



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Untersuchung N-terminaler Motive und deren
Bedeutung für den Proteinimport in
Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Kathrin Hoffmann

aus Dinslaken

Düsseldorf, Juli 2014

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
Korreferentin: Prof. Dr. Laura Rose

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Oktober 2014

Publikationen:

Zimorski V, Major P, Hoffmann K, Pereira Bras 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.

Zimorski V, Major P, Yu R-Y, Hoffmann K, Pereira Bras 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:

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.

Zimorski V, Major P, 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.

Zimorski V, Major P, 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.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	2
3. Einleitung	3
3.1. Organellen mitochondrialen Ursprungs	3
3.2. Proteinimport der Mitochondrien	8
3.3. Proteinimport der Hydrogenosomen und Mitosomen.....	17
3.4. Ziele dieser Dissertation.....	25
4. Material und Methoden	27
4.1. Chemikalien	27
4.2. Enzyme.....	27
4.3. Antikörper	27
4.4. Antibiotika.....	27
4.5. Oligonukleotide	28
4.6. Reagensätze	28
4.7. Vektoren.....	28
4.8. Kulturen	29
4.8.1. <i>Trichomonas vaginalis</i>	29
4.8.2. Anzucht von <i>Trichomonas vaginalis</i>	29
4.8.3. Transfektion von <i>Trichomonas vaginalis</i> durch Elektroporation.....	29
4.8.4. Isolierung von Hydrogenosomen aus <i>Trichomonas vaginalis</i>	30
4.8.5. Fluoreszenzmikroskopie.....	30
4.8.6. <i>Escherichia coli</i>	31
4.8.7. <i>Bacillus subtilis</i>	31
4.8.8. Transformation von <i>Bacillus subtilis</i>	32
4.8.9. Isolierung der Subtiligase aus <i>Bacillus subtilis</i>	32
4.9. Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	33
4.9.1. Isolierung von genomischer DNA aus <i>Trichomonas vaginalis</i>	34
4.9.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
4.9.3. Klonierung über Restriktionsschnittstellen	35
4.9.4. Sequenzierung von DNA.....	36
4.10. Arbeiten mit Proteinen.....	36
4.10.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	36
4.10.2. Separation von Hydrogenosomen in Membranen und Matrix	36
4.10.3. Proteasebehandlung der Hydrogenosomen	37
4.10.4. Präzipitation von Proteinen durch Aceton/Trichloressigsäure.....	37

4.10.5.	Elektrophoretische Trennung von Proteinen (SDS-PAGE)	38
4.10.6.	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	38
4.10.7.	Western Blot und Immunodetektion	38
4.10.8.	Tryptische Spaltung von Proteinen	39
4.10.9.	Proteinsequenzierung im Massenspektrometer.....	40
4.10.10.	N-terminale Markierung von hydrogenosomalen Matrixproteinen mittels Subtiligase	40
5.	Ergebnisse.....	44
5.1.	Globale Analyse der N-Termini reifer hydrogenosomaler Matrixproteine	44
5.1.1.	Expression und Isolierung der Subtiligase.....	44
5.1.2.	Proteinsequenzierung der Subtiligase im Massenspektrometer	47
5.1.3.	Experimenteller Nachweis der generellen Anwendbarkeit der gewählten Methode..	49
5.1.4.	N-terminale Biotinylierung hydrogenosomaler Matrixproteine.....	50
5.2.	Untersuchung der Konformationsabhängigkeit des hydrogenosomalen Proteinimports.....	53
5.2.1.	Verifizierung der DHFR-Lokalisation in <i>T. vaginalis</i>	53
5.2.2.	Kombination von N-terminalen und internen Importsignalen.....	54
5.2.3.	Lokalisation der TrxRh1 in An- und Abwesenheit ihrer hydrogenosomalen Transitsequenz.....	56
5.2.4.	Importkompetenz der hydrogenosomalen Transitsequenz der TrxRh1	58
6.	Diskussion.....	61
6.1.	Globale Analyse des hydrogenosomalen N-Proteoms	62
6.2.	Abhängigkeit des Proteinimports von der Konformation der Proteine	74
6.3.	N-terminale Importsequenzen vs. interne Signale	79
6.4.	Fazit und Ausblick.....	91
7.	Literaturverzeichnis.....	93
8.	Anhang	112
8.1.	MS-Sequenzierungen	112
8.2.	Immunodetektionen zur Überprüfung der isolierten Fraktionen.....	114
8.3.	Lokalisation von HTS*DHFR In Lysosomen.....	115
9.	Abkürzungsverzeichnis.....	116

1. Zusammenfassung

Mitochondrien, Hydrogenosomen und Mitosomen sind Organellen mitochondrialen Ursprungs, die auf einen gemeinsamen, durch ein einziges Endosymbiose-Ereignis entstandenen Vorläufer zurückzuführen sind. Während der Etablierung des Endosymbionten als Zellorganell fand endosymbiotischer Gentransfer in den Zellkern des Wirtes statt, so dass es bei Mitosomen und Hydrogenosomen zu einem vollständigen Verlust und bei Mitochondrien zu drastischen Reduktionen des Organellengenoms kam. Als Resultat entwickelten sich Proteinimport-Mechanismen, um die kerncodierten Proteine nach ihrer Synthese im Cytosol in die Organellen zu importieren. Während die komplexe, modular aufgebaute Import-Maschinerie der Mitochondrien bereits umfassend untersucht wurde, ist das Wissen über den hydrogenosomalen Proteinimport vergleichsweise limitiert. Etwa die Hälfte der hydrogenosomalen Proteine besitzt analog zu den mitochondrialen Matrixproteinen ebenfalls N-terminale Präsequenzen. Diese scheinen aber nicht immer essentiell für den Proteinimport zu sein, neuere Studien konnten belegen, dass viele hydrogenosomale Proteine interne Importsignale enthalten und auch in Abwesenheit ihrer Präsequenz importiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten weitere Hinweise auf das häufige Vorkommen von internen Importsignalen erlangt werden.

Lokalisationsstudien mittels Immunodetektionen und Immunofluoreszenzassays zeigten, dass die bislang als essentiell angesehene N-terminale Präsequenz der TrxRh1 nicht für den Import notwendig ist, das Protein wurde auch nach Deletion der Präsequenz in der hydrogenosomalen Fraktion detektiert. Die Präsequenz enthält trotzdem Targeting-Informationen, da ein Fusionsprotein aus dieser Präsequenz und dem cytosolischen Protein GAPDH in der hydrogenosomalen Membran lokalisiert werden konnte. Außerdem konnte durch ein weiteres Fusionsprotein aus einer ein internes Importsignal beinhaltenden Proteindomäne der SCSa und dem cytosolischen Protein mDHFR nachgewiesen werden, dass dieses interne Signal ausreichend Importinformationen enthält, um ein Reporterprotein in die Matrix der Hydrogenosomen zu importieren. Die im Vergleich zu den mitochondrialen Präsequenzen kürzeren hydrogenosomalen Transitsequenzen sind folglich oft nicht essentiell, könnten aber eine unterstützende Funktion für das Targeting der Proteine an die Organellen haben. Interne Signale kommen häufiger als erwartet vor. Es erscheint denkbar, dass die Unterschiede im Proteinimport von Mitochondrien und Hydrogenosomen größer sind als angenommen und sich auf Basis einer gemeinsamen Grundlage des Vorläufers verschiedene Organellen-spezifische Import-Systeme entwickelt haben.

2. Abstract

Organelles of mitochondrial origin like mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes share a common ancestor that evolved from a single endosymbiotic event. Endosymbiotic gene transfer to the nucleus of the host cell, leading to a complete loss of the hydrogenosomal and mitosomal genome and to a highly reduced mitochondrial genome, accompanied the evolution of the former endosymbiont as an organelle. As a consequence of this gene transfer protein import machineries evolved to import the nuclear encoded proteins after their synthesis in the cytosol into the organelles. The complex, modular designed import machinery of mitochondria has been studied comprehensively, but knowledge about the import mechanisms of hydrogenosomes and mitosomes is still scarce. Approximately half of the hydrogenosomal proteins carry N-terminal presequences like mitochondrial matrix proteins. Their importance for the hydrogenosomal protein import remains unclear. Recent studies have demonstrated the presence of internal import signals within hydrogenosomal proteins which are also imported into the organelles in absence of their N-terminal presequence. This dissertation revealed further evidence for the frequent appearance of internal import signals.

Studies to determine the distribution of TrxRh1 within the cell by immunodetections and immunofluorescence assays revealed that the N-terminal presequence of TrxRh1 up to now considered being essential is actually not necessary for import. Even in absence of the presequence TrxRh1 was detected in the hydrogenosomal fraction. Nevertheless the presequence seems to be involved in protein targeting demonstrated by the localization of a fusion protein of the hydrogenosomal targeting sequence of TrxRh1 and the cytosolic protein GAPDH within the hydrogenosomal membranes. A second fusion protein build of a protein domain of SCSa containing an internal import signal and the cytosolic protein mDHFR verified that this internal signal contains enough import information to target a cytosolic protein to the matrix of the hydrogenosomes. Thus the short hydrogenosomal targeting sequences compared to mitochondrial presequences are often not necessary for protein import, but could have supportive function in protein targeting to the organelles. Internal signals are more common than expected. It seems possible that there are larger differences in protein import mechanisms between mitochondria and hydrogenosomes than expected which could be explained by the development of specific import machineries for each organelle based on a common background of the ancestral cell.

3. Einleitung

3.1. Organellen mitochondrialen Ursprungs

Alle lebenden Organismen lassen sich in drei Domänen einteilen: Eubakterien, Archaeen und Eukaryoten (Woese et al. 1990). Der Ursprung der Eukaryoten ist ein zentrales Thema der Evolutionsbiologie. Umfassende Studien zu diesem Thema konnten zeigen, dass eukaryotische Genome sowohl eubakterielle als auch Archaea-typische Einflüsse aufweisen (Rivera et al. 1998; Esser et al. 2004; Yutin et al. 2008). Obwohl viele Eigenschaften der Eukaryoten somit auf bakterielle Ursprünge zurückzuführen sind, sind Eukaryoten komplexer und weisen eine Vielzahl von spezifischen Charakteristika auf. Dazu zählen vor allem ein ausgeprägtes Endomembransystem und damit einhergehend auch die Kompartimentierung von Stoffwechselprozessen in Membran-umschlossene Zellorganellen, deren endosymbiotische Entstehung möglicherweise eine Art Katalysator für die spezifische Entwicklung der Eukaryoten war (Martin et al. 2001). Eines dieser Organellen ist das Mitochondrium. Hinweise auf einen endosymbiotischen Ursprung liefert die das Organell umgebende Doppelmembran, deren innere Membran Cardiolipin enthält, ein charakteristisches bakterielles Lipid (Shiflett und Johnson 2010). Durch Sequenzierung mitochondrialer Genome und anschließende, phylogenetische Analysen konnte nachgewiesen werden, dass der ursprüngliche Endosymbiont eng mit den α -Proteobakterien verwandt ist (Yang et al. 1985). Die Frage nach der Identität der Wirtszelle wird bis heute kontrovers diskutiert.

Die sogenannte Archezoa-Theorie postuliert, dass der Wirt ein amitochondrialer Eukaryot war, der mit Ausnahme von Mitochondrien bereits alle eukaryotischen Eigenschaften und subzelluläre Strukturen (Nukleus, endoplasmatisches Retikulum, Flagellen, Cytoskelett) aufwies. Dieser eukaryotische Vorläufer soll durch Ausbildung eines Nukleus und eines primitiven Cytoskeletts aus einem gemeinsamen Vorläufer von Archaeen und Eukaryoten hervorgegangen sein. Ein Nachfahre dieser als Archezoa bezeichneten Organismen konnte durch Endocytose eines Eubakteriums Mitochondrien entwickeln, die Etablierung des Endosymbionten als eigenständiges Organell wäre durch die Anwesenheit der eukaryotischen Strukturen deutlich vereinfacht (Cavalier-Smith 1989; Margulis et al. 2006; de Duve 2007; Cavalier-Smith 2009).

Eine dazu gegensätzliche Theorie geht davon aus, dass die Wirtszelle zu den Prokaryoten gehörte und alle eukaryotischen Eigenschaften und Strukturen erst als Folge der Endosymbiose entstanden (Martin 2010). Martin und Müller postulierten 1998 die

sogenannte Wasserstoff-Hypothese, die ein anaerobes, autotrophes, methanogenes Archaeobakterium als Wirtszelle vorschlägt. Dieser Wirt hat ein anaerobes, heterotrophes, Wasserstoff-produzierendes Eubakterium aufgenommen, da Wasserstoff und CO₂ als Substrate zur Methanbildung benötigt wurden. Der Endosymbiont konnte die organischen Substrate des Wirts zur ATP-Gewinnung durch Fermentierung nutzen und setzte dabei Wasserstoff und CO₂ als Nebenprodukte frei (Martin und Müller 1998). Eine Änderung der äußeren Umstände könnte anschließend zu erhöhtem Selektionsdruck geführt haben, so dass die Wirtszelle von ihrem Endosymbionten abhängig wurde. Durch endosymbiotischen Gentransfer wurden anschließend Gene des Symbionten in den Zellkern des Wirts übertragen, so dass dieser als Zellorganell etabliert wurde (Martin et al. 1993; Martin und Herrmann 1998). Die übertragenen Gene wurden dabei vermutlich zunächst kopiert, so dass eventuelle Fehler oder Genverluste bis zur Etablierung einer intakten Kopie des Gens im Nukleus ausgeglichen werden konnten (Allen 2003). Chloroplasten sind somit auf einst freilebende Cyanobakterien zurückzuführen, die durch ein endosymbiotisches Ereignis zu Kompartimenten wurden, in denen die Sauerstoff-produzierende Photosynthese abläuft (Gould et al. 2008). Mitochondrien gehen auf α -Proteobakterien zurück, die jetzt als Organellen zur sauerstoff-abhängigen und -unabhängigen Spaltung von Pyruvat dienen (Tielens et al. 2002; van der Giezen 2009). Beide Organellen besitzen noch ein eigenes Genom, das im Vergleich zu den freilebenden Vorläufern aber durch den endosymbiotischen Gentransfer stark reduziert wurde (Timmis et al. 2004).

Eine erste Erstellung eines eukaryotischen Stammbaums basierend auf tRNA- und Elongationsfaktor-Proteinsequenzen ordnete drei divergierende Abzweigungen an der Basis des Stammbaums ein. Die Trichomonaden, Diplomonaden und Microsporidien galten als primitive amitochondriale Eukaryoten, die bereits vor der Aufnahme der Mitochondrien entstanden (Sogin 1991). *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) ist ein einzelliger Eukaryot, der im Urogenitaltrakt des Menschen parasitiert. Der flagellierte Protist ist der Erreger der Trichomoniasis, der weltweit häufigsten nicht-viralen, sexuell übertragbaren Krankheit (Petrin et al. 1998; Schwebke und Burgess 2004). In einer weiteren Art der Trichomonaden, *Tritrichomonas foetus*, wurden 1973 von Lindmark und Müller Organellen entdeckt, die zunächst nicht in Verbindung mit bereits bekannten Organellen gebracht wurden, da *in vitro* keine mitochondrialen oder peroxisomalen Aktivitäten in *Trichomonas*-Zellextrakten nachgewiesen werden konnten (Lindmark und Müller 1973). Zunächst wurde angenommen, dass das Organell nur durch eine Membran umgeben ist, elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten letztendlich aber eine Doppelmembran identifizieren (Honigberg et al. 1984). Müller und Kollegen konnten schließlich nachweisen, dass diese Organellen am Energiestoffwechsel der Zellen beteiligt sind und mittels fermentativer Umsetzung von

Pyruvat ATP durch Substratkettenphosphorylierung produzieren. Durch diesen Prozess entsteht molekularer Wasserstoff (engl. *hydrogen*), was zur Benennung der Organellen als Hydrogenosomen führte (Müller 1993).

Da Hydrogenosomen kein eigenes Genom enthalten, wurden die Kern-Genome der Organismen verwendet, um die Herkunft der Hydrogenosomen durch phylogenetische Analysen zu untersuchen (Shiflett und Johnson 2010). Erste Hinweise auf eine mögliche Verwandtschaft der Hydrogenosomen mit den Mitochondrien lieferte die Identifizierung von für Hitzeschockproteine codierenden Genen, die große Ähnlichkeit mit den mitochondrialen Hitzeschockproteinen aufwiesen. Die sogenannten Chaperonin-Gene gehören zu den stark konservierten mitochondrialen Genen und sind deshalb geeignete Kandidaten für phylogenetische Analysen (Gupta 1995). Die Chaperonine Cpn60, Cpn10 und Hsp70 sind in den meisten Eukaryoten konserviert, so dass der Nachweis von Homologen im Genom von *T. vaginalis*, die eine monophyletische Gruppe mit den Chaperoninen der Mitochondrien und der α -Proteobakterien bilden, dafür spricht, dass Trichomonaden einst den mitochondrialen Endosymbionten enthalten haben (Horner et al. 1996; Bui et al. 1996; Germot et al. 1996; Roger et al. 1996). Weitere Nachweise der Verwandtschaft konnten durch die Feststellung erbracht werden, dass beide Organellen einen ähnlichen Proteinimport-Mechanismus benutzen. Viele hydrogenosomale Proteine tragen wie mitochondriale Matrixproteine N-terminale Verlängerungen, die in den Import dieser Proteine involviert sind (Bradley et al. 1997; Plümper et al. 1998; Clemens und Johnson 2000). Durch *in vitro* Experimente konnte außerdem nachgewiesen werden, dass diese Sequenzen in der Lage sind, ein Markerprotein in Mitochondrien zu importieren (Häusler et al. 1997). Außerdem konnte ein Mitglied der *mitochondrial carrier family* in *Trichomonas* identifiziert werden, was dafür spricht, dass auch interne Importsignale in *T. vaginalis* genutzt werden (Dyall und Johnson 2000; Pfanner und Geissler 2001). Auch die Identifizierung und Charakterisierung einer NADH Dehydrogenase in den Hydrogenosomen von *T. vaginalis*, die in Mitochondrien Teil der Atmungskette ist, verstärkte die Hinweise darauf, dass es sich bei Mitochondrien und Hydrogenosomen um zwei verschiedene Formen des gleichen Organells handelt (Embley et al. 2003; Hrdý et al. 2004). Alle weiteren Komplexe der inneren mitochondrialen Membran fehlen allerdings. Die innere hydrogenosomale Membran bildet im Gegensatz zu Mitochondrien keine Cristae aus und enthält keine Cytochrome (Bui et al. 1996).

Wasserstoff-produzierende Organellen konnten nicht nur in Trichomonaden, sondern in diversen phylogenetisch verschiedenen Eukaryoten, unter anderem in Ciliaten (z.B. *Nyctotherus ovalis*), Pilzen (Chytridiomyceten, z.B. *Neocallimastix frontalis*) und weiteren Taxa der Excavata gefunden werden (van der Giezen 2009). Diese phylogenetische Verteilung über viele verschiedene Abstammungslinien spricht dafür, dass diese Organellen

mehrfach unabhängig voneinander entstanden sind, dabei aber alle auf einen gemeinsamen Vorläufer zurückgehen (Embley und Hirt 1998). Die unterschiedliche Entwicklung der verschiedenen Arten der Mitochondrien spricht für eine Anpassung an verschiedene ökologische Nischen (Shiflett und Johnson 2010). Weitere phylogenetische Analysen der Microsporidien deckten ein Artefakt der bioinformatischen Analysen von stark divergierenden Genen auf (*long branch attraction*, LBA). Nach Ausschluss der LBA aus den Analysen konnten die vorher basalen Microsporidien in der Gruppe der Fungi eingeordnet werden (Hirt et al. 1999). *T. vaginalis* und *G. lamblia* hingegen wurden auch nach Ausschluss von LBA weiterhin als sehr früh divergierende Eukaryoten eingeordnet, unklar bleibt aber die genaue Positionierung der sogenannten Wurzel (engl. *root*) des eukaryotischen Stammbaums (Embley und Martin 2006). Da es sich bei den Hydrogenosomen aber um Organellen mitochondrialen Ursprungs handelt, konnte die Bezeichnung amitochondriale Eukaryoten nicht mehr aufrecht erhalten werden. Alle Eukaryoten enthalten Organellen mitochondrialen Ursprungs, so dass der Ursprung dieser Organellen auf den Ursprung der Eukaryoten zurückdatiert werden kann (Embley und Martin 2006).

Da die verschiedenen Formen der Mitochondrien auf einen gemeinsamen Ursprung zurückzuführen sind, werden sie mittlerweile als Organellen mitochondrialen Ursprungs (*organelles of mitochondrial origin*) bezeichnet. Es werden fünf verschiedene Klassen unterschieden, Abbildung 3.1 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Klassen und die entsprechenden Kriterien zu ihrer funktionellen Klassifizierung (Müller et al. 2012).

Klasse 1 bilden die aeroben Mitochondrien, die den "klassischen" Mitochondrien entsprechen. Diese Organellen produzieren ATP über oxidative Phosphorylierung und besitzen ein eigenes Genom, das vor allem für die Proteine der Elektronentransportkette codiert. Als terminaler Elektronenakzeptor dient molekularer Sauerstoff (O_2).

Anaerobe Mitochondrien bilden die Klasse 2 dieses Systems. Diese entsprechen typischen Mitochondrien, benutzen als Elektronenendakzeptor aber nicht O_2 , sondern eine meist endogen produzierte Komponente. Häufig ist Fumarat diese Komponente, aus der Succinat generiert wird. Es kann aber zum Beispiel auch Nitrat aus der Umgebung benutzt werden. Anaerobe Mitochondrien wurden bislang sowohl in Protisten als auch in multizellulären Organismen, die in Sauerstoff-armen oder -freien Umgebungen leben, wie beispielsweise Plathelminthen, parasitäre Nematoden, Invertebraten wie Muscheln und Schnecken oder Algen (*Euglena*) identifiziert (Tielens et al. 2002).

Organellen mitochondrialen Ursprungs

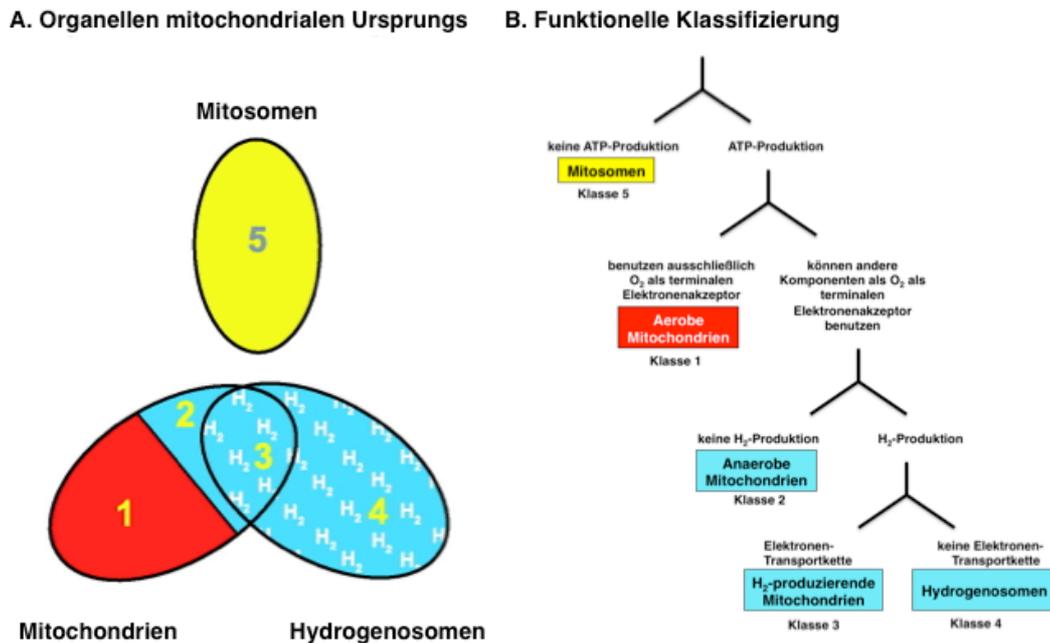


Abbildung 3.1: Organellen mitochondrialen Ursprungs. **A** Übersicht der Organellen mitochondrialen Ursprungs, gruppiert nach funktionellen Kriterien (Klasse 1-5). Klasse 1, das klassische aerobe Mitochondrium, das Sauerstoff als Elektronenendakzeptor nutzt; Klasse 2, ein anaerob funktionierendes Mitochondrium, das einen endogen produzierten terminalen Elektronenakzeptor (z.B. Fumarat) nutzt; Klasse 3, ein Wasserstoff-produzierendes Mitochondrium (H_2), das neben der Elektronentransportkette eine Hydrogenase besitzt und so Protonen als terminalen Elektronenakzeptor nutzen kann; Klasse 4, Hydrogenosomen, anaerob funktionierende ATP-produzierende Organellen mitochondrialen Ursprungs, die Protonen als terminale Elektronenakzeptoren nutzen können, wodurch molekularer Wasserstoff entsteht; Klasse 5, Mitosomen, Organellen mitochondrialen Ursprungs, die kein ATP produzieren. Rot O_2 -Verbrauch während der ATP-Produktion, blau ATP-Produktion ohne O_2 -Verbrauch, gelb keine Beteiligung des Organells an der ATP-Produktion. **B** Kriterien zur funktionellen Klassifizierung der Organellen mitochondrialen Ursprungs. Abbildung modifiziert nach Müller et al. 2012.

Eine weitere Form der Mitochondrien sind Wasserstoff-produzierende Mitochondrien (Klasse 3). Sie besitzen zusätzlich zu einer Elektronen-pumpenden Elektronentransportkette eine (Fe)-Hydrogenase, als terminaler Elektronenakzeptor dienen anstelle von O_2 Protonen, so dass molekularer Wasserstoff (H_2) produziert wird. Diese Form der Mitochondrien bildet eine Art Intermediat zwischen klassischen Mitochondrien und Hydrogenosomen und ist ein Beispiel dafür, dass die Produktion von molekularem Wasserstoff nicht zwangsläufig mit Hydrogenosomen assoziiert sein muss. Der Ciliat *Nyctotherus ovalis* besitzt H_2 -produzierende Mitochondrien, die zunächst als Hydrogenosomen mit einem eigenen Genom galten (Akhmanova et al. 1999; Boxma et al. 2005).

Hydrogenosomen (Klasse 4) sind anaerobe Formen der Mitochondrien, die Pyruvat zu Acetat, CO₂ und molekularem Wasserstoff fermentieren und so ATP durch Substratkettenphosphorylierung produzieren, wobei Protonen als Elektronenendakzeptoren dienen. Die Organellen besitzen kein eigenes Genom und keine Elektronentransportkette. Hydrogenosomen wurden bislang in vielen anaeroben Parasiten und frei lebenden Organismen innerhalb der Trichomonaden, Ciliaten, Chytridiomyceten und weiteren Taxa innerhalb der Excavata beobachtet (van der Giezen 2009).

Mitosomen (Klasse 5) sind die einzigen Formen der Mitochondrien, die nicht an der ATP-Produktion beteiligt sind. Die stark reduzierten Organellen besitzen keine Elektronentransportkette, sie benutzen keine Elektronenakzeptoren und produzieren auch keinen Wasserstoff. Mitosomen beinhalten außerdem kein eigenes Genom. Die Hauptfunktion der Organellen besteht in der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern (FeS-Clustern; (Tovar et al. 2003; Goldberg et al. 2008)). Außerdem scheinen sie für die Sulfat-Aktivierung verantwortlich zu sein (Mi-ichi et al. 2011). Mitosomen konnten in anaeroben oder microaerophilen Organismen der Archamoeba (*Entamoeba histolytica*), Diplomonaden (*Giardia intestinalis*), Microsporidien (*Encephalitozoon cuniculi*) und Ampicomplexa (*Cryptosporidium parva*) gefunden werden (Lithgow und Schneider 2010).

Da Mitosomen kein ATP produzieren, ist die Synthese und Formation von FeS-Clustern die einzige Aufgabe der Organellen mitochondrialen Ursprungs, die sowohl Mitochondrien als auch Hydrogenosomen und Mitosomen gemeinsam haben (Shiflett und Johnson 2010).

3.2. Proteinimport der Mitochondrien

Aufgrund ihres endosymbiotischen Ursprungs sind Mitochondrien von einer Doppelmembran umgeben. Die Organellen können so in vier verschiedene Subkompartimente eingeteilt werden: Die Doppelmembran besteht aus der äußeren und der inneren Membran, zwischen denen der Intermembranraum liegt. Die Matrix im Inneren der Organellen wird durch die Membranen umschlossen (Wiedemann et al. 2004). Die Etablierung des ehemaligen Symbionten als Zellorganell ging mit einem teilweisen Verlust des eigenen Genoms einher, so dass der Großteil der mitochondrialen Proteine kerncodiert ist (Doležal et al. 2006; Dudek et al. 2013). Das mitochondriale Genom enthält nur Informationen für 1% der etwa 1000 mitochondrialen Proteine in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Sickmann et al. 2003; Chacinska et al. 2009). Dabei handelt es sich vor allem um Untereinheiten der Atmungskette und der F₁F₀-ATPase Synthase (Dudek et al. 2013). Die im Nukleus der Zellen codierten Proteine werden an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert und müssen anschließend in die Mitochondrien importiert werden. Aufgrund dieser Anforderungen hat

sich im Verlauf der Anpassung des Endosymbionten an seine Funktion als Zellorganell eine komplexe Proteinimportmaschinerie entwickelt (Doležal et al. 2006). Diese ist hochspezifisch an die verschiedenen Bestimmungsorte der Proteine innerhalb des Organells angepasst. Der Proteinimport in Mitochondrien wurde am umfassendsten an den Mitochondrien der Bäckerhefe *S. cerevisiae* untersucht. Die identifizierten, am Proteinimport beteiligten Komponenten konnten aber in den meisten höher entwickelten Eukaryoten nachgewiesen werden (Dudek et al. 2013). Der Import von mitochondrialen Proteinen erfolgt in der Regel post-translational, es gibt aber auch Ausnahmen wie z.B. Fumarase, deren Import co-translational erfolgt (Yogev et al. 2007).

Um die Translokation in die Organellen zu ermöglichen, tragen die Proteine Signalsequenzen, die importrelevante Informationen enthalten. Dabei kann es sich um N- oder C-terminale Verlängerungen, sogenannte Präsequenzen, oder interne Signale handeln. Die meisten Matrixproteine besitzen N-terminale Präsequenzen (*mitochondrial targeting sequence*, MTS), die aus amphipatischen α -helikalen Segmenten bestehen und eine positive Nettoladung aufweisen. Die durchschnittliche Länge der Präsequenzen beträgt 15 bis 55 Aminosäuren, die Länge kann aber zwischen weniger als 10 bis hin zu 100 Aminosäuren variieren (Chacinska et al. 2009; Voegtle et al. 2009). Eher selten sind C-terminale Präsequenzen, die Helicase Hmi1 wird durch eine Präsequenz-ähnliche C-terminale Verlängerung in die Mitochondrien importiert (Lee et al. 1999). Viele Proteine der inneren und äußeren Membranen und lösliche Proteine des Intermembranraums besitzen keine prozessierbaren Präsequenzen, sondern beinhalten interne Importsignale innerhalb ihrer Proteinsequenz (Endo et al. 2011).

Der Großteil der mitochondrialen Proteine gelangt über die Translokase der äußeren Membran, den sogenannten TOM-Komplex (*translocase of the outer membrane*), in die Organellen (Abbildung 3.2). Anschließend werden die importierten Proteine mittels spezifischer Sortierungsmechanismen in die verschiedenen Subkompartimente weitergeleitet (Endo et al. 2011). Der TOM-Komplex gilt deshalb als generelles Eingangsportal der Mitochondrien (Chacinska et al. 2009). Darüber hinaus ist der Komplex aber auch für die Erkennung der an cytosolische Chaperone gebundene Substrate im Cytosol und deren Freisetzung aus diesen Komplexen zuständig, trägt zur Entfaltung der Proteine bei und vermittelt die Insertion einiger Membranproteine (Neupert und Herrmann 2007). Der 490-600 kDa große TOM-Komplex besteht aus sieben Komponenten: Tom40, ein integrales Membranprotein mit β -barrel (dt. Fass) Strukturen, ist als porenbildendes Protein die zentrale Komponente des Komplexes. Es liegt als Oligomer vor und bildet zwei bis drei Kanäle pro TOM-Komplex (Ahting et al. 2001; Model et al. 2008). Weitere Komponenten des Komplexes sind die Rezeptoren Tom20, Tom22 und Tom70. Tom20 und Tom70 sind als

Hauptrezeptoren für die Erkennung der Präproteine verantwortlich. Beide Proteine sind durch N-terminale Transmembransegmente in der äußeren Membran verankert und ragen mit hydrophilen Domänen in das Cytosol der Zellen hinein (Neupert und Herrmann 2007). Tom20 ist für die Erkennung von Proteinen mit N-terminalen Präsequenzen verantwortlich und besitzt eine Bindestelle für die hydrophobe Oberfläche der mitochondrialen Präsequenzen (Abe et al. 2000; Saitoh et al. 2007). Tom70 ist der Hauptrezeptor für Proteine mit internen Importsignalen. Durch elf Tetratricopeptid-*Repeat*-Motive innerhalb der cytosolischen Domäne des Rezeptors werden Vorläuferproteine mit internen Signalen erkannt. Durch Interaktion mit den cytosolischen Chaperonen, vor allem Hsp70, wird das Vorläuferprotein durch Bindung von ATP aus dem Chaperonkomplex entlassen (Neupert und Herrmann 2007). Tom20 und Tom70 unterscheiden sich also in ihrer Substratspezifität, überschneiden sich aber teilweise in ihrer Funktion und können sich gegenseitig auch partiell ersetzen (Neupert und Herrmann 2007). Tom22 ist ein weiterer wichtiger Bestandteil des TOM-Komplexes. Das Protein durchspannt die äußere Membran und besitzt eine stark negativ geladene N-terminale cytosolische Domäne und eine kurze C-terminale Domäne, die in den Intermembranraum ragt. Durch seine Membrandomäne spielt Tom22 eine wichtige Rolle für die oligomerische Organisation des TOM-Komplexes.

In Abwesenheit des Rezeptors konnte eine Dissoziation des Komplexes in kleinere Tom40-enthaltende Einheiten und eine starke Beeinflussung der mitochondrialen Biogenese beobachtet werden (van Wilpe et al. 1999; Meisinger et al. 2004). Tom22 bindet außerdem Tom20 an die zentrale Importpore. Tom20 und Tom70 erkennen ihre spezifischen Substrate und leiten sie an Tom22 weiter, über diesen Rezeptor erfolgt dann der Eintritt der Proteine in den Importkanal Tom40 (Chacinska et al. 2009). Weitere Bestandteile des TOM-Komplexes sind die sogenannten kleinen Tom-Proteine Tom5, Tom6 und Tom7, die eine Rolle in der Assemblierung und Stabilität des Komplexes spielen (Chacinska et al. 2009). Tom 6 und Tom7 haben antagonistische Funktionen. Tom6 stabilisiert den Komplex, Tom7 hingegen begünstigt die Dissoziation des Komplexes und fördert so die dynamische Organisation des Komplexes. Tom5 unterstützt die Assemblierung des TOM-Komplexes und ist an der Weiterleitung der Präproteine von Tom22 auf Tom20 beteiligt (Dietmeier et al. 1997; Model et al. 2001; Wiedemann et al. 2003).

Nachdem die zu importierenden Proteine über den TOM-Komplex in die Organellen gelangt sind, folgen sie abhängig von ihrem Zielkompartiment unterschiedlichen Importwegen.

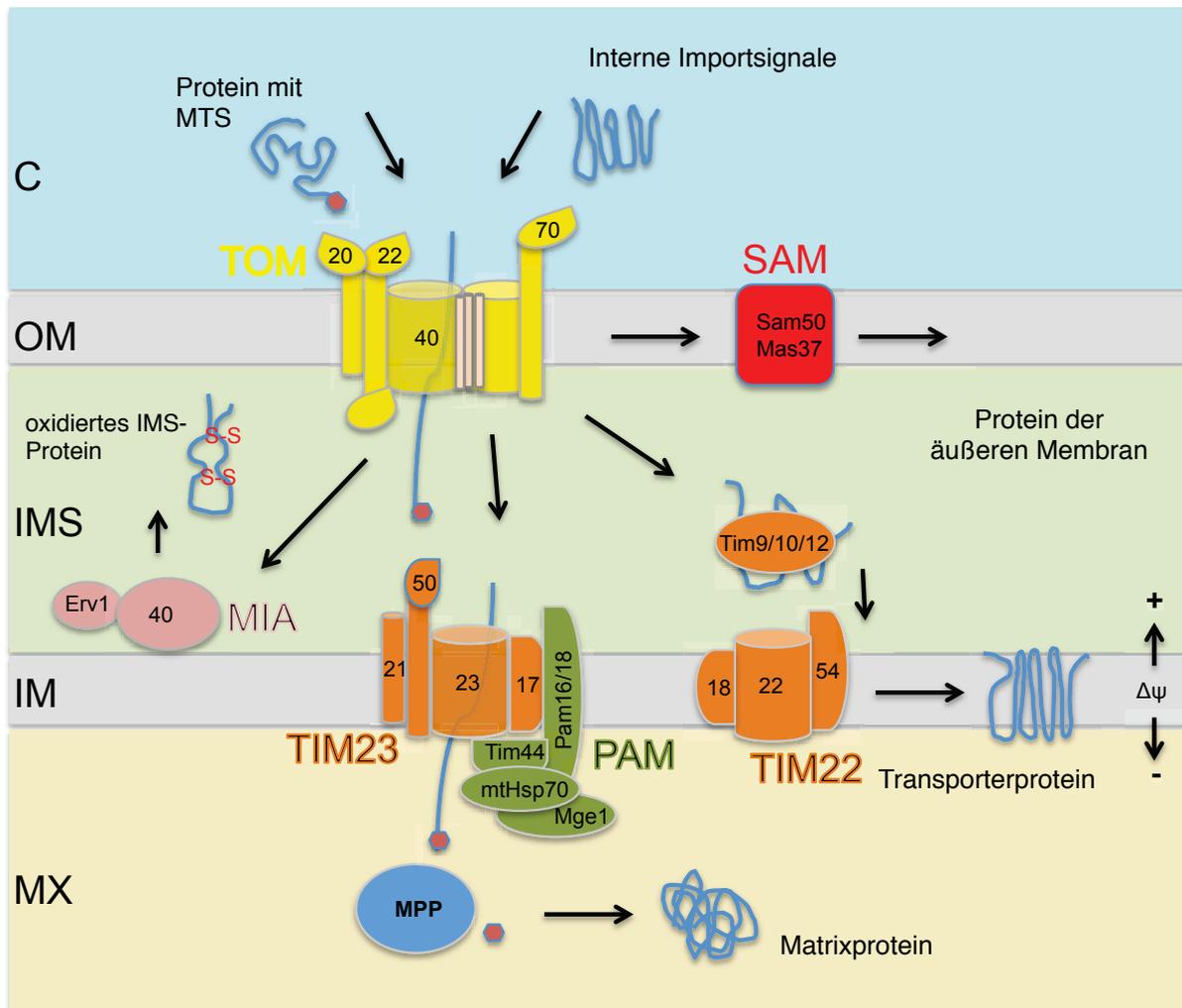


Abbildung 3.2: Schematische Übersicht über die wichtigsten Komponenten der Proteinimportmaschinerie der Mitochondrien. TOM (*translocase of the outer membrane*) ist die zentrale Importpore der äußeren Membran (*outer membrane*, OM) für fast alle mitochondrialen Proteine. Der Rezeptor Tom22 erkennt Proteine mit mitochondrialer Transitsequenz (MTS), Tom70 ist der Hauptrezeptor für Proteine mit internen Transitsignalen. Proteine mit MTS werden anschließend über die Präsequenz-Translokase der inneren Membran TIM23 in die Matrix (MX) importiert, wobei TIM23 mit dem Importmotor PAM (*Presequence translocase-associated motor*) zusammenarbeitet. Abschließend erfolgt die Prozessierung der MTS durch eine Protease (MPP) und die Faltung des reifen Matrixproteins. Transporterproteine mit internen Signalen werden durch kleine Tim-Proteine (Tim9/10/12) durch den Intermembranraum (*intermembrane space*, IMS) zu TIM22, der Transporter-Translokase der inneren Membran, geleitet und dort seitlich in die innere Membran (IM) entlassen. Proteine der äußeren Membran werden unter Beteiligung von Tom40 und des SAM-Komplexes (*sorting and assembly machinery*) in die äußere Membran integriert. Proteine des IMS, die Cysteine enthalten, werden nach Erreichen des IMS durch MIA (*mitochondrial intermembrane space and assembly*) oxidiert und verbleiben deshalb innerhalb des IMS. Detaillierte Beschreibung der verschiedenen Importwege siehe Text. Abbildung modifiziert nach Wiedemann et al. 2004 und Kulawiak et al. 2013.

Die innere Membran besitzt mit TIM23 und TIM22 zwei Translokasen (*translocase of the inner membrane*, TIM). Der TIM23-Komplex transportiert in Kooperation mit dem Importmotor PAM (*presequence translocase-associated motor*) alle Präsequenz-tragenden Matrix-Vorläufer, Proteine der inneren Membran und Proteine des Intermembranraums und wird deshalb als Präsequenz-Translokase bezeichnet (Neupert und Herrmann 2007; Chacinska et al. 2009). TIM23 arbeitet dabei mit dem TOM-Komplex und der Atmungskette der inneren Membran zusammen und nutzt mit dem Membranpotential und ATP zwei verschiedene Energiequellen (Chacinska et al. 2009). Der TIM23-Komplex besteht aus den Untereinheiten Tim23, Tim17, Tim21 und Tim50. Tim23 besitzt vier Transmembransegmente und bildet die Pore der Translokase (Meinecke et al. 2006; Alder et al. 2008). Tim17 ist eng mit Tim23 assoziiert und für den lateralen Einbau von Membranproteinen und die Kooperation mit PAM verantwortlich (Chacinska et al. 2005; Martinez-Caballero et al. 2006). Tim50 ist in der inneren Membran verankert und besitzt eine in den IMS ragende, als Rezeptor fungierende, Domäne (Mokranjac und Neupert 2005; Tamura et al. 2008). Sobald importierte Polypeptide die *trans*-Seite des TOM-Komplexes erreicht haben, werden sie von Tim50 erkannt und an Tim23 weitergeleitet (Neupert und Herrmann 2007). In Abwesenheit von Vorläuferproteinen sorgt Tim50 für die Beibehaltung des geschlossenen Zustand des Kanals (Meinecke et al. 2006). Tim21 besitzt ebenfalls eine in den Intermembranraumragende Domäne und ist für die Interaktion mit TOM und der Atmungskette der inneren Membran verantwortlich. Über Tim21 wird Tim23 an die Komplexe III und IV der Atmungskette gebunden und so der durch das Membranpotential $\Delta\psi$ angetriebene Proteinimport unterstützt (van der Laan et al. 2006; Dienhart und Stuart 2008). Das Membranpotential spielt eine wichtige Rolle für die Translokation von Präsequenz-enthaltenden Vorläuferproteinen über die innere Membran. Nach Erkennung und Weiterleitung eines Vorläuferproteins durch Tim21 auf Tim23 wird die Translokase durch das Membranpotential aktiviert. $\Delta\psi$ ist auf der Matrixseite negativ und übt so außerdem einen elektrophoretischen Effekt auf die positiv geladenen Präsequenzen der zu importierenden Proteine aus (Shariff et al. 2004; Meinecke et al. 2006; Krayl et al. 2007). Vorläuferproteine, die den TOM-Komplex verlassen haben, werden also über die IMS-Domänen von Tim50 und Tim23 an den TIM23-Komplex geführt und passieren unter Einfluss des Membranpotentials den Kanal der Translokase. Auf der Matrixseite der inneren Membran wirkt dann die zweite Energiequelle auf die importierten Proteine. PAM ist ein aus mehreren Untereinheiten aufgebauter Komplex, dessen zentrale Untereinheit das mitochondriale Hitzeschockprotein *heat shock protein 70* (mtHsp70) ist (Li et al. 2004). Das Chaperon mtHsp70 bindet an sich im Importprozess befindende Vorläuferproteine, sobald sie den TIM23-Kanal passiert haben und unterstützt deren Translokation in die Matrix der Organellen. Dieser Prozess benötigt die

Hydrolyse von ATP. Eine weitere Untereinheit von PAM ist der Nukleotidaustauschfaktor Mge1, der die Freisetzung des ADP von mtHsp70 fördert und so die erneute Bindung von ATP ermöglicht (Chacinska et al. 2009). Weitere Untereinheiten von PAM sind vier membrangebundene Co-Chaperone, welche die mtHsp70-Aktivität auf der Matrixseite von TIM23 regulieren. Tim44 ist in unmittelbarer Nähe des Importkanals lokalisiert und besitzt Bindestellen für mtHsp70, bindet selbst aber auch an ein sich im Importprozess befindendes Protein, sobald das Vorläuferprotein den Kanal verlässt (Krayl et al. 2007; Slutsky-Leiderman et al. 2007). Pam18 fördert über seine J-Domäne die ATPase-Aktivität von mtHsp70, Pam16 bildet einen stabilen Komplex mit Pam18 und kontrolliert dessen Aktivität (Kozany et al. 2004; Li et al. 2004; Mokranjac und Neupert 2005). Die vierte membrangebundene Untereinheit, Pam17, reguliert die Interaktion zwischen TIM23- und PAM-Untereinheiten, bevor das Vorläuferprotein importiert wird (Hutu et al. 2008; Popov-Celeketić et al. 2008). Die Translokation der Vorläuferproteine durch den Importkanal von TIM23 erfolgt also zunächst elektrophoretisch angetrieben durch das Membranpotential, sobald das Protein die Matrix erreicht, bindet Tim44 und leitet das Vorläuferprotein an mtHsp70 weiter. Durch Pam18 wird die ATP-Hydrolyse gefördert, es bildet sich eine enge Bindung zwischen Protein und Chaperon, so dass die Dissoziation von Tim44 erfolgt (Chacinska et al. 2009). Wie der Import der Vorläuferproteine durch mtHsp70 genau abläuft, kann durch zwei Hypothesen erklärt werden. Eine Möglichkeit ist, dass mtHsp70 durch Bindung an das Vorläuferprotein dessen Zurückrutschen in den Importkanal verhindert ("*trapping*"). Sobald das Protein durch Diffusion weiter in die Matrix der Organellen gelangt, bindet ein weiteres mtHsp70-Molekül, so dass die Importbewegung des Proteins weiter gefördert wird (Okamoto et al. 2002; Liu et al. 2003; Tamura et al. 2008). Es ist auch denkbar, dass über Tim44 an die Membran gebundenes mtHsp70 aktiv durch Änderung seiner Konformation zu importierende Proteine in die Matrix zieht ("*pulling*"; Chauwin et al. 1998). Funktionelle Studien an mtHsp70 Mutanten und die Entdeckung von Pam16, 17 und 18 als weitere Untereinheiten von PAM zeigten eine größere Komplexität des Proteinimport-Motors als angenommen, so dass es wahrscheinlich ist, dass der Translokationsprozess eine Kombination aus beiden Varianten ist (Krayl et al. 2007; Chacinska et al. 2009). Sobald das Protein vollständig in die Matrix importiert wurde, wird durch Mge1 die Dissoziation von mtHsp70 veranlasst, so dass die N-terminale Präsequenz durch die in der Matrix lokalisierte Protease MPP (*mitochondrial processing peptidase*) prozessiert und das Protein in seine reife Form gefaltet werden kann (Taylor et al. 2001; Chacinska et al. 2009).

Die zweite Translokase der inneren Membran ist TIM22. Transporterproteine der inneren Membran, die hydrophobe interne Sequenzbereiche enthalten, werden durch TIM22 importiert. Der TIM22-Komplex wird auch als Transporter-Translokase bezeichnet, da durch

diesen vor allem Transporter-Proteine und die Untereinheiten des TIM23-Komplexes importiert werden (Neupert und Herrmann 2007). Nach der Translokation der hydrophoben Transporter mittels TOM über die äußere Membran gelangen diese in den Intermembranraum und werden von einem Komplex aus kleinen Tim-Proteinen (Tim9-Tim10-Komplex) gebunden, um sie im wässrigen Milieu des IMS vor Aggregation zu schützen und zur TIM22-Translokase zu leiten (Endo et al. 2011). Die kleinen Tim-Proteine sind Polypeptide mit einer Größe von 8-12 kDa, die charakteristische Cystein-Motive und α -Helices enthalten, über die sie Hexamer-Strukturen mit einer Größe von etwa 70 kDa bilden (Neupert und Herrmann 2007). Durch Bindung an ein weiteres Tim-Protein, Tim12, kann der Tim9-Tim10-Tim12-Komplex an die Tim22-Translokase assoziieren und so das zu importierende Protein auf die Translokase übertragen (Endo et al. 2011). Der TIM22-Komplex ist ein etwa 300 kDa großer Komplex, der aus den drei Membranproteinen Tim22, Tim54 und Tim18 besteht (Neupert und Herrmann 2007). Tim22 ist die zentrale Komponente der Translokase und bildet insgesamt zwei Importkanäle aus (Kovermann et al. 2002; Rehling et al. 2003). Tim54 besitzt eine große in den Intermembranraum ragende Domäne, die als Bindestelle für den Tim9-Tim10-Tim12-Komplex dienen könnte. Die Funktion von Tim18 ist unbekannt, vermutlich spielt das Membranprotein eine Rolle in der Assemblierung der Translokase (Kerscher et al. 1997; Wagner et al. 2009). Der Import von Proteinen der inneren Membran durch TIM22 erfolgt abhängig vom Membranpotential, durch einen bislang unbekanntem Mechanismus werden die Vorläuferproteine seitlich aus der Translokase in die Lipidschicht der Membran entlassen und dort in ihre funktionelle Form assembliert (Rehling et al. 2003; Chacinska et al. 2009).

Viele Proteine der inneren Membran, die nur ein einzelnes Transmembransegment beinhalten, besitzen auch eine typische MTS und nutzen deshalb über die Präsequenz-Translokase TIM23 den sogenannten *stop transfer*-Importweg. Die meisten dieser betreffenden Proteine enthalten nur ein einzelnes Transmembransegment, das als Sortierungssignal dient, durch die Translokase erkannt wird und für den Arrest des Proteins im TIM23-Komplex sorgt. Der Kanal kann sich daraufhin seitlich öffnen und das Protein in die innere Membran entlassen. Der Mechanismus dieses Prozesses konnte noch nicht geklärt werden, die Untereinheit Tim17 scheint aber eine wichtige Rolle darin zu spielen (Chacinska et al. 2005).

Proteine der inneren Membran, die eine MTS und mehrere Transmembransegmente enthalten, benutzen den *conservative sorting*-Importweg in die Membran. Dabei wird die MTS des Proteins von TIM23 erkannt, so dass zunächst der Import in die Matrix der Mitochondrien erfolgt. Dort bindet mtHsp70 an die Proteine. Anschließend werden sie über einen noch ungeklärten Prozess durch Unterstützung des Membranpotentials in die innere

Membran exportiert. Bei Proteinen mit N-terminalen IMS-Domänen erfolgt die Insertion unterstützt durch Oxa1p (Hell et al. 1998). Aufgrund dieser speziellen exportähnlichen Richtung des Imports, die den prokaryotischen Vorläufern der Mitochondrien ähnelt, wird dieser Importweg konservativ genannt (Neupert und Herrmann 2007).

Bei Proteinen der äußeren Membran unterscheidet man zwischen zwei Hauptklassen von Membranproteinen. Typische β -*barrel* Proteine wie Tom40 sind durch mehrere Transmembransegmente in der Lipidphase verankert, wohingegen α -Helix Proteine durch ein hydrophobes α -helikales Segment verankert sind (Qiu et al. 2013). Die äußeren Membranen von endosymbiotisch entstandenen Organellen wie den Mitochondrien und Chloroplasten sind aufgrund ihres bakteriellen Ursprungs die einzigen Membranen der Eukaryoten, die β -*barrel*-Proteine enthalten. Zur Klasse dieser Membranproteine gehören u.a. Porin bzw. VDAC (*voltage dependend anion channel*) und Untereinheiten der Importmaschinerie selbst wie Tom40 und Sam50 (Neupert und Herrmann 2007). Zur Insertion und Assemblierung der β -*barrel* Proteine ist ein weiterer Komplex der äußeren Membran notwendig, die *sorting and assembly machinerie* (SAM; Wiedemann et al. 2003). Die Hauptkomponente dieses Komplexes ist Sam50 (Kozjak et al. 2003). Homologe dieses Proteins lassen sich ubiquitär in allen äußeren Membranen der Eukaryoten finden und auch in den Membranen von gram-negativen Bakterien (Omp85; (Voulhoux et al. 2003; Gentle et al. 2004). Sam50 besteht aus zwei Domänen, die beide stark konserviert sind. Das Protein besitzt eine N-terminale hydrophile Region, die in den Intermembranraum ragt und dort eine charakteristische Struktur ausbildet (POTRA, *polypeptide translocation associated*; Sánchez-Pulido et al. 2003). Außerdem besitzt Sam50 eine C-terminale β -*barrel* Domäne, die aus 14 bis 16 Transmembransegmenten besteht (Voulhoux et al. 2003). Weitere Komponenten von SAM sind Sam37 und Sam35, die an der cytosolischen Seite des Komplexes lokalisiert sind. Beide Proteine haben eine essentielle Funktion in der Insertion und Assemblierung von neu importierten β -*barrel*-Proteinen (Wiedemann et al. 2003; Milenkovic et al. 2004; Waizenegger et al. 2004). Diese werden zunächst durch den TOM-Komplex in den Intermembranraum importiert, dort durch die Anwesenheit von kleinen Tim-Proteinen vor Aggregation geschützt und zu SAM geleitet (Wiedemann et al. 2004). Durch SAM erfolgt dann die Insertion in die äußere Membran, die endgültige Assemblierung erfolgt mit Unterstützung der mitochondrialen Morphologie-Proteine Mdm12/MM1 (Meisinger et al. 2007).

Membranproteine der äußeren Membran mit α -helikalen Transmembransegmenten lassen sich durch die Position dieses Segments in N-terminal (*signal anchored*) und C-terminal (*tail anchored*) verankerte Proteine unterscheiden. Die Transmembrandomäne kann auch in der Mitte des Proteins lokalisiert sein (Chacinska et al. 2009; Schmidt et al. 2010). Die Rezeptoren Tom20 und Tom70 sind Beispiele für N-terminal verankerte Proteine. Diese

Gruppe der Membranproteine nutzen für ihre Insertion in die äußere Membran ein weiteres Membranprotein, das Protein *mitochondrial import 1* (Mim1; Becker et al. 2008; Popov-Čeleketić et al. 2008). Der Vorläufer von Tom22, einem C-terminal verankertem Protein, nutzt Tom-Rezeptoren und anschließend SAM, um in die äußere Membran inseriert zu werden (Stojanovski et al. 2007). Der Import von anderen C-terminal verankerten Proteinen scheint unabhängig von den Importkomplexen der äußeren Membran zu sein (Kemper et al. 2008; Meineke et al. 2008). Im Gegensatz zum Import der β -barrel Proteine sind die genauen Mechanismen zum Import der meisten α -helikalen Proteine noch weitestgehend ungeklärt, der Import scheint oft nicht über den Tom-Kanal abzulaufen (Schmidt et al. 2010).

Proteine, die im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert sind, können in lösliche Proteine und in Membran-gebundenen Proteine, die in den IMS ragen, unterteilt werden (Hewitt et al. 2014). Einige Proteine des IMS werden ebenfalls mit einer N-terminalen Präsequenz synthetisiert, die Importinformationen für eine Translokation in die Matrix enthält und so die Erkennung und Translokation des Proteins durch TOM und TIM23 ermöglicht (van Loon et al. 1986). Diese Proteine werden analog zum *Stop transfer*-Importweg der inneren Membranproteine importiert (Hewitt et al. 2014). Zusätzlich zu ihrer MTS besitzen IMS-Proteine ein hydrophobes Sortierungssignal. Die MTS wird zunächst auf der Matrixseite des TIM23-Komplexes durch die MPP prozessiert, wodurch das dann terminale hydrophobe Signal als eine Art Bremse für den Import wirkt und den Import in die Matrix verhindert (van Loon und Schatz 1987), anschließend wird das Protein seitlich aus TIM23 in die innere Membran freigesetzt. Durch Prozessierung der hydrophoben Sortierungssignale durch spezifische Proteasen, meist handelt es sich um die Protease der inneren Membran (*inner membrane protease*, IMP), können lösliche Proteine dann in den Intermembranraum entlassen werden. Wenn es sich um in der inneren Membran lokalisierte Proteine mit IMS-Domänen handelt, erfolgt keine Prozessierung des Importsignals, die hydrophobe Transmembrandomäne dient zur Verankerung in der Membran (Neupert und Herrmann 2007; Voegtle et al. 2012). Ein weiterer Mechanismus des Proteinimports in den Intermembranraum ist der sogenannte *oxidative folding*-Mechanismus. Viele Proteine des IMS sind sehr klein und enthalten charakteristische Cystein-Motive, über die sie intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden (Lutz et al. 2003). Durch die Charakterisierung von Mia40 konnte eine weitere Komponente der komplexen mitochondrialen Proteinimportmaschinerie identifiziert werden, die für den Import von IMS-Proteinen verantwortlich und Hauptkomponente des MIA (*mitochondrial intermembrane space and assembly*)-Importwegs ist (Chacinska et al. 2004). Sobald ein IMS-Vorläuferprotein den Intermembranraum erreicht, bindet Mia40 über eine hydrophobe Spalte an seiner Oberfläche und bildet durch ein redox-aktives Cystein-Prolin-Cystein (CPC)-Motiv eine Disulfidbrücke mit

einem Cystein des Vorläuferproteins aus (Dudek et al. 2013). Dadurch übt Mia40 gewissermaßen eine Rezeptorfunktion für Intermembranraum-Proteine aus (Chacinska et al. 2009). Der Komplex aus Vorläuferprotein und Mia40 begünstigt die Ausbildung von Disulfidbrücken während der Faltung der Vorläuferproteine durch einen Redox-Reaktionszyklus. Durch Oxidation der Vorläufer werden die Cysteine von Mia40 reduziert. Ein weiterer Bestandteil des MIA-Importwegs ist die Sulfhydryl-Oxidase Erv1, die als Elektronenakzeptor zur Reoxidation der Mia40-Cysteine fungiert. Diese Elektronen werden anschließend über Cytochrom C auf die Atmungskette und somit auf O₂ übertragen (Chacinska et al. 2004; Allen et al. 2005; Mesecke et al. 2005). Bekannte Beispiele für diesen Importweg sind Cytochrom C und die kleinen Tim-Proteine der mitochondrialen Importmaschinerie (Hewitt et al. 2014). MIA ist außerdem in der Lage, die Vorläufer der eigenen Komponenten zu importieren (Chacinska et al. 2009).

3.3. Proteinimport der Hydrogenosomen und Mitosomen

Hydrogenosomen und Mitosomen sind anaerobe Formen der Mitochondrien und gehen auf ein einziges Endosymbiose-Ereignis zurück. Deshalb werden diese Organellen auch als Organellen mitochondrialen Ursprungs bezeichnet (Müller et al. 2012). Im Gegensatz zu klassischen Mitochondrien enthalten Hydrogenosomen und Mitosomen kein eigenes Genom, im Verlauf der Etablierung des ehemaligen Endosymbionten als Organell wurden alle weiterhin benötigten Gene in das Kerngenom der Wirtszelle übertragen, so dass die Ausbildung von spezifischen Proteinimport-Mechanismen notwendig wurde (Clemens und Johnson 2000; Regoes et al. 2005). Die Entdeckung, dass Hydrogenosomen einen ähnlichen Proteinimport-Mechanismus wie Mitochondrien benutzen, trug entscheidend zur Aufklärung der Verwandtschaft der Organellen bei (Plümper et al. 1998). Hydrogenosomen wurden am umfassendsten in *Trichomonas vaginalis*, einem microaerophilen, humanpathogenem Protisten, untersucht. Im Gegensatz zu Mitochondrien ist das Wissen über den Proteinimport in Organellen mitochondrialen Ursprungs wie Hydrogenosomen und Mitosomen aber noch sehr limitiert.

Viele hydrogenosomale Proteine tragen wie mitochondriale Matrixproteine N-terminale Präsequenzen. Diese sind mit einer Länge von 4-24 Aminosäuren in der Regel deutlich kürzer als mitochondriale Präsequenzen (MTS), weisen aber ähnliche Charakteristika auf (Bradley et al. 1997; Dyall und Johnson 2000). Die hydrogenosomaln Präsequenzen (*hydrogenosomal targeting sequence*, HTS) bestehen vermehrt aus hydrophoben Aminosäuren und beginnen häufig mit den Aminosäuren MLS, die putative Restriktionsstelle der Präsequenzen wird durch ein Arginin an Position -2 oder -3 in Relation

zu dieser markiert (Bradley et al. 1997). Weitere konservierte Sequenzcharakteristika liegen allerdings nicht vor (Zimorski et al. 2013). Prozessierte HTS wurden an vielen hydrogenosomalen Proteinen identifiziert und charakterisiert, unter anderem an Ferredoxin (Johnson et al. 1990), α - und β -Untereinheiten der Succinyl-CoA-Synthethasen (Lahti et al. 1992; Lahti et al. 1994), Adenylat-Kinase (Länge et al. 1994), Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (Hrdý und Müller 1995a), Malatenzym (Hrdý und Müller 1995b) und Hsp60 (Bui et al. 1996). Mit der Identifizierung und Charakterisierung einer 47 kDa großen Metallopeptidase in den Hydrogenosomen konnte schließlich auch das für die Prozessierung der HTS verantwortliche Enzym identifiziert werden. Die hydrogenosomale Protease (*hydrogenosomal processing peptidase*, HPP) ähnelt der β -Untereinheit des mitochondrialen Prozessierungsenzyms MPP, phylogenetische Analysen weisen auf einen gemeinsamen Ursprung der beiden Enzyme hin (Brown et al. 2007). Die Identifizierung eines Transporters, der Ähnlichkeit zur *mitochondrial carrier family* (MCF) aufweist, deutete außerdem darauf hin, dass Hydrogenosomen analog zu Mitochondrien auch interne Importsignale in Membranproteinen nutzen (Dyall und Johnson 2000; Pfanner und Geissler 2001).

Mitosomen sind deutlich reduzierte Organellen als Hydrogenosomen und beinhalten weniger Proteine. So wurden in Proteomanalysen von *Giardia lamblia* lediglich 139 Proteine identifiziert, die Mitosomen von *Entamoeba histolytica* beinhalten nur 95 Proteine (Mi-ichi et al. 2009; Jedelský et al. 2011). Die mitochondrialen Präsequenzen sind in der Regel kürzer als hydrogenosomale Transitsequenzen und nicht so definiert wie MTS und HTS (Burri und Keeling 2007). Eine Ausnahme bilden die Präsequenzen der Mitosomen von *Cryptosporidium parvum*. Diese sind deutlich länger als andere mitochondriale Präsequenzen oder HTS, sie ähneln in ihrem Aufbau eher MTS. Die mitochondrialen Proteine der Microsporidien weisen keine konstanten N-terminalen Merkmale auf und sind, falls vorhanden, so abgewandelt, dass sie durch bioinformatische Analysen kaum vorhergesagt werden können (Burri et al. 2006). Bislang konnte auch kein prozessierendes Enzym identifiziert werden, was ebenfalls auf die Abwesenheit von mitochondrialen Präsequenzen innerhalb der Microsporidien hinweist (Katinka et al. 2001; Burri et al. 2006; Burri und Keeling 2007). In *G. lamblia* konnte eine Protease identifiziert werden (GPP), die ebenfalls der β -Untereinheit der MPP ähnelt und phylogenetisch mit den Proteasen der Mitochondrien und Hydrogenosomen verwandt ist (Smíd et al. 2008).

Mitochondrien besitzen eine sehr komplexe, modular aufgebaute Proteinimportmaschinerie, die spezifisch auf die verschiedenen Subkompartimente der Organellen angepasst ist (Doležal et al. 2006). Im Gegensatz dazu sind nur wenige Komponenten der hydrogenosomalen Proteinimportmaschinerie bekannt. Durch Analysen der hydrogenosomalen Genome und Proteome wurde versucht, Homologe zu den

Komponenten der Mitochondrien zu finden. Durch bioinformatischen Analysen konnten Homologe zu Sam50 und Hsp70 identifiziert werden, außerdem wurden mit Tim23, Tim17, Tim44 und Pam18 Mitglieder der Tim17/22/23-Familie und des TIM23/PAM-Komplexes gefunden (Doležal et al. 2006). Zunächst konnten nur Pam18 und Hsp70 in den Hydrogenosomen lokalisiert werden (Doležal et al. 2005). Ob es sich bei den homologen Proteasen tatsächlich um Translokasen handelt, blieb unklar. Auch fehlten Homologe zu TOM. Erst spätere umfangreiche Proteomanalysen und die gezielte Untersuchung des hydrogenosomalen Membranproteoms brachte weitere Hinweise auf am Import beteiligte Komponenten (Rada et al. 2011; Schneider et al. 2011). Schneider und Kollegen konnten durch verschiedene Fraktionierungen von Hydrogenosomen umfangreiche Sequenzierungen der isolierten hydrogenosomalen Proteine mittels restriktiver Spaltung durch Trypsin mit anschließenden massenspektrometrischen Analysen durchführen. Dadurch konnten sie 569 Proteine identifizieren und zeigen, dass Hydrogenosomen komplexer und an mehr Stoffwechselprozessen als erwartet beteiligt sind (Schneider et al. 2011). Das Genom von *T. vaginalis* ist ca. 160 Mb groß und codiert für ungefähr 60.000 Proteine. Die große Redundanz des Genoms lässt vermuten, dass zahlreiche Duplikationen erfolgten, es enthält deshalb viele Gen-Familien mit zahlreichen Kopien eines einzelnen Gens (Carlton et al. 2007). So beinhaltet das Genom 15 paraloge Gene des Malatenzyms, sieben dieser Proteine konnten auch innerhalb des untersuchten Proteoms identifiziert werden. Auch für weitere typische hydrogenosomale Proteine mit mehreren paralogen Genen wie PFOR und Ferredoxin konnten mehrere Proteine innerhalb der Hydrogenosomen nachgewiesen werden. Durch Analysen der 2007 von Carlton und Kollegen veröffentlichten Genom-Analyse von *T. vaginalis* konnten 138 Gene identifiziert werden, die für putative hydrogenosomale Matrixproteine mit N-terminalen Präsequenzen codieren (Carlton et al. 2007). Durch Suche nach Konsensus-Sequenzen der HTS innerhalb der über 500 sequenzierten Proteine konnten jedoch lediglich 95 Proteine mit einer hydrogenosomalen Präsequenz identifiziert werden, so dass entweder wesentlich mehr hydrogenosomale Proteine keine typische HTS aufweisen als erwartet oder die ausgewählten Suchkriterien zu stringent waren (Schneider et al. 2011). Bei mitochondrialen Matrixproteinen besitzen etwa 1/3 der Proteine keine typische MTS (Gakh et al. 2002; Burri und Keeling 2007). Die Durchschnittslänge der sequenzierten hydrogenosomalen Präsequenzen lag zwischen acht und zehn Aminosäuren, 84% der HTS sind kürzer als 14 Aminosäuren (Schneider et al. 2011).

Im Rahmen der Proteomanalyse von Schneider und Kollegen konnten auch 89 Membranproteine identifiziert werden. Dabei wurden vier Proteine identifiziert, die Ähnlichkeit zu Tom40 aufwiesen, da sie eine für Tom40 typische Porin-3-Domäne beinhalten. Da diese Domäne aber nicht zwingend mit dem Proteinimport assoziiert sein muss, sondern auch in

Spannungs-abhängigen Ionenkanälen (*voltage dependent anion channels*, VDACs) der Mitochondrien vorkommt, kann der Bezug zu Tom40 bis zum Nachweis der Funktion nur angenommen werden. Weitere Untereinheiten des TOM-Komplexes wurden nicht gefunden. Zu den von Dolezal und Kollegen vorhergesagten homologen Genen der Untereinheiten der Tim17/22/23-Familie konnten im Proteom der Hydrogenosomen entsprechende Proteine identifiziert werden. Weiterhin konnten alle Untereinheiten des Proteinimport-Motors PAM in den Hydrogenosomen lokalisiert werden.

Die Identifizierung und Charakterisierung von putativen Translokasen der Hydrogenosomen ist von besonderem Interesse, um den hydrogenosomalen Proteinimport genauer verstehen zu können. Die Sequenzierung von Proteinen, die Ähnlichkeit zu Tom40 aufweisen, lieferte erste Hinweise auf das Vorhandensein einer Translokase in der äußeren hydrogenosomalen Membran. Membranproteine sind aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften und geringen Löslichkeit im Rahmen von generellen Proteom-Analysen schwer zu identifizieren, so dass die von Schneider und Kollegen identifizierten Membranproteine möglicherweise nicht dem vollständigen hydrogenosomalen Membranproteom entsprechen (Schneider et al. 2011). Eine von Rada und Kollegen im gleichen Jahr publizierte Analyse des Membranproteoms der Hydrogenosomen identifizierte 68 Proteine, von denen 17 anschließend als Komponenten der Proteinimportmaschinerie annotiert wurden. Sie konnten zwölf Proteine mit multiplen Transmembrandomänen sequenzieren, von denen fünf Ähnlichkeiten zur MCF-Familie aufweisen, darunter auch das bereits bekannte HMP31 (Dyall et al. 2000). Die übrigen Proteine konnten nicht durch orthologe Proteine in anderen Organismen identifiziert werden, ihre Funktion bleibt unklar. Weiterhin konnte eine außergewöhnlich hohe Anzahl an β -barrel Proteinen im hydrogenosomalen Membranproteom identifiziert werden. Die zentrale Komponente des mitochondrialen TOM-Komplexes, Tom40, ist ebenfalls ein β -barrel Protein. Die charakteristische β -barrel Struktur besteht aus 19 Transmembransegmenten, die aus β -Faltblatt-Strukturen bestehen. Im letzten β -Faltblatt ist außerdem das sogenannte β -signal Motiv lokalisiert, das zur Erkennung der Proteine durch den SAM-Komplex dient (Bayrhuber et al. 2008; Hiller et al. 2008; Kutik et al. 2008). Rada und Kollegen konnten innerhalb des hydrogenosomalen Membranproteoms von *T. vaginalis* acht Proteine mit diesem charakteristischen Aufbau der β -barrel Proteine identifizieren. Sechs dieser Proteine konnten als Tom40-Homologe identifiziert werden (*TvTom40-1* bis 6). Zusätzlich konnte eine Funktion dieser Proteine als VDACs durch Analyse der Sequenzen mit VDAC-spezifischen Suchparametern ausgeschlossen werden. Falls *T. vaginalis* auch VDAC-Proteine beinhaltet, ist deren Sequenzabweichung zu groß, um unter Standardbedingungen identifiziert zu werden. Weitere Hinweise, dass es sich bei den identifizierten Proteinen um Untereinheiten

einer putativen Translokase handeln könnte, lieferte die Identifizierung von *TvTom40-3* als Teil eines Komplexes mit hohem Molekulargewicht. Durch Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen konnte auch die Lokalisation dieser homologen Proteine in der hydrogenosomalen Membran verifiziert werden.

Die Analyse des hydrogenosomalen Membranproteoms konnte im Gegensatz zu der generellen Proteomanalyse auch zwei kleine Tim-Proteine identifizieren. Aufgrund starker Sequenzunterschiede ist ein Vergleich mit anderen Organismen schwierig, die größte Ähnlichkeit liegt zu Tim9 aus *S. cerevisiae* vor. Im Gegensatz zu den kleinen Tim-Proteinen der Mitochondrien besitzen die *TvTims* nur ein einzelnes Cystein, die mitochondrialen Proteine weisen ein charakteristisches 2x Cystein-Motiv aus vier Cysteinen auf (Rada et al. 2011).

Außerdem konnten im Rahmen dieser Proteomanalyse ebenfalls die schon von Schneider und Kollegen nachgewiesenen Untereinheiten des TIM23/PAM-Komplexes identifiziert werden. Die beiden Proteine, die große Ähnlichkeit zur Tim17/22/23-Familie aufweisen, besitzen vier Transmembrandomänen und eine charakteristische Aminosäure-Sequenz, das sogenannte PRAT-Motiv (Rassow et al. 1999). Ergänzend konnte durch Behandlung mit Proteinase K gezeigt werden, dass das hydrogenosomale Protein *TvPam18* auch in die innere Membran von Hefe-Mitochondrien integriert werden kann und so vor Abbau durch die Protease geschützt ist, das Protein aus *T. vaginalis* konnte allerdings die Funktion des *ScPam18* nicht vollständig ersetzen. Auch für die putativen Tim23-Kandidaten konnte kein Nachweis der Funktion in Tim23-mutierten *S. cerevisiae* erbracht werden, die *T. vaginalis* Homologe konnten die Funktion der Hefeproteine nicht ersetzen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Proteine in die innere Membran der Mitochondrien integriert wurden (Rada et al. 2011).

Die innere Membran der Hydrogenosomen scheint weniger komplex zu sein als die der Mitochondrien. Es konnten zwar alle Untereinheiten des PAM-Komplexes und der Tim17/22/23-Familie identifiziert werden, es bleibt aber weiterhin unklar, ob Hydrogenosomen ein funktionelles Äquivalent zu der Transporter-Translokase TIM22 der Mitochondrien besitzen. Hinweise darauf, dass Hydrogenosomen eventuell nur eine einzige Translokase in der inneren Membran besitzen, finden sich auch in anderen Protisten, wie zum Beispiel Trypanosoma oder Microsporidien. In beiden Genomen wurde nur ein einzelnes Gen für ein Tim17/22/23 Protein identifiziert (Burri et al. 2006; Schneider et al. 2008). Die Translokase der inneren Membran könnte multifunktional sein, also sowohl für den Import von Matrixproteinen als auch die Assemblierung von Proteinen der inneren Membran verantwortlich sein. Ungewiss bleibt auch, ob die innere Membran der Hydrogenosomen ein Membranpotential ausbildet.

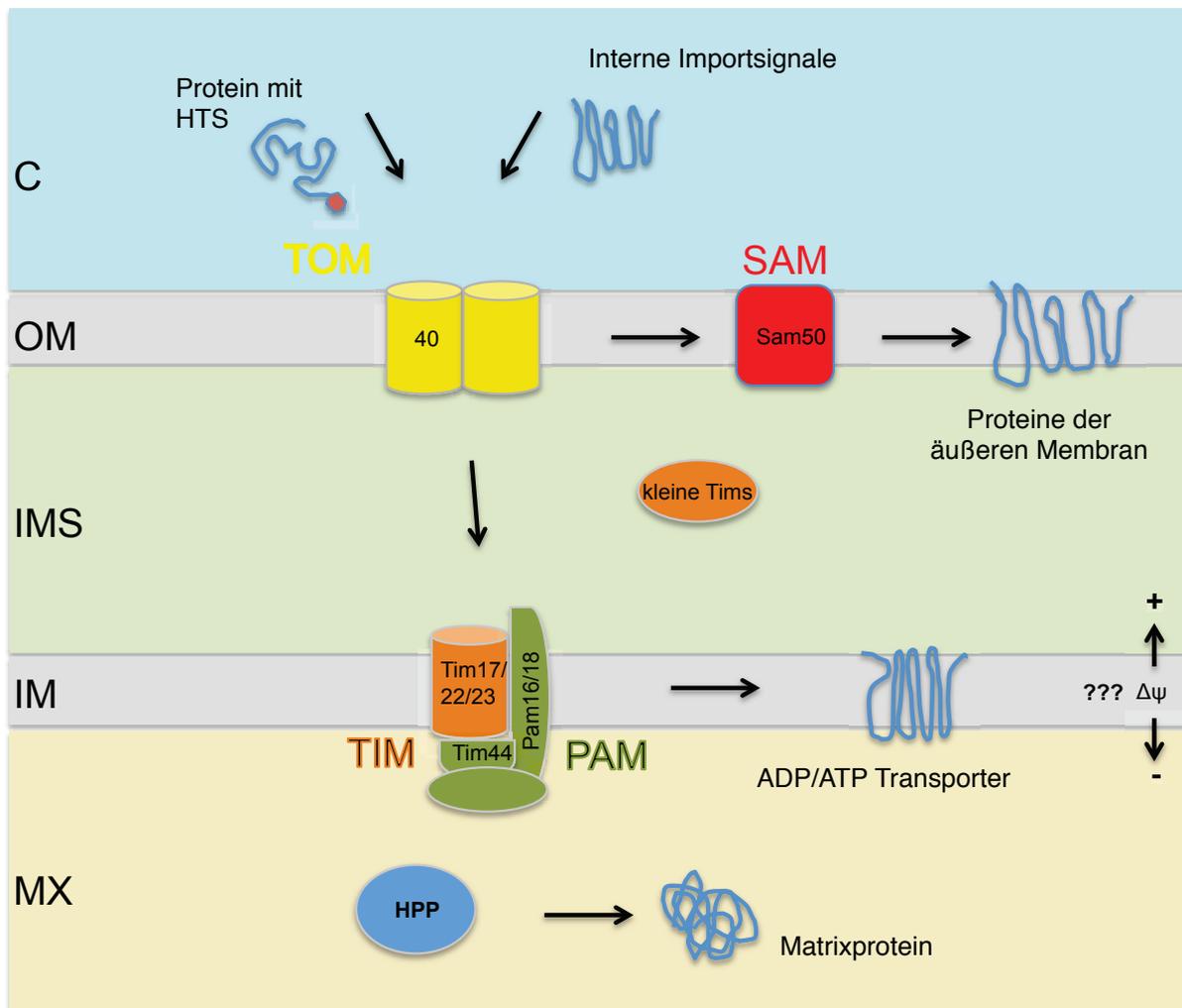


Abbildung 3.3: Schematische Übersicht über die bislang identifizierten Komponenten der hydrogenosomalen Proteinimportmaschinerie. Mit Homologen zu Tom40 und Sam50 und einem Protein der Tim17/22/23 Familie konnten auch in *T. vaginalis* Homologe zu den in den parasitären Protisten am stärksten konservierten Importproteinen identifiziert werden. Ebenfalls vorhanden ist mit dem PAM-Komplex der Proteinimport-Motor. Es fehlen assoziierte Rezeptoren der Translokasen. Unklar bleibt, ob Hydrogenosomen eine universelle Translokase in der inneren Membran besitzen, die sowohl für den Import von Matrixproteinen als auch für die Integration von Membranproteinen zuständig ist oder ob es wie in Mitochondrien funktionell getrennte Translokasen gibt. Innerhalb des Intermembranraums konnten kleine Tim-Proteine identifiziert werden, die jedoch große Sequenzabweichungen zu den mitochondrialen Tim9/10/12 besitzen. In der Matrix konnte ein prozessierendes Enzym (*hydrogenosomal processing peptidase*, HPP) identifiziert werden. Ob Hydrogenosomen ein Membranpotential an der inneren Membran ausbilden, konnte noch nicht endgültig aufgeklärt werden. Details siehe Text. C Cytosol, OM outer membrane, IMS intermembrane space, IM inner membrane, MX Matrix, TOM *Translocase of the outer membrane*, SAM *sorting and assembly machinery*, TIM *translocase of the inner membrane*, PAM *presequence translocase-associated motor*. Abbildung modifiziert nach Rada et al. 2011.

Vereinzelte Veröffentlichungen beschreiben das Vorhandensein eines geringen Membranpotentials (Bradley et al. 1997; Humphreys et al. 1998). Da alle für die Ausbildung des Membranpotentials verantwortlichen Komplexe der inneren mitochondrialen Membran fehlen, kann die Entstehung eines hydrogenosomalen Membranpotentials nicht erklärt werden (Mentel et al. 2008). Hydrogenosomale Präsequenzen weisen verglichen mit mitochondrialen Transitsequenzen eine deutlich geringere negative Ladung auf, was eine Anpassung an ein geringeres Membranpotential sein könnte (Smíd et al. 2008).

Viele Untereinheiten der mitochondrialen Translokasen sind integrale Membranproteine, die mit nur einem Transmembransegment in der Membran verankert sind, beispielsweise die Untereinheiten Tom 5, 6 und 7, die C-terminal in der äußeren Membran verankert sind. In den Membranen der *T. vaginalis* Hydrogenosomen konnten ebenfalls eine große Anzahl an C-terminal verankerten Proteinen identifiziert werden, die allerdings keine Homologien zu mitochondrialen Proteinen aufweisen. N-terminal verankerte Proteine, wie z.B. die Rezeptoren Tom70 und Tom20 bei Mitochondrien, konnten nicht gefunden werden (Rada et al. 2011). Abbildung 3.3 zeigt eine schematische Übersicht über die bislang identifizierten am hydrogenosomalen Proteinimport beteiligten Komponenten.

Die Proteinimport-Maschinerie der Mitosomen ist ähnlich wie die der Hydrogenosomen noch nicht umfassend aufgeklärt. In *G. lamblia* konnten ebenfalls Hsp70 und Pam18 identifiziert werden, beide Proteine besitzen N-terminale Präsequenzen und konnten in den Mitosomen lokalisiert werden (Doležal et al. 2005; Regoes et al. 2005). Außerdem konnte ein Tom40-Homolog in der äußeren Membran nachgewiesen werden, dass Teil eines hochmolekularen Komplexes ist (Dagley et al. 2009). In Genomanalysen von *E. histolytica* konnten nur Hsp70 und ein putatives Tom40 Homolog identifiziert werden, das Genom von *E. cuniculi* beinhaltet Gene für eine verkürzte Form von Tom70, Sam50 und eine stark divergierende Form von Tom40 (Shiflett und Johnson 2010).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse diverser bioinformatischer Analysen der Genome von Organismen mit Hydrogenosomen oder Mitosomen, dass Sam50, Tom40 und Mitglieder der Tim17/22/23 Familie zu den am stärksten konservierten Translokasen gehören. Die meisten Komponenten der mitochondrialen Proteinimport-Maschinerie, mit Ausnahme von Sam50 und Hsp70, weisen keine Homologien zu Proteinen der α -Proteobakterien auf, so dass es wahrscheinlich ist, dass dieses komplexe System erst nach dem endosymbiotischen Ereignis entwickelt wurde (Doležal et al. 2006). Die meisten Komponenten der Maschinerie müssen deshalb nicht evolutionär konserviert sein, es ist denkbar, dass die verschiedenen Formen der Organellen spezifische Importsysteme auf einer gemeinsamen Basis entwickelt haben. Es gibt viele hydrogenosomale Membranproteine, die noch nicht identifiziert und einer bestimmten Funktion zugeordnet

werden konnten. Es bleibt noch unklar, ob es sich dabei um stark in der Sequenz abweichende Homologe von bereits aus anderen Organellen bekannten Importsystemen oder um während der Evolution der Hydrogenosomen neu entstandene Importmechanismen handelt (Rada et al. 2011).

Die einzige Komponente des TOM-Komplexes, die außerhalb der Mitochondrien identifiziert werden konnte, ist mit Tom40 das zentrale Poren-bildende Protein des Komplexes. Die Rezeptoren Tom22 und Tom20 konnten in keinem Organismus mit Organellen mitochondrialen Ursprungs identifiziert werden. Da es sich bei diesen Rezeptoren um die Rezeptoren zur Erkennung von N-terminalen Präsequenzen handelt, könnte die Abwesenheit dieser zur geringeren Ausprägung und Bedeutung der Präsequenzen bei hydrogenosomalen und mitosomalen Proteinen geführt haben (Shiflett und Johnson 2010). Während mitochondriale Matrixproteine nur in 1/3 der Fälle keine MTS aufweisen, sind hydrogenosomale Proteine ohne typische N-terminale Präsequenz deutlich häufiger (Schneider et al. 2011; Burstein et al. 2012). Die Feststellung, dass einige der am stärksten exprimierten hydrogenosomalen Proteine ihre HTS nicht für den Import in die Hydrogenosomen benötigen, lieferte bereits vor den Proteomanalysen Hinweise darauf, dass interne Importsignale in den Matrixproteinen von *T. vaginalis* häufiger vorkommen, als bislang angenommen. Mentel und Kollegen konnten 2008 zeigen, dass die N-terminale Präsequenz des hydrogenosomalen Matrixproteins SCS α nicht essentiell für den Import des Proteins ist, auch nach Deletion der ersten acht Aminosäuren konnte das modifizierte Protein ausschließlich in den Hydrogenosomen lokalisiert werden (Mentel et al. 2008). Außerdem untersuchten sie zwei hydrogenosomale Isoformen einer Thioredoxin-Reduktase (TrxRh1 und 2). Dabei zeigte sich, dass die N-terminale Präsequenz der TrxRh1 essentiell für den Import ist, nach Deletion der N-terminalen zehn Aminosäuren verblieb das Protein im Cytosol. TrxRh2 hingegen besitzt keine typische HTS und konnte trotzdem in den Hydrogenosomen lokalisiert werden. Auch nach Deletion der N-terminalen 21 Aminosäuren wurde TrxRh2 weiterhin in den Hydrogenosomen detektiert, so dass es wahrscheinlich ist, dass dieses Protein ein internes Importsignal innerhalb der Proteinsequenz besitzt. Durch die Untersuchung eines Fusionsproteins aus der HTS der SCS α und TrxRh1 stellte sich heraus, dass die HTS scheinbar nicht ausreichende Import-Informationen enthält, da diese Präsequenz TrxRh1 nicht in die Hydrogenosomen importieren konnte (Mentel et al. 2008). Diese ersten Erkenntnisse über das generelle Vorhandensein von internen Importsignalen in hydrogenosomalen Matrixproteinen konnten durch eine umfangreiche Studie von Zimorski und Kollegen ausgebaut werden. Sie konnten anhand von vier häufig vorkommenden hydrogenosomalen Matrixproteinen (*TvPFO1*, *TvME*, *TvFdx1* und *TvlscA1*) zeigen, dass auch diese trotz Deletion ihrer jeweiligen HTS noch in die Hydrogenosomen importiert

werden. Die HA-markierten Proteine mit modifiziertem N-Terminus konnten nicht nur durch Immunodetektion innerhalb der hydrogenosomalen Fraktion lokalisiert werden, es konnte auch gezeigt werden, dass sie in Protease-Assays vor Abbau durch Proteinase K geschützt sind, also in die Matrix der Organellen importiert werden. Immunofluoreszenz-Aufnahmen transfizierter *T. vaginalis* Kulturen zeigten eine Ko-Lokalisation der untersuchten Proteine mit einem hydrogenosomalen Markerprotein. Alle untersuchten Proteine müssen also interne Importsignale besitzen. Durch gezielte Untersuchung von einzelnen Domänen von SCS α und TrxRh2 konnte außerdem gezeigt werden, dass diese internen Signalen in mehreren Abschnitten der Proteine vorkommen müssen, da einzelne Domänen der Proteine auch isoliert in die Hydrogenosomen importiert werden (Zimorski et al. 2013).

3.4. Ziele dieser Dissertation

Das Proteinimport-System der Mitochondrien wurde bereits umfassend untersucht (Neupert und Herrmann 2007; Voegtle et al. 2009). Im Gegensatz dazu ist das Wissen über den hydrogenosomalen Proteinimport gering. Durch Analysen des Membranproteoms konnten zwar einige Komponenten identifiziert werden, es fehlen aber Informationen über den genauen Aufbau der Translokasen und den Ablauf des Proteinimports (Rada et al. 2011; Schneider et al. 2011). Hydrogenosomale Matrix-Proteine besitzen ebenfalls N-terminale Präsequenzen, die aber nicht immer essentiell für den Import der Proteine sind (Zimorski et al. 2013). In der Matrix der Organellen konnte ein prozessierendes Enzym identifiziert werden, die Prozessierung der Präsequenzen nach Import der Proteine konnte bislang aber nur an einzelnen Proteinen nachgewiesen werden (Bradley et al. 1997; Brown et al. 2007).

Um eine umfassende Übersicht auf das Ausmaß der Prozessierung, die Restriktionsstellen der Präsequenzen und an der Prozessierung der hydrogenosomalen Proteine beteiligte Enzyme ziehen zu können, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit das hydrogenosomale N-Proteom, also die Gesamtheit der N-Termini reifer hydrogenosomaler Matrixproteine, analysiert werden. Eine Untersuchung des mitochondrialen N-Proteoms lieferte zahlreiche neue Erkenntnisse über die Schnittstelle des mitochondrialen Prozessierungsenzyms und führte zur Entdeckung einer bislang unbekanntem weiteren Protease (Voegtle et al. 2009). Um die globale Analyse der hydrogenosomalen N-Termini gezielt durchführen zu können, sollten diese mit Hilfe des Enzyms Subtiligase unter Verwendung eines biotinylierten Peptidsubstrats markiert werden. Diese Biotin-Markierung erlaubt anschließend die spezifische Isolierung und somit die gezielte Sequenzierung der N-terminalen Peptide im Massenspektrometer.

Als weiterer Aspekt des hydrogenosomal Proteinimports sollte untersucht werden, ob dieser von der Konformation der zu importierenden Proteine abhängt. Durch Studien an Reporterproteinen, die mit mitochondrialen Präsequenzen fusioniert waren, konnte für den Proteinimport der Mitochondrien gezeigt werden, dass die zu importierenden Proteine nur linearisiert über die Translokasen importiert werden können (Eilers und Schatz 1986). Um die Abhängigkeit des Proteinimports in die Hydrogenosomen von der Entfaltung der Sekundärstrukturen der zu importierenden Vorläufer-Proteine zu untersuchen, sollte ein Fusionsprotein aus dem Reporterprotein murine Dehydrofolatreduktase (mDHFR) mit einer hydrogenosomal Präsequenz erstellt werden. Die Sekundärstruktur der mDHFR kann durch Anwesenheit von Folat-Derivaten stabilisiert werden, so dass eine Entfaltung des Proteins nicht mehr möglich ist (Eilers und Schatz 1986). Durch die Untersuchung der subzellulären Lokalisation des Fusionsproteins mittels Immunodetektionen und Immunofluoreszenz-Assays in An- und Abwesenheit des Folat-Derivats Pyrimethamin sollten Rückschlüsse auf die Konformation der hydrogenosomal Proteine während des Imports gezogen werden.

4. Material und Methoden

4.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien lagen in höchster Reinheit und Qualität (*p.a.*) vor. Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, bei folgenden Firmen bezogen: Acros Organics (Geel, Belgien), AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Difco Laboratories Inc. (Palo Alto, USA), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Merck Biosciences (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

Puffer, Medien und Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert, nicht autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert.

4.2. Enzyme

<i>Bam</i> HI	New England Biolabs
<i>Nde</i> I	New England Biolabs
Proteinase K	Roth
Quick T4 DNA Ligase	New England Biolabs
<i>Taq</i> -Polymerase	New England Biolabs
TurboTEV-Protease	MoBiTec
Velocity-Polymerase	Bioline

4.3. Antikörper

Mouse anti-HA monoclonal antibody	Sigma
Rabbit anti-ASCT polyclonal antibody	Eurogentec
Rabbit anti-Biotin polyclonal antibody	Abcam
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

4.4. Antibiotika

Ampicillin	Sigma
Chloramphenicol	Serva
Geneticin (G418)	Roth
Penicillin/Streptomycin	Biomedicals LLC

4.5. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit benutzten Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (Martinsried) und Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

Folgende Oligonukleotide wurden für Arbeiten mit DHFR verwendet:

mDHFR_NdeI_FOR	5' – CTG ACG CAT ATG GTT CGA CCA TTG AAC TGC ATC –3'
mDHFR_BamHI_REV	5' – GAC GTG GAT CCG TCT TTC TTC TCG TAG ACT TCA AAC –3'
HTSTrxRh1::DHFR_NdeI_FOR	5' – CTG ACG CAT ATG TTT TCT ATT ATC TTT TTC TCT AGA TTC TCT GTT CGA CCA TTG AAC TGC –3'
SCS+OVDHFR1_FOR	5' – CCA CGA GGA GCT CAC ATC CCA CAG CAC G –3'
SCS+OVDHFR2_REV	5' – GC AAG AAA ATG TGC AGC GAA GCG CTT –3'
DHFR1+OVS1_REV	5' – CTG TGG GAT GTG AGC TCC TCG TGG TGG –3'
DHFR2+OVS2_FOR	5' – CGC TTC GCT GCA CAT TTT CTT GCC AAA AGT TTG –3'
TrxRh1_NdeI_FOR	5' – CTG ACG CAT ATG TTT TCT ATT ATC TTT TTCT CTA G –3'
TrxRh1ΔHTS_NdeI_FOR	5' – CTG ACG CAT ATG TAC TCT ACC GAC GAT GAC G –3'
TrxRh1_BamHI_REV	5' – GAC GTG GAT CCA ATA GCT TTC ACT TGT GAT ATA TAC –3'
pTagvag2_FOR	5' – CGG CCA CTT ACG CTT CAA TTA AGG GG –3'
M13_REV	5' – CAG GAA ACA GCT ATG ACC –3'

4.6. Reagenzsätze

μMACS Streptavidin Kit	Milteny Biotec
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Thermo Scientific
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
High Capacity Streptavidin Agarose Resin	Thermo Scientific
MinElute® Gel Extraction Kit	Qiagen
Quick Ligation™ Kit	New England Biolabs

4.7. Vektoren

Für Klonierungen von DNA wurde der Vektor pJET1.2/blunt (Fermentas) verwendet. Zur homologen Expression von Proteinen in *T. vaginalis* wurde der Vektor pTagvag2 verwendet, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. J. Tachezy, Prag, Tschechien (Hrdý et al. 2004). Um das Enzym Subtiligase in *B. subtilis* zu exprimieren, wurde der *E. coli* / *B. subtilis* Shuttlevektor pPW04 mit der codierenden Sequenz der Subtiligase verwendet, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. J.A. Wells, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of California, San Francisco, USA.

4.8. Kulturen

4.8.1. *Trichomonas vaginalis*

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde der *Trichomonas vaginalis* Stamm T1, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J.-H. Tai vom Institute of Biomedical Sciences, Taipeh, Taiwan verwendet.

4.8.2. Anzucht von *Trichomonas vaginalis*

Die Anzucht von *T. vaginalis* erfolgte bei 37°C in 15 ml Kulturröhrchen mit 12 ml TYM-Medium pH 6,2 (2,22 % (w/v) Tryptose; 1,11 % (w/v) Hefeextrakt; 0,555 % (w/v) Maltose; 0,111% (w/v) L-Cystein; 0,022 % (w/v) L(+)- Ascorbinsäure; 0,088 % (w/v) KH₂PO₄; 0,088 % (w/v) K₂HPO₄ (Diamond, 1957; (Clark und Diamond 2002)) mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem Pferdeserum (PAN Biotech); 0,71 % (v/v) Eisenlösung (1 % (w/v) Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ × 6H₂O; 0,1 % (w/v) 5-Sulfosalicylsäure)). Alle zwei Tage wurden 100 µl der Kultur in frisches Medium überführt. Zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen wurde 1% (v/v) Penicillin/ Streptomycin (Biomedicals LLC) zugegeben. Bei transfizierten Kulturen wurden 100 µg/ml G418 (Roth) als Selektionsmarker verwendet. Für die Anzucht größerer Mengen wurden 45 ml TYM-Medium mit 5 ml oder 1 l TYM-Medium mit 100 ml einer Vorkultur inokuliert.

4.8.3. Transfektion von *Trichomonas vaginalis* durch Elektroporation

Um *T. vaginalis* durch Elektroporation zu transfizieren, wurden 50 ml Kultur zentrifugiert (1500xg, 10 Minuten, 4°C), das entstandene Zellpellet wurde anschließend in 1,5 ml TYM-Medium pro Gramm Zellen resuspendiert und viermal durch eine 23G-Kanüle gezogen. In einer vorgekühlten 0,4 cm Elektroporationsküvette wurden 300 µl Zellsuspension und 50 µg Plasmid gemischt, anschließend erfolgte die Elektroporation (350 V, 975 µF). Nach zehn Minuten auf Eis wurden die Zellen in frisches TYM-Medium überführt und bei 37°C inkubiert. Nach vier Stunden wurde das Antibiotikum G418 (100 µg/ml) zur Selektion zugegeben.

Nach zwei Tagen wurde die Kultur zentrifugiert (1000xg, 10 Minuten, RT) und das Pellet in frischem TYM-Medium resuspendiert. Die weitere Anzucht erfolgte wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben.

4.8.4. Isolierung von Hydrogenosomen aus *Trichomonas vaginalis*

Die Isolierung von Hydrogenosomen aus *Trichomonas vaginalis* erfolgte nach Bradley et al. (1997) mit Modifikationen nach Pütz et al. (2005) und Mentel et al. (2008). Alle verwendeten Geräte, Gefäße und Lösungen wurden vorgekühlt, die durchgeführten Zentrifugationen erfolgten stets bei 4°C. Die Isolierung der Hydrogenosomen erfolgte aus mindestens 2 l *T. vaginalis* Kultur.

Die Zellen wurden zunächst bei 1000xg für 10 Minuten pelletiert und anschließend zweimal mit SMB-Puffer (250 mM Saccharose; 10 mM MOPS/KOH pH 7,2; 10 mM β -Mercaptoethanol) gewaschen. Das Pellet wurde in 15 ml SMDI-Puffer (250 mM Saccharose; 10 mM MOPS/KOH pH 7,2; 10 mM DTT; 50 μ g/ml TLCK; 10 μ g/ml Leupeptin) resuspendiert und mit Glasperlen (\varnothing 400-600 nm) für 20 Minuten gemörsert. Anschließend wurden Glasperlen, unlysierte Zellen, Membranen und Zellkerne durch eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 755xg entfernt und das so entstandene Gesamtzellextrakt durch eine weitere Zentrifugation (7500xg, 10 Minuten) in Cytosol und Organellen getrennt. Die Organellen wurden in 16,2 ml SMDI-Puffer gelöst und mit dem gleichen Volumen einer 90%igen Percoll-Lösung (90% (v/v) Percoll (GE Healthcare); 10% (v/v) isotonische Saccharose (2,5 M Saccharose; 100 mM MOPS/KOH pH 7,2; 10 mM DTT; 50 μ g/ml TLCK; 10 μ g/ml Leupeptin) versetzt. Der Ansatz wurde luftblasenfrei in Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann Optiseal Polyallomer Tubes) überführt und bei 64.300xg für eine Stunde zentrifugiert, um die Hydrogenosomen von den Lysosomen zu trennen. Die Hydrogenosomen wurden mit einer Pasteurpipette abgenommen und 1:10 mit SMDI 1/10-Puffer (250 mM Saccharose; 10 mM MOPS/KOH pH 7,2; 10 mM DTT; 5 μ g/ml TLCK; 1 μ g/ml Leupeptin) verdünnt und für 15 Minuten bei 3000xg zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 30 ml SMDI-Puffer resuspendiert und 10 Minuten bei 7500xg zentrifugiert. Abschließend wurden die Hydrogenosomen in 500-1000 μ l SMDI-Puffer resuspendiert und bei 4°C gelagert.

4.8.5. Fluoreszenzmikroskopie

Um die Lokalisation der HA-markierten Proteine direkt in der Zelle untersuchen zu können, wurden sogenannte Immunofluoreszenz-Assays (IFAs) durchgeführt. Dazu wurden 5-10 ml einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Kultur sukzessive bei 1000xg pelletiert und anschließend in 1 ml PBS (8% (w/v) NaCl; 0,2% (w/v) KCl; 1,44% (w/v) Na_2HPO_4 ; 0,24% (w/v) KH_2PO_4 , pH 7,4) für 5 Minuten gewaschen und erneut zentrifugiert (1000xg, 2 Minuten). Die Zellen wurden in FPS (Fixing Permeabilization Solution, 4% (v/v) PFA; 1% (v/v) Triton X-100 in PBS) für 20 Minuten fixiert und danach erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen eine Stunde lang in Blocking-PBS (1% (w/v)

BSA; 0,25% (w/v) Gelatine; 0,05% (v/v) Tween 20 in PBS) geblockt. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Erstantikörper (1:250 (α -SCS, α ASCT) -1:500 (α HA) in Blocking-PBS) für eine Stunde. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie mit dem Zweitantikörper (AlexaFluor488-anti-mouse IgG bzw. AlexaFluor594-anti-rat IgG (Invitrogen) 1:1000 in Blocking-PBS) für eine Stunde inkubiert wurden. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen in PBS resuspendiert, mit Fluoroshield mit DAPI (Sigma) versetzt und auf einen Objektträger aufgetragen und luftdicht mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Objektträger wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert, bis die Zellen mittels des konfokalen Mikroskops Zeiss LSM 710 untersucht wurden.

4.8.6. *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF ¹ (Stratagene)	Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F ⁺ proAB lacI ^q Z ₁ M15 Tn10 (Tet ¹)]
<i>Escherichia coli</i> K12 ER1821 (New England Biolabs)	F ⁻ glnV44 e14 ⁻ (McrA ⁻) rfbD1? relA1? endA1 spoT1? thi-1 Δ (mcrC-mrr)114::IS10

Alle mit *E. coli* durchgeführten Arbeiten, wie die Kultivierung auf Fest- und in Flüssigmedium, die Herstellung von kompetenten Zellen und Transformationen der kompetenten Zellen wurden nach Standardprotokollen von Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

4.8.7. *Bacillus subtilis*

<i>Bacillus subtilis</i> BG2864 (ATCC-47096, LGC Standards)	Δ (aprE) Δ (nprE) Δ (flaA) ::kan
--	---

Die Anzucht und die Kultivierung von *Bacillus subtilis* erfolgte auf Fest- oder in Flüssigmedium (LB- bzw. 2xYT-Medium, Sambrook et al. 1989).

4.8.8. Transformation von *Bacillus subtilis*

B. subtilis ist natürlich kompetent, da die Zellen DNA-Aufnahmemechanismen ausbilden können, wenn sie die logarithmische Wachstumsphase verlassen. Diese Eigenschaft wird für die Transformation genutzt. Da die Plasmid-DNA linearisiert aufgenommen wird und *in vivo* nur durch homologe Rekombination rezirkularisieren kann, können nur repetitive, konkatermerische Plasmide für die Transformation genutzt werden. Deshalb ist es notwendig, die Plasmid-DNA aus *E. coli* RecA⁺ Stämmen wie ER1821 (Kapitel 4.8.6) zu isolieren.

Um *B. subtilis* zu transformieren, wurde ein Glycerolstock auf LB ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer einzelnen Kolonie wurden 5 ml 2xYT-Medium inokuliert und erneut bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert und das Zellpellet in 5 ml Medium A (10% (v/v) Bacillus Minimal Salts (10x Bacillus Minimal Salts: 0,8 M K₂HPO₄, 0,45 M KH₂PO₄, 0,15 M (NH₄)₂SO₄; 0,04 M NaCitrate-2H₂O); 1% (v/v) 50% Glucose; 0,5% (v/v) 1 M MgCl₂; 1% (v/v) 5 mg/ml Tryptophan; 1% (v/v) 2% Amicase) resuspendiert. Mit 1 ml dieser Zellsuspension wurden 50 ml Medium A inokuliert und bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Alle 20 Minuten wurde die OD₆₀₀ photometrisch bestimmt und so eine Wachstumskurve erstellt. Sobald das Wachstum der Zellen die log-Phase verließ (OD 0,5-0,6) wurden die Zellen für weitere 90 Minuten inkubiert, so dass sie den Zeitpunkt der natürlichen Kompetenz erreichten. 0,5 ml der kompetenten Zellen wurden dann in 5 ml vorgewärmtem Medium B (10% (v/v) Bacillus Minimal Salts; 1% (v/v) 50% Glucose; 0,5% (v/v) 1 M MgCl₂; 0,05% (v/v) 5 mg/ml Tryptophan; 0,25% (v/v) 2% Amicase) verdünnt und jeweils 300 µl dieser Zellsuspension zu 1-2 µg Plasmid-DNA in 15 ml Reaktionsgefäße gegeben. Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne DNA. Die Transformationsansätze wurden für zwei Stunden unter starkem Schütteln bei 37°C inkubiert. Da die verwendeten Plasmide Chloramphenicol als Selektionsmarker enthielten, wurde anschließend jeweils 1 ml 2xYT-Medium mit 0,5 µg/ml Chloramphenicol zugegeben und die Ansätze für eine Stunde inkubiert, um die Transkription der Resistenzgene zu induzieren. Abschließend wurden die Zellen zentrifugiert (2 Minuten, 4000xg), das entstandene Zellpellet wurde in 150 µl 2xYT-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit 5 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und der Transformationserfolg am nächsten Tag überprüft.

4.8.9. Isolierung der Subtiligase aus *Bacillus subtilis*

Um das Enzym Subtiligase in *B. subtilis* zu exprimieren, wurde *B. subtilis* mit dem Plasmid pPW04, das die codierende Sequenz der Subtiligase enthielt, transformiert (Kapitel 4.8.8). Ein Glycerolstock einer transformierten Kultur wurde auf einer LB-Platte mit 10 µg/ml

Chloramphenicol ausgestrichen und über Nacht inkubiert. 5 ml 2xYT-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie dieser Platte inokuliert und ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit jeweils 1 ml dieser Vorkultur wurden anschließend 1 l 2xYT-Medium inokuliert und für 24 Stunden unter ständiger Belüftung bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (10 Minuten, 1000xg) und das Zellpellet anschließend verworfen, da *B. subtilis* exprimierte Proteine in den Überstand sekretiert. Die Proteine wurden durch hinzufügen von 50% (w/v) Ammoniumsulfat bei 4°C unter ständigem Rühren für mindestens eine Stunde präzipitiert und anschließend durch eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 10000xg pelletiert. Das Pellet wurde in 25 mM NaOAc pH 4,5; 5 mM DTT gelöst, anschließend wurden 75% (v/v) Ethanol zugegeben und die Proteine für weitere 30 Minuten bei 4°C präzipitiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 5000xg für 15 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 25 mM NaOAc pH 4,5; 5 mM DTT resuspendiert. Die Proteinlösung wurde 48 Stunden lang gegen diesen Puffer dialysiert, wobei der Puffer mindestens dreimal gewechselt wurde. Anschließend wurden präzipitierte Verunreinigungen durch eine Zentrifugation bei 27000xg pelletiert, der Überstand wurde auf eine äquilibrierte HiTrap SP HP-Säule (GE Healthcare) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1-2 ml/min gegeben. Die Säule wurde mit mindestens fünf Säulenvolumen 25 mM NaOAc pH 4,5 gewaschen und die isolierten Proteine anschließend mit einem linearen Salzgradienten (NaCl) von der Säule eluiert. Die dabei gesammelten Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel überprüft, die Fraktionen, die das exprimierte Protein enthielten, konzentriert und anschließend durch eine Gelfiltration über eine Sephacryl S-200 HR-Säule (GE Healthcare) gereinigt. Die eluierten Fraktionen wurden ebenfalls auf einem SDS-Gel überprüft und die Fraktionen, die Subtiliginase enthielten, vereint und konzentriert. Nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden Aliquots von 100 µM in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

4.9. Arbeiten mit Nukleinsäuren

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

- Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese
- Restriktion von DNA
- Ligationen in Expressionsvektoren

Folgende Methoden wurden nach Herstellerangaben durchgeführt:

- Extraktion von DNA aus Agarosegelen (MinElute[®] Gel Extraction Kit, Qiagen)
- Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (Qubit Fluorometer, Invitrogen)
- Plasmid-Präparation aus *E. coli* (GeneJET[™] Plasmid Miniprep Kit, Thermo Scientific)
- Klonierungen mit dem pJET-Vektor (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific)
- Ligationen mit der Quick-Ligase (Quick Ligation[™] Kit, New England Biolabs)

4.9.1. Isolierung von genomischer DNA aus *Trichomonas vaginalis*

Um genomische DNA aus *T. vaginalis* zu isolieren, wurde eine 50 ml Kultur 10 Minuten bei 1000xg und 4°C pelletiert und das entstandene Zellpellet in 1 ml DNAzol[®] (Invitrogen) resuspendiert. Die weitere Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben. Die isolierte DNA wurde abschließend zu einer Konzentration von 100 ng/ μ l in TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

4.9.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der zu untersuchenden Gene erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR; (Saiki et al. 1988)). Durch Verwendung von genspezifischen Oligonukleotiden ist es möglich, Gene gezielt aus genomischer DNA oder Plasmid-DNA mithilfe einer DNA-Polymerase zu vervielfältigen. Dazu wurden jeweils 100 ng DNA benutzt. Die Reaktionsansätze beinhalteten neben der DNA 1x Polymerasenspezifischen Puffer, je 0,2 M dNTPs, je 0,4 μ M Oligonukleotide und 1 U Polymerase. Nach einer Initialdenaturierung der DNA für 2 Minuten bei 98°C folgten 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung (30 sec, 98°C), *Annealing* (Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA-Stränge, Temperatur oligonukleotid-spezifisch 50-68°C, 30 sec) und Elongation der angelagerten Oligonukleotide zu einem neuen Doppelstrang (72°C, 15-30 sec/kb). Abschließend erfolgte eine finale Elongation bei 72°C für 10 Minuten. Der Erfolg der Amplifikation wurde auf einem 1%igen Agarosegel überprüft, indem die Proben mit 1x DNA-Ladepuffer versetzt und durch Gelelektrophorese getrennt wurden.

Um die codierende Sequenz des SCSa Block 2 (Zimorski et al. 2013) in die codierende Sequenz der DHFR einzufügen, wurde die Methode der overlap extension PCR angewendet (Wurch et al. 1998). Durch diese Methode ist es in drei PCR-Schritten möglich, ein chimäres Gen zu amplifizieren (Abbildung 4.1). In der ersten PCR werden Oligonukleotide verwendet, die an ihrem 5'-Ende partiell komplementär zu den zu verbindenden Fragmenten sind (Kapitel 4.4.5). Sowohl die beiden Abschnitte der DHFR als

auch der SCS-Teil werden so mit überhängenden Enden passend zu den anderen Abschnitten versehen. Diese überhängenden Enden wurden dann in der zweiten und dritten PCR dazu verwendet, die Genbereiche zu verbinden.

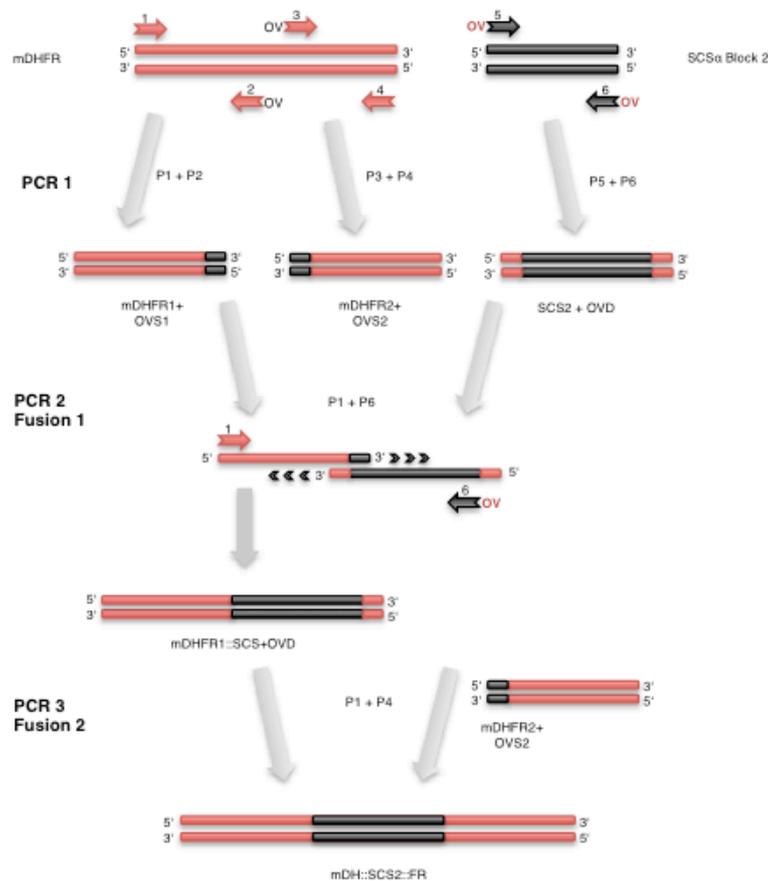


Abbildung 4.1: Overlap extension PCR zur Insertion der codierenden Sequenz des SCSa Block II (schwarz) in die codierende Sequenz der mDHFR (rot). Durch Verwendung von Oligonukleotiden (P1-6) mit spezifischen Überhängen (OV), die komplementär zu den zu verbindenden Sequenzbereichen sind, wird eine Fusion zweier PCR-Produkte in einer weiteren PCR ermöglicht.

4.9.3. Klonierung über Restriktionsschnittstellen

Um mittels PCR (Kapitel 4.9.2) amplifizierte Gene zu vervielfältigen, wurden sie durch Klonierung in einen Vektor eingebracht und in *E. coli* vermehrt. Um die Ligation von Vektor und Gen zu ermöglichen, wurden Restriktionsschnittstellen verwendet. Restriktionsenzyme restringieren DNA an spezifischen Erkennungssequenzen und verursachen dadurch charakteristische Enden der DNA. Dabei unterscheidet man zwischen glatten DNA-Enden (*blunt ends*) und überhängenden Enden (*sticky ends*). Um PCR-Produkte direkt nach der Amplifikation zu klonieren, wurde eine *blunt end*-Ligation mit dem CloneJET PCR Cloning Kit

(Thermo Scientific) durchgeführt. Die amplifizierte DNA erhält durch die Korrekturfunktion der verwendeten Polymerase *blunt ends*, der Vektor liegt bereits linearisiert im Kit vor. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Vermehrung des Plasmids wurde *E. coli* mit diesem Plasmid transformiert und die Zellen zur Selektion auf LB-Agarplatten mit Ampicillin aufgebracht. Aus positiven Klonen wurden die vermehrten Plasmide isoliert und die korrekte Amplifikation der Gene durch Sequenzierung der Plasmide (4.9.4) überprüft. Anschließend wurden die inserierten Gene durch die Verwendung von Restriktionsenzymen, deren Erkennungssequenzen über die verwendeten Oligonukleotide an die Gene angefügt wurden, aus dem Klonierungsvektor isoliert und mittels der so entstandenen überhängenden Enden in einen Expressionsvektor ligiert. Für Untersuchungen in *Trichomonas vaginalis* wurde der Vektor pTagvag2 und die Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI* verwendet.

4.9.4. Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von verwendeten Plasmiden wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg durchgeführt. Die Überprüfung der sequenzierten Plasmide erfolgte anschließend mit Sequencher (Gene Codes).

4.10. Arbeiten mit Proteinen

4.10.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde nach (Bradford 1976) durchgeführt. Dazu wurde die Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay) 1:5 verdünnt und anschließend zu 1 ml Bradford-Lösung je 1 μ l Proteinlösung zugegeben und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Anschließend konnte die Extinktion gegen eine Referenz bestimmt werden. Um die Proteinkonzentrationen aus der Extinktion ableiten zu können, wurde eine Kalibrierungsgrade mit bekannten BSA-Konzentrationen erstellt. Die Messungen erfolgten computergesteuert (Vision lite, Thermo Electro Corporation).

4.10.2. Separation von Hydrogenosomen in Membranen und Matrix

Hydrogenosomen wurden nach (Fujiki et al. 1982) durch die Behandlung mit Natriumcarbonat und anschließender Ultrazentrifugation in Membranen und Matrixproteine getrennt.

2 mg Hydrogenosomen wurden für 45 Minuten in 0,1 M Na_2CO_3 pH 11,5 inkubiert und dabei alle zehn Minuten geschüttelt. Anschließend wurden die aufgeschlossenen Organellen

für eine Stunde bei 208000xg zentrifugiert. Die dabei pelletierten Membranen wurden zweimal mit 100 μ l eiskaltem Wasser gewaschen und anschließend bei -80°C gelagert. Die Matrixproteine verblieben im Überstand und wurden durch Fällung mit Aceton/Trichloressigsäure (7,5:1) präzipitiert (Kapitel 4.10.4).

4.10.3. Proteasebehandlung der Hydrogenosomen

Zur Verifizierung des hydrogenosomalen Proteinimports wurden frisch isolierte Hydrogenosomen einer Behandlung mit Proteinase K unterzogen (Dyall 2003; Zimorski et al. 2013).

Dazu wurden 1 mg Hydrogenosomen bei 2500xg für 10 Minuten pelletiert und in 1 ml SM-Puffer (10 mM MOPS/KOH pH 8.0; 250 mM Saccharose; 10 mM EDTA) gewaschen. Anschließend wurden die Organellen in 500 μ l SM-Puffer zu einer Konzentration von 2 μ g/ μ l resuspendiert. Die in SM-Puffer gelösten Organellen wurden in Einzelproben von 200 μ g aufgeteilt, zu der Hälfte der Proben wurde Triton X-100 hinzugefügt, anschließend wurden alle Proben für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde allen Proben 50 bzw. 100 μ g/ml Proteinase K (Roth Chemicals) zugefügt, wobei eine Probe ohne Proteinase K als Negativkontrolle diente. Alle Proben wurden erneut für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend wurde die Proteolyse durch Zugabe von Aceton/Trichloressigsäure (7,5:1) gestoppt.

4.10.4. Präzipitation von Proteinen durch Aceton/Trichloressigsäure

Um hydrogenosomale Proteine nach Behandlung mit Proteinase K oder nach Isolierung der Matrixproteine zu präzipitieren, wurde ein Gemisch aus Aceton und Trichloressigsäure (TCA) im Verhältnis 7,5:1 verwendet. Dazu wurden 0,76 ml Aceton/TCA pro ml Probe hinzugefügt und die Präzipitation bei -20°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine pelletiert, indem die Ansätze für 10 Minuten bei 16000xg zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem Aceton resuspendiert, für 20 Minuten bei 500 rpm geschüttelt und anschließend erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, abschließend wurde das Pellet bei 30°C und 600 rpm in Rehydratationspuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% (w/v) CHAPS) resuspendiert. Nach Zugabe von konzentriertem Tris und 5x Laemmli-Puffer konnten die präzipitierten Proteine auf ein SDS-Gel aufgetragen werden.

4.10.5. Elektrophoretische Trennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli 1970). Es wurden die Standardprotokolle für 5%ige Sammelgele und 12%ige Trenngele nach Sambrook et al. (1989) verwendet, die Trennung erfolgte in Gelkammern (P9DS, Owl Separation Systems/Thermo Scientific) bei 120 und 240 V. Die zu untersuchenden Proben wurden vor dem Auftrag auf das SDS-Gel mit 1/5 Volumen 5x Laemmli-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 und für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Als Proteinmarker wurde PageRuler™ Plus Prestained #26619 (Thermo Scientific) verwendet.

4.10.6. Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Um getrennte Proteine in einem SDS-Gel anzufärben, wurden sie mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt (Heukeshoven und Dernick, 1988). Dazu wurde eine Coomassie-Stammlösung (60% (v/v) Methanol, 1 Tablette PhastGel Blue R-350 (GE Healthcare) 1:10 mit 10%iger (v/v) Essigsäure verdünnt und auf 90°C erhitzt. Das SDS-Gel wurde für eine Stunde in dieser Färbelösung inkubiert und anschließend in 10%iger (v/v) Essigsäure bis zum gewünschten Färbegrad der Banden entfärbt.

4.10.7. Western Blot und Immunodetektion

Durch eine SDS-PAGE getrennte Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Western Blot bzw. Western Transfer), um die Lokalisation von markierten Proteinen durch Verwendung von spezifischen Antikörpern zu ermöglichen (Immunodetektion).

Zur Durchführung des Western Blots wurden drei Lagen auf die Größe des Gels angepasstes und mit Transferpuffer (40 mM Glycin, 50 mM Tris, 1 mM SDS, 20% (v/v) Methanol) angefeuchtetes Whatman 3 MM-Papier auf die Anode gelegt. Die Nitrocellulosemembran und das SDS-Gel wurden in Wasser angefeuchtet, auf das Whatman-Papier gelegt und abschließend mit drei weiteren Lagen Whatman-Papier bedeckt. Anschließend wurde die Kathode aufgelegt und der Transfer im Trans Blot® Turbo™ Transfer-System (Bio-Rad) durchgeführt (30 Minuten, 1 Ampere, 25 V). Nach Überprüfung des Transfers durch eine Färbung der Membran mit Ponceau S (0,5% (w/v) Ponceau S, 1% (v/v) Essigsäure) wurde die Membran für 30 Minuten mit Blocking-Puffer (5% (w/v) Magermilchpulver in TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl)) inkubiert, um freie Bindungsstellen der Membran zu blockieren und so die spezifische Detektion der auf die

Membran übertragenen Proteine durch die verwendeten Antikörper zu ermöglichen (Kapitel 4.4). Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit dem Erstantikörper (1:1000-1:5000 in Blocking-Puffer) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (1:10000 in Blocking-Puffer) für eine Stunde. Abschließend wurde die Membran erneut dreimal mit TBS gewaschen und für 5 Minuten mit dem SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Thermo Scientific) inkubiert, um die Detektion der markierten Proteine zu ermöglichen. Die Detektion wurde computergesteuert im ChemiDoc[™] MP (Bio-Rad) durchgeführt.

4.10.8. Tryptische Spaltung von Proteinen

Die Sequenzierung von Proteinen im Massenspektrometer (Kapitel 4.10.9) erfordert zunächst die proteolytische Behandlung der Proteine mit Trypsin, um diese in Peptide zu spalten. Die Spaltung von Proteinen ist sowohl bei durch SDS-PAGE getrennten Proteinen als auch in Proteinlösungen (in Gel- bzw. in Lösung-Spaltung) möglich.

Für die tryptische Spaltung von Proteinen in einem SDS-Gel wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel mittels eines Skalpellens ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke wurden zunächst zweimal in 50% (v/v) Acetonitril in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat (Bicarb) gewaschen (30 Minuten, Thermoschüttler), um Salze und störende Agentien zu entfernen. Anschließend wurden die Gelstücke in 100% Acetonitril dehydriert und in der Vakuum-Zentrifuge vollständig getrocknet. Zur Proteolyse der enthaltenen Proteine wurden die Gelstücke mit Trypsinlösung (0,1 µg/µl in 25 mM Bicarb) rehydratisiert, mit 25 mM Bicarb überschichtet und 12-16 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Spaltung wurden die Gelstücke zentrifugiert, wodurch sich die freigesetzten Peptide im Überstand ansammeln. Um verbleibende Peptide aus den Gelresten freizusetzen, wurden diese mit Wasser bedeckt, für fünf Minuten im Ultraschallbad inkubiert und anschließend dreimal mit Elutionslösung (50% (v/v) Acetonitril, 5% (v/v) Ameisensäure) gewaschen (30 Minuten, Thermoschüttler) und zentrifugiert. Abschließend wurden sie mit 100% Acetonitril vollständig dehydriert und die Peptide durch eine erneute Zentrifugation in den Überstand überführt. Alle gesammelten Überstände wurden vereinigt und die enthaltenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge vollständig eingetrocknet. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Zur Proteolyse von Proteinen in Lösungen wurde der zu behandelnden Proteinlösung Trypsin (0,1 µg/µl in 25 mM Bicarb) zugefügt, so dass das Verhältnis von Trypsin zu Protein etwa 1:20 betrug. Der Reaktionsansatz wurde für 2,5 Stunden bei 37°C inkubiert und die Proteolyse anschließend durch Hitze-Inaktivierung (95°C, 10 Minuten) gestoppt. Die

Proteinlösung wurde abschließend in der Vakuum-Zentrifuge vollständig eingetrocknet und bei -20°C gelagert.

4.10.9. Proteinsequenzierung im Massenspektrometer

Proteinsequenzierungen wurden mit Unterstützung von Dr. Sabine Metzger am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Die Peptide wurden in 4% (v/v) Methanol, 1% (v/v) Ameisensäure gelöst, über C18ZipTips (Millipore) entsalzt und anschließend mit 60% (v/v) Methanol, 1% (v/v) Ameisensäure eluiert. Die Sequenzierung der Peptide erfolgte unter Verwendung eines ESI-QqTOF-MS/MS (Applied Biosystems QSTAR® XL), indem zunächst Übersichtsspektren im Massenbereich von 350-1300 m/z aufgenommen wurden. Zweifach und dreifach geladene Peptide, sogenannte Vorläufer-Ionen, wurden durch kollisionsinduzierten Zerfall (*collision induced dissociation*, CID) fragmentiert und die daraus resultierenden Fragmentspektren zur Sequenzierung benutzt. Die Auswertung der Sequenzierungen erfolgte mit der Software Analyst® QS 1.1 (Applied Biosystems). Erhaltene Peptidsequenzen konnten durch die MASCOT-Datenbank (www.matrixscience.com) oder durch BLAST-Suche in der *Trichomonas vaginalis*-Datenbank TrichDB (www.trichdb.org) identifiziert werden.

4.10.10. N-terminale Markierung von hydrogenosomalen Matrixproteinen mittels Subtiligase

Um die N-Termini von hydrogenosomalen Proteinen zu untersuchen, wurde eine auf dem modifizierten Enzym Subtiligase basierende Methode verwendet. Das Enzym Subtiligase wurde durch Modifikation einiger Aminosäure-Positionen aus der endogenen Serinprotease Subtilisin entwickelt und erhielt dadurch die Fähigkeit, mit einem Ester verbundene Peptide spezifisch an freie N-Termini von Proteinen zu ligieren (Chang et al. 1994). Die Verwendung einer Biotin-Markierung an diesen Substraten ermöglicht eine gezielte Markierung der N-Termini der zu untersuchenden Proteine und schafft so die Voraussetzungen für deren Isolierung und Sequenzierung (Mahrus et al. 2008).

Das Enzym Subtiligase wurde in *B. subtilis* exprimiert und anschließend isoliert und gereinigt (Kapitel 4.8.9). Als Substrat für das Enzym diente ein Peptidester (Abbildung 4.2 A), der von Dr. Sabine Metzger (BMFZ, Düsseldorf) synthetisiert wurde. Die Aminosäuresequenz des Peptids ($K_{\text{Biotin}}\text{GGTENLYFQSY}_{\text{Ester}}$) enthält neben der Reaktionsstelle der Subtiligase zusätzlich eine Schnittstelle für eine TEV-Protease, die nach erfolgreicher Isolierung der N-terminalen Peptide dazu genutzt werden kann, die Biotin-Markierung zu entfernen. Dabei verbleibt ein Rest von zwei Aminosäuren (Serin und Tyrosin,

SY) des Substrats an den isolierten Peptiden. Diese Markierung dient zur Identifizierung spezifisch isolierter N-Termini während der Proteinsequenzierung im Massenspektrometer. Abbildung 4.2 B gibt einen schematischen Überblick über den generellen Arbeitsablauf der N-terminalen Markierung. Nach der Ligation des Substrats an die N-Termini der zu untersuchenden Proteine werden diese in Lösung mit Trypsin gespalten. Die markierten N-Termini werden durch immobilisiertes Avidin von den restlichen Peptiden separiert und können so gezielt im Massenspektrometer sequenziert werden, nachdem die Biotin-Markierung durch die TEV-Protease abgespalten wurde.

Für alle durchgeführten N-terminalen Markierungen wurden hydrogenosomale Matrixproteine verwendet. Aus dem *T. vaginalis* Stamm T1 isolierte Hydrogenosomen (Kapitel 4.8.4) wurden in Membranen und Matrixproteine getrennt (Kapitel 4.10.2) und die Matrixproteine anschließend durch Aceton/TCA-Fällung präzipitiert (Kapitel 4.10.4).

Um die Aktivität der Subtiligase zu überprüfen und somit den experimentellen Beweis für die generelle Durchführbarkeit der Methode (engl. *proof of principle*) zu erbringen, wurden sogenannte *small scale*-Ligationen, basierend auf einem Protokoll von (Yoshihara et al. 2008) durchgeführt. Yoshihara und Kollegen haben diese Ligationen in kleinem Maßstab entwickelt, um neu entwickelte Substrate zu testen. Um eine *small scale*-Ligation durchzuführen, wurden 250-300 µg hydrogenosomale Matrixproteine in SM-Puffer mit 10 mM DTT versetzt und bei 45°C für 45 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 6 mM Iodacetamid über Nacht bei 4°C alkyliert. Die N-terminale Markierung der Proteine erfolgte in SM-Puffer und 10% (v/v) DMSO, 1 mM Substrat und 1 µM Subtiligase für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach der Ligation wurde zur Hälfte der Probe 100 U TEV-Protease hinzugefügt und für fünf Stunden bei 4°C inkubiert. Abschließend wurden beide Proben mit 5x Laemmli-Puffer versetzt und die behandelten Proteine durch eine SDS-PAGE getrennt (Kapitel 4.10.5). Dabei wurde zusätzlich eine Kontrolle mit unbehandelten hydrogenosomalen Matrixproteinen aufgetragen. Die getrennten Proteine wurden durch einen Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Kapitel 4.10.7), um biotinylierte Proteine mittels eines αBiotin-Antikörpers nachweisen zu können. Dafür wurde die Membran nach Blockieren freier Bindungsstellen für eine Stunde mit dem Erstantikörper (Rabbit anti-Biotin polyclonal antibody (Abcam), 1:500 in 10% (w/v) Magermilchpulver in TBS) inkubiert. Als Zweitantikörper wurde Immunopure goat anti-rabbit (1:10000 in 10% (w/v) Magermilchpulver in TBS) verwendet. Die Detektion der markierten Proteine erfolgte wie in Kapitel 4.10.7 beschrieben.

Nach erfolgtem Test der Aktivität der isolierten Subtiligase konnte das Enzym für N-terminale Markierung in größerem Maßstab verwendet werden. Dabei wurden zwei

verschiedene Protokolle verwendet, um die Methode der Subtiligase für hydrogenosomale Proteine zu etablieren.

Bei der N-terminalen Markierung der hydrogenosomalen Matrixproteine, basierend auf dem Protokoll von Mahrus und Kollegen (Mahrus et al. 2008), wurde das aus der Präzipitation der hydrogenosomalen Matrixproteine erhaltene Pellet in 100 mM Bicine, pH 8,5 gelöst. Der Reaktionsansatz bestand aus 200-500 μg Protein in 100 mM Bicine, pH 8,5; 2 mM DTT, 10% (v/v) DMSO, 1 mM Substrat (Peptidester) und 1 μM Subtiligase. Die Reaktion wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid (GuHCl) denaturiert, anschließend durch 2 mM DTT reduziert und für 15 Minuten bei 95 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 6 mM Iodacetamid hinzugefügt, um die Proteine zu alkylieren (1 h Inkubation im Dunkeln). Um überschüssiges Substrat zu entfernen, wurde die gesamte Probe auf eine Gelfiltrationssäule (Sephacryl S 200 HR, GE Healthcare) aufgetragen und mit 100 mM Bicine, 200 mM NaCl, 1 M GuHCl filtriert. Die gesammelten Proteinfractionen wurden vereinigt, mit 20 mM CaCl_2 versetzt und für 12-16 h mit Trypsin behandelt (in Lösung-Spaltung, Kapitel 4.10.8). Die mit Biotin markierten N-Termini wurden mittels Streptavidin-überzogener magnetischer Kügelchen (μMACS Streptavidin-Kit, Miltenyi Biotec) isoliert. Dazu wurde die Probe zunächst für 15-60 Minuten mit den magnetischen Kügelchen inkubiert. Anschließend wurden die gebundenen N-terminalen Peptide isoliert, indem die Kügelchen durch einen Magneten (μMACS Separator, Miltenyi Biotec) aus dem Proteingemisch isoliert wurden. Durch mehrmaliges Waschen mit 100 mM Bicine wurden unspezifisch gebundene Peptide entfernt. Abschließend wurden die isolierten Peptide mit 100 U TEV-Protease über Nacht bei 4°C inkubiert, um die Biotin-Markierung zu entfernen und die Peptide so von den magnetischen Kügelchen zu trennen. Durch erneute Separation der Probe über einen Magneten können die Peptide isoliert werden, da die magnetischen Kügelchen in der Säule verbleiben, die Peptide befinden sich im Durchfluss und können so gesammelt werden. Abschließend wurden die Peptide in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und bis zur weiteren Untersuchung im Massenspektrometer bei -20°C gelagert.

Um die N-terminale Markierung nach der von Agard und Kollegen verwendeten Methode durchzuführen (Agard et al. 2010), wurden die hydrogenosomalen Matrixproteine in 100 mM Ammoniumbicarbonat gelöst. Der Ligationsansatz bestand aus 300 μg Protein in 100 mM Ammoniumbicarbonat, 1 mM DTT, 10% (v/v) DMSO, 1 mM Substrat und 1 μM Subtiligase. Die Probe wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde direkt eine Gelfiltration in 100 mM Ammoniumbicarbonat durchgeführt. Die erhaltenen Proteinfractionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Anschließend wurden die Proteine in 6 M GuHCl, 100 mM Bicine, 10 mM DTT resuspendiert und für 10 Minuten bei 100°C denaturiert.

Danach erfolgte eine Alkylierung der Proteine mit 25 mM Iodacetamid für eine Stunde bei Raumtemperatur. N-Terminal markierte Proteine wurden durch Bindung der Biotin-Markierung an Streptavidin-beschichtete magnetische Kügelchen über einen Magneten isoliert und zweimal mit 4 M GuHCl und zweimal mit 100 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen. Anschließend wurden 5 mM CaCl₂ und Trypsin zu der Lösung (inklusive magnetischer Kügelchen) zugefügt und der Ansatz für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Alle tryptisch-generierten Peptide wurden durch Separieren über die Kügelchen entfernt, so dass nur noch die markierten N-Termini an diesen verblieben. Abschließend wurde die Biotin-Markierung durch Zugabe von 100 U TEV-Protease über Nacht bei 4°C entfernt, die N-terminalen Peptide durch eine Vakuumzentrifuge getrocknet und bei -20°C gelagert.

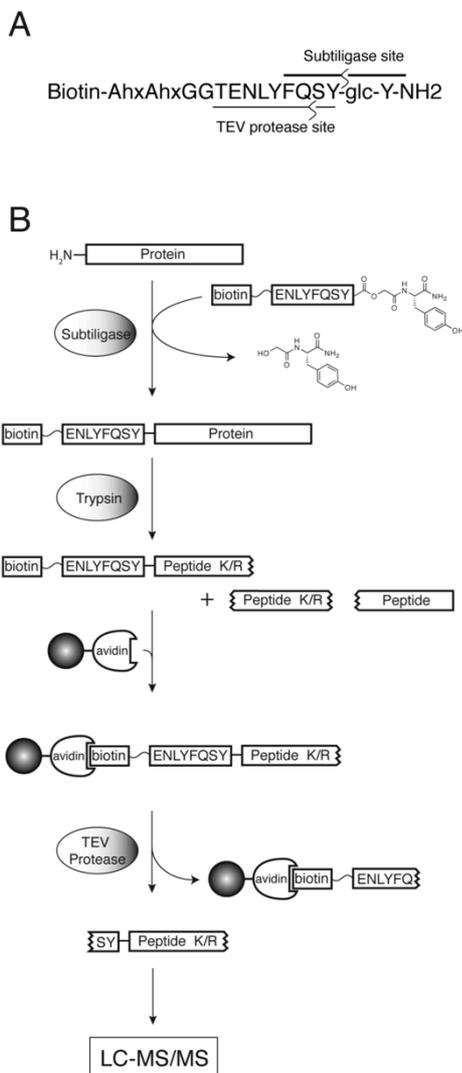


Abbildung 4.2: **A** Struktur des Peptidester-Prototypens mit Lignationsstelle der Subtiligase und TEV-Protease-Restriktionsstelle. Ahx = 6-Aminohehexanoyl, glc = Glycoloyl. **B** Arbeitsablauf zur N-terminalen Markierung von Proteinen durch Verwendung der Subtiligase. Aus Yoshihara et al. 2008.

5. Ergebnisse

5.1. Globale Analyse der N-Termini reifer hydrogenosomaler Matrixproteine

Die umfassende Charakterisierung des mitochondrialen N-Proteoms, also der Gesamtheit aller mitochondrialen N-Termini, brachte zahlreiche neue Erkenntnisse über die mitochondrialen Transitsequenzen, deren Prozessierung und daran beteiligte Enzyme. So konnte im Rahmen dieser Studie mit Icp55 eine bis dahin unbekannte Protease identifiziert werden, die zur Proteinstabilität der importierten Proteine beiträgt (Voegtle et al. 2009). Etwa die Hälfte aller vorhergesagten hydrogenosomalen Proteine besitzt ebenfalls N-terminale Transitsequenzen (Burstein et al. 2012). Obwohl mit einer Protease in der Matrix der Hydrogenosomen ein Homolog der mitochondrialen Prozessierungs-Protease MPP identifiziert werden konnte (Brown et al. 2007; Smíd et al. 2008), gibt es nur vereinzelte Studien über die Prozessierung hydrogenosomaler Proteine (z.B. SCS, PFOR; Dyall und Johnson 2000). Deshalb sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine globale Analyse der N-Termini reifer hydrogenosomaler Matrixproteine durchgeführt werden, um das hydrogenosomale N-Proteom von *Trichomonas vaginalis* zu erstellen. Dazu sollte die 2008 von Mahrus und Kollegen entwickelte Methode basierend auf dem modifizierten Protein Subtiligase angewendet werden, die eine gezielte Markierung der N-Termini und somit ihre Isolierung aus einem Proteingemisch und anschließende Sequenzierung im Massenspektrometer ermöglicht, indem das Enzym freie Aminogruppen der N-Termini mittels Acylierung unter Verwendung von biotinylierten Peptid-Estern als Substrat mit Biotin markiert (Chang et al. 1994; Mahrus et al. 2008; Yoshihara et al. 2008).

5.1.1. Expression und Isolierung der Subtiligase

Die Methode zur N-terminalen Markierung von Proteinen durch einen biotinylierten Peptidester beruht auf dem Enzym Subtiligase. Der erste Schritt, um diese Methode anwenden zu können, bestand folglich in der Expression und Isolierung des Enzyms (Kapitel 4.8.9).

Bacillus subtilis konnte erfolgreich mit dem Plasmid pPW04, das die codierende Sequenz der Subtiligase enthielt, transformiert werden (Kapitel 4.8.8). Da *B. subtilis* exprimierte Proteine in das Medium sekretiert (Doi und Wang 1986; Chang et al. 1987), wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und der Kulturüberstand für die Isolierung der Subtiligase verwendet (Kapitel 4.8.9). Die im Medium enthaltenen Proteine wurden durch Ammoniumsulfat und Ethanol präzipitiert. Weitere Verunreinigungen, wie zum Beispiel durch

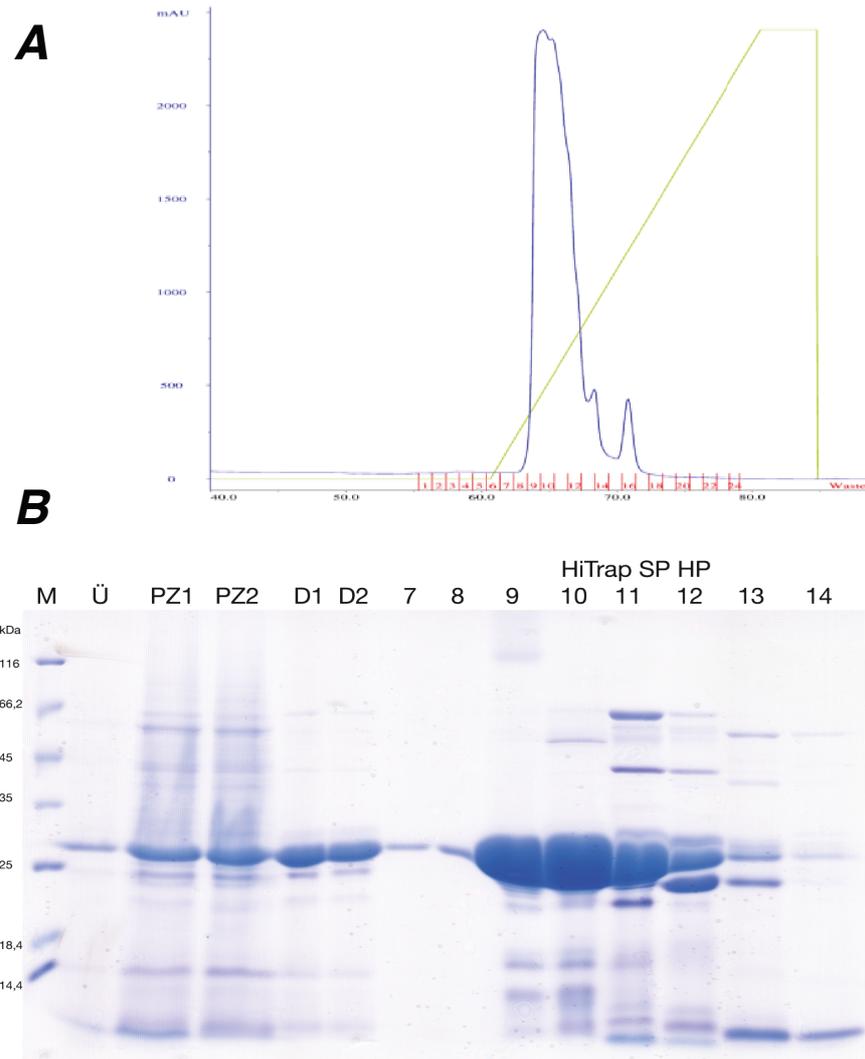


Abbildung 5.1: **A** Spektrum der Ionenaustausch-Chromatographie. Die auf der Säule enthaltenen Proteine werden durch einen linearen Salzgradienten (NaCl, grüne Linie) eluiert, was durch Messen der Absorption (mAU, blaue Linie) verfolgt wird. Die eluierten Proteine wurden in Fraktionen von jeweils 1 ml gesammelt (rot). **B** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der Reinigungsschritte zur Isolierung der Subtiligase: **Ü** Überstand der pelletierten Kultur; **PZ 1** und **2** Präzipitationen; **D1** und **2** Dialyseschritte; **HiTrap SP HP 7-14** gesammelte Fraktionen während der Ionenaustauschchromatographie. Aufgetragen wurden jeweils 40 μ l. **M** Größenmarker (Fermentas).

Medium-Rückstände, wurden durch Dialyse der Proteinlösung gegen 25 mM NaOAc pH 4,5; 5 mM DTT entfernt. Um die Probe weiter zu konzentrieren und zu reinigen, wurde eine Ionenaustauschchromatographie über eine HiTrap SP HP-Säule (GE Healthcare) durchgeführt. Nach einigen Waschschritten wurden die isolierten Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten von der Säule eluiert. Erwartet wurde, dass Subtiligase bereits bei einer NaCl-Konzentration von etwa 100 μ M eluiert (Protokoll Mahrus). Es wurde ein NaCl-Gradient über einen Zeitraum von 20 Minuten bis zu einer finalen Konzentration von 1 M NaCl durchgeführt. Abbildung 5.1 A zeigt das FPLC-Spektrum der durchgeführten

Chromatographie. Tatsächlich konnte die Subtiligase bereits bei einer geringen NaCl-Konzentration (grüne Linie) eluiert werden, wie durch den starken Anstieg der Absorption (mAU, blaue Linie) nachgewiesen werden konnte. Alle isolierten Proteine wurden in Fraktionen von jeweils 1 ml gesammelt, die anschließend auf einer SDS-PAGE überprüft wurden. Abbildung 5.1 B zeigt das Coomassie-gefärbte SDS-Gel (Kapitel 4.10.6), die neben den Fraktionen der Chromatographie auch die Reinigungsschritte der Isolierung zeigt. Bereits im Überstand (Ü) der *Bacillus*-Kultur ist eine deutliche Bande bei ca. 27 kDa zu erkennen, was der Größe der Subtiligase entspricht. In den präzipitierten Proben (PZ1 und 2) wird diese Bande deutlich stärker, es sind allerdings auch weitere Banden sichtbar, die durch die durchgeführte Dialyse (D1 und 2) aber weitestgehend entfernt werden konnten. Alle während der Chromatographie gesammelten Fraktionen (7-14) enthalten ebenfalls die teilweise sehr starke Proteinbande bei ca. 27 kDa, allerdings auch weitere Banden, die auf Verunreinigungen oder Abbauprodukte hindeuten. Die Fraktionen 9 bis 12 enthielten die größte Ausbeute an überexprimiertem Protein und konnten deswegen für die weitere Isolierung der Subtiligase genutzt werden, indem sie vereint und auf ein Volumen von 0,5 ml konzentriert wurden. Die konzentrierte Proteinprobe wurde durch eine Gelfiltrationschromatographie gereinigt, um ausschließlich das Enzym Subtiligase zu isolieren. Die Chromatographie wurde mit Hilfe einer Sephacryl S-200 HR-Säule (GE Healthcare) in 100 mM Bicine, pH 8,5; 5 mM DTT bei einer Flussrate von 0,5 ml/min über Nacht durchgeführt. Eluierte Proteine wurden in Fraktionen von jeweils 1,5 ml gesammelt. Abbildung 5.2 A zeigt das Spektrum der durchgeführten Gelchromatographie. Fraktionen, die Protein enthielten (Fraktionen 49-62) wurden auf einer SDS-PAGE überprüft, indem von jeder Fraktion ein festes Aliquot (40 μ l) aufgetragen wurde. Abbildung 5.2 B zeigt das Coomassie-gefärbte SDS-Gel der erhaltenen Gelfiltrationschromatographie-Fraktionen. Dabei zeigte sich, dass nur die Fraktionen 51-60 tatsächlich Protein enthielten. Im Gegensatz zur Ionenaustauschchromatographie war aber jeweils nur noch eine Proteinbande sichtbar. Die Protein-enthaltenden Fraktionen 51-60 wurden vereint und konzentriert. Die Konzentration des isolierten Enzyms wurde photometrisch bestimmt und die Probe anschließend in Aliquots von jeweils 100 μ M aufgeteilt, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer späteren Verwendung für N-terminale Markierungen von hydrogenosomalen Matrixproteinen bei -80°C gelagert wurden.

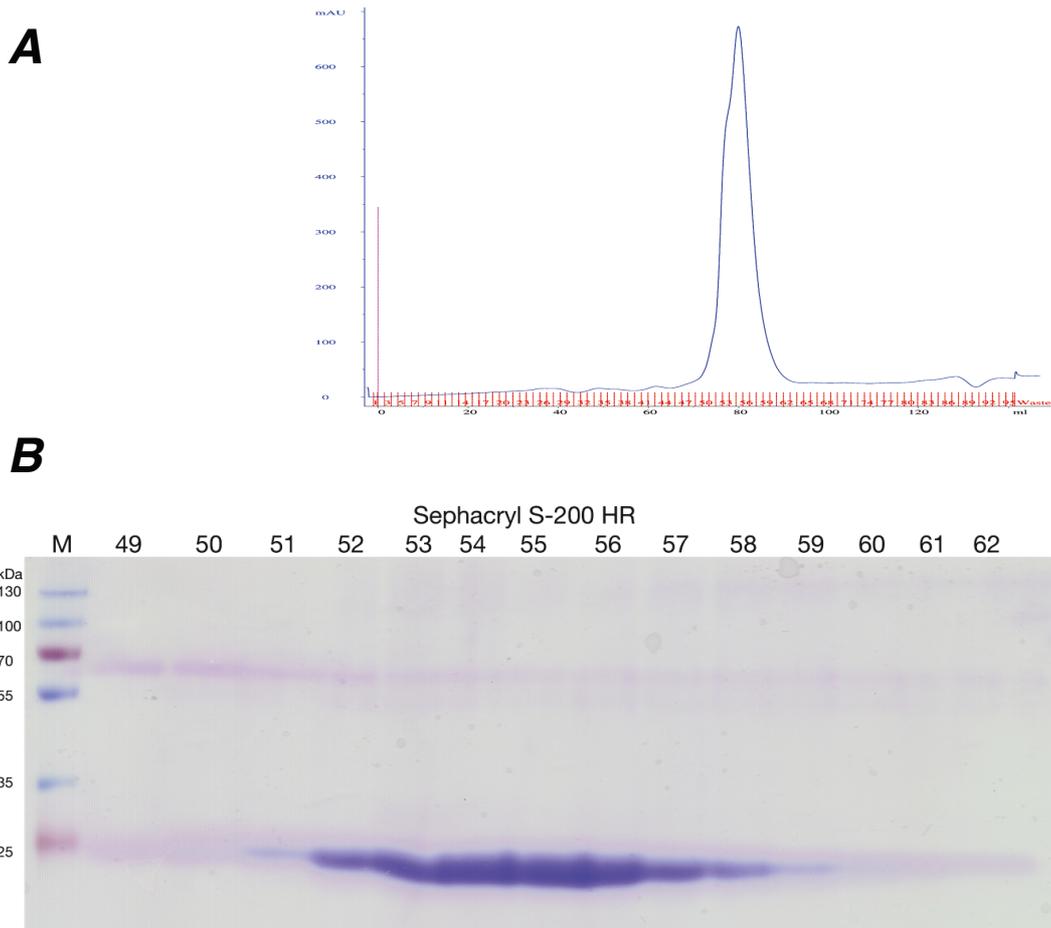


Abbildung 5.2: **A** Spektrum der Gelfiltrations-Chromatographie. Die blaue Linie entspricht der gemessenen Absorption (mAU) und zeigt so die eluierten Proteine an, die in Fraktionen von jeweils 1,5 ml (rot) gesammelt wurden. Der Zeitpunkt der Injektion der Probe auf die Gelfiltrationssäule ist in pink dargestellt. **B** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der durch die Gelchromatographie erhaltenen **Fraktionen 49-62**. Aufgetragen wurden jeweils 40 μ l jeder Fraktion. (**M** PageRuler™ Plus Prestained #26619 , Thermo Scientific).

5.1.2. Proteinsequenzierung der Subtiligase im Massenspektrometer

Da die gewählte Methode zur N-terminalen Markierung der zu untersuchenden Proteine auf dem modifizierten Enzym Subtiligase basiert, war die eindeutige Identifizierung des exprimierten Proteins von großer Bedeutung. Deshalb sollte das isolierte Protein im Massenspektrometer sequenziert werden. Um die Sequenzierung zu ermöglichen, wurde eine tryptische In-Lösung-Spaltung des isolierten Proteins durchgeführt (Kapitel 4.10.8). Die erhaltenen tryptischen Peptide wurden entsalzt und anschließend im Massenspektrometer durch kollisionsinduzierten Zerfall fragmentiert, die daraus resultierenden Fragmentspektren wurden zur Sequenzierung der Peptide benutzt (Kapitel 4.10.9).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ala	Gln	Ser	Val	Pro	Tyr	Gly	Val	Ser	Gln	Ile	Lys	Ala	Pro	Ala	Leu	His	Ser	Gln	Gly
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Tyr	Thr	Gly	Ser	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Val	Ile	Asp	Ser	Gly	Ile	Asp	Ser	Ser	His	Pro
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Asp	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Ser	Phe	Val	Pro	Ser	Glu	Thr	Asn	Pro	Phe	Gln	Asp
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Asn	Asn	Ser	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Asp	Asn	Ser	Ile	Gly
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Val	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Ser	Gly	Gln	Tyr	Ser	Trp	Ile	Ile	Ser	Gly	Ile	Glu	Trp	Ala	Ile	Ala	Asn	Asn	Met	Asp
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
Val	Ile	Asn	Leu	Ala	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Gly	Ser	Ala	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Asp
141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
Lys	Ala	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Val	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Glu	Gly	Thr	Ser	Gly
161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Gly	Tyr	Pro	Gly	Lys	Tyr	Pro	Ser	Val	Ile	Ala	Val	Gly	Ala	Val
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
Asp	Ser	Ser	Asn	Gln	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Ser	Val	Gly	Pro	Glu	Leu	Asp	Val	Met	Ala
201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
Pro	Gly	Val	Ser	Ile	Gln	Ser	Thr	Leu	Pro	Gly	Asn	Arg	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Ser	Gly	Thr
221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
Cys	Met	Ala	Ser	Ala	His	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Leu	Ile	Leu	Ser	Lys	His	Pro	Asn
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
Trp	Thr	Asn	Thr	Gln	Val	Arg	Ser	Ser	Leu	Glu	Asn	Thr	Thr	Thr	Lys	Leu	Gly	Asp	Ser
261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275					
Phe	Tyr	Tyr	Gly	Lys	Gly	Leu	Ile	Asn	Val	Gln	Ala	Ala	Ala	Gln					

Abbildung 5.3: Aminosäuresequenz der Subtiligase. Sequenzierte Peptide sind grau hinterlegt. Blau: Stabilisierende Mutationen. Rot spezifische Aminosäure-Modifikationen der Subtiligase.

Die Sequenzierung der Peptide ergab eine Sequenzabdeckung von ca. 50%, es konnten sieben von insgesamt 14 tryptisch generierten Peptiden sequenziert und identifiziert werden (Abbildung 5.3). Dabei konnten Peptide aus allen Sequenzbereichen des Proteins identifiziert werden. Das modifizierte Enzym basiert auf der endogenen Serinprotease Subtilisin und unterscheidet sich nur in wenigen Aminosäurepositionen von dem ursprünglichen Enzym. An Position 221 wurde ein für die ursprüngliche Amidase-Aktivität katalytisches Serin durch Cystein ersetzt (S221C), an Position 225 wurde Prolin durch Alanin ersetzt (P225A; (Abrahmsén et al. 1991). Diese Modifikationen sind in Abbildung 5.3 in rot dargestellt. Weitere stabilisierende Mutationen sind blau markiert.

5.1.3. Experimenteller Nachweis der generellen Anwendbarkeit der gewählten Methode

Um die Funktion der Subtiligase zu testen und experimentell nachzuweisen, dass die Methode der N-terminalen Markierung von hydrogenosomalen Matrixproteinen durch die Subtiligase generell anwendbar ist, wurde eine sogenannte *small scale*-Ligation durchgeführt (Kapitel 4.10.10). Dazu wurden 250 μg hydrogenosomale Matrixproteine denaturiert, reduziert und alkyliert und mittels der Subtiligase N-terminal markiert. Die Hälfte der Probe wurde anschließend mit der TEV-Protease behandelt, um nachzuweisen, dass die N-terminale Markierung entfernt werden kann. Die Proben wurden durch eine SDS-PAGE getrennt (Kapitel 4.10.5), auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und die Biotin-Markierung durch einen α Biotin-Antikörper nachgewiesen (Kapitel 4.10.7). Eine weitere Probe von unbehandelten hydrogenosomalen Matrixproteinen diente als Kontrolle, dass spezifisch biotinylierte Proteine nachgewiesen werden konnten. Abbildung 5.4 zeigt das Ergebnis der Immunodetektion der behandelten Matrixproteine. In der Kontrolle (K) konnten keine Proteine durch den α Biotin-Antikörper detektiert werden. Die Probe der durch die Subtiligase markierten und so biotinylierten Proteine (B) zeigt starke Signale, klare Banden konnten bei einer Größe von etwa 35 kDa und 70-100 kDa beobachtet werden. In der Spur der mit der TEV-Protease behandelten Probe wurden ebenfalls biotinylierte Proteine nachgewiesen, die Signale sind allerdings deutlich schwächer als in Probe B.

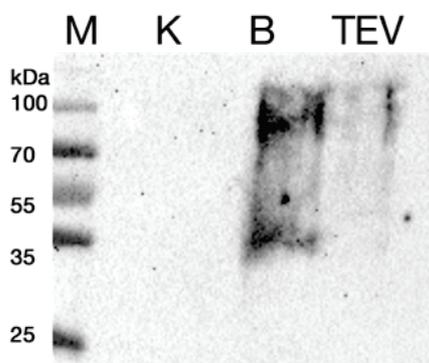


Abbildung 5.4: Immunodetektion der small-scale Biotinylierung mittels eines α Biotin-Antikörpers. In der Subtiligase-behandelten Probe (**B**) konnten deutliche Biotin-Signale detektiert werden, die nach TEV-Protease-Behandlung (**TEV**) kaum noch detektierbar waren. In der Kontrolle (unbehandelte hydrogenosomale Matrixproteine, **K**) konnten keine biotinylierten Proteine nachgewiesen werden. Aufgetragen wurden jeweils 125 μg Protein, Marker **M**.

5.1.4. N-terminale Biotinylierung hydrogenosomaler Matrixproteine

Da durch die *small scale*-Ligation mit anschließender Immunodetektion der biotinylierten Proteine der Nachweis der generellen Aktivität der Subtiligase und Anwendbarkeit der Methode auf hydrogenosomale Proteine erfolgreich war, konnte das isolierte Enzym für N-terminale Markierungen der hydrogenosomalen Matrixproteine in größerem Maßstab eingesetzt werden.

Für die Durchführung der Markierung wurden zwei unterschiedliche Protokolle angewendet, um verschiedene Abläufe und Konditionen zu testen. Bei der N-terminalen Markierung der Proteine nach der von Mahrus (2008) verwendeten Methode, fand die Reaktion in 100 mM Bicine statt (Kapitel 4.10.10). Es wurden maximal 500 μg hydrogenosomale Matrixproteine eingesetzt. Nach der Markierungsreaktion wurden die Proteine denaturiert, reduziert und alkyliert und wurden anschließend über eine Gelfiltrationssäule konzentriert, um überschüssiges Substrat zu entfernen. Abbildung 5.5 A zeigt beispielhaft ein Spektrum dieser Gelfiltration. Es ist zu erkennen, dass es mehrere Höchstpunkte (engl. *peak*) während der Elution der Proteine gibt. Da es sich um eine Größenausschluss-Chromatographie handelt, ist anzunehmen, dass es sich bei dem kleineren Peak um separiertes Substrat handelt. Die gesammelten Proteine (Peak 2-4) wurden mit Trypsin in Peptide gespalten, so dass anschließend mittels magnetischer Streptavidin-überzogener Kügelchen ausschließlich die Biotin-markierten N-terminalen Peptide isoliert werden sollten. Diese wurden über Nacht mit 100 U TEV-Protease inkubiert, um das Biotin über die TEV-Restriktionsstelle innerhalb des Substrats zu entfernen. Die Biotin-Markierung verbleibt dabei an den magnetischen Kügelchen und kann so von den isolierten N-terminalen Peptiden separiert werden. Die Peptide wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend im Massenspektrometer sequenziert (Kapitel 4.10.9).

Die N-terminale Markierung nach Agard et al. (2010) wurde in 100 mM Ammoniumbicarbonat durchgeführt (Kapitel 4.10.10). Es wurden 300 μg hydrogenosomale Matrixproteine eingesetzt. Nach der Ligation wurde eine Gelfiltration durchgeführt und die Proteine anschließend denaturiert und alkyliert. Die gesamte Probe wurde dann mit den magnetischen Kügelchen inkubiert und mit Trypsin gespalten. Die N-terminal markierten Peptide wurden anschließend über einen Magneten aus der Probe isoliert und über Nacht mit der TEV-Protease behandelt, um die Markierung zu entfernen und die Peptide so von den magnetischen Kügelchen zu separieren. Die isolierten Peptide wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und ebenfalls im Massenspektrometer sequenziert.

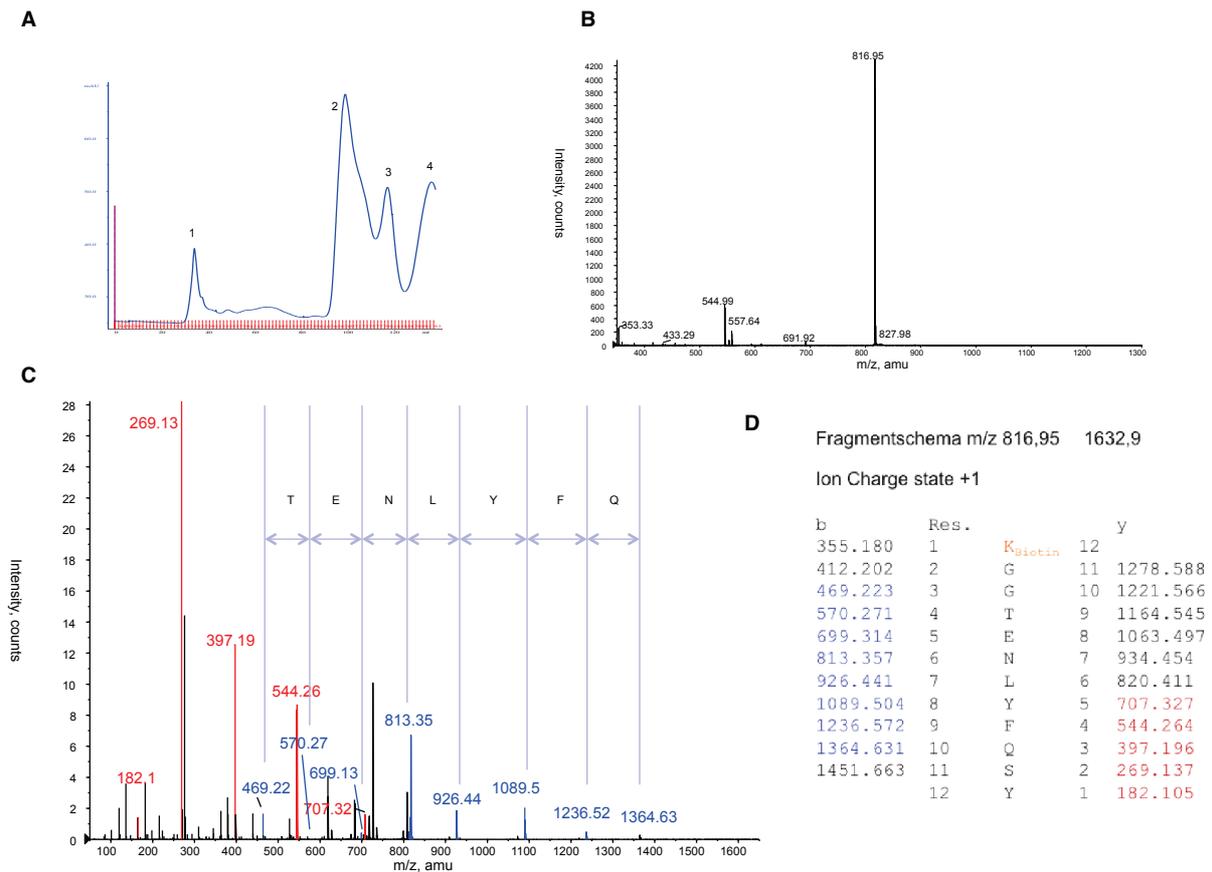


Abbildung 5.5: N-terminale Markierung hydrogenosomaler Proteine. **A** Spektrum der Größenausschluss-Gelfiltration zur Separation von überschüssigem Substrat aus der Proteinprobe. Nach Injektion der Probe auf die Säule (pinke Linie) konnte anhand der gemessenen Absorption (mAU, blau) die Elution der Proteine verfolgt werden, die in Fraktionen von je 1,5 ml (rot) gesammelt wurden. Die gesammelten Fraktionen 1-4 wurden für die weitere Sequenzierung mittels des Massenspektrometers (MS) verwendet. **B** Das Übersichtsspektrum TOF-MS (*time of flight*-MS) der FPLC-Fraktion 2 zeigt ein zweifach-geladenes Peptid mit einer Masse von $m/z = 816,95 [M+2H]^{2+}$ (Masse zu Ladungs-Verhältnis). **C** *De novo* Sequenzierung des $m/z = 816,95$ Peptids. Durch Kollisions-induzierten Zerfall des Peptids konnte die Aminosäuresequenz durch die b-Ionen- (blau) und y-Ionen-Serien (rot) ermittelt werden. **D** Fragmentschema des sequenzierten Peptids $m/z 816,95 [M+2H]^{2+}$. Identifizierte Ionen der b- bzw. y-Serie sind in blau bzw. rot markiert.

Im Rahmen der Sequenzierung stellte sich unabhängig von der angewandten Methode heraus, dass es sich bei den isolierten Proben nicht um Peptide der hydrogenosomalen Proteine, sondern lediglich um das eingesetzte Substrat handelte. Abbildung 5.5 zeigt eine Übersicht der erhaltenen Ergebnisse. Nach Separation der markierten hydrogenosomalen Proteine von überschüssigem Substrat mittels Größenausschluss-Chromatographie konnten vier Ausschläge in der gemessenen Absorption festgestellt werden (Abbildung 5.5 A). Die gesammelten Fraktionen wurden vereinigt und zur weiteren Sequenzierung (Kapitel 4.10.9) mittels Massenspektrometrie verwendet. Abbildung 5.5 B zeigt ein ESI-MS Übersichtsspektrum der Fraktion 2. Es konnten einige Peptide mit verschiedenen Massen

beobachtet werden, besonders deutlich trat aber vor allem das zweifach-geladene Peptid mit einer Masse von $m/z = 816,95 [M+2H]^{2+}$ auf. Eine *de novo* Sequenzierung dieses Peptids zeigte, dass es sich dabei um das eingesetzte Substrat handelt (Abbildung 5.5 C). Durch Identifizierung der verschiedenen Ionen-Serien (b- bzw. y-Ionen) konnte die Sequenz des Peptidesters ($K_{\text{Biotin}}\text{GGTENLYFQSYY}_{\text{Ester}}$, 1852,821 Dalton $[M+H]^+$) fast vollständig abgedeckt werden (Abbildung 5.5 D). Dem identifizierten Peptid, das eine Größe von $m/z = 1632,9 [M+H]^+$ aufwies, fehlt lediglich das abschließende Tyrosin (Y_{Ester}), über das der Ester mit der Peptidsequenz verbunden ist, es handelt sich folglich um eine hydrolysierte Form des Substrats. Auch weitere identifizierte Peptide konnten lediglich als unterschiedlich modifizierte Formen des Substrats identifiziert werden. So entspricht das ebenfalls zweifach-geladene Peptid mit einer Masse von $m/z = 691,92 [M+2H]^{2+}$ einer stärker hydrolysierten Form des Substrats, der die abschließenden Aminosäuren $\text{SYY}_{\text{Ester}}$ fehlen (Abbildung 8.2, Anhang). Bei dem Peptid mit einer Masse von $m/z = 827,98 [M+2H]^{2+}$ handelt es sich um das Substrat mit einer zusätzlichen Natrium-Anlagerung (Abbildung 8.3, Anhang). Auch die Peptide mit einer geringeren Masse konnten nicht als hydrogenosomale N-Termini identifiziert werden. Abbildung 5.5 zeigt beispielhaft eine Sequenzierung der isolierten Fraktion 2, bei den isolierten Fraktionen 3 und 4 zeigte sich allerdings das gleiche Bild, es konnten lediglich verschiedene Formen des eingesetzten Substrats identifiziert werden, in keiner Fraktion konnten hydrogenosomale Proteine detektiert werden (Abbildung 8.1, Anhang). In Fraktion 1 konnten keine Peptide identifiziert werden. Mehrmalige Wiederholungen lieferten stets das gleiche Resultat.

5.2. Untersuchung der Konformationsabhängigkeit des hydrogenosomalen Proteinimports

Eilers und Schatz konnten 1986 zeigen, dass die Linearisierung von mitochondrialen Vorläuferproteinen essentiell für den Import in die Mitochondrien ist (Eilers und Schatz 1986). Der Import eines Fusionsproteins aus einer mitochondrialen Präsequenz und der murinen Dehydrofolatreduktase (mDHFR) wurde in Anwesenheit eines Folat-Antagonisten wie z.B. Methotrexat, der DHFR in seiner gefalteten Konformation stabilisiert, inhibiert. Erkenntnisse über die Konformationsabhängigkeit des hydrogenosomalen Imports fehlen bislang, so dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit mDHFR als Markerprotein benutzt werden sollte, um die Konformation importierter hydrogenosomaler Proteine zu untersuchen. Um den Import des eigentlich cytosolischen Proteins in die Hydrogenosomen zu ermöglichen, wurde ein Fusionsprotein aus mDHFR und einer hydrogenosomalen Transitsequenz (HTS) hergestellt (HTS*DHFR). Als HTS wurde die Transitsequenz der Thioredoxin-Reduktase 1 (TrxRh1, TVAG_281360) ausgewählt, da es sich bei dieser HTS um die bislang einzige bekannte essentielle Transitsequenz handelt. Nach Deletion ihrer HTS (10 AS, *MFSIIFSRFS*) wurde TrxRh1 nicht mehr in die Hydrogenosomen importiert, im Gegensatz zu vielen anderen hydrogenosomalen Proteinen, deren HTS nicht essentiell notwendig für den Import sind (Mentel et al. 2008; Zimorski et al. 2013).

5.2.1. Verifizierung der DHFR-Lokalisation in *T. vaginalis*

Um HTS*DHFR als Reporterprotein für die Untersuchung der Konformationsabhängigkeit des hydrogenosomalen Proteinimports nutzen zu können, musste zunächst der Import des Fusionsproteins in die Hydrogenosomen nachgewiesen werden. Als Kontrolle sollte zusätzlich die Lokalisation der mDHFR verifiziert werden, da es sich um ein Protein handelt, das endogen nicht in *T. vaginalis* vorkommt. Im Ursprungsorganismus (*Mus Musculus*) handelt es sich bei DHFR um ein cytosolisches Protein.

Zur Verifizierung der Lokalisation von mDHFR und HTS*DHFR wurden transfizierte *T. vaginalis* Kulturen subzellulär fraktioniert (Kapitel 4.8.4) und die isolierten Fraktionen Gesamtzellextrakt (GZ), Cytosol und Hydrogenosomen für Immunodetektionen der C-terminal HA-markierten Proteine genutzt (Kapitel 4.10.7). Im Fall der HTS*DHFR wurden die isolierten Hydrogenosomen zusätzlich einer Proteinase K-Behandlung unterzogen, um den Proteinimport zu verifizieren (Kapitel 4.10.3). Abbildung 5.6 A zeigt das Ergebnis der Immunodetektion. mDHFR konnte im Gesamtzellextrakt und Cytosol der Zellen detektiert werden und nicht in den Hydrogenosomen. HTS*DHFR konnte dagegen auch in den Hydrogenosomen detektiert werden und ist in der Proteinase K-Behandlung vor Abbau durch

die Proteinase geschützt, erst in Anwesenheit von Triton X-100 wurde kein Signal mehr beobachtet. Die Reinheit der isolierten Fraktionen wurde zusätzlich durch Detektion eines hydrogenosomalen Markerproteins überprüft (Abbildung 8.3, Anhang).

Zusätzlich wurden Immunofluoreszenz-Assays durchgeführt, um die zu untersuchenden Proteine mittels fluoreszierender Antikörper direkt in der Zelle detektieren zu können (Kapitel 4.8.5). Die Ergebnisse der Immunofluoreszenzmikroskopie sind in Abbildung 5.6 B dargestellt. Die HA-Markierung der überexprimierten Proteine wurde durch einen HA-Antikörper (grün) detektiert und die Lokalisation der Proteine im Vergleich zu einem hydrogenosomalen Markerprotein (SCSa oder ASCT, rot) betrachtet. mDHFR konnte im Cytosol der Zelle detektiert werden, die grüne Fluoreszenz ist über die komplette Zelle verteilt. Es konnte keine Überlagerung mit dem hydrogenosomalen Markerprotein SCSa beobachtet werden. HTS*DHFR wurde in klar abgegrenzten runden Strukturen detektiert, die allerdings nicht den Hydrogenosomen entsprachen, bei Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenz konnte keine Ko-Lokalisation der HTS*DHFR mit den Hydrogenosomen festgestellt werden, obwohl das Protein im Rahmen der Immunodetektion in der hydrogenosomalen Fraktion detektiert wurde.

Aufgrund der Tatsache, dass HTS*DHFR nicht in die Hydrogenosomen importiert wird, konnten keine Untersuchungen zur Faltungsabhängigkeit des hydrogenosomalen Proteinimports durchgeführt werden, da zunächst untersucht werden muss, in welches Zellkompartiment mDHFR durch die HTS der TrxRh1 geleitet wird.

5.2.2. Kombination von N-terminalen und internen Importsignalen

Die DHFR-Ergebnisse zeigten, dass eine aussagekräftige Beurteilung über die Faltungsabhängigkeit des Proteinimports in die Hydrogenosomen nicht möglich war und die genaue Lokalisation der HTS*DHFR in der Zelle noch nicht ausreichend geklärt ist.

mDHFR wurde deshalb weiterhin genutzt, um mehr Informationen über den hydrogenosomalen Proteinimport und die Bedeutung von N-terminalen Transitsequenzen und internen Importsignalen zu erhalten. Zur Verifizierung des Einflusses eines internen Importsignals auf das Targeting der mDHFR wurde durch overlap extension PCR (Kapitel 4.9.2, Abbildung 4.1) ein Fusionsprotein aus mDHFR und einem Teilabschnitt der SCSa (TVAG_165340) hergestellt, indem Block 2 der SCSa in die codierende Sequenz der mDHFR eingefügt wurde (mDH::SCS::FR). Zimorski et al. konnten 2013 anhand der SCSa zeigen, dass sich interne Importsignale nicht auf ein einzelnes Signal im Protein beschränken müssen, sondern in mehreren Domänen vorkommen können und sogar isoliert

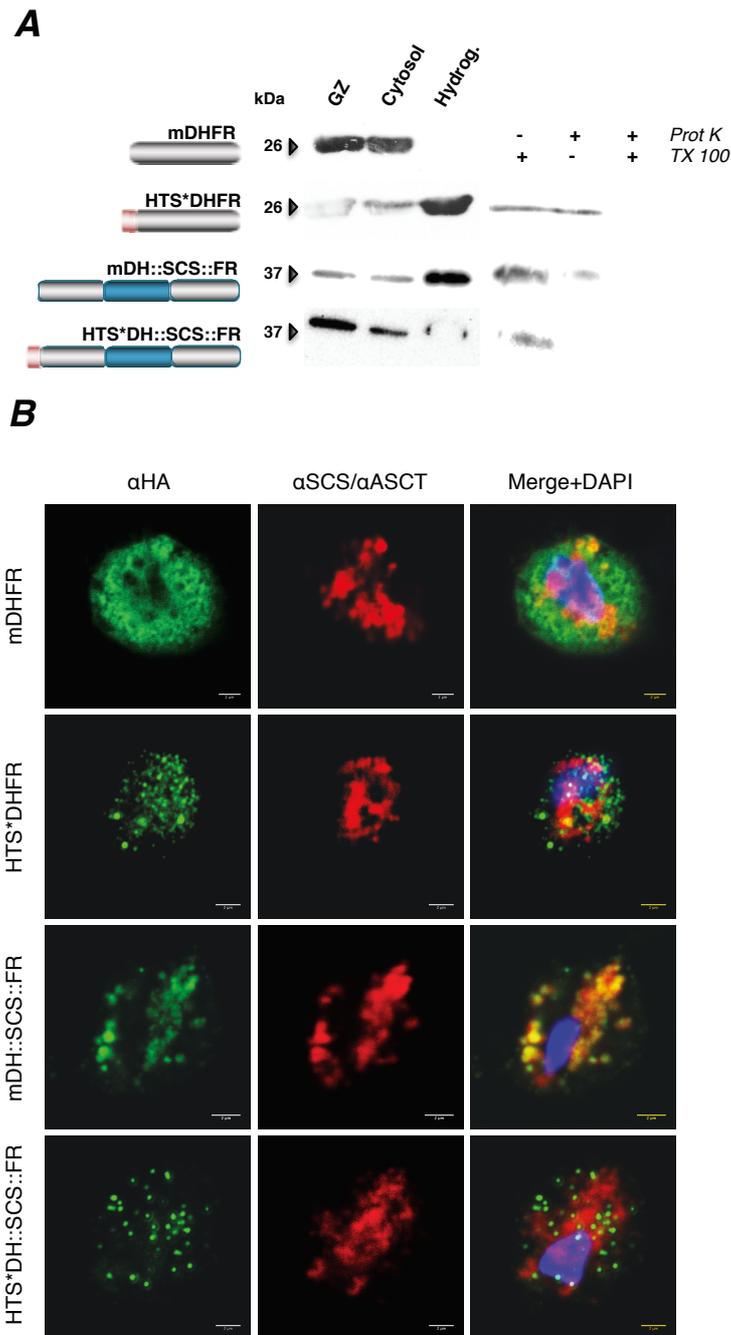


Abbildung 5.6: Lokalisation der DHFR-Konstrukte in *T. vaginalis*. **A** Immunodetektion der C-terminal HA-markierten DHFR-Proteine in den subzellulären Fraktionen Gesamtzellextrakt (GZ), Cytosol und Hydrogenosomen (Hydrog.), es wurden jeweils 25 μg Protein eingesetzt. Während die murine Dehydrofolatreduktase (mDHFR) im Cytosol verbleibt, kann das Fusionsprotein aus DHFR und der HTS der TrxRh1 (HTS*DHFR) in den Hydrogenosomen lokalisiert werden und ist bei Behandlung mit Proteinase K (Prot K) selbst in Anwesenheit von Triton X-100 (TX 100) vor Abbau geschützt. Ein Fusionsprotein aus mDHFR und einem internen Importsignal (SCS α Block 2, blaue Domäne, Zimorski et al. 2013) konnte ebenfalls in den Hydrogenosomen lokalisiert werden. Durch Hinzufügen der HTS von TrxRh1 veränderte sich das Importbild, in der Proteinase K-Behandlung kann HTS*DH::SCS::FR lediglich in der Kontrolle detektiert werden. Größe der markierten Proteine in Kilodalton (kDa). **B** Immunofluoreszenzmikroskopie der DHFR-Proteine. Die Lokalisation der markierten Proteine wird durch einen HA-Antikörper (grün) markiert und im Vergleich zu einem hydrogenosomalen Markerprotein (rot, αSCS (mDHFR) bzw. αASCT (Rest)). Durch Überlagerung der beiden Fluoreszenzen (*Merge*) können Aussagen über die Lokalisation getroffen werden. Färbung des Zellkerns mit DAPI (blau), Skalierungsbalken 2 μm .

in der Lage sind, die jeweiligen Teilabschnitte des Proteins in die Hydrogenosomen zu importieren. Um Rückschlüsse über eventuelle Wechselwirkungen zwischen N-terminaler Transitsequenz und internem Importsignal ziehen zu können, wurde außerdem ein Fusionsprotein aus HTS*DHFR und SCSa Block 2 hergestellt (HTS*DH::SCS::FR).

Mit diesen Konstrukten transfizierte *T. vaginalis* Zellen wurden subzellulär fraktioniert, um die Hydrogenosomen zu isolieren, die anschließend einer Proteinase K-Behandlung unterzogen wurden. Abbildung 5.6 A zeigt die Ergebnisse der mit den isolierten Fraktionen und Proteinase K-behandelten Proben durchgeführten Immunodetektionen. mDH::SCS::FR konnte in den Hydrogenosomen detektiert werden und war vor Abbau durch die Proteinase K geschützt, lediglich in Anwesenheit von Triton X-100 konnte kein HA-markiertes Protein mehr detektiert werden. HTS*DH::SCS::FR konnte ebenfalls in den hydrogenosomalen Fraktion lokalisiert werden, war in der Proteinase K-Behandlung allerdings lediglich in der Kontrolle in Abwesenheit der Proteinase K detektierbar. Auch von diesen Kulturen wurden Immunofluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen hergestellt, die in Abbildung 5.6 B abgebildet sind. mDH::SCS::FR ist in runden Strukturen lokalisiert, die den Hydrogenosomen entsprechen, was durch die Überlagerung mit der Fluoreszenz des hydrogenosomalen Markerproteins sichtbar wird. HTS*DH::SCS::FR konnte in kleinen, klar definierten Kompartimenten über die Zelle verteilt beobachtet werden, die allerdings nicht mit den Hydrogenosomen ko-lokalisieren, wie die Überlagerung der beiden Fluoreszenzen zeigte.

5.2.3. Lokalisation der TrxRh1 in An- und Abwesenheit ihrer hydrogenosomalen Transitsequenz

Da nach HTS*DHFR mit HTS*DH::SCS::FR ein weiteres Protein in klar definierten runden Strukturen in der Zelle detektiert wurde, bei denen es sich allerdings nicht um Hydrogenosomen handelte (Abbildung 5.6 B), bestand Klärungsbedarf über die Bedeutung der hydrogenosomalen Transitsequenz der TrxRh1. Da diese Lokalisationen nur in Anwesenheit der HTS auftraten, könnte diese selbst dafür verantwortlich sein. Bislang galt die N-terminale Transitsequenz der TrxRh1 als die einzige bekannte essentielle hydrogenosomale Transitsequenz, da das Protein im Gegensatz zu vielen anderen hydrogenosomalen Proteinen nach Deletion der HTS nicht mehr in den Hydrogenosomen detektiert werden konnte (Mentel et al. 2008). Die damals beobachteten Ergebnisse beruhten lediglich auf Immunodetektionen der HA-markierten Proteine, um Kontaminationen auszuschließen, wurden Enzymassays zur Bestimmung der Reinheit der isolierten Fraktionen durchgeführt. Mittlerweile gehören allerdings auch Proteinase K-Behandlungen der isolierten Hydrogenosomen und Immunofluoreszenz-Assays zu den Standardprotokollen,

um den Proteinimport zu verifizieren und durch Fluoreszenzantikörper direkt in der Zelle sichtbar zu machen. Diese Daten fehlen für die TrxRh1 und sollten deshalb im Rahmen dieser Arbeit erbracht werden.

Um die Lokalisation der TrxRh1 in An- und Abwesenheit der HTS zu untersuchen, wurde das entsprechende Gen mittels spezifischer Oligonukleotide (Kapitel 4.5) amplifiziert (TrxRh1), zur Untersuchung des Proteins ohne HTS wurde diese im Gen deletiert (TrxRh1 Δ HTS). Mit transfizierten *T. vaginalis* Kulturen wurden subzelluläre Fraktionierungen (Kapitel 4.8.4) durchgeführt und die frisch isolierten Hydrogenosomen anschließend einer Proteinase K-Behandlung (Kapitel 4.10.3) unterzogen, um zu überprüfen, ob die Proteine tatsächlich in die Matrix der Hydrogenosomen importiert werden oder lediglich mit der Membran der Organellen assoziiert sind. Abbildung 5.7 A zeigt das Ergebnis der Immunodetektion der HA-markierten Proteine. TrxRh1 konnte in allen drei subzellulären Fraktionen detektiert werden, wobei in den Fraktionen Gesamtzellextrakt und Cytosol Doppelbanden beobachtet wurden. In der hydrogenosomalen Fraktion konnte nur die schneller migrierende Bande detektiert werden. In der Proteinase K-Behandlung konnte kein Protein detektiert werden. Mehrere Wiederholungen auch mit verschiedenen Proteinkonzentrationen brachten kein Ergebnis. TrxRh1 Δ HTS konnte wie TrxRh1 in allen isolierten subzellulären Fraktionen detektiert werden. Die Proteinase K-Behandlung zeigte ein Signal in der Kontrolle, in Anwesenheit der Proteinase K konnte kein Protein detektiert werden.

Die durchgeführten Immunofluoreszenz-Assays unterstützen die Ergebnisse der Immunodetektionen (Abbildung 5.7 B). TrxRh1 wurde durch einen HA-Antikörper lokalisiert (grün) und im Vergleich zu einem hydrogenosomalen Markerprotein (rot) betrachtet. TrxRh1 befindet sich in regelmäßig über die Zelle verteilten Strukturen. Bei Überlagerung der beiden Fluoreszenzen (*Merge*) wurde deutlich, dass die Signale zumindest zum Teil ko-lokalisieren (gelbe Fluoreszenz). TrxRh1 Δ HTS konnte ebenfalls in über die Zelle verteilten abgeschlossenen Strukturen detektiert werden, die in der Überlagerung mit den Hydrogenosomen ko-lokalisieren, was durch deutliche gelbe Signale gezeigt wurde.

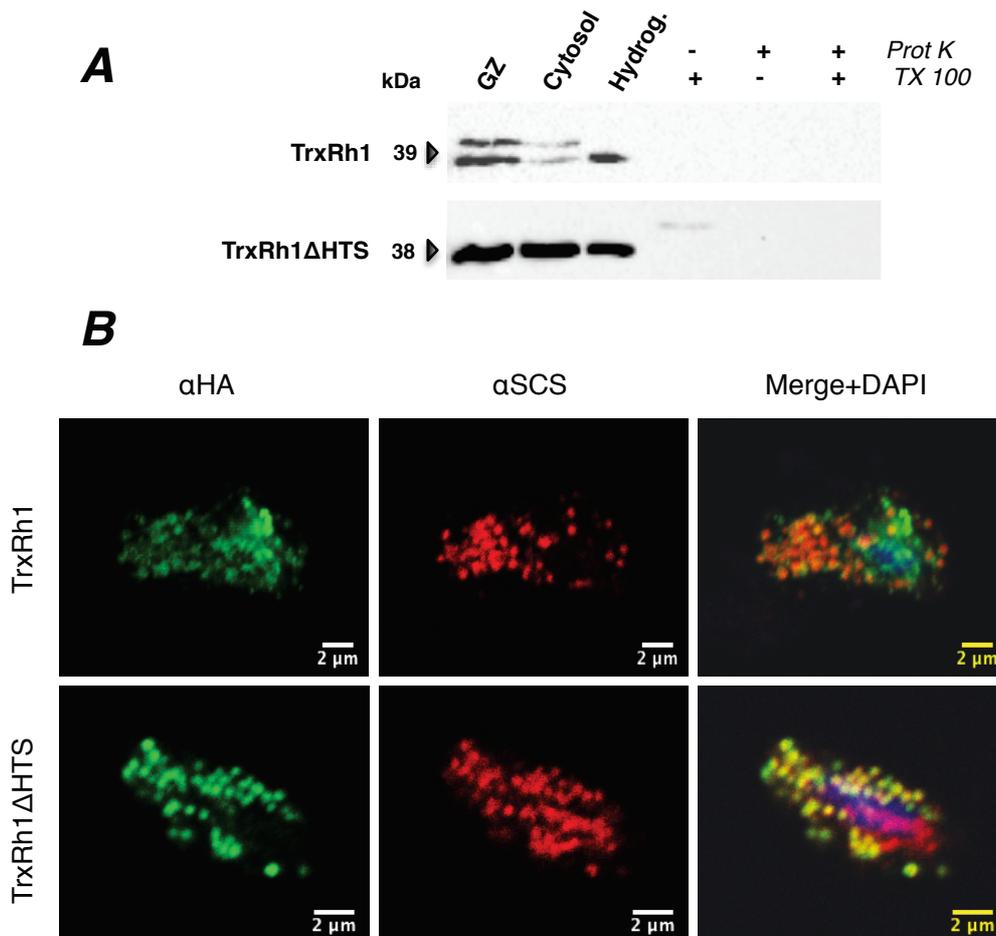


Abbildung 5.7: Lokalisation von TrxRh1 in An- und Abwesenheit (Δ HTS) der hydrogenosomalen Transitsequenz (HTS). **A** Immunodetektion der C-terminal HA-markierten Proteine in den subzellulären Fraktionen Gesamtzellextrakt (GZ), Cytosol und Hydrogenosomen (Hydrog.). Es wurden jeweils $25 \mu\text{g}$ Protein eingesetzt. Beide Proteine konnten in allen Fraktionen detektiert werden, aber nur TrxRh1 Δ HTS konnte in der Proteinase K (Prot K)-Behandlung der Hydrogenosomen in Abwesenheit (-) von Triton X-100 (TX 100) detektiert werden. Größe der markierten Proteine in Kilodalton (kDa). **B** Immunofluoreszenzmikroskopie der HA-markierten TrxRh1 und TrxRh1 Δ HTS (α HA, grün) im Vergleich zu einem hydrogenosomalen Markerprotein (α SCS, rot). Durch Überlagerung (*Merge*) der Fluoreszenzen zeigte sich, dass TrxRh1 in An- und Abwesenheit der HTS mit den Hydrogenosomen ko-lokalisiert. Färbung des Zellkerns mit DAPI (blau), Skalierungsbalken $2 \mu\text{m}$.

5.2.4. Importkompetenz der hydrogenosomalen Transitsequenz der TrxRh1

Ergänzend zur Untersuchung der TrxRh1-Lokalisation in An- und Abwesenheit ihrer hydrogenosomalen Transitsequenz, sollte diese HTS auf ihre Importkompetenz überprüft werden, um Rückschlüsse über die enthaltenen Informationen für den Proteinimport der TrxRh1 ziehen zu können. Dazu wurde ein Fusionsprotein aus der HTS der TrxRh1 und einem cytosolischen Protein hergestellt. Dadurch sollte verifiziert werden, ob die HTS Importinformationen enthält und ein cytosolisches Protein in die Hydrogenosomen importieren kann. Als cytosolisches Protein wurde Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, TVAG_475220) ausgewählt, ein an der Glykolyse beteiligtes

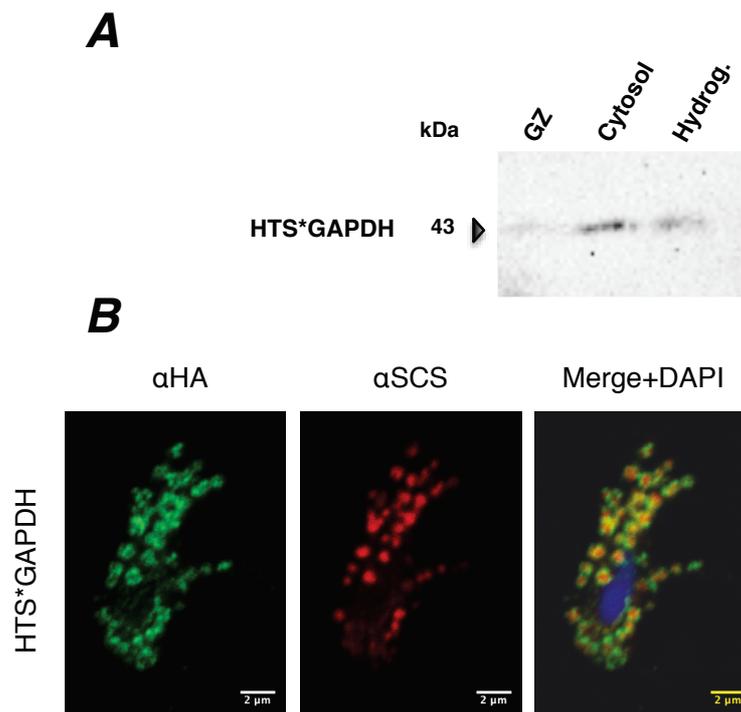


Abbildung 5.8: Subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins HTS*GAPDH in *T. vaginalis*. **A** Immunodetektion der C-terminal HA-markierten HTS*GAPDH in den Fraktionen Gesamtzellextrakt (GZ), Cytosol und Hydrogenosomen (Hydrog.). Durch die Anwesenheit der HTS von TrxRh1 kann das eigentlich cytosolische Protein GAPDH (Zimorski et al. 2013) auch in den Hydrogenosomen detektiert werden. Es wurden jeweils 200 μg Protein eingesetzt, Größe in Kilodalton (kDa). **B** Immunofluoreszenzmikroskopie zur Lokalisation der HTS*GAPDH mittels eines HA-Antikörpers (αHA, grün) im Vergleich zu einem hydrogenosomalen Markerprotein (αSCS, rot). Durch Überlagerung (*Merge*) der Fluoreszenzen wird deutlich, dass das Fusionsprotein die Matrix der Hydrogenosomen umgibt. Färbung des Zellkerns mit DAPI (blau), Skalierungsbalken 2 μm.

Enzym, dass in *T. vaginalis* als cytosolisches Markerenzym gilt (Müller 2003) und dessen cytosolische Lokalisation unter gleichen Bedingungen wie in dieser Arbeit angewandt klar bestätigt wurde (Zimorski et al. 2013) .

Die hydrogenosomale Transitsequenz der TrxRh1 wurde mittels eines spezifischen Oligonukleotids (Kapitel 4.5) an das 5' Ende der codierenden Sequenz der GAPDH (HTS*GAPDH) amplifiziert. Aus mit HTS*GAPDH transfizierten *T. vaginalis* Zellen wurden Hydrogenosomen isoliert, die anschließend mit Proteinase K behandelt wurden, um den Import des Fusionsproteins zu verifizieren. Anschließend wurde die C-terminal HA-markierte HTS*GAPDH in den isolierten subzellulären Fraktionen durch einen HA-Antikörper detektiert. Um HTS*GAPDH in den Fraktionen detektieren zu können, mussten jeweils 200 μg Protein eingesetzt werden (Abbildung 5.8 A). Das Protein konnte sehr schwach im Gesamtzellextrakt detektiert werden und im Vergleich stärker in den Fraktionen Cytosol und Hydrogenosomen. In den durchgeführten Proteinase K-Behandlungen konnte trotz mehrfacher Wiederholungen mit verschiedenen Proteinkonzentrationen kein Signal detektiert werden.

Zur weiteren Verifizierung der HTS*GAPDH Lokalisation wurden Immunfluoreszenz-Aufnahmen der transfizierten Zellen angefertigt (Abbildung 5.8 B). Das durch einen HA-Antikörper (grün) detektierte Fusionsprotein HTS*GAPDH bildete ringförmige Strukturen, die regelmäßig über die Zelle verteilt waren. Durch einen Vergleich der Lokalisation mit der eines hydrogenosomalen Markerproteins (SCS α , rot), das in der Matrix der Hydrogenosomen lokalisiert ist, zeigte sich, dass HTS*GAPDH Ringe um die Matrix der Hydrogenosomen bildet (*Merge*).

6. Diskussion

Zellorganellen wie Mitochondrien und Hydrogenosomen sind durch ein Endosymbiose-Ereignis entstanden. Durch die Etablierung des Symbionten als Organell innerhalb der Wirtszelle kam es im Fall der Mitochondrien zu einem massiven Genverlust. Gene wurden in den Nukleus der Wirtszelle übertragen oder gingen verloren (Timmis et al. 2004; Embley und Martin 2006). Etwa 99% der mitochondrialen Gene sind deshalb kerncodiert, die entsprechenden Proteine müssen nach ihrer Synthese im Cytosol der Zellen in die Mitochondrien importiert werden. Dazu tragen die Proteine N-terminale Präsequenzen oder interne Signale, die für den Import verantwortlich sind (Doležal et al. 2006; Neupert und Herrmann 2007; Bolender et al. 2008). Mitochondriale Präsequenzen (*mitochondrial targeting sequence*, MTS) sind in der Regel 10 bis 80 Aminosäuren lang, besitzen eine positive Ladung und können amphipathische Helices bilden (Gakh et al. 2002; Neupert und Herrmann 2007; Smíd et al. 2008). Dem reifen importierten Protein fehlen diese Sequenzen, nach Translokation über die Doppelmembran der Organellen wird die MTS durch eine in der Matrix lokalisierte Protease (*mitochondrial processing peptidase*, MPP) prozessiert (Yaffe et al. 1985).

Hydrogenosomen sind anaerobe Formen der Mitochondrien. Im Gegensatz zu den Mitochondrien ging die Aufnahme des Endosymbionten als Organell aber mit einem vollständigen Verlust des eigenen Genoms einher, so dass alle hydrogenosomalen Gene kerncodiert sind (Akhmanova et al. 1999; Clemens und Johnson 2000). Um in die Organellen importiert werden zu können, trägt etwa die Hälfte der hydrogenosomalen Proteine ebenfalls N-terminale Präsequenzen (*hydrogenosomal targeting sequence*, HTS), die mit einer Länge zwischen vier bis 24 Aminosäuren allerdings deutlich kürzer als die MTS der Mitochondrien sind (Burstein et al. 2012). Neueste Studien weisen außerdem darauf hin, dass interne Importsignale bei hydrogenosomalen Proteinen häufiger vertreten sind (Zimorski et al. 2013). Analog zur MPP gibt es auch in den Hydrogenosomen ein prozessierendes Enzym, über dessen Substrate aber keine umfassenden Informationen vorliegen (Brown et al. 2007; Smíd et al. 2008).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Erstellung eines hydrogenosomalen N-Proteoms erfolgen, um detailliertere Erkenntnisse zur Prozessierung der hydrogenosomalen Proteine und daran beteiligter Enzyme zu erlangen. Durch die Untersuchung von N-terminalen Transitsequenzen und internen Import-Signalen in hydrogenosomalen Proteinen sollten außerdem weitere Informationen über den hydrogenosomalen Proteinimport und daran beteiligte Komponenten erlangt werden.

6.1. Globale Analyse des hydrogenosomalen N-Proteoms

Das mitochondriale Prozessierungsenzym MPP ist die zentrale Protease der Mitochondrien und in der Matrix der Organellen lokalisiert (Taylor et al. 2001). MPP ist eine Metalloendopeptidase, die aus zwei Untereinheiten besteht (Taylor et al. 2001). Die katalytische α -Untereinheit bindet ein Zink-Kation über ein konserviertes Sequenz-Motiv, die regulatorische β -Untereinheit ist für die Erkennung des Substrats mittels eines Glycin-reichen Sequenzabschnitts verantwortlich (Nagao et al. 2000; Gakh et al. 2002). Nachdem die mitochondrialen Vorläufer-Proteine über die Translokasen der äußeren und inneren Membran die Matrix erreicht haben, prozessiert MPP die Präsequenzen, anschließend können die importierten Proteine durch Chaperone wie Hsp60 und Hsp10 in ihre aktive Konformation gefaltet werden (Bukau und Horwich 1998; Hartl und Hayer-Hartl 2002; Wiedemann et al. 2004).

Für die Prozessierung von mitochondrialen N-terminalen Präsequenzen ist das Enzym MPP allerdings nicht allein verantwortlich. Es konnten mehrere Proteasen in Mitochondrien identifiziert werden. Nach der Prozessierung der Präsequenzen durch MPP kommt es bei einigen Proteinen zu weiteren Prozessierungsschritten. So entfernt die ebenfalls in der Matrix lokalisierte *mitochondrial intermediate peptidase (Octapeptidyl aminopeptidase 1, Oct1)* ein Oktapeptid von zahlreichen Präproteinen (Gakh et al. 2002). Als sekundär prozessierendes Enzym nach der MPP fungiert auch die *inner membrane protease (IMP)*, die ein hydrophobes Signalpeptid entfernt, das bei Proteinen des Intermembranraums typischerweise hinter der MTS lokalisiert ist. Durch Prozessierung dieses Signals wird das importierte Protein aus der Translokase der inneren Membran in den Intermembranraum freigesetzt (Gakh et al. 2002; Neupert und Herrmann 2007). Weitere Proteasen der inneren Membran sind die sogenannten AAA-Proteasen, deren aktives Zentrum entweder in den Intermembranraum (i-AAA) ragt oder auf der Matrixseite (m-AAA) lokalisiert ist, und die Rhomboid-Protease Pcp1, diese Proteasen prozessieren einige Präproteine und tragen dadurch zur Spezifität der Proteinsortierung in den Mitochondrien bei (Nolden et al. 2005; Rainey et al. 2006; Chacinska et al. 2009).

Lange ungeklärt war die Frage, wie die typische Schnittstelle der MPP aussieht. Sicher war zunächst nur, dass ein Arginin (R) in der C-terminalen Region der Präsequenz ein wichtiger Bestandteil der Schnittstelle ist. Die Lokalisation dieser Aminosäure variierte aber zwischen Position -2 (R-2 Motiv) und Position -3 (R-3 Motiv) in Bezug auf die Restriktionsstelle (Schneider et al. 1998; Emanuelsson und Heijne 2001; Gakh et al. 2002). Beide Positionen konnten in Mutationsstudien als wichtig für die Prozessierung demonstriert werden, so dass eine experimentelle Lösung zunächst nicht erbracht werden konnte (Gakh et al. 2002). Durch die Entdeckung einer weiteren Protease, der *intermediate cleaving*

peptidase of 55 kDa (Icp55) konnte eine Erklärung für die variierenden Arginin-Positionen gefunden werden (Naamati et al. 2009; Voegtle et al. 2009). Icp55 ist eine in der Matrix lokalisierte Protease, die als sekundär prozessierendes Enzym nach der MPP fungiert (Voegtle et al. 2009; Teixeira und Glaser 2013). Vögtle und Kollegen konnten 2009 in ihrer globalen Analyse der mitochondrialen N-Termini 38 Substrate der Icp55 identifizieren, bei denen nach Prozessierung durch die MPP jeweils eine weitere Aminosäure am N-Terminus entfernt wurde, so dass aus einem R-3 Motiv das R-2 Motiv wurde. Diese weitere Prozessierung erklärt die widersprüchlichen Erkenntnisse um die MPP-Schnittstelle (R-2 vs. R-3). Auffallend war dabei, dass durch die Prozessierung neue N-Termini entstanden, bei denen nach der sogenannten N-End Regel eine destabilisierende Aminosäure in eine stabilisierende Aminosäure konvertiert wurde. Der Signalweg der N-End Regel wurde 1986 von Varshavsky und Kollegen postuliert. Sie konnten zeigen, dass die Stabilität eines Proteins stark von der N-terminalen Aminosäure abhängig ist. Einige Aminosäuren führten zu einem schnellen Abbau des Proteins (Halbwertszeit < 3 min, destabilisierende Aminosäuren), während dieser Effekt bei anderen Aminosäuren nicht auftrat (Halbwertszeit > 20 h, stabilisierende Aminosäuren; Bachmair et al. 1986)). Seitdem wurde dieser Signalweg zur gezielten Degradierung von Proteinen sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten entdeckt (Dougan et al. 2010; Sriram et al. 2011; Varshavsky 2011). Die vier hauptsächlich destabilisierenden Aminosäuren in Prokaryoten sind Tyrosin, Leucin, Phenylalanin und Tryptophan. Eine Analyse der Icp55-Substrate zeigte, dass drei dieser Aminosäuren von Icp55 erkannt und prozessiert wurden und die so neu entstehenden N-Termini fast aller Substrate mit Serin, Alanin oder Threonin abschließend eine stabilisierende Aminosäure aufwiesen (Voegtle et al. 2009). Auch für die meisten Substrate der Protease Oct1 konnten ähnliche Charakteristika der N-Termini demonstriert werden, beide Proteasen scheinen eine Funktion für die Proteinstabilität im Sinn der N-End Regel auszuüben (Voegtle et al. 2011; Mossmann et al. 2012).

Die Identifizierung dieser neuen Protease war nur ein Ergebnis einer umfassenden Analyse der N-Termini aller mitochondrialen Proteine, des sogenannten N-Proteoms. Durch Anwendung der COFRADIC-Methode (Gevaert et al. 2003) konnten gezielt die N-Termini der importierten Proteine untersucht werden, um mehr Informationen über die genauen Prozessierungsstellen, die Charakteristika der mitochondrialen Präsequenzen und der beteiligten Enzyme zu erlangen. Die globale Analyse konnte die N-Termini von 615 verschiedenen Proteinen untersuchen und ergab, dass der Großteil der importierten Proteine (69,6%) prozessiert wird. Mitochondriale Signalsequenzen wurden allgemein als positiv geladen und mit einer durchschnittlichen Länge von 20-60 Aminosäuren beschrieben (Gakh et al. 2002; Emanuelsson et al. 2007). Die Analyse des N-Proteoms ergab eine

Durchschnittslänge von 15-55 Aminosäuren, es konnten aber auch deutlich längere (>65 Aminosäuren) und auch sehr kurze Präsequenzen beobachtet werden, mit einer Länge von 6 Aminosäuren war die MTS von Atp17 die kürzeste des N-Proteoms (Voegtle et al. 2009). Aufgrund von fehlenden experimentell validierten Daten wurden bisher häufig Computerprogramme wie MitoProtII (Claros und Vincens 1996) und TargetP (Emanuelsson et al. 2007) benutzt, um die Länge und die Schnittstelle potentieller MTS vorherzusagen. Da bisher nur 50 einzelne N-Termini von mitochondrialen Proteinen untersucht wurden, konnten die Programme nur mit diesen geringen Datenumfängen arbeiten. Die Genauigkeit der Vorhersagen konnte nun durch die Daten des N-Proteoms überprüft werden. Dabei zeigte sich, dass TargetP lediglich 41% des N-Proteoms genau vorhersagte und MitoProtII 31%, wenn die Gesamtheit des N-Proteoms betrachtet wurde. Die Genauigkeit der Vorhersagen variierte sehr stark zwischen Vorhersagen für Proteine mit prozessierbaren MTS (21% MitoProtII bzw. 33% TargetP) und Vorhersagen über die Abwesenheit einer MTS (61-64%; (Voegtle et al. 2009)).

Für hydrogenosomale Proteine fehlen ähnliche Daten bisher. Es ist nur eine prozessierende Protease bekannt, es gibt auch keine speziellen Vorhersageprogramme für hydrogenosomale Proteine. Proteomanalysen ergaben, dass Hydrogenosomen etwa 500-600 Proteine beinhalten (Schneider et al. 2011). Da die hydrogenosomale Lokalisation nur für einen Bruchteil (30 Proteine) experimentell nachgewiesen wurde, entwickelten Burstein et al. 2012 eine bioinformatische Methode auf Grundlage einer sogenannten *machine-learning* Herangehensweise, um die hydrogenosomale Lokalisation vorherzusagen. Dabei wurde der Fokus nicht ausschließlich auf die An- oder Abwesenheit einer typischen Präsequenz gelegt, sondern insgesamt 57 Gen- und Proteineigenschaften wie z.B. Sequenz, Funktion, GO-Annotation und Anteil bestimmter Aminosäuren mit positiver oder negativer Ladung einbezogen. Als Trainingsset für die Vorhersage dienten experimentell nachgewiesene hydrogenosomale Proteine, als Negativset wurden 576 nicht-importierte Proteine verwendet. Die Analysen ergaben, dass ungefähr die Hälfte der hydrogenosomalen Proteine eine typische HTS enthalten (Burstein et al. 2012). Um die Vorhersagen experimentell zu überprüfen, wurden einige ausgesuchte Proteinen in *T. vaginalis* exprimiert und anschließend durch Immunofluoreszenzassays und Immunodetektionen der HA-Markierung in den Zellen lokalisiert. Die Lokalisation der 15 wahrscheinlichsten hydrogenosomalen Proteinen konnte die hydrogenosomale Lokalisation von sechs Proteinen bestätigen, von denen zwei Proteine keine typische HTS aufweisen. Die Ergebnisse dieser *in vivo* Validierung wurden dann wiederum genutzt, um die Positiv- und Negativ-Trainingssets des Algorithmus weiter zu entwickeln, um die Vorhersagen zu präzisieren. Die Studie von Burstein et al. gibt einen guten Überblick über die Häufigkeit von Präsequenzen und die

Wahrscheinlichkeit einer hydrogenosomalen Lokalisation, allerdings handelt es sich dabei nur um bioinformatische Vorhersagen. Informationen über die Menge an prozessierten HTS, beteiligte Enzyme und die Prozessierungsstellen liefert diese Studie nicht (Burstein et al. 2012).

Die Prozessierung von N-terminalen Transitsequenzen konnte nur in Studien an einzelnen Proteinen nachgewiesen werden (Bradley et al. 1997). Prozessiert werden Ferredoxin (Johnson et al. 1990), α - und β -Untereinheiten der Succinyl-CoA-Synthetasen ((Lahti et al. 1992; Lahti et al. 1994), Adenylat-Kinase (Länge et al. 1994), Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (Hrdý und Müller 1995a), Malatenzym (Hrdý und Müller 1995b) und Hsp60 (Bui et al. 1996). Erst später wurde mit einer hydrogenosomalen Protease in der Matrix der Organellen (*hydrogenosomal processing peptidase*, HPP) das dafür verantwortliche Enzym entdeckt (Brown et al. 2007). Das Genom von *T. vaginalis* enthält ein Gen für ein Homolog der β MPP, das eine Identität von 20,9% und eine Sequenzähnlichkeit von 42,9% zu der β -Untereinheit der MPP aufweist. Da kein Homolog zu α MPP entdeckt werden konnte, wurde zunächst angenommen, dass es sich bei der HPP um einen Homodimer handelt. *T. vaginalis* besitzt zwar mit GRLP ein Protein, das vermehrt die Aminosäure Glycin enthält und den Glycin-reichen Strukturen der α MPP ähnelt, das allerdings die β HPP-Aktivität nicht stimulieren konnte und deshalb nicht als weitere Untereinheit der HPP angesehen wurde (Brown et al. 2007). Neuere phylogenetische Analysen zur Verwandtschaft der prozessierenden Enzyme MPP, HPP und GPP brachten allerdings weitere Erkenntnisse. In phylogenetischen Analysen gruppierte GRLP als Teil der α MPP Clade. *In vitro* Experimente zeigten außerdem, dass die Aktivität der β -Untereinheit durch die Anwesenheit der potentiellen α -Untereinheit deutlich ansteigt, was auf eine Heterodimer-Bildung der beiden Untereinheiten hinweist (Smíd et al. 2008).

Das prozessierende Enzym in den Mitosomen von *Giardia intestinalis*, die GPP, ist im Gegensatz zu MPP und HPP ein Monomer (α GPP) und wurde zunächst als nicht mit der MPP verwandt beschrieben (Doležal et al. 2005; Morrison et al. 2007). In den phylogenetischen Analysen von Smíd et al. konnte sie allerdings der Gruppe der β MPP zugeordnet werden, weitere Hinweise auf die Verwandtschaft des Enzyms mit der β MPP lieferte die Anwesenheit eines typischen katalytischen Motivs in der Proteinsequenz (β GPP, (Smíd et al. 2008). Mitosomen sind stark reduzierte Formen der Mitochondrien, die Abwesenheit einer α -Untereinheit spricht für reduktive Evolution, in deren Verlauf die α -Untereinheit verloren ging. Weitere Hinweise darauf lassen sich auch in der Spezifität der Proteasen finden. GPP konnte in einer *in vitro* Studie ausschließlich mitosomale Proteine prozessieren, während die hydrogenosomale Protease zusätzlich zu den eigenen Substraten auch mitosomales Ferredoxin und 2 mitochondriale Proteine prozessieren konnte. Die MPP

von *S. cerevisiae* erkannte mitochondriale Proteine und konnte außerdem hydrogenosomale Präsequenzen prozessieren, die mitochondrialen Präsequenzen ähneln, da sie distal positiv geladene Aminosäuren aufweisen. HPP scheint also eine Art Intermediat zwischen MPP und GPP zu sein und kann Präsequenzen mit und ohne positive Nettoladung prozessieren, erkennt allerdings nur kürzere mitochondriale Präsequenzen. Die Tatsache, dass hydrogenosomale Proteine teilweise noch Transitsequenzen besitzen, die denen der mitochondrialen Proteine ähneln, erklärt vermutlich auch den Verbleib der α HPP, da diese Untereinheit in die Erkennung der Substrate durch Glycin-reiche Abschnitte involviert ist (Smíd et al. 2008).

Um annähernd umfangreiche Daten wie für Mitochondrien vorliegend für hydrogenosomale Proteine zu generieren, sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit das hydrogenosomale N-Proteom erstellt werden. Da die COFRADIC-Methode umfassende chemische Modifikationen und intensive Massenspektrometer-Analysen erfordert, wurde die N-terminale Markierung der Proteine durch die Subtiligase gewählt (Chang et al. 1994; Mahrus et al. 2008; Yoshihara et al. 2008). Die Verwendung der Subtiligase ermöglicht die gezielte Markierung von Protein-Termini durch Biotinylierung, indem als Substrat biotinylierte Peptidester verwendet werden. Durch eine Alkylierungsreaktion wird die Biotin-Markierung auf den Protein-Terminus übertragen. Nach Spaltung des Proteingemischs durch Trypsin können die markierten N-terminalen Peptide spezifisch durch Streptavidin-überzogene Kügelchen aus dem Gemisch isoliert werden und stehen so für Sequenzierungen im Massenspektrometer zur Verfügung. Da es sich bei der Subtiligase um ein synthetisch hergestelltes modifiziertes Enzym auf Basis des *Bacillus amyloliquefaciens* Subtilisin BPN¹ handelt, das patentrechtlich geschützt ist, kann es nicht käuflich erworben werden (Wells et al. 1983; Carter und Wells 1987; Abrahmsén et al. 1991). Deshalb war es zunächst erforderlich, das Protein in *Bacillus subtilis* zu exprimieren und anschließend zu isolieren. Das für die Transformation von *B. subtilis* benötigte Plasmid mit der codierenden Sequenz der Subtiligase wurde freundlicherweise von Prof. J.A. Wells, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of California, San Francisco, USA zur Verfügung gestellt. *B. subtilis* konnte erfolgreich transformiert werden und das modifizierte Enzym aus der Kultur isoliert werden (Kapitel 5.1.1). Eine Sequenzierung des isolierten Enzyms ergab eine Sequenzabdeckung von ca. 50% (Abbildung 5.3). Die Isolierung des benötigten Enzyms konnte also erfolgreich durchgeführt werden.

Um die generelle Anwendbarkeit der Methode auf hydrogenosomale Proteine zu testen, wurden sogenannte *small scale*-Ligationen durchgeführt, bei denen die N-terminale Markierung von hydrogenosomalen Proteine in einem geringen Probenvolumen durchgeführt wurde (Kapitel 4.10.10). Nach der N-terminalen Markierung der Proteine wurde die

bearbeitete Probe durch ein SDS-Gel getrennt, als Kontrolle für erfolgreiche Ligation von ausschließlich markierter Proteine wurde zusätzlich eine Probe von unbehandelten hydrogenosomal Proteinen und eine mit der TEV-Protease behandelte Probe, durch deren Einsatz die N-terminale Markierung wieder entfernt werden kann, aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mittels eines Anti-Biotin-Antikörpers detektiert. Dabei zeigte sich, dass in der markierten Probe biotinylierte Proteine nachgewiesen werden konnten (Abbildung 5.4). Im Gegensatz dazu konnten in der unbehandelten Kontrolle keine markierten Proteine nachgewiesen werden, so dass unspezifische Bindungen des Biotin-Antikörpers ausgeschlossen werden können. Die TEV-Protease behandelte Probe wies noch sehr geringe Signale auf, die aber wesentlich schwächer als die Banden in der markierten Probe ausfielen. Daraus lässt sich schließen, dass die N-terminale Markierung durch die Verwendung der TEV-Protease wieder entfernt werden kann, die eingesetzte Konzentration des Enzyms aber nicht ausreichend war, um in der Inkubationszeit sämtliche Markierungen wieder zu entfernen. Im Rahmen der durchgeführten *small-scale*-Ligationen war die angewandte Methode der N-terminalen Biotinylierung also erfolgreich und anwendbar.

In den auf den Protokollen von Mahrus et al. und Agard et al. basierenden Versuchsanordnungen wird nach erfolgter Markierung eine Größenchromatographie der Probe durchgeführt, um ungebundenes Substrat zu entfernen. Weitergehend wird die Gesamtheit der hydrogenosomal Proteine anschließend mit Trypsin gespalten, um die markierten N-terminalen Peptide gezielt zu untersuchen. Diese werden über Affinitätschromatographie zwischen Streptavidin und Biotin gezielt über Streptavidin-überzogene magnetische Kügelchen aus der Gesamtprobe identifiziert. Nach Entfernung der Biotinylierung sollte dann die Sequenzierung der N-Termini im Massenspektrometer erfolgen (Mahrus et al. 2008; Agard et al. 2010). Leider war es auch durch Anwendung verschiedenster Versuchsbedingungen nicht möglich, markierte N-Termini in der Probe zu identifizieren. Meist handelte es sich bei den sequenzierten Proben um Substrat in verschiedenen hydrolysierten oder modifizierten Formen (Kapitel 5.1.4, Abbildung 5.5).

Mögliche Fehlerquellen liegen in der Zugänglichkeit der N-Termini, der eingesetzten Protein- und Substratmengen und in der Spezifität der Subtiligase. Die Zugänglichkeit der N-Termini der hydrogenosomal Proteine ist eine sehr wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Markierung durch die Subtiligase. Die meisten eukaryotischen N-Termini liegen modifiziert vor, die häufigste Modifikation ist die Acetylierung. Durch N-terminale Acetyl-Transferasen wird ein Acetyl-Rest von Acetyl-CoenzymA auf die N-terminale α -Aminogruppe des Proteins übertragen, wodurch die positive Ladung der Aminogruppe entfernt wird (Starheim et al. 2012). Bis zu 80% der eukaryotischen Proteine weisen einen acetylierten

Terminus auf, je nach Spezies variiert dieser Wert zwischen 60% (*S. cerevisiae*) und 80% bei humanen Proteinen (Polevoda und Sherman 2003; Arnesen 2009; Van Damme et al. 2011). Auch in Archaeen sind bis zu 15% der N-Termini acetyliert (Aivaliotis et al. 2007).

Subtiligase nutzt die α -Aminogruppe am N-Terminus und markiert diesen spezifisch, indem ein biotinylierter Peptidester durch Acylierung an den N-Terminus angefügt wird (Abrahmsén et al. 1991; Chang et al. 1994). Die Spezifität der Subtiligase hängt also stark von der Zugänglichkeit der N-terminalen Aminogruppe ab. Im Gegensatz zu cytosolischen Proteine soll der Anteil an unmodifizierten N-Termini bei Proteinen, die Signalsequenzen tragen und in Organellen wie z.B. Mitochondrien importiert werden müssen, allerdings deutlich größer sein (Neupert 1997; Timmer et al. 2007; Yoshihara et al. 2008). Im Rahmen einer Studie an mitochondrialen Präsequenzen von *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* wurden 62 bzw. 52 mitochondriale Präsequenzen sequenziert. Keines der untersuchten Proteine wies dabei eine N-terminale Acetylierung auf (Huang et al. 2009). Die Verfügbarkeit der α -Aminogruppe der hydrogenosomalen Proteine sollte also eine Markierung der Proteine erlauben. Das positive Ergebnis der *small scale*-Ligation (Kapitel 5.1.3) lässt ebenfalls eine generelle Anwendbarkeit der Methode vermuten. Da in kleinem Maßstab Proteine markiert werden konnte, diese positiven Ergebnisse aber nicht auf größere Ansätze übertragen werden konnten, liegt die Ursache vermutlich in den eingesetzten Protein- und Substratmengen.

Während der Markierung der N-Termini durch das Enzym Subtiligase acyliert diese nicht nur die N-Termini unter Verwendung des eingesetzten Peptidesters, sondern hydrolysiert auch frei verfügbares Substrat. Durch Einbringung von Modifikationen in einzelnen Aminosäurepositionen wurde die Peptidase-Aktivität erhöht und die Neigung zur Hydrolyse bereits drastisch reduziert. Eine Restaktivität verbleibt dennoch, wodurch die Effizienz der Subtiligase verringert wird (Nakatsuka et al. 1987; Chang et al. 1994). Es ist also notwendig, Substrat im Überschuss einzusetzen, um ausreichend Substrat für die Markierung der Proteine zur Verfügung zu stellen, bevor es durch Hydrolyse verwertet wird (Yoshihara et al. 2008). Limitierender Faktor für den erhöhten Einsatz des Substrats ist allerdings die eingeschränkte Löslichkeit des Peptidesters in wässrigen Lösungen, das Substrat (TEVest2) kann lediglich in Konzentrationen von 1-2 mM verwendet werden. Yoshihara und Kollegen haben alternative Substrate entwickelt, die durch zusätzliche basische Aminosäuren in der Peptidsequenz des Substrats eine deutlich erhöhte Löslichkeit aufweisen (10-40 mM; Yoshihara et al. 2008). Diese modifizierten Substrate könnten eine Alternative zum bisher verwendeten Substrat darstellen.

Ein weiteres Problem besteht in der eingesetzten Proteinmenge. Während in den Studien von Wells und Kollegen an humanen Zellen bis zu 100 mg Protein eingesetzt

wurden (Mahrus et al. 2008; Agard et al. 2010), konnten die Versuche mit hydrogenosomalen Proteinen im Rahmen dieser Arbeit lediglich mit einer Höchstmenge von 500-1000 μg hydrogenosomalen Matrixproteinen durchgeführt werden. Die limitierte Ausbeute durch subzelluläre Fraktionierung von *T. vaginalis* und die anschließende Separation der isolierten Hydrogenosomen in Membran- und Matrixfraktion lässt den Einsatz von größeren Proteinmengen nicht zu. Für die Durchführung der *small scale*-Ligationen wurden 250 μg hydrogenosomale Matrixproteine eingesetzt, es konnten daraufhin markierte Proteine mittels eines Biotin-Antikörpers detektiert werden. Diese Proteinmenge scheint aber für Versuche in größerem Maßstab nicht mehr geeignet zu sein. Die Anreicherung von markierten N-terminalen Peptiden mittels Gelchromatographie und Affinitätschromatographie war nicht erfolgreich. Es war nicht möglich, die N-terminale Markierung von hydrogenosomalen Proteinen durch die Verwendung des modifizierten Enzyms Subtiligase zu etablieren.

Zur Analyse des hydrogenosomalen N-Proteoms sollte also eine Methode angewendet werden, die eine spezifischere und stärkere N-terminale Markierung bietet und auch mit geringen Proteinmengen durchführbar ist. Weitere Anforderungen an eine Methode, um gezielt N-Termini anzureichern, sind Reduktion der Probenkomplexität, Maximierung der Detektion von signifikanten Peptiden im Massenspektrometer und einfache Analyse der Massenspektrometer-Daten (Kleifeld et al. 2011). Tabelle 6.1 gibt einen Überblick über diese Methoden und ihre wichtigsten Eigenschaften.

Die von McDonald et al. entwickelte Methode zur selektiven Extraktion von N-terminalen Peptiden basiert auf der Acetylierung von freien α - und ε -Aminogruppen. Eine restriktive Spaltung der Probe resultiert in N-terminal acetylierten (N-Terminus) und nicht-acetylierten internen Peptiden. Letztere wurden ursprünglich biotinyliert und anschließend über Affinitätschromatographie mittels Streptavidin aus der Probe entfernt (McDonald et al. 2005). Diese Methode erforderte zahlreiche Reinigungsschritte, um die verwendeten Reagenzien wieder zu entfernen, wodurch es zu deutlichem Verlust von Probenmaterial kam. Deshalb wurde die Methode weiter entwickelt, um die erforderlichen Schritte zu minimieren und so die Ausbeute an Peptiden zu erhöhen. Die internen Peptide werden durch amin-reaktive immobilisierte Reagenzien aus der Probe entfernt, so dass lediglich die N-terminalen Peptide verbleiben und durch massenspektrometrische Analysen sequenziert werden können (McDonald und Beynon 2006). Diese Methode bietet einen einfachen Weg, um N-terminale Peptide zu identifizieren, und ist auch schon mit geringen Proteinmengen (ab 50 μg) durchführbar.

Tabelle 6.1: Methoden zur Analyse von N-Termini und Proteolyse-Produkten, modifiziert nach Kleifeld et al. 2011

Methoden	Eigenschaften, Vor- (+) und Nachteile (-)
Acetylierung primärer Amine, tryptische Spaltung, Biotinylierung freier N-Termini der internen tryptischen Peptide <i>McDonald et al. 2005</i>	Chemische Markierung freier N-Termini und Lysine, negative Selektion blockierter N-Termini (-) keine Unterscheidung zwischen blockierten N-Termini und freien N-Termini interner Peptide nach Acetylierung möglich (-) geringe Peptidausbeute (-) kein quantitativer Aspekt
Lysin-Guanidierung und Biotinylierung der N-Termini <i>Timmer et al. 2007</i>	Chemische Markierung freier N-Termini nach chemischer Blockierung der Lysin-Seitenketten, positive Selektion der N-terminalen Peptide (-) nicht für blockierte N-Termini geeignet (-) kein quantitativer Aspekt
Biotinylierung der N-Termini durch Subtiliginase <i>Mahrus et al. 2008</i>	Enzymatische Markierung der N-Termini durch patentgeschütztes Enzym, dadurch positive Selektion der N-Termini möglich (+) keine Blockierung der Lysine notwendig (-) N-Termini können zu kurz für Analyse sein (-) stark abhängig von Subtiliginase-Aktivität (-) nicht für blockierte N-Termini geeignet (-) große Proteinmengen erforderlich (-) kein quantitativer Aspekt
iTRAQ-Markierung der Protein N-Termini <i>Enoksson et al. 2007</i>	Markierung der N-Termini durch stabile Isotope (+) quantitativ (+) Vergleich zwischen unbehandelter und behandelter Probe mittels verschiedener Reagenzien (-) sehr komplexe Proben, keine Anreicherung der N-Termini (-) iTRAQ-Reagenzien sehr teuer (-) sehr geringe Ausbeute an N-Termini (-) nicht für blockierte N-Termini geeignet
COFRADIC <i>(combined fractional diagonal chromatography)</i> <i>Gevaert et al. 2003</i>	Alkylierung freier Aminogruppen, tryptische Spaltung der Proteine, negative Selektion der N-Termini durch Markierung der internen Peptide mittels TNBS (+) Unterscheidung zwischen blockierten und neu generierten Termini (+) Quantitative Identifizierung neu generierter N-Termini (+) Flexible und etablierte Methode (-) Sehr aufwändig, MS-intensiv
TAILS <i>(terminal amine isotopic labeling of substrates)</i> <i>Kleifeld et al. 2010</i>	Dimethylierung der primären Amine, negative Selektion der N-Termini durch Entfernen der internen Peptide mittels eines Polyglycerol-Aldehyd-Polymers (+) Blockierte N-Termini möglich (+) sehr flexibel (+) Verwendeter Polymer ist kommerziell erwerblich (+) Quantitativ

Nachteile liegen allerdings darin, dass natürlich blockierte N-Termini nicht von den tryptisch-generierten internen Peptiden unterschieden werden können und die Ausbeute an Peptiden für eine globale Analyse zu gering ausfällt (Kleifeld et al. 2011).

Einen ähnlichen Ansatz bietet die 2007 von Timmer et al. publizierte Methode. Freie Aminogruppen der Lysine werden zunächst durch Guanidierung blockiert, die N-Termini der Proteine werden durch Biotinylierung markiert. Nach tryptischer Spaltung der Probe werden die markierten Peptide durch Affinitätschromatographie positiv selektiert und so für weitere Analysen angereichert (Timmer et al. 2007). Natürlich blockierte N-Termini können so allerdings ebenfalls nicht untersucht werden, außerdem ist es eine vollständige Guanidierung der Lysin-Aminogruppen schwer zu erreichen (Kleifeld et al. 2011).

Einen quantitativen Ansatz zur Analyse von proteolytischen Restriktionsstellen bietet die Markierung durch sogenannte iTRAQ-Reagenzien. iTRAQ (*isobaric tagging for relative and absolute quantitation*) wurde entwickelt, um quantitative Unterschiede in Proteingehalten im Massenspektrometer nachzuweisen (Ross et al. 2004). Enoksson et al. entwickelten basierend auf diesem Verfahren eine Methode, um durch die Verwendung von stabilen Isotopen als Markierung Substrate von Proteasen zu identifizieren. Dabei wird die zu untersuchende Probe nach Guanidierung der Lysin-Aminogruppen halbiert, die eine Hälfte wird in Anwesenheit der aktiven Protease inkubiert, die andere Probe bleibt unbehandelt oder wird mit einer inaktiven Protease behandelt. Anschließend werden beide Proben mit verschiedenen iTRAQ-Markierungen versehen und wieder vereint. Nach einer tryptischen Spaltung der kompletten Probe wird diese im Massenspektrometer analysiert. Die unterschiedlichen isobarischen Markierungen besitzen verschiedene Massen und weisen jeweils ein charakteristisches Zerfallsmuster im Massenspektrometer auf. Dadurch ist es möglich, die Proben zu unterscheiden. Durch das Auftreten eines für das jeweilige Isotop typischen Reporter-Ions kann die relative Häufigkeit der im Spektrum identifizierten Peptide im Verhältnis zum Reporter-Ion bestimmt werden (Ross et al. 2004; Enoksson et al. 2007). Durch den Vergleich zwischen unbehandelter und behandelter Probe eignet sich diese Methode allerdings weniger für die Sequenzierung des hydrogenosomalen N-Proteoms. Weitere Nachteile liegen in der großen Komplexität der Proben, da keine Anreicherung der N-Termini vorgesehen ist (Kleifeld et al. 2011).

Eine sehr etablierte und erfolgreiche Methode, um N-terminale Peptide zu isolieren, ist die von Gevaert und Kollegen entwickelte COFRADIC-Methode (*combined fractional diagonal chromatography*, (Gevaert et al. 2003)). Freie Aminogruppen der Proteine werden zunächst mittels Acetylierung blockiert und die Proteine dann durch Trypsin gespalten, so dass zwei Arten von Peptiden entstehen. N-terminale Peptide weisen einen acetylierten N-Terminus auf, während die durch die tryptische Spaltung generierten internen Peptide einen

freien N-Terminus besitzen. Die gesamte Probe wird mittels *reverse phase* Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) fraktioniert, anschließend werden alle Peptide einer Fraktion mit TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid) behandelt. Nur die freien Aminogruppen der internen Peptide reagieren mit TNBS und bilden sehr hydrophobe Trinitrophenyl-Peptide (TNP-Peptide). Die behandelten TNBS-Fractionen werden durch einen zweiten RP-HPLC-Lauf über die gleiche Säule und unter identischen Bedingungen des ersten Laufs erneut fraktioniert. TNP-markierte interne Peptide weisen eine hydrophobe Veränderung auf und eluieren deshalb später als im ersten Lauf. Die unmarkierten N-terminalen Peptide verändern ihr Verhalten in der Chromatographie nicht und können so einfach identifiziert und isoliert werden. Durch weitere massenspektrometrische Analysen ist dann die Sequenzierung der gesammelten N-Termini möglich (Gevaert et al. 2003). COFRADIC ermöglicht so umfassende N-terminale Analysen. Um diese durchzuführen, sind allerdings komplexe RP-Chromatographien nötig, die gesammelten N-Termini erfordern umfangreiche Analysen im Massenspektrometer, so sind pro gesammelter Fraktion bis zu 150 MS/MS-Analysen erforderlich. Durch die Vereinigung von Proben kann die Anzahl der Analysen aber reduziert werden (Staes et al. 2008; Kleifeld et al. 2011).

Eine alternative und weniger zeitintensive Methode ist die von Kleifeld und Kollegen entwickelte TAILS-Methode. TAILS (*terminal amine isotopic labeling of substrates*) basiert auf einer negativen Selektion aller N-Termini, indem interne Peptide durch die Verwendung von dendritischen Polyglycerol-Aldehyd-Polymeren entfernt werden (Kleifeld et al. 2010). Um Substrate von Proteasen zu identifizieren, wird auch in dieser Methode zwischen einer unbehandelten Kontrolle und einer Protease-behandelten Probe unterschieden. Durch Dimethylierung der primären Amine mittels ($d(2)C^{13}$)-Formaldehyd (Protease-behandelte Probe, schweres Isotop) und ($d(0)C^{12}$)-Formaldehyd (Kontrolle, leichtes Isotop) werden alle freien ϵ -Aminogruppen der Lysine und α -Aminogruppen der N-Termini markiert und blockiert. Anschließend werden die Proben vereint und durch Trypsin gespalten. Durch die Dimethylierung der Lysine restringiert Trypsin nur noch an Arginin-Stellen in der Sequenz, so dass längere Peptide entstehen, was die Identifizierung der N-Termini im Massenspektrometer erleichtert. Durch den Einsatz von wasserlöslichen Polymeren, die mit den freien N-Termini der internen Peptide reagieren, werden diese aus der Probe entfernt und so spezifisch die N-terminalen Peptide angereichert. Die gesammelten N-Termini werden anschließend im Massenspektrometer analysiert, wobei die unterschiedlichen Markierungen zur Identifizierung und Quantifizierung von Protease-Substraten dienen (Kleifeld et al. 2010). Diese Methode bietet so eine einfache Möglichkeit, umfassende Analysen von N-Termini und Identifizierungen von Substraten durchzuführen (Guryča et al. 2012). Ein weiterer Vorteil ist die große Flexibilität der Methode, da sie mit verschiedenen

Probenpräparationen und diversen isotopischen Markierungsmethoden kombiniert werden kann. Die Markierung kann wie beschrieben durch Dimethylierung erfolgen, in Zellkulturen kann aber zum Beispiel auch SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*, Gioia et al. 2009) angewendet werden (SILAC-TAILS). Sollen mehr als zwei unterschiedliche Proben untersucht werden, ist es außerdem möglich, TAILS mit iTRAQ (iTRAQ-TAILS) zu kombinieren (Prudova et al. 2010; Kleifeld et al. 2011).

Für die Analyse und Sequenzierung des hydrogenosomalen N-Proteoms sind allerdings einige Modifikationen der Methode notwendig. Ziel der Studie sollte die globale Sequenzierung der N-Termini sein, ein Vergleich zwischen unbehandelter und Protease-behandelter Probe ist bei importierten Proteinen nicht möglich.

Basierend auf der TAILS-Methode haben Huesgen et al. 2013 eine Möglichkeit entwickelt, um native N-Termini von Proteinen aus komplexen Plastiden zu untersuchen (Huesgen et al. 2013). Die Kieselalge *Thalassiosira pseudonana* besitzt Plastiden, die durch sekundäre Endosymbiose entstanden sind (Archibald 2009; Green 2010). Die Proteine der Plastiden werden im Cytosol synthetisiert und anschließend durch eine zweiteilige Transitsequenz über insgesamt vier Membranen in die Organellen importiert (Gruber et al. 2007). Genaue Informationen über die Eigenschaften der Transitpeptide und ihre Restriktionsstellen fehlten bislang, es wurden nur einzelne N-Termini sequenziert (Patron und Waller 2007). Die Adaption von TAILS auf reife N-Termini von importierten Proteinen umfasst ebenfalls die Dimethylierung der primären N-terminalen α -Amine und der ϵ -Amine der Lysin-Seitenketten durch Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid. Dabei wurden Proteinmengen zwischen 500 μ g und 1 mg eingesetzt. Im Gegensatz zur ursprünglichen TAILS-Methode wurde dabei auf verschiedene Formaldehyd-Isotope verzichtet, da der vergleichende und quantifizierende Aspekt nicht relevant ist. Nach einer tryptischen Spaltung der Probe werden interne Signale über ihre unmodifizierte Aminogruppe mittels des HPG-ALD-Polymers isoliert, so dass die N-terminalen Peptide spezifisch angereichert werden und durch MS-Analysen sequenziert und identifiziert werden können. Durch Anwendung dieser Methode konnten Huesgen und Kollegen 63 Transitpeptide der Kieselalge identifizieren und sequenzieren und so konservierte Schnittstellen für die im Stroma lokalisierte prozessierende Protease SPP und eine weitere Protease identifizieren. Diese Informationen erweitern die Vorstellung der zweigeteilten Targeting-Sequenz und des Ablaufs des Proteinimports über die Membranen der Plastiden (Huesgen et al. 2013).

Derartige Erkenntnisse wären auch für hydrogenosomale Proteine wünschenswert, um ein umfassendes Bild über das hydrogenosomale N-Proteom und den Umfang der Prozessierung zu erlangen. Bis auf wenige einzelne sequenzierte N-terminale Peptide gibt es keine Informationen über die Prozessierung der HTS und daran beteiligte Enzyme. Es

konnte bislang nur eine hydrogenosomale Peptidase identifiziert werden. Die sequenzierten Präsequenzen weisen sowohl das R-2 als auch das R-3-Motiv auf, so dass auch dort noch keine konkrete Aussage über die Schnittstelle der HPP getroffen werden kann (Bradley et al. 1997). Die Varianz zwischen den beiden Arginin-Motiven könnte für die Anwesenheit einer weiteren Protease sprechen, die analog zur Icp55 der Mitochondrien als sekundär prozessierendes Enzym nach der HPP fungiert (Voegtle et al. 2009). Das Genom von *T. vaginalis* enthält neun Gene, die für Rhomboid-Proteasen codieren, sieben dieser Gene werden allerdings als inaktiv vorhergesagt (Santos et al. 2011). Rhomboid-Proteasen bilden eine große Familie von Intramembran-Serinproteasen, die in allen sechs Tierreichen vorkommen (Koonin et al. 2003). Dabei fallen ihnen mehrere Funktionen zu. Einerseits fungieren sie intrazellulär in Signalwegen, in Mitochondrien sind sie für die sekundäre Prozessierung von importierten Proteinen des Innermembranraums verantwortlich, bekannte Substrate für die Prozessierung durch Rhomboid-Proteasen in *S. cerevisiae* sind die Cytochrom C Peroxidase und die Dynamin-ähnlichen GTPase Mgm1p (Herlan et al. 2003; McQuibban et al. 2003; Esser et al. 2004; Santos et al. 2011; Teixeira und Glaser 2013). Ob die als aktiv annotierten Rhomboid-Proteasen in *T. vaginalis* in den Hydrogenosomen lokalisiert sind und ebenfalls zur Prozessierung von importierten Proteinen beitragen, müsste durch Lokalisationsstudien und durch die globale Analyse des hydrogenosomalen N-Proteoms verifiziert werden.

6.2. Abhängigkeit des Proteinimports von der Konformation der Proteine

Der Großteil der mitochondrialen Proteine ist kerncodiert und wird deshalb im Cytosol der Zelle an freien Ribosomen synthetisiert (Neupert und Herrmann 2007). Nach der Synthese bilden die Präproteine Komplexe mit cytosolischen Komponenten, um sich vor Aggregation und Degradation zu schützen. Bekannte Interaktionspartner sind die cytosolischen Chaperone Hsp70 und Hsp90 (Mihara und Omura 1996; Young et al. 2003). Über die in den Proteinen enthaltenen Importinformationen gelangen diese an die Mitochondrien. Die Translokase der äußeren Membran, der sogenannte TOM-Komplex, ist die generelle Importpore für nahezu alle mitochondrialen Proteine (Wiedemann et al. 2004). Über die Rezeptor-Untereinheiten Tom20 (Proteine mit MTS) und Tom70 (interne Importsignale) erfolgt die Erkennung der Protein-Chaperon-Komplexe, durch Bindung von ATP wird anschließend die Freilassung der Proteine aus diesen Komplexen ermöglicht, so dass die Insertion in den TOM-Komplex erfolgen kann (Abe et al. 2000; Yano et al. 2003; Young et al. 2003; Neupert und Herrmann 2007). Die meisten mitochondrialen Proteine werden in

entfalteter Konformation importiert. Dabei scheinen die Mitochondrien aktiv an der Entfaltung der Präproteine beteiligt zu sein (Wilcox et al. 2005; Neupert und Herrmann 2007).

Eilers und Schatz konnten 1986 zeigen, dass Proteine nur entfaltet in die Mitochondrien importiert werden können. Dazu nutzen sie ein Fusionsprotein aus einem cytosolischen Protein (mDHFR, murine Dehydrofolatreduktase) und der Präsequenz der Cytochrom Oxidase Untereinheit IV, einem mitochondrialen Protein. Hurt et al. konnten zuvor bereits nachweisen, dass dieses Fusionsprotein sowohl in isolierte Mitochondrien als auch *in vivo* in Mitochondrien lebender Hefezellen importiert und auch prozessiert wird (Hurt et al. 1984; Hurt et al. 1985). Eilers und Schatz konnten demonstrieren, dass die Anwesenheit der Präsequenz die enzymatische Aktivität der DHFR nicht beeinflusst, das Protein liegt also in seiner nativen Konformation vor und konnte erfolgreich in die Mitochondrien importiert werden. Dort war es auch vor Abbau durch Proteinase K geschützt, was für den vollständigen Import in die Matrix der Organellen spricht. In Anwesenheit von Methotrexat, einem Antifolat mit Ähnlichkeit zum Substrat der DHFR, wurde der Import des Fusionsproteins *in vitro* verhindert, der Proteinimport generell wurde aber nicht inhibiert. Daraus schlussfolgerten Eilers und Schatz, dass Methotrexat durch die Bindung an DHFR die Linearisierung der Sekundärstrukturen des Proteins verhindert und der mitochondriale Proteinimport von der Konformation der zu importierenden Proteinen abhängt (Eilers und Schatz 1986). Das Targeting der Präproteine wurde dadurch nicht beeinflusst, es konnte eine Akkumulation von Präproteinen an den isolierten Mitochondrien festgestellt werden. Durch die Arretierung des Proteinimports bildet sich eine Art Import-Intermediat. Die Präsequenz durchspannt die beiden Membranen, während die gefaltete DHFR-Domäne außerhalb der Organellen an der äußeren Membran verbleibt (Rassow et al. 1989).

Diese Erkenntnisse konnten weiterführend durch *in vivo* Studien an Hefezellen vertieft werden. Die Anwesenheit des Methotrexat-Derivats Aminopterin induzierte eine stabile Tertiärstruktur eines Fusionsproteins aus der Präsequenz von Cytochrom b_2 und DHFR in lebenden Hefezellen und führte so zu einer Akkumulation des Fusionsproteins an mitochondrialen Kontaktstellen, der Import des Proteins konnte nicht mehr erfolgen (Wienhues et al. 1991). Es blieb aber zunächst unklar, ob Präproteine für den Import vollständig entfaltet werden müssen und linear Aminosäure für Aminosäure durch den Importkanal transportiert werden oder ob partielle Proteinstrukturen erhalten bleiben können. Elektronenmikroskopische Aufnahmen und elektrophysische Messungen ergaben einen ungefähren Durchmesser der Importpore von 20 bis 22 Ångström, so dass der Import von Proteinen mit Sekundärstruktur-Elementen denkbar wäre (Hill et al. 1998; Künkele et al. 1998). Durch das Einbringen von Disulfid-Brücken, die mehrere β -Faltblatt-Stränge kovalent vernetzen, konnten Schwartz und Kollegen überprüfen, ob der Import eines Fusionsproteins

(MTS von *S. cerevisiae* Cytochrom b_2 vor *B. amyloliquefaciens* Barnase (unmodifiziert nur ein β -Faltblatt) durch diese Strukturen inhibiert wird. Dabei konnten sie zeigen, dass schon die Anwesenheit einer einzelnen stabilisierten β -Faltblatt-Struktur den Proteinimport im Vergleich zum unmodifizierten Protein deutlich inhibiert, was darauf hinweist, dass die Sekundärstruktur der Barnase normalerweise vollständig entfaltet wird (Schwartz et al. 1999).

Die Möglichkeit, die Sekundärstrukturen der DHFR durch Anwesenheit von Methotrexat zu stabilisieren, wurde auch genutzt, um den Proteinimport in Chloroplasten zu untersuchen. Dazu wurde ein Fusionsprotein aus dem Transitpeptid des Chloroplasten-Proteins Plastocyanin und der DHFR verwendet. In Anwesenheit von Methotrexat wurde der Proteinimport des Fusionsproteins aber nicht inhibiert, sondern lediglich verlangsamt (America et al. 1994). Weitere Untersuchungen zeigten, dass das Fusionsprotein durch Bindung an die Chloroplasten-Membranen trotz Anwesenheit von Methotrexat entfaltet wird, was indiziert, dass es starke Entfaltungsmechanismen an der Oberfläche der Chloroplasten gibt (Guera et al. 1993).

Der hydrogenosomale Proteinimport ist nicht annähernd so umfassend untersucht wie der Import in Mitochondrien. Erst in letzter Zeit wurden durch eine umfangreiche Proteomanalyse der hydrogenosomalen Membranen wichtige Komponenten der hydrogenosomalen Proteinimportmaschinerie entdeckt, wie zum Beispiel Paraloge zu Tom40, Sam50 und Pam18 (Rada et al. 2011; Schneider et al. 2011). Lokalisationen einiger Kandidaten durch Immunofluoreszenz-Assays zeigte eine klare Lokalisation in der hydrogenosomalen Membran und teilweise ringförmige Strukturen um die Matrix der Organellen (Rada et al. 2011). Weitere Erkenntnisse über den Aufbau oder die Eigenschaften der Translokasen gibt es allerdings noch nicht. Auch die Konformation der hydrogenosomalen Proteine während des Imports ist noch ungeklärt. Aufgrund der Verwandtschaft der Mitochondrien-ähnlichen Organellen könnten weitere Ähnlichkeiten der Importmaschinerien und -abläufe vorliegen. Um zu untersuchen, ob der hydrogenosomale Proteinimport ebenfalls von der Linearisierung der zu importierenden Präproteine abhängt, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob DHFR durch eine hydrogenosomale Präsequenz in die Hydrogenosomen importiert werden kann und ob der Import durch Anwesenheit eines Antifolats inhibiert wird.

Zur Untersuchung der Protein-Konformation während des hydrogenosomalen Proteinimports wurde ein Fusionsprotein aus der hydrogenosomalen Transitsequenz der Thioredoxin-Reduktase 1 (TrxRh1, HTS *MFSIIFSRFS*) und DHFR hergestellt (HTS*DHFR). Die HTS der TrxRh1 wurde ausgewählt, da sie als essentiell für den Import der TrxRh1 in die Hydrogenosomen gilt (Mentel et al. 2008; Zimorski et al. 2013). Durch Immunodetektionen

und Immunofluoreszenz-Assays sollte zunächst die intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins bestimmt werden, bevor der Einfluss der Proteinfaltung auf den Proteinimport in die Hydrogenosomen mittels Stabilisierung der Tertiärstrukturen der DHFR durch Pyrimethamin untersucht werden sollte.

Wie erwartet konnte das cytosolische Protein mDHFR in Immunofluoreszenz-Assays im Cytosol der Zellen detektiert werden. Auch in den subzellulären Fraktionen transfizierter Zellen wurde der überwiegende Teil des Proteins in der cytosolischen Fraktion detektiert (Abbildung 5.6). Das Fusionsprotein HTS*DHFR wurde in Immunodetektionen in den Hydrogenosomen detektiert und war dort vor Abbau durch Proteinase K geschützt, was dafür spricht, dass die HTS der TrxRh1 das Protein in die Matrix der Hydrogenosomen importieren kann (Abb. 5.6 A). Bei Verifizierung der Lokalisation mittels Immunofluoreszenzmikroskopie wurde das Protein in abgegrenzten Strukturen innerhalb der Zelle detektiert, die entgegen der Erwartungen nicht den Hydrogenosomen entsprechen. Es konnte keine Ko-Lokalisation des Proteins mit einem hydrogenosomalen Markerprotein festgestellt werden (Abb. 5.6 B). Diese widersprüchlichen Ergebnisse aus Immunodetektionen der einzelnen subzellulären Fraktionen und der *in vivo* Immunofluoreszenzmikroskopie machen eine weitere Untersuchung der Faltungsabhängigkeit des hydrogenosomalen Proteinimports zunächst unmöglich, da die genaue Lokalisation des Fusionsproteins unklar bleibt.

Dieses Ergebnis wurde mehrfach in unabhängigen Versuchen beobachtet, so dass eine ungleichmäßige Antikörperfärbung der Organellen ausgeschlossen werden kann. Das Fusionsprotein scheint in einem anderen Zellorganell oder -kompartiment zu lokalisieren, dass während der Isolierung der Hydrogenosomen als Kontamination ebenfalls isoliert wird, da HTS*DHFR im Rahmen der Immunodetektion in der isolierten hydrogenosomalen Fraktion detektiert werden konnte. Auch die Verifizierung des Imports durch Behandlung der Hydrogenosomen mit Proteinase K spricht dafür, dass HTS*DHFR in einem Organell lokalisiert ist, da auch in Anwesenheit von Proteinase K ein Signal durch den HA-Antikörper detektiert werden konnte. Im Fall einer Akkumulation des Fusionsproteins an der äußeren hydrogenosomalen Membran aufgrund von Problemen während des Importprozesses wäre das Protein durch Proteinase K abgebaut worden und somit nicht mehr in der Immunodetektion nachweisbar.

T. vaginalis besitzt neben den Hydrogenosomen weitere Zellorganellen, die Lysosomen (Petrin et al. 1998; Benchimol 2009). Diese Zellorganellen sind Vesikel, die für die Degradation von Makromolekülen verantwortlich sind (de Duve 2005). Dabei können sie sowohl von der Zelle aufgenommenes Material als auch zelleigene Makromoleküle verarbeiten. Lysosomen ähneln in ihrer Masse den Hydrogenosomen, unterscheiden sich aber in der Dichte von diesen und können deshalb während der Isolierung der

Hydrogenosomen durch eine isopyknische Zentrifugation über einen Percoll-Gradienten von den Hydrogenosomen getrennt werden (Lockwood et al. 1988; Bradley et al. 1997). Defekte Hydrogenosomen werden durch Autophagie in den Lysosomen abgebaut, wie am Beispiel von *Tritrichomonas foetus* gezeigt werden konnte. Die Hydrogenosomen werden in diesem Prozess von Membranen des endoplasmatischen Retikulums umschlossen und sind zunächst noch intakt bzw. können die Hydrolasen der Lysosomen die hydrogenosomalen Matrixproteine nicht unmittelbar abbauen, so dass weiterhin hydrogenosomale Proteine in dieser Vakuole detektiert werden konnten (Benchimol 1999). Das Fusionsprotein HTS*DHFR scheint also nicht durch unvollständigen Import für eine starke Beschädigung und somit den Abbau der Hydrogenosomen verantwortlich zu sein. In diesem Fall müsste auch das hydrogenosomale Markerprotein in diesen Kompartimenten detektiert werden. Es wäre möglich, dass das Fusionsprotein im Cytosol akkumuliert und deswegen durch die Lysosomen abgebaut wird. Bei einer Überprüfung der subzellulären Fraktionen von HTS*DHFR transfizierten Zellen konnte das Fusionsprotein auch in der lysosomalen Fraktion mittels eines HA-Antikörpers detektiert werden. Es handelte sich dabei nicht um eine hydrogenosomale Kontamination, da das hydrogenosomale Markerproteins ASCT nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung 8.4, Anhang). Ob es sich bei dieser Fraktion tatsächlich um Lysosomen handelt oder um degenerierte Hydrogenosomen oder weitere bislang unbekannte Zellorganellen handelt, müsste durch ein lysosomales Markerprotein verifiziert werden. Durch *in vivo* Immunfluoreszenz-Assays unter Verwendung eines lysosomalen Markers wie zum Beispiel LysoSensor oder LysoTracker, die erfolgreich an peripheren Vakuolen von *Giardia lamblia* angewandt wurden (Touz et al. 2012), könnte außerdem überprüft werden, ob eine Ko-Lokalisation mit dem Fusionsprotein vorliegt.

Salvador und Kollegen nutzten das System der DHFR, um die Konformation von Proteinen, die im Rahmen von Chaperon-vermittelter Autophagie in die Lysosomen transportiert werden, zu untersuchen (Salvador et al. 2000). Dabei konnten sie zeigen, dass mDHFR *in vitro* in Leberzellen von Ratten in die Lysosomen importiert wurde. Die Anwesenheit einer Signalsequenz der Untereinheit 9 der ATPase von *Neurospora crassa* verstärkte die Menge an importierter DHFR zusätzlich. In Anwesenheit des Folat-Derivats Methotrexat wurde der Import inhibiert, der Import von zu degradierenden Proteinen scheint von der Entfaltung dieser abhängig zu sein. Warum das Fusionsprotein mit so großer Effizienz importiert wurde, bleibt unklar. Der Import von Proteinen in Lysosomen durch Chaperon-vermittelte Autophagie wird mit spezifischen Pentapeptid-Sequenzen assoziiert. So werden bevorzugt Proteine degradiert, die KFERQ-ähnliche Sequenzen enthalten (Wing et al. 1991; Cuervo et al. 1995). mDHFR besitzt mit der Sequenz KDRIN (beginnend ab AS 69) und RLIEQ (AS 98) zwei dieser Sequenzen. Die verwendete Präsequenz der ATPase-

Untereinheit besitzt ebenfalls zwei Sequenzen, die als KFERQ-ähnlich angesehen werden, so dass es möglich ist, dass diese Sequenzen den Import der DHFR drastisch verstärken (Salvador et al. 2000).

Da mDHFR alleine im Cytosol der Zellen detektiert werden konnte, scheint das Protein aus einem anderen Organismus nicht die Ursache für die Fehllokalisierung zu sein und die enthaltenen KFERQ-ähnlichen Sequenzen nicht für einen Import in die Lysosomen von *T. vaginalis* verantwortlich. Die Lokalisation in den ungeklärten Zellstrukturen tritt erst in Anwesenheit der hydrogenosomalen Präsequenz der TrxRh1 auf. Deshalb war das Fusionsprotein HTS*DHFR aufgrund der ungeklärten Lokalisation nicht geeignet, um die Abhängigkeit des hydrogenosomalen Proteinimports von der Struktur der Präproteine zu untersuchen. Alternativ könnte eine andere hydrogenosomale Präsequenz in Kombination mit DHFR genutzt werden, zum Beispiel die HTS des NifU-ähnlichen Proteins TVAG_146780, für die gezeigt werden konnte, dass sie essentiell für den Import des Proteins in Hydrogenosomen ist (Palakunnel, 2013). Weiterführende Arbeiten zur Untersuchung der Abhängigkeit des hydrogenosomalen Proteinimports von der Konformation der importierten Proteine verwendeten ebenfalls mDHFR, als HTS diente die N-terminale Präsequenz von TVAG_146780. Die HTS des NifU-ähnlichen Proteins konnte mDHFR in die Hydrogenosomen importieren, allerdings zeigte sich in dieser Arbeit, dass mDHFR auch ohne HTS in die Hydrogenosomen importiert wurde (Temirci, 2014). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in deren Rahmen mDHFR durch Immunofluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen im Cytosol der Zellen detektiert werden konnte. Da aber auch die Ursache für die Fehllokalisierung der Fusionsproteine aus HTS der TrxRh1 und mDHFR nicht aufgeklärt werden konnte, scheint das Reporterprotein mDHFR generell für die Anwendung in *T. vaginalis* nicht geeignet zu sein.

6.3. N-terminale Importsequenzen vs. interne Signale

Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umgeben und werden dadurch in vier Subkompartimente gegliedert. Zwischen der äußeren und der inneren Membran liegt der Intermembranraum, die Matrix wird von der Doppelmembran umschlossen (Neupert 1997). 99% der mitochondrialen Proteine sind kerncodiert und werden deshalb nach ihrer Synthese im Cytosol der Zelle in die Organellen importiert (Chacinska et al. 2009). Je nach Bestimmungsort innerhalb der Mitochondrien tragen die importierten Proteine spezifische Importsignale. Die Vorläufer-Proteine lassen sich dabei in zwei Hauptklassen einteilen.

Proteine der mitochondrialen Matrix sowie einige Proteine der inneren Membran und des Intermembranraums tragen prozessierbare, N-terminale Präsequenzen, die für das Targeting der Proteine an die Organellen und den Import durch die Translokasen der Membranen verantwortlich sind. Alle äußere Membranproteine und zahlreiche Proteine der inneren Membran und des Intermembranraums beinhalten interne Importsignale und besitzen keine N-terminale Verlängerung (Wiedemann et al. 2004).

Aufgrund der Verwandtschaft der Mitochondrien und der Hydrogenosomen wurde zunächst angenommen, dass auch der Mechanismus des Proteinimports konserviert ist (Doležal et al. 2006). Hydrogenosomale Matrixproteine tragen ebenfalls häufig eine N-terminale Präsequenz, die nach Import des Proteins durch eine in der Matrix der Organellen lokalisierte Protease (HPP) prozessiert wird (Doležal et al. 2005). In den letzten Jahren konnten aber vermehrt Hinweise entdeckt werden, dass der Import von hydrogenosomalen Matrixproteinen nicht so strikt von N-terminalen Präsequenzen abhängig ist wie der mitochondriale Proteinimport. Mentel et al. konnten 2008 als erste am Beispiel des Proteins SCSa zeigen, dass der Import nicht essentiell an die Anwesenheit der N-terminalen Präsequenz gebunden ist. SCSa wurde auch nach Deletion ihrer HTS noch in die Organellen importiert. Dieses Ergebnis legt nahe, dass es weitere Importsignale innerhalb des Proteins geben muss (Mentel et al. 2008). Diese Erkenntnisse konnten 2013 von Zimorski et al. vertieft werden. In ihrer Studie wurde gezeigt, dass der Proteinimport von vier der am häufigsten in den Hydrogenosomen vorkommenden Proteinen unabhängig von deren N-terminalen Präsequenzen ist. Durch Unterteilung der SCSa in mehrere einzelne Abschnitte konnten sie außerdem zeigen, dass sich interne Signale nicht auf eine einzelne Domäne innerhalb des Proteins beschränken müssen, sondern mehrere Signale über die vollständige Proteinsequenz verteilt vorkommen können, die ausreichend Importinformationen enthalten, um auch isoliert in die Hydrogenosomen importiert zu werden. Interne Signale scheinen bei hydrogenosomalen Proteinen also nicht die Ausnahme zu sein, sondern häufiger vorzukommen (Zimorski et al. 2013). Obwohl auch bis zu 1/3 der mitochondrialen Matrixproteine keine typische MTS besitzen und somit interne Signale beinhalten müssen, scheint der hydrogenosomale Proteinimport nicht so abhängig von N-terminalen Präsequenzen zu sein wie der Import in die Mitochondrien (Gakh et al. 2002; Chacinska et al. 2009; Zimorski et al. 2013). Die hydrogenosomalen Transitsequenzen sind mit einer durchschnittlichen Länge von 10 Aminosäuren auch deutlich kürzer als die mitochondrialen Präsequenzen, die eine Länge von 10 bis 80 Aminosäuren haben (Neupert und Herrmann 2007; Schneider et al. 2011). Lediglich die Hälfte der vorhergesagten hydrogenosomalen Proteine trägt eine charakteristische HTS, was ein weiteres Zeichen für die geringere Bedeutung der Transitsequenzen ist (Burstein et al. 2012; Zimorski et al. 2013). Es scheint

möglich, dass der Proteinimport in die Hydrogenosomen von *T. vaginalis* auf einer Kombination aus N-terminalen und internen Importsignalen basiert, genauere Informationen über Art und Umfang der internen Signale fehlen noch (Major, 2013).

Das Fusionsprotein aus der HTS der TrxRh1 und mDHFR konnte nicht genutzt werden, um die Abhängigkeit des hydrogenosomalen Proteinimports von der Konformation der Proteine zu untersuchen. Da es sich bei mDHFR um ein cytosolisches Protein handelt, wurde dieses Reporterprotein im Rahmen der vorliegenden Arbeit anschließend verwendet, um interne Signale und ihre Kombination mit N-terminalen Präsequenzen zu untersuchen. Zimorski et al. konnten zeigen, dass einzelne Abschnitte der SCS α auch isoliert in die Hydrogenosomen importiert werden können (Zimorski et al. 2013). Um zu verifizieren, ob die Importkompetenz einer einzelnen Domäne ausreichend ist, ein cytosolisches Protein in die Hydrogenosomen zu importieren, wurde die codierende Sequenz des zweiten SCS-Abschnitts (SCS α Block 2) mittels *overlap extension* PCR in die codierende Sequenz der mDHFR eingefügt (mDH::SCS::FR, Kapitel 4.9.2). Zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen hydrogenosomaler Präsequenz und internen Importsignalen wurde außerdem ein Fusionsprotein aus HTS der TrxRh1, mDHFR und SCS α Block 2 untersucht (HTS*DH::SCS::FR). Die Lokalisation dieser beiden Fusionsproteine in transfizierten *T. vaginalis* Zellen wurde durch subzelluläre Fraktionierung mit anschließender Immunodetektion der HA-markierten Proteine und Immunofluoreszenz-Assays untersucht (Kapitel 5.2.2). mDH::SCS::FR konnte in den isolierten Fraktionen Gesamtzellextrakt, Cytosol und Hydrogenosomen nachgewiesen werden. Die Verifizierung des Proteinimports durch Behandlung der Hydrogenosomen mit Proteinase K zeigte, dass das Protein vor Abbau durch die Protease geschützt war (Abbildung 5.6 A). Das Fusionsprotein aus mDHFR und dem zweiten Abschnitt der SCS α konnte folglich in die Matrix der Hydrogenosomen importiert werden. Bestätigt wird dieses Ergebnis auch durch Immunofluoreszenz-Aufnahmen der transfizierten *T. vaginalis* Zellen. mDH::SCS::FR konnte in abgegrenzten Kompartimenten in der Zelle lokalisiert werden. Die Ko-Lokalisation mit dem hydrogenosomalen Markerprotein ASCT zeigt, dass das Fusionsprotein in den Hydrogenosomen lokalisiert ist (Abb. 5.6 B). Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass das im zweiten Abschnitt der SCS α enthaltene Importsignal ausreichende Importkompetenz an ein cytosolisches Protein vermitteln kann.

Das Fusionsprotein HTS*DH::SCS::FR konnte ebenfalls in der hydrogenosomalen Fraktion detektiert werden, wobei das Signal im Vergleich zu dem des Gesamtzellextrakts und der cytosolischen Fraktion schwächer war. In den Proben der Proteinase K-Behandlung konnte kein Signal des Fusionsproteins detektiert werden, lediglich in der als Kontrolle dienenden Probe ohne Proteinase K konnte das Protein nachgewiesen werden (Abb. 5.6 A).

Immunofluoreszenz-mikroskopische Analysen der transfizierten Zellen zeigten HTS*DH::SCS::FR in runden, klar abgegrenzten Strukturen, die gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt waren. Im Vergleich mit der Lokalisation des hydrogenosomalen Markerproteins ASCT zeigte sich keine Übereinstimmung, es handelt sich folglich bei den durch HA-Antikörper markierten Kompartimenten nicht um Hydrogenosomen. Es konnte keine Ko-Lokalisation des Fusionsproteins mit den Hydrogenosomen festgestellt werden (Abb. 5.6 B). Die beobachtete Lokalisation des Fusionsproteins HTS*DH::SCS::FR in runden Strukturen innerhalb der Zelle ähnelt der Lokalisation der HTS*DHF_R, die ebenfalls nicht mit den Hydrogenosomen ko-lokalisiert (Abb. 5.6 B). Auffällig dabei ist, dass die ungeklärten Lokalisationen nur in Anwesenheit der hydrogenosomalen Präsequenz der TrxRh1 auftreten, mDHF_R alleine ist cytosolisch lokalisiert, als Fusionsprotein mit einem Abschnitt der SCS_a wird das Protein in die Hydrogenosomen importiert. Ursache für die unerwartete Lokalisation scheint also die HTS der TrxRh1 zu sein.

Thioredoxin-Reduktase1 ist Teil eines Antioxidans-Systems in den Hydrogenosomen. Zwei Hauptkomponenten des Energie-Stoffwechsels der Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* sind die Sauerstoff-sensitiven Enzyme Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR) und {Fe}-Hydrogenase (Williams et al. 1990; Page-Sharp et al. 1996). In seiner natürlichen Umgebung im menschlichen Urogenitaltrakt ist der Parasit geringen Sauerstoffkonzentrationen von bis zu 60 μM ausgesetzt und wird deshalb als mikroaerophil bezeichnet (Wagner und Levin, 1978). Um die sensitiven Enzyme vor Sauerstoff zu schützen, besitzt der Organismus verschiedene Antioxidans-Systeme. Bei niedrigen Sauerstoff-Konzentrationen bis 0,25 μM wird Sauerstoff (O_2) durch NAD(P)H-Oxidasen schnell zu Wasser (H_2O) reduziert (Lindmark und Müller 1974). Bei höheren O_2 -Konzentrationen werden 5-10% des aufgenommenen Sauerstoffs zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt (Chapman et al. 1999). Die beteiligten NAD(P)H-Oxidasen bieten allerdings keinen Schutz gegen sogenannte reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS, *reactive oxygen species*) wie Superoxid-Radikale oder H_2O_2 . Zur Detoxifizierung der Superoxid-Radikalen dient das Enzym Superoxid-Dismutase, das sowohl in den Hydrogenosomen als auch im Cytosol der Zellen aktiv ist (Lindmark und Müller 1974). Viele Eukaryoten besitzen zur Detoxifizierung von schädlichen Peroxiden sogenannte Peroxid-reduzierende Systeme, die auf Gluthation-abhängigen Peroxidasen beruhen. Derartige Enzyme fehlen allerdings in *T. vaginalis* (Ellis et al. 1994). Im Cytosol der Zellen konnte stattdessen ein auf Thioredoxin-basierendes Antioxidans-System entdeckt werden (Coombs et al. 2004). Dieses System besteht aus einer Thiol-Peroxidase, Thioredoxin und einer Thioredoxin-Reduktase (TrxR). Thiol-Peroxidasen können Wasserstoffperoxid mittels von Thioredoxin zur Verfügung gestellten Elektronen reduzieren, oxidiertes Thioredoxin wird anschließend durch die

beteiligte TrxR reduziert (Rhee et al. 2005). Ein ähnliches System konnte durch die Identifizierung von Rubrerythrin und Peroxiredoxin Thiol-Peroxidase, die starke Ähnlichkeit zu prokaryotischen Peroxidasen aufweisen, auch in den Hydrogenosomen entdeckt werden (Pütz et al. 2005). Im Rahmen dieser Studie konnte außerdem ein Thioredoxin mit N-terminaler Präsequenz entdeckt werden, die starke Ähnlichkeit mit hydrogenosomalen Transitsequenzen aufweist. Die fehlende Komponente eines Thioredoxin-abhängigen Antioxidans-Systems, die TrxR, konnte anschließend durch Mentel et al. identifiziert werden (Mentel et al. 2008). Thioredoxin-Reduktasen der Eukaryoten werden in zwei Gruppen eingeteilt, deren Enzyme sich in Struktur und katalytischen Mechanismen unterscheiden. TrxR mit hohem Molekulargewicht (~55 kDa) kommen vor allem in Tieren und Protisten der Apicomplexa vor. Die zweite Gruppe besteht aus Thioredoxin-Reduktasen mit geringem Molekulargewicht (~35 kDa), die in den meisten anderen eukaryotischen Taxa vorkommen (Arscott et al. 1997; Hirt et al. 2002). Die in *T. vaginalis* identifizierte TrxR gehört zur Gruppe der Reduktasen mit geringem Molekulargewicht (Coombs et al. 2004). *T. vaginalis* besitzt fünf Homologe zu TrxR mit niedrigem Molekulargewicht, die sich stark ähneln, aber doch einige Unterschiede aufweisen. So beinhalten nicht alle Isoformen eine typische Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums (CATC). Die von Coombs et al. identifizierte TrxR konnte bereits im Cytosol lokalisiert werden (TrxRc). Die anderen vier Reduktasen wurden in sogenannte lange (mit N-terminaler Präsequenz) und kurze (ohne erkennbare N-terminale Verlängerung) Isoformen unterteilt. Drei Isoformen besitzen eine N-terminale Präsequenz, von denen allerdings nur zwei charakteristische HTS-Merkmale aufweisen. Durch Markierung der vier Isoformen durch Di-Hämagglutinin konnte deren Lokalisation in *T. vaginalis* verifiziert werden. Nur eine der langen Isoformen (TrxR_89667, TrxRh1) wurde in die Hydrogenosomen importiert. Außerdem konnte eine kurze Isoform ohne erkennbare HTS in den Hydrogenosomen lokalisiert werden, die auch nach Deletion der ersten 21 Aminosäuren noch importiert wurde (TrxRh2). TrxRh1 konnte allerdings nicht ausschließlich in den Hydrogenosomen lokalisiert werden, sondern auch in der cytosolischen Fraktion. Der N-terminalen Verlängerung der TrxRh1 fehlt das sonst oft charakteristische Leucin oder Serin an Position 2 der HTS (Carlton et al. 2007), besitzt aber an Position 9 Arginin, was auf eine putative Prozessierungsstelle der HPP hinweist (Hirt et al. 2007). Durch Deletion der ersten 10 Aminosäuren konnte gezeigt werden, dass die untypische N-terminale Präsequenz MFSIIFSRFS für den hydrogenosomalen Import essentiell ist, da das Protein ohne HTS im Cytosol verblieb (Mentel et al. 2008). Diese Ergebnisse basieren auf Immunodetektionen des HA-markierten Proteins TrxRh1 in den subzellulären Fraktionen Gesamtzellextrakt, Cytosol und Hydrogenosomen. Um Kontaminationen der einzelnen Fraktionen auszuschließen, wurden Enzymassays mit Kompartiment-spezifischen Marker-Enzymen durchgeführt (Mentel

et al. 2008). Um den hydrogenosomalen Proteinimport zu untersuchen, wurden in den letzten Jahren aber noch weitere Methoden angewandt, so sind mittlerweile Proteinase K-Behandlungen der isolierten Organellen üblich, um den Import zu verifizieren. Außerdem werden Immunofluoreszenz-Assays durchgeführt, um Proteine mit Hilfe von Antikörpern direkt in der Zelle zu lokalisieren. Diese Methoden sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf das Protein TrxRh1 angewendet werden, um die Bedeutung der N-terminalen Präsequenz erneut zu verifizieren und eventuelle Gründe für die beobachteten Lokalisationen der Fusionsproteine der mDHFR zu finden.

Untersucht wurden das native Protein TrxRh1 (TrxRH1, TVAG_281360) und TRxRh1 mit deletierter Präsequenz ($\Delta 10$ AS, TrxRh1 Δ HTS). Die Lokalisation des Proteins in An- und Abwesenheit der HTS wurde durch subzelluläre Fraktionierung transfizierter *T. vaginalis* Zellen und Proteinase K-Behandlung der isolierten Hydrogenosomen mit anschließender Immunodetektion der HA-Markierung und durch Immunofluoreszenz-Assays untersucht (Kapitel 5.2.3). TrxRh1 konnte in allen subzellulären Fraktionen detektiert werden. Dabei konnten Doppelbanden im Gesamtzellextrakt und in der cytosolischen Fraktion beobachtet werden. In der hydrogenosomalen Fraktion wurde nur die schneller migrierende Bande beobachtet. In den Proben der Proteinase K-Behandlung der Hydrogenosomen konnte auch in Abwesenheit der Proteinase K kein HA-markiertes Protein detektiert werden (Abb. 5.7 A). Ähnliche Doppelbanden wurden bereits häufiger bei Immunodetektionen hydrogenosomaler Proteine beobachtet. Sie treten meistens bei Proteinen mit deletiertem N-Terminus auf, können aber auch bei Untersuchungen an unmodifizierten Proteinen beobachtet werden. Es kann dabei ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Artefakt durch Überexpression der Proteine handelt. Es konnten außerdem keine Hinweise auf eine post-translationale Modifikation gefunden werden. Möglicherweise sind die zwei verschiedenen Banden auf ein Import-Intermediat zurückzuführen (Zimorski et al. 2013, Major, 2013). Die durchgeführten Immunofluoreszenz-Assays zeigten eine teilweise Übereinstimmung der Lokalisation der TrxRh1 und des hydrogenosomalen Markerproteins SCSa. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Mentel et al. 2008 konnte auch das Protein ohne hydrogenosomales Transitpeptid in der hydrogenosomalen Fraktion detektiert werden. Die Behandlung der Hydrogenosomen mit Proteinase K konnte lediglich HA-markiertes Protein in der Kontrolle ohne Proteinase K nachweisen (Abbildung 5.7 A). Immunofluoreszenz-Assays der mit TrxRh1 Δ HTS transfizierten Zellen zeigen eine Ko-Lokalisation des Proteins mit dem hydrogenosomalen Markerprotein SCSa (Abb. 5.7 B).

Die beobachteten Lokalisationen der TrxRh1 in An- und Abwesenheit ihrer HTS sind unerwartet und weichen von den vorherigen Ergebnissen aus der Studie von Mentel et al. ab. Die hydrogenosomale Lokalisation der TrxRh1 scheint nicht so eindeutig wie

angenommen. Da in der Proteinase K-Behandlung kein Signal des markierten Proteins detektiert werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass sich TrxRh1 nicht in der Matrix der Organellen befindet, denn dort wäre das Protein vor der Proteolyse durch Proteinase K geschützt. Mehrfache Wiederholungen resultierten stets in diesem Ergebnis. Auch die Lokalisation des Proteins mit deletiertem N-Terminus weicht von den Erwartungen ab. Trotz Deletion der HTS konnte das Protein in der hydrogenosomalen Fraktion detektiert werden, auch die Ergebnisse der Immunofluoreszenz-Assays zeigen eine räumliche Übereinstimmung mit dem hydrogenosomalen Markerprotein SCS α (Abb. 5.7). Im Gegensatz zu TrxRh1 konnte TrxRh1 Δ HTS in der Proteinase K-Behandlung nachgewiesen werden. Allerdings konnte lediglich in der Kontrolle ohne Proteinase K HA-markiertes Fusionsprotein nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass TrxRh1 Δ HTS nicht vollständig in die Organellen importiert wird, so dass mindestens der C-Terminus des Proteins und somit die HA-Markierung frei zugänglich für die Proteinase K waren. Es wäre denkbar, dass TrxRh1 Δ HTS lediglich an der äußeren Membran der Hydrogenosomen assoziiert ist oder das Protein die Translokasen der beiden Membranen nicht korrekt passieren kann und so in der Membran arretiert.

Weder TrxRh1 noch TrxRh1 Δ HTS konnten in ähnlichen Strukturen wie HTS*DHFR und HTS*DH::SCS::FR beobachtet werden, sondern konnten assoziiert mit den Hydrogenosomen lokalisiert werden. Durch die Lokalisation der TrxRh1 konnte die Ursache für die Lokalisation der DHFR-Fusionsproteine in Anwesenheit der TrxRh1-HTS nicht geklärt werden. Ein weiterer Grund für die Lokalisation der Proteine in bislang nicht identifizierten Kompartimenten könnte auch eine Wechselwirkung zwischen der HTS und dem cytosolischen Protein mDHFR gewesen sein. Um die Importkompetenz der N-terminalen Präsequenz generell zu verifizieren, sollte deshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die HTS der TrxRh1 ein cytosolisches Protein von *T. vaginalis* in die Hydrogenosomen importieren kann. Dazu wurde mit GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, TVAG_475220) ein cytosolisches Markerenzym ausgewählt, dessen cytosolische Lokalisation eindeutig nachgewiesen wurde (Zimorski et al. 2013). Das Fusionsprotein aus HTS der TrxRh1 und GAPDH (HTS*GAPDH) wurde in transfizierten *T. vaginalis* Zellen durch Immunofluoreszenz-Assays und Immunodetektionen lokalisiert. Die Konzentration des Proteins in den isolierten subzellulären Fraktionen stellte sich als sehr gering heraus, so dass HTS*GAPDH erst bei Verwendung der zehnfachen Proteinmenge (200 μ g) in den Fraktionen detektiert werden konnte. Das Fusionsprotein konnte sowohl im Cytosol als auch in den Hydrogenosomen lokalisiert werden (Abbildung 5.8 A). Dieses Ergebnis zeigt erste Hinweise auf einen Import der GAPDH durch die HTS der TrxRh1. Eine Verifizierung des Proteinimports durch Behandlung der isolierten Hydrogenosomen durch

Proteinase K konnte aufgrund der geringen Proteinkonzentrationen nicht durchgeführt werden, da die Menge an isolierten Hydrogenosomen stets zu gering war. Durch Immunofluoreszenz-Assays konnte HTS*GAPDH durch den verwendeten HA-Antikörper in *T. vaginalis* Zellen detektiert werden. Dabei zeigte sich, dass das Protein in abgegrenzten Kompartimenten über die Zelle verteilt ist, teilweise bildet es auch runde, ringförmige Strukturen. Der Vergleich der Lokalisation der HTS*GAPDH mit dem hydrogenosomalen Markerprotein SCSa zeigte, dass es sich bei den Kompartimenten um Hydrogenosomen handelt (Abb. 5.8 B). SCSa ist in der Matrix der Organellen lokalisiert (Zimorski et al. 2013). HTS*GAPDH umschließt SCSa teilweise, was nahelegt, dass HTS*GAPDH in den hydrogenosomalen Membranen lokalisiert ist und deshalb ringförmige Strukturen um die Matrix bildet. Ein ähnliches Ergebnis konnte zuvor bereits bei verifizierten hydrogenosomalen Membranproteinen beobachtet werden, wie zum Beispiel Untereinheiten der Translokase der äußeren Membran (Rada et al. 2011). Da es sich bei GAPDH nicht um ein Membranprotein handelt, scheint die HTS der TrxRh1 das cytosolische Protein nicht vollständig importieren zu können, so dass die Translokation über die hydrogenosomalen Membranen nicht erfolgen kann und das Protein in den Membranen akkumuliert.

Die HTS der TrxRh1 besitzt aber nachweislich ausreichend Importkompetenz, um das cytosolische Protein GAPDH an die Hydrogenosomen zu leiten. Dieses Ergebnis unterstützt die Theorie, dass der Import von vielen hydrogenosomalen Proteinen nicht von deren N-terminalen Präsequenzen abhängig ist, diese aber den Transport der Präproteine im Cytosol an die Hydrogenosomen begünstigen. So konnten häufig Proteine mit deletierter HTS vermehrt im Cytosol der Zellen detektiert werden, da diese Proteine aber nachweislich auch in die Organellen importiert werden, scheint die Deletion der HTS die Translokation der Proteine zu beeinflussen, allerdings nicht den Import an sich (Zimorski et al. 2013). Viele der bekannten und untersuchten Präsequenzen werden auch nach Import der Präproteine prozessiert, obwohl sie nicht für den Import essentiell sind (z.B. SCSa). Die Prozessierung könnte für die korrekte Funktion des reifen Proteins essentiell sein (Zimorski et al. 2013).

Da die HTS der TrxRh1 mit GAPDH ein cytosolisches Protein an die Hydrogenosomen leiten kann, bleibt die Frage ungeklärt, warum es zu der Fehllokalisierung von HTS*DHFR und HTS*DH::SCS::FR kam. Möglich wäre eine unbekannte Wechselwirkung zwischen HTS und Sequenzen innerhalb der DHFR, die zur Akkumulation des Fusionsproteins in Kompartimenten der Zelle führten. Denkbar wäre die Ansammlung in Lysosomen, um das Protein zu degradieren, der Nachweis, ob es sich bei den Kompartimenten um Lysosomen handelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erbracht werden.

Bereits in der Studie von Mentel et al. konnte eine duale Lokalisation der TrxRh1 in Cytosol und Hydrogenosomen beobachtet werden. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu der Lokalisation von verschiedenen anderen hydrogenosomalen Proteinen, die im nativen Zustand durch eine HA-Markierung ausschließlich in den Hydrogenosomen detektiert werden konnten, z.B. SCSa. Kontaminationen der cytosolischen Fraktion konnten durch Enzymassays mit Kompartiment-spezifischen Markerenzymen ausgeschlossen werden (Mentel et al. 2008). Die duale Lokalisation der TrxRh1 in Cytosol und Hydrogenosomen konnte auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden. Die Verteilung eines Proteins auf mehrere Kompartimente einer Zelle kann durch verschiedene Mechanismen erreicht werden. Ursache können zwei verschiedene Gene, zwei verschiedene mRNAs aus einem einzelnen Gen oder zwei Translations-Initiationspunkte auf einer mRNA sein. Diese Voraussetzungen resultieren stets in zwei verschiedenen Translationsprodukten, die sich z.B. durch die An- oder Abwesenheit einer Signalsequenz unterscheiden (Danpure 1995; Small et al. 1998). In den letzten Jahren konnte ein weiterer Mechanismus entdeckt werden, der eine duale Lokalisation eines Proteins aus einem einzelnen Translationsprodukt bei mitochondrialen Proteinen zeigt. Betroffene Proteine werden partiell in die Mitochondrien importiert, so dass deren N-terminale Präsequenz die Matrix der Organellen erreicht und dort durch MPP prozessiert werden kann. Anschließend wird eine Subpopulation der Moleküle durch sogenannte retrograde Translokation zurück ins Cytosol transportiert. Der restliche Teil der Moleküle wird vollständig in die Mitochondrien importiert. Die treibende Kraft der retrograden Translokation ist die schnelle Faltung des zu importierenden Proteins. Beginnt die Faltung des Proteins am C-terminalen Ende und somit im Cytosol, gelangt das Protein zurück in das Cytosol der Zelle. Durch rasche Faltung in der Matrix wird der Import in die Hydrogenosomen begünstigt (Karniely und Pines 2005). Eine duale Lokalisation eines einzelnen Translationsproduktes in zwei verschiedenen Zellkompartimenten kann in Eukaryoten häufiger beobachtet werden. So konnten mit Fumarase und Aconitase in der Hefe zwei Proteine beschrieben werden, die sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien lokalisiert sind. Die Verteilung der beiden Proteine ist dabei deutlich verschieden. Fumarase ist mit mehr als 50% der Gesamtproteinmenge deutlich im Cytosol vertreten, die Menge an Aconitase in der cytosolischen Fraktion beträgt weniger als 5%. Durch Mutationsstudien an den N-terminalen Präsequenzen der beiden Proteine konnte außerdem gezeigt werden, dass die MTS entscheidenden Einfluss auf die Verteilung der Proteine hat (Regev-Rudzki et al. 2008). Ob im Fall der *T. vaginalis* TrxRh1 auch ein Re-Import des Proteins in das Cytosol der Zellen vorliegt, müsste durch Sequenzierung des Proteins untersucht werden. Sollte es sich um nicht-importiertes Protein handeln, müsste die MTS nachweisbar sein. Sollte es durch retrograde Translokation zu cytosolischer Lokalisation der TrxRh1 kommen, wäre das

Protein prozessiert (Regev-Rudzki et al. 2008). Ob es sich dabei um aktives Enzym handelt, kann durch Aktivitätstests bestimmt werden.

Die Lokalisation der TrxRh1 in den Hydrogenosomen genauer einzugrenzen, erwies sich als schwierig. Die Verifizierung des hydrogenosomalen Proteinimports durch die Behandlung der Hydrogenosomen mit Proteinase K konnte sowohl in An- als auch in Abwesenheit der HTS kein vor Proteolyse geschütztes Protein nachweisen. Es ist also fraglich, ob TrxRh1 vollständig in die Matrix der Organellen importiert wird. Obwohl mit Thioredoxin, Thioredoxin-Reduktase1 und Peroxiredoxin Thiol-Peroxidase alle Komponenten des Thioredoxin-abhängigen Antioxidans-Systems in den Hydrogenosomen lokalisiert werden konnten, bleibt die Lokalisation der TrxRh1 im Organell unklar. Die Hefe *S. cerevisiae* besitzt ebenfalls Thioredoxin-Signalwege, sowohl im Cytosol der Zelle als auch in den Mitochondrien (Spyrou et al. 1997; Damdimopoulos et al. 2002). In den Organellen ist das Antioxidans-System für den Abbau von ROS verantwortlich (Toledano et al. 2013). Mit Thioredoxin konnte ein an dem System beteiligte Komponente auch innerhalb des Intermembranraums der Mitochondrien von Säugerzellen lokalisiert werden. Im IMS ist es an der Regulation des Membranpotentials beteiligt, es ist aber noch nicht bekannt, wie Trx innerhalb des IMS reduziert wird (Hirasaka et al. 2011). In den Mitochondrien der Hefe konnte innerhalb des IMS außer Glutathion keine typischen Komponenten eines Thiol-abhängigen Redox-Signalweges identifiziert werden (Toledano et al. 2013). Eine Verteilung des Systems über mehrere Subkompartimente der Organellen scheint in Säugerzellen also möglich, sowohl bei der Form des Thioredoxins in der Matrix als auch innerhalb des IMS handelt es sich um das gleiche Protein, das eine N-terminale MTS zum Import in die Mitochondrien besitzt. Die unterschiedliche Lokalisation innerhalb der Organellen wird durch Prozessierung durch die in der Matrix lokalisierte MPP oder durch die Protease des Intermembranraums IMP erreicht (Hirasaka et al. 2011).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte TrxRh1 auch in Abwesenheit der HTS in der hydrogenosomalen Fraktion detektiert werden. Die Isoform TrxRh2 weist starke Ähnlichkeit zu TrxRh1 auf (Mentel et al. 2008). TrxRh2 beinhaltet interne Importsignale, die sich auf mehrere Domänen des Proteins verteilen und auch einzeln in die Hydrogenosomen importiert werden können (Zimorski et al. 2013, Major 2013). Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeiten der beiden Isoformen wäre es also denkbar, dass auch TrxRh1 interne Importsignale enthält. Diese Möglichkeit konnte auch von Mentel et al. 2008 nicht ausgeschlossen werden. Weitere Hinweise darauf liefert auch die untypische HTS der TrxRh1. Mentel et al. wollten durch Austausch der HTS gegen die N-terminale Präsequenz eines ausschließlich in den Hydrogenosomen lokalisierten Proteins überprüfen, ob TrxRh1 dadurch vollständig importiert werden kann, so dass kein cytosolisches Signal mehr

detektiert werden kann. Dazu erstellten sie Fusionsproteine aus der HTS von SCSa bzw. PFOR und der Sequenz der TrxRh1. Beide Präsequenzen waren nicht in der Lage, TrxRh1 in die Hydrogenosomen zu importieren (Mentel et al. 2008). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass diese hydrogenosomalen Präsequenzen nicht alle für den Import benötigten Informationen enthalten und sich weitere Importsignale in der Sequenz der Proteine befinden müssen. Ähnliche Daten lassen sich auch bei mitochondrialen Proteinen finden. So konnte gezeigt werden, dass die ersten 34 Aminosäuren des in der Matrix lokalisierten Enzyms Superoxid-Dismutase das cytosolische Protein mDHFR in die Mitochondrien importieren konnte, aber nicht das Hefeprotein Invertase (Van Steeg et al. 1986). Um das *E. coli* Protein β -Galaktosidase in Mitochondrien zu importieren, waren die ersten 139 N-terminalen Aminosäuren der β -Untereinheit der F_1 -ATPase nötig, während 39 Aminosäuren ausreichten, wenn das zu importierende Protein Invertase war (Emr et al. 1986). Verner und Lemire konnten außerdem zeigen, dass der Import der mDHFR in isolierte Mitochondrien durch die ersten sieben Aminosäuren der Hefe Cytochrom Oxidase Untereinheit IV von der Konformation des Reporterproteins abhing. Präsequenzen und die dazugehörigen Proteine scheinen sich zusammen entwickelt zu haben, so dass spezifische Interaktionen zwischen beiden Domänen stattfinden können, wodurch die Effizienz des Vorläufer-Proteins gesteigert werden kann (Verner und Lemire 1989). Eine aktuelle Studie von Doyle und Kollegen hat diese Idee aufgegriffen. Sie haben eine umfangreiche *in silico* Analyse von mitochondrialen Transitsequenzen und den zugehörigen Proteinsequenzen durchgeführt, um die bis heute ungeklärte Diversität der Präsequenzen näher zu untersuchen. MTS haben in verschiedenen Kompartimenten der Zelle eine Funktion, sie sind sowohl im Cytoplasma, als auch innerhalb des Intermembranraums und der mitochondrialen Matrix von Bedeutung, da sie während des Proteinimports mit cytosolischen Chaperonen und verschiedenen Membran-gebundenen Komponenten der Import- und Prozessierungsmaschinerie kooperieren. Durch die globale Analyse der MTS aus fünf verschiedenen Taxa (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*) sollten evolutionär konservierte Charakteristika entdeckt werden, die die Beziehung zwischen MTS und reifer Proteinsequenz erklären können. Dabei konnten sie zeigen, dass die Diversität der MTS durch physiochemische und strukturelle Charakteristika des reifen Proteins beeinflusst werden kann, die in verschiedenen Taxa gefunden werden können. Durch die Anpassung der MTS an die Eigenschaften des zu importierenden Proteins scheint ein optimierter Import, der zwischen Anforderungen der Importmechanismen, wie z.B. der elektrophoretische Effekt des Membranpotentials, und einschränkenden Eigenschaften des Proteins (Interaktionen zwischen Vorläuferprotein und Importkomplex, Entfaltung des zu importierenden Proteins) ermöglicht zu werden (Doyle et al. 2013). Eine Anpassung der hydrogenosomalen

Präsequenzen an ihre zugehörigen reifen Proteine scheint also denkbar und könnte auch erklären, warum einige N-terminale Präsequenzen von hydrogenosomalen Proteinen keine Importkompetenz an andere hydrogenosomale Proteine vermitteln können (Mentel et al. 2008). Die geringere Bedeutung der kurzen N-terminalen Präsequenzen der hydrogenosomalen Proteine und die Tatsache, dass interne Signale nicht nur die Ausnahme zu sein scheinen, liefert weitere Hinweise auf Anpassungen zwischen HTS und der reifen Proteinsequenz (Zimorski et al. 2013).

Hydrogenosomen sind reduzierte Formen der Mitochondrien, was sich auch in einer geringeren Komplexität der hydrogenosomalen Importmaschinerie widerspiegelt. So scheinen diverse Untereinheiten der Translokasen der äußeren und inneren Membran (Tom70, Tom20, Tom22, Tim54, Tim50 und Tim21) in *T. vaginalis* zu fehlen (Shiflett und Johnson 2010; Rada et al. 2011). Auch die mit einer durchschnittlichen Länge von zwölf Aminosäuren kürzeren N-terminale Präsequenzen weisen auf eine evolutionäre Reduktion der Organellen hin, so dass interne Signale an Bedeutung für den Proteinimport gewinnen (Zimorski et al. 2013). Ähnlich kurze Präsequenzen können auch bei Proteinen der Mitosomen beobachtet werden, stark reduzierte mit den Mitochondrien verwandte Organellen, die kein ATP generieren, sondern hauptsächlich in die Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern involviert sind (Katinka et al. 2001; Tovar et al. 2003). Einige mitosomale Proteine tragen kurze N-terminale Präsequenzen, die für den Import essentiell zu sein scheinen, es gibt aber auch zahlreiche Proteine ohne erkennbare Präsequenz, die stattdessen diverse interne Signale zu enthalten scheinen (Doležal et al. 2005; Regoes et al. 2005; Burri und Keeling 2007). Die Proteinimportmaschinerie der Mitosomen scheint deutlich reduzierter zu sein als die der Hydrogenosomen, bislang konnten mit Tom40 und Tom70 lediglich zwei Komponenten der Translokase der äußeren Membran identifiziert werden (Heinz und Lithgow 2013). Die Entdeckung einer bis dahin unbekanntes Tom-Untereinheit in den Mitosomen von *Entamoeba histolytica* brachte weitere Hinweise für die evolutionäre Reduktion der Organellen. Tom60 bildet mit Tom40 einen Komplex und fungiert als cytosolischer Rezeptor für lösliche Proteine und Membranproteine, es scheint also keine unterschiedlichen Rezeptoren für die verschiedenen zu importierenden Präproteine mehr zu geben (Makiuchi und Nozaki 2013). Einen ähnlichen Austausch einer Rezeptoruntereinheit könnte es auch in *T. vaginalis* gegeben haben. Die Analyse des hydrogenosomalen Membranproteoms zeigt die Möglichkeit, dass es anstelle von zwei distinkten Translokasen (TIM22 und TIM23) einen einzelnen multifunktionalen TIM-Komplex in der inneren Membran geben könnte (Rada et al. 2011). Auch in den Genomen von *Trypanosoma brucei* und Microsporidien wurden einzelne Gene, die für ein Tim17/22/23 Protein codieren, identifiziert (Burri et al. 2006; Schneider et al. 2008).

6.4. Fazit und Ausblick

Die globale Analyse der hydrogenosomalen N-Termini sollte eine umfassende Übersicht über die Prozessierung der hydrogenosomalen Proteine liefern. Leider konnte die auf der Subtiligase basierende Methode im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht für hydrogenosomale Proteine etabliert werden. Da genaue Kenntnisse über die Transitsequenzen und ihre Prozessierung und die dafür verantwortlichen Enzyme wichtig für das Verständnis des Proteinimports und somit auch die Evolution der Organellen ist, sollten weitere Methoden angewandt werden, um die N-Termini zu analysieren. Mit der von Huesgen und Kollegen entwickelten Methode, die spezifisch auf die N-Proteom-Analyse von komplexen Organellen entwickelt wurde, bietet sich eine vielversprechende Möglichkeit dazu.

Ein weiterer wichtiger Aspekt des Proteinimports ist die Konformation der zu importierenden Proteine. Während für mitochondriale Proteine bereits gezeigt werden konnte, dass sie nur linearisiert importiert werden können, bleibt die Frage, ob der hydrogenosomale Proteinimport ebenfalls von der Konformation der Proteine abhängt, offen. Das in Mitochondrien genutzte Reporterprotein mDHFR konnte von der verwendeten hydrogenosomalen Präsequenz der TrxRh1 nicht in die Organellen importiert werden, so dass eine Untersuchung der Faltung des Proteins nicht möglich war.

Die HTS der TrxRh1 galt bislang als essentielle Präsequenz, da TrxRh1 in Abwesenheit der Präsequenz nicht länger in die Hydrogenosomen importiert wurde. Eine Verifizierung der Lokalisation der TrxRh1 in An- und Abwesenheit ihrer HTS im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte allerdings zeigen, dass auch das Protein mit deletiertem N-Terminus zumindest an die Hydrogenosomen geleitet wird, so dass auch im Fall der TrxRh1 interne Importsignale innerhalb der Proteinsequenz wahrscheinlich sind. Da die HTS mit GAPDH ein cytosolisches Protein von *T. vaginalis* an die Organellen leiten und zumindest teilweise importieren konnte, scheint die Präsequenz im Vergleich mit anderen hydrogenosomalen Präsequenzen Importsignale zu enthalten. Hydrogenosomale Präsequenzen sind deutlich kürzer als mitochondriale Transitsequenzen, außerdem konnten bislang keine Präsequenz-erkennenden Rezeptoren in der äußeren Membran der Hydrogenosomen identifiziert werden. Interne Importsignale kommen nicht nur in Membranproteinen, sondern auch häufig in Matrixproteinen vor. Dabei beschränken sich die Signale nicht auf einzelne Bereiche der Proteine, sondern kommen in mehreren Domänen vor. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte anhand eines Fusionsproteins aus mDHFR und einer Domäne der SCSa gezeigt werden, dass diese Importsignale ausreichen, um ein cytosolisches Protein in die Hydrogenosomen zu importieren.

Die geringere Bedeutung der Präsequenz und das häufige Vorkommen von internen Signalen können Anzeichen dafür sein, dass die Proteinimport-Mechanismen der

Hydrogenosomen im Laufe der Evolution reduziert wurden und die Präsequenzen immer mehr an Bedeutung verlieren. Alternativ wäre es auch möglich, dass Hydrogenosomen nie ein so komplexes System besessen haben, sondern sich die unterschiedlichen Maschinerien erst nach Entstehung der verschiedenen Formen der Organellen mitochondrialen Ursprungs entwickelt haben.

Um das Verständnis des hydrogenosomalen Proteinimports zu erweitern, sollten beide Möglichkeiten weiter untersucht werden. Einige hydrogenosomale Proteine besitzen verhältnismäßig lange Präsequenzen. Durch Überprüfung ihrer Bedeutung für den Import könnten Rückschlüsse auf die evolutionäre Reduktion der Präsequenzen gezogen werden. Proteomanalysen der hydrogenosomalen Membranen konnten einige Homologe zu Komponenten des mitochondrialen Proteinimport-Systems identifizieren, zeigten aber auch, dass die Membranen zahlreiche Proteine enthalten, deren Funktion noch unklar ist und die nicht durch Homologien identifiziert werden konnten. Durch die nähere Charakterisierungen dieser Kandidaten können eventuell weitere Komponenten des hydrogenosomalen Proteinimports gefunden werden, die aufgrund von starken Sequenzabweichungen oder Zugehörigkeiten zu bislang unbekanntem Komponenten des hydrogenosomalen Proteinimports noch nicht identifiziert werden konnten.

7. 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.
- Abrahmsén L, Tom J, Burnier J, Butcher KA, Kossiakoff A, Wells JA. 1991. Engineering subtilisin and its substrates for efficient ligation of peptide bonds in aqueous solution. *Biochemistry* 30:4151–4159.
- Agard NJ, Maltby D, Wells JA. 2010. Inflammatory stimuli regulate caspase substrate profiles. *Mol. Cell Proteomics* 9:880–893.
- 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. *J. Cell Biol.* 153:1151–1160.
- Aivaliotis M, Gevaert K, Falb M, Tebbe A, Konstantinidis K, Bisle B, Klein C, Martens L, Staes A, Timmerman E, Van Damme J, Siedler F, Pfeiffer F, Vandekerckhove J, Oesterhelt D. 2007. Large-Scale Identification of N-Terminal Peptides in the Halophilic Archaea *Halobacterium salinarum* and *Natronomonas pharaonis*. *J. Proteome Res.* 6:2195–2204.
- Akhmanova A, Voncken FG, Hosea KM, Harhangi H, Keltjens JT, op den Camp HJ, Vogels GD, Hackstein JH. 1999. A hydrogenosome with pyruvate formate-lyase: anaerobic chytrid fungi use an alternative route for pyruvate catabolism. *Mol. Microbiol.* 32:1103–1114.
- Alder NN, Jensen RE, Johnson AE. 2008. Fluorescence Mapping of Mitochondrial TIM23 Complex Reveals a Water-Facing, Substrate-Interacting Helix Surface. *Cell* 134:439–450.
- Allen JF. 2003. The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 358:19–38.
- Allen S, Balabanidou V, Sideris DP, 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.
- America T, Hagemann J, Guera A, Archer K, Keegstra K, Weisbeek P. 1994. Methotrexate does not block import of a DHFR fusion protein into chloroplasts. *Plant Molecular Biology*:1–12.
- Archibald JM. 2009. The Puzzle of Plastid Evolution Review. *Current Biology* 19:R81–R88.
- Arnesen T. 2009. Protein N-terminal acetylation: NAT 2007–2008 Symposia. *BMC Proc* 3:S1.
- Arcott LD, Gromer S, Schirmer RH, Becker K, Williams CH. 1997. The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:3621–3626.
- Bachmair A, Finley D, Varshavsky A. 1986. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234:179–186.

- Bayrhuber M, Meins T, Habeck M, Becker S, Giller K, Villinger S, Vonrhein C, Griesinger C, Zweckstetter M, Zeth K. 2008. Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:15370–15375.
- Becker T, Pfannschmidt S, Guiard B, Stojanovski D, Milenkovic D, Kutik S, Pfanner N, Meisinger C, Wiedemann N. 2008. Biogenesis of the Mitochondrial TOM Complex: Mim1 PROMOTES INSERTION AND ASSEMBLY OF SIGNAL-ANCHORED RECEPTORS. *Journal of Biological Chemistry* 283:120–127.
- Benchimol M. 1999. Hydrogenosome autophagy: an ultrastructural and cytochemical study. *Biology of the Cell* 91:165–174.
- Benchimol M. 2009. Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue and Cell* 41:151–168.
- Bolender N, Sickmann A, Wagner R, Meisinger C, Pfanner N. 2008. Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep* 9:42–49.
- Boxma B, de Graaf RM, van der Staay GW, van Alen TA, Ricard G, Gabaldon T, van Hoek AHAM, Moon-van der Staay SY, Koopman WJH, van Hellermond JJ, Tielens AGM, Friedrich T, Veenhuls M, Huynen MA, Hackstein JHP. 2005. An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* 434:74–79.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Bradley PJ, Lahti CJ, Plümper E, Johnson PJ. 1997. Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist *Trichomonas*: similarities with mitochondrial protein import. *The EMBO journal* 16:3484–3493.
- Brown MT, Goldstone HMH, Bastida-Corcuera F, Delgadillo-Correa MG, McArthur AG, Johnson PJ. 2007. A functionally divergent hydrogenosomal peptidase with protomitochondrial ancestry. *Mol. Microbiol.* 64:1154–1163.
- Bui E, Bradley PJ, Johnson PJ. 1996. A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:9651.
- Bukau B, Horwich AL. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92:351–366.
- Burri L, Keeling PJ. 2007. Protein targeting in parasites with cryptic mitochondria. *International Journal for Parasitology* 37:265–272.
- Burri L, Williams BAP, Bursać D, Lithgow T, Keeling PJ. 2006. Microsporidian mitosomes retain elements of the general mitochondrial targeting system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:15916–15920.
- 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.

- Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Deicher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortmann JR, Bidwell SL, Alsmark UCM, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Müller S, Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M, Okumura CY, Schneider R, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Perteua M, Feldblyum TV, Utterback TR, Shu C-L, Osoegawa K, de Jong, PJ, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik S-B, Logsdon Jr, JM, Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzberg SL, Tang P, Chiu C-H, Lee Y-S, Embley TM, Coombs GH, Mottram JC, Tachezy J, Fraser-Liggett CM, Johnson PJ. 2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315:207–212.
- Carter P, Wells JA. 1987. Engineering enzyme specificity by substrate-assisted catalysis. *Science* 237:394–399.
- Cavalier-Smith T. 1989. Molecular phylogeny. *Archaeobacteria and Archezoa*. *Nature* 339:100–101.
- Cavalier-Smith T. 2009. Predation and eukaryote cell origins: A coevolutionary perspective. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41:307–322.
- Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. 2009. Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell* 138:628–644.
- Chacinska A, Lind M, Frazier AE, Dudek J, Meisinger C, Geissler A, Sickmann A, Meyer HE, Truscott KN, Gulard B, Pfanner N, Rehling P. 2005. Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell* 120:817–829.
- Chacinska A, Pfannschmidt S, Wiedemann N, et al. 2004. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *The EMBO journal* 23:3735–3746.
- Chang S, Chang SY, Gray O. 1987. Structural and genetic analyses of a par locus that regulates plasmid partition in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 169:3952–3962.
- Chang TK, Jackson DY, Burnier JP, Wells JA. 1994. Subtiligase: a tool for semisynthesis of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:12544–12548.
- Chapman A, Linstead DJ, Lloyd D. 1999. Hydrogen peroxide is a product of oxygen consumption by *Trichomonas vaginalis*. *J. Biosci.* 24:339–344.
- Chauwin JF, Oster G, Glick BS. 1998. Strong precursor-pore interactions constrain models for mitochondrial protein import. *Biophysical Journal* 74:1732–1743.
- Clark CG, Diamond LS. 2002. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:329–341.
- Claros MG, Vincens P. 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* 241:779–786.
- Clemens DL, Johnson PJ. 2000. Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. *Molecular and Biochemical Parasitology* 106:307–313.

- Coombs GH, Westrop GD, Suchan P, Puzova G, Hirt RP, Embley TM, Mottram JC, Müller S. 2004. The amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis* contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system. *J. Biol. Chem.* 279:5249–5256.
- Cuervo AM, Knecht E, Terlecky SR, Dice JF. 1995. Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am. J. Physiol.* 269:C1200–C1208.
- Dagley MJ, Dolezal P, Likic VA, Smid O, Purcell AW, Buchanan SK, Tachezy J, Lithgow T. 2009. The Protein Import Channel in the Outer Mitosomal Membrane of *Giardia intestinalis*. *Mol. Biol. Evol.* 26:1941–1947.
- Damdimopoulos AE, Miranda-Vizuete A, Pelto-Huikko M, Gustafsson J-A, Spyrou G. 2002. Human mitochondrial thioredoxin. Involvement in mitochondrial membrane potential and cell death. *J. Biol. Chem.* 277:33249–33257.
- Danpure CJ. 1995. How can the products of a single gene be localized to more than one intracellular compartment? *Trends in Cell Biology* 5:230–238.
- de Duve C. 2005. The lysosome turns fifty. *Nat. Cell Biol.* 7:847–849.
- de Duve C. 2007. The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nat Rev Genet* 8:395–403.
- Diamond LS. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *The Journal of Parasitology* 43, 488–490.
- Dienhart MK, Stuart RA. 2008. The yeast Aac2 protein exists in physical association with the cytochrome bc1-COX supercomplex and the TIM23 machinery. *Mol. Biol. Cell* 19:3934–3943.
- Dietmeier K, Hönlinger A, Bömer U, Dekker PJ, Eckerskorn C, Lottspeich F, Kübrich M, Pfanner N. 1997. Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature* 388:195–200.
- Doi RH, Wang LF. 1986. Multiple procaryotic ribonucleic acid polymerase sigma factors. *Microbiol. Rev.* 50:227–243.
- Doležal P, Likic V, Tachezy J, Lithgow T. 2006. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* 313:314–318.
- Doležal P, Smíd O, Rada P, Zubáčová Z, Bursač D, Suták R, Nebesárová J, Lithgow T, Tachezy J. 2005. *Giardia* mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:10924–10929.
- Dougan DA, Truscott KN, Zeth K. 2010. The bacterial N-end rule pathway: expect the unexpected. *Mol. Microbiol.* 76:545–558.
- Doyle SR, Kasinadhuni NRP, Chan CK, Grant WN. 2013. Evidence of Evolutionary Constraints That Influences the Sequence Composition and Diversity of Mitochondrial Matrix Targeting Signals. *PLoS ONE* 8:e67938.
- Dudek J, Rehling P, van der Laan M. 2013. Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - Molecular Cell Research* 1833:274–285.

- Dyall SD, Johnson PJ. 2000. Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:404–411.
- Dyall SD, Koehler CM, Delgadillo-Correa MG, Bradley PJ, Plümper E, Leuenberger D, Turck CW, Johnson PJ. 2000. Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* 20:2488–2497.
- Dyall SD, Lester DC, Schneider RE, Delgadillo-Correa MG, Plümper E, Martinez A, Koehler CM, Johnson PJ. 2003. *Trichomonas vaginalis* Hmp35, a Putative Pore-forming Hydrogenosomal Membrane Protein, Can Form a Complex in Yeast Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 278:30548–30561.
- Eilers M, Schatz G. 1986. Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature* 322:228–232.
- Ellis JE, Yarlett N, Cole D, Humphreys MJ, Lloyd D. 1994. Antioxidant defences in the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis*: comparison of metronidazole-resistant and sensitive strains. *Microbiology (Reading, Engl.)* 140 (Pt 9):2489–2494.
- Emanuelsson O, Brunak S, Heijne von G, Nielsen H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2:953–971.
- Emanuelsson O, Heijne von G. 2001. Prediction of organellar targeting signals. *Biochim. Biophys. Acta* 1541:114–119.
- Embley M, Giezen der MV, Horner DS, Dyal PL, Foster P. 2003. Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 358:191–203.
- Embley TM, Hirt RP. 1998. Early branching eukaryotes? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:624–629.
- Embley TM, Martin W. 2006. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440:623–630.
- Emr SD, Vassarotti A, Garrett J, Geller BL, Takeda M, Douglas MG. 1986. The amino terminus of the yeast F1-ATPase beta-subunit precursor functions as a mitochondrial import signal. *J. Cell Biol.* 102:523–533.
- Endo T, Yamano K, Kawano S. 2011. *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - Biomembranes* 1808:955–970.
- Enoksson M, Li J, Ivancic MM, Timmer JC, Wildfang E, Eroshkin A, Salvesen GS, Tao WA. 2007. Identification of Proteolytic Cleavage Sites by Quantitative Proteomics. *J. Proteome Res.* 6:2850–2858.
- Esser C, Ahmadinejad N, Wiegand C, Rotte C, Sebastiani F, Gelius-Dietrich G, Henze K, Kretschmann E, Richly E, Leister D, Bryant D, Steel MA, Lockhart PJ, Penny D, Martin W. 2004. A genome phylogeny for mitochondria among alpha-proteobacteria and a predominantly eubacterial ancestry of yeast nuclear genes. *Mol. Biol. Evol.* 21:1643–1660.
- Esser K, Jan PS, Pratje E, Michaelis G. 2004. The mitochondrial IMP peptidase of yeast: functional analysis of domains and identification of Gut2 as a new natural substrate. *Molecular Genetics and Genomics* 271:616–626.

- Fujiki Y, Hubbard AL, Fowler S, Lazarow PB. 1982. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 93:97–102.
- Gakh O, Cavadini P, Isaya G. 2002. Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1592:63–77.
- Gentle I, Gabriel K, Beech P, Waller R, Lithgow T. 2004. The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J. Cell Biol.* 164:19–24.
- Germot A, Philippe H, Le Guyader H. 1996. Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:14614–14617.
- Gevaert K, Goethals M, Martens L, Van Damme J, Staes A, Thomas GR, Vandekerckhove J. 2003. Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides. *Nat Biotech* 21:566–569.
- Gioia, M, Foster, LJ, Overall, CM. 2009. Cell-based identification of natural substrates and cleavage sites for extracellular proteases by SILAC proteomics. *Methods Mol. Biol.* 539, 131–153.
- Goldberg AV, Molik S, Tsaousis AD, Neumann K, Kuhnke G, Delbac F, Vivares CP, Hirt RP, Lill R, Embley TM. 2008. Localization and functionality of microsporidian iron–sulphur cluster assembly proteins. *Nature* 452:624–628.
- Gould SB, Waller RF, McFadden GI. 2008. Plastid Evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:491–517.
- Green BR. 2010. After the primary endosymbiosis: an update on the chromalveolate hypothesis and the origins of algae with Chl c. *Photosynth Res* 107:103–115.
- Gruber A, Vugrinec S, Hempel F, Gould SB, Maier U-G, Kroth PG. 2007. Protein targeting into complex diatom plastids: functional characterisation of a specific targeting motif. *Plant Molecular Biology* 64:519–530.
- Guera A, America T, van Waas M, Weisbeek PJ. 1993. A strong protein unfolding activity is associated with the binding of precursor chloroplast proteins to chloroplast envelopes. *Plant Molecular Biology* 23:309–324.
- Gupta RS. 1995. Evolution of the chaperonin families (HSP60, HSP 10 and TCP-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* 15:1–11.
- Guryča V, Lamerz J, Ducret A, Cutler P. 2012. Qualitative improvement and quantitative assessment of N-terminomics. *Proteomics* 12:1207–1216.
- Habib, S.J., Neupert, W., Rapaport, D. (2007). Analysis and prediction of mitochondrial targeting signals. *Methods Cell Biol.* 80, 761–781.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295:1852–1858.

- Häusler T, Stierhof YD, Blattner J, Clayton C. 1997. Conservation of mitochondrial targeting sequence function in mitochondrial and hydrogenosomal proteins from the early-branching eukaryotes *Crithidia*, *Trypanosoma* and *Trichomonas*. *Eur J Cell Biol* 73:240–251.
- Heinz E, Lithgow T. 2013. Back to basics: A revealing secondary reduction of the mitochondrial protein import pathway in diverse intracellular parasites. *BBA - Molecular Cell Research* 1833:295–303.
- Hell K, Herrmann JM, Pratje E, Neupert W, Stuart RA. 1998. Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:2250–2255.
- Herlan M, Vogel F, Bornhovd C, Neupert W, Reichert AS. 2003. Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* 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 VL, Gabriel K, Traven A. 2014. *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - General Subjects* 1840:1246–1253.
- Hill K, Model K, Ryan MT, Dietmeier K, Martin F, Wagner R, Pfanner N. 1998. Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature* 395:516–521.
- Hiller S, Garces RG, Malia TJ, Orekhov VY, Colombini M, Wagner G. 2008. Solution Structure of the Integral Human Membrane Protein VDAC-1 in Detergent Micelles. *Science* 321:1206–1210.
- Hirasaka K, Lago CU, Kenaston MA, Fathe K, Nowinski SM, Nikawa T, Mills EM. 2011. Identification of a Redox-Modulatory Interaction Between Uncoupling Protein 3 and Thioredoxin 2 in the Mitochondrial Intermembrane Space. *Antioxidants & Redox Signaling* 15:2645–2661.
- Hirt RP, Logsdon JM, Healy B, Dorey MW, Doolittle WF, Embley TM. 1999. Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:580–585.
- Hirt RP, Müller S, Embley TM, Coombs GH. 2002. The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives. *Trends in Parasitology* 18:302–308.
- Hirt RP, Noel CJ, Sicheritz-Ponten T, Tachezy J, Fiori P-L. 2007. *Trichomonas vaginalis* surface proteins: a view from the genome. *Trends in Parasitology* 23:540–547.
- Honigberg BM, Volkmann D, Enzeroth R, Scholtyseck E. 1984. A Freeze-Fracture Electron Microscope Study of *Trichomonas vaginalis* Donné and *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller) 1. *J Eukaryotic Microbiology* 31:116–131.
- Horner DS, Hirt RP, Kilvington S, Lloyd D, Embley TM. 1996. Molecular data suggest an early acquisition of the mitochondrion endosymbiont. *Proc. Biol. Sci.* 263:1053–59.

- Hrdý I, Hirt RP, Doležal P, Bardonová L, Foster PG, Tachezy J, Embley TM. 2004. Trichomonas hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* 432:618–622.
- Hrdý I, Müller M. 1995a. Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *J. Mol. Evol.* 41:388–396.
- Hrdý I, Müller M. 1995b. Primary structure of the hydrogenosomal malic enzyme of *Trichomonas vaginalis* and its relationship to homologous enzymes. *J Eukaryotic Microbiology* 42:593–603.
- Huang S, Taylor NL, Whelan J, Millar AH. 2009. Refining the Definition of Plant Mitochondrial Presequences through Analysis of Sorting Signals, N-Terminal Modifications, and Cleavage Motifs. *Plant Physiol.* 150:1272–1285.
- Huesgen PF, Alami M, Lange PF, Foster LJ, Schröder WP, Overall CM, Green BR. 2013. Proteomic Amino-Termini Profiling Reveals Targeting Information for Protein Import into Complex Plastids. *PLoS ONE* 8:e74483.
- Humphreys M, Ralphs J, Durrant L, Lloyd D. 1998. Confocal Laser Scanning Microscopy of Trichomonads: Hydrogenosomes Store Calcium and Show a Membrane Potential. *European Journal of Protistology* 34:356–362.
- Hurt EC, Müller U, Schatz G. 1985. The first twelve amino acids of a yeast mitochondrial outer membrane protein can direct a nuclear-coded cytochrome oxidase subunit to the mitochondrial inner membrane. *The EMBO Journal* 4:3509–3518.
- Hurt EC, Pesold-Hurt B, Schatz G. 1984. The amino-terminal region of an imported mitochondrial precursor polypeptide can direct cytoplasmic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. *The EMBO Journal* 3:3149–3156.
- Hutu DP, Guiard B, Chacinska A, Becker D, Pfanner N, Rehling P, van der Laan M. 2008. Mitochondrial Protein Import Motor: Differential Role of Tim44 in the Recruitment of Pam17 and J-Complex to the Presequence Translocase. *Mol. Biol. Cell* 19:2642–2649.
- Jedelský PL, Doležal P, Rada P, Pyrih J, Smid O, Hrdy I, Sedinova M, Marcincikova M, Voleman L, Perry AJ, Campo Beltran N, Lithgow T, Tachezy J. 2011. The Minimal Proteome in the Reduced Mitochondrion of the Parasitic Protist *Giardia intestinalis*. *PLoS ONE* 6:e17285.
- Johnson PJ, d'Oliveira CE, Gorrell TE, Müller M. 1990. Molecular analysis of the hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:6097–6101.
- Karniely S, Pines O. 2005. Single translation—dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes. *EMBO Rep* 6:420–425.
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier 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, Vivares CP. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414:450–453.

- Kemper C, Habib SJ, Engl G, Heckmeyer P, Dimmer KS, Rapaport D. 2008. Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components. *Journal of Cell Science* 121:1990–1998.
- Kerscher O, Holder J, Srinivasan M, Leung RS, Jensen RE. 1997. The Tim54p–Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* 139:1663–1675.
- Kleifeld O, Doucet A, Keller UAD, Prudova A, Schilling O, Kainthan RK, Starr AE, Foster LJ, Kizhakkedathu JN, Overall CM. 2010. Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. *Nat Biotech* 28:281–288.
- Kleifeld O, Doucet A, Prudova A, auf dem Keller U, Gioia M, Kizhakkedathu JN, Overall CM. 2011. Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates. *Nat Protoc* 6:1578–1611.
- Koonin EV, Makarova KS, Rogozin IB, Davidovic L, Letellier M-C, Pellegrini L. 2003. The rhomboids: a nearly ubiquitous family of intramembrane serine proteases that probably evolved by multiple ancient horizontal gene transfers. *Genome Biol.* 4:R19.
- Kovermann P, Truscott KN, Guiard B, Rehling P, Sepuri NB, Müller H, Jensen RE, Wagner R, Pfanner N. 2002. Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Molecular cell* 9:363–373.
- Kozany C, Mokranjac D, Sichting M, Neupert W, Hell K. 2004. The J domain–related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase. *Nat Struct Mol Biol* 11:234–241.
- Kozjak V, Wiedemann N, Milenkovic D, Lohaus C, Meyer HE, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N. 2003. An Essential Role of Sam50 in the Protein Sorting and Assembly Machinery of the Mitochondrial Outer Membrane. *Journal of Biological Chemistry* 278:48520–48523.
- Krayl M, Lim JH, Martin F, Guiard B, Voos W. 2007. A Cooperative Action of the ATP-Dependent Import Motor Complex and the Inner Membrane Potential Drives Mitochondrial Preprotein Import. *Mol. Cell. Biol.* 27:411–425.
- Kutik S, Stojanovski D, Becker L, Becker T, Meinecke M, Krüger V, Prinz C, Meisinger C, Guiard B, Wagner R, Pfanner N, Wiedemann N. 2008. Dissecting Membrane Insertion of Mitochondrial β -Barrel Proteins. *Cell* 132:1011–1024.
- Künkele KP, Heins S, Dembowski M, Nargang FE, Benz R, Thieffry M, Walz J, Lill R, Nussberger S, Neupert W. 1998. The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* 93:1009–1019.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lahti CJ, Bradley PJ, Johnson PJ. 1994. Molecular characterization of the α -subunit of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal succinyl CoA synthetase. *Molecular and Biochemical Parasitology* 66:309–318.

- Lahti CJ, d'Oliveira CE, Johnson PJ. 1992. Beta-succinyl-coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. *J. Bacteriol.* 174:6822–6830.
- 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.
- Lee CM, Sedman J, Neupert W, Stuart RA. 1999. The DNA helicase, Hmi1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. *J. Biol. Chem.* 274:20937–20942.
- 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. *J. Biol. Chem.* 279:38047–38054.
- Lindmark DG, Müller M. 1973. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* 248:7724–7728.
- Lindmark DG, Müller M. 1974. Superoxide dismutase in the anaerobic flagellates, *Tritrichomonas foetus* and *Monocercomonas* sp. *J. Biol. Chem.* 249:4634–4637.
- Lithgow T, Schneider A. 2010. Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365:799–817.
- Liu Q, D'Silva P, Walter W, Marszalek J, Craig EA. 2003. Regulated cycling of mitochondrial Hsp70 at the protein import channel. *Science* 300:139–141.
- Lockwood BC, North MJ, Coombs GH. 1988. The release of hydrolases from *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 30:135–142.
- Lutz T, Neupert W, Herrmann JM. 2003. Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *The EMBO Journal* 22:4400–4408.
- Mahrus S, Trinidad JC, Barkan DT, Sali A, Burlingame AL, Wells JA. 2008. Global Sequencing of Proteolytic Cleavage Sites in Apoptosis by Specific Labeling of Protein N Termini. *Cell* 134:866–876.
- Major, P. 2013. Einfluss von Transitpeptiden und internen Signalen auf den Proteinimport in Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis*. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Makiuchi T, Nozaki T. 2013. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie*:1–15.
- Margulis L, Chapman M, Guerrero R, Hall J. 2006. The last eukaryotic common ancestor (LECA): acquisition of cytoskeletal motility from aerotolerant spirochetes in the Proterozoic Eon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:13080–13085.
- Martin W, Brinkmann H, Savonna C, Cerff R. 1993. Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes: eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:8692–8696.

- Martin W, Herrmann R. 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol.* 118:9–17.
- Martin W, Hoffmeister M, Rotte C, Henze K. 2001. An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biol. Chem.* 382:1521–1539.
- Martin W, Müller M. 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392:37–41.
- Martin W. 2010. Evolutionary origins of metabolic compartmentalization in eukaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365:847–855.
- Martinez-Caballero S, Grigoriev SM, Herrmann JM, Campo ML, Kinnally KW. 2006. Tim17p Regulates the Twin Pore Structure and Voltage Gating of the Mitochondrial Protein Import Complex TIM23. *Journal of Biological Chemistry* 282:3584–3593.
- McDonald L, Beynon RJ. 2006. Positional proteomics: preparation of amino-terminal peptides as a strategy for proteome simplification and characterization. *Nat Protoc* 1:1790–1798.
- McDonald L, Robertson DHL, Hurst JL, Beynon RJ. 2005. Positional proteomics: selective recovery and analysis of N-terminal proteolytic peptides. *Nat Meth* 2:955–957.
- McQuibban GA, Saurya S, Freeman M. 2003. Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* 423:537–541.
- Meinecke M, Wagner R, Kovermann P, Guiard B, Mick DU, Hutu DP, Voos W, Truscott KN, Chacinska A, Pfanner N, Rehling P. 2006. Tim50 maintains the permeability barrier of the mitochondrial inner membrane. *Science* 312:1523–1526.
- Meineke B, Engl G, Kemper C, Vasiljev-Neumeyer A, Paulitschke H, Rapaport D. 2008. The outer membrane form of the mitochondrial protein Mcr1 follows a TOM-independent membrane insertion pathway. *FEBS Letters* 582:855–860.
- Meisinger C, Pfannschmidt S, Rissler M, Milenkovic D, Becker T, Stojanovski D, Youngman MJ, Jensen RE, Chacinska A, Guiard B, Pfanner N, Wiedemann N. 2007. The morphology proteins Mdm12/Mmm1 function in the major β -barrel assembly pathway of mitochondria. *The EMBO journal* 26:2229–2239.
- Meisinger C, Rissler M, Chacinska A, Sanjuan Szklarz LK, Milenkovic D, Kozjak V, Schönfisch B, Lohaus C, Meyer HE, Yaffe MP, Guiard B, Wiedemann N, Pfanner N. 2004. The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev. Cell* 7:61–71.
- 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 JM. 2005. A Disulfide Relay System in the Intermembrane Space of Mitochondria that Mediates Protein Import. *Cell* 121:1059–1069.

- Mi-ichi F, Abu Yousuf M, Nakada-Tsukui K, Nozaki T. 2009. Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:21731–21736.
- Mi-ichi F, Makiuchi T, Furukawa A, Sato D, Nozaki T. 2011. Sulfate Activation in Mitosomes Plays an Important Role in the Proliferation of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1263.
- Mihara K, Omura T. 1996. Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria: the role of MSF and hsp 70. *Trends in Cell Biology* 6:104–108.
- Milenkovic D, Kozjak V, Wiedemann N, Lohaus C, Meyer HE, Guiard B, Pfanner N, Meisinger C. 2004. Sam35 of the Mitochondrial Protein Sorting and Assembly Machinery Is a Peripheral Outer Membrane Protein Essential for Cell Viability. *Journal of Biological Chemistry* 279:22781–22785.
- Model K, Meisinger C, Kühlbrandt W. 2008. Cryo-Electron Microscopy Structure of a Yeast Mitochondrial Preprotein Translocase. *Journal of Molecular Biology*:1–9.
- Model K, Meisinger C, Prinz T, Wiedemann N, Truscott KN, Pfanner N, Ryan MT. 2001. Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane. *Nat. Struct. Biol.* 8:361–370.
- Mokranjac D, Neupert W. 2005. Protein import into mitochondria. *Biochem. Soc. Trans.* 33:1019–1023.
- Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, et al. 2007. Genomic Minimalism in the Early Diverging Intestinal Parasite *Giardia lamblia*. *Science* 317:1921–1926.
- Mossmann D, Meisinger C, Voegtle FN. 2012. *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - Gene Regulatory Mechanisms* 1819:1098–1106.
- Müller M, Mentel M, van Hellemond JJ, Henze K, Woehle C, Gould SB, Yu R-Y, van der Giezen M, Tielens AGM, Martin WF. 2012. Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76:444–495.
- Müller M. 1993. The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* 139:2879–2889.
- Müller M. 2003. Energy metabolism. Part I: anaerobic protozoa. In: Marr, J. (ed.), *Molecular Medical Parasitology*. Academic Press, London. p. 125–139.
- Naamati A, Regev-Rudzki N, Galperin S, Lill R, Pines O. 2009. Dual Targeting of Nfs1 and Discovery of Its Novel Processing Enzyme, Icp55. *Journal of Biological Chemistry* 284:30200–30208.
- Nagao Y, Kitada S, Kojima K, Toh H, Kuhara S, Ogishima T, Ito A. 2000. Glycine-rich region of mitochondrial processing peptidase alpha-subunit is essential for binding and cleavage of the precursor proteins. *J. Biol. Chem.* 275:34552–34556.
- Nakatsuka T, Sasaki T, Kaiser ET. 1987. Peptide segment synthesis catalyzed by the semisynthetic enzyme thiolsubtilisin. *J. Am. Chem. Soc.* 109:3808–3810.
- Neupert W, Herrmann JM. 2007. Translocation of Proteins into Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76:723–749.

- Neupert W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 66:863–917.
- Nolden M, Ehses S, Koppen M, Bernacchia A, Rugarli EI, Langer T. 2005. The m-AAA Protease Defective in Hereditary Spastic Paraplegia Controls Ribosome Assembly in Mitochondria. *Cell* 123:277–289.
- Okamoto K, Brinker A, Paschen SA, Moarefi I, Hayer-Hartl M, Neupert W, Brunner M. 2002. The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *The EMBO journal* 21:3659–3671.
- Page-Sharp M, Behm CA, Smith GD. 1996. *Trichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*: the pattern of inactivation of hydrogenase activity by oxygen and activities of catalase and ascorbate peroxidase. *Microbiology (Reading, Engl.)* 142 (Pt 1):207–211.
- Palakunnel, G. 2013. Der Einfluss der Transitpeptidlänge auf das Targeting zu den hydrogenosomalen Organellen von *Trichomonas vaginalis*. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Patron NJ, Waller RF. 2007. Transit peptide diversity and divergence: A global analysis of plastid targeting signals. *Bioessays* 29:1048–1058.
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. 1998. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:300–317.
- Pfanner N, Geissler A. 2001. Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:339–349.
- Plümper E, Bradley PJ, Johnson PJ. 1998. Implications of Protein Import on the Origin of Hydrogenosomes. *Protist* 149:303–311.
- Polevoda B, Sherman F. 2003. N-terminal Acetyltransferases and Sequence Requirements for N-terminal Acetylation of Eukaryotic Proteins. *Journal of Molecular Biology* 325:595–622.
- Popov-Celeketić D, Mapa K, Neupert W, Mokranjac D. 2008. Active remodelling of the TIM23 complex during translocation of preproteins into mitochondria. *The EMBO journal* 27:1469–1480.
- Popov-Čeleketić J, Waizenegger T, Rapaport D. 2008. Mim1 Functions in an Oligomeric Form to Facilitate the Integration of Tom20 into the Mitochondrial Outer Membrane. *Journal of Molecular Biology* 376:671–680.
- Prudova A, auf dem Keller U, Butler GS, Overall CM. 2010. Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 9:894–911.
- 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.
- Qiu J, Wenz L-S, Zerbes RM, et al. 2013. Coupling of mitochondrial import and export translocases by receptor-mediated supercomplex formation. *Cell* 154:596–608.

- Rada P, Doležal P, Jedelský PL, Bursac D, Perry AJ, Sedinova M, Smiskova K, Novotny M, Campo Beltran N, Hrdy I, Lithgow T, Tachezy J. 2011. The Core Components of Organelle Biogenesis and Membrane Transport in the Hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. Lightowers B, editor. PLoS ONE 6:e24428.
- Rainey RN, Glavin JD, Chen HW, French SW, Teitell MA, Koehler CM. 2006. A New Function in Translocation for the Mitochondrial i-AAA Protease Yme1: Import of Polynucleotide Phosphorylase into the Intermembrane Space. *Mol. Cell. Biol.* 26:8488–8497.
- Rasoloson D, Tomkova E, Cammack R, Kulda J, Tachezy J. 2001. Metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen. *Parasitology* 123:45–56.
- Rassow J, Dekker PJ, van Wilpe S, Meijer M, Soll J. 1999. The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *Journal of Molecular Biology* 286:105–120.
- Rassow J, Guiard B, Wienhues U, Herzog V, Hartl F-U, Neupert W. 1989. Translocation arrest by reversible folding of a precursor protein imported into mitochondria. A means to quantitate translocation contact sites. *J. Cell Biol.* 109:1421–1428.
- Regev-Rudzki N, Yogev O, Pines O. 2008. The mitochondrial targeting sequence tilts the balance between mitochondrial and cytosolic dual localization. *Journal of Cell Science* 121:2423–2431.
- Regoes A, Zourmpanou D, León-Avila G, van der Giezen M, Tovar J, Hehl AB. 2005. Protein import, replication, and inheritance of a vestigial mitochondrion. *J. Biol. Chem.* 280:30557–30563.
- Rehling P, Model K, Brandner K, Kovermann P, Sickmann A, Meyer HE, Kühlbrandt W, Wagner R, Truscott KN, Pfanner N. 2003. Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science* 299:1747–1751.
- Rhee SG, Chae HZ, Kim K. 2005. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine* 38:1543–1552.
- Rivera MC, Jain R, Moore JE, Lake JA. 1998. Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:6239–6244.
- Roger AJ, Clark CG, Doolittle WF. 1996. A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:14618–14622.
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlet-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ. 2004. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell Proteomics* 3:1154–1169.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 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.
- Salvador N, Aguado C, Horst M, Knecht E. 2000. Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J. Biol. Chem.* 275:27447–27456.
- Sambrook, J, Fritsch EF, Maniatis T. 198. *Molecular cloning: A laboratory manual*, Vol. 2. New York: Cold Spring Harbor laboratory press.
- Santos JM, Graindorge A, Soldati-Favre D. 2011. *Molecular & Biochemical Parasitology*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 182:27–36.
- Sánchez-Pulido L, Devos D, Genevrois S, Vicente M, Valencia A. 2003. POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of β -barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* 28:523–526.
- Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. 2010. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature Publishing Group* 11:655–667.
- Schneider A, Bursać D, Lithgow T. 2008. The direct route: a simplified pathway for protein import into the mitochondrion of trypanosomes. *Trends in Cell Biology* 18:12–18.
- Schneider G, Sjöling S, Wallin E, Wrede P, Glaser E, Heijne von G. 1998. Feature-extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targeting peptides. *Proteins* 30:49–60.
- Schneider RE, Brown MT, Shiflett AM, Dyall SD, Hayes RD, Xie Y, Loo JA, Johnson PJ. 2011. The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. *International Journal for Parasitology*:1–14.
- Schwartz MP, Huang S, Matouschek A. 1999. The structure of precursor proteins during import into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 274:12759–12764.
- Schwebke JR, Burgess D. 2004. Trichomoniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:794–803.
- Shariff K, Ghosal S, Matouschek A. 2004. The Force Exerted by the Membrane Potential during Protein Import into the Mitochondrial Matrix. *Biophysical Journal* 86:3647–3652.
- Shiflett AM, Johnson PJ. 2010. Mitochondrion-Related Organelles in Eukaryotic Protists. *Annu. Rev. Microbiol.* 64:409–429.
- Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schönfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C. 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:13207–13212.
- Slutsky-Leiderman O, Marom M, Iosefson O, Levy R, Maoz S, Azem A. 2007. The Interplay between Components of the Mitochondrial Protein Translocation Motor Studied Using Purified Components. *Journal of Biological Chemistry* 282:33935–33942.
- Small I, Wintz H, Akashi K, Mireau H. 1998. Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Molecular Biology* 38:265–277.

- Smíd O, Matušková A, Harris SR, et al. 2008. Reductive Evolution of the Mitochondrial Processing Peptidases of the Unicellular Parasites *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*. *PLoS Pathog* 4:e1000243.
- Sogin ML. 1991. Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1:457–463.
- Spyrou G, Enmark E, Miranda-Vizueté A, Gustafsson J. 1997. Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 272:2936–2941.
- Sriram SM, Kim BY, Kwon YT. 2011. The N-end rule pathway: emerging functions and molecular principles of substrate recognition. *Nature Publishing Group* 12:735–747.
- Staes A, Van Damme P, Helsens K, Demol H, Vandekerckhove J, Gevaert K. 2008. Improved recovery of proteome-informative, protein N-terminal peptides by combined fractional diagonal chromatography (COFRADIC). *Proteomics* 8:1362–1370.
- Starheim KK, Gevaert K, Arnesen T. 2012. Protein N-terminal acetyltransferases: when the start matters. *37:152–161.*
- Stojanovski D, Guiard B, Kozjak-Pavlovic V, Pfanner N, Meisinger C. 2007. Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of γ -helical TOM proteins. *J. Cell Biol.* 179:881–893.
- Tamura Y, Harada Y, Shiota T, Yamano K, Watanabe K, Yokota M, Yamamoto H, Sesaki H, Endo T. 2008. Tim23-Tim50 pair coordinates functions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import. *Journal of Biological Chemistry* 283:27325–27332.
- Taylor AB, Smith BS, 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.
- Teixeira PF, Glaser E. 2013. Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. *BBA - Molecular Cell Research* 1833:360–370.
- Temirci, Ö. 2014. NifU als Modellprotein zur Analyse der Proteintranslokation in die Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis*. Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Tielens AGM, Rotte C, van Hellemond JJ, Martin W. 2002. Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.* 27:564–572.
- Timmer JC, Enoksson M, Wildfang E, Zhu W, Igarashi Y, Denault J-B, Ma Y, Dummit B, Chang Y-H, Mast AE, Eroshkin A, Smith JW, Tao WA, Salvesen GS. 2007. Profiling constitutive proteolytic events in vivo. *Biochem. J.* 407:41.
- Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CY, Martin W. 2004. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* 5:123–135.
- Toledano MB, Delaunay-Moisan A, Outten CE, Igararia A. 2013. Functions and Cellular Compartmentation of the Thioredoxin and Glutathione Pathways in Yeast. *Antioxidants & Redox Signaling* 18:1699–1711.

- Touz MC, Rivero MR, Miras SL, Bonifacino JS. 2012. Lysosomal protein trafficking in *Giardia lamblia*: common and distinct features. *Front Biosci (Elite Ed)* 4:1898–1909.
- Tovar J, León-Avila G, Sánchez LB, Suták R, Tachezy J, van der Giezen M, Hernández M, Müller M, Lucocq JM. 2003. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426:172–176.
- Van Damme P, Arnesen T, Gevaert K. 2011. Protein alpha-N-acetylation studied by N-terminomics. *FEBS Journal* 278:3822–3834.
- van der Giezen M. 2009. Hydrogenosomes and mitosomes: conservation and evolution of functions. *J Eukaryotic Microbiology* 56:221–231.
- van der Laan M, Wiedemann N, Mick DU, Guiard B, Rehling P, Pfanner N. 2006. A Role for Tim21 in Membrane-Potential-Dependent Preprotein Sorting in Mitochondria. *Current Biology* 16:2271–2276.
- van Loon AP, Brändli AW, Schatz G. 1986. The presequences of two imported mitochondrial proteins contain information for intracellular and intramitochondrial sorting. *Cell* 44:801–812.
- van Loon AP, Schatz G. 1987. Transport of proteins to the mitochondrial intermembrane space: the “sorting” domain of the cytochrome c1 presequence is a stop-transfer sequence specific for the mitochondrial inner membrane. *The EMBO journal* 6:2441–2448.
- Van Steeg H, Oudshoorn P, Van Hell B, Polman JE, Grivell LA. 1986. Targeting efficiency of a mitochondrial pre-sequence is dependent on the passenger protein. *The EMBO journal* 5:3643–3650.
- van Wilpe S, Ryan MT, Hill K, Maarse AC, Meisinger C, Brix J, Dekker PJ, Moczko M, Wagner R, Meijer M, Guiard B, Hönliger A, Pfanner N. 1999. Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* 401:485–489.
- Varshavsky A. 2011. The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Science* 20:1298–1345.
- Verner K, Lemire B. 1989. Tight folding of a passenger protein can interfere with the targeting function of a mitochondrial presequence. *The EMBO Journal*:1–5.
- Voegtle FN, Burkhart JM, Rao S, Gerberth C, Hinrichs J, Martinou J-C, Chacinska A, Sickmann A, Zahedi RP, Meisinger C. 2012. Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. *Mol. Cell Proteomics* 11:1840–1852.
- Voegtle FN, Prinz C, Kellermann J, Lottspeich F, Pfanner N, Meisinger C. 2011. Mitochondrial protein turnover: role of the precursor intermediate peptidase Oct1 in protein stabilization. *Mol. Biol. Cell* 22:2135–2143.
- Voegtle FN, Wortelkamp S, Zahedi RP, 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.
- Voulhoux R, Bos MP, Geurtsen J, Mols M, Tommassen J. 2003. Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* 299:262–265.

- Wagner G, Levin R. 1978. Oxygen tension of the vaginal surface during sexual stimulation in the human. *Fertil. Steril.* 30:50–53.
- Wagner K, Mick DU, Rehling P. 2009. *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - Molecular Cell Research* 1793:52–59.
- Waizenegger T, Habib SJ, Lech M, Mokranjac D, Paschen SA, Hell K, Neupert W, Rapaport D. 2004. Tob38, a novel essential component in the biogenesis of β -barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep* 5:704–709.
- Wells JA, Ferrari E, Henner DJ, Estell DA, Chen EY. 1983. Cloning, sequencing, and secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* 11:7911–7925.
- Wiedemann N, Frazier AE, Pfanner N. 2004. The protein import machinery of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279:14473–14476.
- Wiedemann N, Kozjak V, Chacinska A, Schönfisch B, Rospert S, Ryan MT, Pfanner N, Meisinger C. 2003. Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* 424:565–571.
- Wienhues U, Becker K, Schleyer M, Guiard B, Tropschug M, Horwich AL, Pfanner N, Neupert W. 1991. Protein folding causes an arrest of preprotein translocation into mitochondria in vivo. *J. Cell Biol.* 115:1601–1609.
- Wilcox AJ, Choy J, Bustamante C, Matouschek A. 2005. Effect of protein structure on mitochondrial import. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:15435–15440.
- Williams KP, Leadlay PF, Lowe PN. 1990. Inhibition of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from *Trichomonas vaginalis* by pyruvate and its analogues. Comparison with the pyruvate decarboxylase component of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. J.* 268:69–75.
- Wing SS, Chiang HL, Goldberg AL, Dice JF. 1991. Proteins containing peptide sequences related to Lys-Phe-Glu-Arg-Gln are selectively depleted in liver and heart, but not skeletal muscle, of fasted rats. *Biochem. J.* 275:165–169.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:4576–4579.
- Wurch T, Lestienne F, Pauwels PJ. 1998. A modified overlap extension PCR method to create chimeric genes in the absence of restriction enzymes. *Biotechnology Techniques* 12:653–657.
- Yaffe MP, Ohta S, Schatz G. 1985. A yeast mutant temperature-sensitive for mitochondrial assembly is deficient in a mitochondrial protease activity that cleaves imported precursor polypeptides. *The EMBO Journal* 4:2069–2074.
- Yang D, Oyaizu Y, Oyaizu H, Olsen GJ, Woese CR. 1985. Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:4443–4447.
- Yano M, Terada K, Mori M. 2003. AIP is a mitochondrial import mediator that binds to both import receptor Tom20 and preproteins. *J. Cell Biol.* 163:45–56.

-
- Yogev O, Karniely S, Pines O. 2007. Translation-coupled Translocation of Yeast Fumarase into Mitochondria in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 282:29222–29229.
- Yoshihara HAI, Mahrus S, Wells JA. 2008. Tags for labeling protein N-termini with subtiligase for proteomics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18:6000–6003.
- Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU. 2003. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112:41–50.
- Yutin N, Makarova KS, Mekhedov SL, Wolf YI, Koonin EV. 2008. The Deep Archaeal Roots of Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 25:1619–1630.
- Zimorski V, Major P, Hoffmann K, Brás XP, 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.

8. Anhang

8.1. MS-Sequenzierungen

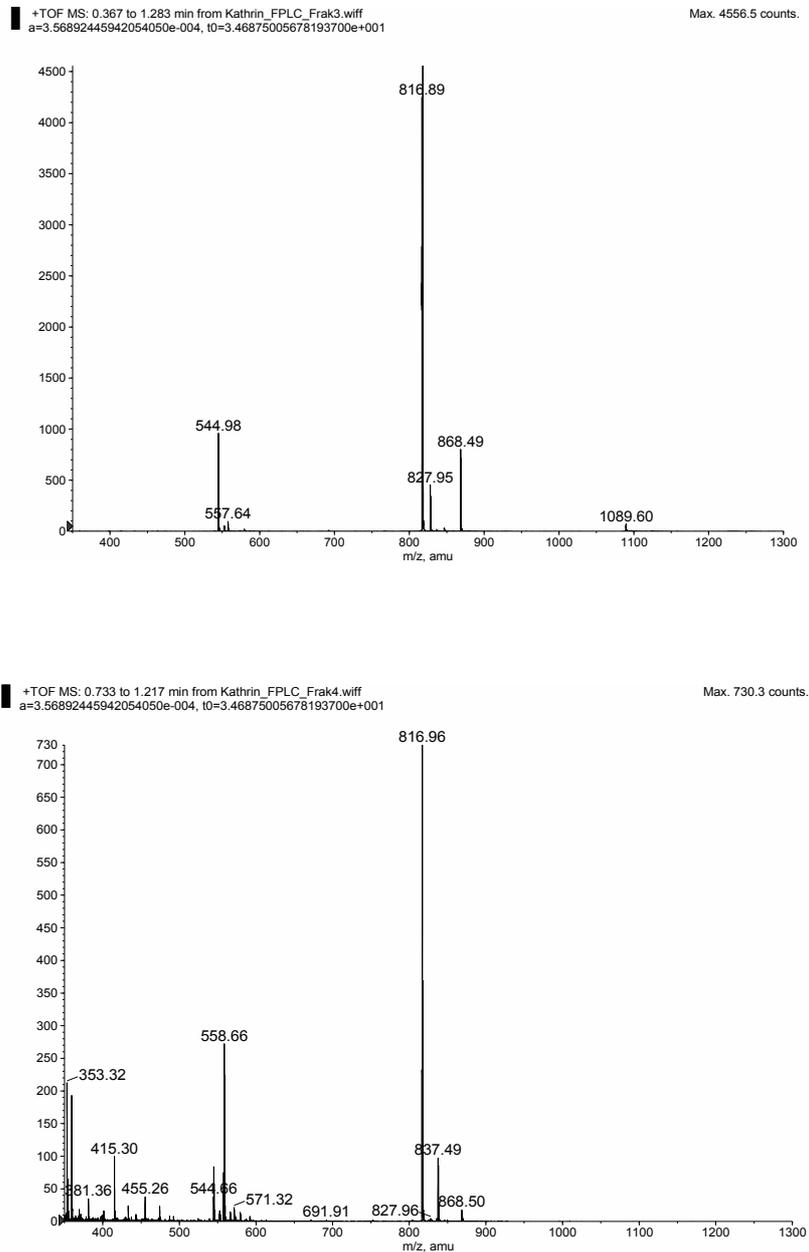


Abbildung 8.1: TOF-MS Übersichtsspektren der FPLC-Fractionen 3 (oben) und 4 (unten). In Fraktion 1 konnten keine Peptide identifiziert werden, deshalb sind keine Daten abgebildet.

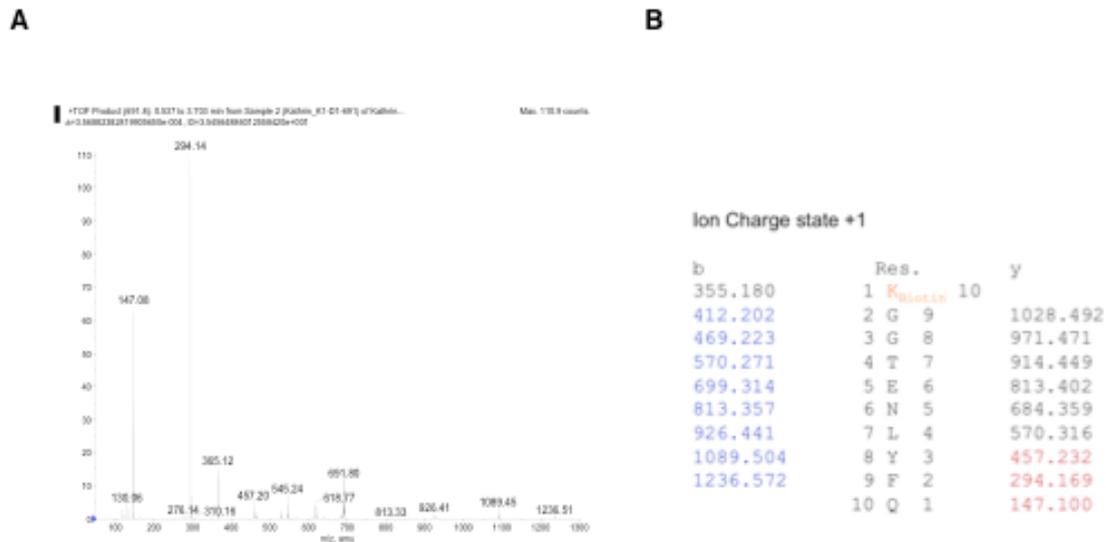


Abbildung 8.2: *De novo* Sequenzierung durch Kollisions-induzierten Zerfall (**A**) und ermitteltes Fragmentschema (**B**) des Peptids m/z 691,80 $[M+2H]^{2+}$. Identifizierte Ionen der b- bzw. y-Serie sind in blau bzw. rot markiert.

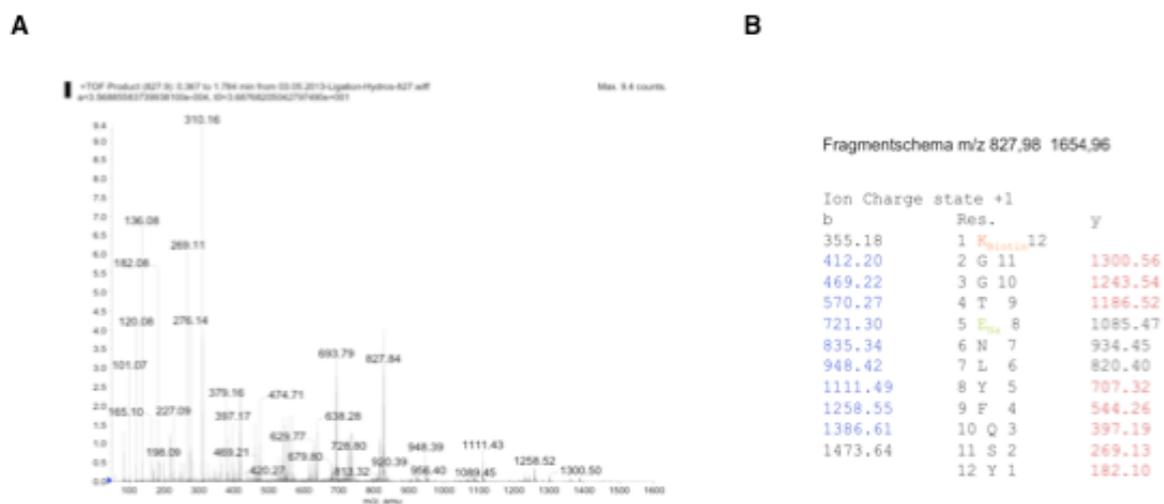


Abbildung 8.3: *De novo* Sequenzierung durch Kollisions-induzierten Zerfall (**A**) und ermitteltes Fragmentschema (**B**) des Peptids m/z 827,98 $[M+2H]^{2+}$. Identifizierte Ionen der b- bzw. y-Serie sind in blau bzw. rot markiert. Die zusätzliche Modifikation in Form einer Natrium-Anlagerung ist grün (E_{Na}) dargestellt.

8.2. Immunodetektionen zur Überprüfung der isolierten Fraktionen

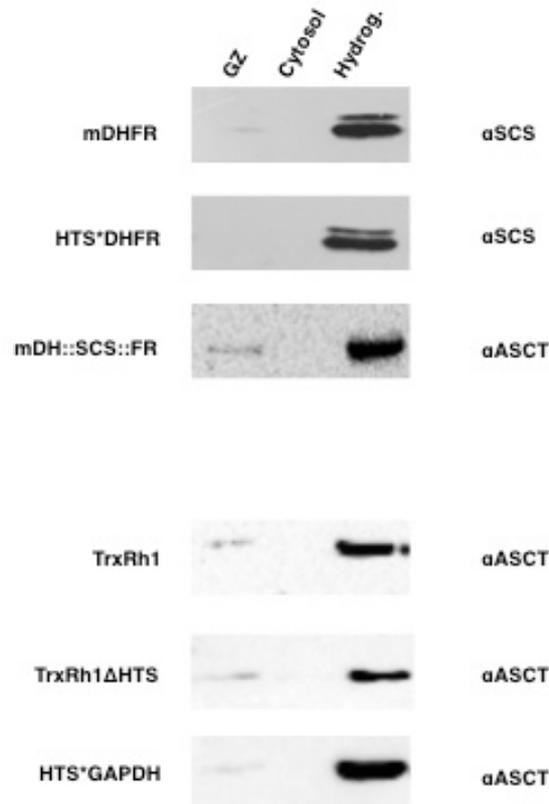


Abbildung 8.3: Immunodetektionen der hydrogenosomalen Markerproteine ASCT bzw. SCS zur Überprüfung der Reinheit der isolierten subzellulären Fraktionen Gesamtzellextrakt (GZ), Cytosol und Hydrogenosomen (Hydrog.) aller verwendeten transfizierten *T. vaginalis* Kulturen. Es fehlt das Konstrukt HTS*DH:SCS:FR, dort war aufgrund geringer Proteinmengen keine Detektion eines Markerproteins erfolgreich.

8.3. Lokalisation von HTS*DHFR In Lysosomen

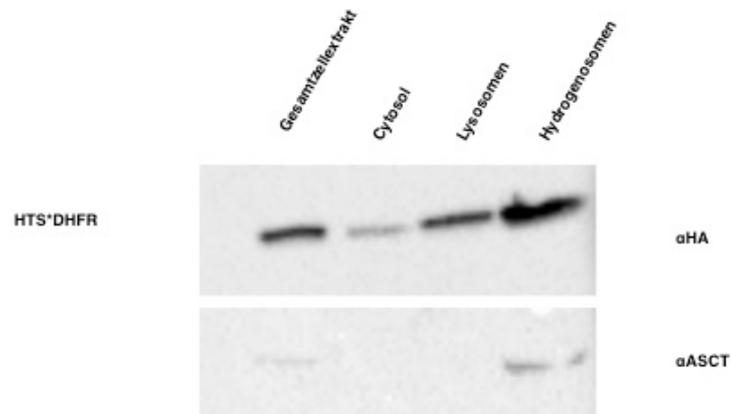


Abbildung 8.4: Lokalisation der HA-markierten HTS*DHFR in den subzellulären Fraktionen Gesamtzell-extrakt, Cytosol, Lysosomen und Hydrogenosomen. Die Detektion des hydrogenosomalen Markerproteins ASCT zeigt, dass die Lokalisation in den Lysosomen nicht auf hydrogenosomale Kontamination der Fraktion zurückzuführen ist. Ob es sich tatsächlich um Lysosomen handelt, müsste durch ein lysosomales Markerprotein überprüft werden.

9. Abkürzungsverzeichnis

Einbuchstabencode bzw. Dreibuchstabencode der Aminosäuren

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

Abkürzungen:

A	Ampere
aa	Aminosäuren
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AK	Antikörper
ASCT	Acetyl:Succinat-CoA Transferase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DHFR	Dehydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i> , und andere
ESI	<i>Elektrospray ionization</i>
FeS	Eisen-Schwefel-Cluster
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
H ₂ O	Wasser
HPP	<i>hydrogenosomal processing peptidase</i>
HSP	Hitzeschock-Protein
HTS	<i>hydrogenosomal targeting sequence</i>
IFA	Immunofluoreszenz-Assay
IM	innere Membran
IMS	<i>inner membrane space</i> , Intramembranraum
kb	Kilobase
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K ₂ HPO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i> Medium
m	milli- (10^{-3})
M	Molar mol/l
MIA	<i>mitochondrial intermembrane space assembly</i>
min	Minute
mol	Mol
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPP	<i>mitochondrial processing peptidase</i>
mRNA	<i>messengerRNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MTS	<i>mitochondrial targeting sequence</i>
MX	Matrix
n	nano (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamadenindinukleotid

OD	optische Dichte
OM	äußere Membran
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	<i>presequence translocase-associated motor</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFOR	Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase
pH	pH-Wert
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAM	<i>sorting and assembly machinery</i>
sec	Sekunde
SCS	Succinyl-CoA Synthetase
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
SMB	Saccharose MOPS β -Mercaptoethanol
SMDI	Saccharose MOPS DTT Protease-Inhibitoren
T	Thymin
TBS	Tris-Puffer Natrium
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris EDTA
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TIM	<i>translocase of the inner membrane</i>
TOM	<i>translocase of the outer membrane</i>
TOF	<i>time of flight</i> Massenspektrometrie
tRNA	<i>transfer</i> RNA
TrxRh	Thioredoxin-Reduktase
Trx	Thioredoxin
U	Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	Volumen
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>
w	Gewicht
μ	Mikro (10^{-6})

Danke

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. William Martin für die interessante und herausfordernde Themenstellung und die Möglichkeit, in seinem Institut zu promovieren. Durch sein Interesse, motivierende und kritische Diskussionen und seine kontinuierliche Unterstützung hat er meine Arbeit begleitet und gefördert.

Frau Professor Dr. Laura Rose danke ich für die Übernahme des Korreferats und das entgegengebrachte Interesse an meiner Arbeit.

Sehr herzlich möchte ich mich außerdem bei Dr. Sabine Metzger bedanken. Für die Einführung in die Welt des MS, aber auch für ihre stete Ansprechbarkeit bei Fragen oder Diskussionsbedarf und ihre tatkräftige Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Bei Dr. Sven Gould bedanke ich mich sehr für die Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit durch kritische Diskussionen, viele Denkanstöße und die Durchsicht meiner Doktorarbeit.

Dr. Verena Zimorski möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und viele gute Ratschläge für die Laborarbeit danken.

Bei Dr. Daniel Schlieper aus dem Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie möchte ich mich für die umfangreiche Einführung in die FPLC-Methodik bedanken.

Gary Kusdian danke ich sehr für das gründliche Korrekturlesen meiner Arbeit und seine Unterstützung.

Dr. Mayo Röttger, Dr. Christian Wöhle und Dr. Xavier Peireira Bras danke ich für die gute Zeit im gemeinsamen Büro, ihre Hilfsbereitschaft und ihr offenes Ohr bei Problemen.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Evolution sehr für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die entgegengebrachte Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor- und Büroalltag.

Die vorliegende Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Verwendete Quellen wurden kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde weder in der vorliegenden Form noch in ähnlicher Form bei anderen Instituten eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 18. Juli 2014

.....
(Kathrin Hoffmann)