



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Einfluss von Transitpeptiden und internen
Signalen auf den Proteinimport in
Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Peter Andreas Major
aus Warschau

Düsseldorf, Februar 2013

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

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2013

Publikationen:

Burstein D, Gould SB, Zimorski V, Kloesges T, Kiosse F, **Major P**, Martin WF, Pupko T, Dagan T (2012). A machine-learning approach to identify hydrogenosomal proteins in *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryotic Cell* **11**, 217–228.

Major P, Zimorski V, Hoffmann K, Pereira Brás X, Martin WF, Gould SB (2013). The N-terminal sequences of four major hydrogenosomal proteins are not essential for import into hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **60**, 89–97.

Dagan T, Roettger M, Stucken K, Landan G, Koch R, **Major P**, Gould SB, Goremykin VV, Rippka R, Tandeau de Marsac N, Guggler M, Lockhart PJ, Allen JF, Brune I, Maus I, Pühler A, Martin WF (2013). Genomes of stigonematalean cyanobacteria (subsection V) and the evolution of oxygenic photosynthesis from prokaryotes to plastids. *Genome Biology and Evolution* **5**, 31–44.

Zimorski V, **Major P**, Yu R-Y, Hoffmann K, Pereira Brás X, Tucci S, Mentel M, Gould SB, Henze K, Martin WF (2012). Evolutionary significance of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research* **23**, 64–68.

Tagungsbeiträge:

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

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

Zimorski V, **Major P**, Hoffmann K, Pereira Brás X, Gould SB, Martin W (2011) Internal targeting motifs of hydrogenosomal *Trichomonas* proteins. VI European Congress of Protistology, DGP, Berlin, Deutschland. Posterpräsentation.

Major P, Zimorski V, Hoffmann K, Pereira Brás X, Martin WF, Gould SB (2012) Targeting into *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes is evolving towards a mechanism independent of cleavable N-terminal targeting sequences. 35th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, DGZ, Dresden, Deutschland. Posterpräsentation, Vortrag.

Burstein D, Gould SB, Zimorski V, Kloesges T, Kiosse F, **Major P**, Martin W, Pupko T, Dagan T (2012) Computational prediction and experimental validation of hydrogenosomal proteins coded in the nuclear genome of *Trichomonas vaginalis*. Society for Molecular Biology & Evolution, Dublin, Irland. Posterpräsentation.

Major P, Zimorski V, Hoffmann K, Pereira Brás X, Martin WF, Gould SB (2012) The N-terminal sequences of four major hydrogenosomal proteins are not essential for import into hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. Endosymbiosis from prokaryotes to eukaryotic organelles, München, Deutschland. Posterpräsentation.

Roettger M, Dagan T, Stucken K, Landan G, Koch R, **Major P**, Gould SB, Goremykin VV, Rippka R, Tandeau de Marsac N, Gugger M, Lockhart P, Allen JF, Brune I, Maus I, Pühler A, Martin WF (2012) Evidence for the origin of photosynthesis and plastids in large cyanobacterial genomes. Endosymbiosis from prokaryotes to eukaryotic organelles, München, Deutschland. Posterpräsentation.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Abstract	1
Zusammenfassung	2
1 Einleitung.....	3
1.1 <i>Trichomonas vaginalis</i>	3
1.2 Das Hydrogenosom	5
1.3 Proteinimport in Mitochondrien.....	8
1.4 Proteinimport in Hydrogenosomen und Importsignale	12
1.5 Ziele dieser Doktorarbeit.....	14
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Abkürzungen	16
2.2 Enzyme	18
2.3 Antikörper.....	18
2.4 Antibiotika	19
2.5 Oligonukleotide.....	19
2.6 Vektoren	20
2.7 Kulturen	20
2.8 Medien	21
2.9 Arbeiten mit Zellkulturen.....	21
2.9.1 Kultivierung von <i>Trichomonas vaginalis</i>	22
2.9.2 Transfektion durch Elektroporation	22
2.9.3 Isolation von Hydrogenosomen	23
2.9.4 Proteasebehandlung der Hydrogenosomen	24
2.9.5 Dephosphorylierung hydrogenosomaler Proteine	24
2.9.6 Isolation hydrogenosomaler Membranen und Matrix.....	24
2.9.7 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	24
2.9.8 Anlegen von Stammkulturen	25
2.9.9 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	25
2.9.10 Transformation durch Hitzeschock	25
2.10 Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	25
2.10.1 Silanisieren von Glasgefäßen	25
2.10.2 Isolation genomischer DNA aus Cyanobakterien	26
2.10.3 Reinigung isolierter DNA aus Cyanobakterien.....	26
2.10.4 Isolation genomischer DNA und RNA aus <i>T. vaginalis</i>	27
2.10.5 Synthese von cDNA.....	27
2.10.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.10.7 Agarose Gelelektrophorese.....	28
2.10.8 DNA-Elution aus Agarosegelen	29
2.10.9 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	29
2.10.10 Klonierung über Restriktionsschnittstellen	30
2.10.11 Klonierung mit dem Gateway System	30
2.10.12 Isolation von zirkulären Plasmiden.....	32
2.10.13 Sequenzierung.....	32
2.11 Arbeiten mit Proteinen	33
2.11.1 Präzipitation von Proteinen mit Aceton/TCA.....	33
2.11.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	33
2.11.3 SDS-PAGE.....	33
2.11.4 Isoelektrische Fokussierung	34

2.11.5	Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen	34
2.11.6	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	35
2.11.7	Tryptischer Verdau von Proteinen.....	35
2.11.8	Western Blot.....	36
2.11.9	Proteinfärbung mit Ponceau S.....	37
2.11.10	Immunodetektion.....	37
2.11.11	Strippen der Nitrocellulosemembran.....	37
2.11.12	Zellfixierung und Immunofluoreszenzmikroskopie.....	38
2.12	Bioinformatische Methoden	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Lokalisation von Proteinen mit entfernten Transitpeptiden.....	40
3.2	Lokalisation von separaten Proteindomänen	41
3.3	2D-Trennung von TvSCS α Block 2 Hydrogenosomen.....	45
3.4	Immunofluoreszenzlokalisierung	46
3.5	Experimentelle Verifikation vorhergesagter Lokalisation	47
3.6	Transkriptionsanalyse von Ferredoxin und IscA	49
3.7	Isolation genomischer DNA aus Cyanobakterien	52
4	Diskussion	56
4.1	Transitpeptide und interne Signale	56
4.2	Migrationsdifferenzen in der SDS-PAGE	64
4.3	Cyanobakterielle Genome.....	68
4.4	Fazit und Ausblick	69
5	Anhang	71
5.1	Vektorkarten.....	71
5.2	Kontrollen	74
5.3	Alignments	74
5.4	Sequenzen	75
6	Literaturverzeichnis	77

Abstract

The human pathogen *Trichomonas vaginalis* possesses hydrogenosomes – organelles of mitochondrial origin that produce hydrogen and ATP. These organelles lack a genome, but harbour about 500 proteins that are imported into the organelle from the cytosol. In mitochondria the import of proteins into the matrix is dependent on N-terminal transit peptides. However, in hydrogenosomes only half the proteins are predicted to encode canonical transit peptides, and these are not always obligatory for import, as recent studies indicate. In the present work, the significance of transit peptides for import of several hydrogenosomal proteins was examined and alternative internal signals were explored. Hemagglutinin tagged fusion proteins were overexpressed after transfection of *T. vaginalis* cells with plasmid DNA, and the proteins were detected through cell fractionation and immunoblotting. In addition, images of fixed cells were obtained by immunofluorescence microscopy. The results show that transit peptides have little, if any, influence upon the correct hydrogenosomal localization of the proteins analyzed and that internal targeting signals can be present in multiple parts of a protein, so that individual blocks of a split protein can be directed independently to the organelles. As the main result, it was shown that internal signals have a stronger emphasis on the protein import in *T. vaginalis* hydrogenosomes than previously thought.

Zusammenfassung

Der Humanparasit *Trichomonas vaginalis* besitzt Hydrogenosomen – Wasserstoff und ATP generierende Organellen mitochondrialen Ursprungs. Diesen Organellen fehlt ein eigenes Genom, es sind aber voraussichtlich etwa 500 Proteine dort lokalisiert. Sie werden aus dem Cytosol importiert. Bei Mitochondrien ist der Import von Proteinen in die mitochondriale Matrix abhängig von N-terminalen Transitpeptiden. Bei Hydrogenosomen haben jedoch nur die Hälfte der Proteine klassische N-terminale Transitpeptide, die nach aktuellen Erkenntnissen nicht immer notwendig sind. In dieser Doktorarbeit wurde der Einfluss der Transitpeptide auf den Import an mehreren hydrogenosomalen Proteinen untersucht und es wurden alternative, interne Importsignale erforscht. Hierbei wurden Hämagglutinin markierte Fusionsproteine erzeugt, die nach einer Transfektion von *T. vaginalis* Zellen exprimiert wurden. Die Lokalisation der HA-markierten Proteine wurde durch subzelluläre Fraktionierung und Immunodetektion determiniert. Zusätzlich wurden mikroskopische Immunfluoreszenzaufnahmen fixierter Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass Transitpeptide wenig bzw. keinen Einfluss auf die korrekte Lokalisation der überexprimierten Proteine in die hydrogenosomale Matrix haben und interne Signale in mehreren Teilen eines Proteins vorliegen, so dass einzelne Blöcke eines dreigeteilten Proteins individuell zu den Organellen transportiert werden können. Generell wurde gezeigt, dass interne Signale eine stärkere Gewichtung bei dem Proteinimport in *T. vaginalis* Hydrogenosomen haben als bisher angenommen wurde.

1 Einleitung

1.1 *Trichomonas vaginalis*

Der Humanparasit *Trichomonas vaginalis* löst beim Menschen Trichomoniasis aus und ist einer der häufigsten durch Geschlechtsverkehr übertragenen, nicht viralen Krankheitserreger mit weltweit über 160 Millionen Neuinfektionen jährlich (Harp & Chowdhury, 2011; Petrin *et al.*, 1998; Schwebke & Burgess, 2004). Behandelt wird die Krankheit mit Metronidazol (Freeman *et al.*, 1997), das durch hydrogenosomale Enzyme zu freien, zellschädigenden Radikalen zersetzt wird (Pal *et al.*, 2009). Die Behandlung resistenter Stämme erfolgt mit anderen 5-Nitroimidazolen (Cudmore *et al.*, 2004), jedoch besteht weiterhin Forschungsbedarf zur Entwicklung neuer Medikamente. Es existieren zwei verschiedene *T. vaginalis* Typen. Sie unterscheiden sich unter anderem in der Sensitivität gegenüber Metronidazol und im Auftreten des *T. vaginalis* Virus (TVV), außerdem ist der Organismus zu genetischem Austausch innerhalb der Population fähig, wie in einer globalen Analyse ermittelt wurde (Conrad *et al.*, 2011; Conrad *et al.*, 2012; Goodman *et al.*, 2011). Kandidaten vom Typ 1 wurden hierbei durch eine Konzentration von 76,6 µg/ml Metronidazol abgetötet, während bei Typ 2 228,4 µg/ml benötigt wurden. Der TVV wurde häufiger in Typ 1 (112 von 154 Isolationen) als in Typ 2 (42 von 154 Isolationen) identifiziert. Die häufig verwendeten Laborstämme C1:NIH (Bradley *et al.*, 1997), G3 (Carlton *et al.*, 2007) und T1 (Tai *et al.*, 1993), welcher in dieser Studie eingesetzt wurde, gehören nach dieser Klassifizierung zu Typ 1.

Bei einer Zellgröße von 10 bis 20 µm können *T. vaginalis* Zellen unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden. Zellkompartimente können durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gut identifiziert werden (Abb. 1.1). Bei 37 °C beträgt die Generationszeit des Organismus etwa acht Stunden. Die Zellen können in drei verschiedenen Stadien auftreten: a) im pyriformen Zustand bei Kultivierung im Medium, b) in der amoeboiden Form bei der Infektion von Wirtsgewebe und c) als Pseudozysten unter Extrembedingungen (Yeh *et al.*, 2012).

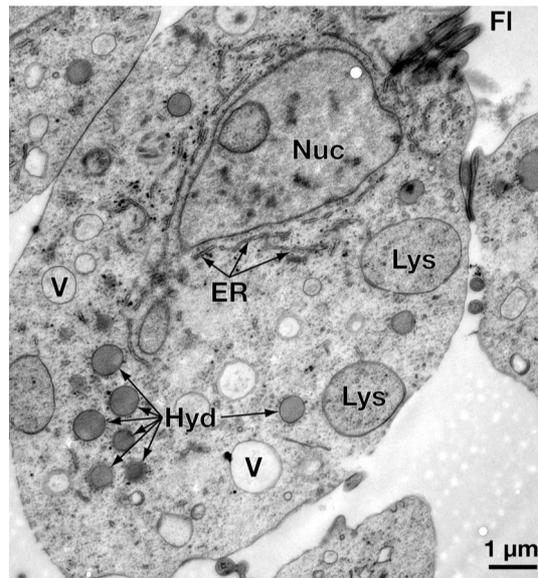


Abb. 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer *Trichomonas vaginalis* Zelle (aus Burstein *et al.*, 2012). Nuc: Zellkern, ER: Endoplasmatisches Retikulum, V: Vakuole, Lys: Lysosomen, Hyd: Hydrogenosomen, Fl: Flagellum.

Seit 2007 ist die Genomsequenz des *Trichomonas vaginalis* G3 Stammes bekannt. Das Genom besteht aus sechs Chromosomen (Yuh *et al.*, 1997) und kodiert potentiell für fast 60.000 Proteine (Carlton *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2009). Mit 160 Mb ist das Genom für einzellige Parasiten sehr groß – noch größer geschätzt wird bisher nur das Genom des Rinderparasiten *Tritrichomonas foetus* mit 177 Mb (Zubáčová *et al.*, 2008). Vergleichsweise klein sind die Genome von *Giardia intestinalis* mit 11,7 Mb (Franzén *et al.*, 2009; Jerlström-Hultqvist *et al.*, 2010; McArthur *et al.*, 2000; Morrison *et al.*, 2007) und Mikrosporidien wie *Encephalitozoon cuniculi* mit 2,9 Mb (Katinka *et al.*, 2001) oder *Trachipleistophora hominis* mit 8,5 Mb (Heinz *et al.*, 2012).

In seinem anaeroben Lebensraum erzeugt der Protist *Trichomonas vaginalis* Energie durch Wasserstoff produzierende Fermentation (Müller, 1988, 1993) und alternativ mit dem Arginin Dihydrolase Stoffwechselweg (Yarlett *et al.*, 1996; Yarlett *et al.*, 1994). Mikrosporidien haben als intrazelluläre Parasiten dagegen die Fähigkeit, ATP von ihren Wirtszellen zu importieren (Tsaousis *et al.*, 2008).

1.2 Das Hydrogenosom

Hydrogenosomen unterscheiden sich von aeroben Mitochondrien vor allem durch ihren anaeroben Stoffwechsel und das Fehlen eines eigenen Genoms. Charakteristisch für Hydrogenosomen ist die Produktion des namensgebenden Wasserstoffs, der bei dem Energiestoffwechsel durch Substratkettenphosphorylierung entsteht (Abb. 1.2). Hydrogenosomen wurden erstmalig im Rinderparasiten *Tritrichomonas foetus* beschrieben (Lindmark & Müller, 1973) und kommen in einer Vielzahl von Organismen vor (Tab. 1.1; van der Giezen, 2009).

Tab. 1.1: Auswahl einiger Eukaryoten mit Hydrogenosomen

Organismus	Referenz
<i>Breviata anathema</i>	Minge <i>et al.</i> , 2009
<i>Dasytricha ruminantium</i>	Yarlett <i>et al.</i> , 1981
<i>Histomonas meleagridis</i>	Mazet <i>et al.</i> , 2008
<i>Isotricha prostoma</i> / <i>Isotricha intestinalis</i>	Yarlett <i>et al.</i> , 1983
<i>Mastigamoeba balamuthi</i>	Gill <i>et al.</i> , 2007
<i>Neocallimastix patriciarum</i>	Yarlett <i>et al.</i> , 1986
<i>Plagiopyla nasuta</i>	Zwart <i>et al.</i> , 1988
<i>Polyplastron multivesiculatum</i>	Paul <i>et al.</i> , 1990
<i>Psalteriomonas lanterna</i>	Broers <i>et al.</i> , 1990; de Graaf <i>et al.</i> , 2009
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Lindmark <i>et al.</i> , 1975
<i>Trimastix pyriformis</i>	Hampl <i>et al.</i> , 2008
<i>Trimyema compressum</i>	Zwart <i>et al.</i> , 1988
<i>Tritrichomonas foetus</i>	Lindmark & Müller, 1973
<i>Sawyeria marylandensis</i>	Barberà <i>et al.</i> , 2010
weitere	Yarlett <i>et al.</i> , 1984

Heute werden Organellen protomitochondrialen Ursprungs in fünf Klassen unterteilt: 1) aerobe Mitochondrien, 2) anaerobe Mitochondrien, 3) Wasserstoff produzierende Mitochondrien, 4) Hydrogenosomen und 5) Mitosomen (Müller *et al.*, 2012). *Nyctotherus ovalis* (Akhmanova *et al.*, 1998; Boxma *et al.*, 2005) und *Blastocystis hominis* (Stechmann *et al.*, 2008) haben ebenfalls Hydrogenosomen, jedoch ist bei diesen Organismen auch ein

eigenes Genom vorhanden. Somit stellen deren Organellen einen Übergangszustand zwischen Mitochondrien und Hydrogenosomen dar und werden als Wasserstoff produzierende Mitochondrien klassifiziert (Müller *et al.*, 2012).

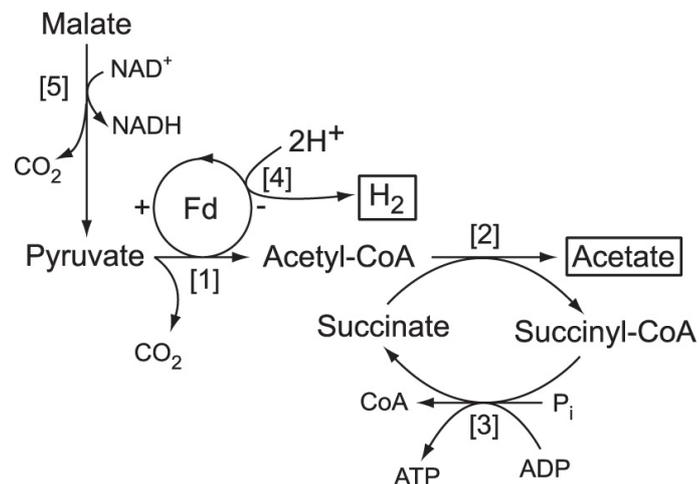


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der hydrogenosomalen Energiegewinnung durch Substratkettenphosphorylierung, (aus Müller *et al.*, 2012). [1] PFO, [2] ASCT, [3] SCS, [4] Hydrogenase, [5] *malic enzyme* (Malatenzym)

Einheitlich ist ihr evolutionärer Ursprung, da diese Organellen von einem gemeinsamen Vorgänger abstammen, der durch Endosymbiose aus einem freilebenden α -Proteobakterium entstanden ist (Martin & Müller, 1998). Sie sind von einer aus Phospho- und Glycolipiden bestehenden Doppelmembran umgeben. Im Gegensatz zu aeroben Mitochondrien hat die innere Membran der Hydrogenosomen jedoch keine Cristae. Die beiden Membranen grenzen die Matrix von dem Rest der Zelle räumlich ab, so dass die Organellen ein eigenes Kompartiment in der eukaryotischen Zelle bilden. Die am stärksten reduzierten Organellen mitochondrialen Ursprungs sind die Mitosomen. Sie kommen beispielsweise in *Giardia intestinalis* und Mikrosporidien vor, ihre Funktion beschränkt sich auf die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese (Goldberg *et al.*, 2008; Henze & Martin, 2003; Tovar *et al.*, 1999; Tovar *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2002).

Hydrogenosomen beinhalten laut Vorhersagen etwa 500 Proteine, die kernkodiert sind und zum Organell transportiert werden müssen (Rada *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2011). Bei Mitochondrien der Hefe sind es dagegen ca. 1000 und bei denen des Menschen ca. 1500 Proteine (Chacinska *et al.*, 2009). Davon werden ca. 0,1 bis 1 % von mitochondrialen Ribosomen im Organell synthetisiert, der Rest ist ebenfalls kernkodiert und wird in das Organell importiert (Doležal *et al.*, 2006). Verglichen mit dem Proteinimport in Mitochondrien ist bisher sehr wenig über die Translokation von Proteinen durch beide Membranen bei Hydrogenosomen bekannt. Ebenso wenig ist im Detail über die beteiligten Komponenten bekannt (Rada *et al.*, 2011), wie das Beispiel des TOM Komplexes verdeutlicht (*translocase of the outer mitochondrial membrane*; Abb. 1.3). So wurde bei *Trichomonas* Hydrogenosomen bisher nur TOM40 identifiziert, TOM20, TOM22 und TOM70, die an der Erkennung und Weiterleitung von N-terminalen und internen Signalen beteiligt sind, sowie die kleinen TOMs TOM5, TOM6 und TOM7 hingegen nicht. Bei Mitosomen sind oft auch nur die Kernkomponenten der Maschinerie bekannt (Lithgow & Schneider, 2010). Entweder sind die nicht identifizierten Komponenten in ihrer Sequenz zu unterschiedlich, um als Homologe identifiziert werden zu können, oder sie gingen im Laufe der Entwicklung dieser Organellen durch reduktive Evolution verloren (Hjort *et al.*, 2010).

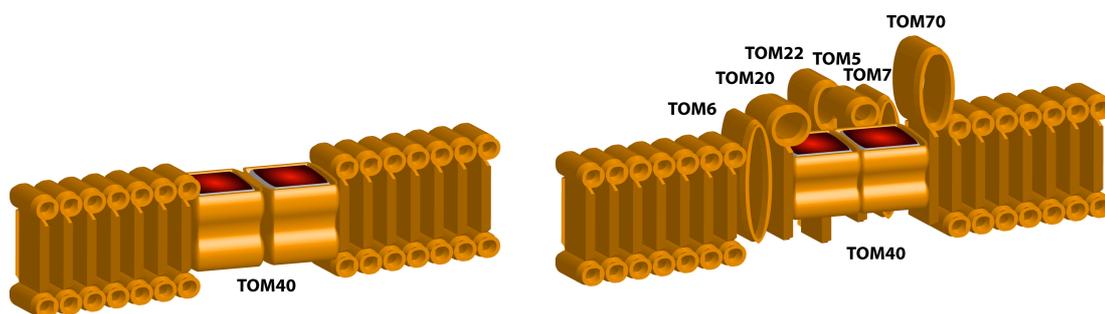


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Importmaschinerie der äußeren Membran, verändert nach Rada *et al.*, 2011. Links: *Trichomonas* Hydrogenosomen mit TOM40. Rechts: *Saccharomyces* Mitochondrien mit TOM5, TOM6, TOM7, TOM20, TOM22, TOM40 und TOM70.

1.3 Proteinimport in Mitochondrien

Am besten untersucht ist der Proteinimport in die Mitochondrien der Backhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Bisher sind fünf Mechanismen bekannt, nach denen die Translokation abläuft (Becker *et al.*, 2012). Das Zielkompartiment ist hierbei ein wichtiger Aspekt: Soll das Protein in die äußere Membran, den Intermembranraum, die innere Membran oder die Matrix importiert werden? Für jeden Ort existieren unterschiedliche Mechanismen und Signale, an denen verschiedene Komplexe der Importmaschinerie beteiligt sind (Abb. 1.4). Zum Organell geleitet werden die Vorläuferproteine im Cytosol durch die Chaperone HSP70 und HSP90 (Young *et al.*, 2003) sowie das *aryl hydrocarbon receptor interacting protein* AIP (Yano *et al.*, 2003). Bei Matrixproteinen sind Transitpeptide, die am N-Terminus α -Helices ausbilden und eine positive Nettoladung aufweisen, vorhanden (Pfanner & Geissler, 2001; Roise & Schatz, 1988). Die Signale werden von TOM20 erkannt (Abe *et al.*, 2000; Saitoh *et al.*, 2007) und die Proteine über TOM22 (Shiota *et al.*, 2011; van Wilpe *et al.*, 1999) zu dem Importkanal TOM40 geleitet (Ahting *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 1998), um diesen in linearer Konformation zu passieren. Im Gegensatz hierzu erfolgt der Import von Membranproteinen mit internen Signalen in Loop Konformation (Wiedemann *et al.*, 2001). Stabilisiert wird der TOM Komplex von den kleinen TOMs TOM5, TOM6 und TOM7 (Alconada *et al.*, 1995; Dietmeier *et al.*, 1997; Hönlinger *et al.*, 1996).

Der Import über die innere Membran erfolgt durch den TIM23 Kanal (*translocase of the inner mitochondrial membrane*; Marom *et al.*, 2011), welcher durch das Membranpotential $\Delta\Psi$ aktiviert wird. Im Intermembranraum wird das Matrixprotein von TIM50 erkannt, das mit TIM21 und TIM17 den Import durchführt, wobei MGR2 (*mitochondrial genome required*) das Vorläuferprotein von TIM21 zu TIM23 leitet (Gebert *et al.*, 2012). Auf der Matrixseite sind der ATP-abhängige PAM Komplex (*presequence translocase-associated motor*; Li *et al.*, 2004), HSP70 (Mapa *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 1994) und der Nukleotidaustauschfaktor MGE1 am Import beteiligt (*mitochondrial GrpE*; Laloraya *et al.*, 1994).

Verbindungsstelle zu TIM23 ist hierbei TIM44. In der Matrix wird abschließend das Transitpeptid von der MPP entfernt (*mitochondrial processing peptidase*; Taylor *et al.*, 2001). Zur Protein stabilisierung werden in einigen Fällen durch weitere Peptidasen Teile des Proteins abgeschnitten, z.B. acht Aminosäuren durch OCT1 (*octapeptidyl aminopeptidase*) oder eine Aminosäure durch ICP55 (*intermediate cleaving peptidase*; Naamati *et al.*, 2009; Vögtle *et al.*, 2011; Vögtle *et al.*, 2009).

Proteinprozessierung im Intermembranraum hingegen erfolgt durch die IMP (*inner membrane protease*; Nunnari *et al.*, 1993). Weitere Peptidasen existieren ebenfalls, wie z.B. m-AAA (*matrix-ATPase associated with a variety of cellular activities*), die Rhomboid-Protease PCP1 (*processing of cytochrome c peroxidase*) oder die Metalloprotease ATP23 (*ATP synthase*; Koppen & Langer, 2007; Mossmann *et al.*, 2012). Sie sind an der Prozessierung von Transitpeptiden bestimmter Proteine beteiligt: m-AAA und PCP1 z.B. bei CCP1 (*cytochrome c peroxidase*; Esser *et al.*, 2002). Ein weiteres Substrat der m-AAA ist MRPL32 (*mitochondrial ribosomal protein L32*; Nolden *et al.*, 2005). PCP1 prozessiert zudem MGM1, nachdem das MGM1 Transitpeptid von der MPP entfernt wurde (Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003). ATP23 entfernt zehn Aminosäuren am N-Terminus von ATP6, wobei ATP6 das einzige bekannte Substrat für ATP23 ist (Michon *et al.*, 1988; Osman *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2007). Rhomboid-Proteasen wurden auch für Parasiten vorhergesagt, darunter neun für *Trichomonas* (Santos *et al.*, 2012), bekannt für hydrogenosomale N-terminale Proteinprozessierung ist aber bisher ausschließlich die HPP (*hydrogenosomal processing peptidase*; Brown *et al.*, 2007; Šmíd *et al.*, 2008).

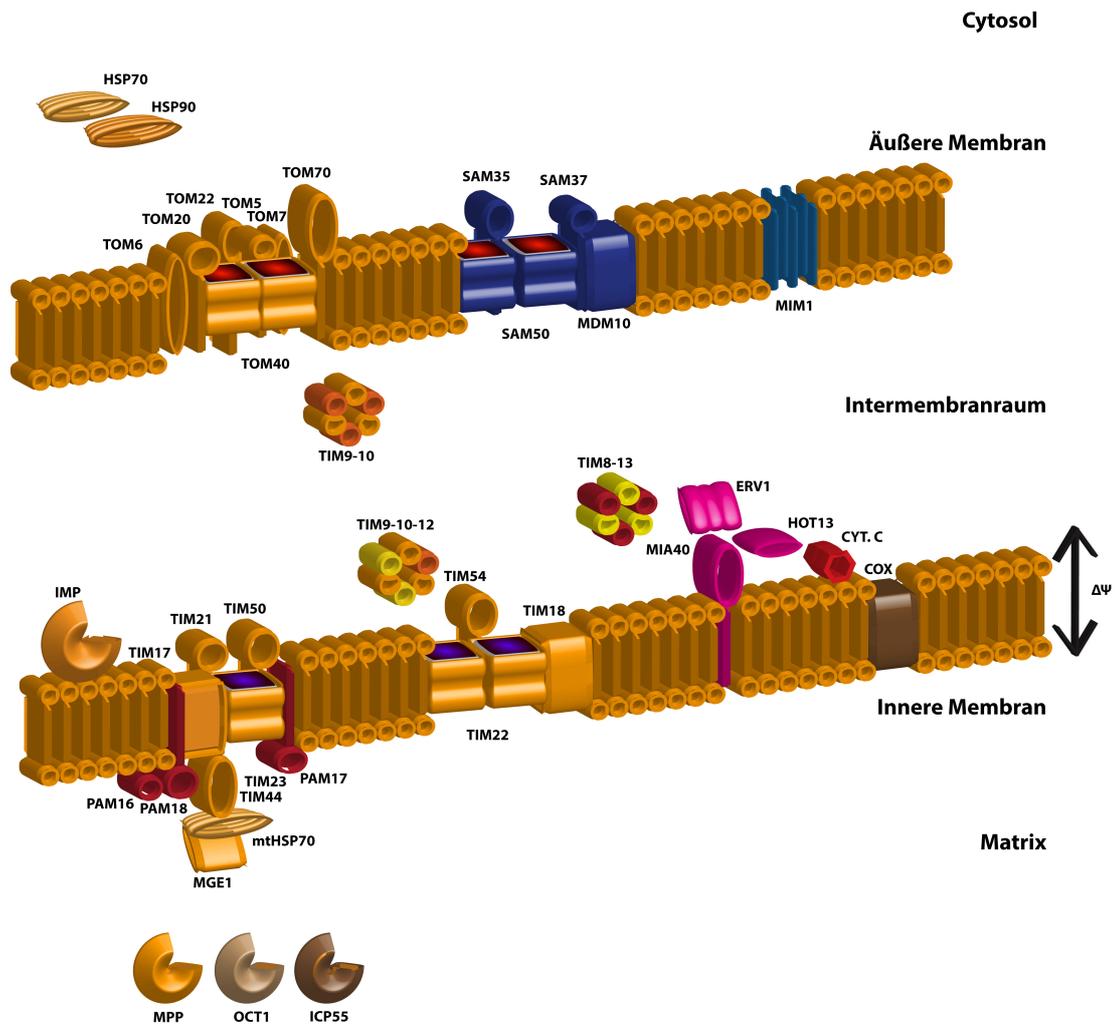


Abb. 1.4: Konsensus Schema der Proteinimportmaschinerie von Mitochondrien. Die wesentlichen, bisher bekannten Komplexe sind dargestellt. HSP: *Heat shock protein*, TOM: *Translocase of the outer mitochondrial membrane*, SAM: *Sorting and assembly machinery*, MDM: *Mitochondrial distribution and morphology*, MIM: *Mitochondrial import protein*, TIM: *Translocase of the inner mitochondrial membrane*, PAM: *Presequence translocase-associated motor*, MIA: *Mitochondrial intermembrane space assembly*, ERV: *Essential for respiration and viability*, HOT: *Helper of TIM*, CYT. C: *Cytochrome c*, COX: *Cytochrome c oxidase*, MGE: *Mitochondrial GrpE*, MPP: *Mitochondrial processing peptidase*, OCT: *Octapeptidyl aminopeptidase*, ICP: *Intermediate cleaving peptidase*, IMP: *Inner membrane peptidase*, $\Delta\Psi$: Membranpotential.

Für die Insertion von Proteinen in die äußere mitochondriale Membran sind zwei Mechanismen bekannt. Bei Proteinen, welche über β -Faltblätter importiert werden, wird erst das Transitpeptid durch den TOM Komplex erkannt und das Protein in den Intermembranraum transportiert. Von dort aus wird es mit Hilfe der kleinen TIMs zum SAM Komplex geleitet, durch den die Integration ausgeführt wird (Pfanter *et al.*, 2004). Bei Proteinen mit

Importsignalen in α -Helices hingegen erkennt TOM70 den Vorläufer und leitet ihn zu MIM1 (*mitochondrial import protein*), durch das der Einbau gewährleistet wird (Becker *et al.*, 2011; Waizenegger *et al.*, 2005).

Proteine der inneren Membran passieren ebenfalls zuerst den TOM40 Kanal und werden dann durch die kleinen TIM Chaperone TIM9-10 und TIM9-10-12 zu TIM22 geleitet (Rehling *et al.*, 2003). Beteiligt sind auch TIM54 und TIM18 sowie die Energiequelle $\Delta\Psi$. Neuere Studien implizieren auch eine Beteiligung von SDH3 (*succinate dehydrogenase subunit 3*) beim Import des TIM22 Komplex (Gebert *et al.*, 2011).

Bei einem Import von Proteinen in den Intermembranraum ist MIA40 beteiligt (*mitochondrial intermembrane space assembly*). Durch Ausbildung von Disulfidbrücken wird das zu importierende Protein durch den TOM Komplex erkannt (Mesecke *et al.*, 2005). Reoxidiert wird MIA40 durch die Sulfhydryloxidase ERV1 (*essential for respiration and viability*; Allen *et al.*, 2005) und HOT13 (*helper of TIM*; Mesecke *et al.*, 2008). Der Elektronenfluss läuft dabei über Cytochrom c und die Cytochrom c Oxidase zum Endakzeptor Sauerstoff ab (Bihlmaier *et al.*, 2007; Dabir *et al.*, 2007).

Weitere Regulationsmechanismen zur Effizienz des Imports sind bekannt. So inhibieren cytosolische Proteinkinasen den Import durch Phosphorylierung des TOM Komplexes und MIM1 (Rao *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2011). Trotz des eingehend erforschten Modellsystems der Hefemitochondrien ist noch von weiteren, bisher unbekanntem Wegen des Proteinimports auszugehen (Becker *et al.*, 2012; Stojanovski *et al.*, 2012).

Außer den Mitochondrien gibt es auch noch ein weiteres Zellorganell, welches durch Endosymbiose vor etwa 1 bis 1,5 Milliarden Jahren entstanden ist, der Chloroplast (Archibald 2009; Parfrey *et al.*, 2011). Die Chloroplasten stammen von einst freilebenden Cyanobakterien ab und weisen ähnliche evolutive Charakteristika auf wie ihre mitochondrialen Nachbarn: Gentransfer in den Nukleus, Umgebung durch eine Doppelmembran, die eine Proteinimportmaschinerie enthält und zu importierende Proteine, die anhand ihrer Signale erkannt werden (Gould *et al.*, 2008).

1.4 Proteinimport in Hydrogenosomen und Importsignale

Bei Hydrogenosomen ist die Importmaschinerie deutlich weniger erforscht. Im Gegensatz zu Mitochondrien sind dort nur TOM40, SAM50, TIM17-22-23, TIM44, TIM9-10 und der PAM Komplex bekannt (Rada *et al.*, 2011; Shiflett & Johnson, 2010). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass es in diesem System noch weitere Importmechanismen bzw. Komponenten zu entdecken gibt, was auch Ergebnisse aus dieser Arbeit vermuten lassen. Kürzlich wurde beispielsweise von der Entdeckung von pATOM36 berichtet (*archaic translocase of the outer mitochondrial membrane*), einem Protein der äußeren Membran von Mitochondrien in *Trypanosoma* (Pusnik *et al.*, 2012a). Die Ähnlichkeit und evolutionäre Beziehung von ATOM zu TOM40 wird jedoch noch diskutiert (Pusnik *et al.*, 2012b; Žárský *et al.*, 2012). Ansonsten wird die Hypothese der Endosymbiose und die Entstehung der Zellorganellen aus einst freilebenden Organismen durch die Ähnlichkeit der mitochondrialen Maschinerie zu bakteriellen Kanälen gestützt (Hewitt *et al.*, 2011).

Die mitochondriale Proteinimportmaschinerie erkennt Signale, die bei den zu importierenden Proteinen vorhanden sind und im Zuge der Endosymbiose zusammen mit der Maschinerie koevolviert sind (Dyall *et al.*, 2004). Diese können am N-Terminus oder intern im Protein vorhanden sein (Chacinska *et al.*, 2009). Auch eine Kombination aus beidem ist möglich und die internen Signale können mehrfach im Protein vorhanden sein (Chacinska *et al.*, 2009). Für Hefemitochondrien ist beschrieben, dass Matrixproteine N-terminale Importsignale besitzen, die amphipatische α -Helices ausbilden, serin-reich und positiv geladen sind und aus bis zu etwa 100 Aminosäuren bestehen können, während Membranproteine und Proteine des Intermembranraums interne Signale aufweisen. Interne Signale können ebenfalls Eigenschaften der N-terminalen Transitpeptide haben. Oft haben sie allerdings keine Ähnlichkeiten zu Transitpeptiden und sind nicht genau beschrieben. Proteine des Intermembranraumes haben Cystein beinhaltende interne Signale zur Ausbildung von Disulfidbrücken (Banci *et al.*, 2009).

Interne Signale hydrogenosomaler Membranproteine wurden in *Trichomonas* auch gefunden (Dyall *et al.*, 2000; Dyall *et al.*, 2003; Tjaden *et al.*, 2004). N-terminale Transitpeptide von Matrixproteinen sind ähnlich im Vergleich mit jenen mitochondrialer Proteine der Hefe, jedoch kürzer. Bisher wurde davon ausgegangen, dass Transitpeptide eine äquivalente Rolle bei *Trichomonas* einnehmen. Bekannt ist bis heute jedoch nur ein Fall von einer hydrogenosomalen Thioredoxin Reduktase, bei dem der Import in Hydrogenosomen von diesem Signal obligat abhängig ist (Mentel *et al.*, 2008; Zimorski *et al.*, 2012).

Ob ein Protein in ein Organell importiert wird oder nicht, kann durch verschiedene Ansätze überprüft werden. Bei unbekanntem oder hypothetischen Proteinen kann unter Berücksichtigung diverser Parameter von bereits bekannten Proteinen und deren Charakteristika eine bioinformatische Vorhersage gemacht werden. Zu den Charakteristika gehören der phylogenetische Ursprung, die Aminosäurezusammensetzung oder das Vorhandensein von Importsignalen (Burstein *et al.*, 2012; Claros & Vincens, 1996). Das Programm berechnet Wahrscheinlichkeiten, mit denen die Kandidaten im entsprechenden Zellkompartiment voraussichtlich lokalisieren. Um die Vorhersage experimentell zu überprüfen, können diese Kandidaten direkt mit fluoreszierenden Antikörpern gegen sie detektiert werden, wobei als Positivkontrolle Antikörper gegen ein bekanntes Protein des Zellkompartiments eingesetzt und unter einem Fluoreszenzmikroskop Aufnahmen der Zellen gemacht werden. Kolokalisiert der Kandidat mit der Kontrolle bei Überlagerung der Bilder, so ist die Lokalisation in der gegebenen Fraktion bestätigt. Alternativ können Fusionsproteine aus den Kandidaten und bekannten Tags hergestellt und nach einer Transfektion in den Zellen homolog exprimiert werden. Die Detektion erfolgt dann entweder ebenfalls durch Zellfixierung und Immunofluoreszenz oder durch Zellfraktionierung, SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion der einzelnen Fraktionen.

1.5 Ziele dieser Doktorarbeit

Mitochondrien und Hydrogenosomen sind Zellorganellen gemeinsamen Ursprungs. Im Vergleich zu Mitochondrien aus dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* ist der Proteinimport in Hydrogenosomen jedoch nur marginal erforscht. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Proteinimportsignale in Hydrogenosomen näher zu charakterisieren. Durch Expression geeigneter Genkonstrukte in transfizierten *T. vaginalis* Zellen, Zellfraktionierung und Immunodetektion, sollte die Signifikanz des N-terminalen Importsignals hydrogenosomaler Matrixproteine untersucht werden. Im Zuge dessen sollten interne Importsignale durch Untersuchung einzelner Proteindomänen gezielt charakterisiert werden. Im Verlauf der Arbeit beobachtete, unerwartete und wiederholt auftretende Migrationsdifferenzen von exprimierten Importsubstraten in SDS Polyacrylamidgelen sollten ebenfalls aufgeklärt werden.

Für die Lokalisationsstudien wurden bekannte hochexprimierte hydrogenosomale Proteine ausgewählt: Ferredoxin 1 (*TvFd*; TVAG_003900) aus der Klasse der [2Fe-2S] Ferredoxine (Gorrell *et al.*, 1984; Johnson *et al.*, 1990; Vidakovic *et al.*, 1996; Weksberg *et al.*, 2007), das am Elektronentransport beteiligt ist (Abb. 1.2), *TvlscA* (TVAG_456770) – ein *iron sulfur cluster assembly protein, malic enzyme* (*TvME*; TVAG_267870) – eine hydrogenosomale Malatdehydrogenase (Brugerolle *et al.*, 2000; Doležal *et al.*, 2004; Hrdý & Müller, 1995b), die an der Bereitstellung von Pyruvat beteiligt ist (Abb. 1.2), die α -Untereinheit der Succinyl CoA Synthetase (TVAG_165340), auch bekannt als Succinat Thiokinase (Brugerolle *et al.*, 2000; Jenkins *et al.*, 1991; Lahti *et al.*, 1994; Mentel *et al.*, 2008), welche die ATP Produktion katalysiert (Abb. 1.2) und die hydrogenosomale Thioredoxin Reduktase *TrxRh2* (TVAG_125360), die an der Sauerstoffdetoxifizierung beteiligt ist (Hirt *et al.*, 2002; Mentel *et al.*, 2008).

Zusätzlich sollten zum Verständnis des Vorläufers der Chloroplasten die Genome von Sektion V Cyanobakterien sequenziert werden. Diese zeichnen sich durch Filamentbildung und echte Verzweigungen in den

Filamenten aus und gehören somit zu den komplexesten Prokaryoten (Dagan *et al.*, 2013). Ausgewählt für die Analysen wurden *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912, *C. fritschii* PCC 9212, *Fischerella muscicola* PCC 73103, *F. muscicola* PCC 7414 und *F. thermalis* PCC 7521 sowie zum Vergleich ein Kandidat aus Sektion IV – *Scytonema hofmanni* PCC 7110 (Rippka *et al.*, 1979). Zur Ermöglichung von Sequenzanalysen sollte genomische DNA aus den jeweiligen Stämmen isoliert und in ausreichender Qualität und Quantität zur Verfügung gestellt werden. Bisher waren sequenzierte Genome nur von Kandidaten der Sektionen I bis IV verfügbar.

2 Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ASCT	Acetat:Succinat-CoA Transferase
AIP	<i>aryl hydrocarbon receptor interacting protein</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCl ₄	Tetrachlormethan
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
(CH ₃) ₂ SiCl ₂	Dichlordimethylsilan
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
COX	<i>cytochrome c oxidase</i>
CsCl	Cäsiumchlorid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CYT. C	<i>cytochrome c</i>
Δ	Delta, deletiert
ΔΨ	Membranpotential
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBOSS	<i>european molecular biology open software suite</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERV	<i>essential for respiration and viability</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae, et alia</i>
Fd	Ferredoxin
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	Eisen(II)-Ammoniumsulfat
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitation
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
G418	Geneticin
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HOT	<i>helper of Tim</i>
HPP	<i>hydrogenosomal processing peptidase</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>

Material und Methoden

ICP	<i>intermediate cleaving peptidase</i>
IMP	<i>inner membrane peptidase</i>
KCl	Kaliumchlorid
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
IscA	<i>iron sulfur cluster assembly</i>
IgG	Immunglobulin G
LB	<i>lysogeny broth</i>
μ	Mikro
M	Molar
MDM	<i>mitochondrial distribution and morphology</i>
ME	<i>malic enzyme</i>
MGE	<i>mitochondrial GrpE</i>
MIA	<i>mitochondrial intermembrane space assembly</i>
MIM	<i>mitochondrial import protein</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPP	<i>mitochondrial processing peptidase</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OCT	<i>octapeptidyl aminopeptidase</i>
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	<i>presequence translocase-associated motor</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCC	<i>Pasteur Culture Collection</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFO	Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase
pH	<i>potentia Hydrogenii, pondus Hydrogenii</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
SAM	<i>sorting and assembly machinery</i>
SCS	Succinyl-CoA Synthetase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SM	Saccharose MOPS
SMB	Saccharose MOPS β-Mercaptoethanol
SMDI	Saccharose MOPS DTT Inhibitoren
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA

TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	TBS Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris EDTA
TLCK	N- α -Tosyl-L-Lysinchloromethylketon-Hydrochlorid
Tim	<i>translocase of the inner mitochondrial membrane</i>
Tom	<i>translocase of the outer mitochondrial membrane</i>
TP	Transitpeptid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrxR	Thioredoxin-Reduktase
Tween 20	Polysorbat 20
U	Enzymaktivität in Units
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	Volumen
w	Gewicht

2.2 Enzyme

Restriktionsenzyme	Fermentas/NEB
BP / LR Clonase II enzyme mix	Invitrogen
Proteinase K	Roth
Quick T4 DNA Ligase	NEB
<i>Taq</i> -Polymerase	Metabion
<i>Pfu</i> -Polymerase	Stratagene
Velocity-Polymerase	Bioline
Phusion-Polymerase	Finnzymes

2.3 Antikörper

Mouse anti-HA monoclonal antibody	Sigma
Rabbit anti-ASCT polyclonal antibody	Eurogentec
Rabbit anti-SCS polyclonal antibody	Eurogentec
ImmunoPure goat anti-mouse	Pierce/Thermo Scientific
ImmunoPure goat anti-rabbit	Pierce/Thermo Scientific
Alexa fluor 488 donkey anti-mouse	Invitrogen
Alexa fluor 633 goat anti-rabbit	Invitrogen

2.4 Antibiotika

Ampicillin	Sigma
Kanamycin	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Biomedicals LLC
G418	Roth

2.5 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotidsequenzen (Primer) wurden von den Firmen Metabion und Eurofins synthetisiert.

Folgende Primer wurden zur Klonierung mit dem Gateway System verwendet.

Fd_WT_B1_F	5'-AAA AAG CAG GCT ATG CTC TCT CAA GTT TGC C-3'
Fd_Δ7_B1_F	5'-AAA AAG CAG GCT ATG GGA ACA ATC ACA GCC GTC-3'
Fd_B5r_R	5'-TAT ACA AAG TTG GAG CTC GAA AAC AGC ACC-3'
HA_B2_R	5'-AGA AAG CTG GGT TTA AGC GTA ATC TGG AAC A-3'
IscA_B1_F	5'-AAA AAG CAG GCT ATG CTT TCC TCC ATT ATC C-3'
IscA_B5r_R	5'-TAT ACA AAG TTG ATG GAG GCA AGC ACC TGG-3'
SCSα_WT_B1_F	5'-AAA AAG CAG GCT ATG CTC TCC TCT TCC TTC-3'
SCSα_1st_B1_F	5'-AAA AAG CAG GCT ATG CTC CAC CAA CCA CTC-3'
SCSα_1st_B5r_R	5'-TAT ACA AAG TTG TTC TGT GAT GCA GAC-3'
SCSα_2nd_B1_F	5'-AAA AAG CAG GCT ATG CAC ATC CCA CAG CAC-3'
SCSα_2nd_B5r_R	5'-TAT ACA AAG TTG TGC AGC GAA GCG CTT-3'
SCSα_3rd_B1_F	5'-AAA AAG CAG GCT ATG GAC CCA CAG ACC GAG-3'
SCSα_3rd_B5r_R	5'-TAT ACA AAG TTG GAT CTT GCC CAT TCT-3'
TrxRh2_1st_B1_F	5'-AAA AAG CAG GCT ATG TCG GGT GAC ATT GAT-3'
TrxRh2_1st_B5r_R	5'-TAT ACA AAG TTG AAC GAT AAC AGA GCG-3'
TrxRh2_2nd_B1_F	5'-AAA AAG CAG GCT ATG GCA ACA GGT GCT AAG-3'
TrxRh2_2nd_B5r_R	5'-TAT ACA AAG TTG GTT TGT GAC AAC ATT-3'
TrxRh2_3rd_B1_F	5'-AAA AAG CAG GCT ATG GAA GTC AGC GAA ATC-3'
TrxRh2_3rd_B5r_R	5'-TAT ACA AAG TTG GTC CGT TAA ATA TTT-3'
1_B1_Adapter	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT-3'
1_B5r_Adapter	5'-GGG GAC AAC TTT TGT ATA CAA AGT TG-3'

Folgende Primer wurden zur Klonierung über Restriktion verwendet. Eingefügte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Fd_NdeI_F	5'-CTG ACG <u>CAT ATG</u> CTC TCT CAA GTT TGC CGC-3'
Fd_BamHI_R	5'-GAC GTG <u>GAT CCG</u> AGC TCG AAA ACA GCA CC-3'
IscA_NdeI_F	5'-CTG ACG <u>CAT ATG</u> CTT TCC TCC ATT ATC CGC-3'
IscA_Δ8_NdeI_F	5'-CTG ACG <u>CAT ATG</u> GCA AAA GCA AGA CCA GCA-3'
IscA_BamHI_R	5'-GAC GTG <u>GAT CCA</u> TGG AGG CAA GCA CCT GG-3'
ME_NdeI_F	5'-CTG ACG <u>CAT ATG</u> CTC ACA TCT TCA GTC TCT-3'
ME_Δ11_NdeI_F	5'-CTG ACG <u>CAT ATG</u> ATC TGC AGG GCT AAG GTC-3'
ME_BamHI_R	5'-GAC GTG <u>GAT CCA</u> TAG AGT TGC TCG TAT TC-3'

Folgende Primer wurden für Sequenzierungen verwendet.

M13_F	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'
M13_R	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'
pJET_F	5'-CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC-3'
pJET_R	5'-AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG-3'
pTagvag2_F	5'-CGG CCA CTT ACG CTT CAA TTA AGG GG-3'

2.6 Vektoren

pDONR TM 221 P1-P5r	Invitrogen
pDONR TM 221 P5-P2	Invitrogen
pJET1.2/blunt	Fermentas
pTagvag2	(Hrdý <i>et al.</i> , 2004)
pStreptag	Dr. Sven B. Gould

2.7 Kulturen

Escherichia coli Kulturen wurden zu Klonierungszwecken käuflich erworben. *Trichomonas vaginalis* war der Modellorganismus für zell- und molekularbiologische Experimente. Cyanobakterien der Sektionen IV und V (Rippka *et al.*, 1979) wurden zur Genomanalyse eingesetzt.

Name	Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	
XL1-Blue MRF ⁺ (Stratagene)	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^{\text{q}}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^{\text{r}}\text{)]}$
DH5 α (Bethesda Research Laboratories)	F ⁻ <i>endA1 thi-1 recA1 relA1 gyrA96</i> $\phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$ $\Delta(\text{lacZYA-argF})$ U169 <i>hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) phoA supE44</i> λ -
One Shot [®] <i>ccdB</i> Survival [™] 2 T1 ^K (Invitrogen)	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$ $\Delta(\text{lacX74 recA1 ara}\Delta 139 \Delta(\text{ara-leu})7697 \text{ galU galK rpsL (Str}^{\text{R}}) \text{ endA1 nupG thuA::IS2}$

Name	Bezug
<i>Trichomonas vaginalis</i>	J.-H. Tai, Institute of Biomedical Sciences, Taipei, Taiwan
<i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 6912	R. Rippka, Institut Pasteur, Paris
<i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 9212	R. Rippka, Institut Pasteur, Paris
<i>Fischerella muscicola</i> PCC 73103	R. Rippka, Institut Pasteur, Paris
<i>Fischerella muscicola</i> PCC 7414	R. Rippka, Institut Pasteur, Paris
<i>Fischerella thermalis</i> PCC 7521	R. Rippka, Institut Pasteur, Paris
<i>Scytonema hofmanni</i> PCC 7110	R. Rippka, Institut Pasteur, Paris

2.8 Medien

TYM (Diamond, 1957)

LB (Bertani, 1951)

2.9 Arbeiten mit Zellkulturen

Für sämtliche durchgeführten Experimente wurde der *Trichomonas vaginalis* T1 Stamm verwendet.

2.9.1 Kultivierung von *Trichomonas vaginalis*

Die Zellkulturen von *Trichomonas vaginalis* wurden in tryptose-yeast extract-maltose Medium (TYM) pH 6,2 (2,22 % (w/v) Tryptose; 1,11 % (w/v) Hefeextrakt; 5,55 % (w/v) Maltose; 1,11 % (w/v) L-Cystein; 0,22 % (w/v) L-(+)Ascorbinsäure; 0,88 % (w/v) Kaliumdihydrogenphosphat; 0,88 % (w/v) Dikaliumhydrogenphosphat; nach Autoklavierung 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes Pferdeserum (PAN Biotech); 0,71 % (v/v) Eisenlösung (1 % (w/v) $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1 % (w/v) 5-Sulfosalicylsäure)) in 15 ml Röhrchen kultiviert (Clark & Diamond, 2002; Diamond, 1957). Zellen aus den Kulturen wurden mindestens alle zwei Tage in frisches Medium überführt. Für Experimente in dieser Arbeit wurden Kulturen in Volumina bis zu 2 l angezogen.

Zur langzeit Lagerung wurden Dauerkulturen angelegt. Verwendet wurde stets eine dicht angewachsene Kultur, die in Cryo-Röhrchen mit frischem TYM Medium zu 50 % verdünnt wurde. Zu den Dauerkulturen wurde zusätzlich 10 % (v/v) DMSO zugegeben. Es folgte 1 h Inkubation auf Eis und 1 h bei -20 °C. Anschließend wurden sie bei -80 °C aufbewahrt.

TYM Medium wurde zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen stets mit 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (MP Biomedicals) versetzt. Zur Selektion von transfizierten *Trichomonas* Zellen wurde 100 µg/ml G418 (Roth) verwendet.

2.9.2 Transfektion durch Elektroporation

T. vaginalis Zellen wurden durch Elektroporation transfiziert (Delgadillo *et al.*, 1997; Land *et al.*, 2004). Es wurde stets 50 µg Plasmid in 0,4 cm Elektroporationsküvetten (Molecular BioProducts bzw. Bio-Rad) verwendet. Hinzugegeben wurden ca. $2,5 \times 10^8$ in 300 µl frischem TYM Medium resuspendierte und viermal durch eine 23G-Nadel gezogene *T. vaginalis* Zellen. Die Küvette wurde in die Schockkammer des Gene Pulser (Bio-Rad) inseriert, der elektrische Puls erfolgte bei 350 V und 960 µF. Anschließend wurden die Zellen für 10 min auf Eis gekühlt und in frisches TYM Medium

überführt. Die Selektion erfolgte mit G418 [100 µg/ml] nach einer Inkubation von 4 h bei 37 °C.

Der Transfektionserfolg wurde mit einer PCR überprüft. Nach drei Waschschritten mit sterilem H₂O wurden die transfizierten Zellen in einem Thermocycler (Eppendorf) durch wiederholtes Erhitzen und Abkühlen aufgeschlossen. Die Zellsuspension diente als Ausgangsmaterial für die PCR, die unter Verwendung spezifischer Primer gegen das entsprechende Konstrukt durchgeführt wurde.

2.9.3 Isolation von Hydrogenosomen

Intakte Hydrogenosomen wurden aus dicht angewachsenen 2 l *T. vaginalis* Kulturen isoliert (Bradley *et al.*, 1997; Pütz *et al.*, 2005). Die Zellen wurden bei 1000 g pelletiert und zweimal mit SMB (250 mM Saccharose; 10 mM MOPS/KOH pH 7,2; 10 mM β-Mercaptoethanol) gewaschen. Danach wurden sie in SMDI (250 mM Saccharose; 10 mM MOPS/KOH pH 7,2; 10 mM DTT; 10 µg/ml Leupeptin; 50 µg/ml TLCK) resuspendiert und mit Mörser und Pistill unter Zugabe von Ø 0,4 bis 0.6 mm Glasperlen (Sartorius) aufgeschlossen. Die Glasperlen und Zelltrümmer wurden bei 755 g abzentrifugiert und der Überstand als Gesamtzellextrakt aufbewahrt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 7500 g wurde das Cytosol von den Organellen getrennt. Die Organellen wurden in SMDI resuspendiert, mit 90 % Percoll (90 % (v/v) Percoll, GE Healthcare; 10 % (v/v) isotonische Saccharose (2,5 M Saccharose; 100 mM MOPS/KOH pH 7,2); 10 mM DTT; 50 µg/ml TLCK; 10 µg/ml Leupeptin) im Verhältnis 1 : 1 verdünnt und in einem Vertikalrotor bei 87000 g bis zur Einstellung eines Dichtegradienten zentrifugiert. Es entstanden zwei distinkte Banden, Lysosomen und Hydrogenosomen, sowie eine Polysaccharidschicht als Sediment am Zentrifugenröhrchen. Die Hydrogenosomen wurden zweimal mit SMDI gewaschen und anschließend aufbewahrt.

2.9.4 Proteasebehandlung der Hydrogenosomen

Isolierte Hydrogenosomen wurden zur Determination des Proteinimports mit Proteinase K behandelt (Dyall *et al.*, 2003). 200 µg Hydrogenosomen wurden in SM Puffer (250 mM Saccharose; 10 mM MOPS/KOH pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert, mit 50 bzw. 100 µg/ml Proteinase K versetzt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Als Positivkontrolle wurde bei jedem Ansatz eine Probe mit 1 % (v/v) Triton X-100 verwendet. Ebenfalls wurde stets eine Negativkontrolle, ohne Zugabe von Proteinase K, angesetzt. Die Proteolyse wurde durch das Hinzufügen von Aceton/Trichloressigsäure (1 : 7,5) beendet.

2.9.5 Dephosphorylierung hydrogenosomaler Proteine

Hydrogenosomale Proteine wurden durch Einsatz von alkalischer Phosphatase (CIP) dephosphoryliert. 50 µg Hydrogenosomen wurden mit 5 U CIP (Fermentas), CIP Puffer (Fermentas) und 1 % (v/v) Triton X-100 für 60 min bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrollen wurden Proben ohne CIP bzw. ohne Triton X-100 verwendet.

2.9.6 Isolation hydrogenosomaler Membranen und Matrix

Hydrogenosomale Proteine wurden durch Ultrazentrifugation in Membran- und Matrixproteine getrennt. Die Hydrogenosomen wurden für 45 min in 0,1 M Na₂CO₃ inkubiert (Fujiki *et al.*, 1982) und anschließend bei 208000 g zentrifugiert. Die Membranproteine sedimentierten am Boden des Zentrifugenröhrchens, während die Matrixproteine in der gelösten Fraktion verblieben.

2.9.7 Kultivierung von *Escherichia coli*

Escherichia coli XL1-Blue und DH5α Kulturen wurden bei 37 °C in LB Medium bzw. auf LB Agarplatten angezogen (Bertani, 1951; Sambrook *et al.*, 1989).

2.9.8 Anlegen von Stammkulturen

Die Kulturen wurden in LB Medium bis zu einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8 angezogen und nach Zugabe von sterilem Glycerin aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Stammkulturen (Glycerolstocks) wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.9.9 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die chemische Kompetenz von *E. coli* Zellen wurde durch die Behandlung mit Kalziumsalz erreicht (Mandel & Higa, 1970). Eine 250 ml *E. coli* Kultur wurde bis zu einer OD_{550} von 0,4 bis 0,6 angezogen. Dann wurde sie für 15 min bei 1300 g pelletiert und in 80 ml Freezing Buffer gewaschen (100 mM KCl; 50 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 10 mM Kaliumacetat; 10 % (v/v) Glycerin; pH 6,4). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 20 ml Freezing Buffer resuspendiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.9.10 Transformation durch Hitzeschock

Chemisch kompetente Zellen wurden durch Hitzeschock mit Plasmid DNA transformiert (Hanahan, 1983). Der Hitzeschock erfolgte bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ nach einer Inkubation der Zellen auf Eis. Die Zellen wurden wieder abgekühlt und in LB Medium bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei 200 rpm angezogen. Danach wurden sie auf einer LB Platte mit entsprechendem Antibiotikum auf positive Klone selektiert.

2.10 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.10.1 Silanisieren von Glasgefäßen

Corex[®] Zentrifugationsröhrchen und Pasteurpipetten wurden mit 5 % $(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$ in CCl_4 zur Hydrophobierung silanisiert. Hierbei entstand an der Glasoberfläche eine Silanschicht durch chemische Anlagerung. Somit wurde die Adhärenz durch Wasserstoffbrücken von Flüssigkeitsresten an der

Glasoberfläche unterbunden. Die silanisierten Gefäße wurden mit Ethanol und Wasser gespült und zum Trocknen ausgeheizt.

2.10.2 Isolation genomischer DNA aus Cyanobakterien

Cyanobakterielle DNA wurde mit der Phenol/Chloroform Extraktion isoliert, da andere Methoden wie die Isolation mit DNAzol[®] (Invitrogen) oder CTAB (Roth) keinen Erfolg zeigten. Pelletierte Kulturen wurden hierbei in TES Puffer (25 % (w/v) Saccharose; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert und die Zellen durch Inkubation mit Lysozym [5 mg/ml] bei 37 °C für 1 h aufgeschlossen. Zum Entfernen der Exopolysacharidschicht wurde 0,1 bis 1 % Sarkosyl hinzugefügt (Wu *et al.*, 2000). Anschließend erfolgte die Zugabe von Proteinase K [100 µg/ml] sowie 2 % (v/v) SDS und eine Inkubation bei 60 °C für 2h. Proteine und DNA wurden zweimal durch Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform voneinander getrennt. Anschließend wurde 1 Volumen reines Chloroform verwendet. Die DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und in H₂O bei 4 °C über Nacht resuspendiert.

2.10.3 Reinigung isolierter DNA aus Cyanobakterien

Die mit Phenol/Chloroform extrahierte DNA enthielt noch RNA und Polysaccharide. Diese wurden durch Dichtegradientenzentrifugation entfernt. Es wurde 1 g CsCl pro ml TE Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) verwendet. Hinzugegeben wurde die isolierte DNA Probe und circa 0,01 % (v/v) Ethidiumbromid. Der Ansatz wurde mit silanisierten Pasteurpipetten in Beckmann Polyallomer Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1 µl Isoamylalkohol versetzt. Die Röhrchen wurden verschweißt und bei 150000 g und 20 °C für 40 h zentrifugiert. Unter UV Licht wurde die DNA Bande sichtbar. RNA und Polysaccharide sedimentierten am Zentrifugenröhrchen. Das Röhrchen wurde mit einer 23G-Nadel durchstoßen und die DNA abgenommen. Eine weitere Nadel wurde für den Druckausgleich verwendet. Das Ethidiumbromid wurde mit in CsCl gesättigtem Isoamylalkohol entfernt. Die DNA wurde durch Zugabe von 70%

Ethanol in TE Puffer und 0,1 M Natriumacetat pH 6,5 bei -20 °C über Nacht in silanisierten Corex[®] Röhrchen gefällt. Dann wurden die Proben bei 7500 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert und die DNA in TE Puffer resuspendiert.

Zur Erstellung von Fosmid Bibliotheken von *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 zum Schließen des Genoms wurde auf den Schritt verzichtet, um Scherkräfte zu vermeiden und zur Gewährleistung von DNA Fragmenten mit hohem Molekulargewicht. RNA wurde hierbei durch Inkubation in RNase entfernt und die DNA in H₂O resuspendiert.

2.10.4 Isolation genomischer DNA und RNA aus *T. vaginalis*

Genomische DNA aus *T. vaginalis* wurde mit DNAzol[®] (Invitrogen) isoliert. Hierbei wurde eine 50 ml Zellkultur in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet und die Zellen bei 1000 g pelletiert. Das verbliebene Medium wurde verworfen und die Isolation nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Gesamt RNA wurde mit TRIzol[®] (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.10.5 Synthese von cDNA

Aus isolierter Gesamt RNA wurde mit dem SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) cDNA nach dem Herstellerprotokoll synthetisiert. Für die Synthese wurde die reverse Transkriptase SuperScript III RT eingesetzt.

2.10.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von Genen wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt (Saiki *et al.*, 1988). Mit dieser Methode wurden die gewünschten Gene durch wiederholtes Erhitzen und Abkühlen vervielfältigt. Im ersten Schritt wurde die doppelsträngige DNA bei 95 °C in ihre Einzelstränge denaturiert. Der zweite Schritt war die Anlagerungsphase, bei der die Primer an die DNA banden, und fand bei 50 bis 60 °C statt. Da die

optimalen Anlagerungstemperaturen bei verschiedenen Primern variieren wurde hier oft ein Temperaturgradient eingesetzt, um ein optimales Ergebnis zu erzielen. Der dritte Schritt war die Elongationsphase und fand bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der DNA Polymerase, statt. Hierbei wurde der komplementäre DNA Strang neu synthetisiert. Diese drei Schritte stellten einen Zyklus der PCR dar, welcher 30 mal wiederholt wurde. Somit stieg die Zahl der Genkopien logarithmisch an.

Als Ausgangsmaterial wurde isolierte genomische DNA oder gereinigtes Plasmid mit dem gewünschten Zielgen verwendet. Sämtliche Primer wurden zuvor konstruiert und von den Firmen Metabion bzw. Eurofins synthetisiert. Jeder Ansatz enthielt zusätzlich dNTPs und eine DNA Polymerase mit entsprechendem Puffer. In dieser Arbeit wurden die Proofreading Polymerasen *Pfu* (Fermentas), Phusion (Finnzymes/NEB) und Velocity (Bioline) verwendet. Bereits vorhandene Konstrukte wurden mit der *Taq* Polymerase (Metabion) getestet.

Falls die Überhänge für die Primer zu lang waren, wurde die PCR in zwei Teilen durchgeführt. Die erste PCR erfolgte wie oben beschrieben. Die zweite PCR wurde als Nested-PCR bezeichnet. Hierbei diente als Ausgangssubstrat das Produkt der ersten PCR. Ziel dieser PCR war die Verlängerung der Überhänge an den 5' und 3' Enden des entsprechenden Gens.

2.10.7 Agarose Gelelektrophorese

Mit der Gelelektrophorese wurde DNA und RNA in einem Agarosegel bei einer angesetzten Spannung getrennt. Um eine optimale Trennung zu gewährleisten wurden je nach Gengröße 0,7 bis 2 %ige (w/v) Agarosegele in TAE Puffer (40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA pH 8,0) angesetzt. Das Gel wurde in der Mikrowelle Quick Cookmate (Daewoo) aufgekocht und in einen Gelträger gegossen. Zum Erzeugen von Geltaschen wurde ein entsprechender Kamm verwendet. Nachdem das Gel ausgehärtet war, konnte es in eine Elektrophoresekammer der Serie Sub-Cell® GT (Bio-Rad) eingesetzt werden und mit Proben beladen werden. Die Proben wurden stets

mit Ladepuffer (2,5 % (w/v) Ficoll 400; 5 % (v/v) EDTA pH 8,0; 0,0125 % (w/v) Bromphenolblau; 0,0125 % (w/v) Xylencyanolblau) versetzt. Zur Visualisierung der DNA Banden wurde Ethidiumbromid verwendet. Zur Determination der Bandengröße wurden stets Marker verwendet. Eingesetzt wurden die Marker Hyperladder I, II und IV (Bioline). Analysiert wurden die Gele in der Geldokumentationsanlage GelDoc-IT™ (UVP) oder auf einem UV-Tisch (LTF Labortechnik) unter Bestrahlung mit UV-Licht. Durch Interkalierung des Ethidiumbromids mit den Nukleinsäuren wurden die spezifischen Banden durch Fluoreszenz sichtbar. Anhand der Leuchtintensität des Markers konnte zudem eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden, da die Konzentrationen der einzelnen Markerbanden bekannt waren. Durch die Gelmigration wurde die DNA-Probe auch von anderen Inhaltsstoffen, wie z.B. Puffern oder Restriktionsenzymen, gereinigt. Die Bande konnte dann mit einem Skalpell ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert werden.

2.10.8 DNA-Elution aus Agarosegelen

Durch Elektrophorese getrennte und ausgeschnittene DNA wurde nach dem Prinzip der DNA-Bindung an Silikamembranen aus Agarosegelen eluiert (Vogelstein & Gillespie, 1979). Verwendet wurden hierfür das QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen) bzw. MinElute® Gel Extraction Kit (Quiagen) und es wurde nach Protokoll des Herstellers weiter verfahren.

2.10.9 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm. Alternativ wurde sie mit Qbit (Invitrogen) nach Herstellerprotokoll bestimmt oder bei der Gelelektrophorese durch Abgleich der DNA Leuchtintensität mit Banden bekannter Konzentration des Markers HyperLadder I (Bioline).

2.10.10 Klonierung über Restriktionsschnittstellen

Amplifizierte Gene wurden durch Klonierung in *Escherichia coli* vermehrt. Es wurden Klonierungen mit glatten Enden (*blunt ends*) und mit klebrigen Enden (*sticky ends*) durchgeführt.

Die blunt end Ligation wurde mit dem CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas) durchgeführt. PCR Produkte wurden hierbei in den bereits linearisiert vorliegenden pJET1.2/blunt Vektor mit einer T4 DNA Ligase ligiert. Die Ligation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Anschließend erfolgte zur Vermehrung des Plasmids eine Transformation mit *E. coli* XL1-Blue Zellen und eine Selektion mit Ampicillin auf positive Transformanten. Zellen, die ein mit sich selbst religiertes Plasmid aufgenommen hatten, wurden durch ein letales Gen im Vektor am Wachstum gehindert. Plasmide wurden aus den positiven Klonen isoliert und die Gene durch Sequenzierung überprüft.

Die Fragmente wurden mit Restriktionsenzymen aus dem Plasmid rausgeschnitten. Typischerweise wurden hier die Enzyme *NdeI* und *BamHI* eingesetzt, so dass sticky ends entstanden. Der Zielvektor wurde stets mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelt, um eine Ligation zu ermöglichen. In diesem Fall wurde für die Ligation der Expressionsvektor pTagvag2 und eine Quick T4 DNA Ligase (NEB) verwendet. Danach folgte wieder eine Transformation mit *E. coli* XL1-Blue Zellen, die Selektion mit Ampicillin und eine Plasmidisolierung. Der Expressionsvektor mit dem gewünschten Zielgen konnte anschließend für die Transfektion von *T. vaginalis* Zellen verwendet werden.

2.10.11 Klonierung mit dem Gateway System

Alternativ wurde die Klonierung mit dem Gateway System (Invitrogen) durchgeführt (Katzen, 2007). Diese Methode basiert auf der Rekombination von Erkennungsstellen (attachment sites) der Phage λ bei der Insertion seines Genoms in das Genom des Wirtsbakteriums (Hartley *et al.*, 2000; Landy, 1989; Sasaki *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2008). Die Klonierung wird in zwei Stufen unterteilt: die BP Rekombination und die LR Rekombination.

Bei der BP Rekombination wurde das Amplifikat in einen Klonierungsvektor inseriert. Amplifizierte Genfragmente enthielten hierbei attB sites, welche Äquivalente der bakteriellen Rekombinationssequenzen darstellen. Die Klonierungsvektoren hingegen enthielten attP sites, die den Phagenrekombinationsstellen entsprachen. Die BP Rekombination wurde mit dem attB PCR Produkt, dem entsprechenden attP pDONR™221 Klonierungsvektor und dem BP Clonase II enzyme mix nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Der pDONR™221 P1-P5r wurde stets für die Klonierung von Zielgenen aus *T. vaginalis* verwendet. Der pDONR™221 P5P2 Vektor hingegen wurde ausschließlich für die Klonierung eines Di-Hämagglutinin Tags, der für die spätere Immunodetektion relevant war, verwendet und wurde freundlicherweise von Dr. Verena Zimorski (Institut für Molekulare Evolution, HHU Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Nach abgeschlossener Rekombination entstanden attL und attR sites. Darauf folgte eine Transformation von *E. coli* DH5 α , die Selektion mit Kanamycin, Plasmidisolation und Sequenzierung. Ein letales Gen in den pDONR™221 Vektoren verhinderte das Wachstum von Transformanten mit nicht rekombinierten Plasmiden.

Bei der LR Rekombination wurden die Fragmente aus den pDONR™221 Vektoren in einen Expressionsvektor in vordefinierter Reihenfolge inseriert. Die linken attL sites rekombinierten hierbei mit den rechten attR sites. Für die Reaktion wurden stets die beiden rekombinierten pDONR™221 Vektoren, der mit attachment sites modifizierte Expressionsvektor pTagvag2 (freundlicherweise von Dr. Verena Zimorski (Institut für Molekulare Evolution, HHU Düsseldorf) zur Verfügung gestellt) sowie der LR Clonase II Plus enzyme mix nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Danach erfolgte eine Transformation von *E. coli* DH5 α , die Selektion mit Ampicillin und die Plasmidisolation. Das fertige Konstrukt konnte anschließend für die Transfektion von *T. vaginalis* verwendet werden.

Zur Vervielfältigung des nicht rekombinierten pDONR™221 P1-P5r Plasmids wurden One Shot® ccdB Survival™ 2 T1^R kompetente *E. coli* Zellen (Invitrogen) für die Transformation verwendet. Diese Zellen werden nicht von

den Effekten des letalen Gens des Vektors abgetötet. Die Transformation wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

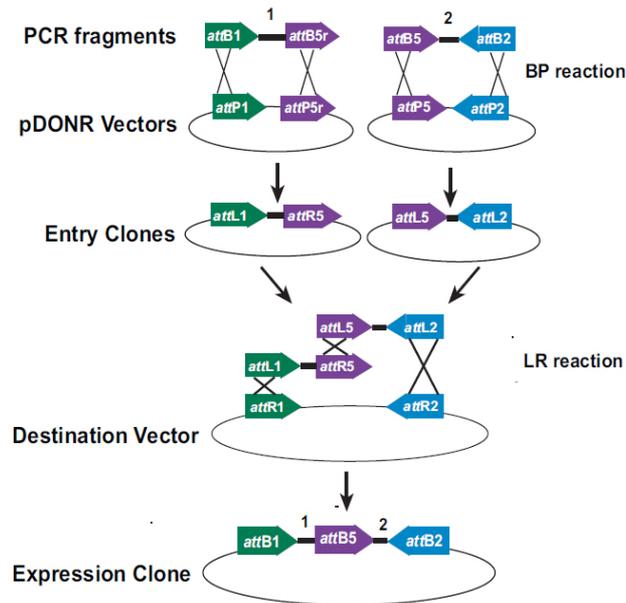


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Klonierungsprinzips mit dem Gateway System aus dem Protokoll von Invitrogen.

2.10.12 Isolation von zirkulären Plasmiden

Plasmid DNA aus *E. coli* wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse bakterieller Zellen isoliert (Birnboim & Doly, 1979). Dafür verwendet wurden die Kits NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel) bzw. GeneJET[™] Plasmid Miniprep Kit (Fermentas).

2.10.13 Sequenzierung

Plasmide wurden mit dem Kettenabbruchverfahren sequenziert (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC durchgeführt und die Ergebnisse wurden durch die Internetpräsenz zur Verfügung gestellt.

2.11 Arbeiten mit Proteinen

2.11.1 Präzipitation von Proteinen mit Aceton/TCA

Aceton und Trichloressigsäure (TCA) wurden im Verhältnis 1 : 7,5 eingesetzt. Hydrogenosomale Proteine wurden auf diese Weise über Nacht bei -20 °C gefällt. Danach wurden sie drei mal mit Aceton bei 500 rpm gewaschen und anschließend in Rehydratisierungspuffer (7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 4 % (w/v) CHAPS) bei 600 rpm resuspendiert. Für die Proteintrennung durch eine SDS-PAGE wurde konzentriertes Tris und Laemmli-puffer hinzugefügt.

2.11.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen wurde photometrisch bei 595 nm unter Verwendung eines Bradford-Reagenz für Protein Assays (Bio-Rad) bestimmt (Bradford, 1976). Um die Proteinkonzentrationen ermitteln zu können wurde zuerst eine Kalibrierungsgerade mit bekannten Rinderserumalbumin (BSA) Proteinkonzentrationen erstellt.

2.11.3 SDS-PAGE

Die Trennung von Proteinen erfolgte durch denaturierende SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Mit dieser Methode wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Verwendet wurden Mini-PROTEAN[®] TGX[™] Stainfree Precast Gele (Bio-Rad) oder selbst angefertigte 12 bis 15 %ige (v/v) Gele. Sie bestanden aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Als Proteinmarker wurde stets der PageRuler[™] Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Proteine in Precast Gelen wurden in der Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell (Bio-Rad) getrennt. Die Trennung mit selbst hergestellten Gelen erfolgte in den Gelkammern P8DS, P9DS oder P10DS (OWL Separation Systems/Thermo Scientific) bzw. Hoefer SE600 (Hoefer). Die Proteine wurden stets vor der Trennung für 10 min bei 95 °C denaturiert und mit 1 × 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) versetzt. Die Kammern wurden mit 1 × Tris-Glycin Laufpuffer befüllt.

2.11.4 Isoelektrische Fokussierung

Zur zweidimensionalen Trennung wurde vor der SDS-PAGE eine isoelektrische Fokussierung durchgeführt. Hierbei wurden Proteine nach ihrem pH Wert getrennt und lagerten sich an ihrem isoelektrischen Punkt an. 1 mg Hydrogenosomen wurden in Lysispuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 40 mM Tris-HCl pH 9.0, 2 % (w/v) CHAPS, 2 % (w/v) ASB14) mit 1 % (w/v) DTT inkubiert mit einem 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare) nach Herstellerprotokoll behandelt und anschließend in Rehydratisierungspuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % (w/v) CHAPS, 2 % (w/v) ASB14, 0,5 % (v/v) IPG-Puffer pH 6-11, spurweise Bromphenolblau) mit 1 % (w/v) DTT resuspendiert. Mit den Proteinen wurde dann ein IPG-Strip (*immobilised pH gradient*) pH 6-11 in einem Keramik Stripholder beladen und mit cover fluid (Mineralöl) überschichtet. Die Fokussierung erfolgte im Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) bei 20 °C und 50 µA/Strip. Folgendes Programm wurde verwendet: 10 h Rehydratisierung, 1 h step 'n hold 100 V, 1 h step 'n hold 200 V, 1 h step 'n hold 500 V, 1 h step 'n hold 1000 V, 1 h Gradient 1000 bis 8000 V, 4 h step 'n hold 8000 V. Darauf folgte die Trennung nach der zweiten Dimension. Hierzu wurde der IPG-Strip in Äquilibrierungslösung (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, Spurweise Bromphenolblau) und 1 % (w/v) DTT inkubiert, beim zweiten Äquilibrierungsschritt zusätzlich mit 2,5 % (w/v) Iodacetamid, auf ein SDS-Gel geladen und mit Agarose Sealing solution (1 × Tris-Glycin Puffer, 0,5 % (w/v) M-Agarose, spurweise Bromphenolblau) fixiert.

2.11.5 Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen

Proteingele wurden mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt (Heukeshoven & Dernick, 1988; Neuhoff *et al.*, 1985). Dazu wurde eine Tablette PhastGel™ Blue R-350 (GE Healthcare) in 40 % Wasser und 60 % (v/v)

Methanol (Endvolumen: 200 ml) gelöst. Anschließend wurde die Lösung 1 : 10 mit 10% (v/v) Essigsäure verdünnt.

Alternativ wurde die Sensitive Coomassie Färbung eingesetzt (Kang *et al.*, 2002). Die angesetzte Färbelösung bestand aus 0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250; 2 % (w/v) Phosphorsäure; 5 % (w/v) Aluminiumsulfat; 10 % (v/v) Ethanol.

2.11.6 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung wurde zur Visualisierung von zweidimensional getrennten Proteinen in SDS Gelen durchgeführt (Blum *et al.*, 1987). Hierzu wurde das Gel in Lösung 1 (30 % (v/v) Methanol; 12 % (v/v) Essigsäure) für 1 h inkubiert und danach unter Schütteln in H₂O über Nacht. Anschließend wurde dreimal für 20 min in 30 % (v/v) Ethanol geschüttelt und für 1 min in 0,02 % (w/v) Na₂S₂O₃ inkubiert. Danach folgten drei Waschschrte mit H₂O und Inkubation in Lösung 2 (0,2 % (w/v) Silbernitrat, 0,075 % (v/v) Formaldehyd). Es wurde zweimal in H₂O gewaschen und in Lösung 3 (6 % (w/v) Natriumcarbonat; 0,0004 % (v/v) Natriumthiosulfat; 0,00005 % (v/v) Formaldehyd) inkubiert. Die Färbung wurde mit Lösung 4 (50 % (v/v) Methanol; 12 % (v/v) Essigsäure) gestoppt.

2.11.7 Tryptischer Verdau von Proteinen

Zur Proteinsequenzierung wurden die Proteine mit Trypsin behandelt. Die entsprechenden Proteine wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die Gelstücke in ca. 1 mm³ große Stücke zerkleinert. Um Verluste möglichst gering zu halten wurden LoRetention Reaktionsgefäße (Eppendorf) und LoRetention Pipettenspitzen (Eppendorf) verwendet. Salze und störende Agentien wurden aus dem Gel zweimal mit 50 % (v/v) Acetonitril ausgewaschen. Danach wurde mit 100 % Acetonitril gewaschen und anschließend mit 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (Bicarbonat). Dann wurde 100 mM Bicarbonat zugegeben und dazu 1 Volumen Acetonitril. Danach wurde 1 Volumen 100 % Acetonitril hinzugefügt. Anschließend

wurde die Lösung abgenommen und die Probe in der Vakuum-Zentrifuge Concentrator 5301 (Eppendorf) getrocknet. Als nächstes wurden die Peptide durch Zugabe von 10 mM DTT in 100 mM Bicarbonat reduziert. Cystein-Reste wurden durch 55 mM Iodacetamid in 100 mM Bicarbonat alkyliert. Nach Abnehmen der Lösung wurde dann in 100 mM Bicarbonat inkubiert und 1 Volumen Acetonitril hinzugefügt. Nachfolgend wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Gelstücke wurden dann in 0,1 mg/ml Trypsinlösung in 50 mM Bicarbonat rehydratisiert. Im Anschluss wurden die Gelstücke in 25 mM Bicarbonat resuspendiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubationszeit eluierten die Peptide aus den Gelstücken. Diese wurden abzentrifugiert und der Überstand aufbewahrt. Zur Extraktion der verbleibenden Peptide wurden die Gelstücke mit 25 mM Bicarbonat, mit Bicarbonat/Acetonitril und mit Elutionslösung (50 % (v/v) Acetonitril, 5 % (v/v) Ameisensäure) gewaschen. Die Überstände wurden vereint und die Peptide in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurden sie bei -20 °C aufbewahrt.

2.11.8 Western Blot

Durch SDS-PAGE getrennte Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Gershoni & Palade, 1983). Verwendet wurden die Membranen Hybond™-C Extra (GE Healthcare) bzw. porablot NCP (Macherry-Nagel). Hierbei wurden drei Stücke Whatman 3 MM Papier nach den Gelmaßen zurechtgeschnitten, mit Transferpuffer (40 mM Glycin; 50 mM Tris, 1 mM SDS, 20 % (v/v) Methanol) befeuchtet und auf die Anode der Western Blot Apparatur Multiphor II (GE Healthcare) aufgelegt. Darauf wurde die in Wasser getränkte Membran und das Gel gelegt und von drei weiteren Stücken Whatman Papier bedeckt. Anschließend wurde die Kathode aufgelegt und der Transfer für 1 h bei 0,82 mA/cm² gestartet. Alternativ wurde die Trans Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) Apparatur verwendet. Hierbei dauerte der Transfer bei selbst hergestellten Gelen 30 min und bei Mini-PROTEAN® TGX™ Stainfree Precast Gelen 7 min.

2.11.9 Proteinfärbung mit Ponceau S

Optional wurden Proteine auf der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S (0,5 % (w/v) Ponceau S; 1 % (v/v) Essigsäure) gefärbt. Die Färbung wurde anschließend mit H₂O differenziert. Hiermit konnte direkt die Qualität des Proteintransfers überprüft werden.

2.11.10 Immunodetektion

Proteine auf Nitrocellulosemembranen wurden durch Antikörperbehandlung detektiert. Zuerst wurde die Membran mit Blocking Puffer (5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl)) für 1 h behandelt. Dann wurde sie zweimal für 5 min in TBS gewaschen. Anschließend wurde sie mit dem ersten Antikörper Maus Anti-HA monoclonal antibody (Sigma) 1 : 1000 bis 1 : 5000 verdünnt in Blocking Puffer und in Folie eingeschweißt und für 1 h auf dem 3D Schüttler PS-M3D (Grant-bio) inkubiert. Darauf folgten drei Waschschrte in TBS für 10 min und die Inkubation mit dem Zweitantikörper ImmunoPure Goat Anti-Mouse IgG, Peroxidase Conjugated (Pierce) 1 : 10000 verdünnt in Blocking Puffer für 1 h. Dann wurde die Membran erneut dreimal für 10 min in TBS gewaschen. Zur Detektion wurde sie in einer Detektionslösung inkubiert, bestehend aus Lösung A (0,1 M Tris-HCl pH 8,6; 1,25 mM Luminol (Sigma)), Lösung B (6 mM para-Hydroxycoumarinsäure (Sigma) in DMSO) und 0,01 % (v/v) Wasserstoffperoxid. Alternativ wurde hierfür das SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Pierce/Thermo Scientific) nach Herstellerprotokoll eingesetzt. Die Filmexposition wurde im Fotolabor durch Auflegen eines Lumi-Film Chemilumineszent Detection Films (Roche) durchgeführt. Der Film wurde nach der Expositionszeit entwickelt und fixiert. Alternativ dazu wurde die Exposition im ChemiDoc[™] MP (Bio-Rad) durchgeführt.

2.11.11 Strippen der Nitrocellulosemembran

Antikörper wurden von einer Nitrocellulosemembran durch Inkubation in mild stripping buffer (Glycin; SDS; Tween 20; pH 2,2) für 5 bis 10 min entfernt.

Die Membran wurde anschließend zweimal in PBS (8 % (w/v) NaCl; 0,2 % (w/v) KCl; 1,44 % (w/v) Na₂HPO₄; 0,24 % (w/v) KH₂PO₄; pH 7,4) und zweimal in TBST (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20) gewaschen. Anschließend konnte mit dem Blocken fortgefahren werden.

2.11.12 Zellfixierung und Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Zellfixierung wurden *T. vaginalis* Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Dazu wurden sie in einer anaeroben Kammer 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Kammer bestand aus einem silanisierten Objektträger, an den sich die Zellen anhaften konnten, einer Gummidichtung und einem Standardobjektträger. Die Kulturen wurden durch die Gummidichtung mit einer 23G-Nadel in die Kammer injiziert. Nach der Inkubationszeit wurde die Kammer geöffnet und das überschüssige Medium entfernt. Der silanierte Objektträger mit den daran haftenden Zellen wurde für 5 min in Methanol und 5 min in Aceton bei -20 °C fixiert. Danach wurden die Objektträger zum Trocknen liegen gelassen. Anschließend wurden die Zellen für 1 h in Blocking PBS (0,25 % (w/v) BSA; 0,25 % (v/v) Gelatine in PBS) inkubiert. Dann folgte eine Inkubation mit den ersten Antikörpern Anti-HA (mouse) und Anti-ASCT (rabbit) bzw. Anti-SCS (rabbit) 1 : 500 verdünnt in Blocking PBS für 1 h. Es folgten drei Waschschrte für 10 min mit PBS, dann wurde für 1 h mit Zweitantikörpern (Alexa fluor 488 anti-mouse; Alexa flour 633 anti-rabbit) 1 : 1000 verdünnt im Dunkeln inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS im Dunkeln gewaschen. Der Objektträger wurde zum Trocknen liegen gelassen und mit einem Tropfen Vectashield mit DAPI (Vector Laboratories) bzw. Fluoroshield™ mit DAPI (Sigma) versetzt und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedichtet. Das Präparat wurde mit Glycerol Gelatine (Sigma) versiegelt.

2.12 Bioinformatische Methoden

Sequenzen aus dem *Trichomonas vaginalis* Genom wurden von der Datenbank TrichDB (Aurrecoechea *et al.*, 2009) bezogen. Die Datenbank

war auf der Internetpräsenz unter der Adresse www.trichdb.org abrufbar. Sequenzidentitäten wurden mit BLAST (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) auf der gleichen Seite oder bei NCBI durchgeführt. Weiterführende Sequenzanalysen wurden mit Programmen des EMBOSS Pakets (Rice *et al.*, 2000) durchgeführt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit den Programmen Photoshop Elements (Adobe) und ImageJ (Collins, 2007). Sequenzanalysen erfolgten mit Sequencher (Gene Codes). Plasmidkarten wurden mit Vector NTI[®] Express (Invitrogen) erstellt (Lu & Moriyama, 2004). Alignments wurden mit ClustalW erstellt (Thompson *et al.*, 1994) und mit BoxShade überarbeitet (Gaskell, 2000).

3 Ergebnisse

3.1 Lokalisation von Proteinen mit entfernten Transitpeptiden

Der Einfluss von Transitpeptiden auf den Proteinimport in Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* wurde bei drei Proteinen untersucht: Ferredoxin (TvFd, TVAG_003900), iron-sulfur cluster assembly protein (TvIscA, TVAG_456770) und *malic enzyme* (TvME, TVAG_267870). Am 5'-Ende der Gene wurden durch Verwendung spezifischer Primer die für das Transitpeptid kodierenden Nukleotide nicht amplifiziert, so dass die Aminosäuren des Transitpeptids am N-Terminus des Proteins fehlten. Proteine ohne Transitpeptid sind als Δ TP gekennzeichnet. Zur Kontrolle wurden die entsprechenden Proteine in voller Länge verwendet.

Folgende Aminosäuren an den N-Termini wurden entfernt (grau und kursiv markiert):

TvFd: **MLSQVCREFGTITA...** – 7 Aminosäuren

TvIscA: **MLSSIIRSF**AK**ARP...** – 8 Aminosäuren

TvME: **MLTSSVSV**PVR**NICRAK...** – 11 Aminosäuren

In allen sechs Fällen – je drei mit und drei ohne TP – wurden die überexprimierten Proteine in allen Fraktionen durch Antikörper gegen einen Di-Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) detektiert (Abb. 3.1). In den Hydrogenosomen und im Gesamtzellextrakt, der sowohl Cytosol als auch Hydrogenosomen enthält, wurde stets viel Protein detektiert. In der cytosolischen Fraktion hingegen gab es ein Signal schwächerer Intensität oder es wurde kein Signal erzielt. Zur Bestimmung der Reinheit der Fraktionen wurden die Antikörper von der Membran entfernt und dann mit Antikörpern gegen die hydrogenosomale Acetat:Succinat CoA Transferase (TvASCT, TVAG_395550) (van Grinsven *et al.*, 2008) oder Succinyl CoA Synthetase alpha (TvSCS α , TVAG_165340) erneut inkubiert und detektiert (Abb. 5.4).

Um zu überprüfen, ob die Proteine aus der hydrogenosomalen Fraktion tatsächlich die Membran passieren und in die Matrix gelangen, oder ausschließlich von außen an die hydrogenosomale Membran assoziieren, wurden Proteinase K Assays durchgeführt. Bei allen sechs Fällen waren die Proteine vor Proteolyse geschützt (Abb. 3.1). Die Aktivität der Protease wurde durch Zugabe von Triton X-100 bestätigt. Als Negativkontrolle wurde Triton X-100 ohne Proteinase K hinzugegeben.

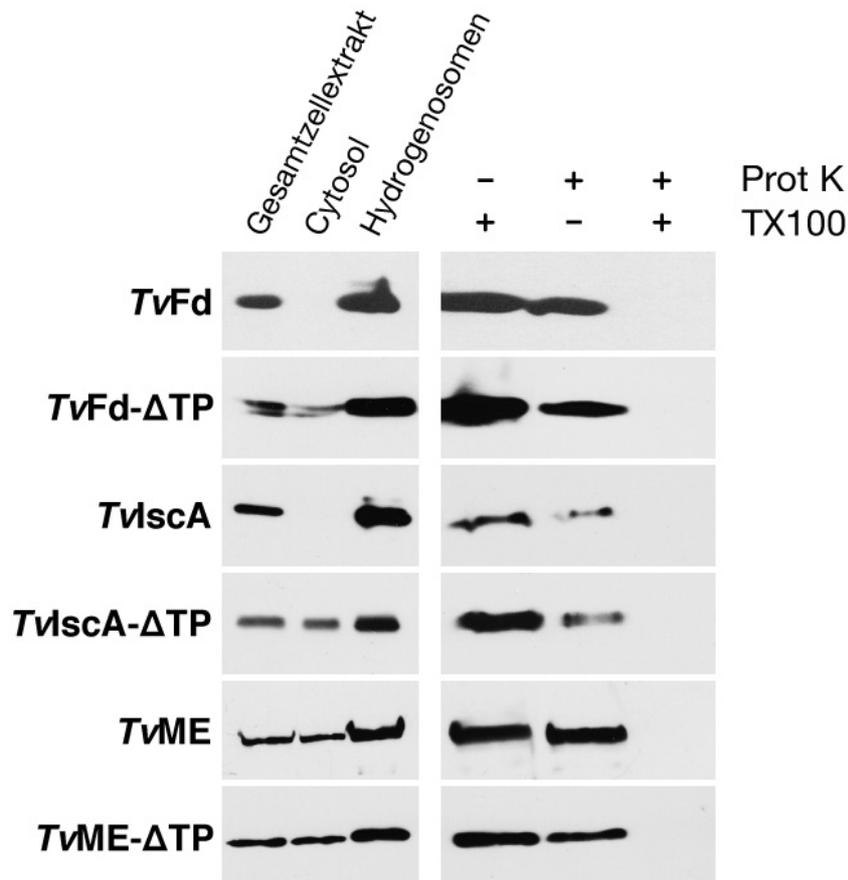


Abb. 3.1: Proteinimport in Hydrogenosomen von Proteinen mit und ohne Transitpeptid (Δ TP). Gezeigt sind die drei Fraktionen Gesamtzell-extrakt, Cytosol und Hydrogenosomen sowie die Proteinase K Behandlung der hydrogenosomalen Fraktion. *TvFd*: Ferredoxin (TVAG_003900), *TvIsca*: *Iron-sulfur cluster assembly protein* (TVAG_456770), *TvME*: *malic enzyme* (TVAG_267870), Prot K: Proteinase K, TX100: Triton X-100, +: Anwesenheit, -: Abwesenheit (Major *et al.*, 2013).

3.2 Lokalisation von separaten Proteindomänen

Da die untersuchten Proteine unabhängig vom Transitpeptid in der hydrogenosomalen Matrix lokalisieren, wurden weitere, möglicherweise

interne Importsignale gesucht. Bereits in einer früheren Studie wurde gezeigt, dass das hydrogenosomale Protein Succinyl CoA Synthetase (*TvSCSα*, TVAG_165340) ohne Transitpeptid importiert wird (Mentel *et al.*, 2008). Das Ergebnis konnte in dieser Arbeit reproduziert werden (Abb. 3.2). Folgende Aminosäuren am N-Terminus wurden entfernt (grau und kursiv markiert):

TvSCSα: **MLSSSFERNLHQPL...** – 8 Aminosäuren

Zur Untersuchung des Importverhaltens von einzelnen Domänen des Proteins wurde es in drei individuelle Blöcke gleicher Länge geteilt: *TvSCSα* Block 1, *TvSCSα* Block 2 und *TvSCSα* Block 3. Als Ausgangsprotein wurde hierbei *TvSCSα*-ΔTP (301 Aminosäuren) gewählt. Bei den Genen für *TvSCSα* Block 2 und *TvSCSα* Block 3 wurde ein ATG Startcodon am 5' Ende für die Proteinexpression hinzugefügt, was in einem Methionin am N-Terminus resultierte. Somit entstanden drei *TvSCSα* Teilproteine mit jeweils 101 Aminosäuren, zuzüglich der Aminosäuren des HA-Tags und der Gateway Erkennungsstelle (Anhang, Punkt 5.4). Alle drei individuellen Domänen wurden in der hydrogenosomalen Fraktion nachgewiesen und für Block 1 und 2 konnte der Schutz vor Proteolyse durch Proteinase K gezeigt werden (Abb. 3.2). Zusätzlich wurden die drei Domänen in jeweils zwei Konzentrationen nebeneinander aufgetragen (Abb. 3.4). Im direkten Vergleich war die deutlich schwächere Exposition von Block 3 erkennbar. Außerdem konnte eine Doppelbande in der hydrogenosomalen Fraktion bei Block 1 und 2 beobachtet werden. Im Cytosol hingegen war stets jeweils nur eine Bande vorhanden.

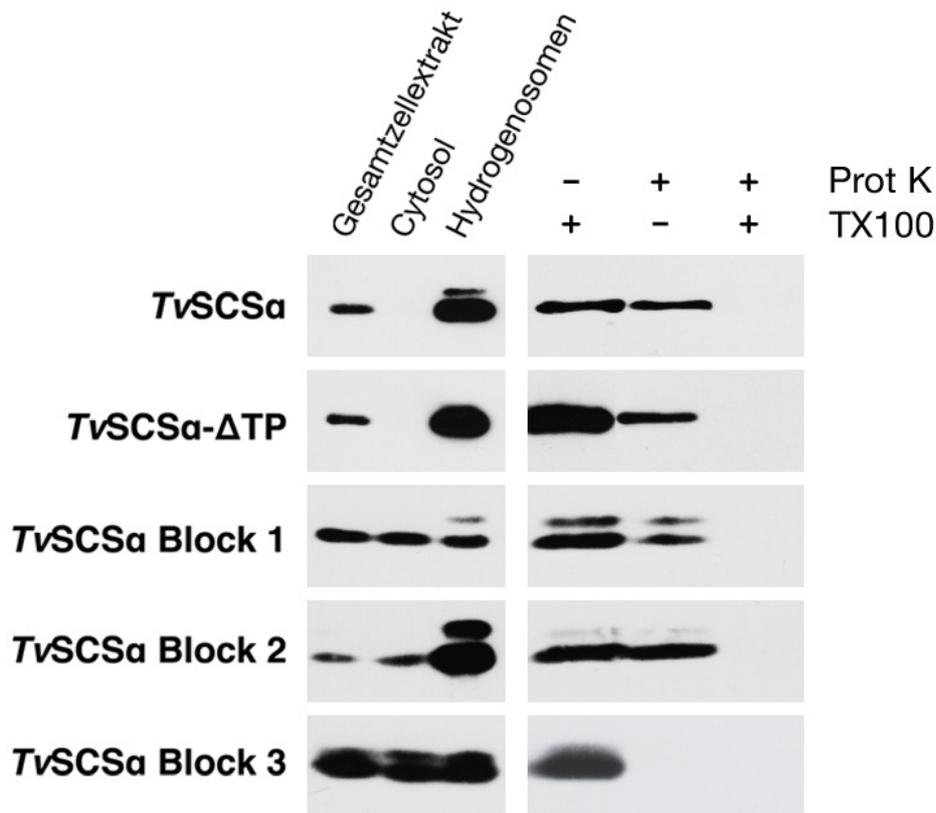


Abb. 3.2: Immunodetektion des HA-markierten *TvSCSa* Proteins in den drei Fraktionen Gesamtzellextrakt, Cytosol und Hydrogenosomen. Dargestellt ist das Gesamtprotein mit und ohne Transitpeptid sowie die drei individuellen Domänen. *TvSCSa*: Succinyl CoA Synthetase (TVAG_165340), Prot K: Proteinase K, TX100: Triton X-100, +: Anwesenheit, -: Abwesenheit (Major *et al.*, 2013).

Zusätzlich wurde ein zweites Protein zur Untersuchung interner Signale in drei Blöcke unterteilt, die hydrogenosomale Thioredoxin Reduktase 2 (*TvTrxRh2*, TVAG_125360). In einer vorangegangenen Studie wurde das Protein, das kein charakteristisches N-terminales Importmotiv aufweist, in den Hydrogenosomen lokalisiert (Mentel *et al.*, 2008). Die Domänenaufteilung wurde in diesem Fall nach der Proteinstruktur ausgewählt, die Einteilung orientierte sich an bioinformatisch vorhergesagten α -Helices. Demzufolge wurde *TvTrxRh2* Block 1 aus den Aminosäuren 1 bis 116, *TvTrxRh2* Block 2 aus 117 bis 229 und *TvTrxRh2* Block 3 aus 230 bis 311 gebildet. Diese Domänen wurden ebenfalls in der hydrogenosomalen Fraktion detektiert (Abb. 3.4).

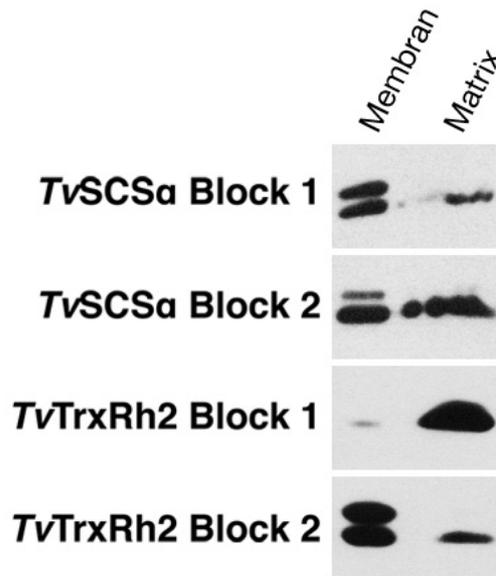


Abb. 3.3: Suborganellare Lokalisation der Blöcke 1 und 2 von *TvSCSα* und *TvTrxRh2* durch Trennung von Membran und Matrix.

Die Lokalisation *in organello* durch Trennung der Hydrogenosomen in Membran- und Matrixfraktion zeigte ebenfalls die Lokalisation der einzelnen Blöcke (Abb. 3.3). Die zuvor in den Hydrogenosomen beobachtete Doppelbande trat hierbei stets nur in der Membranfraktion auf, nicht jedoch in der Matrix.

Bei beiden Proteinen war der dritte Teil deutlich schwieriger zu detektieren als die ersten beiden, da das Signal bei *TvSCSα* Block 3 und *TvTrxRh2* Block 3 schwächer war als die anderen (Abb. 3.4). Zudem war bei Block 3 keine Doppelbande nachweisbar.

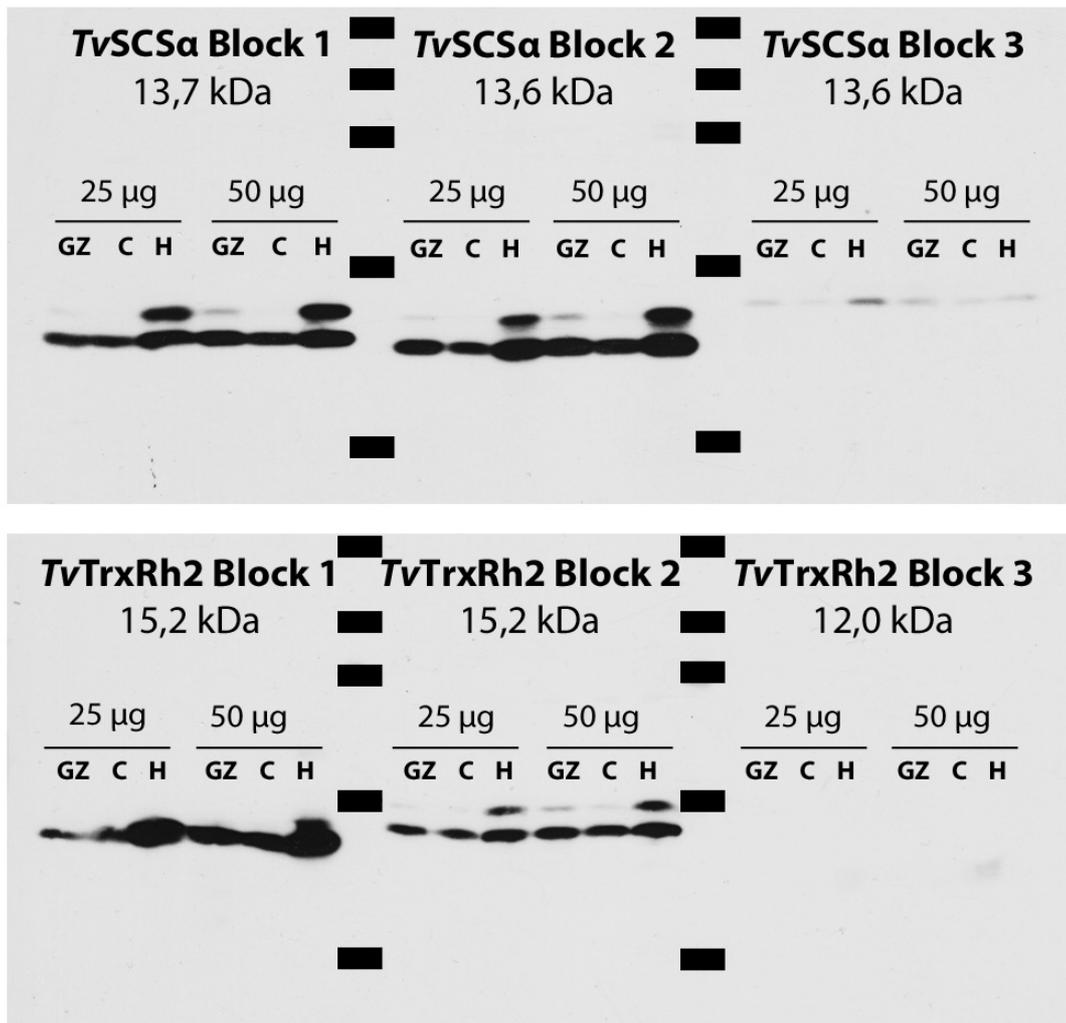


Abb. 3.4: Vergleich der Lokalisation der einzelnen Domänen von *TvSCSα* (TVAG_165340) und *TvTrxRh2* (TVAG_125360). Zu beobachten sind Migrationsdifferenzen bei den Blöcken sowie Unterschiede bei der Expositionsintensität der Signale. Aufgetragen sind jeweils zwei Konzentrationen (25 und 50 µg). Das angegebene Molekulargewicht in Kilodalton (kDa) basiert auf einer Vorhersage aus der Aminosäurezusammensetzung der Fusionsproteine. GZ: Gesamtzellextrakt, C: Cytosol, H: Hydrogenosomen.

3.3 2D-Trennung von *TvSCSα* Block 2 Hydrogenosomen

Zur Untersuchung der Doppelbande wurde die hydrogenosomale Fraktion von *TvSCSα* Block 2 durch isoelektrische Fokussierung nach dem isoelektrischen Punkt und anschließend durch SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht getrennt. Bei der Immunodetektion ist hierbei neben der Größenabweichung der beiden Banden auch eine Abweichung des

isoelektrischen Punktes bei einem pH Gradienten von 6 bis 11 festgestellt worden (Abb. 3.5).

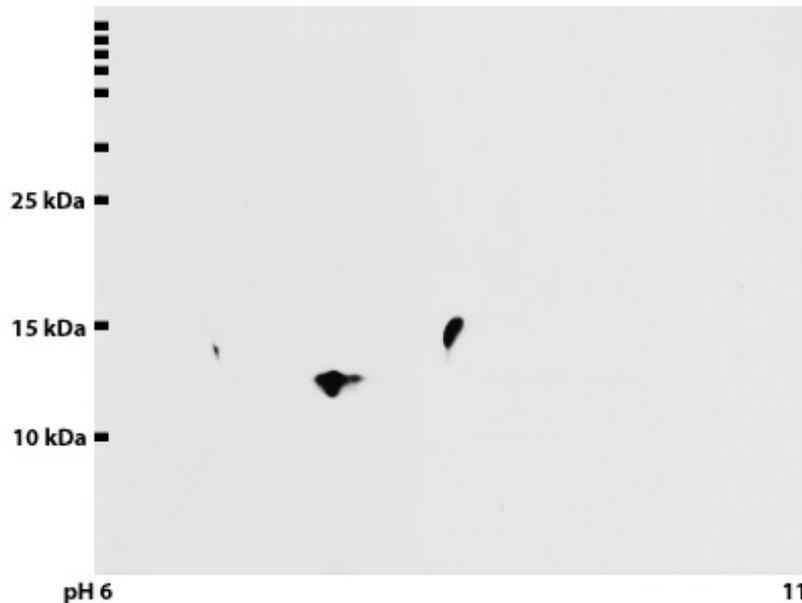


Abb. 3.5: Immunodetektion des C-terminalen HA-Tags der zweiten Domäne von *TvSCSα* (*TvSCSα* Block 2) Hydrogenosomen nach zweidimensionaler Elektrophorese.

3.4 Immunfluoreszenzlokalisierung

Die Proteine *TvFd-ΔTP*, *TvlscA-ΔTP*, *TvME-ΔTP*, *TvSCSα-ΔTP* sowie *TvSCSα* Block 1 und 2 wurden *in situ* durch Immunfluoreszenzmikroskopie lokalisiert (Abb. 3.6). Der grüne Kanal repräsentiert jeweils das HA-markierte Protein, der rote Kanal den hydrogenosomalen Marker. Ausgelöst wird die grüne Farbe durch eine Fluoreszenz bei 488 nm, die rote durch Fluoreszenz bei 633 nm. In beiden Kanälen sind stets Konturen innerhalb der Zelle erkennbar. In keinem Fall ist die komplette Zelle mit Signal ausgefüllt, was die Bindungsspezifität der Antikörper bestätigt. Die Überlagerung der beiden Kanäle (*merge*) zeigt auch eine Überlagerung der beiden Signale, was ein starkes Indiz für eine hydrogenosomale Lokalisation des Proteins ist. Der Zellkern ist mit DAPI blau angefärbt, mit Ausnahme bei der Probe *TvSCSα-ΔTP*, bei der kein DAPI verwendet wurde. Der Skalierungsbalken misst 2 μm und ermöglicht die Einschätzung der Größendimension und der Maße der Zellen.

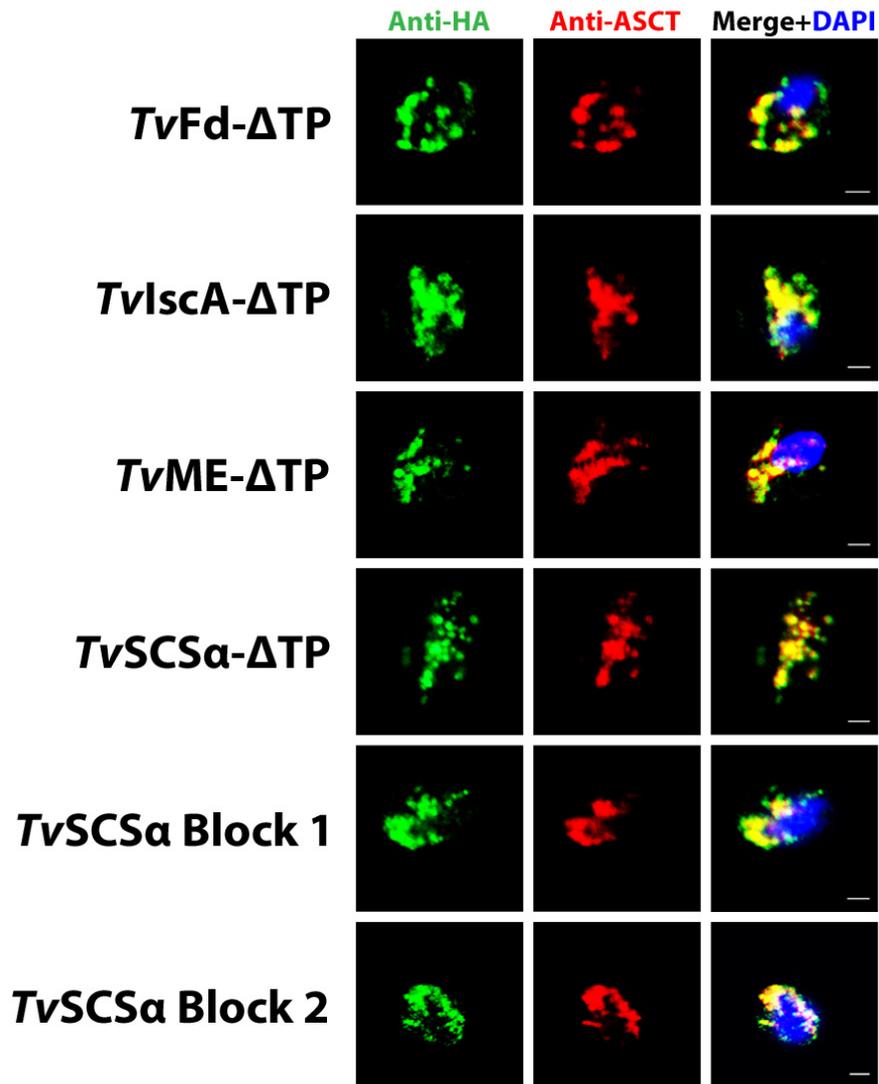


Abb. 3.6: Lokalisation hydrogenosomaler HA-markierter Proteine ohne Transitpeptide mittels Immunofluoreszenz. Grün: Anti-HA (Alexa fluor 488), Rot: Anti-ASCT (Alexa fluor 633). Merge: grüner und roter Kanal überlagert + DAPI (blau). Skalierungsbalken: 2 μ m.

3.5 Experimentelle Verifikation vorhergesagter Lokalisation

Um bioinformatische Vorhersagen zum Proteinimport von *T. vaginalis* Proteinen in Hydrogenosomen experimentell zu bestätigen, wurden drei weitere Proteine auf ihre subzelluläre Lokalisation untersucht (Abb. 3.7). Die Ergebnisse waren Teil des Projektes zur Optimierung von maschinellen Vorhersageparametern zur Charakterisierung der Proteindestination (Burstein *et al.*, 2012). Hierbei wurden zwei Datensätze erstellt, die sich in

der Berücksichtigung des Transitpeptids voneinander unterschieden und mit denen die Importwahrscheinlichkeit der einzelnen Proteine des *Trichomonas* Gesamtproteoms nach 57 verschiedenen Parametern berechnet wurde. Als Ergebnis gab das Programm einen Wert zwischen 0 und 1 aus: Je höher der Wert, desto wahrscheinlicher die hydrogenosomale Lokalisation des Proteins. Eine Auswahl an Kandidaten wurde anschließend zur Verifikation der Vorhersagen durch Zellfraktionierung und Immunodetektion der HA-markierten und homolog überexprimierten Proteine bestimmt. In dieser Arbeit wurden *TvHSP60* (TVAG_088050), *TvlscA* (TVAG_361540) und *TvPEP* Carboxykinase (TVAG_139300) untersucht (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Importwahrscheinlichkeiten der zu testenden Proteine nach maschineller Vorhersage mit Parametern aus zwei Datensätzen, mit und ohne Berücksichtigung des Transitpeptids im Datensatz (aus Burstein *et al.*, 2012).

Zugangsnummer	Transitpeptid	TP+ Vorhersage	TP- Vorhersage
TVAG_088050	Ja	1,0000	0,9691
TVAG_361540	Ja	1,0000	1,0000
TVAG_139300	Nein	0,9433	0,0426

Wie von dem Programm vorhergesagt, wurden *TvHSP60* und *TvlscA* in der hydrogenosomalen und *TvPEP* Carboxykinase in der cytosolischen Fraktion nachgewiesen (Abb. 3.7). Weitere Proteine wurden auf diese Weise getestet und der Vergleich zwischen Vorhersage und tatsächlicher Lokalisation der Proteine ergab eine Zuverlässigkeit der Vorhersagen von 71 % (Burstein *et al.*, 2012).

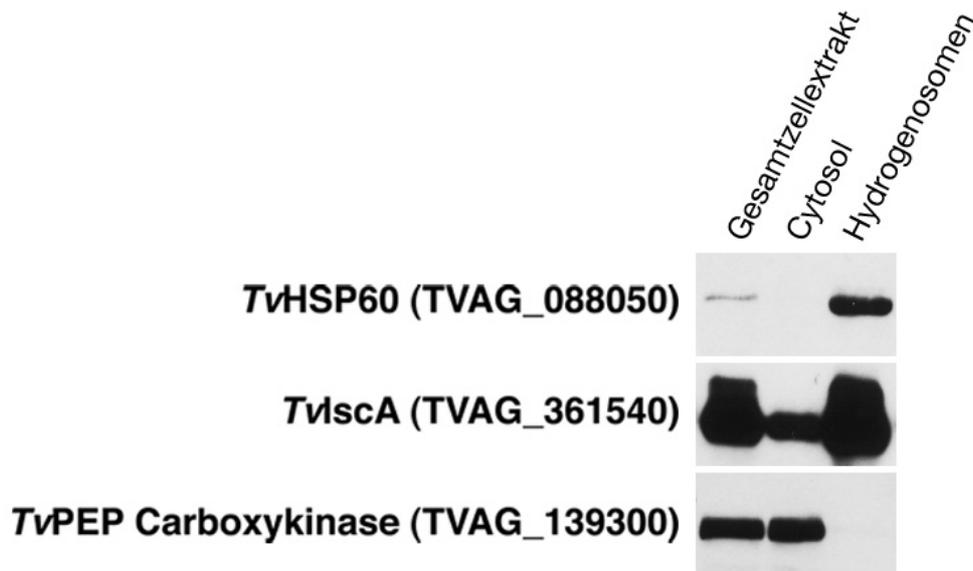


Abb. 3.7: Proteinlokalisierung durch Immunodetektion der HA-markierten Proteine von *TvHSP60*, *TvIscA*, *TvPEP* Carboxykinase in den Zellfraktionen Gesamtzellextrakt, Cytosol und Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* Zellen, die jeweils eins der Proteine exprimierten (Burstein *et al.*, 2012).

3.6 Transkriptionsanalyse von Ferredoxin und IscA

Neben den Migrationsdifferenzen der *TvSCS α* und *TvTrxRh2* Blöcke (Abb. 3.4) wurden auch bei Immunodetektionen der HA-markierten Fusionsproteine Ferredoxin und *TvIscA* Abweichungen in der SDS-PAGE beobachtet. Zur Untersuchung dieses Phänomens wurden die Proteine nach einer zweidimensionalen Trennung sequenziert. Als Resultat konnten dabei jedoch keine Veränderungen am Protein festgestellt werden, die diese Beobachtungen erklären würden. Deshalb wurden daraufhin die Transkripte untersucht. *T. vaginalis* Zellen wurden mit den Konstrukten *TvFd* und *TvIscA* im Expressionsvektor pTagvag2 transfiziert. Aus den Kulturen wurde Gesamt-RNA isoliert und cDNA hergestellt. Diese diente dann als Ausgangssubstrat für eine PCR zur Analyse der Transkripte von *TvFd* und *TvIscA* (Abb. 3.8). Die PCR wurde jeweils mit den Forward Primern der genannten Gene und PolyT Reverse Primern durchgeführt. Die erzeugten Amplifikate hatten eine Größe von ca. 600 bis 700 Basenpaaren, was deutlich die eigentliche Größe der Gene übersteigt und auch nicht durch den in doppelter Ausführung vorhandenen HA-Tag, der eine Größe von 54

Basenpaaren aufweist, erklärt werden kann. Das Ferredoxin (TVAG_003900) in der genomischen DNA hat laut TrichDB eine kodierende Sequenz mit einer Länge von 303 bp (ohne Stoppkodon) und die mRNA eine Länge von 341 bp, das Gen für *TvlscA* (TVAG_456770) besteht aus 393 bp und die mRNA aus 430 bp.

Sequenzierungen sämtlicher in dieser Arbeit amplifizierten Gene aus genomischer DNA ergaben stets die erwartete Größe, die Sequenzen stimmten mit den bei TrichDB angegebenen überein. Zur Bestimmung der Sequenz wurden die Amplifikate aus cDNA in den Klonierungsvektor pJET ligiert und sequenziert. Zusätzlich wurde die 3'-Region mittels PCR amplifiziert unter Verwendung eines Forward Primers gegen den HA-Tag und eines Reverse Primers gegen den Poly A Schwanz. Das Ergebnis der Sequenzierung ist als Nukleotidsequenz und der entsprechenden Aminosäuresequenz dargestellt (Abb. 3.9). Zwischen dem HA-Tag und der Polyadenylierungsstelle befindet sich ein Sequenzabschnitt des Vektors pTagvag2. Die Terminatorregion (3' UTR des *malic enzyme*) befindet sich im Vektor auch erst nach dieser Sequenz (Abb. 5.3).

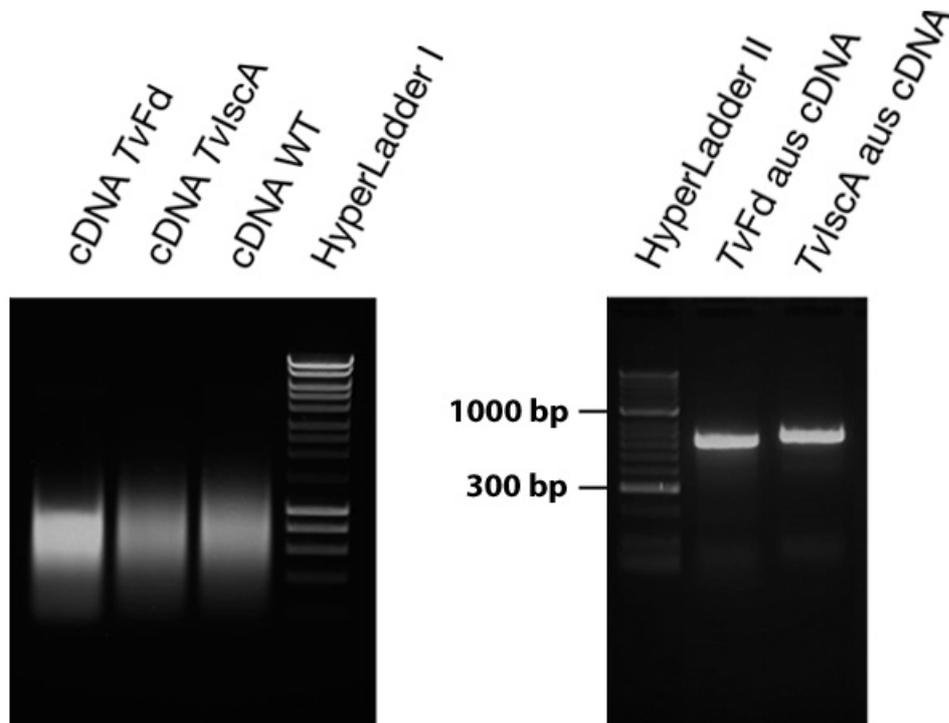


Abb. 3.8: Agarosegelaufnahmen zur Transkriptionsanalyse von *TvFd* und *TvIsca*. Links: Hergestellte cDNA aus isolierter Gesamt-RNA transfizierter *T. vaginalis* Kulturen und einer nicht transfizierten Wildtyp-Kultur (WT) zur Kontrolle. Rechts: Amplifikate von *TvFd* (TVAG_003900) und *TvIsca* (TVAG_456770) aus den jeweiligen entsprechenden cDNAs unter Verwendung spezifischer Primer gegen den Start des Gens und den Poly-A Schwanz.

Die sequenzierten Nukleotide des Vektors (Abb. 3.9) am 3'-Ende der Gene erklären die Größenzunahme der Gene aus cDNA (Abb. 3.8), somit wird bei der Transkription in *Trichomonas* auch Vektorsequenz mit abgelesen. Bei der Translation scheinen die Proteine jedoch nicht davon betroffen zu sein, da diese Sequenz bei der oben genannten Sequenzierung der Proteine nicht gefunden wurde. Somit können die SDS-PAGE Unterschiede mit den hier erzielten Erkenntnissen nicht erklärt werden.

TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTA^{ACTCGAGTAACAAGTACCTCATCGACAA}
CGAGCTCGCAACAGCTGTTCCACCAAAGGGTACATCTCTCAAGGACTGGCTCAAGGC
TCAGCTCTTCGAACCATCAGCT^{GACTACGAACCACTTTACTAAGCGCGATTTTAAA}
CACTTAGCTTTCTTAAAAAAAAAAAAA

YPYDVPDYA*^{LE}*QVPHRQRARNSCSTKGYISQGLAQGSALRTIS*^{LRTLLSAIFK}
HLAFLKKKK

Abb. 3.9: Beispiel einer Sequenz, erhalten aus der Sequenzierung eines Amplifikates mit HA-Forward und PolyT-Reverse Primern. Unten ist die daraus resultierende Aminosäuresequenz aufgeführt. Sequenzdomänen sind farblich hervorgehoben. Grün: HA-Tag; Rot: Stoppkodons; Orange: Restriktionsschnittstelle; Blau: Sequenz des Vektors pTagvag2; Schwarz: Poly A.

3.7 Isolation genomischer DNA aus Cyanobakterien

Aus Sektion V Cyanobakterien wurde genomische DNA isoliert und durch einen Dichtegradienten gereinigt. Bei der Reinigung wurde die DNA von in der Probe vorhandenen Polysacchariden und RNA getrennt, die im Röhrrchen sedimentierten. Unter UV-Licht war die DNA als Bande im Zentrifugenröhrrchen (Abb. 3.10) und die RNA als leuchtendes Pellet am Röhrrchenboden (nicht dargestellt) zu erkennen. Anschließend wurde das Ethidiumbromid entfernt und die DNA durch Elektrophorese im Agarosegel analysiert (Abb. 3.10). Die Qualität der DNA wurde durch Restriktion mit *HindIII* überprüft (Abb. 3.11). Die DNA wurde anschließend zur Sequenzierung an das Center for Biotechnology der Universität Bielefeld übergeben.

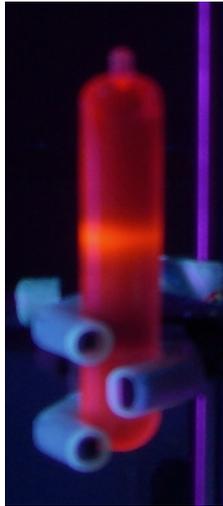


Abb. 3.10: Fotoaufnahme eines verschweißten Polyallomer Beckmann Röhrchens mit Cyanobakterien DNA-Bande in Ethidiumbromid, an einem Stativ befestigt und mit UV-Licht visualisiert. Die Bande bildete sich nach 40 h Zentrifugation bei 150000 g und 20 °C in einem Cäsiumchlorid Gradienten, wobei RNA und Polysaccharide pelletierten.

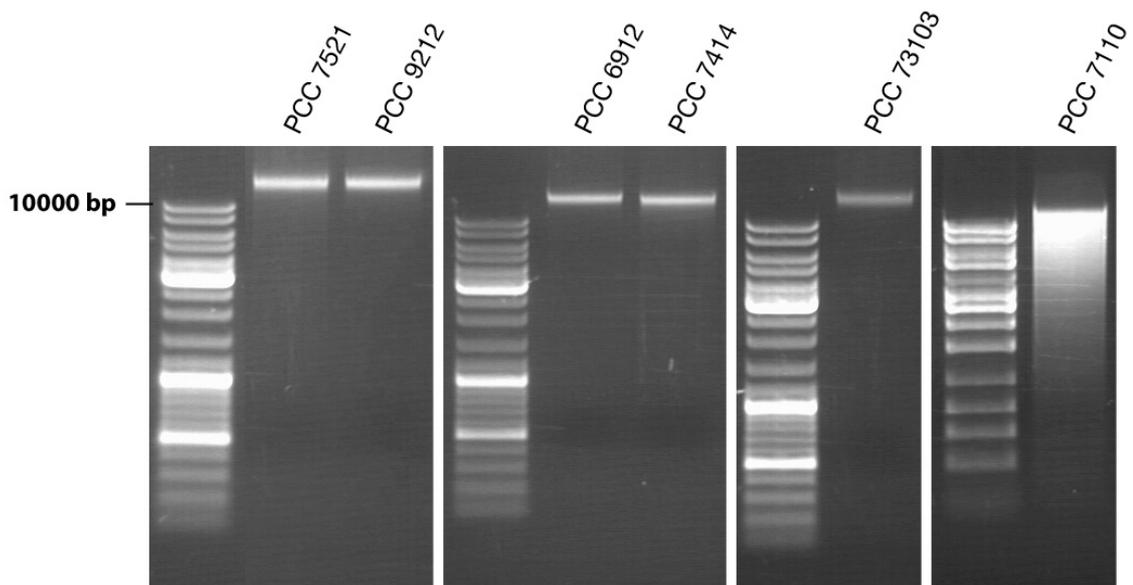


Abb. 3.11: Isolierte und gereinigte DNA im Agarosegel aus den Sektion V Cyanobakterien *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912, *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212, *Fischerella muscicola* PCC 73103, *Fischerella muscicola* PCC 7414, *Fischerella thermalis* PCC 7521 und dem Sektion IV Cyanobakterium *Scytonema hofmanni* PCC 7110.

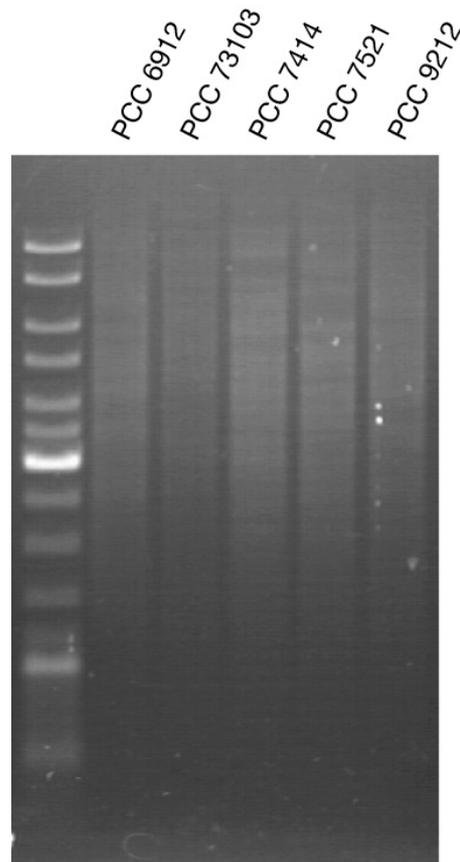


Abb. 3.12: Überprüfung der DNA Qualität durch Restriktion mit *Hind*III und Elektrophorese über Nacht in einem 0,7 %igen Agarosegel bei niedriger Voltzahl.

Die Eckdaten der Genome aus der Sequenzierung sind dargestellt (Abb. 3.13). Unter den Sektion V Cyanobakterien hat *Fischerella thermalis* mit 5340 kodierenden Sequenzen das kleinste Genom. Der Kandidat *Scytonema hofmanni* PCC 7110 aus Sektion IV hingegen hat mit 12356 Genen das größte bisher sequenzierte prokaryotische Genom überhaupt (Dagan *et al.*, 2013). Durch Lücken in den Genomen, deren Ursache in zahlreichen repetitiven Elementen liegt, sind die Genome jedoch nicht vollständig geschlossen. Das einzige Genom, das durch die nachträgliche Erstellung von Fosmiddatenbanken vollständig entschlüsselt wurde, ist das von *C. fritschii* PCC 6912. Die aus der Sequenzierung resultierten Daten dienen als Ausgangsmaterial für phylogenetische Analysen.

Ergebnisse

Genus	<i>Chlorogloeopsis</i>		<i>Fischerella</i>			<i>Scytonema</i>
	<i>fritschii</i>	<i>fritschii</i>	<i>muscicola</i>	<i>muscicola</i>	<i>thermalis</i>	<i>hofmanni</i>
PCC strain	6912	9212	73103	7414	7521	7110
Assembled scaffolds	8	21	37	16	4	81
Bases in scaffolds	7,819,561	7,698,501	7,573,287	7,008,859	5,482,660	12,073,012
%GC	41.5	41.5	38.6	40.4	40.5	41.5
No. CDSs	7,439	7,571	7,231	7,167	5,340	12,356
CDS density (%)	82	82	78	79	79	83
Mean gene length (bp)	830	829	820	778	825	806
rRNA operons	4	3	3	3	4	3
No. tRNA	45	41	43	59	42	67
No. Plasmids	2	n. d. ⁽¹⁾	n. d. ⁽¹⁾	0	0	n. d. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Not determined.

Abb. 3.13: Sequenzierdaten der untersuchten cyanobakteriellen Genome aus der Sequenzierung am CeBiTec (*Center for Biotechnology*) an der Universität Bielefeld (aus Dagan *et al.*, 2013).

4 Diskussion

Die Zellorganellen eukaryotischer Zellen sind durch Endosymbiose entstanden (Embley & Martin, 2006). Im Verlauf der Evolution von freilebenden Prokaryoten zu Organellen rezenter Zellen fand sowohl Reduktion als auch Gentransfer vom Organell in den Zellkern statt, so dass die cytosolisch translatierten Proteine durch die Doppelmembran der Organellen importiert werden müssen (Chacinska *et al.*, 2009; Gould *et al.*, 2008; Martin & Herrmann, 1998; Palmer, 1997). Im Gegensatz zu Mitochondrien, die noch ein eigenes Genom besitzen, wurden bei *Trichomonas* Hydrogenosomen keine Gene nachgewiesen (Clemens & Johnson, 2000). Während der Proteinimport und die darin involvierte Maschinerie in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondrien bereits eingehend studiert wurde (Wiedemann *et al.*, 2004), ist der Proteinimport-Mechanismus bei *Trichomonas vaginalis* Hydrogenosomen nur in den Grundzügen aufgeklärt, jedoch werden hier kontinuierlich Fortschritte erzielt (Rada *et al.*, 2011).

In dieser Doktorarbeit wurde der Proteinimport in die Hydrogenosomen erforscht. Hierbei wurde der Einfluss von N-terminalen Präsequenzen (Transitpeptide) hoch exprimierter Matrixproteine auf den Import untersucht. Des Weiteren wurde das Wissen über vorhandene interne Importsignale erweitert.

4.1 Transitpeptide und interne Signale

Aufgrund der gemeinsamen Abstammung von Hydrogenosomen und Mitochondrien (Müller *et al.*, 2012), wurden auch Ähnlichkeiten im Proteinimport zwischen aeroben Mitochondrien und *Trichomonas* Hydrogenosomen vermutet (Bradley *et al.*, 1997; Dyall *et al.*, 2000; Häusler *et al.*, 1997). In Mitochondrien ist für den Import von Matrixproteinen das N-terminale Transitpeptid essentiell. Membranproteine besitzen hingegen auch interne Signale, die zum Targeting der Proteine beitragen (Chacinska *et al.*, 2009). Im Vergleich dazu wurden bei hydrogenosomalen *T. vaginalis*

Proteinen Gemeinsamkeiten zu mitochondrialen Signalen festgestellt: *In vitro* Untersuchungen von Ferredoxin ergaben eine strikte Abhängigkeit vom Transitpeptid für den Import in das Organell (Bradley *et al.*, 1997). Bereits eine Mutation der zweiten Aminosäure des Transitpeptids (Leucin zu Glycin) resultierte im Abbruch des Imports. Bei *in vivo* Studien wurde die cytosolische Lokalisation von TvFd-ΔTP von derselben Arbeitsgruppe berichtet, jedoch nur bei grober Pelletierung der Organellen (Dyall *et al.*, 2000).

Zusätzlich wurde eine hydrogenosomale Prozessierungspeptidase (HPP) als Äquivalent der mitochondrialen Peptidase (MPP) in den Hydrogenosomen beschrieben, die für das Entfernen der Transitpeptide nach erfolgtem Import zuständig ist (Brown *et al.*, 2007; Šmíd *et al.*, 2008). Die Prozessierung des Transitpeptides konnte für einige hydrogenosomale Proteine gezeigt werden: Ferredoxin (TvFd, Johnson *et al.*, 1990), TvME (Hrdý & Müller, 1995b), TvPFO (Hrdý & Müller, 1995a), Adenylatkinase (TvAK, Länge *et al.*, 1994), TvSCS α (Lahti *et al.*, 1994), TvSCS β (Lahti *et al.*, 1992) und TvHSP60 (Bui *et al.*, 1996).

Dass Proteine auch interne Importsignale besitzen, war zunächst nur bei hydrogenosomalen Membranproteinen, wie z.B. TvHMP31, bekannt (Dyall *et al.*, 2000). In späteren Studien wurde auch für Matrixproteine bestätigt, dass interne Signale vorhanden sein müssen, da trotz Entfernens des Transitpeptids von TvSCS α bei *in vivo* Studien ein Import in die Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* beobachtet wurde (Mentel *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde der Import von Matrixproteinen in *T. vaginalis* Hydrogenosomen, die kein charakteristisches Transitpeptid aufweisen, wie der TvTrxRh2 (Mentel *et al.*, 2008) und *Giardia intestinalis* IscS (Doležal *et al.*, 2005), experimentell belegt. In einer Analyse des hydrogenosomalen Proteoms (Rada *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2011) wurden über 500 Proteine vorhergesagt, die im Organell lokalisieren, wovon jedoch nur etwa die Hälfte ein klassisches N-terminales Importmotiv aufweist (Burstein *et al.*, 2012).

In dieser Doktorarbeit wurden drei hydrogenosomale Proteine ausgewählt und der Zusammenhang zwischen ihren Transitpeptiden und

dem Import in die Hydrogenosomen untersucht: Ferredoxin (*TvFd*, TVAG_003900), *TvlscA* (TVAG_456770) und *malic enzyme* (*TvME*, TVAG_267870). Die Lokalisation der Proteine in voller Länge sowie mit entferntem N-Terminus wurde über einen C-terminalen HA-Tag durch Immunodetektion (Abb. 3.1) und Immunofluoreszenz (Abb. 3.5) nachgewiesen. Für die Lokalisation *in organello* wurden bei Hydrogenosomen Proteinase K Assays sowie eine Membran und Matrix Fraktionierung durchgeführt. Die nativen Proteine wurden erwartungsgemäß in den Hydrogenosomen detektiert. Ebenso lokalisierten die Proteine ohne Transitpeptid in der hydrogenosomalen Fraktion. Durch diese Ergebnisse wurde gezeigt, dass interne Importsignale stärker verbreitet sind als bisher angenommen und eher die Regel als eine Ausnahme in *Trichomonas vaginalis* zu sein scheinen.

Bei einem weiteren Protein wurden im Rahmen dieser Studie die gleichen Ergebnisse erzielt, *TvPFO A* (TVAG_198110) mit entferntem Transitpeptid **MLRSFGKRIP...** (grau und kursiv markiert) wurde in den Hydrogenosomen nachgewiesen (Major *et al.*, 2013). In der Datenbank TrichDB wurden weitere Proteine mit diesem Transitpeptid gefunden: Die hypothetischen Proteine TVAG_131910 und TVAG_210030 (Carlton *et al.*, 2007). Bei einer BLAST Suche wird TVAG_131910 mit *TvBspA* ähnlichen Proteinen gruppiert, welche Oberflächenproteine darstellen (Noël *et al.*, 2010). TVAG_210030 gruppiert mit OsmC ähnlichen Proteinen, möglicherweise Alkylhydroperoxid Reduktasen, von denen auch Kandidaten im hydrogenosomalen Proteom gefunden wurden (Pütz, 2007; Schneider *et al.*, 2011). Weitere PFO Isoformen sind in der Genomdatenbank annotiert: TVAG_230580, TVAG_242960 und TVAG_254890. Deren Transitpeptid **MLRNF** ist ebenfalls bei anderen Proteinen vorhanden: Bei den hypothetischen Proteinen TVAG_495580 und evtl. TVAG_343440 (ORF DS113284-6-63181-61430). Bei diesen beiden Proteinen wurde bei einer BLAST Suche keine bekannten konservierten Domänen gefunden. Die Transitpeptide der restlichen untersuchten Proteine sind jeweils nur bei ihnen selbst vertreten. Eine Liste von *T. vaginalis* Proteinen, deren N-terminale Sequenzen charakteristische Transitpeptideigenschaften, wie Länge, Ladung

und vorhergesagte Prozessierungsstelle aufweisen ist verfügbar (Šmíd *et al.*, 2008).

Die Ergebnisse (Abb. 3.1) wurden für jedes untersuchte Protein bei wiederholten Transfektionen reproduzierbar beobachtet. Besonders interessant waren die Beobachtungen bei Ferredoxin, da sie sich nicht mit früheren Ergebnissen decken. Es wurde beschrieben, dass *TvFd-ΔTP* nach Zentrifugation vom Gesamtzellextrakt bei 12000 *g* im Überstand (cytosolische Fraktion) verbleibt und nicht mit den Organellen pelletiert (Dyall *et al.*, 2000). In dieser Doktorarbeit (Abb. 3.1) hingegen konnte bei keinem Ansatz mit *TvFd-ΔTP* mehr HA-markiertes Protein im Cytosol (Zentrifugation vom Gesamtzellextrakt bei 7500 *g*) als in Hydrogenosomen (nach Reinigung mit einem Percoll Gradienten) festgestellt werden. *TvFd-ΔTP* war allerdings schwieriger zu detektieren als *TvFd* mit Transitpeptid und die anderen Proteine (Abb. 3.1). So musste bei *TvFd-ΔTP* mindestens 100 μg Proteinextrakt eingesetzt werden, um eine Bande detektieren zu können, während bei *TvFd* und den anderen untersuchten Proteinen bereits 20 μg ausreichten. Selbst bei Überladung mit bis zu 1 mg Protein war *TvFd-ΔTP* nur spurenweise im Cytosol vorhanden. Wurde jedoch das Transitpeptid eines anderen hydrogenosomalen Proteins N-terminal an *TvFd-ΔTP* angehängt, war eine normale Detektion bei 20 μg Protein möglich. So konnte *TvFd-ΔTP* mit den Transitpeptiden von *TvSCS α* **MLSSSFERN** und *TvPFO A* **MLRSF** in die Hydrogenosomen importiert werden (Major, 2009), obwohl sie das *TvTrxRh1* Transitpeptid nicht ersetzen konnten – *TvTrxRh1-ΔTP* verblieb mit den beiden Transitpeptiden im Cytosol (Mentel *et al.*, 2008). Somit wurde für *TvTrxRh1* (TVAG_281360) gezeigt, dass das eigene Transitpeptid nicht durch Transitpeptide anderer hydrogenosomaler Proteine ersetzbar ist (Mentel *et al.*, 2008) und somit das einzige bisher experimentell bestätigte *T. vaginalis* Protein ist, das ohne eigenes Transitpeptid nicht in das Hydrogenosom importiert wird (Burstein *et al.*, 2012; Mentel *et al.*, 2008). Dafür wurde erwartungsgemäß *TvFd-ΔTP* mit dem TP der *TvTrxRh1* **MFSIIFSRFS** importiert (Major, 2009).

In einer Studie reichte neben der kompletten Entfernung des Transitpeptids von Ferredoxin bereits die Mutation des Leucins an Position

zwei aus, um einen Importabbruch zu bewirken (Bradley *et al.*, 1997). Eine mögliche Erklärung zu der Diskrepanz mit den Ergebnissen aus dieser Studie wäre, dass in den beiden Arbeiten verschiedene Bedingungen vorherrschten (*in vivo* gegen *in vitro*) und verschiedene *T. vaginalis* Stämme sowie unterschiedliche Tags verwendet wurden (Major *et al.*, 2013). Aufschluss könnte eine Wiederholung der Leucin zu Glycin Mutation im Transitpeptid unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen geben. Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse wäre auch hier ein Import in die Hydrogenosomen zu erwarten.

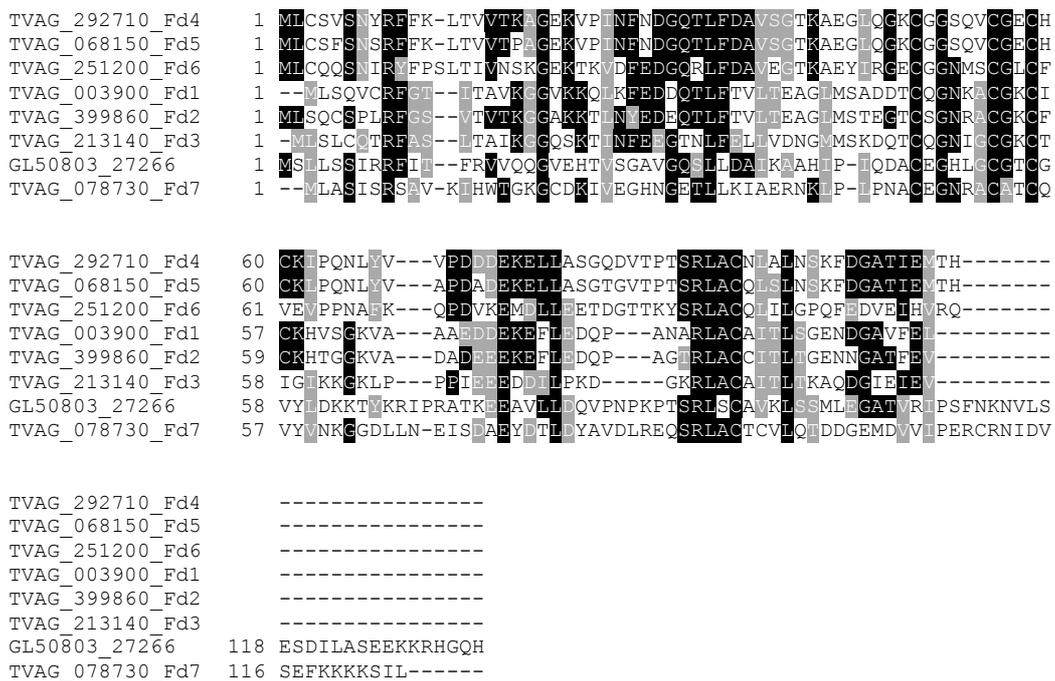


Abb. 4.1: Alignment der sieben Ferredoxine von *Trichomonas vaginalis* und eines Ferredoxins von *Giardia intestinalis* (GL50803_27266) aus TrichDB und GiardiaDB.

In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass *Giardia intestinalis* Fd in *T. vaginalis* Hydrogenosomen importiert wurde, GiFd-ΔTP jedoch im Cytosol verblieb (Doležal *et al.*, 2005). Das *Giardia* Ferredoxin GL50803_27266 gehört zur gleichen Proteinfamilie der [2Fe-2S] Ferredoxine wie die Ferredoxine von *Trichomonas* (Abb. 4.1; Nixon *et al.*, 2002b). Das Transitpeptid ***MSLLSIRRFITFRV***... (grau und kursiv dargestellt) ist zwar ähnlich zu Transitpeptiden in *Trichomonas* (Šmíd *et al.*, 2008), doch die

Aminosäureidentität des Alignments der beiden Proteine liegt nur bei 30% (Abb. 4.2). Somit könnte es sein, dass eventuell vorhandene interne Signale des *Giardia* Ferredoxins von der *Trichomonas* Importmaschinerie nicht als solche erkannt werden. Zudem enthält das Gen nach GiardiaDB Annotation ein Intron (Nixon *et al.*, 2002a), wurde jedoch in der oben genannten Arbeit aus genomischer DNA amplifiziert (Doležal *et al.*, 2005), was die Vergleichbarkeit weiter einschränkt. Generell gibt es Introns sowohl bei *Giardia* als auch bei *Trichomonas* (Roy *et al.*, 2012; Vaňáčková *et al.*, 2005).

```

GL50803_27266      1  MSLLSSRRFIFRVVQQGVEHTVSGAVGOSTLDAIKAAHIP-IQDAEFGHLCGTTCGVY
TVAG_03900_Fd1    1  --MLSQVCRFGTITAVKGGVKQQLKFEDDQTLFTVLTETAGLMSADDTQGNKACGKC---

GL50803_27266      60  IDKITYKRIPRATKKEEAVLLDQVNPKPTSRLSCAVKLSMLEGATVRI PSFNKNVLSSE
TVAG_03900_Fd1    56  ICKHVSGKVAAAEDEKEFLEDQF---ANARLACAITLSGENDGAVFEI-----

GL50803_27266      120  DILASEEKKRHGQH
TVAG_03900_Fd1    -----

```

Abb. 4.2: Alignment zweier Ferredoxine aus *Giardia intestinalis* und *Trichomonas vaginalis*. Die Aminosäureidentität beträgt 30 %.

Das *Giardia* Ferredoxin wurde in einer weiteren Arbeit homolog exprimiert und lokalisiert, wobei von Transitpeptid-abhängigem Import berichtet wurde (Regoes *et al.*, 2005). *GiFd-ΔTP* wurde mittels HA-Tag im Cytosol lokalisiert und das Transitpeptid war in der Lage, GFP in Mitosomen zu importieren. Doch es fehlt die Kontrolle von *GiFd* mit TP und auch hier wird auf das Intron in der Sequenz nicht eingegangen. Ein Import über interne Signale wurde aber für *GiHSP60*, *GimtHSP70* und *GilscS* gezeigt.

Wird der Proteinimport von *Trichomonas* Hydrogenosomen mit Proteinimport bei anaeroben Parasiten mit stark reduzierten Mitochondrien, etwa bei den Mikrosporidien, verglichen, so sind Gemeinsamkeiten feststellbar. Deren mitochondriale Matrixproteine haben keine erkennbaren N-terminalen Transitpeptide, sondern interne Importsignale (Hjort *et al.*, 2010). So wurde die mitochondriale Lokalisation für *Encephalitozoon cuniculi* Ferredoxin gezeigt (Williams *et al.*, 2008), obwohl es kein klassisches Importmotiv aufweist (Abb. 4.3). Ebenso sind auch bei *Giardia* Ferredoxine

ohne Transitpeptid vorhanden (Abb. 5.6), die jedoch kürzer sind als die anderen [2Fe-2S] Ferredoxine, und somit zu den 2[4Fe-4S] Ferredoxinen gehören. Diese könnten allerdings im Cytosol lokalisieren, wo sie am Stoffwechsel und der Wasserstoffproduktion beteiligt wären (Lloyd *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2012). Im mitochondrialen Proteom wurde nur das lange [2Fe-2S] Ferredoxin identifiziert (Jedelský *et al.*, 2011).

```

AEWD_070560      1  MDMFSAPDRIPDRIPEQIRFFFKTMKQVVPKAVCGSTVLDVAHKNGVDLEGACEGNLACSTCH
TVAG_003900_Fd1  1  --MLSQVCRFGTITAKGGVKKQLKFEDDQTLFTVLTETAG--LMSADTCCQGNKACGKC-

AEWD_070560      61  VILEEPTIYRKLCEPSDKREYDLIDQAFGATGTSRLGCOIIRVDKSEFENAVFTVPRATKNMAV
TVAG_003900_Fd1  56  --TCKHISGKVAEEDDEKFFLEDQP---ANARLACATLISGENDCAVEEI-----

AEWD_070560      121  DGFKPKPH
TVAG_003900_Fd1  -----
    
```

Abb. 4.3: Alignment zwischen *Encephalitozoon cuniculi* und *Trichomonas vaginalis* Ferredoxin. Die Aminosäureidentität beträgt 24 %.

Der Proteinimport in homologe Organellen verschiedener Organismen kann unterschiedlich verlaufen. In Mitochondrien ist am Beispiel des Intermembranraumproteins MIA40 bekannt, dass dieses Protein in verschiedenen Organismen auf unterschiedliche Weise importiert wird. In Hefe ist das Protein ScMIA40 groß (403 bzw. 427 Aminosäuren) und wird über ein Transitpeptid importiert (Chacinska *et al.*, 2004; Naoé *et al.*, 2004), in höheren Organismen, wie bei HsMIA40, ist es klein (142 Aminosäuren) und der Import erfolgt über interne Signale (Chacinska *et al.*, 2008; Hofmann *et al.*, 2005).

Um die internen Signale weiter zu erforschen, könnten in zukünftigen Studien die sechs weiteren Ferredoxine von *Trichomonas* durch das Entfernen der Transitpeptide auf hydrogenosomalen Import untersucht werden, sofern diese wie TvFd1 auch hydrogenosomal sind. Sollte eines oder mehrere davon von seinem TP obligat für den Import abhängig sein, so wäre ein Vergleich zur TvFd1 Referenz interessant, andernfalls würde die

These, dass interne Signale überwiegend vorhanden sind und den Import beeinflussen, weiter untermauert werden.

Interne Signale wurden in dieser Arbeit am Protein *TvSCS α* (TVAG_165340) untersucht. Dessen hydrogenosomale Lokalisation wurde mit und ohne TP ***MLSSSFERNLHQPL***... (grau und kursiv markiert) bereits früher beschrieben (Mentel *et al.*, 2008) und in dieser Arbeit bestätigt (Abb. 3.2). Um die Lokalisation des potentiellen internen Signals einzugrenzen wurde das Protein *TvSCS α - Δ TTP* in drei jeweils 101 Aminosäuren umfassende Domänen unterteilt (Anhang, Punkt 5.4). Überraschenderweise lokalisierte jede einzelne Domäne unabhängig voneinander in den Hydrogenosomen (Abb. 3.2). Das gleiche Ergebnis wurde für die drei Domänen der Thiooxidase *TvTrxRh2* erzielt (Abb. 3.3), bei der die Blockeinteilung nach alpha-Helices erfolgte wie zuvor beschrieben (Zimorski, 2010), *TvTrxRh2* lokalisiert auch in voller Länge ohne klassisches TP in den Hydrogenosomen (Mentel *et al.*, 2008). Daraus resultiert, dass interne Signale in mehreren Teilen der Proteine vorhanden sein müssen und von der Zelle für den Import erkannt werden. Für die jeweils ersten beiden Blöcke sind die Ergebnisse eindeutig, die Proteine werden importiert und sind vor Proteolyse geschützt. Bei den dritten Blöcken ist die Detektion durch das schwache Signal bei der Exposition schwieriger.

Bei Einsatz einer Proteinmenge von bis zu 500 μ g bei *TvSCS α* Block 3 (Abb. 3.2) und *TvTrxRh2* Block 3 (nicht dargestellt) wurden allerdings auch diese in der hydrogenosomalen Fraktion nachgewiesen. Bei geringerer Konzentration (50 μ g; Abb. 3.4) war bei Block 3 der beiden Proteine eine spurweise Detektion in den Hydrogenosomen bereits möglich. Im Gegensatz zu Block 1 und 2 konnte jedoch kein erfolgreicher Schutz vor Proteolyse gezeigt werden, insofern ist es möglich, dass das Protein nur von außen an die Hydrogenosomen assoziiert, aber nicht in der Lage ist, in die Matrix importiert zu werden.

Um die Detektierbarkeit von schwer nachweisbaren Konstrukten zu verbessern, könnten andere Promotoren getestet werden (Liston & Johnson, 1998; Quon *et al.*, 1994; Smith & Johnson, 2011; Smith *et al.*, 2011), sofern

die Ursache dafür transkriptionsbedingt ist. Der hier eingesetzte *TvSCS α* Promotor ist aber bereits als starker, selbstinduzierender Promotor bekannt (Liston & Johnson, 1999). Alternativ könnte ein Tetracyclin-induziertes Expressionssystem eingesetzt werden (Ortiz & Johnson, 2003).

Die Resultate zeigen (Abb. 3.2 bis Abb. 3.4), dass interne Signale bei Matrixproteinen vorhanden sind und auch Proteine mit deletierten Transitpeptiden in die Hydrogenosomen importiert werden können. Das Importsignal des Transitpeptids kann demnach von internen Signalen kompensiert werden. Weitere Studien sind notwendig, um die Relevanz von Transitpeptiden für den Import quantitativ zu erfassen. Da trotzdem ein Protein bekannt ist, bei dem ein Transitpeptid zwingend erforderlich für den Import ist (*TrxRh1*, Mentel *et al.* 2008), kommen Fragen nach der Evolution der Transitpeptide auf. Der Erwerb von Transitpeptiden wird diskutiert und es werden verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen, unter anderem durch Exon shuffling, alternatives Splicing, Promotor Mutation und Duplikation bereits vorhandener Signale (Kadowaki *et al.*, 1996; Kubo *et al.*, 1999; Long *et al.*, 1996; Murcha *et al.*, 2005). Bei *Trichomonas* wird anhand von *in silico* Analysen vermutet, dass die N-Termini direkt von bakteriellen Vorläufern erworben wurden (Yu *et al.*, 2012). Wenig ist jedoch über das Zusammenspiel zwischen internen Signalen und Transitpeptiden bei Matrixproteinen bekannt, so dass weitere Experimente notwendig sind, um ein besseres Verständnis ihrer Evolution zu bekommen.

4.2 Migrationsdifferenzen in der SDS-PAGE

Im Laufe der vorliegenden Arbeiten wurde beobachtet, dass nach Trennung durch SDS-PAGE der einzelnen Domänen von *TvSCS α* und *TvTrxRh2* Doppelbanden in der hydrogenosomalen Fraktion auftraten (Abb. 3.4). Im Cytosol hingegen war stets nur eine der beiden Banden, die schneller migrierende, vorhanden (Abb. 3.4). Eindeutig zu beobachten war dieses Phänomen bei *TvSCS α* Block 1 und 2 und bei *TvTrxRh2* Block 2 (Abb. 3.4). In früheren Studien wurden Doppelbanden im Zusammenhang mit dem Proteinimport stets mit der Prozessierung des Transitpeptides in Verbindung

gebracht, wie bei *TvHMP31* (Dyall *et al.*, 2000), *GilscU* (Doležal *et al.*, 2005) und anderen (Šmíd *et al.*, 2008). In den genannten Arbeiten lag die hydrogenosomale Bande stets unter der cytosolischen Bande bzw. das Molekulargewicht verringerte sich nach Zugabe einer Prozessierungspeptidase. In dem hier vorliegenden Fall war jedoch das Gegenteil zutreffend: Die langsamer migrierende Proteinbande der hydrogenosomalen Fraktion lokalisierte oberhalb der cytosolischen Bande (Abb. 3.4). Die Blöcke haben zudem kein charakteristisches Transitpeptid, so dass von einer Prozessierung nicht auszugehen ist. Bei der Trennung von Membran und Matrix trat die Doppelbande nur in der Membran auf, in der Matrix hingegen war nur eine Bande vorhanden (Abb. 3.3).

Es könnte hierbei möglicherweise ein Transportzustand vorliegen, der durch eine kovalente Modifikation des Proteins hervorgerufen wird und somit temporär das Molekulargewicht verändert. Bei zweidimensionaler Elektrophorese lag die obere Bande von *TvSCS α* Block 2 zudem weiter im basischen Bereich als die untere (Abb. 3.5). Proteinreinigung und -sequenzierung könnten zur Aufklärung des Phänomens beitragen. Versuche, das Protein über eine HA-Affinitätssäule zu reinigen blieben ohne Erfolg. Ein möglicher Ansatz wäre, das hydrogenosomale Proteom mit zweidimensionaler Elektrophorese zu trennen, die richtigen Spots zu identifizieren (Rabilloud, 2002; Rabilloud *et al.*, 2010) und mögliche Proteinmodifikationen zu entdecken.

Es sind diverse Proteinmodifikationen bekannt (Mann & Jensen, 2003), die das Molekulargewicht von Proteinen beeinträchtigen. Unwahrscheinlich sind GPI-Anker, da diese in *Trichomonas* nicht vorkommen (Carlton *et al.*, 2007; Hirt *et al.*, 2007; Hirt *et al.*, 2011). Ebenso wenig in Betracht kommen Prenylierung, Palmitoylierung oder Ubiquitinierung (Major *et al.*, 2013), da sie nicht die entsprechenden Änderungen im Molekulargewicht in diesem Rahmen verursachen. Phosphorylierungen sind dagegen eher wahrscheinliche, da die observierten Größenunterschiede der einzelnen Banden im SDS-Gel von ca. 1 bis 2 kDa mit bereits beschriebenen Mobilitätsvariationen übereinstimmen (Wegener & Jones, 1984) und reversible Phosphorylierungen gängig sind bei mitochondrialen Proteinen

(Cui *et al.*, 2010). Ob Phosphorylierungen in diesem Fall vorliegen, könnte durch Phosphorylierungsexperimente bzw. den Einsatz von PhosTag Gelen überprüft werden (Kinoshita *et al.*, 2006; Kinoshita *et al.*, 2004). Proteinmodifikationen könnten einen Einfluss auf den Proteinimport haben, dies wurde in *Trichomonas* jedoch noch nicht berichtet. Im Gegensatz zu Mitochondrien (Abb. 4.4) ist beispielsweise beim TOM Komplex von Hydrogenosomen bisher nur TOM40 beschrieben (Rada *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2011).

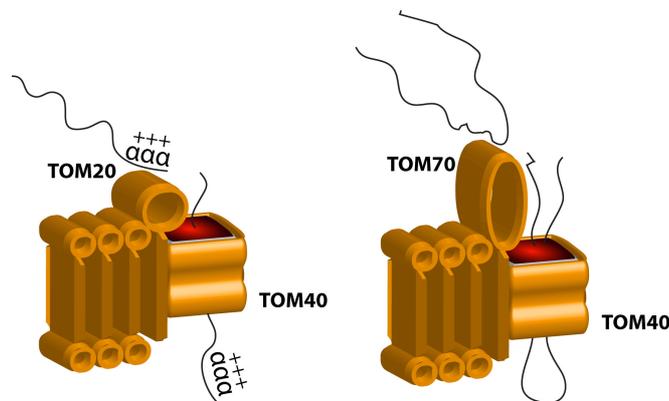


Abb. 4.4: Proteinimportmaschinerie der äußeren Membran in Hefe-Mitochondrien, verändert aus Chacinska *et al.*, 2009. Positiv geladene Transitpeptide (+++: positive Nettoladung, ααα: alpha helices) werden durch TOM20 erkannt, interne Signale durch TOM70. Die Proteine werden weitergeleitet zu TOM22 und dann zu TOM40. Matrixproteine mit N-terminalem Signal passieren den Kanal in linearer Konformation, Membranproteine mit internen Signalen in Loop Formation.

Phosphoryliert werden können die OH-Gruppen der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin. Aber auch die Aminosäuren Histidin, Lysin, Arginin und Cystein sind phosphorylierbar (Matthews, 1995). Die Blöcke von TvSCSα und TvTrxRh2 wurden auf potenzielle Phosphorylierungsstellen mit NetPhos getestet (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>; Blom *et al.*, 1999). Jeder Block wies dabei mindestens eine phosphorylierbare Aminosäure auf.

Experimentell wurde daraufhin ein Dephosphorylierungsassay mit frisch isolierten Hydrogenosomen der TvSCSα Blöcke 1 und 2 durchgeführt, bei dem jedoch keine Veränderung zur Kontrolle feststellbar war, beide

Banden waren weiterhin vorhanden. Möglicherweise waren die eingesetzten 5 U alkalischer Phosphatase nicht ausreichend oder die Versuchsbedingungen nicht optimal gewählt. Es könnte allerdings auch sein, dass die Modifikation trotz gegebener Indizien in diesem Fall nicht vorliegt. So wurde beispielsweise in einer kürzlich durchgeführten Charakterisierung des Phosphoproteoms von *T. vaginalis* das Protein TvSCS α nicht gelistet (Yeh *et al.*, 2012).

Die Ursache für das Auftreten der Doppelbanden konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Für die exakte Ermittlung der Proteinmodifikation könnte in zukünftigen Experimenten eine Proteinsequenzierung beider Banden nach Reinigung durch zweidimensionale Gelelektrophorese erfolgen. Alternativ könnte eine Affinitätschromatographische Reinigung durchgeführt werden, falls eines der Proteine aufgrund von Membranassoziation schwierig durch isoelektrische Fokussierung von anderen Proteinen zu trennen sein sollte.

Bei den hier durchgeführten Arbeiten wurden gelegentlich auch leicht abweichende, unerwartete Migrationshöhen der Proteine Ferredoxin und TvIscA beobachtet (nicht dargestellt). Die Sequenzierung der Proteine nach Trennung durch zweidimensionale Gelelektrophorese ergab allerdings keine signifikanten Modifikationen. Das Überlesen von Stoppkodons wurde als Möglichkeit in Betracht gezogen, so dass Teile des Plasmids zwischen Stoppkodon und 3'-UTR des *malic enzyme* ebenfalls translatiert werden könnten (Abb. 5.3). Die Möglichkeit der Stoppkodon Überlesung wurde während der Analyse in *Trichomonas* auch in der Literatur berichtet (Kay *et al.*, 2012). In Hefe ist das Überlesen von Stoppkodons oder der Wechsel von Leserahmen bekannt (Nakamura *et al.*, 1996; von der Haar & Tuite, 2007). Bestätigt werden konnte dies in dieser Arbeit nicht und weitere Experimente diesbezüglich konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Amplifikate aus cDNA deuten jedoch darauf hin, dass die mRNA länger ist als erwartet (Abb. 3.8), möglicherweise bedingt durch die große Entfernung des *malic enzyme* Terminators im Plasmid. Das native Ferredoxin-Gen hat in genomischer DNA nur kurze UTRs – an der 5'-Region 16 und an der 3'-Region 18 Nukleotide (Johnson *et al.*, 1990).

4.3 Cyanobakterielle Genome

Parallel zu den hydrogenosomalen Studien wurden fünf Genome von Sektion V Cyanobakterien und ein zusätzliches von einem Sektion IV Cyanobakterium zur Erforschung des Vorläufers der Chloroplasten sequenziert. Cyanobakterien gelten als die plastidären Vorgänger, da sie die einzigen freilebenden Prokaryoten sind, die die Fähigkeit zur Sauerstoff produzierenden Photosynthese haben. Aufgrund häufiger lateraler Gentransfers innerhalb der Cyanobakterien ist der genaue Kandidat schwierig zu bestimmen (Shi & Falkowski, 2008). Phylogenetische Analysen haben jedoch gezeigt, dass das ursprüngliche Cyanobakterium, aus dem die Plastiden hervorgegangen sind, zur filamentösen und Heterozysten bildenden Gruppe gehören könnte (Deusch *et al.*, 2008).

Die Ergebnisse (Abb. 3.13) haben gezeigt, dass die angewandten Methoden für ausreichende DNA Qualität und Quantität zur Sequenzierung und Erstellung einer Genomdatenbank geeignet sind, sofern es gelingt, störende Polysaccharidschichten zu entfernen. Aufgrund von repetitiven Elementen konnte mit dieser Methode jedoch keines der Genome vollständig geschlossen werden. Hierfür wurden bei *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 Fosmidbanken erstellt, wodurch die Lücken geschlossen werden konnten. Die Stämme der Sektion V zeigen bei einem Vergleich mit 45 weiteren cyanobakteriellen Genomen die größte Ähnlichkeit zu pflanzlichen Genen cyanobakteriellen Ursprungs, womit die These bestätigt wird, dass ein Cyanobakterium dieser Klasse der Vorläufer der Chloroplasten war (Dagan *et al.*, 2013).

Seit der Sequenzierung des ersten cyanobakteriellen Genoms im Jahr 1996 von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko & Tabata, 1997; Kaneko *et al.*, 1996) werden die Sequenzdaten in der Datenbank CyanoBase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>) annotiert und sind dort abrufbar (Nakamura *et al.*, 2000; Nakao *et al.*, 2010). Alternativ sind die Daten bei NCBI verfügbar oder auf der Website des jeweiligen Genomprojekts, in diesem Fall auf www.molevol.de/resources.

Das Genom von *Scytonema hofmanni* PCC 7110 der Sektion IV ist mit 12 Mb und über 12000 Genen das größte bisher sequenzierte prokaryotische Genom (Dagan *et al.*, 2013). Die einzigen cyanobakteriellen Genome, die größer geschätzt werden, sind die von *Calothrix* PCC 7101, PCC 7102 und PCC 7426, die ebenfalls zur Sektion IV gehören, und möglicherweise weiterer Stämme, zu denen keine Genominformationen verfügbar sind (Herdman *et al.*, 1979; Lachance, 1981). Allerdings ist das Genom von *Calothrix* hoch repetitiv (Mazel *et al.*, 1990), wie auch das anderer Vertreter der Sektionen IV und V (Katayama *et al.* 2002).

4.4 Fazit und Ausblick

Die vorliegenden Arbeiten haben Aspekte des Proteinimports in Hydrogenosomen von *T. vaginalis* und die Kenntnisse über Importsignale beleuchtet. Zugleich haben diese Arbeiten neue Fragen zum Proteinimport aufgeworfen. Die Signale der verhältnismäßig kurzen, N-terminalen Transitpeptide konnten in allen in dieser Doktorarbeit untersuchten Fällen von internen Importsignalen kompensiert werden. Somit wurde gezeigt, dass in hydrogenosomalen Matrixproteinen interne Signale häufiger auftreten als bisher angenommen und eher die Regel als die Ausnahme zu sein scheinen. Die Bedeutung der Transitpeptide scheint dabei von geringerer Relevanz zu sein als bei Proteinen von Mitochondrien der Hefe oder anderen Organismen. Zudem wurde gezeigt, dass die internen Signale in mehreren Domänen eines Proteins vorkommen und diese dazu befähigen, individuell und unabhängig voneinander in das Organell importiert zu werden. Ein allgemein gültiges Motiv für ein internes Importsignal konnte allerdings nicht identifiziert werden. Weiterer Forschungsbedarf besteht außerdem bei der Frage, inwieweit cytosolische Faktoren den Import beeinflussen und ob Proteinmodifikationen entscheidend für deren Destination sein könnten. Künftige Studien könnten andere Aspekte beleuchten, beispielsweise ob und inwiefern mRNA Assoziation an das Organell Auswirkungen auf den Proteinimport in die Hydrogenosomen hat, wie es bei Mitochondrien in Hefe beschrieben wurde (Fox, 2012).

In dieser Studie wurden nur hochexprimierte hydrogenosomale Proteine untersucht. In weiterführenden Experimenten könnte untersucht werden, ob dies auch auf weniger stark exprimierte Proteine zutrifft. Zusätzlich könnten Proteine mit langen Transitpeptiden untersucht werden. Das Protein mit dem längsten in dieser Arbeit betrachteten Transitpeptid war *TvME*. Dabei wurden 11 Aminosäuren entfernt. Ob Proteine mit längeren Transitpeptiden ebenfalls ihre Importkompetenz behalten, wenn diese deletiert werden, könnte in weiterführenden Studien untersucht werden.

5 Anhang

5.1 Vektorkarten

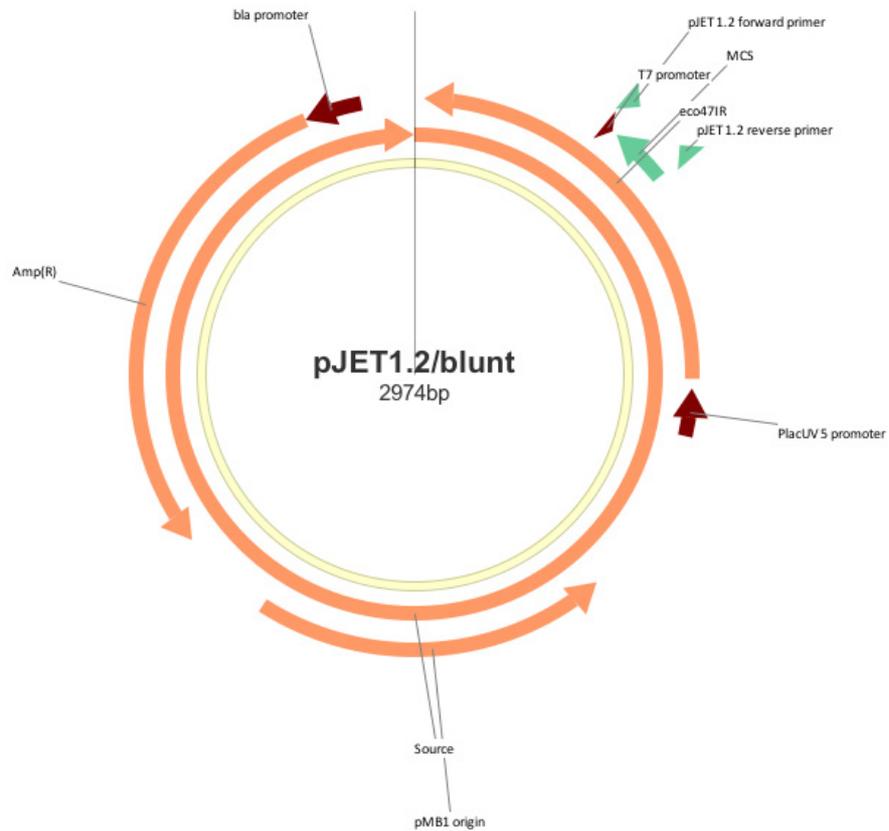


Abb. 5.1: pJET1.2/blunt Klonierungsvektor (Fermentas). Plasmidkarte gezeichnet nach Vorlage aus dem Herstellerprotokoll.

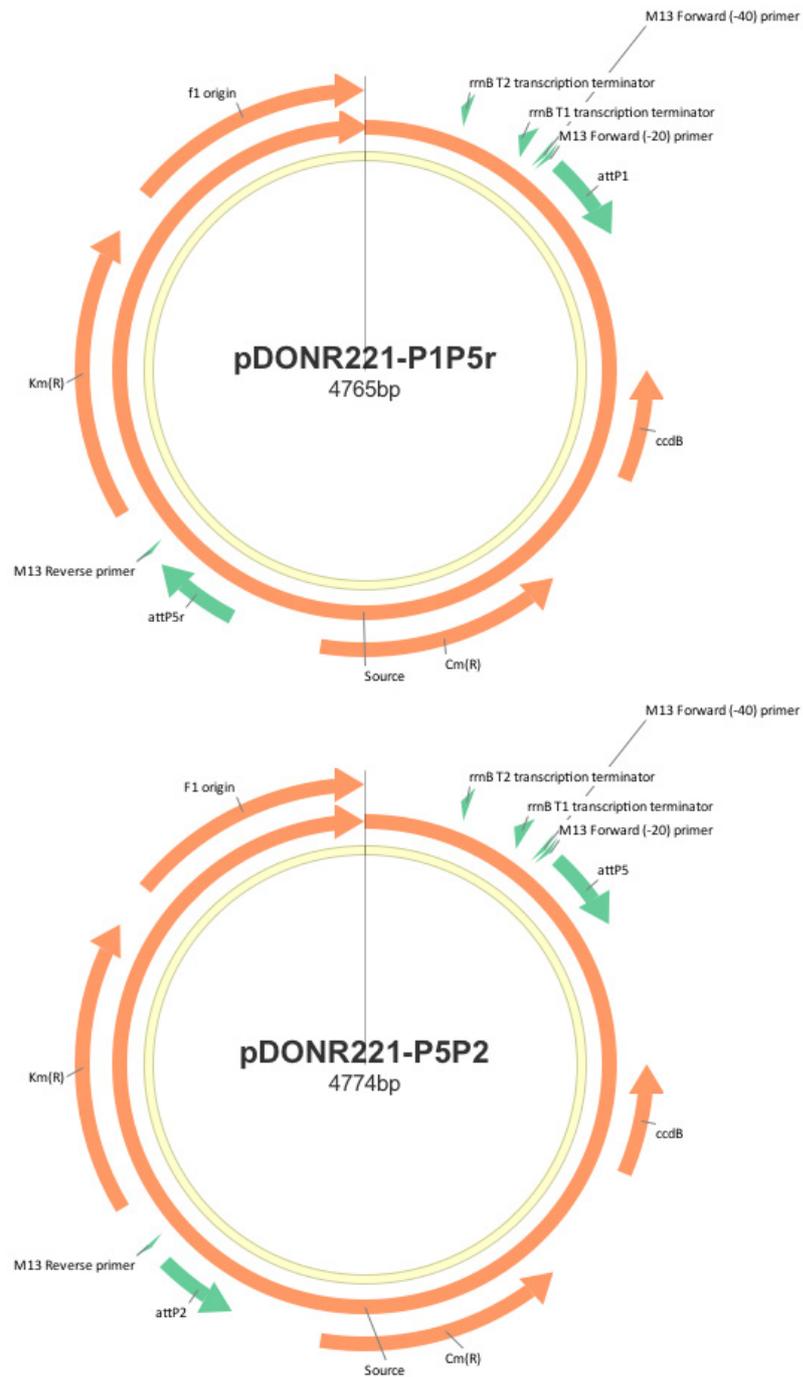


Abb. 5.2: pDONR221 Klonierungsvektoren des Gateway Systems (Invitrogen) für die BP Rekombination. Plasmidkarten verändert nach Vorlage des Herstellers.

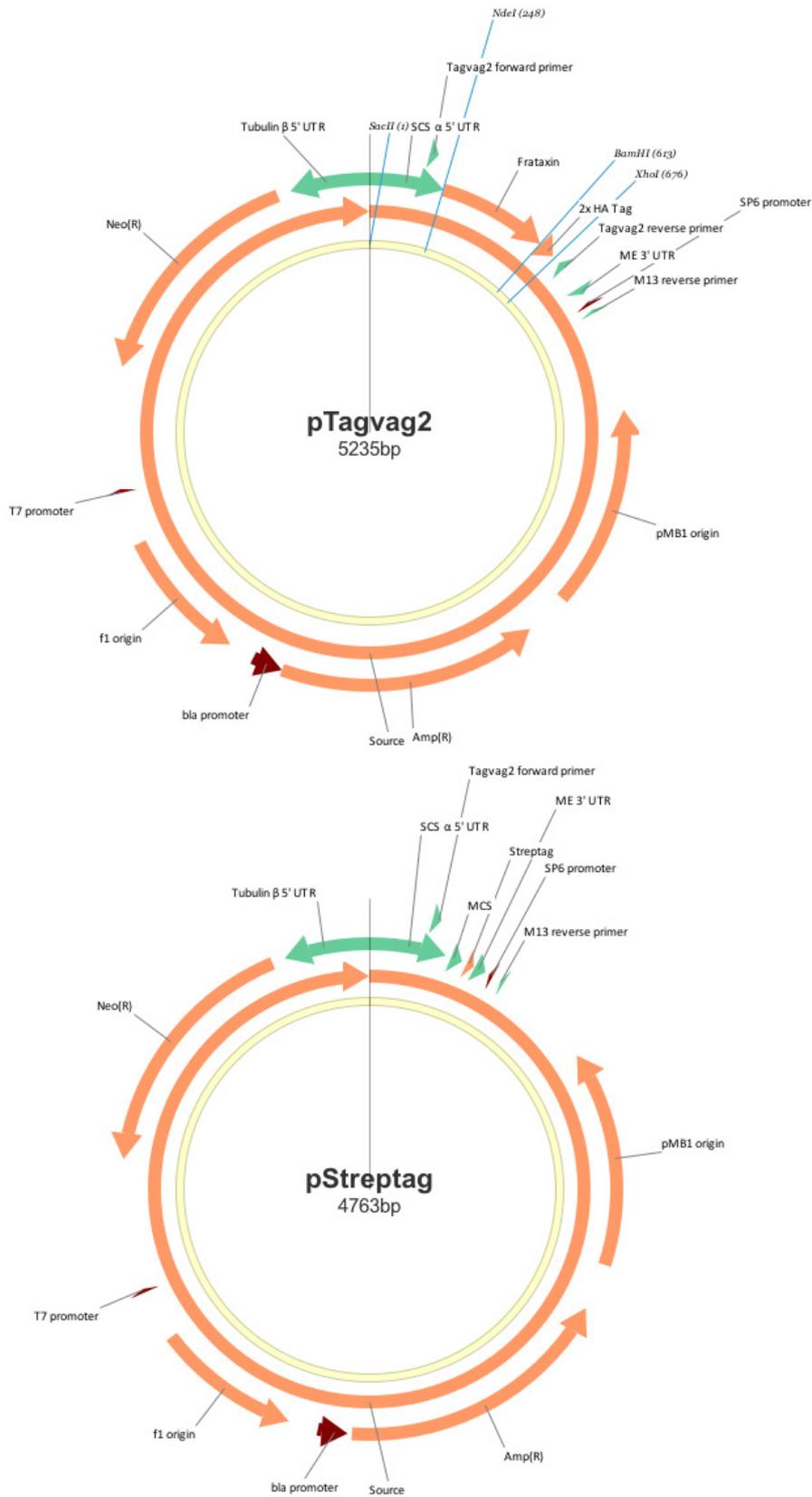


Abb. 5.3: Expressionsvektoren pTagvag2 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. J Tachezy, Universität Prag) und pStreptag (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. S. B. Gould, Universität Düsseldorf).

5.2 Kontrollen

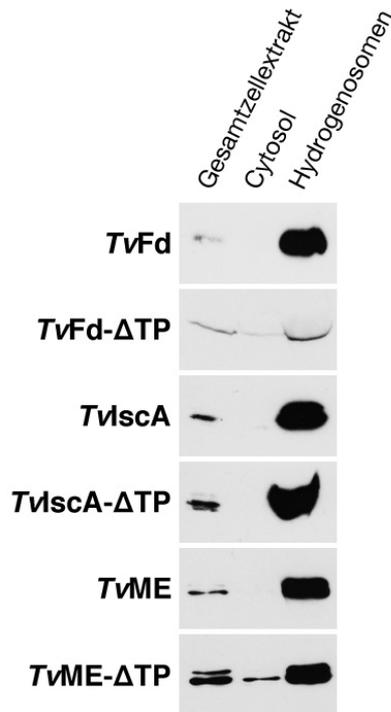


Abb. 5.4: Kontrollen zu Abb. 3.1 zur Bestimmung der Reinheit der Fraktionen. Membranen wurden gestrippt und mit einem Antikörper gegen ein hydrogenosomales Protein, Anti-ASCT bzw. Anti-SCS, detektiert.

5.3 Alignments

```

TVAG_003900_Fd1 1 --MLSQVCRFGT--TAVKKGVKKQKRFEDDQTLFTVLTEAGTMSADDTCCQGNKACGKCI
TVAG_399860_Fd2 1 MLSQCSPLRFGS--VTVTKGGAKKTLNMEDEQTLFTVLTEAGTMSTEGTCSGNRCACGKCF
TVAG_213140_Fd3 1 --MLSLCSTRFAS--TFAIKGQSKTINFEETGTLFELTVDNGTMSKDQTCQGNIGCGKCT
TVAG_292710_Fd4 1 MLCVSNYRFFK-LTVVTKAGEKVPINENDGQTLFDVSGTKAEGLOCKCGGSQVCGECH
TVAG_068150_Fd5 1 MLCVSNYRFFK-LTVVTPAGEKVPINENDGQTLFDVSGTKAEGLOCKCGGSQVCGECH
TVAG_251200_Fd6 1 MLCQQSNIRYFPSLTIIVNSKGEKTKVDFEDGQRLFDVSEGTRAEYIRGECGGNMSCGLCF
TVAG_078730_Fd7 1 ---MLASISRSVAVKHWTGKGCCKIIEGHNGETLLKLAERNKIP-IPNACEGNRACATCQ
    
```

```

TVAG_003900_Fd1 57 CRHVS--KVAAEDEEKEFLDQP---ANARLACATLSGENDGAVFEL-----
TVAG_399860_Fd2 59 CKHTGG--KVADADEEKEFLDQP---AGRLACCTILTGENNGATFV-----
TVAG_213140_Fd3 58 IGTKKG--KLPPPIEEEDDILPKD---GKRLACATLTKAQDGIETV-----
TVAG_292710_Fd4 60 CKLPQN--LYVVPDDDEKELIASGQDVTPTSRLACNIALNSKFDGATTEMTH-----
TVAG_068150_Fd5 60 CKLPQN--LYVAPDADEKELIASGTVTPTSRLACQLSLNSKFDGATTEMTH-----
TVAG_251200_Fd6 61 VEVPPN--AFKQPDVKEMDLLEETDGTTKYSRLACQLLIGPQFEDVEIHVRQ-----
TVAG_078730_Fd7 57 VYVNKAGDLNNEISDAEYDTLIVAVDLRECSRLACTCVLQTDGEMDVIIPRCRNIDVS
    
```

```

TVAG_003900_Fd1 -----
TVAG_399860_Fd2 -----
TVAG_213140_Fd3 -----
TVAG_292710_Fd4 -----
TVAG_068150_Fd5 -----
TVAG_251200_Fd6 -----
TVAG_078730_Fd7 117 EFKKKKSIL
    
```

Abb. 5.5: *Trichomonas vaginalis* Ferredoxin alignment.

Anhang

```
GL50803_9662      1  -----MPTKI DAAKCCATMFC-----
GL50803_10329    1  -----MRVHI IEGKCTGCCGC-----
GL50803_27266    1  MSLSSIRRFITFRVVQQVEHTVSGAVGQSLDDAIKAAHPTIQDACEGHLGCCFCGVYL

GL50803_9662     17  -----CEVCPADVDFE SGAKVVS ARPDACTECCACVSACASNAISL-----
GL50803_10329    17  -----IPSCAYNV HMDEV TNRVVLAPSYGCVGCLOCLAVCHDAIGTPVRY
GL50803_27266    61  DKKTYKRIPRATKEEAVLLDQVPEKPTSRLSCAVKLSSLEGATVRIPEFNKNVLSSED

GL50803_9662     -----
GL50803_10329    64  E-----
GL50803_27266    121 ILASEEKKRHGQH
```

Abb. 5.6: *Giardia intestinalis* Alignment von zwei kurzen 2[4Fe-4S] Ferredoxinen und einem langen [2Fe-2S] Ferredoxin.

5.4 Sequenzen

Detaillierte Proteinsequenzen der drei Blöcke von *TvSCSα* und *TvTrxRh2* mit C-terminaler Gateway Erkennungsstelle (blau) und HA-Tag (grün) sowie einem zusätzlichen Methionin am N-Terminus der Blöcke 2 und 3.

TvSCSα Block 1 – 13,69 kDa

MLHQPLLFIDKDTKVVIQGIGNQGQFHSRLMRQYGTQKVVGAVHPKKAGSIIAGLP
IFK
KNMKEVVKRTDANASLIFVPAPGAAAACIEAAQAGMGLVVCITEQLCIQKLYPYDVP
DYAYPYDVPDYA

TvSCSα Block 2 – 13,61 kDa

MHIPQHDMIKVKKVMKETGCQLIGPNCPLIQQPGTHTKLGIIPTNIFNNGKIGIVSR
SGTLTYEAAAYATTLAGLGQSTVVGIGGDPFAGQLHTDVVKRFAAQLCIQKLYPYDVP
DYAYPYDVPDYA

TvSCSα Block 3 – 13,57 kDa

MDPQTEGIILIGEIGGTSEEDAAEWIAKTKLTQEKPVVAFIAGATAPPGKRMGHAGA
IVSGGKGTAEGKYKALEAAGVRIARHPGNMGKFI FEEMKRMGKIQLCIQKLYPYDVP
DYAYPYDVPDYA

TvTrxRh2 Block 1 – 15,24 kDa

MSGDIDWTKAETVDIAIIGSGPGGSTAALYAARAGFKVIVLHGEVPGGQLTTTTELE
NFPGWKGTGPGLVEAIEKQATEAGA EYKYEVVTKVDFSVNPKLLSTDMDTHYKARSV
IVQLCIQKLYPYDVPDYAYPYDVPDYA

TvTrxRh2 Block 2 – 15,19 kDa

MATGAKALYLGLPNEERLKGKGVSGCATCDGPLYKGDVVVGGDAAEEAIFLSK
ICKSVKLVHRRDQLRASLPMRKRVEASSIQMIWNTVIEDVLGENKVTGVKVKNVVTN
QLCIQKLYPYDVPDYAYPYDVPDYA

TvTrxRh2 Block 3 – 11,96 kDa

MEVSEIPCDGLFVAIGHKPATEVFKDYLOTDEQGYFLTNGTPVTSIPGVFVCGDCAD
RHYRQAITSAAATGCQAALLAEKYLTDQLCIQKLYPYDVPDYAYPYDVPDYA

6 Literaturverzeichnis

Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T. & Kohda, D. (2000). Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* **100**, 551–560.

Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W. & Nussberger, S. (2001). Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *The Journal of Cell Biology* **153**, 1151–1160.

Akhmanova, A., Voncken, F., van Alen, T., van Hoek, A., Boxma, B., Vogels, G., Veenhuis, M. & Hackstein, J. H. P. (1998). A hydrogenosome with a genome. *Nature* **396**, 527–528.

Alconada, A., Kübrich, M., Moczko, M., Hönlinger, A. & Pfanner, N. (1995). The mitochondrial receptor complex: the small subunit Mom8b/Isps6 supports association of receptors with the general insertion pore and transfer of preproteins. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 6196–6205.

Allen, S., Balabanidou, V., Sideris, D. P., Lisowsky, T. & Tokatlidis, K. (2005). Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome *c*. *Journal of Molecular Biology* **353**, 937–944.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403–410.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.

Archibald, J. M. (2009). The puzzle of plastid evolution. *Current Biology* **19**, 81–88.

- Aurrecochea, C., Brestelli, J., Brunk, B. P., Carlton, J. M., Dommer, J., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gingle, A., Grant, G., Harb, O. S., Heiges, M., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J. C., Kraemer, E., Li, W., Miller, J. A., Morrison, H. G., Nayak, V., Pennington, C., Pinney, D. F., Roos, D. S., Ross, C., Stoeckert Jr, C. J., Sullivan, S., Treatman, C. & Wang, H. (2009).** GiardiaDB and TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Nucleic Acids Research* **37**, 526–530.
- Banci, L., Bertini, I., Cefaro, C., Ciofi-Baffoni, S., Gallo, A., Martinelli, M., Sideris, D. P., Katrakili, N. & Tokatlidis, K. (2009).** MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. *Nature Structural & Molecular Biology* **16**, 198–206.
- Barberà, M. J., Ruiz-Trillo, I., Tufts, J. Y. A., Bery, A., Silberman, J. D. & Roger, A. J. (2010).** *Sawyeria marylandensis* (Heterolobosea) has a hydrogenosome with novel metabolic properties. *Eukaryotic Cell* **9**, 1913–1924.
- Becker, T., Böttinger, L. & Pfanner, N. (2012).** Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends in Biochemical Sciences* **37**, 85–91.
- Becker, T., Wenz, L. S., Krüger, V., Lehmann, W., Müller, J. M., Goroncy, L., Zufall, N., Lithgow, T., Guiard, B., Chacinska, A., Wagner, R., Meisinger, C. & Pfanner, N. (2011).** The mitochondrial import protein Mim1 promotes biogenesis of multispinning outer membrane proteins. *The Journal of Cell Biology* **194**, 387–395.
- Bertani, G. (1951).** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **62**, 293–300.
- Bihlmaier, K., Mesecke, N., Terziyska, N., Bien, M., Hell, K. & Herrmann, J. M. (2007).** The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *The Journal of Cell Biology* **179**, 389–395.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513–1523.
- Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S. (1999).** Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology* **294**, 1351–1362.

- Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. (1987).** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93–99.
- Boxma, B., de Graaf, R. M., van der Staay, G. W. M., van Alen, T. A., Ricard, G., Gabaldón, T., van Hoek, A. H. A. M., Moon-van der Staay, S. Y., Koopman, W. J. H., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G. M., Friedrich, T., Veenhuis, M., Huynen, M. A. & Hackstein, J. H. P. (2005).** An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* **434**, 74–79.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Bradley, P. J., Lahti, C. J., Plümper, E. & Johnson, P. J. (1997).** Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist *Trichomonas*: similarities with mitochondrial protein import. *The EMBO Journal* **16**, 3484–3493.
- Broers, C. A. M., Stumm, C. K., Vogels, G. D. & Brugerolle, G. (1990).** *Psalteriomonas lanterna* gen. nov., sp. nov., a free-living amoeboflagellate isolated from freshwater anaerobic sediments. *European Journal of Protistology* **25**, 369–380.
- Brown, M. T., Goldstone, H. M. H., Bastida-Corcuera, F., Delgadillo-Correa, M. G., McArthur, A. G. & Johnson, P. J. (2007).** A functionally divergent hydrogenosomal peptidase with protomitochondrial ancestry. *Molecular Microbiology* **64**, 1154–1163.
- Brugerolle, G., Bricheux, G. & Coffe, G. (2000).** Immunolocalization of two hydrogenosomal enzymes of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research* **86**, 30–35.
- Bui, E. T. N., Bradley, P. J. & Johnson, P. J. (1996).** A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 9651–9656.
- Burstein, D., Gould, S. B., Zimorski, V., Kloesges, T., Kiosse, F., Major, P., Martin, W. F., Pupko, T. & Dagan, T. (2012).** A machine learning approach to identify hydrogenosomal proteins in *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryotic Cell* **11**, 217–228.

- Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J. R., Bidwell, S. L., Alsmark, U. C. M., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noël, C. J., Dacks, J. B., Foster, P. G., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J., Westrop, G. D., Müller, S., Dessi, D., Fiori, P. L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F. D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M. T., Hayes, R. D., Mukherjee, M., Okumura, C. Y., Schneider, R., Smith, A. J., Vaňáčová, Š., Villalvazo, M., Haas, B. J., Perteua, M., Feldblyum, T. V., Utterback, T. R., Shu, C.-L., Osoegawa, K., de Jong, P. J., Hrdý, I., Horváthová, L., Zubáčová, Z., Doležal, P., Malik, S.-B., Logsdon Jr, J. M., Henze, K., Gupta, A., Wang, C. C., Dunne, R. L., Upcroft, J. A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S. L., Tang, P., Chiu, C.-H., Lee, Y.-S., Embley, T. M., Coombs, G. H., Mottram, J. C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C. M. & Johnson, P. J. (2007).** Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* **315**, 207–212.
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T. & Pfanner, N. (2009).** Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**, 628–644.
- Chacinska, A., Guiard, B., Müller, J. M., Schulze-Specking, A., Gabriel, K., Kutik, S. & Pfanner, N. (2008).** Mitochondrial biogenesis, switching the sorting pathway of the intermembrane space receptor Mia40. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 29723–29729.
- Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuán Szklarz, L. K., Schulze-Specking, A., Truscott, K. N., Guiard, B., Meisinger, C. & Pfanner, N. (2004).** Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *The EMBO Journal* **23**, 3735–3746.
- Clark, C. G. & Diamond, L. S. (2002).** Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 329–341.
- Claros, M. G. & Vincens, P. (1996).** Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European Journal of Biochemistry* **241**, 779–786.
- Clemens, D. L. & Johnson, P. J. (2000).** Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. *Molecular and Biochemical Parasitology* **106**, 307–313.

- Collins, T. J. (2007).** ImageJ for microscopy. *BioTechniques* **43**, 25–30.
- Conrad, M., Zubáková, Z., Dunn, L. A., Upcroft, J., Sullivan, S. A., Tachezy, J. & Carlton, J. M. (2011).** Microsatellite polymorphism in the sexually transmitted human pathogen *Trichomonas vaginalis* indicates a genetically diverse parasite. *Molecular and Biochemical Parasitology* **175**, 30–38.
- Conrad, M. D., Gorman, A. W., Schillinger, J. A., Fiori, P. L., Arroyo, R., Malla, N., Dubey, M. L., Gonzalez, J., Blank, S., Secor, W. E., & Carlton, J. M. (2012).** Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**, e1573.
- Cudmore, S. L., Delgaty, K. L., Hayward-McClelland, S. F., Petrin, D. P. & Garber, G. E. (2004).** Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews* **17**, 783–793.
- Cui, Z., Hou, J., Chen, X., Li, J., Xie, Z., Xue, P., Cai, T., Wu, P., Xu, T. & Yang, F. (2010).** The profile of mitochondrial proteins and their phosphorylation signaling network in INS-1 beta cells. *Journal of Proteome Research* **9**, 2898–2908.
- Dabir, D. V., Leverich, E. P., Kim, S.-K., Tsai, F. D., Hirasawa, M., Knaff, D. B. & Koehler, C. M. (2007).** A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1. *The EMBO Journal* **26**, 4801–4811.
- Dagan, T., Roettger, M., Stucken, K., Landan, G., Koch, R., Major, P., Gould, S. B., Goremykin, V. V., Rippka, R., Tandeau de Marsac, N., Gugger, M., Lockhart, P. J., Allen, J. F., Brune, I., Maus, I., Pühler, A. & Martin, W. F. (2013).** Genomes of stigonematalean cyanobacteria (subsection V) and the evolution of oxygenic photosynthesis from prokaryotes to plastids. *Genome Biology and Evolution* **5**, 31–44.
- de Graaf, R. M., Duarte, I., van Alen, T. A., Kuiper, J. W. P., Schotanus, K., Rosenberg, J., Huynen, M. A. & Hackstein, J. H. P. (2009).** The hydrogenosomes of *Psalteriomonas lanterna*. *BMC Evolutionary Biology* **9**, 287.

- Delgadillo, M. G., Liston, D. R., Niazi, K. & Johnson, P. J. (1997).** Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 4716–4720.
- Deusch, O., Landan, G., Roettger, M., Gruenheit, N., Kowallik, K. V., Allen, J. F., Martin, W. & Dagan, T. (2008).** Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 748–761.
- Diamond, L. S. (1957).** The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *The Journal of Parasitology* **43**, 488–490.
- Dietmeier, K., Hönlinger, A., Bömer, U., Dekker, P. J. T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kübrich, M. & Pfanner, N. (1997).** Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature* **388**, 195–200.
- Doležal, P., Vaňáčová, Š., Tachezy, J. & Hrdý, I. (2004).** Malic enzymes of *Trichomonas vaginalis*: two enzyme families, two distinct origins. *Gene* **329**, 81–92.
- Doležal, P., Likić, V., Tachezy, J. & Lithgow, T. (2006).** Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* **313**, 314–318.
- Doležal, P., Šmíd, O., Rada, P., Zubáčová, Z., Bursac, D., Suták, R., Nebesárová, J., Lithgow, T. & Tachezy, J. (2005).** Giardia mitochondria and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 10924–10929.
- Dyall, S. D., Brown, M. T. & Johnson, P. J. (2004).** Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* **304**, 253–257.
- Dyall, S. D., Koehler, C. M., Delgadillo-Correa, M. G., Bradley, P. J., Plümper, E., Leuenberger, D., Turck, C. W. & Johnson, P. J. (2000).** Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 2488–2497.

- Dyall, S. D., Lester, D. C., Schneider, R. E., Delgadillo-Correa, M. G., Plümper, E., Martinez, A., Koehler, C. M. & Johnson, P. J. (2003).** *Trichomonas vaginalis* Hmp35, a putative pore-forming hydrogenosomal membrane protein, can form a complex in yeast mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 30548–30561.
- Embley, T. M. & Martin, W. (2006).** Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* **440**, 623–630.
- Esser, K., Tursun, B., Ingenhoven, M., Michaelis, G. & Pratje, E. (2002).** A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1. *Journal of Molecular Biology* **323**, 835–843.
- Fox, T. D. (2012).** Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics* **192**, 1203–1234.
- Franzén, O., Jerlström-Hultqvist, J., Castro, E., Sherwood, E., Ankarklev, J., Reiner, D. S., Palm, D., Andersson, J. O., Andersson, B. & Svärd, S. G. (2009).** Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? *PLoS Pathogens* **5**, e1000560.
- Freeman, C. D., Klutman, N. E. & Lamp, K. C. (1997).** Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs* **54**, 679–708.
- Fujiki, Y., Hubbard, A. L., Fowler, S. & Lazarow, P. B. (1982).** Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology* **93**, 97–102.
- Gaskell, G. J. (2000).** Multiple sequence alignment tools on the Web. *BioTechniques* **29**, 60–62.
- Gebert, M., Schrempp, S. G., Mehnert, C. S., Heißwolf, A. K., Oeljeklaus, S., Ieva, R., Bohnert, M., von der Malsburg, K., Wiese, S., Kleinschroth, T., Hunte, C., Meyer, H. E., Haferkamp, I., Guiard, B., Warscheid, B., Pfanner, N. & van der Laan, M. (2012).** Mgr2 promotes coupling of the mitochondrial presequence translocase to partner complexes. *The Journal of Cell Biology* **197**, 595–604.

- Gebert, N., Gebert, M., Oeljeklaus, S., von der Malsburg, K., Stroud, D. A., Kulawiak, B., Wirth, C., Zahedi, R. P., Doležal, P., Wiese, S., Simon, O., Schulze-Specking, A., Truscott, K. N., Sickmann, A., Rehling, P., Guiard, B., Hunte, C., Warscheid, B., van der Laan, M., Pfanner, N. & Wiedemann, N. (2011).** Dual function of Sdh3 in the respiratory chain and TIM22 protein translocase of the mitochondrial inner membrane. *Molecular Cell* **44**, 811–818.
- Gershoni, J. M. & Palade, G. E. (1983).** Protein blotting: principles and applications. *Analytical Biochemistry* **131**, 1–15.
- Gill, E. E., Diaz-Triviño, S., Barberà, M. J., Silberman, J. D., Stechmann, A., Gaston, D., Tamas, I. & Roger, A. J. (2007).** Novel mitochondrion-related organelles in the anaerobic amoeba *Mastigamoeba balamuthi*. *Molecular Microbiology* **66**, 1306–1320.
- Goldberg, A. V., Molik, S., Tsaousis, A. D., Neumann, K., Kuhnke, G., Delbac, F., Vivares, C. P., Hirt, R. P., Lill, R. & Embley, T. M. (2008).** Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature* **452**, 624–628.
- Goodman, R. P., Ghabrial, S. A., Fichorova, R. N. & Nibert, M. L. (2011).** *Trichomonasvirus*: a new genus of protozoan viruses in the family *Totiviridae*. *Archives of Virology* **156**, 171–179.
- Gorrell, T. E., Yarlett, N. & Müller, M. (1984).** Isolation and characterization of *Trichomonas vaginalis* ferredoxin. *Carlsberg Research Communications* **49**, 259–268.
- Gould, S. B., Waller, R. F. & McFadden, G. I. (2008).** Plastid evolution. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 491–517.
- Hampl, V., Silberman, J. D., Stechmann, A., Diaz-Triviño, S., Johnson, P. J. & Roger, A. J. (2008).** Genetic evidence for a mitochondriate ancestry in the 'amitochondriate' flagellate *Trimastix pyriformis*. *PLoS ONE* **3**, e1383.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557–580.
- Harp, D. F. & Chowdhury, I. (2011).** Trichomoniasis: evaluation to execution. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **157**, 3–9.

- Hartley, J. L., Temple, G. F. & Brasch, M. A. (2000).** DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research* **10**, 1788–1795.
- Häusler, T., Stierhof, Y. D., Blattner, J. & Clayton, C. (1997).** Conservation of mitochondrial targeting sequence function in mitochondrial and hydrogenosomal proteins from the early-branching eukaryotes *Crithidia*, *Trypanosoma* and *Trichomonas*. *European Journal of Cell Biology* **73**, 240–251.
- Heinz, E., Williams, T. A., Nakjang, S., Noël, C. J., Swan, D. C., Goldberg, A. V., Harris, S. R., Weinmaier, T., Markert, S., Becher, D., Bernhardt, J., Dagan, T., Hacker, C., Lucocq, J. M., Schweder, T., Rattei, T., Hall, N., Hirt, R. P. & Embley, T. M. (2012).** The genome of the obligate intracellular parasite *Trachipleistophora hominis*: new insights into microsporidian genome dynamics and reductive evolution. *PLoS Pathogens* **8**, e1002979.
- Henze, K. & Martin, W. (2003).** Evolutionary biology: essence of mitochondria. *Nature* **426**, 127–128.
- Herdman, M., Janvier, M., Rippka, R. & Stanier, R. Y. (1979).** Genome size of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **111**, 73–85.
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W. & Reichert, A. S. (2003).** Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 27781–27788.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1988).** Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem Development Unit. *Electrophoresis* **9**, 60–61.
- Hewitt, V., Alcock, F. & Lithgow, T. (2011).** Minor modifications and major adaptations: the evolution of molecular machines driving mitochondrial protein import. *Biochimica et Biophysica Acta* **1808**, 947–954.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M. T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. & Pfanner, N. (1998).** Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* **395**, 516–521.
- Hirt, R. P., Müller, S., Embley, T. M. & Coombs, G. H. (2002).** The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives. *Trends in Parasitology* **18**, 302–308.

- Hirt, R. P., Noël, C. J., Sicheritz-Ponten, T., Tachezy, J. & Fiori, P. L. (2007).** *Trichomonas vaginalis* surface proteins: a view from the genome. *Trends in Parasitology* **23**, 540–547.
- Hirt, R. P., de Miguel, N., Nakjang, S., Dessi, D., Liu, Y.-C., Diaz, N., Rappelli, P., Acosta-Serrano, A., Fiori, P. L. & Mottram, J. C. (2011).** *Trichomonas vaginalis* pathobiology: new insights from the genome sequence. *Advances in Parasitology* **77**, 87–140.
- Hjort, K., Goldberg, A. V., Tsaousis, A. D., Hirt, R. P. & Embley, T. M. (2010).** Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **365**, 713–727.
- Hofmann, S., Rothbauer, U., Mühlenbein, N., Baiker, K., Hell, K. & Bauer, M. F. (2005).** Functional and mutational characterization of human MIA40 acting during import into the mitochondrial intermembrane space. *Journal of Molecular Biology* **353**, 517–528.
- Hönlinger, A., Bömer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K. & Pfanner, N. (1996).** Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *The EMBO Journal* **15**, 2125–2137.
- Hrdý, I. & Müller, M. (1995a).** Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Molecular Evolution* **41**, 388–396.
- Hrdý, I. & Müller, M. (1995b).** Primary structure of the hydrogenosomal malic enzyme of *Trichomonas vaginalis* and its relationship to homologous enzymes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* **42**, 593–603.
- Hrdý, I., Hirt, R. P., Doležal, P., Bardoňová, L., Foster, P. G., Tachezy, J. & Embley, T. M. (2004).** *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* **432**, 618–622.
- Huang, K.-Y., Chien, K.-Y., Lin, Y.-C., Hsu, W.-M., Fong, I.-K., Huang, P.-J., Yueh, Y.-M., Gan, R. R.-C. & Tang, P. (2009).** A proteome reference map of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research* **104**, 927–933.

- Jedelský, P. L., Doležal, P., Rada, P., Pyrih, J., Šmíd, O., Hrdý, I., Šedinová, M., Marcinčíková, M., Voleman, L., Perry, A. J., Beltràn, N. C., Lithgow, T. & Tachezy, J. (2011).** The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS ONE* **6**, e17285.
- Jenkins, T. M., Gorrell, T. E., Müller, M. & Weitzman, P. D. J. (1991).** Hydrogenosomal succinate thiokinase in *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **179**, 892–896.
- Jerlström-Hultqvist, J., Franzén, O., Ankarklev, J., Xu, F., Nohýnková, E., Andersson, J. O., Svärd, S. G. & Andersson, B. (2010).** Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. *BMC Genomics* **11**, 543.
- Johnson, P. J., d'Oliveira, C. E., Gorrell, T. E. & Müller, M. (1990).** Molecular analysis of the hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 6097–6101.
- Kadowaki, K., Kubo, N., Ozawa, K. & Hirai, A. (1996).** Targeting presequence acquisition after mitochondrial gene transfer to the nucleus occurs by duplication of existing targeting signals. *The EMBO Journal* **15**, 6652–6661.
- Kaneko, T. & Tabata, S. (1997).** Complete genome structure of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant & Cell Physiology* **38**, 1171–1176.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. & Tabata, S. (1996).** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Research* **3**, 109–136.
- Kang, D. H., Gho, Y. S., Suh, M. K. & Kang, C. (2002).** Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **23**, 1511–1512.

- Katayama, T., Okamoto, S., Narikawa, R., Fujisawa, T., Kawashima, S., Itoh, M., Ohmori, M., Kanehisa, M. (2002).** Comprehensive analysis of tandem repeat sequences in cyanobacteria genome. *Genome Informatics* **13**, 400–401.
- Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J. & Vivarès, C. P. (2001).** Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **414**, 450–453.
- Katzen, F. (2007).** Gateway[®] recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2**, 571–589.
- Kay, C., Woodward, K. D., Lawler, K., Self, T. J., Dyall, S. D. & Kerr, I. D. (2012).** The ATP-binding cassette proteins of the deep-branching protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**, e1693.
- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. & Koike, T. (2006).** Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* **5**, 749–757.
- Kinoshita, E., Takahashi, M., Takeda, H., Shiro, M. & Koike, T. (2004).** Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc(II) complex. *Dalton Transactions*, 1189–1193.
- Koppen, M. & Langer, T. (2007).** Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **42**, 221–242.
- Kubo, N., Harada, K., Hirai, A. & Kadowaki, K. (1999).** A single nuclear transcript encoding mitochondrial RPS14 and SDHB of rice is processed by alternative splicing: common use of the same mitochondrial targeting signal for different proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 9207–9211.
- Lachance, M.-A. (1981).** Genetic relatedness of heterocystous cyanobacteria by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid reassociation. *International Journal of Systematic Bacteriology* **31**, 139–147.

- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lahti, C. J., d'Oliveira, C. E. & Johnson, P. J. (1992).** β -succinyl-coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. *Journal of Bacteriology* **174**, 6822–6830.
- Lahti, C. J., Bradley, P. J. & Johnson, P. J. (1994).** Molecular characterization of the α -subunit of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal succinyl CoA synthetase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **66**, 309–318.
- Laloraya, S., Gambill, B. D. & Craig, E. A. (1994).** A role for a eukaryotic GrpE-related protein, Mge1p, in protein translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 6481–6485.
- Land, K. M., Delgadillo-Correa, M. G., Tachezy, J., Vaňáčová, Š., Hsieh, C. L., Sutak, R. & Johnson, P. J. (2004).** Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. *Molecular Microbiology* **51**, 115–122.
- Landy, A. (1989).** Dynamic, structural, and regulatory aspects of λ site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 913–949.
- Länge, S., Rozario, C. & Müller, M. (1994).** Primary structure of the hydrogenosomal adenylate kinase of *Trichomonas vaginalis* and its phylogenetic relationships. *Molecular and Biochemical Parasitology* **66**, 297–308.
- Li, Y., Dudek, J., Guiard, B., Pfanner, N., Rehling, P. & Voos, W. (2004).** The presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. Pam16 functions in an antagonistic manner to Pam18. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 38047–38054.
- Lindmark, D. G. & Müller, M. (1973).** Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **248**, 7724–7728.
- Lindmark, D. G., Müller, M. & Shio, H. (1975).** Hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Parasitology* **61**, 552–554.

- Liston, D. R. & Johnson, P. J. (1998).** Gene transcription in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Today* **14**, 261–265.
- Liston, D. R. & Johnson, P. J. (1999).** Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiator element. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 2380–2388.
- Lithgow, T. & Schneider, A. (2010).** Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **365**, 799–817.
- Lloyd, D., Ralphs, J. R. & Harris, J. C. (2002).** *Giardia intestinalis*, a eukaryote without hydrogenosomes, produces hydrogen. *Microbiology* **148**, 727–733.
- Long, M., de Souza, S. J., Rosenberg, C. & Gilbert, W. (1996).** Exon shuffling and the origin of the mitochondrial targeting function in plant cytochrome c1 precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 7727–7731.
- Lu, G. & Moriyama, E. N. (2004).** Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Briefings in Bioinformatics* **5**, 378–388.
- Major, P. (2009).** Die Funktion der N-terminalen Extension für die intrazelluläre Lokalisierung des hydrogenosomalen Ferredoxins aus *Trichomonas vaginalis*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Major, P., Zimorski, V., Hoffmann, K., Pereira Brás, X., Martin, W. F. & Gould, S. B. (2013).** The N-terminal sequences of four major hydrogenosomal proteins are not essential for import into hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **60**, 89–97.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970).** Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology* **53**, 159–162.
- Mann, M. & Jensen, O. N. (2003).** Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology* **21**, 255–261.

- Mapa, K., Sikor, M., Kudryavtsev, V., Waegemann, K., Kalinin, S., Seidel, C. A. M., Neupert, W., Lamb, D. C. & Mokranjac, D. (2010).** The conformational dynamics of the mitochondrial Hsp70 chaperone. *Molecular Cell* **38**, 89–100.
- Marom, M., Dayan, D., Demishtein-Zohary, K., Mokranjac, D., Neupert, W. & Azem, A. (2011).** Direct interaction of mitochondrial targeting presequences with purified components of the TIM23 protein complex. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 43809–43815.
- Martin, W. & Müller, M. (1998).** The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**, 37–41.
- Martin, W. & Herrmann, R. G. (1998).** Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiology* **118**, 9–17.
- Matthews, H. R. (1995).** Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: a possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacology & Therapeutics* **67**, 323–350.
- Mazel, D., Houmard, J., Castets, A. M. & Tandeau de Marsac, N. (1990).** Highly repetitive DNA sequences in cyanobacterial genomes. *Journal of Bacteriology* **172**, 2755–2761.
- Mazet, M., Diogon, M., Alderete, J. F., Vivarès, C. P. & Delbac, F. (2008).** First molecular characterisation of hydrogenosomes in the protozoan parasite *Histomonas meleagridis*. *International Journal for Parasitology* **38**, 177–190.
- McArthur, A. G., Morrison, H. G., Nixon, J. E. J., Passamaneck, N. Q. E., Kim, U., Hinkle, G., Crocker, M. K., Holder, M. E., Farr, R., Reich, C. I., Olsen, G. E., Aley, S. B., Adam, R. D., Gillin, F. D. & Sogin, M. L. (2000).** The *Giardia* genome project database. *FEMS Microbiology Letters* **189**, 271–273.
- McQuibban, G. A., Saurya, S. & Freeman, M. (2003).** Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* **423**, 537–541.

- 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. *Eukaryotic Cell* **7**, 1750–1757.
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K. & Herrmann, J. M. (2005).** A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* **121**, 1059–1069.
- Mesecke, N., Bihlmaier, K., Grumbt, B., Longen, S., Terziyska, N., Hell, K. & Herrmann, J. M. (2008).** The zinc-binding protein Hot13 promotes oxidation of the mitochondrial import receptor Mia40. *EMBO Reports* **9**, 1107–1113.
- Michon, T., Galante, M. & Velours, J. (1988).** NH₂-terminal sequence of the isolated yeast ATP synthase subunit 6 reveals post-translational cleavage. *European Journal of Biochemistry* **172**, 621–625.
- Minge, M. A., Silberman, J. D., Orr, R. J. S., Cavalier-Smith, T., Shalchian-Tabrizi, K., Burki, F., Skjæveland, Å. & Jakobsen, K. S. (2009).** Evolutionary position of breviate amoebae and the primary eukaryote divergence. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **276**, 597–604.
- Morrison, H. G., McArthur, A. G., Gillin, F. D., Aley, S. B., Adam, R. D., Olsen, G. J., Best, A. A., Cande, W. Z., Chen, F., Cipriano, M. J., Davids, B. J., Dawson, S. C., Elmendorf, H. G., Hehl, A. B., Holder, M. E., Huse, S. M., Kim, U. U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Nigam, A., Nixon, J. E. J., Palm, D., Passamanek, N. E., Prabhu, A., Reich, C. I., Reiner, D. S., Samuelson, J., Svärd, S. G. & Sogin, M. L. (2007).** Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* **317**, 1921–1926.
- Mossmann, D., Meisinger, C. & Vögtle, F.-N. (2012).** Processing of mitochondrial presequences. *Biochimica et Biophysica Acta* **1819**, 1098–1106.
- Müller, M. (1988).** Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annual Review of Microbiology* **42**, 465–488.
- Müller, M. (1993).** The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology* **139**, 2879–2889.

- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S. B., Yu, R.-Y., van der Giezen, M., Tielens, A. G. M. & Martin, W. F. (2012).** Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**, 444–495.
- Murcha, M. W., Rudhe, C., Elhafez, D., Adams, K. L., Daley, D. O. & Whelan, J. (2005).** Adaptations required for mitochondrial import following mitochondrial to nucleus gene transfer of ribosomal protein S10. *Plant Physiology* **138**, 2134–2144.
- Naamati, A., Regev-Rudzki, N., Galperin, S., Lill, R. & Pines, O. (2009).** Dual targeting of Nfs1 and discovery of its novel processing enzyme, Icp55. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 30200–30208.
- Nakamura, Y., Ito, K. & Isaksson, L. A. (1996).** Emerging understanding of translation termination. *Cell* **87**, 147–150.
- Nakamura, Y., Kaneko, T. & Tabata, S. (2000).** CyanoBase, the genome database for *Synechocystis* sp. strain PCC6803: status for the year 2000. *Nucleic Acids Research* **28**, 72.
- Nakao, M., Okamoto, S., Kohara, M., Fujishiro, T., Fujisawa, T., Sato, S., Tabata, S., Kaneko, T. & Nakamura, Y. (2010).** CyanoBase: the cyanobacteria genome database update 2010. *Nucleic Acids Research* **38**, 379–381.
- Naoé, M., Ohwa, Y., Ishikawa, D., Ohshima, C., Nishikawa, S., Yamamoto, H. & Endo, T. (2004).** Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 47815–47821.
- Neuhoff, V., Stamm, R. & Eibl, H. (1985).** Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* **6**, 427–448.
- Nixon, J. E. J., Wang, A., Morrison, H. G., McArthur, A. G., Sogin, M. L., Loftus, B. J. & Samuelson, J. (2002a).** A spliceosomal intron in *Giardia lamblia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 3701–3705.

- Nixon, J. E. J., Wang, A., Field, J., Morrison, H. G., McArthur, A. G., Sogin, M. L., Loftus, B. J. & Samuelson, J. (2002b).** Evidence for lateral transfer of genes encoding ferredoxins, nitroreductases, NADH oxidase, and alcohol dehydrogenase 3 from anaerobic prokaryotes to *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic Cell* **1**, 181–190.
- Noël, C. J., Diaz, N., Sicheritz-Ponten, T., Šafaříková, L., Tachezy, J., Tang, P., Fiori, P.-L. & Hirt, R. P. (2010).** *Trichomonas vaginalis* vast BspA-like gene family: evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. *BMC Genomics* **11**, 99.
- Nolden, M., Ehses, S., Koppen, M., Bernacchia, A., Rugarli, E. I. & Langer, T. (2005).** The *m*-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell* **123**, 277–289.
- Nunnari, J., Fox, T. D. & Walter, P. (1993).** A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science* **262**, 1997–2004.
- Ortiz, D. & Johnson, P. J. (2003).** Tetracycline-inducible gene expression in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **128**, 43–49.
- Osman, C., Wilmes, C., Tatsuta, T. & Langer, T. (2007).** Prohibitins interact genetically with Atp23, a novel processing peptidase and chaperone for the F₁F₀-ATP synthase. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 627–635.
- Pal, D., Banerjee, S., Cui, J., Schwartz, A., Ghosh, S. K. & Samuelson, J. (2009).** *Giardia*, *Entamoeba*, and *Trichomonas* enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**, 458–464.
- Palmer, J. D. (1997).** Organelle genomes: going, going, gone! *Science* **275**, 790–791.
- Parfrey, L. W., Lahr, D. J. G., Knoll, A. H. & Katz, L. A. (2011).** Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 13624–13629.

- Paul, R. G., Williams, A. G. & Butler, R. D. (1990).** Hydrogenosomes in the rumen entodiniomorphid ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. *Journal of General Microbiology* **136**, 1981–1989.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R. & Garber, G. (1998).** Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews* **11**, 300–317.
- Pfanner, N. & Geissler, A. (2001).** Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 339–349.
- Pfanner, N., Wiedemann, N., Meisinger, C. & Lithgow, T. (2004).** Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**, 1044–1048.
- Pusnik, M., Mani, J., Schmidt, O., Niemann, M., Oeljeklaus, S., Schnarwiler, F., Warscheid, B., Lithgow, T., Meisinger, C. & Schneider, A. (2012a).** An essential novel component of the noncanonical mitochondrial outer membrane protein import system of trypanosomatids. *Molecular Biology of the Cell* **23**, 3420–3428.
- Pusnik, M., Schmidt, O., Perry, A. J., Oeljeklaus, S., Niemann, M., Warscheid, B., Meisinger, C., Lithgow, T. & Schneider, A. (2012b).** Response to Žárský *et al.* *Current Biology* **22**, 481–482.
- Pütz, S. (2007).** Charakterisierung des hydrogenosomalen Proteoms aus dem mikroaerophilen Humanparasiten *Trichomonas vaginalis*. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- 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*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **142**, 212–223.
- Quon, D. V. K., Delgadillo, M. G., Khachi, A., Smale, S. T. & Johnson, P. J. (1994).** Similarity between a ubiquitous promoter element in an ancient eukaryote and mammalian initiator elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 4579–4583.
- Rabilloud, T. (2002).** Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* **2**, 3–10.

- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S. & Lelong, C. (2010).** Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *Journal of Proteomics* **73**, 2064–2077.
- Rada, P., Doležal, P., Jedelský, P. L., Bursac, D., Perry, A. J., Šedinová, M., Smíšková, K., Novotný, M., Beltrán, N. C., Hrdý, I., Lithgow, T. & Tachezy, J. (2011).** The core components of organelle biogenesis and membrane transport in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *PLoS ONE* **6**, e24428.
- Rao, S., Schmidt, O., Harbauer, A. B., Schönfisch, B., Guiard, B., Pfanner, N. & Meisinger, C. (2012).** Biogenesis of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: protein kinase A phosphorylates the precursor of Tom40 and impairs its import. *Molecular Biology of the Cell* **23**, 1618–1627.
- Regoes, A., Zourmpanou, D., León-Avila, G., van der Giezen, M., Tovar, J. & Hehl, A. B. (2005).** Protein import, replication, and inheritance of a vestigial mitochondrion. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 30557–30563.
- Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H. E., Kühlbrandt, W., Wagner, R., Truscott, K. N. & Pfanner, N. (2003).** Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science* **299**, 1747–1751.
- Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A. (2000).** EMBOSS: the european molecular biology open software suite. *Trends in Genetics* **16**, 276–277.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. & Stanier, R. Y. (1979).** Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **111**, 1–61.
- Roise, D. & Schatz, G. (1988).** Mitochondrial presequences. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 4509–4511.
- Roy, S. W., Hudson, A. J., Joseph, J., Yee, J. & Russell, A. G. (2012).** Numerous fragmented spliceosomal introns, AT-AC splicing, and an unusual dynein gene expression pathway in *Giardia lamblia*. *Molecular Biology and Evolution* **29**, 43–49.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491.
- Saitoh, T., Igura, M., Obita, T., Ose, T., Kojima, R., Maenaka, K., Endo, T. & Kohda, D. (2007).** Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *The EMBO Journal* **26**, 4777–4787.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual, vol. 2. New York: Cold Spring Harbor laboratory press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463–5467.
- Santos, J. M., Graindorge, A. & Soldati-Favre, D. (2012).** New insights into parasite rhomboid proteases. *Molecular and Biochemical Parasitology* **182**, 27–36.
- Sasaki, Y., Sone, T., Yoshida, S., Yahata, K., Hotta, J., Chesnut, J. D., Honda, T. & Imamoto, F. (2004).** Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system. *Journal of Biotechnology* **107**, 233–243.
- Sasaki, Y., Sone, T., Yahata, K., Kishine, H., Hotta, J., Chesnut, J. D., Honda, T. & Imamoto, F. (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. *Journal of Biotechnology* **136**, 103–112.
- Schmidt, O., Harbauer, A. B., Rao, S., Eyrich, B., Zahedi, R. P., Stojanovski, D., Schönfisch, B., Guiard, B., Sickmann, A., Pfanner, N. & Meisinger, C. (2011).** Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases. *Cell* **144**, 227–239.
- Schneider, H.-C., Berthold, J., Bauer, M. F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M. & Neupert, W. (1994).** Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* **371**, 768–774.

- Schneider, R. E., Brown, M. T., Shiflett, A. M., Dyall, S. D., Hayes, R. D., Xie, Y., Loo, J. A. & Johnson, P. J. (2011).** The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. *International Journal for Parasitology* **41**, 1421–1434.
- Schwebke, J. R. & Burgess, D. (2004).** Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews* **17**, 794–803.
- Shi, T. & Falkowski, P. G. (2008).** Genome evolution in cyanobacteria: the stable core and the variable shell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 2510–2515.
- Shiflett, A. M. & Johnson, P. J. (2010).** Mitochondrion-related organelles in eukaryotic protists. *Annual Review of Microbiology* **64**, 409–429.
- Shiota, T., Mabuchi, H., Tanaka-Yamano, S., Yamano, K. & Endo, T. (2011).** In vivo protein-interaction mapping of a mitochondrial translocator protein Tom22 at work. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 15179–15183.
- Šmíd, O., Matušková, A., Harris, S. R., Kučera, T., Novotný, M., Horváthová, L., Hrdý, I., Kutějová, E., Hirt, R. P., Embley, T. E., Janata, J. & Tachezy, J. (2008).** Reductive evolution of the mitochondrial processing peptidases of the unicellular parasites *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*. *PLoS Pathogens* **4**, e1000243.
- Smith, A. & Johnson, P. (2011).** Gene expression in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Research in Microbiology* **162**, 646–654.
- Smith, A. J., Chudnovsky, L., Simoes-Barbosa, A., Delgadillo-Correa, M. G., Jonsson, Z. O., Wohlschlegel, J. A. & Johnson, P. J. (2011).** Novel core promoter elements and a cognate transcription factor in the divergent unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Cellular Biology* **31**, 1444–1458.
- Stechmann, A., Hamblin, K., Pérez-Brocal, V., Gaston, D., Richmond, G. S., van der Giezen, M., Clark, C. G. & Roger, A. J. (2008).** Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Current Biology* **18**, 580–585.

- Stojanovski, D., Bohnert, M., Pfanner, N. & van der Laan, M. (2012).** Mechanisms of protein sorting in mitochondria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**, 1–18.
- Tai, J.-H., Su, H.-M., Tsai, J., Shaio, M.-F. & Wang, C. C. (1993).** The divergence of *Trichomonas vaginalis* virus RNAs among various isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Experimental Parasitology* **76**, 278–286.
- Taylor, A. B., Smith, B. S., Kitada, S., Kojima, K., Miyaura, H., Otwinowski, Z., Ito, A. & Deisenhofer, J. (2001).** Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. *Structure* **9**, 615–625.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673–4680.
- Tjaden, J., Haferkamp, I., Boxma, B., Tielens, A. G. M., Huynen, M. & Hackstein, J. H. P. (2004).** A divergent ADP/ATP carrier in the hydrogenosomes of *Trichomonas gallinae* argues for an independent origin of these organelles. *Molecular Microbiology* **51**, 1439–1446.
- Tovar, J., Fischer, A. & Clark, C. G. (1999).** The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology* **32**, 1013–1021.
- Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M. & Lucocq, J. M. (2003).** Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* **426**, 172–176.
- Tsaousis, A. D., Kunji, E. R. S., Goldberg, A. V., Lucocq, J. M., Hirt, R. P. & Embley, T. M. (2008).** A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **453**, 553–557.
- van der Giezen, M. (2009).** Hydrogenosomes and mitosomes: conservation and evolution of functions. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **56**, 221–231.

- van Grinsven, K. W. A., Rosnowsky, S., van Weelden, S. W. H., Pütz, S., van der Giezen, M., Martin, W., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G. M. & Henze, K. (2008).** Acetate:succinate CoA-transferase in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* - identification and characterization. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 1411–1418.
- van Wilpe, S., Ryan, M. T., Hill, K., Maarse, A. C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P. J. T., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., Guiard, B., Hönlinger, A. & Pfanner, N. (1999).** Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* **401**, 485–489.
- Vaňáčová, Š., Yan, W., Carlton, J. M. & Johnson, P. J. (2005).** Spliceosomal introns in the deep-branching eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4430–4435.
- Vidakovic, M. S., Fraczkiwicz, G. & Germanas, J. P. (1996).** Expression and spectroscopic characterization of the hydrogenosomal [2Fe-2S] ferredoxin from the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 14734–14739.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 615–619.
- Vögtle, F.-N., Prinz, C., Kellermann, J., Lottspeich, F., Pfanner, N. & Meisinger, C. (2011).** Mitochondrial protein turnover: role of the precursor intermediate peptidase Oct1 in protein stabilization. *Molecular Biology of the Cell* **22**, 2135–2143.
- Vögtle, F.-N., Wortelkamp, S., Zahedi, R. P., Becker, D., Leidhold, C., Gevaert, K., Kellermann, J., Voos, W., Sickmann, A., Pfanner, N. & Meisinger, C. (2009).** Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* **139**, 428–439.
- von der Haar, T. & Tuite, M. F. (2007).** Regulated translational bypass of stop codons in yeast. *Trends in Microbiology* **15**, 78–86.
- Waizenegger, T., Schmitt, S., Zivkovic, J., Neupert, W. & Rapaport, D. (2005).** Mim1, a protein required for the assembly of the TOM complex of mitochondria. *EMBO Reports* **6**, 57–62.

- Wegener, A. D. & Jones, L. R. (1984).** Phosphorylation-induced mobility shift in phospholamban in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels - evidence for a protein-structure consisting of multiple identical phosphorylatable subunits. *The Journal of Biological Chemistry* **259**, 1834–1841.
- Weksberg, T. E., Lynch, G. C., Krause, K. L. & Pettitt, B. M. (2007).** Molecular dynamics simulations of *Trichomonas vaginalis* ferredoxin show a loop-cap transition. *Biophysical Journal* **92**, 3337–3345.
- Wiedemann, N., Pfanner, N. & Ryan, M. T. (2001).** The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *The EMBO Journal* **20**, 951–960.
- Wiedemann, N., Frazier, A. E. & Pfanner, N. (2004).** The protein import machinery of mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 14473–14476.
- Williams, B. A. P., Hirt, R. P., Lucocq, J. M. & Embley, T. M. (2002).** A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* **418**, 865–869.
- Williams, B. A. P., Cali, A., Takvorian, P. M. & Keeling, P. J. (2008).** Distinct localization patterns of two putative mitochondrial proteins in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **55**, 131–133.
- Wu, X., Zarka, A. & Boussiba, S. (2000).** A simplified protocol for preparing DNA from filamentous cyanobacteria. *Plant Molecular Biology Reporter* **18**, 385–392.
- Yano, M., Terada, K. & Mori, M. (2003).** AIP is a mitochondrial import mediator that binds to both import receptor Tom20 and preproteins. *The Journal of Cell Biology* **163**, 45–56.
- Yarlett, N., Hann, A. C., Lloyd, D. & Williams, A. (1981).** Hydrogenosomes in the rumen protozoon *Dasytricha ruminantium* Schuberg. *Biochemical Journal* **200**, 365–372.
- Yarlett, N., Hann, A. C., Lloyd, D. & Williams, A. G. (1983).** Hydrogenosomes in a mixed isolate of *Isotricha prostoma* and *Isotricha intestinalis* from ovine rumen contents. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **74**, 357–364.

- Yarlett, N., Coleman, G. S., Williams, A. G. & Lloyd, D. (1984).** Hydrogenosomes in known species of rumen entodiniomorphid protozoa. *FEMS Microbiology Letters* **21**, 15–19.
- Yarlett, N., Martinez, M. P., Moharrami, M. A. & Tachezy, J. (1996).** The contribution of the arginine dihydrolase pathway to energy metabolism by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **78**, 117–125.
- Yarlett, N., Orpin, C. G., Munn, E. A., Yarlett, N. C. & Greenwood, C. A. (1986).** Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochemical Journal* **236**, 729–739.
- Yarlett, N., Lindmark, D. G., Goldberg, B., Moharrami, M. A. & Bacchi, C. J. (1994).** Subcellular localization of the enzymes of the arginine dihydrolase pathway in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **41**, 554–559.
- Yeh, Y.-M., Huang, K.-Y., Richie Gan, R.-C., Huang, H.-D., Wang, T.-C. V. & Tang, P. (2012).** Phosphoproteome profiling of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, in press.
- Young, J. C., Hoogenraad, N. J. & Hartl, F. U. (2003).** Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* **112**, 41–50.
- Yu, D., Wang, Y., Fang, X., Hu, S., Tang, P. & Fu, Y. (2012).** Acquisition of hydrogenosomal presequences: examples from *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiology Letters* **330**, 127–131.
- Yuh, Y. S., Liu, J. Y. & Shaio, M. F. (1997).** Chromosome number of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Parasitology* **83**, 551–553.
- Žárský, V., Tachezy, J. & Doležal, P. (2012).** Tom40 is likely common to all mitochondria. *Current Biology* **22**, 481–482.
- Zeng, X., Neupert, W. & Tzagoloff, A. (2007).** The metalloprotease encoded by *ATP23* has a dual function in processing and assembly of subunit 6 of mitochondrial ATPase. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 617–626.

- Zimorski, V. (2010).** Kompartimentierung des Energiestoffwechsels und Proteinimport in Hydrogenosomen bei *Trichomonas vaginalis*. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Zimorski, V., Major, P., Yu, R.-Y., Hoffmann, K., Pereira Brás, X., Tucci, S., Mentel, M., Gould, S. B., Henze, K. & Martin, W. F. (2012).** Evolutionary significance of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research* **23**, 64–68.
- Zubáčová, Z., Cimbůrek, Z. & Tachezy, J. (2008).** Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **161**, 49–54.
- Zwart, K. B., Goosen, N. K., van Schijndel, M. W., Broers, C. A. M., Stumm, C. K. & Vogels, G. D. (1988).** Cytochemical localization of hydrogenase activity in the anaerobic protozoa *Trichomonas vaginalis*, *Plagiopyla nasuta* and *Trimyema compressum*. *Journal of General Microbiology* **134**, 2165–2170.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. William Martin für die Möglichkeit der Promotion und für sein entgegengebrachtes Interesse an meinen Projekten sowie die Bereitstellung des interessanten Themas. Ich bedanke mich ebenfalls für die exzellenten Arbeitsbedingungen und wissenschaftlichen Kontakte.

Prof. Dr. Tal Dagan und Dr. Karina Stucken danke ich für die Hilfsbereitschaft in Bioinformatik und im Labor zu Themen rund um Cyanobakterien sowie ausgezeichnete Zusammenarbeit in der Lehre.

Ich danke PD Dr. Katrin Henze für die Übernahme des Korreferats und für Hilfe bei organisatorischen Angelegenheiten.

Dr. Sven B. Gould danke ich für zahlreiche innovative Vorschläge, Ideen und Inspirationen, die den Umfang und die Qualität meiner Arbeit bereichern haben, sowie für seinen Einsatz bei der Modernisierung und Erweiterung der Laborausstattung.

Ich danke Dr. Verena Zimorski für ihre stetige Hilfsbereitschaft und themenbezogenen Diskussionen sowie konstruktive Kritik. Auch in laborsicherheitstechnischen Fragen war sie stets engagiert und in der Lehre vorbildlich.

Ich danke Dr. Xavier Pereira Brás für hilfreiche Ratschläge im Laboralltag.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Büronachbarn Ovidiu Popa, Houda El-Haddad und Re-Young Yu für die angenehme Atmosphäre außerhalb des Labors.

Ich danke Kathrin Hoffmann, Kai Ming Cheung, Gary Kusdian, Jörn Habicht und Harald Preisner für die Hilfe im Labor.

Ich danke dem ganzen Institut für Molekulare Evolution und dem Institut für Genomische Mikrobiologie für die schöne gemeinsame Zeit während meiner gesamten Promotion. Sowohl im Arbeitsalltag im Labor, als auch bei Konferenzen, Betriebsausflügen und den Weihnachtsfeiern.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel verfasst zu haben. Verwendete Quellen wurden kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde bei keinen anderen Institutionen eingereicht und es wurden bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.