.

5.11 Arbeiten mit Proteinen

5.11.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe eines Bradford-Microassays bestimmt. Aus der Stammlösung (Bio-Rad Protein Assay) wurde eine 1:5 Verdünnung erstellt. 1 ml Bradford-Reagenz wurde mit 1 µl Proteinlösung versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Mit Hilfe einer BSA-Kalibrierungsgeraden wurde die Konzentration, die proportional zur Extinktion ist, berechnet. Bei der Messung ($\lambda = 595 \text{ nm}$) wurde das Photometer über das Programm „Vision lite“ von Thermo Electro Corporation mit dem PC gesteuert.

5.11.2 1D-SDS-PAGE

Die aufzutrennenden Proben wurden in 1x Lämmli-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol, 10 (v/v) Glycerin, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, bei 95°C für 5 min denaturiert und auf das Sammelgel aufgetragen (Laemmli, 1970). Die Trennung erfolgte mit 5% Sammel- und 12% Trenngelen in OWL Separation systems P9DS (UVP)

mit 120 und 240 V (Sambrook *et al.*, 1989). Als Proteinmarker wurde der PageRuler™ Plus Prestained #26619 von Thermo Scientific verwendet.

5.11.3 2D-SDS-PAGE

Bei der 2D-PAGE werden Proteine zuerst nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und anschließend nach dem Molekulargewicht, wie in Pütz (2007) beschrieben, getrennt.

Probenvorbereitung: 500 mg isolierte Hydrogenosomen wurden mit 16.000 x g für 2 min pelletiert. Für die Fokussierung im pH-Bereich 3-10 wurde das Pellet in 180 µl Lysispuffer R (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% (w/v) CHAPS und 40 mM Tris-HCl pH 9,0) resuspendiert, 1/10 Vol. 10% (w/v) DTT für die Reduktion von Disulfidbrücken hinzugegeben und eine Stunde bei RT inkubiert. Zu der Probe wurden 3% (v/v) Acrylamid gegeben und für 3 h bei RT alkyliert. Für die Fokussierung im pH-Bereich 6-11 wurden die pelletierten Hydrogenosomen in 100 µl Lysispuffer R mit 1,2 µl *DeStreak-Solution* (GE Healthcare) resuspendiert und für 4 h bei RT reduziert. Die Proben wurden mit dem *Ettan 2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare) gefällt und in 360 (pH 4-10) bzw. 380 µl (pH 6-11) Rehydratationspuffer R (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% (w/v) CHAPS, 2‰ (w/v) Bromphenolblau, 0,5% (v/v) IPG-Puffer pH 3-10 bzw. pH 6-11 (GE Healthcare)) mit 1% DTT (w/v) (pH 4-10) bzw. 4,5 µl *DeStreak-Solution* (pH 6-11) resuspendiert und 1 h bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation mit 16.000 x g für 30 min wurde der Überstand in die Mitte eines Stripholders (GE Healthcare) pipettiert und die *Immobiline Dry Strips* pH 3-10 bzw. pH 6-11, je 18 cm (GE Healthcare), darauf platziert.

Erste Dimension: Die Rehydratation und anschließende isoelektrische Fokussierung wurde mit dem Ettan IPGphor IEF System von GE Healthcare durchgeführt. Die Rehydratation dauerte 16 h bei 20°C und 50 µA pro IEF-Streifen. Für die Fokussierung wurde der folgende Ablauf verwendet: 1 h 100 V Step-n-hold, 1 h 200 V Step-n-hold, 1 h 500 V Step-n-hold, 1 h 1000 V Gradient, 1 h 8000 V Gradient, 5 h 8000 V Step-n-hold.

Zweite Dimension: Die IEF-Streifen wurden 15 min in 10 ml Äquilibriumspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 2‰ (w/v) Bromphenolblau) mit 100 mg DTT und anschließend 15 min in 10 ml Äquilibriumspuffer mit 250 mg Iodacetamid auf einem 2D-Schüttler äquilibriert. Für die zweite Dimension wurden die IEF-Streifen neben einen Streifen (0,5 x 2 cm) Whatman®-Papier mit Proteinmarker (5.11.2) auf ein 12% SDS-Gel gelegt und mit erwärmter Agarose-Lösung (Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS), 0,5% (w/v) Agarose M

und 2‰ (w/v) Bromphenolblau) überschichtet. Die Trennung erfolgte bei 12 °C und 20-40 mA pro Gel.

5.11.4 Coomassie-Färbung

Für die Färbung von Proteine im SDS-Gel nach Heukeshoven und Dernick (1988) wurde die Coomassie-Stammlösung (60% (v/v) Methanol, 1 Tablette *Phast Gel Blue R-350* von GE Healthcare) 1:10 mit 10% Essigsäure verdünnt, auf 90°C erhitzt und heiß auf das Gel gegossen. Das Gel wurde eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt und über Nacht bei Raumtemperatur in 10% Essigsäure entfärbt.

5.11.5 Proteolyse von Proteinen im Gel

Die Proteolyse von Proteinen wurde, wenn nicht anders angegeben, bei RT durchgeführt und in einem Thermoschüttler mit 500 rpm geschüttelt. 1 Volumen (Vol.) entspricht der notwendigen Menge, um die Gelstücke vollständig zu bedecken. Die Gelstücke wurden mit einem Skalpell aus dem SDS-Gel ausgestochen, in ca. 1 mm³ große Würfel zerkleinert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke wurden zweimal in doppeltem Volumen Milli-Q Wasser (MQW)/Acetonitril (ACN) im Verhältnis 1:1 (v/v) 15 min geschüttelt. Die Waschlösung wurde entfernt, ein Volumen ACN zugegeben und die Gelstücke 5 min inkubiert. Das ACN wurde abgenommen, ein Volumen 100 mM Ammoniumbicarbonat (BiCa) zugegeben und die Proben 5 min geschüttelt. Zu dem BiCa wurde 1 Vol. ACN gegeben und die Gelstücke für 15 min geschüttelt. Zur Reduktion und Alkylierung von Cystein-Resten wurden zu den trockenen Gelstücken 2 Vol. DTT (10 mM in 100 mM BiCa) gegeben. Der Ansatz wurde 45 min bei 56°C inkubiert, bei RT abgekühlt und das DTT durch 2 Vol. Iodacetamid (55 mM in 100 mM BiCa) ersetzt. Nach der Inkubation von 30 min im Dunkeln wurde die Flüssigkeit abgenommen, 1 Vol. BiCa zugegeben und der Ansatz 15 min geschüttelt. Zu dem BiCa wurde 1 Vol. ACN zugegeben und die Gelstücke weitere 15 min unter Schütteln inkubiert. Die Flüssigkeit wurde entfernt und die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Zu den trockenen Gelstücken wurden 20 µl Trypsinlösung (10 ng/µl in 50 mM BiCa, Promega) zugegeben, und die Proben 10 min auf Eis inkubiert. Die Zugabe der Trypsinlösung wurde so lange wiederholt, bis die Gelstücke nicht weiter aufquollen und vollständig bedeckt waren. Die Trypsinlösung wurde entfernt, die Gelstücke mit 25 mM BiCa bedeckt und der Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Extraktion der Peptide aus den Gelstücken wurden diese 2 min im Ultraschallbad inkubiert und die Flüssigkeit in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß aufbewahrt. Die Gelstücke wurden mit 1 Vol. 25 mM BiCa bedeckt und 20 min geschüttelt. Zu dem BiCa wurde 1 Vol. ACN

gegeben, weitere 15 min geschüttelt, der Ansatz 2 min im Ultraschallbad inkubiert und die Flüssigkeit im gleichen 1,5 ml Reaktionsgefäß wie oben gesammelt. Die Gelstücke wurden zweimal 15 min in 1 Vol. 5% (v/v) Ameisensäure/ACN (1:1) geschüttelt und die Flüssigkeit zu den anderen aufbewahrten Überständen gegeben. Die gesammelten Überstände wurden in der Vakuumzentrifuge bei 60°C bis auf ca. 10 µl eingengt und bei -20 °C gelagert.

5.11.6 Behandlungen mit Proteinase K

Die Behandlungen mit Proteinase K erfolgte verändert, wie von Dyall *et al.* (2003) bzw. Rada *et al.* (2011) beschrieben. Die Behandlung der Hydrogenosomen erfolgte in SM-Puffer (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS/KOH pH 8.0 und 10 mM EDTA). Die Behandlung der Mitochondrien in Import-Puffer (Chan und Lithgow, 2008; 0,6 M Sorbitol, 50 mM HEPES pH 7,4, 2 mM KP_i pH 7,4, 25 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EDTA und 1 mM DTT). Pro Ansatz (1 ml) wurden 200 µg der isolierten Organellen eingesetzt. Die Organellen wurden dreimal mit 1 ml des entsprechenden Puffers (2380 x g, 4°C, 5 min) gewaschen. Die Hydrogenosomen wurden mit und ohne 1% Triton X-100 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit Proteinase K bei 37°C für weitere 30 min behandelt. Die Mitochondrien wurden mit und ohne 1% Triton X-100 30 min bei 25°C inkubiert und anschließend mit Proteinase K auf Eis oder 25°C behandelt. Die Proteolyse wurde durch Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure (TCS, 5.11.9) gestoppt.

5.11.7 Behandlung der Hydrogenosomen und Mitochondrien mit Na_2CO_3

Die Behandlung der Hydrogenosomen und Mitochondrien mit eiskaltem 0,1 M Na_2CO_3 erfolgte nach Fujiki *et al.* (1982). 2 mg der isolierten Organellen wurden in 30 ml Na_2CO_3 resuspendiert, für insgesamt 45 min auf Eis inkubiert und dabei alle 10 min für 10 s geschüttelt. Die Membranen mit den peripheren Membranproteine (MP) wurden durch eine Ultrazentrifugation für 1 h mit 45.000 rpm und bei 4°C im Type 70Ti Rotor (Beckmann) pelletiert. Im Überstand (LP) befanden sich die löslichen Proteinen der Matrix sowie des Intermembranraumes, und die peripheren Proteine, die mit einer der beiden hydrogenosomalen Membranen assoziiert sind und durch den hohen pH-Wert in Lösung gehen. Die Membranen (MP1) wurden zweimal mit 100 µl eiskalten H_2O gewaschen und bei -80°C aufbewahrt. Um Kreuzkontaminationen zu reduzieren, wurde ein Teil der isolierten Membran (MP1) erneut mit Na_2CO_3 wie oben beschrieben behandelt (MP2). Von dem Überstand mit den löslichen Proteinen wurden 20 ml (LP1) von oben abgenommen und der Rest verworfen. Die Hälfte der Fraktion LP1 wurde erneut mit Na_2CO_3 auf 30 ml aufgefüllt,

erneut ultrazentrifugiert und 10 ml von oben abgenommen (LP2). Die Fraktionen LP1+2 wurden bei -20°C aufbewahrt oder sofort mit Trichloressigsäure gefällt (5.11.9).

5.11.8 Solubilisierung der Membranproteine mit Triton X-114

Für die Solubilisierung der Membranproteine wurden 1 mg Hydrogenosomen in Tris-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl und 1 mM EDTA, pH 7,4) mit 2% Triton X-114 resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert (Bordier, 1981; Rada *et al.*, 2011). Der Ansatz wurde mit 20.000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert, das Pellet verworfen und der Überstand 3 min bei 37°C inkubiert. Die Triton X-114 Phase wurde durch eine Zentrifugation mit 13.000 x g für 1 min von der wässrigen Phase getrennt. Die wässrige Phase mit den löslichen Proteinen wurde verworfen und die Triton X-114 Phase mit den Membranproteine in 10 Vol. eiskaltem Tris-Puffer resuspendiert. Die Extraktion der Triton X-114 Phase bei 37°C für 3 min, die Trennung der wässrige Phase und die Zugabe von Tris-Puffer wurden zweimal wiederholt. Abschließend wurde die Triton X-114 Phase durch die Zugabe von 10 Vol. eiskaltem 100%igen Aceton gefällt und auf Eis luftgetrocknet.

5.11.9 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCS)

Für die Fällung von Proteinen wurden 760 µl TCS-Lösung (50% (w/v) Trichloressigsäure (TCS) und 100%igen Aceton im Verhältnis 1: 4,75) pro ml Probe verwendet. Die Probe wurde mit der TCS-Lösung kurz gemischt, über Nacht bei -20°C gefällt und die Proteine mit 16.000 x g für 10 min pelletiert. Um die TCS aus der Probe zu waschen, wurde das Pellet in 1 ml 100%igen Aceton resuspendiert, für 20 min bei RT mit 500 rpm geschüttelt und erneut zentrifugiert. Nach der dritten Waschung wurde das Pellet bei RT getrocknet und in 70 µl Rehydratationspuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% (w/v) CHAPS) resuspendiert. Abschließend wurde die Restsäure durch die Zugabe von 10 µl konzentriertem Tris neutralisiert.

5.11.10 Western-Transfer und Immunodetektion

Die Proteine wurden aus einem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond™ C Extra, Amersham Biosciences) mittels einer Semi-Dry-Elektrotransferapparatur (Multiphor II von Pharmacia Biotech) übertragen (Gershoni und Palade, 1983). Zuerst wurde die Anode mit H₂O befeuchtet und drei in Transferpuffer (40 mM Glycin, 50 mM Tris, 1 mM SDS, 20% (v/v) Methanol) getränkte Lagen Whatman® Papier luftblasenfrei darauf gelegt. Auf das Whatman® Papier wurde die gewässerte Nitrozellulosemembran und anschließend das Gel,

das vorher kurz in H₂O geschwenkt wurde, gelegt. Auf das Gel wurden drei weitere in Transferpuffer getränkte Lagen Whatman® Papier gelegt. Der Transfer erfolgte mit 0,82 mA/cm² für 60 min. Nach dem Transfer wurde die Membran für ca. 1 min mit Ponceau S (0,5% (w/v) Ponceau S; 1% (v/v) Essigsäure) reversibel gefärbt und die restliche Farbe mit Wasser entfernt.

Die Membran wurde 1 h in 10% (w/v) Milchpulver in TBST (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl und 0,1% (v/v) Tween 20) geblockt, mit dem ersten Antikörper, (1:5.000 in 10% (w/v) Milchpulver in TBST verdünnt) 1 h auf dem 3D-Schüttler bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert und dreimal 10 min mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper (1:10000 in 10% (w/v) Milchpulver in TBST verdünnt) 1 h auf dem 3D-Schüttler bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert und 10 min dreimal mit TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte mit 4 ml Lösung A (1,25 mM Luminol in 0,1 M Tris-HCl pH 8,6), 400 µl Lösung B (6 mM para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO) und 1,2 µl 30% (v/v) H₂O₂. Die Reaktion wurde mit einem Lumi-Film Chemilumineszenz Detektionsfilme (Roche) detektiert.

Um das hydrogenosomale Matrixprotein ASCT in den gleichen Proben, die für die Detektion des Hämagglutinin markierten HMP23 verwendet wurden, zu detektieren, wurden anschließend die Antikörper von den Nitrozellulosemembranen nach einem Protokoll von abcam® schonend entfernt. Dazu wurde die Membran bei RT 10 min in Puffer (1,5% (w/v) Glycin, 0,1% (w/v) SDS und 1% (v/v) Tween 20, pH 2,2) geschwenkt, zweimal für 10 min mit PBS und zweimal für 5 min mit TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion der ASCT wie oben beschrieben.

5.12 Bioinformatische Methoden

Die Auswertung der DNA-Sequenzierungen erfolgte mit dem Programm Bioedit². Für die Übersetzung von DNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen wurde das Programm Translate³ genutzt. Für die Ermittlung des Molekulargewichts von Proteinen wurde ein Programm von Scansite⁴ verwendet. Die Suche nach Homologien erfolgte mit BLAST in der nr-Datenbank des „National Center for Biotechnology and Information“ (NCBI⁵) (Altschul *et al.*, 1990). Das Alignieren von Aminosäuresequenzen erfolgte mit ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007).

² www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit

³ <http://web.expasy.org/translate>

⁴ http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi

⁵ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

5.12.1 Voraussage über die Konformation von Proteinen

Die Untersuchung der AS auf β -Faltblätter erfolgte mit den Programmen PRED-TMBB, TMB-Hunt und TMBETA-NET (Bagos *et al.*, 2004; Gromiha und Suwa, 2005; Garrow *et al.*, 2005). Die Voraussagen von α -helikalen transmembranen Domänen und der Topologie von Proteinen erfolgten mit den Programmen TMHMM v.2.0, HMMTOP v.2.0 und SPOCTOPUS.

Das Programm TMHMM v.2.0 arbeitet mit dem Hidden Markov Model (HMM). Die Parameter, die die Länge und den Abstand der transmembranen Domäne (TM) voraussagen, wurden anhand von 160 Proteine, von denen die Lokalisation der transmembranen Domäne bekannt ist, bestimmt (Krogh *et al.*, 2001).

Das Programm HMMTOP arbeitet auch mit dem Hidden Markov Model (HMM) und macht die Voraussagen (*Prediction*) von transmembranen Domänen (TM) anhand der Aminosäuren-Zusammensetzung innerhalb eines Abschnittes (Tusnády und Simon, 2001).

SPOCTOPUS kombiniert ein Hidden Markov Model und eine selbstlernender Netzwerk, um Voraussagen über ein mögliches Signal-Peptid und transmembrane Domänen zu machen (Viklund *et al.*, 2008).

5.12.2 Phylogenetische Untersuchungen

MAFFT (**m**ultiple sequence **a**lignment tool using **f**ast **f**ourier **t**ransform) ist ein Programm, das Aminosäuresequenzen zu einem globalen multiplen Alignment zusammensetzen kann. Das Programm ProtTest 2.4 bestimmt das beste Model für die Proteinevolution (Abascal *et al.*, 2005). Mit PhyML wurden maximum likelihood Bäume mit Bootstrapreplikaten erzeugt und aus diesen mit dem Programm Consensus aus dem Phylip Paket v3.6 ein Konsensusbaum nach der Mehrheitsregel bestimmt (Felsenstein, 1989; Guindon und Gascuel, 2003).

5.12.3 Identitäten und Ähnlichkeiten aus globalen Alignments

Das Programm Needle aus dem EMBOSS Paket (*European Molecular Biology Open Software Suite*) berechnet für zwei Sequenzen ein optimales globales Alignment, in dem die Sequenzen eine optimale Ausrichtung unter Einsetzen von Gaps erreichen (Needleman und Wunsch, 1970; Rice *et al.*, 2000).

5.12.4 Berechnung von Flächen

Es wurden nur die Hydrogenosomen gemessen, bei denen die Membran deutlich zu erkennen war. So sollten die Hydrogenosomen ausgeschlossen werden, die nicht in der Mitte durchgeschnitten wurden. Die Berechnung der Fläche der *T. vaginalis* Zelle und der Hydrogenosomen erfolgte anhand der Pixelanzahl mit dem Programm GIMP (*GNU Image Manipulation Program*) v.2.6.11. Es wurde bestimmt, wie viele Pixel sich z.B. in den Hydrogenosomen befinden. Mit Hilfe der Pixelanzahl und der Länge des Maßstabbalkens wurde festgestellt, wie viele Pixel 1 nm entsprechen und anschließend die Fläche hochgerechnet.

6. Literatur

- Abascal F, Zardoya R, Posada D. 2005.** ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**: 2104-2105.
- Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE. 1994.** Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**: 621-628.
- Adl S, Simpson A, Farmer M, et al. 2005.** The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukar. Microbiol* **52**: 399-451.
- Akhmanova A, Voncken F, van A, et al. 1998.** A hydrogenosome with a genome. *Nature* **396**: 527-528.
- Al Zaid Siddiquee K, Arauzo-Bravo MJ, Shimizu K. 2004.** Metabolic flux analysis of pykF gene knockout *Escherichia coli* based on 13 C-labeling experiments together with measurements of enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 407-417.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Andrade MA, Perez-Iratxeta C, Ponting CP. 2001.** Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J. Struct. Biol.* **134**: 117-131.
- Aurrecoechea C, Brestelli J, Brunk BP, et al. 2009.** GiardiaDB and TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Nucleic Acids Res.* **37**: D526-D530.
- Bagos PG, Liakopoulos TD, Spyropoulos IC, Hamodrakas SJ. 2004.** PRED-TMBB: a web server for predicting the topology of β -barrel outer membrane proteins. *Nucleic Acids Res.* **32**: W400-W404.
- Bamber L, Harding M, Monne M, Slotboom D, Kunji ERS. 2007.** The yeast mitochondrial ADP/ATP carrier functions as a monomer in mitochondrial membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 10830-10834.
- Beach DH, Holz G, Singh BN, Lindmark DG. 1990.** Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**: 175-190.
- Becker T, Gebert M, Pfanner N, van der Laan M. 2009.** Biogenesis of mitochondrial membrane proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**: 484-493.
- Benchimol M. 2001.** Hydrogenosome morphological variation induced by fibronectin and other drugs in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol. Res.* **87**: 215-222.
- Benchimol M, Aquino Almeida J, de Souza W. 1996a.** Further studies on the organization of the hydrogenosome in *Tritrichomonas foetus*. *Tissue Cell* **28**: 287-299.
- Benchimol M, de Souza W. 1983.** Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. *J. Protozool.* **30**: 422-425.

- Benchimol M, Elias CA, de Souza W. 1982.** *Tritrichomonas foetus*: Ultrastructural localization of calcium in the plasma membrane and in the hydrogenosome. *Exp. Parasitol.* **54**: 277-284.
- Benchimol M, Engelke F. 2003.** Hydrogenosome behavior during the cell cycle in *Tritrichomonas foetus*. *Biol. Cell* **95**: 283-293.
- Benchimol M, Johnson PJ, de Souza W. 1996b.** Morphogenesis of the hydrogenosome: An ultrastructural study. *Biol. Cell* **87**: 197-205.
- Biagini GA, Hayes AJ, Suller MTE, Winters C, Finlay BJ, Lloyd D. 1997.** Hydrogenosomes of *Metopus contortus* physiologically resemble mitochondria. *Microbiology* **143**: 1623-1629.
- Bill R, Henderson P, Iwata S, et al. 2011.** Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nat. Biotechnol.* **29**: 335-340.
- Bordier C. 1981.** Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* **256**: 1604-1607.
- Bouche N, Bouchez D. 2001.** Arabidopsis gene knockout: phenotypes wanted. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **4**: 111-117.
- Bradley PJ. 1997.** Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist *Trichomonas*: similarities with mitochondrial protein import. *EMBO J.* **16**: 3484-3493.
- Bui ET, Bradley PJ, Johnson PJ. 1996.** A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 9651-9656.
- Burstein D, Gould SB, Zimorski V, et al. 2012.** A machine-learning approach to identify hydrogenosomal proteins in *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot. Cell* **11**: 217-228.
- Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, et al. 2007.** Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* **315**: 207-212.
- Castegna A, Scarcia P, Agrimi G, et al. 2010.** Identification and Functional Characterization of a Novel Mitochondrial Carrier for Citrate and Oxoglutarate in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **285**: 17359-17370.
- Chloupková M, Reaves SK, LeBard LM, Koeller DM. 2004.** The mitochondrial ABC transporter Atm1p functions as a homodimer. *FEBS Lett.* **569**: 65-69.
- Chou PY, Fasman GD. 1974.** Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* **13**: 211-222.
- Chou PY, Fasman GD. 1977.** Secondary structural prediction of proteins from their amino acid sequence. *Trends in Biochem. Sci.* **2**: 128-131.
- Clark CG, Diamond LS. 2002.** Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 329-341.
- Clemens DL, Johnson PJ. 2000.** Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. *Mol. Biochem. Parasitol.* **106**: 307-313.

- Cotch MF, Pastorek J, Nugent RP, et al. 1997.** *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Sex. Transm. Dis.* **24**: 353-360.
- Cowan SW, Rosenbusch JP. 1994.** Folding pattern diversity of integral membrane proteins. *Science* **264**: 914-916.
- de Andrade RI, Einicker-Lamas M, Roney BR, et al. 2006.** Cardiolipin in hydrogenosomes: evidence of symbiotic origin. *Eukaryot. Cell* **5**: 784-787.
- Delgadillo MG, Liston DR, Niazi K, Johnson PJ. 1997.** Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 4716-4720.
- Dolezal P, Dancis A, Lesuisse E, et al. 2007.** Frataxin, a Conserved Mitochondrial Protein, in the Hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot. Cell* **6**: 1431-1438.
- Dolezal P, Likic V, Tachezy J, et al. 2006.** Evolution of the Molecular Machines for Protein Import into Mitochondria. *Science* **313**: 314-318.
- Dolezal P, Smid O, Rada P, et al. 2005.** Giardia mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 10924-10929.
- Duy D, Soll J, Philippar K. 2007.** Solute channels of the outer membrane: from bacteria to chloroplasts. *Biol. Chem.* **388**: 879-889.
- Dyall S, Lester D, Schneider R, et al. 2003.** *Trichomonas vaginalis* Hmp35, a putative pore-forming hydrogenosomal membrane protein, can form a complex in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **278**: 30548-30561.
- Dyall S, Koehler C, Delgadillo-Correa M, et al. 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.
- Embley TM, Martin W. 2006.** Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* **440**: 623-630.
- Embley TM, van der Giezen M, Horner D, Dyal P, Bell S, Foster P. 2003.** Hydrogenosomes, Mitochondria and Early Eukaryotic Evolution. *IUBMB Life* **55**: 387-395.
- Esser C, Ahmadinejad N, Wiegand C. 2004.** A Genome Phylogeny for Mitochondria Among α -Proteobacteria and a Predominantly Eubacterial Ancestry of Yeast Nuclear Genes. *Mol. Biol. Evol.* **21**: 1643-1660.
- Fairman JW, Noinaj N, Buchanan SK. 2011.** The structural biology of β -barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**: 523-531.
- Felsenstein J. 1989.** PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 164-166.
- Firlej-Kwoka E, Strittmatter P, Soll J, Bölter B. 2008.** Import of preproteins into the chloroplast inner envelope membrane. *Plant Mol. Biol.* **68**: 505-519.

- Fujiki Y, Hubbard AL, Fowler S, Lazarow PS. 1982.** Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **93**: 97-102.
- Garrow AG, Agnew A, Westhead DR. 2005.** TMB-Hunt: a web server to screen sequence sets for transmembrane β -barrel proteins. *Nucleic Acids Res.* **33**: W188-W192.
- Gavel Y, von Heijne G. 1992.** The distribution of charged amino acids in mitochondrial inner-membrane proteins suggests different modes of membrane integration for nuclearly and mitochondrially encoded proteins. *Eur. J. Biochem.* **205**: 1207-1215.
- Gerdes F, Tatsuta T, Langer T. 2012.** Mitochondrial AAA proteases — Towards a molecular understanding of membrane-bound proteolytic machines. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**: 49-55.
- Germot A, Philippe H, Le G. 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. U. S. A.* **93**: 14614-14617.
- Gershoni J, Palade G. 1983.** Protein blotting: Principles and applications. *Anal. Biochem.* **131**: 1-15.
- Giaever G, Chu AM, Ni L, et al. 2002.** Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**: 387-391.
- Gohil V, Greenberg M. 2009.** Mitochondrial membrane biogenesis: phospholipids and proteins go hand in hand. *J. Cell Biol.* **184**: 469-472.
- Gray MW, Burger G, Lang BF. 2001.** The origin and early evolution of mitochondria. *Genome. Biol.* **2**: 1018.1-1018.5.
- Gromiha MM, Suwa M. 2005.** A simple statistical method for discriminating outer membrane proteins with better accuracy. *Bioinformatics* **21**: 961-968.
- Gu Z, Steinmetz L, Gu X, Scharfe C, Davis R, Li W. 2003.** Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* **421**: 63-66.
- Guidotti G. 1972.** Membrane Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **41**: 731-752.
- Guindon S, Gascuel O. 2003.** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* **52**: 696-704.
- Hamel P, Saint-Georges Y, Pinto B de, Lachacinski N, Altamura N, Dujardin G. 2004.** Redundancy in the function of mitochondrial phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Microbiol.* **51**: 307-317.
- Harrison R, Papp B, Pal C, Oliver S, Delneri D. 2007.** Plasticity of genetic interactions in metabolic networks of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2307-2312.
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. 2000.** DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* **10**: 1788-1795.
- Heger A, Holm L. 2000.** Rapid automatic detection and alignment of repeats in protein sequences. *Proteins* **41**: 224-237.

- Henderson R, Unwin PN. 1975.** Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* **257**: 28-32.
- Heukeshoven J, Dernick R. 1988.** Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem Development Unit. *Electrophoresis* **9**: 60-61.
- Horner DS, Hirt RP, Embley TM. 1999.** A single eubacterial origin of eukaryotic pyruvate:ferredoxin oxidoreductase genes: implications for the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 1280-1291.
- Hrdy I, Hirt R, Dolezal P, et al. 2004.** Trichomonas hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* **432**: 618-622.
- Huang Y, Smith BS, Chen LX, Baxter RHG, Deisenhofer J. 2009.** Insights into pilus assembly and secretion from the structure and functional characterization of usher PapC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 7403-7407.
- Indiveri C. 2010.** Studying amino acid transport using liposomes. *Methods Mol Biol.* **606**: 55-68.
- Jansen G, Wu C, Schade B, Thomas DY, Whiteway M. 2005.** Drag&Drop cloning in yeast. *Gene* **344**: 43-51.
- Johnson JE, Cornell RB. 1999.** Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions (review). *Mol. Membr. Biol.* **16**: 217-235.
- Jones PM, George AM. 1999.** Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**: 187-202.
- Jungwirth H, Kuchler K. 2006.** Yeast ABC transporters - A tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett.* **580**: 1131-1138.
- Khandelia H, Ipsen JH, Mouritsen OG. 2008.** The impact of peptides on lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**: 1528-1536.
- Kleffel B, Garavito RM, Baumeister W, Rosenbusch JP. 1985.** Secondary structure of a channel-forming protein: porin from *E. coli* outer membranes. *EMBO J.* **6**: 1589-1592.
- Klingenberg M. 2008.** The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**: 1978-2021.
- Koebnik R, Locher KP, Van G. 2000.** Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **37**: 239-253.
- Kovermann P, Meyer S, Hörtensteiner S, et al. 2007.** The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *Plant J.* **52**: 1169-1180.
- Krogh A, Larsson B, von H, Sonnhammer EL. 2001.** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**: 567-580.
- Kuan J, Saier M. 1993.** The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional, and evolutionary relationships. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 209-233.

- Kucknoor A, Mundodi V, Alderete J. 2005.** *Trichomonas vaginalis* adherence mediates differential gene expression in human vaginal epithelial cells. *Cell Microbiol.* **7**: 887-897.
- Kulda J. 1999.** Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International J. Parasitol.* **29**: 199-212.
- Kulda J, Čerkasov J, Demeš P, Čerkasovová A. 1984.** *Tritrichomonas foetus*: Stable anaerobic resistance to metronidazole in vitro. *Exp. Parasitol.* **57**: 93-103.
- Kulda J, Tachezy J, Cerkasovova A. 1993.** In vitro induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**: 262-269.
- Kunji E, Robinson A. 2006.** The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**: 1237-1248.
- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laga M, Manoka A, Kivuvu M, et al. 1993.** Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS* **7**: 95-102.
- Lahti CJ, d'Oliveira CE, Johnson PJ. 1992.** Beta-succinyl-coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. *J. Bacteriol.* **174**: 6822-6830.
- Lahti CJ, Johnson PJ. 1991.** *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal proteins are synthesized on free polyribosomes and may undergo processing upon maturation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **46**: 307-310.
- Lal K, Noel CJ, Field MC, Goulding D, Hirt RP. 2006.** Dramatic reorganisation of *Trichomonas* endomembranes during amoebal transformation: A possible role for G-proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* **148**: 99-102.
- Land KM, Clemens DL, Johnson PJ. 2001.** Loss of multiple hydrogenosomal proteins associated with organelle metabolism and high-level drug resistance in trichomonads. *Exp. Parasitol.* **97**: 102-110.
- Land KM, Delgadillo-Correa MG, Tachezy J, et al. 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.
- Larkin M, Blackshields G, Brown N, et al. 2007.** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.
- Larsen WJ. 1970.** Genesis of mitochondria in insect fat body. *J. Cell. Biol.* **47**: 373-383.
- Lindmark DG, 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.
- Lister R, Carrie C, Duncan O, et al. 2007.** Functional definition of outer membrane proteins involved in preprotein import into mitochondria. *Plant Cell* **19**: 3739-3759.

- Liu W, Saint D. 2002.** A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal. Biochem.* **302**: 52-59.
- Lloyd D, Müller M. 1979.** Respiration of *Tritrichomonas foetus*: absence of detectable cytochromes. *J. Parasitol.* **65**: 466-469.
- Low MG. 1987.** Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. *Biochem. J.* **244**: 1-13.
- Mannella CA, Forte M, Colombini M. 1992.** Toward the molecular structure of the mitochondrial channel, VDAC. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**: 7-19.
- Marouga R, David S, Hawkins E. 2005.** The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal. Bioanal. Chem.* **382**: 669-678.
- 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, Müller M. 1998.** The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**: 37-41.
- Martin W, Russell MJ. 2003.** On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philos. Trans. R. Soc. B* **358**: 59-85.
- Mehlhorn H, Piekarski G. 1998.** *Grundriß der Parasitenkunde: Parasiten des Menschen und der Nutztiere*, 5th edn. Stuttgart u.a: G. Fischer.
- 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.
- Morada M, Smid O, Hampl V, et al. 2011.** Hydrogenosome-localization of arginine deiminase in *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **176**: 51-54.
- Mukherjee M, Brown MT, McArthur AG, Johnson PJ. 2006a.** Proteins of the Glycine Decarboxylase Complex in the Hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot. Cell* **5**: 2062-2071.
- Mukherjee M, Sievers SA, Brown MT, Johnson PJ. 2006b.** Identification and Biochemical Characterization of Serine Hydroxymethyl Transferase in the Hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot. Cell* **5**: 2072-2078.
- Müller M. 1986.** Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. *Biochem. Pharmacol.* **35**: 37-41.
- Müller M. 1988.** Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**: 465-488.
- Müller M. 1993.** The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2879-2889.
- Müller M, Mentel M, van Hellemond J, et al. 2012.** Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. R. in press*.

- Needleman SB, Wunsch CD. 1970.** A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* **48**: 443-453.
- Nelson DR, Felix CM, Swanson JM. 1998.** Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family. *J. Mol. Biol.* **277**: 285-308.
- Neupert W, Herrmann JM. 2007.** Translocation of Proteins into Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 723-749.
- Ortiz D, Johnson PJ. 2003.** Tetracycline-inducible gene expression in *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **128**: 43-49.
- Otera H, Taira Y, Horie C, et al. 2007.** A novel insertion pathway of mitochondrial outer membrane proteins with multiple transmembrane segments. *J. Cell Biol.* **179**: 1355-1363.
- Palmieri F, Bisaccia F, Capobianco L, et al. 1993.** Transmembrane topology, genes, and biogenesis of the mitochondrial phosphate and oxoglutarate carriers. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**: 493-501.
- Papp B, Pal C, Hurst L. 2004.** Metabolic network analysis of the causes and evolution of enzyme dispensability in yeast. *Nature* **429**: 661-664.
- Paul C, Rosenbusch JP. 1985.** Folding patterns of porin and bacteriorhodopsin. *EMBO J.* **4**: 1593-1597.
- Pereira-Neves A, Benchimol M. 2007.** Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol. Cell* **99**: 87-101.
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. 1998.** Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 300-317.
- Pütz S. 2007.** Charakterisierung des hydrogenosomalen Proteoms aus dem mikroaerophilen Humanparasiten *Trichomonas vaginalis*, Inaugural-Dissertation, Heinrich Heine Universität.
- Pütz S, Gelius-Dietrich G, Piotrowski M, 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.
- Quon DV, d'Oliveira CE, Johnson PJ. 1992.** Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 4402-4406.
- Rada P, Doležal P, Jedelský PL, et al. 2011.** The Core Components of Organelle Biogenesis and Membrane Transport in the Hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *PLoS ONE* **6**: e24428.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. 2003.** Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **339**: 62-66.
- Rasoloson D, Tomkova E, Cammack R, Kulda J, Tachezy J. 2001.** Metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen. *Parasitology* **123**: 45-56.

- Rice P, Longden I, Bleasby A. 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* **16**: 276-277.
- Robinson A, Overy C, Kunji E. 2008. The mechanism of transport by mitochondrial carriers based on analysis of symmetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 17766-17771.
- Roger AJ, Clark CG, Doolittle WF. 1996. A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 14618-14622.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual Vol. 2*, 2nd edn. S.I: Cold Spring Harbor.
- Sasaki Y, Sone T, Yahata K, et al. 2008. Multi-gene gateway clone design for expression of multiple heterologous genes in living cells: Eukaryotic clones containing two and three ORF multi-gene cassettes expressed from a single promoter. *J. Biotechnol.* **136**: 103-112.
- Sasaki Y, Sone T, Yoshida S, et al. 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.
- Schagger H, Cramer WA, von J. 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**: 220-230.
- Schnaitman C, Greenawalt JW. 1968. Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *J. Cell Biol.* **38**: 158-175.
- Schneider RE, Brown MT, Shiflett AM, et al. 2011. The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. *Int. J. Parasitol.* **41**: 1421-1434.
- Schroers A, Burkovski A, Wohlrab H, Kramer R. 1998. The phosphate carrier from yeast mitochondria. Dimerization is a prerequisite for function. *J. Biol. Chem.* **273**: 14269-14276.
- Seelig J. 2004. Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**: 40-50.
- Shug AL, Shrago E. 1973. Inhibition of phosphoenolpyruvate transport via the tricarboxylate and adenine nucleotide carrier systems of rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **53**: 659-665.
- Siegenthaler P, Sutter J, Rawyler A. 1988. The transmembrane distribution of galactolipids in spinach thylakoid inside-out vesicles is opposite to that found in intact thylakoids. *FEBS Lett.* **228**: 94-98.
- Sigrist C, Cerutti L, de C, et al. 2010. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res.* **38**: D161-D166.
- Sluse FE. 1996. Mitochondrial metabolite carrier family, topology, structure and functional properties: an overview. *Acta Biochim. Pol.* **43**: 349-360.

- Šmíd O, Matušková A, Harris SR, et al. 2008.** Reductive Evolution of the Mitochondrial Processing Peptidases of the Unicellular Parasites *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*. *PLoS Pathog.* **4**: e1000243.
- Smith CK, Withka JM, Regan L. 1994.** A thermodynamic scale for the beta-sheet forming tendencies of the amino acids. *Biochemistry* **33**: 5510-5517.
- Sogin ML. 1991.** Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1**: 457-463.
- Stabler RM. 1954.** *Trichomonas gallinae*: a review. *Exp. Parasitol.* **3**: 368-402.
- Steck TL. 1974.** The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J. Cell Biol.* **62**: 1-19.
- Street DA, Wells C, Taylor-Robinson D, Ackers JP. 1984.** Interaction between *Trichomonas vaginalis* and other pathogenic micro-organisms of the human genital tract. *Br. J. Vener. Dis.* **60**: 31-38.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. 1990.** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60-89.
- Sutak R, Dolezal P, Fiumera H, et al. 2004.** Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 10368-10373.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. 2000.** Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* **29**: 332-337.
- Tachezy J, Sanchez LB, Muller 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.
- Taglicht D, Michaelis S. 1998.** *Saccharomyces cerevisiae* ABC proteins and their relevance to human health and disease. *Methods Enzymol.* **292**: 130-162.
- Tian W, Skolnick J. 2003.** How well is enzyme function conserved as a function of pairwise sequence identity? *J. Mol. Biol.* **333**: 863-882.
- Tjaden J, Haferkamp I, Boxma B, Tielens A, Huynen M, Hackstein J. 2004.** A divergent ADP/ATP carrier in the hydrogenosomes of *Trichomonas gallinae* argues for an independent origin of these organelles. *Mol. Microbiol.* **51**: 1439-1446.
- Todd AE, Orengo CA, Thornton JM. 2001.** Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective. *J. Mol. Biol.* **307**: 1113-1143.
- Todisco S, Agrimi G, Castegna A, Palmieri F. 2006.** Identification of the mitochondrial NAD⁺ transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **281**: 1524-1531.
- Tohsatot Y, Baba T, Mazaki Y, Ito M, Wanner BL, Mori H. 2010.** Environmental dependency of gene knockouts on phenotype microarray analysis in *Escherichia coli*. *J. Bioinform. Comput. Biol.* **08**: 83-99.
- Tschudi C, Pearce EJ. 2000.** *Biology of parasitism*. Boston: Kluwer Academic.

- Tusnády GE, Simon I. 2001.** The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**: 849-850.
- van der Giezen M, Sjollem KA, Artz RR, Alkema W, Prins RA. 1997.** Hydrogenosomes in the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* have a double membrane but lack an associated organelle genome. *FEBS Lett.* **408**: 147-150.
- Viklund H, Bernsel A, Skwark M, Elofsson A. 2008.** SPOCTOPUS: a combined predictor of signal peptides and membrane protein topology. *Bioinformatics* **24**: 2928-2929.
- Vogt J, Schulz GE. 1999.** The structure of the outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence. *Structure* **7**: 1301-1309.
- von Heijne G. 1986.** The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J.* **5**: 3021-3027.
- von Heijne G. 1999.** Recent advances in the understanding of membrane protein assembly and structure. *Q. Rev. Biophys.* **32**: 285-307.
- Wagner A. 2000.** Robustness against mutations in genetic networks of yeast. *Nat. Genet.* **24**: 355-361.
- Walker JE. 1992.** The mitochondrial transporter family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**: 519-526.
- Wallin E, von Heijne G. 1998.** Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* **7**: 1029-1038.
- Wang J, Lindsay B, Leebens-Mack J, et al. 2004.** EST clustering error evaluation and correction. *Bioinformatics* **20**: 2973-2984.
- Westrop GD. 2006.** Cysteine Biosynthesis in *Trichomonas vaginalis* Involves Cysteine Synthase Utilizing O-Phosphoserine. *J. Biol. Chem.* **281**: 25062-25075.
- Williams B, Haferkamp I, Keeling P. 2008.** An ADP/ATP-specific mitochondrial carrier protein in the microsporidian *Antonospora locustae*. *J. Mol. Biol.* **375**: 1249-1257.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. 1997.** Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **22**: 130-1, 134-8.
- Wojtczak L, Baranska J, Zborowski J, Drahota Z. 1971.** Exchange of phospholipids between microsomes and mitochondrial outer and inner membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **249**: 41-52.
- Wojtkowska M, Jakalski M, Pienkowska JR, et al. 2012.** Phylogenetic Analysis of Mitochondrial Outer Membrane β -Barrel Channels. *Genome Biol. Evol.* **4**: 110-125.
- Wright J, Webb R, O'Donoghue P, Upcroft P, Upcroft J. 2010.** Hydrogenosomes of Laboratory-Induced Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis* Lines are Downsized While Those from Clinically Metronidazole-Resistant Isolates Are Not. *J. Eukaryot. Microbiol.* **57**: 171-176.
- Yang D, Oyaizu Y, Oyaizu H, Olsen GJ, Woese CR. 1985.** Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 4443-4447.

- Yarlett N, Hackstein JHP. 2005.** Hydrogenosomes: One Organelle Multiple Origins. *BioScience* **55**: 657-668.
- Young L. 2001.** Role of the ABC Transporter Mdl1 in Peptide Export from Mitochondria. *Science* **291**: 2135-2138.
- Zubay G. 1973.** In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu. Rev. Genet.* **7**: 267-287.

Geräte

Autoklav	Fedegari
Biofuge Fresco: Rotor 3325	Heraeus
Concentrator 5301 (Speed Vac)	Eppendorf
Eismaschine	Ziegra
Elektroblot Novablot Multiphor II	Pharmacia Biotech
Eppendorfschüttler	Eppendorf
Feinwaage BP61	Sartorius
Gelkammer Sub-Cell®GT	Biorad
Gene Pulser	Biorad
Heizblock	HLC
Brutschränke	Heraeus
Magnetrührer IKA	Labortechnik
Mikroliter Pipette P2, P20, P200, P1000	Gilson
Mikrowelle Quick Cookman	Daewoo
qRT-PCR Cyclers 7500 Fast	Applied Biosystems
pH-Meter	Schott
PowerPac 300/3000	Biorad
Rotator für 1,5 ml Reaktionsgefäßen	MACSmix™
Schüttelinkubator	GFL
SDS-Gelkammer P9DS (UVPM)	OWL Separation systems
Sterilbank	Heraeus
Taumelschüttler Multi-3D-Shaker	Peqlab
Thermomixer Compact	Eppendorf
Ultraschallgerät Sonoplus HD60	BANDELIN
Vakuumpumpe CVC 2000	Vacubrand
Vortex REAX top	Heidolph
Waage BL1500S	Sartorius
Wasserbad	GFL
Ultrazentrifuge L7-55	Beckmann
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus
Zentrifuge RC 5B Plus	Sorvall

Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10^{-6})
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
A	Adenin; Ampere
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
ASCT	Acetat:Succinat-CoA Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines (Rinder-)Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propansulfonat
CIAP	Calf intestinal alkaline phosphatase
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-Threitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
F	Farad
FD	Ferredoxin
FeS	Eisen-Schwefel-Cluster
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m s}^{-2}$); Gramm
G	Guanin
Gen.	genomisch
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
kb	Kilobase = 1000 Basenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	mol pro Liter
m	Milli (10^{-3})
min	Minute
mtDNA	mitochondriale DNA
mol	$6,3 \times 10^{23}$ Teilchen
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
n	Nano (10^{-9})
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PFO	Pyruvat: Ferredoxin Oxidoreduktase
P_i	Phosphat
pH	$-\log_{10}[\text{H}^+]$
qRT-PCR	quantitative real time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
s	sekunde
SCS	Succinyl Coenzym A Synthetase

SDS	sodium dodecyl sulfate; Natrium-Dodecylsulfat
T	Thymin
TLCK	N _α -Tosyl-L-lysinchloromethylketon - Hydrochlorid
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (unit)
V	Volt
v/v	Volumenprozent
Vol.	Volumen
w/v	Gewichtsprozent

Einbuchstabencode der Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

Anhang 1

Tabelle A1.1: Identitäten in % für HMP23 aus dem globalen Alignment und der BLAST-Suche

UniProt Zg. Nr.	Name	HMP23 ID (global)	Name	HMP23 ID (BLAST)
A2FMX1	HMP23	100	HMP23	100,0
A2EZ28	TVAG_485120	38,9	TVAG_485120	41,3
A2FGM5	TVAG_077910	31,6	TVAG_423530	31,5
A2DTJ1	TVAG_423530	30,3	TVAG_087280	27,5
A2EN42	TVAG_087280	26,5	TVAG_077910	27,1
A2E1Z7	h31_3 TVAG_164560	17,9	CMC1_YEAST_sp	6,4
P04710	ADT1	16,5	OAC1_YEAST_sp	6,0
Q9NI37	h31_1 TVAG_237680	16,4	YP011_YEAST_sp	5,5
P32332	OAC1	16,2	ADT3_YEAST_sp	4,1
P18239	ADT2	15,6	ADT2_YEAST_sp	4,1
Q06497	ANT1	15	ADT1_YEAST_sp	4,1
Q03028	ODC1	14,1		
P39953	YEA6	13,9		
A2DUD3	h31_5 TVAG_262210	13,5		
P38087	YMC2	12,9		
B8CA20	<i>T. pseudonana</i> MCF	12,8		
P23500	MRS4	12,6		
P40556	YIA6	12,5		
P32331	YMC1	12,5		
Q12375	ORT1	12,2		
Q12251	YP011	12		
Q06143	DIC1	11,9		
P40464	FLX1	11,6		
P53257	TPC1	11,2		
Q12289	CRC1	11,2		
P18238	ADT3	11,1		
P53320	MTM1	11		
P40035	PIC2	10,7		
Q99297	ODC2	10,5		
Q03829	YM39	10,5		
A2FII9	h31_2 TVAG_051820	10,3		
P33303	SFC1	10		
Q07534	S2538	10		
P23641	MPCP	10		
P38921	PET8	10		
D6W196	CMC1	8,6		
P38702	LEU5	7,2		
Q04013	YHM2	7,1		
A2F4V4	H31_4 TVAG_196220	6,9		
P38127	RIM2	6,4		
Q12482	AGC1	5,5		
P38988	GGC1	5,3		
P10566	MRS3	5,2		
P38152	TXTP	4		
P43617	YFL5	3,2		

Zg. Nr.: Zugangsnummer; ID: Identität

Anhang 2

Tabelle A2.1: Anzahl der Zellen des Wildtyps *T. vaginalis* T1 für die Herstellung der Wachstumskurve.

Versuch Nr.	WT T1				\bar{x}	\pm
	1	2	3	4		
Stunden	Zellen/ml					
0					20.000	0
6	46.875	31.250	31.250	62.500	42.969	14.960
23	511.719	578.125	562.500	531.250	545.899	29.983
25	750.000	781.250	781.250	937.500	812.500	84.625
27	2.156.250	1.062.500	1.062.500	781.250	1.265.625	608.373
29	1.152.344	1.406.250	1.687.500	968.750	1.303.711	312.474
31	1.621.094	2.812.500	2.281.250	2.187.500	2.225.586	487.999
33	-	2.656.250	2.187.500	2.187.500	2.343.750	270.633
47	4.609.376	-	4.062.500	3.125.000	3.932.292	750.705
48	4.765.625	-	3.750.000	3.750.000	4.088.542	586.371
49,5	4.492.118	-	5.781.250	5.468.750	5.247.373	672.474
51	4.843.750	-	4.062.500	5.156.250	4.687.500	563.367
53	4.414.063	-	3.906.250	5.468.750	4.596.354	797.041
54,5	2.929.688	-	2.890.625	-	1.940.104	1.680.293
56	-	-	3.125.000	-	1.562.500	2.209.709
76	0	1	2.000.000	0	500.000	1.000.000

\bar{x} : Mittelwert; \pm : Standardabweichung

Tabelle A.2.2: Anzahl der Zellen des Stammes T1 Δ HMP23 für die Herstellung der Wachstumskurve.

Versuch Nr.	T1 Δ HMP23				\bar{x}	\pm
	1	2	3	4		
Stunden	Zellen/ml					
0					20.000	0
6	15625	15625	15625	46875	23.438	15.625
23	382.813	812.500	625.000	500000	580.078	183.815
25	519.531	1.187.500	906.250	937500	887.695	275.834
27	822.917	1.562.500	1.093.750	937500	1.104.167	325.093
29	937.500	1.937.500	1.468.750	1562500	1.476.563	412.512
31	958.333	2.421.875	2.218.750	2000000	1.899.740	650.818
33		1.875.000	2.343.750	2343750	2.187.500	270.633
47	3.828.125		5.625.000	2812500	4.088.542	1.424.220
48	3.515.625		4.843.750	3593750	3.984.375	745.265
49,5	3.710.938		5.312.500	4062500	4.361.979	841.734
51	4.453.125		3.437.500	5000000	4.296.875	792.882
53	3.125.000		3.593.750	4375000	3.697.917	631.477
54,5	4.023.438		2.343.750	-	2.122.396	2.020.832
56			2.265.625	-	1.132.813	1.602.039
76	0	-	0	0	0	0

\bar{x} : Mittelwert; \pm : Standardabweichung

Danksagung

Herrn Prof. Dr. William Martin danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Molekulare Evolution der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Frau Privatdozentin Dr. Katrin Henze danke ich herzlich für Übernahme des Korreferats und für ihr Interesse an meiner Dissertation.

Herr Dr. Sven Gould danke ich für diverse Hilfestellungen sowie anregende und konstruktive Diskussionen.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für ihre Unterstützung bei unterschiedlichen Problemen. Ich danke Kathrin Hoffmann, Mayo Röttger, Oliver Deusch und Christian Wöhle für die unvergesslichen Stunden im Büro und Claudia Kirberich für ihre Unterstützung und die lustigen Gespräche im Labor.

Ich danke Frau Dr. Kathrin Bolte für die TEM Aufnahmen der Hydrogenosomen.

Ich danke meinem guten Freund Dr. Andreas Bleiziffer für die konstruktive Kritik und Diskussionen, Dr. Christian Eßer für die Hilfestellung in der Bioinformatik und Kathrin Hoffmann und Dr. Verena Zimorski für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Carolin Pereira Brás und meinem Sohn Nuno.

Eidesstattliche Erklärung

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.

Xavier Pereira Brás

Düsseldorf, 26.04.2012