

**Charakterisierung des hydrogenosomalen Proteoms aus
dem mikroaerophilen Humanparasiten
*Trichomonas vaginalis***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Simone Pütz
geb. Ahr

aus Mönchengladbach

März 2007

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

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

Referent: Prof. Dr. William Martin

Korreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2007

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

Publikationen

Martin W, Rotte C, Hoffmeister M, Theissen U, Gelius-Dietrich G, Ahr S, Henze K (2003). Early cell evolution, eukaryotes, anoxia, sulfide, oxygen, fungi first (?), and a tree of genomes revisited. *IUBMB Life*. 55 (4-5): 193-204.

Pütz S, Gelius-Dietrich G, Piotrowski M, Henze K (2005). Rubrerythrin and peroxiredoxin: Two novel putative peroxidases in the hydrogenosomes of the microaerophilic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biol Parasitol*. 142: 212-223.

Pütz S, Dolezal P, Gelius-Dietrich G, Bohacova L, Tachezy J, Henze K (2006). Fe-hydrogenase maturases in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell*. 5 (3): 579-586.

van Grinsven KWA, van Weelden SWH, Pütz S, van der Giezen M, van Hellemond JJ, Tielens AGM, Henze K (2007). Acetate:succinate CoA-transferase in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: identification and characterization. *Eingereicht*.

Tagungsbeiträge

Ahr S und Henze K (2004). Two putative peroxidases of bacterial origin in the hydrogenosomes of the anaerobic protozoan *Trichomonas vaginalis*. Society of Protozoologists 56th Annual Meeting, Smithfield, USA.

Pütz S und Henze K (2004). Hydrogenosome-bound ribosomes in *Trichomonas vaginalis*? Molecular Parasitology Meeting XV, Woods Hole, USA.

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

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
1.1 Protisten und Parasiten.....	3
1.2 <i>Trichomonas vaginalis</i>	4
1.3 Hydrogenosomen	5
1.4 Hydrogenosomen und Mitochondrien – ein gemeinsamer Ursprung.....	7
1.5 Proteomanalyse	11
1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien	14
2.2 Reagenzsätze.....	14
2.3 Enzyme.....	15
2.4 Organismen	15
2.4.1 <i>Trichomonas vaginalis</i> und <i>Tritrichomonas foetus</i>	15
2.4.2 Bakterienstämme.....	15
2.5 Vektoren.....	16
2.6 Oligonukleotide.....	16
2.7 Arbeiten mit <i>Trichomonas vaginalis</i> und <i>Tritrichomonas foetus</i>	18
2.7.1 Anzucht von <i>Trichomonas vaginalis</i> und <i>Tritrichomonas foetus</i>	18
2.7.2 Dauerkulturen von <i>Trichomonas vaginalis</i> und <i>Tritrichomonas foetus</i>	18
2.7.3 Transformation von <i>Trichomonas vaginalis</i>	19
2.7.4 Isolierung von Hydrogenosomen	19
2.7.5 Extraktion hydrogenosomaler Membranproteine	20
2.7.6 Elektronenmikroskopie	20
2.7.7 Fluoreszenzmikroskopie	21
2.8 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	22
2.8.1 Heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i>	22
2.8.2 Aufschluss von Expressionskulturen und Reinigung rekombinanter Enzyme	22
2.9 Arbeiten mit Nukleinsäuren	23
2.9.1 Isolierung von genomischer DNA aus <i>Trichomonas vaginalis</i>	23
2.9.2 Amplifikation über Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	23
2.9.3 Klonierung von PCR-Fragmenten	24
2.9.4 Isolation von Plasmid-DNA.....	24
2.9.5 DNA-Sequenzierung nach Sanger	24
2.9.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Trichomonas vaginalis</i>	25
2.9.7 Isolierung von mRNA aus der hydrogenosomalen Fraktion mit anschließender cDNA Synthese.....	25
2.9.8 RNA-Transfer auf eine Nylon-Membran (Northern Transfer).....	25
2.9.9 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	26
2.9.10 Northern-Hybridisierung und Detektion.....	26
2.10 Proteinbiochemische Methoden.....	27
2.10.1 Bestimmung der Protein-Konzentration	27
2.10.2 1D-SDS-PAGE	27
2.10.3 2D-SDS-PAGE	27
2.10.4 Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	29
2.10.5 Coomassie Brilliant Blau-Färbung von Proteingelen	30
2.10.6 Silberfärbung von Proteingelen	31

2.10.7	Proteolyse von Proteinen im Gel	31
2.10.8	Proteinsequenzierung	32
2.10.9	Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran (Western Transfer)	32
2.10.10	Immunodetektion von Proteinen	33
2.10.11	Bestimmung von Enzymaktivitäten	33
2.10.12	Thermolysin- und Triton X-100-Behandlung der hydrogenosomalen Fraktion.....	34
2.10.13	Enzymatischer Test zur Bestimmung der Rubrerythrin Aktivität.....	34
2.11	Bioinformatische Methoden	35
2.11.1	Sequenzanalysen, Datenbankvergleiche und phylogenetische Netzwerke	35
2.11.2	Voraussagen über mögliche Transitpeptide, das Molekulargewicht und den isoelektrischen Punkt von Proteinen	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Isolierung von Hydrogenosomen	36
3.2	2D-Elektrophorese der hydrogenosomalen Fraktion von <i>T. vaginalis</i>	38
3.3	Analyse der hydrogenosomalen Fraktion von <i>Tritrichomonas foetus</i>	42
3.4	Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
3.5	Ribosomale Proteine in der hydrogenosomalen Fraktion von <i>Trichomonas</i> <i>vaginalis</i>	45
3.6	mRNA Analyse der hydrogenosomalen Fraktion	46
3.7	Analysen spezieller Proteine der hydrogenosomalen Fraktion	48
3.7.1	Fe-Hydrogenase Maturasen in <i>T. vaginalis</i>	48
3.7.2	Intrazelluläre Lokalisierung der Proteine HydG, HydE und HydF.....	52
3.7.3	Mögliche Peroxidasen in den Hydrogenosomen von <i>T. vaginalis</i>	54
3.7.3.1	Hydrogenosomale Thiolperoxidase.....	54
3.7.3.2	Rubrerythrin	57
3.7.3.3	Intrazelluläre Lokalisierung von Rubrerythrin.....	59
3.7.3.4	Phylogenetische Analyse von Rubrerythrin	60
3.7.3.5	Heterologe Expressionen von Rubrerythrin	61
3.7.3.6	Anti-Rubrerythrin Antikörper	63
3.7.3.7	<i>In vitro</i> NADPH-abhängige Peroxidase Aktivität des FNR/Rub/Rbr- Systems.....	65
3.7.4	SOD und Rubrerythrin in <i>Tritrichomonas foetus</i>	66
3.7.5	<i>In vivo</i> Expressionsstudien der Peroxidasen unter oxidativem Stress.....	68
4	Diskussion	70
4.1	Isolierung von Hydrogenosomen und Auftrennung der Proteine durch 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	70
4.2	Das hydrogenosomale Proteom von <i>Trichomonas vaginalis</i>	72
4.3	Ribosomale Proteine an Hydrogenosomen.....	76
4.4	ASCT - das letzte noch nicht klonierte Enzym des hydrogenosomalen Pyruvat-Stoffwechsels	79
4.5	Fe-Hydrogenase Maturasen ?	80
4.6	Oxidativer Stress in <i>T. vaginalis</i>	83
4.6.1	Tpx/Trx/TrxR – ein hydrogenosomales Peroxidase System ?	85
4.6.2	Rubrerythrin – eine NADPH-abhängige Peroxidase.....	87
4.6.3	OsmC – eine Alkylhydroperoxid Reduktase ?	91
4.6.4	Auswirkungen von oxidativem Stress auf SOD- und Peroxidase- Expressionen und der Zusammenhang mit Metronidazol-Resistenzen.....	92
4.7	Ausblick.....	94

5	Literaturverzeichnis	97
6	Anhang	115
	Anhang 1: 2D-Polyacrylamidgele von <i>T. vaginalis</i> und <i>T. foetus</i> Hydrogenosomen mit unterschiedlichen pH-Gradienten in der ersten Dimension	115
	Anhang 2: Sequenzierte Proteine aus 2D-Polyacrylamidgelen der Hydrogenosomen von <i>T. vaginalis</i>	119
	Anhang 3: Sequenzierte Proteine aus 2D-Polyacrylamidgelen von <i>T. foetus</i> Hydrogenosomen	122
	Anhang 4: Sequenzierte Peptide der BN-PAGE der hydrogenosomalen Membran- proteine von <i>T. vaginalis</i>	123
	Anhang 5: Identifizierte cDNA-Sequenzen der mRNA aus dem Gesamtzellextrakt bzw. der hydrogenosomalen Fraktion von <i>T. vaginalis</i>	124
	Anhang 6: Zugangsnummern der in phylogenetischen Analysen verwendeten Sequenzen	127
	Abkürzungsverzeichnis	130
	Danksagung	132

Zusammenfassung

Trichomonas vaginalis ist ein mikroaerophiler Flagellat, der weder Peroxisomen noch *bona fide* Mitochondrien besitzt, sondern Hydrogenosomen - anaerobe Formen der Mitochondrien. Das hydrogenosomale Proteom wurde analysiert, um die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Hydrogenosomen und Mitochondrien sowie Stoffwechsel- und Synthesewege der Hydrogenosomen zu charakterisieren. Dazu wurden hydrogenosomale Proteine in zweidimensionalen Gelelektrophoresen aufgetrennt. Durch massenspektrometrische Sequenzierung wurden 84 Proteine unterschiedlicher Funktion durch Vergleich mit der TIGR Genom-Datenbank von *T. vaginalis* identifiziert. Folgende Erkenntnisse konnten aus der Protein-zusammensetzung dieser Fraktion gewonnen werden:

- Es wurden 17 eukaryotische ribosomale Proteine und vier weitere an Translation und Transkription beteiligte Proteine in der hydrogenosomalen Fraktion identifiziert. Dies ist ein Indiz für co-translationalen Protein-Import in die Hydrogenosomen, da diese Organellen kein Genom besitzen und hydrogenosomale Proteine im Cytosol gebildet werden. Zusätzlich enthielt die hydrogenosomale Fraktion mRNA, die mehr als doppelt so viele Sequenzen für hydrogenosomale Proteine aufwies als aus Gesamtzell-Fractionen isolierte mRNA.
- Der Anteil der für glycolytische Proteine kodierenden mRNA war ebenfalls um mehr als das zweifache erhöht, und drei glycolytische Enzyme lagen in der hydrogenosomalen Protein-Fraktion vor, was auf Assoziationen glycolytischer Proteine an Hydrogenosomen hinweist. Sowohl co-translationaler Protein-Import in die Organellen als auch Assoziationen glycolytischer Proteine an die Organellen sind bereits von Mitochondrien bekannt.
- Eine Acetat-Succinat-CoA-Transferase – das letzte noch nicht klonierte Enzym des hydrogenosomalen Pyruvat-Stoffwechsels – wurde identifiziert. Diese ASCT gehört zu der Familie der Acetyl-CoA-Hydrolasen/-Transferasen und ist phylogenetisch nicht mit der einzigen bereits charakterisierten ASCT aus *Trypanosoma brucei* verwandt.
- In den Hydrogenosomen sind die spezifisch an der Reifung von Fe-Hydrogenasen beteiligten Proteine HydG, HydE und HydF lokalisiert. Diese putativen Maturasen waren bisher nur aus anaeroben Bakterien und den Chloroplasten der Grünalge *C. reinhardtii* bekannt.
- Drei aus Mitochondrien nicht bekannte, bakterielle Proteine sind an Schutzsystemen vor reaktiven Sauerstoffspezies von *T. vaginalis* beteiligt: eine Thiolperoxidase, die mögliche Alkylhydroperoxid-Reduktase OsmC und Rubrerythrin (Rbr) – ein Nicht-Häm Eisenprotein, das in anaeroben Bakterien H₂O₂ reduziert. Rbr wies eine *in vitro* NADPH-abhängige Peroxidase-Aktivität auf, und die Rbr-Transkription konnte durch oxidativen Stress induziert werden. Die anaeroben Hydrogenosomen nutzen somit bakterielle Systeme zum Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies, die sich deutlich von den Schutzsystemen der aeroben Mitochondrien unterscheiden.

Abstract

Trichomonas vaginalis is a microaerophilic flagellate which possesses neither peroxisomes nor *bona fide* mitochondria, but hydrogenosomes - anaerobic forms of mitochondria.

The major aim of this PhD-thesis was to analyze the hydrogenosomal proteome in order to characterize the relationship between hydrogenosomes and mitochondria, and to explore the metabolic capacity of hydrogenosomes. Hydrogenosomal proteins were separated on two-dimensional gels, and 84 proteins with different functions were identified by comparison with the TIGR *T. vaginalis* genome database. The following conclusions could be drawn from the protein composition:

- 17 eukaryotic ribosomal proteins and four additional proteins involved in translation and transcription were localized in the hydrogenosomal fraction. This indicates co-translational protein import into the hydrogenosomes, because the organelles lack a genome, and organellar proteins are synthesized in the cytosol. Furthermore there was mRNA in the hydrogenosomal fraction which contained twice as many sequences of hydrogenosomal proteins than mRNA isolated from whole cell extract.
- The number of mRNAs coding for glycolytic proteins was also twice as large, and three glycolytic proteins were present in the hydrogenosomal protein fraction. This indicated associations of glycolytic proteins with hydrogenosomes. Both co-translational protein import and associations of glycolytic proteins with the outside of the organelle are well known from mitochondria.
- An acetate-succinate-CoA-transferase – the last unknown sequence of the hydrogenosomal pyruvate metabolism – was identified. This ASCT belongs to an acetyl-CoA-hydrolase/-transferase family, and is phylogenetically unrelated to the only already characterized *Trypanosoma brucei* ASCT.
- The specific Fe-hydrogenase maturases HydG, HydE, and HydF are localized in the hydrogenosomes. These proteins were known only from anaerobic bacteria and the chloroplasts of the green alga *C. reinhardtii* so far.
- Three proteins of bacterial origins, which are not known from mitochondria, are involved in defense against reactive oxygen species in *T. vaginalis*: a thiolperoxidase, the putative alkylhydroperoxide reductase OsmC, and rubrerythrin (Rbr) – a non-heme iron protein, which reduces H₂O₂ in anaerobic bacteria. Rbr exhibited an *in vitro* NADPH-dependent peroxidase activity and Rbr transcription was induced by oxidative stress. Thus the anaerobic hydrogenosomes use defensive mechanisms of bacterial origins against reactive oxygen species, which are quite different from systems found in aerobic mitochondria.

1 Einleitung

1.1 Protisten und Parasiten

Antoni van Leeuwenhoek entdeckte 1675 mit einem selbstgebauten, einlinsigen Mikroskop als Erster einzellige Lebewesen in Teich- und Regenwasser sowie in menschlichem Speichel, und bezeichnete sie als *ANIMACULA*. 1805 separierte Lorenz von Oken einzellige Organismen von höheren Pflanzen und Metazoen und bezeichnete sie als URTHIERE. Die Bezeichnung PROTOZOA wurde 1818 von dem deutschen Zoologen und Paläontologen Georg August Goldfuß aus dem Griechischen („proto-“ für erste und „-zoa“ für Lebewesen/Tier) eingeführt. Ernst Haeckel teilte 1866 die gesamte Organismenwelt in drei oberste Hauptgruppen ein: Tierreich, Pflanzenreich und Protistenreich, wobei er zu den PROTISTA viele einzellige, jedoch nicht ausschließlich eukaryotische Organismen zählte, da Bakterien zu der Zeit noch nicht als Prokaryoten klassifiziert waren.

Zu den PROTISTEN werden heutzutage alle eukaryotischen, einzelligen Organismen ohne Zell-Differenzierung in Gewebe gezählt, unabhängig davon, ob sie heterotroph (Protozoa) oder phototroph (Protophyta) sind. Somit ist eine phylogenetisch-systematische Definition der Protisten nicht möglich, da sie keine monophyletische Gruppe repräsentieren (Adl *et al.* 2005; Hausmann *et al.* 2003).

Neben freilebenden Protisten, wie z.B. dem Pantoffeltierchen (*Paramecium*) oder dem Augentierchen (*Euglena gracilis*), gibt es Protisten, die mit einem Wirt assoziiert sind. In Abhängigkeit von der Art der Interaktionen wird zwischen drei Lebensweisen unterschieden: Symbiose (beide Organismen profitieren vom Zusammenleben), Kommensalismus (nur ein Partner, der Symbiont, hat Vorteile, ohne den Wirt zu schädigen) und Parasitismus (der Wirt wird geschädigt, während der Parasit profitiert).

Zu den anaeroben, pathogenen, parasitischen Protisten gehören z.B. *Giardia intestinalis* (Lamblienruhr), *Entamoeba histolytica* (Amöbenruhr), *Tritrichomonas foetus* (Trichomonadenseuche bei Rindern) und *Trichomonas vaginalis* (Trichomoniasis bei Menschen).

1.2 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis (Abb. 1.1) ist ein humanpathogener Flagellat und gehört nach neuester Klassifizierung der Trichomonadida in den Rang Parabasalia zu der Über-Gruppe Excavata (Adl *et al.* 2005).

T. vaginalis befällt den menschlichen Urogenitaltrakt und ist der Erreger der weltweit häufigsten, nicht-viralen, sexuell übertragbaren Krankheit Trichomoniasis. In den

USA wird von jährlich 7,4 Millionen Neuinfektionen mit *T. vaginalis* ausgegangen (Weinstock *et al.* 2004). Eine *T. vaginalis* Infektion kann beim Mann Entzündungen der Harnröhre und der Prostata und bei einer Frau Trichomonadenkolpitis auslösen. Diese Entzündung im Genitalbereich erhöht die Anfälligkeit einer HIV Infektion bei Kontakt mit diesem Virus und kann Frühgeburten und geringes Geburtsgewicht verursachen (zusammengefasst in Schwebke und Burgess 2004).

Trichomoniasis kann mit einer Chemotherapie mit den 5-Nitroimidazol-Derivaten Metronidazol und Tinidazol behandelt werden. Durch Elektronen-Übertragung von Ferredoxin auf z.B. Metronidazol entstehen cytotoxische Radikale ($R-NO_2^-$) (Müller 1986), die die DNA des Parasiten schädigen können (Edwards 1993). Allerdings wurden bereits Metronidazol-resistente Stämme isoliert (Meingassner und Thurner 1979; Müller *et al.* 1980; Kulda *et al.* 1982; Lossik *et al.* 1986).

Parasitische Trichomonaden wie *Trichomonas vaginalis* und der Rinderparasit *Tritrichomonas foetus* besitzen Nahrungsvakuolen und ernähren sich phagocytotisch von Bakterien und Wirtszellen (Rendón-Maldonado *et al.* 1998), können aber im Labor in axenischer Kultur gehalten werden. *In vitro* in Flüssigkultur gehaltene Trichomonaden besitzen eine ovale bis runde Morphologie mit einer Größe von 10-25 μm (Honigberg *et al.* 1984; Nielsen 1975). Bei Kontakt mit vaginalen Epithelzellen *in vivo* bilden *T. vaginalis* flache, amöboide Zellen und maximieren dadurch den Oberflächenkontakt zu den Epithelzellen (Arroyo *et al.* 1993).

T. vaginalis besitzt fünf Flagellen, von denen vier anterior lokalisiert sind, während das fünfte als Schleppgeißel mit der undulierenden Membran verbunden und zurücklaufend ist. Das für die Parabasalia charakteristische Axostyl, ein unbeweglicher Achsenstab aus Mikrotubuli, durchzieht die Zelle in Längsrichtung.

T. vaginalis Trophozoiten vermehren sich innerhalb des Wirtes durch Zweiteilung und



Abb. 1.1: *Trichomonas vaginalis* Trophozoit; der Skalierungsbalken entspricht 10 μm .

können nur durch direkten Kontakt übertragen werden, da keine Zysten gebildet werden und die Zellen aufgrund der einfachen Zellhülle aus einer Membran ohne Zellwandauflagerung anfällig gegen Austrocknung sind (Mehlhorn und Piekarski 1995). Obwohl *T. vaginalis* 27 Orthologe zu 29 bekannten meiotischen Genen besitzt (Malik *et al.* 2006) konnte bisher keine sexuelle Vermehrung beobachtet werden.

Eine weitere Besonderheit der Trichomonaden ist, dass sie weder Peroxisomen noch klassische Mitochondrien besitzen, sondern Hydrogenosomen, anaerobe Formen der Mitochondrien (Embley *et al.* 2003; Hrdy *et al.* 2004).

1.3 Hydrogenosomen

Hydrogenosomen wurden in den 70er Jahren in *Tritrichomonas foetus* und *Trichomonas vaginalis* entdeckt und zunächst als paracostale und paraxostylare „Körnchen“ bzw. *Microbodies* beschrieben (Lindmark und Müller 1973), die weder spezifische Enzymaktivitäten von Peroxisomen noch von Mitochondrien besaßen (Müller 1973). In den Wasserstoff-produzierenden Trichomonaden *T. foetus* und *T. vaginalis* wurden Enzyme identifiziert, die sich deutlich von Enzymen der Pyruvat-metabolisierenden Mitochondrien unterschieden: die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase und die Hydrogenase. Diese Aktivitäten ließen sich den Fraktionen, die mit diesen „Körnchen“ angereichert waren, zuordnen, so dass diese Partikel nach ihrem auffälligsten Stoffwechselprodukt - molekularem Wasserstoff - benannt wurden (Lindmark und Müller 1973; Lindmark *et al.* 1975). Seither wurden weitere hydrogenosomale Enzymaktivitäten gemessen, so dass der Energie-Stoffwechsel dieser Organellen in Trichomonaden wie folgt beschrieben werden kann (Abb. 1.2):

In den Hydrogenosomen von *T. vaginalis* wird Pyruvat bzw. Malat, das über die decarboxylierende Malat-Dehydrogenase (①) zu Pyruvat decarboxyliert wird, fermentativ über die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR; ②) zu Acetyl-CoA und CO₂ oxidiert. Dabei werden Elektronen auf Ferredoxin übertragen. Eine Hydrogenase (③) überträgt die Elektronen von reduziertem Ferredoxin auf Protonen, wodurch molekularer Wasserstoff entsteht. Das Coenzym A des Acetyl-CoA wird zunächst über die Acetat-Succinat-CoA-Transferase (ASCT; ④) auf Succinat übertragen und anschließend mittels Succinyl-CoA-Synthase (⑤) abgespalten, wobei ein ATP durch Substratketten-Phosphorylierung gebildet wird. Die NADH:Ferredoxin Oxidoreduktase (⑥) überträgt die Elektronen von NADH, das bei der Decarboxylierung von der Malat-Dehydrogenase gebildet wird, auf Ferredoxin

(Steinbüchel und Müller 1986; Müller 1993; Embley und Martin 1998; Martin und Müller 1998; Martin *et al.* 2001; Williams *et al.* 2002; Hrdy *et al.* 2004; Dyall *et al.* 2004a).

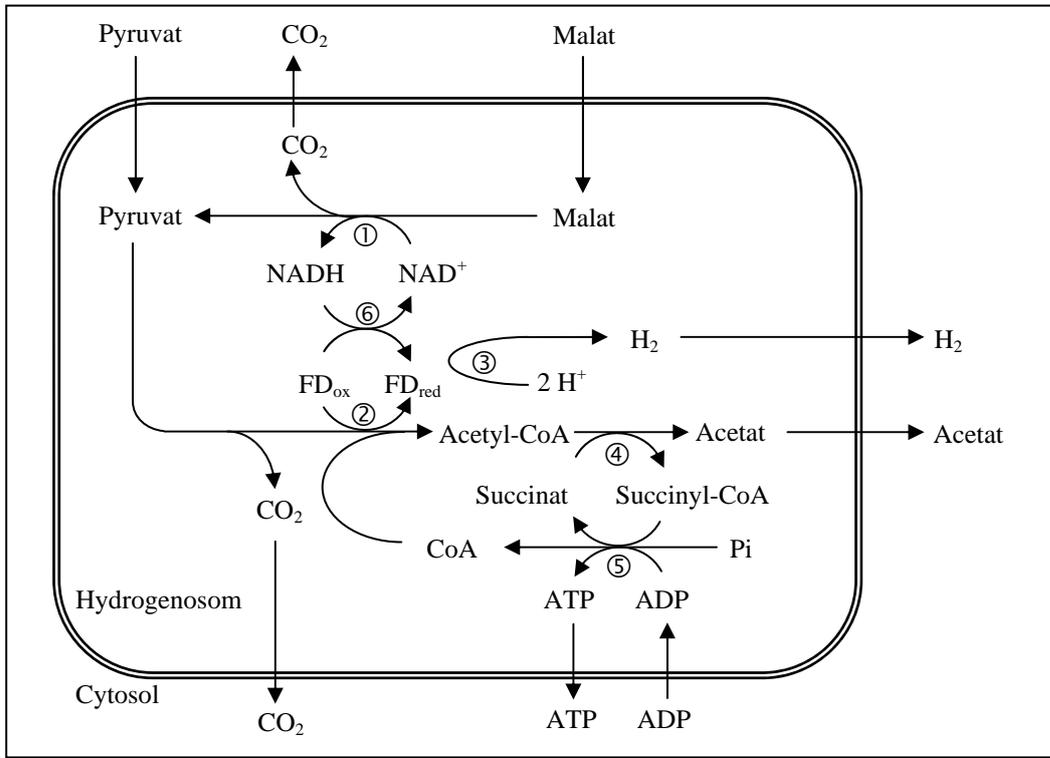


Abb. 1.2: Schematische Übersicht des Energie-Stoffwechsels in den Hydrogenosomen von *T. vaginalis*, modifiziert nach Müller (1993); ① decarboxylierende Malat-Dehydrogenase, ② Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase, ③ Hydrogenase, ④ Acetat-Succinat-CoA-Transferase, ⑤ Succinyl-CoA-Synthase, ⑥ NADH:Ferredoxin Oxidoreduktase.

Ähnliche Hydrogenase-aktive Organellen sind auch aus anaeroben Ciliaten (z.B. *Plagiopyla*, Finlay und Fenchel 1989), Amöboflagellaten (z.B. *Psalteriomonas*, Broers *et al.* 1990) und anaeroben Chytridiomyceten (z.B. *Neocallimastix*, Yarlett *et al.* 1986; *Piromyces*, Akhmanova *et al.* 1999) bekannt. Bei Ciliaten und Amöboflagellaten sind diese Organellen mit symbiontischen methanogenen Bakterien assoziiert, die die Stoffwechselprodukte CO₂ und H₂ der Hydrogenosomen zur Methanogenese nutzen (Finlay und Fenchel 1989; Broers *et al.* 1990).

1.4 Hydrogenosomen und Mitochondrien – ein gemeinsamer Ursprung

Hydrogenosomen ähneln in der ATP- und H₂-Produktion biochemisch einigen frei lebenden anaeroben Eubakterien, jedoch nicht Mitochondrien, so dass zunächst ein unabhängiger Ursprung von Hydrogenosomen und Mitochondrien vermutet wurde (Müller 1988). Allerdings weisen seither viele Daten, z.B. phylogenetische Analysen der Hitzeschockproteine Hsp10, Hsp60 und Hsp70 (Bui *et al.* 1996; Germot *et al.* 1996; Horner *et al.* 1996; Roger *et al.* 1996), auf einen gemeinsamen Ursprung dieser Organellen hin, so dass Hydrogenosomen als anaerobe Formen von Mitochondrien angesehen werden. Hydrogenosomen und Mitochondrien haben einige weitere Gemeinsamkeiten, aber auch deutliche Unterschiede (Abb. 1.3).

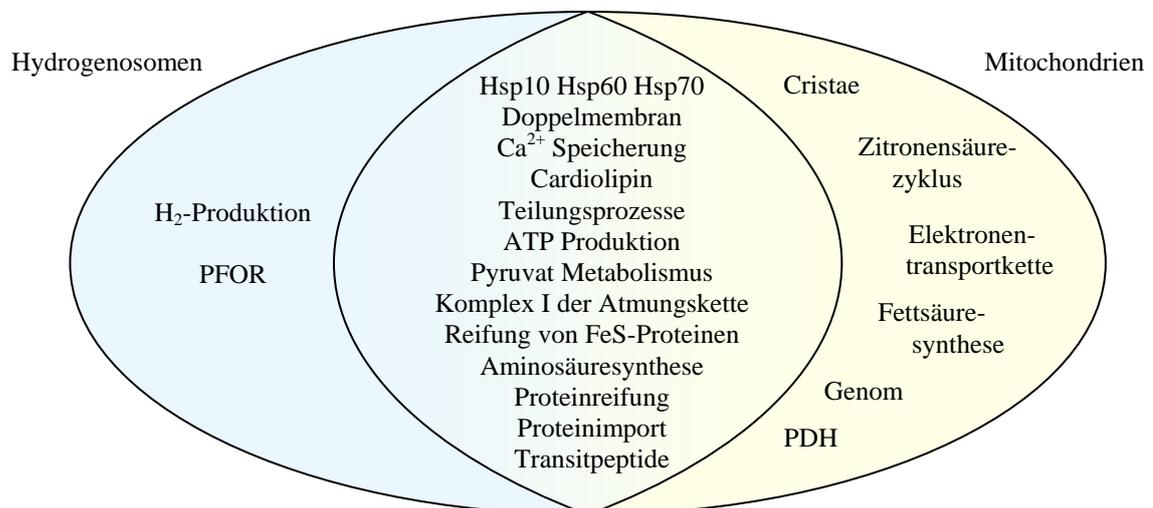


Abbildung 1.3: Gemeinsamkeiten (Mitte) und Unterschiede der Hydrogenosomen von *Trichomonas* (links) und Mitochondrien (rechts). Diese Abbildung fasst die auf den folgenden Seiten zitierten Daten zusammen.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass Hydrogenosomen, ebenso wie Mitochondrien, von einer doppelten Membran umgeben sind (Benchimol und de Souza 1983). In einigen Regionen wird zwischen den hydrogenosomalen Membranen, die jeweils ca. 6 nm dick sind, eine Vesikel-ähnliche Struktur im Intermembranraum ausgebildet. In diesen Strukturen wird wie bei Mitochondrien (Carafoli und Crompton 1978) Calcium gespeichert und somit die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration reguliert (Benchimol *et al.* 1982). Das Phospholipid Cardiolipin, das in bakteriellen Membranen und der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, konnte ebenfalls in Hydrogenosomen nachgewiesen werden (Cerkasovová *et al.* 1976; de Andrade Rosa *et al.* 2006). Im Gegensatz zur inneren Mitochondrienmembran bildet die innere Membran der Hydrogenosomen keine Cristae aus

(Honigberg *et al.* 1984). Die Teilungsprozesse der Hydrogenosomen durch Segmentierung und Abtrennung, wie sie bereits für Mitochondrien beschrieben wurden, konnten durch Transmissions-Elektronenmikroskopie gezeigt werden (Benchimol *et al.* 1996a, 1996b; Benchimol und Engelke 2003).

Eine weitere Gemeinsamkeit von Hydrogenosomen und Mitochondrien ist die Bildung von ATP (Müller 1993). In beiden Organellen ist Pyruvat das Substrat, allerdings werden in Mitochondrien durch oxidative Phosphorylierung pro mol Pyruvat 15 mol ATP, in Hydrogenosomen durch Substratketten-Phosphorylierung jedoch nur ein mol ATP gebildet. Weder die Reaktionen der oxidativen Phosphorylierung noch des Zitronensäurezyklus sind in Hydrogenosomen vorhanden (Müller 1993; Tielens *et al.* 2002; Embley und Martin 2006). Die Atmungskette ist ein Teilprozess der oxidativen Phosphorylierung und umfasst vier Proteinkomplexe, von denen drei in der inneren Mitochondrienmembran integriert sind (Komplex I, III und IV). Die katalytische Komponente des Komplex I (NADH-Dehydrogenase) ist ebenfalls in Hydrogenosomen vorhanden und wahrscheinlich an einem hydrogenosomal Oxidoreduktase-Komplex beteiligt (Dyall *et al.* 2004b).

Die Art der Proteinreifung und des -transports ist bei Mitochondrien und Hydrogenosomen ebenfalls sehr ähnlich: z.B. werden für die Lokalisierung ATP und ein N-terminales Transitpeptid benötigt, das nach dem Import abgespalten wird, und der Import wird durch das Protonophor CCCP gehemmt (Bradley *et al.* 1997).

Eine wichtige Aufgabe von Mitochondrien ist die Reifung von FeS-Proteinen durch Insertion der FeS-Zentren (Li *et al.* 1999; Lill und Kispal 2000; Lill und Mühlenhoff 2005). In Eukaryoten ist das mitochondrielle ISC-System (*iron-sulfur cluster*) an diesem Reifungsprozess beteiligt. Homologe Sequenzen zu einer Cystein-Desulfurase dieses Systems (IscS) liegen in der genomischen DNA von *T. vaginalis* und dem Diplomonaden *Giardia intestinalis* vor (Tachezy *et al.* 2001). Die Reifung von FeS-Proteinen (z.B. [2Fe-2S]-Ferrodoxin oder [Fe]-Hydrogenase) durch Insertion der FeS-Zentren findet in den Hydrogenosomen von *T. vaginalis* statt (Sutak *et al.* 2004). *G. intestinalis* besitzt ein rudimentäres Mitochondrium (Mitosom), das ebenfalls an der Reifung von FeS-Proteinen beteiligt ist (Tovar *et al.* 2003).

In *T. vaginalis* wurden vier an Aminosäuresynthesen beteiligte Proteine identifiziert (Mukherjee *et al.* 2006a, 2006b): zwei Glycin-spaltende Proteine (H-Proteine) und eine Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (L-Protein) des Glycin-Decarboxylase-Komplexes und eine Serin-Hydroxymethyl-Transferase (SHMT), die den reversiblen Umsatz von Serin und Tetrahydrofolat zu Glycin und Methylentetrahydrofolat katalysiert. In Eukaryoten gibt es von der SHMT sowohl cytosolische als auch mitochondrielle Isoformen. Das SHMT-Gen aus

T. vaginalis kodiert für eine mitochondrielle SHMT, inklusive einer N-terminalen Präsequenz. Die Lokalisierung dieser vier Enzyme in den Hydrogenosomen konnte durch Immunofluoreszenz-Analysen nachgewiesen werden. Allerdings wird für diese Synthesewege Tetrahydrofolat benötigt, das bisher in *T. vaginalis* nicht nachgewiesen werden konnte, so dass die Funktionalität der H- und L-Proteine sowie des SHMT geklärt werden muss (Carlton *et al.* 2007).

Weitere Unterschiede zwischen den Organellen sind die Produktion von molekularem Wasserstoff in den Hydrogenosomen (Müller 1993) und der Fettsäurestoffwechsel in Mitochondrien, der in Hydrogenosomen von Trichomonaden nicht vorhanden ist (Beach *et al.* 1990). Ferner besitzen Hydrogenosomen im Gegensatz zu Mitochondrien kein Genom (Dyall *et al.* 2004a; van der Giezen *et al.* 1997; Clemens und Johnson 2000) – mit einer Ausnahme: *Nyctotherus ovalis*, ein Parasit im Dickdarm von Termiten, besitzt ein rudimentäres hydrogenosomales Genom, das für Komponenten der mitochondriellen Elektronentransportkette kodiert (Akhmanova *et al.* 1998; Boxma *et al.* 2005).

Hinweise auf einen gemeinsamen eubakteriellen Vorfahren von Mitochondrien und Hydrogenosomen gibt es in allen Gruppen mit Hydrogenosomen: Trichomonaden (Lahti *et al.* 1994; Bui *et al.* 1996), Chytridiomyceten (van der Giezen *et al.* 1997; Brondijk *et al.* 1996), Ciliaten (Akhmanova *et al.* 1998) und Amöboflagellaten (Brul *et al.* 1994). Es wird vermutet, dass Hydrogenosomen mehrmals unabhängig voneinander entstanden sind, da Organismen unterschiedlicher Gruppen Hydrogenosomen besitzen, z.B. Ciliaten und Pilze, und zu diesen Gruppen Organismen mit Mitochondrien, Hydrogenosomen oder Mitosomen (ein rudimentäres Mitochondrium; Tovar *et al.* 1999) zählen (Embley und Martin 1998; Embley *et al.* 1995; Yarlett und Hackstein 2005). Ferner gibt es biochemische Unterschiede, wie z.B. die Identifikation einer Pyruvat:Format Lyase bei den Chytridiomyceten *Neocallimastix frontalis* und *Piromyces* sp. E2, die anstatt einer Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase den Pyruvat-Abbau in den Organellen katalysiert (Akhmanova *et al.* 1999; Boxma *et al.* 2004; Gelius-Dietrich und Henze 2004). So wird für die Hydrogenosomen der Ciliaten und Pilze aufgrund der Ultrastruktur, der molekularen Phylogenie, anhand biochemischer Studien und der Tatsache, dass zu diesen Gruppen sowohl aerobe als auch anaerobe Spezies gehören, angenommen, dass sie aus aeroben Mitochondrien in Anpassung an sauerstoffarme Lebensräume entstanden sind (Akhmanova *et al.* 1998; van Hoek *et al.* 2000; Hackstein *et al.* 1999; Voncken *et al.* 2002a; Yarlett und Hackstein 2005).

Die Entstehung der Organellen wird durch die Endosymbiontentheorie beschrieben, wobei als Endosymbiose die intrazelluläre Vereinigung zweier Organismen verstanden wird. Das

erste endosymbiontische Modell für die Entstehung der Chloroplasten wurde von Mereschkowsky (1905) beschrieben. Die derzeit diskutierten Modelle führen den Ursprung der Chloroplasten auf frei lebende Cyanobakterien und den Ursprung der Mitochondrien auf frei lebende α -Proteobakterien zurück (zusammengefasst in Martin *et al.* 2001). In der Wasserstoffhypothese von Martin und Müller (1998) wird der Vorfahr von Mitochondrien und Hydrogenosomen als frei lebendes, fakultativ anaerobes, H_2 - und CO_2 -produzierendes Eubakterium – wahrscheinlich ein α -Proteobakterium – diskutiert. Die Kompartimentierung des Energiestoffwechsels entstand durch die Aufnahme dieses Eubakteriums durch ein anaerobes, autotrophes, methanogenes Archaeobakterium (Abb. 1.4).

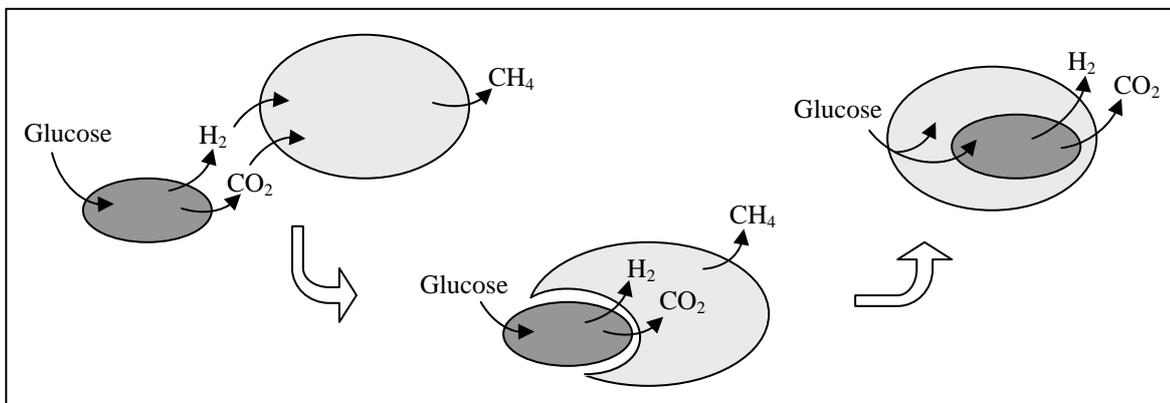


Abb. 1.4: Skizze der Wasserstoffhypothese verändert nach Martin und Müller (2007). Der Weg vom frei lebenden Proteobakterium zum mitochondriellen/hydrogenosomalen Endosymbionten. *Oben links*: ein fakultativ anaerobes α -Proteobakterium (dunkelgrau) produziert Wasserstoff, der von einem autotrophen methanogenen Eubakterium (hellgrau) aufgenommen wird; *Mitte*: Annäherung der Zellen erhöht den Oberflächenkontakt und ermöglicht den direkten Wasserstofftransfer zwischen den Spezies; *oben rechts*: nach vollständiger Aufnahme produziert das Proteobakterium weiterhin Wasserstoff und nutzt die vom Wirt zur Verfügung gestellten reduzierten organischen Verbindungen. Unter aeroben Bedingungen könnte sich aus diesem „Ur-Organell“ das Mitochondrium bzw. unter anaeroben Bedingungen das Hydrogenosom entwickelt haben.

Der Symbiont nutzt organische Substanzen für seine Energiegewinnung, bei der molekularer Wasserstoff produziert wird. Der Wirt benötigt diesen molekularen Wasserstoff für seine CO_2 -Fixierung. Durch sich verändernde Umweltbedingungen von CO_2 - und H_2 -reicher zu H_2 -armer Umgebung wurde der Wirt abhängig von dem H_2 -produzierenden Symbionten. Dieser Selektionsdruck stabilisierte die Assoziation von Symbiont und Wirt. Den größtmöglichen Nutzen erhält der Wirt durch einen maximalen Oberflächenkontakt zum Eubakterium, was durch einen Einschluss der Zelle ermöglicht wird. Dazu müssen zuvor u.a. Gene für die Importer organischer Substrate durch lateralen Gentransfer von dem Symbionten auf das Archaeobakterium übertragen werden. Dadurch ist der Wirt nicht mehr auf den Wasserstoff des Symbionten angewiesen, denn er ist nun selbst heterotroph: die Glycolyse findet bis zur Bildung des Pyruvats im Cytosol (im Wirt) statt, Pyruvat wird im Symbionten fermentiert,

und Wasserstoff ist ein Abfallprodukt. Aus diesem „Ur-Organell“ haben sich Mitochondrien und Hydrogenosomen entwickelt (Martin und Müller 2007).

Im Gegensatz zu den Funktionen und Stoffwechselwegen der Mitochondrien ist über Hydrogenosomen erst wenig bekannt. Hydrogenosomale und mitochondrielle Proteine können über umfangreiche Proteomanalysen der Organellen miteinander verglichen und somit weitere Aussagen über Funktion und Evolution der Organellen getroffen werden.

1.5 Proteomanalyse

Das Proteom (von engl. *protein complement expressed by the genome*) umfasst die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle oder einem Organell zu einem bestimmten Zeitpunkt.

Das mitochondrielle Proteom der Hefe mit vermutlich ~700 Proteinen wurde bereits z.B. durch Kumar *et al.* (2002), Sickmann *et al.* (2003) und Prokisch *et al.* (2004) untersucht. Dennoch sind wahrscheinlich 10 % der mitochondriellen Proteine noch unbekannt (Prokisch *et al.* 2004). Mitochondrien-Genome sind stark reduziert, z.B. kodiert das mitochondrielle Genom der Hefe nur 28 Proteine (Richly *et al.* 2003), so dass der Großteil der mitochondriellen Proteine im Kerngenom kodiert wird. In Hydrogenosomen (Müller 1993; Palmer 1997) und Mitosomen (Leon-Avila und Tovar 2004) sind keine Organellengenome vorhanden (außer in *Nyctotherus*; Akhmanova *et al.* 1998), so dass alle in diesen Organellen lokalisierten Proteine im Kerngenom kodiert und in die Organellen importiert werden.

Analysen von mitochondriellen Proteomen haben ergeben, dass Mitochondrien variabel in Funktion und Größe sind – das Spektrum reicht von 180 mitochondriellen Proteinen bei *Plasmodium falciparum* bis zu 4162 Proteinen in menschlichen Mitochondrien (Richly *et al.* 2003). Ferner sind z.B. für *Saccharomyces cerevisiae* 17,5-22 % der mitochondriellen Proteine spezifisch für diesen Organismus (Karlberg *et al.* 2000; Marcotte *et al.* 2000).

Neben Enzymen, die sowohl in Mitochondrien als auch in Hydrogenosomen lokalisiert sind, wie z.B. die NADH-Dehydrogenase, gibt es ebenfalls Enzyme, die spezifisch für Hydrogenosomen bzw. Mitochondrien sind, wie z.B. die Hydrogenase (bei Hydrogenosomen) und die Pyruvat-Dehydrogenase (bei Mitochondrien). Wahrscheinlich gibt es auch im Vergleich hydrogenosomaler Proteome zueinander eine hohe Diversität. Ein bekannter signifikanter Unterschied zwischen den Hydrogenosomen der Trichomonaden und der Chytridiomyceten ist z.B. der Abbau von Pyruvat: in Trichomonaden wird Pyruvat über die PFOR zu Acetat und CO₂ decarboxyliert, während in Chytridiomyceten (*Neocallimastix frontalis*,

Piromyces sp. E2) die Pyruvat-Format-Lyase (PFL) Pyruvat zu Acetyl-CoA und Format umsetzt (Akhmanova *et al.* 1999; Boxma *et al.* 2004; Gelius-Dietrich und Henze 2004).

Eine Proteomanalyse von Hydrogenosomen könnte Aufschluss über weitere Funktionen des Organells und Gemeinsamkeiten und Unterschiede mit Mitochondrien, oder Hydrogenosomen anderer Organismen geben. Solche Analysen können über verschiedene Ansätze durchgeführt werden, z.B. durch mRNA-Expressionsanalysen, DNA-Mikroarray Analysen, Lokalisierungs-Studien, Protein-Protein Interaktions-Studien oder Massenspektrometrie der Organellen. Bisher wurden Daten zu hydrogenosomalen Proteinen nur aus Studien zusammengetragen, die auf einzelne Proteine oder spezifische Stoffwechselwege fokussiert waren.

Bei Trichomonaden und Chytridiomyceten sind axenische Kulturen und die Gewinnung von ausreichend Zellmaterial für Zellfraktionierungen und Proteomanalysen möglich. Ferner wurde die Sequenzierung des Genoms von *Trichomonas vaginalis* abgeschlossen, was die Identifizierung sequenzierter Peptide vereinfacht. Das 160 Mb große Genom von *T. vaginalis*, das aus sechs Chromosomen besteht, ist in der TIGR Genom-Datenbank veröffentlicht (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tvg/>). Es ist das bisher größte bekannte Genom eines parasitischen Protisten (Carlton *et al.* 2007).

Die Translokation von hydrogenosomalen Proteinen in die Organellen weist Ähnlichkeit mit dem mitochondriellen Mechanismus auf. Ein *in vitro* Import-Aktivitätstest zeigte, dass für den Import von Ferredoxin eine N-terminale Transitsequenz von acht Aminosäuren benötigt wird (Bradley *et al.* 1997). Diese Transitsequenz ähnelt den N-terminalen Sequenzen weiterer hydrogenosomaler Proteine, z.B. β -Succinyl-CoA-Synthase (SCS) und decarboxylierende Malat-Dehydrogenase. Die hydrogenosomalen Transitsequenzen weisen Ähnlichkeiten zu mitochondriellen Transitsequenzen auf, z.B. in der Aminosäuren-Zusammensetzung. Anhand der N-terminalen Aminosäuren eines Proteins kann eine mögliche Lokalisierung dieses Proteins in das Organell vorhergesagt werden. Das Genom wurde nach Präsequenzen mit den Aminosäure-Motiven ML(S/T/A)X_(1..15)R(N/F/E/XF), MSLX_(1..15)R(N/F/XF) oder MLR(S/N)F durchsucht (Carlton *et al.* 2007). Es wurden 138 Gene mit möglichen Transitsequenzen identifiziert, was z.B. im Vergleich zu ~700 mitochondriellen Proteinen der Hefe sehr wenig ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch Proteine ohne erkennbare Transitsequenzen in das Organell importiert werden.

Neben solchen bioinformatischen Vorraussagen sind experimentelle Nachweise der intrazellulären Lokalisierung von Proteinen nötig. Diese sind jedoch meist auf abundante Proteine beschränkt, da z.B. Proteine, die nur in sehr geringen Mengen exprimiert werden, durch zweidimensionale Gelelektrophoresen nicht detektiert werden können. Es sind somit

umfangreiche Proteomanalysen notwendig, die bioinformatische, biochemische und molekularbiologische Methoden kombinieren, um einen vollständigen Überblick über das hydrogenosomale Proteom eines Organismus bzw. Organells zu erhalten.

1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

Hydrogenosomen sind in den 70er Jahren von Lindmark und Müller entdeckt worden, doch sind bis heute die Stoffwechsel-Prozesse in diesen mit Mitochondrien verwandten Organellen nicht vollständig geklärt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das hydrogenosomale Proteom des mikroaerophilen, parasitischen Protisten *Trichomonas vaginalis* zu charakterisieren. Dazu sollten Hydrogenosomen isoliert und die Reinheit der hydrogenosomalen Fraktion anhand Aktivitätstests von cytosolischen, lysosomalen und hydrogenosomalen Enzymen überprüft werden. Die Fraktionierung sollte optimiert und die hydrogenosomalen Proteine in zweidimensionalen Elektrophoresen aufgetrennt werden. Über Isolation der Peptide mit anschließender massenspektrometrischer Sequenzierung sollten die Proteine durch Vergleich mit der TIGR Genom-Datenbank von *T. vaginalis* identifiziert werden.

Durch Vergleiche der hydrogenosomalen Proteine mit homologen eukaryotischen und bakteriellen Sequenzen sollten Rückschlüsse auf Verwandtschaftsverhältnisse dieser Organellen mit Mitochondrien gezogen werden. Ferner sollte geklärt werden, welche Stoffwechsel- und Synthesewege, z.B. Energie-Metabolismus, Bildung von FeS-Proteinen, Aminosäure-Synthesen und Sauerstoff-Entgiftung, in den Hydrogenosomen vorliegen.

Die Herkunft spezifisch hydrogenosomaler Proteine, die bisher aus Mitochondrien nicht bekannt waren, sollte durch phylogenetische Analysen geklärt werden. Darüber hinaus sollten die hydrogenosomalen Proteine aus *T. vaginalis* mit Proteinen aus Hydrogenosomen, z.B. aus dem Chytridiomyceten *Neocallimastix frontalis*, verglichen und dadurch ggf. Unterschiede zwischen hydrogenosomalen Proteomen diskutiert werden.

Proteine, deren Aufgabe in den Organellen unklar ist, sollten heterolog in *E. coli* exprimiert und biochemisch charakterisiert werden. Die Transformation von *T. vaginalis* mit markierten Proteinen zur Überprüfung der intrazellulären Lokalisierung war ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

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

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

2.2 Reagenzsätze

CycleReader TM Auto DNA Sequencing Kit	Fermentas
Ettan 2-D Clean-Up Kit	GE Healthcare
Nucleospin Plasmid Kit Mini	Macherey-Nagel
pGEM-T Easy Vector System	Promega
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
SMART PCR cDNA Synthesis Kit	Clontech
Total RNA Isolation NucleoSpin RNA II Kit	Macherey-Nagel

2.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIAP)	New England Biolabs
DNase I	Roche
Ferredoxin-NADP ⁺ -Reduktase von <i>Spinacia oleracea</i>	Sigma
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Typ VII von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sigma
Glucose-Oxidase von <i>Aspergillus Niger</i>	Calbiochem
Klenow Fragment	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, New England Biolabs
RNase A	Serva
Rubredoxin von <i>Clostridium pasteurianum</i>	Sigma
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Eppendorf
Thermolysin	Fluka
Trypsin	Promega

2.4 Organismen

2.4.1 *Trichomonas vaginalis* und *Tritrichomonas foetus*

In der vorliegenden Arbeit wurden die *Trichomonas vaginalis* Stämme Donne C1:NIH (ATCC 3001) und T1 (J.-H. Tai, Institute of Biomedical Sciences, Taipei, Taiwan) und der *Tritrichomonas foetus* Stamm Kvc-1 (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Prof. J. Tachezy, Karlsuniversität, Prag, Tschechische Republik) verwendet.

2.4.2 Bakterienstämme

Es wurden folgende *Escherichia coli* Stämme verwendet:

XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ\Delta M15 Tn10 (Tetr)]$	Stratagene
BL21 (DE3)	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm (DE3)$	Invitrogen

2.5 Vektoren

Für die Klonierung von DNA wurden pBluescript SK+ (Stratagene) und pGEM-T Easy (Promega) verwendet. Als Expressionsvektoren wurden pET-21b, pET-32a (Novagen) und pTrcHis2A (Invitrogen) eingesetzt. Für die Transformation von *Trichomonas vaginalis* wurde der Vektor pTagvag2 (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Prof. J. Tachezy, Prag, Tschechische Republik) verwendet (Hrdy *et al.* 2004).

2.6 Oligonukleotide

Die nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert. Für die Sequenzierung von DNA-Fragmenten in den Vektoren pBluescript SK+ und pGEM-T Easy wurden folgende Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide verwendet:

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

Folgende Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide wurden für die Sequenzierung von DNA-Fragmenten in dem Vektor pET-32a eingesetzt:

T7proext	5'-IRD700-CGC GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG-3'	$T_m = 61,9\text{ °C}$
T7term	5'-IRD800-ATG CTA GTT ATT GCT CAG CGG-3'	$T_m = 57,9\text{ °C}$

Für die Klonierung der Gene der Maturasen *hydG*, *hydE* und *hydF*, Rubrerythrin (*rbr*) und der Thiolperoxidase (*tpx*) in den Vektor pTagvag2 wurden folgende Oligonukleotidpaare mit Restriktionsschnittstellen für eine gerichtete Klonierung gewählt:

HydG for1	5'-CGC ACG <u>CAT ATG</u> TTG GCT TCA TTA AGT CGC TCC-3'	$T_m = 70,7\text{ °C}$
	<u>NdeI</u>	
HydG rev1	5'-CGA GCA <u>GGA TCC</u> GAA GTA AAG ATC ACG CTT TCC-3'	$T_m = 70,7\text{ °C}$
	<u>BamHI</u>	
HydE for2	5'-CGC ACG <u>CAT ATG</u> TCA CAC GAT CAC ATC GTG AGG-3'	$T_m = 71,9\text{ °C}$
	<u>NdeI</u>	
HydE rev2	5'-CGT GCT <u>GGA TCC</u> AAC GGA CTT ACC TTC CTT CAA AGC-3'	$T_m = 72,9\text{ °C}$
	<u>BamHI</u>	
HydF for1	5'-CGC ACT <u>CAT ATG</u> CTC ACT TCA ATT GGG CGC-3'	$T_m = 69,5\text{ °C}$
	<u>NdeI</u>	
HydF rev1	5'-CGA GTC <u>GGA TCC</u> TTT CCA TGG CTT GAG AAC CCT CTC G-3'	$T_m = 75,0\text{ °C}$
	<u>BamHI</u>	

Rubr forS1	5'-CTG ACG <u>CAT ATG</u> TCT CTT AAA GGC ACC CAG AC-3'	
	<i>NdeI</i>	$T_m = 69,5\text{ °C}$
Rubr revS1	5'-GA CGT <u>GGA TCC</u> CTC GAG GAC TTC CTT GAT TTC G-3'	
	<i>BamHI</i>	$T_m = 71,9\text{ °C}$
Tpx forS1	5'-CTG ACG <u>CAT ATG</u> ATC AAG ACA GCT TTC CAG GGC ACA CC-3'	
	<i>NdeI</i>	$T_m = 73,8\text{ °C}$
Tpx revS1	5'-GA CGT <u>GGA TCC</u> TTC GTT CTT AAT AGC AGC GAT GGC AGC-3'	
	<i>BamHI</i>	$T_m = 73,8\text{ °C}$

Folgende degenerierte Oligonukleotide wurden für die Amplifikation der Rubrerythrin Sequenzen verwendet:

RbrT

Rub 18A_neu	5'-GGT GGT <u>GGA TCC</u> GTC TCT TAA AGG CAC CCA GAC AG-3'	
	<i>BamHI</i>	$T_m = 74,1\text{ °C}$
Rub 19A	5'-GGT GGT <u>AAG CTT</u> CTC GAG GAC TTC CTT GAT TTC G-3'	
	<i>HindIII</i>	$T_m = 70,7\text{ °C}$
Rub 19A_neu	5'-GGT GGT <u>AAG CTT</u> TCA CTC GAG GAC TTC CTT GAT TTC-3'	
	<i>HindIII</i>	$T_m = 71,7\text{ °C}$

RbrR

Rub 18A	5'-GGT GGT <u>GGA TCC</u> TCT CTT AAA GGC ACC CAG ACA G-3'	
	<i>BamHI</i>	$T_m = 73,1\text{ °C}$
Rub 19A_neu	5'-GGT GGT <u>AAG CTT</u> TCA CTC GAG GAC TTC CTT GAT TTC-3'	
	<i>HindIII</i>	$T_m = 71,7\text{ °C}$

RbrK

Rub 18_neu	5'-GGT GGT <u>GGA TCC</u> GCT TCA CTT TGC TTT CGT TG-3'	
	<i>BamHI</i>	$T_m = 70,8\text{ °C}$
Rub 19	5'-GGT GGT <u>AAG CTT</u> AAT AGT TTC CTT AAT TTC GAA G-3'	
	<i>HindIII</i>	$T_m = 64,7\text{ °C}$
Rub 19_neu	5'-GGT GGT <u>AAG CTT</u> TCA AAT AGT TTC CTT AAT TTC GAA G-3'	
	<i>HindIII</i>	$T_m = 66,1\text{ °C}$

RbrB

Rub_92945_ B_for	5'-GGT GGT <u>GGA TCC</u> G TCA ATT CCA TTC AAG GGA AGC CAG-3'	
	<i>BamHI</i>	$T_m = 78,9\text{ °C}$
Rub_92945_ rev	5'-GGT GGT <u>GGT ACC</u> AC TTC TAA AAC TTC TCT GAT TTG TTG G-3'	
	<i>KpnI</i>	$T_m = 75,7\text{ °C}$
Rub_92945_ rev_STOP	5'-GGT GGT <u>GGT ACC</u> AC TTA TTC TAA AAC TTC TCT GAT TTG TTGG-3'	
	<i>KpnI</i>	$T_m = 76,0\text{ °C}$

RbrTK

RbrTK for1	5'- GGT GGT <u>GGA TCC</u> G CTT GCT TGC GCT TTC GCC G -3'	
	<i>BamHI</i>	$T_m = 77,0\text{ °C}$
Rub 19A	5'-GGT GGT <u>AAG CTT</u> CTC GAG GAC TTC CTT GAT TTC G-3'	
	<i>HindIII</i>	$T_m = 70,7\text{ °C}$

<u>EntRbr</u>		
EntRub for1	5'-GGT GGT <u>GGA TCC</u> G GCA ACT CTC ATT AAT CTT TG-3'	$T_m = 69,5\text{ °C}$
	<i>Bam</i> HI	
EntRub rev1	5'-GGT GGT <u>AAG CTT</u> AAT AGA AAC TTG AAC TCT G-3'	$T_m = 64,2\text{ °C}$
	<i>Hind</i> III	
EntRub revSTOP	5'-GGT GGT <u>AAG CTT</u> TTA AAT AGA AAC TTG AAC TC-3'	$T_m = 63,1\text{ °C}$
	<i>Hind</i> III	

Für Hybridisierungssonden wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Actin for1	5'-GCT GAA GAA GAC GTT CAG ACA CTC G-3'	$T_m = 64,6\text{ °C}$
Actin rev1	5'-GAA GCA CTT ACG GTG AAC GAT GG-3'	$T_m = 62,4\text{ °C}$
SOD GSP-1	5'-TAG CAC CAG CCG GAG C-3'	$T_m = 56,9\text{ °C}$
SOD GSP-2	5'-TTC GAA GTT AGA AGC AAG GAC-3'	$T_m = 55,9\text{ °C}$

2.7 Arbeiten mit *Trichomonas vaginalis* und *Tritrichomonas foetus*

2.7.1 Anzucht von *Trichomonas vaginalis* und *Tritrichomonas foetus*

Die Erhaltung von *T. vaginalis* und *T. foetus* Kulturen erfolgte in 15 ml Kulturröhrchen in 12 ml TYM-Medium (Clark und Diamond 2002), pH 6,2 (*T. vaginalis*) bzw. pH 7,2 (*T. foetus*) mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem Pferdeserum, 7 ‰ (w/v) Eisenammoniumsulfat und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin [10.000 U_{PEN}/ml bzw. 10.000 µg_{STREP}/ml, ICN] bei 37 °C. Von einer zwei Tage alten Kultur wurden 100 µl in frisches Medium übertragen und wiederum 2 Tage bei 37 °C inkubiert. Für die Anzucht in größerem Maßstab wurden zu 50 ml TYM-Medium 5 ml einer 12 ml-Vorkultur gegeben. Nach Wachstum über Nacht bei 37 °C konnte diese Kultur für Inokulationen größerer Kulturen verwendet werden.

Für Inkubation unter oxidativem Stress wurden 50-500 ml Kulturen nach 24 Stunden Wachstum bei 37 °C für 3 Stunden mit 5 % Sauerstoff bei Raumtemperatur begast, bzw. nach Zugabe von H₂O₂ (1 mM Endkonzentration) weitere 3 Stunden bei 37 °C inkubiert.

2.7.2 Dauerkulturen von *Trichomonas vaginalis* und *Tritrichomonas foetus*

Für *T. vaginalis* bzw. *T. foetus* Dauerkulturen wurden zu 12 ml TYM-Medium je 1 ml Kultur (siehe 2.7.1) gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. In sterile 2 ml Cryo-Röhrchen (Roth) wurden 0,5 ml 37 °C warmes TYM-Medium mit 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid

(DMSO, Roth) vorgelegt und jeweils 0,5 ml der 12 ml-Kultur zugegeben. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.7.3 Transformation von *Trichomonas vaginalis*

Die Sequenzen für HydG, HydE, HydF, Rbr und Tpx wurden mit homologen Oligonukleotiden (siehe 2.6) aus genomischer DNA amplifiziert und in den Vektor pTagvag2 zwischen die α -SCS 5'-UTR (untranslatierte Region) und einen 3'-(HA)₂-Anhang ligiert (Hrdy *et al.* 2004). Für die Elektroporation mit den erhaltenen Konstrukten pTvhydg, pTvhyde, pTvhydf, pTvrbr und pTvtpx wurde eine 50 ml *T. vaginalis* T1 Kultur für 15 min bei 1000 x g zentrifugiert, das Pellet in 0,5 ml TYM-Medium pro Gramm Zellen resuspendiert und viermal durch eine 23G Nadel gezogen. Die Elektroporation erfolgte mit 300 μ l Zellsuspension und 50 μ g Plasmid in einer 0,4 cm Küvette mit 350 V und 975 μ F. Dabei sollte die Zeitkonstante einen Wert von 165-200 ms erreichen. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort in 50 ml warmes TYM-Medium mit 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin [10.000 U_{PEN}/ml bzw. 10.000 μ g_{STREP}/ml] gegeben. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde zur Selektion der transformierten Zellen 100 μ g/ml G418 (Geneticindisulfat, Roth) zugegeben und die Kultur über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag, bzw. sobald die Kultur angewachsen war, wurden die oberen 45 ml abgenommen und für 15 min bei 1000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem TYM-Medium mit Penicillin/Streptomycin und G418 resuspendiert und bei 37 °C inkubiert. Die weitere Anzucht der transformierten Zellen erfolgte wie unter 2.7.1 beschrieben mit Zugabe von G418.

2.7.4 Isolierung von Hydrogenosomen (modifiziert nach Bradley *et al.* 1997)

Hydrogenosomen wurden aus einem Kulturvolumen von 3 Litern isoliert. Die *T. vaginalis* Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000 x g und 4 °C für 10 min pelletiert und zweimal mit SMB (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS pH 7,2, 10 mM β -Mercaptoethanol) gewaschen. Das Pellet wurde in 30 ml SMDI (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS pH 7,2, 10 mM DTT, 50 μ g/ml TLCK, 10 μ g/ml Leupeptin) resuspendiert und mit Glasperlen (\varnothing 400-600 nm) auf Eis 25 min gemörsert. Durch 10 minütige Zentrifugation bei 755 x g und 4 °C wurden die Zelltrümmer, nicht lysierte Zellen und die Glasperlen von dem Cytosol und den Organellen abgetrennt. Der Überstand dieser Zentrifugation, im Folgenden als Gesamtzellextrakt bezeichnet, wurde mit SMDI auf 115 ml verdünnt. Für die isotonische

Dichtegradientenzentrifugation wurde eine Percoll-Lösung (90 % (v/v) Percoll, 10 % (v/v) isotonische Saccharose (2,5 M Saccharose, 100 mM MOPS/KOH pH 7,2), 10 mM DTT, 50 µg/ml TLCK, 10 µg/ml Leupeptin) angesetzt, 1:1 mit dem verdünnten Gesamtzellextrakt gemischt und luftblasenfrei in die Ultrazentrifugen-Gefäße gefüllt. Die Zentrifugation erfolgte in dem Vertikalrotor VTi50 (Beckmann) bei 30000 rpm für 45 min und 4 °C ohne Bremse (L8-70M Ultrazentrifuge, Beckmann). Nach der Zentrifugation wurde sowohl die lysosomale als auch die hydrogenosomale Bande mit Pasteurpipetten abgenommen. Während die Lysosomen nicht weiterbehandelt wurden, wurde die Hydrogenosomen-Fraktion 1:10 mit SMDI (1/10 Leupeptin und TLCK) verdünnt und für 15 min bei 3000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml SMDI resuspendiert und für 10 min bei 7500 x g und 4 °C zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde in 500 µl SMDI aufgenommen.

Für zwei aufeinander folgende Percoll-Gradienten wurde die Hydrogenosomen-Fraktion des ersten Gradienten mit der o.g. 90 % Percoll-Lösung auf 45 % Percoll eingestellt und die Ultrazentrifugation unter gleichen Bedingungen wiederholt. Die erhaltene Hydrogenosomen-Fraktion wurde wie bereits beschrieben mit SMDI gewaschen.

2.7.5 Extraktion hydrogenosomaler Membranproteine

Hydrogenosomale Membranproteine wurden nach der Methode von Fujiki *et al.* (1982) durch eine Natriumcarbonat-Waschung isoliert. Nach der Ultrazentrifugation bei 45000 rpm und 4 °C in dem Rotor 70Ti (L8-70M Ultrazentrifuge, Beckmann) wurde das Pellet zweimal mit eiskaltem bidest. H₂O gewaschen und bei -80 °C gelagert.

2.7.6 Elektronenmikroskopie

Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) wurden 5 mg Hydrogenosomen nach zwei Percoll-Gradienten (siehe 2.7.4) in Fixativ (5 % (v/v) Glutaraldehyd in 0,1 M Natrium-Cacodylat-Puffer pH 7,3) resuspendiert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Einbettung, Dünnschnitte und TEM-Aufnahmen wurden von Frau M. Nissen und Herrn G. Gelius-Dietrich am Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie wie folgt durchgeführt: Die Probe wurde fünfmal in 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer (pH 7,3) je 10 min gewaschen und das Pellet in 3,5 % (w/v) Low Melting Agar eingebettet. Die Osmierung erfolgte in 2 % (w/v) Osmiumtetroxid (OsO₄) in 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer (pH 7,3), 0,8 % (w/v) Kaliumhexacyanoferrat III für 2 Stunden. Die Probe wurde in 0,1 M Na-Cacodylat-

Puffer (pH 7,3) wie oben beschrieben gewaschen und in folgender Acetonreihe entwässert: jeweils 15 min in 50 % (v/v), 70 % (v/v), 80 % (v/v), 90 % (v/v), 96 % (v/v) und dreimal 15 min in 100 % Aceton (absolutiert). Die Infiltration erfolgte durch vorsichtiges Rühren in 49 % (v/v) Araldit[®] CY 212 (Serva), 49 % (v/v) Araldit[®] Härter HY 964 mit 2 % (v/v) Araldit[®] Beschleuniger DY 964. Durch Inkubation in Araldit:Aceton (1:3) für 2 h, Araldit:Aceton (1:1) für 2 h, Araldit:Aceton (3:1) über Nacht und reines Araldit für 3 h wurde das Aceton schrittweise durch Araldit ersetzt. Die Endeinbettung erfolgte in reinem Araldit bei 45 °C über Nacht und anschließender Inkubation bei 70 °C für 3 Tage. Ultradünnschnitte von 70-80 nm wurden am Mikrotom Ultracut E (Reichert-Jung) angefertigt und mit Uranylacetat (Stempak und Ward 1964; Strugger 1956) und Bleicitrat (Reynolds 1963) doppelt kontrastiert. Dazu wurden die Proben in 50 % (v/v) Ethanol gewaschen, 20 min in 5 % (v/v) Uranylacetat im Dunkeln inkubiert, erneut zweimal mit 50 % (v/v) Ethanol und abschließend mit dest. H₂O gewaschen. Nach anschließender Bleicitratkontrastierung wurden die Aufnahmen am Transmissions-Elektronenmikroskop CEM 902 (Zeiss) erstellt.

2.7.7 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden *Trichomonas*-Kulturen verwendet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. In eine luftdichte Kammer zwischen zwei Objektträgern wurden 1-2 ml Kultur durch eine Gummidichtung eingefüllt und für 15 min im 37 °C-Schrank inkubiert. In dieser Zeit hafteten die Zellen an dem silanisierten Objektträger. Die Kultur wurde abgegossen und der Objektträger trocknen gelassen, bis die Oberfläche nur noch leicht feucht war. Die Zellen wurden 5 min bei -20 °C in Methanol fixiert und anschließend sofort für 5 min in Aceton (-20 °C) überführt. Der Objektträger wurde getrocknet und bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert.

Für die Antikörper-Behandlung wurde das Präparat in einer feuchten Kammer (Pipettendose mit in PBS getränktem Whatmanpapier, abgedeckt mit Parafilm) für 1 h mit 1 ml 0,25 % (w/v) Gelatine und 0,25 % (w/v) BSA in PBS (8 % (w/v) NaCl, 0,2 % (w/v) KCl, 1,44 % (w/v) Na₂HPO₄, 0,24 % (w/v) KH₂PO₄, pH 7,4) überschichtet. Die Immunreaktion mit dem primären Antikörper erfolgte mit 2 µl Maus-Anti-HA monoklonalem Antikörper (Sigma) bzw. mit Kaninchen-Anti-Ferredoxin oder Kaninchen-Anti-Malatenzym polyklonalem Antikörper (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. P.J. Johnson, Los Angeles, USA bzw. Dr. J. Tachezy, Prag, Tschechische Republik) in 1 ml PBS für 1 h in der feuchten Kammer. Anschließend wurde der Objektträger 3 x 5 min in

einer Petrischale mit PBS unter leichtem Schütteln gewaschen. Das Präparat wurde 1 h in der feuchten Kammer mit 2 µl des 1:1000 verdünnten sekundären Antikörpers (Alexa Fluor-488 Esel-Anti-Maus- und Alexa Fluor-594 Esel-Anti-Kaninchen-Antikörper, Invitrogen-Molecular Probes) in 1 ml PBS inkubiert und wie oben beschrieben gewaschen. Der Objektträger wurde getrocknet und für die Färbung der Zellkerne ein Tropfen Vectashield mit DAPI (Vector Laboratories) auf die Probe gegeben. Ein Deckgläschen wurde auf den Tropfen gelegt und mit Nagellack an den Rändern fixiert. Das Präparat wurde dunkel bei 4 °C gelagert. Die Aufnahmen wurden mit der Software *Analysis 3.0* der Firma Sis bearbeitet.

2.8 Arbeiten mit *Escherichia coli*

Die Anzucht von *Escherichia coli* Kulturen in Luria-Bertani Medium (LB), die Herstellung von CaCl₂-kompetenten *Escherichia coli* Zellen und die Hitzeschock-Transformation dieser kompetenten Zellen mit Plasmid-DNA wurden nach Standardprotokollen nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

2.8.1 Heterologe Expression in *Escherichia coli*

Transformierte *E. coli* Kulturen wurden in Abhängigkeit von der Effizienz der Expressionen unter verschiedenen Bedingungen angezogen: Die Inkubationstemperatur nach der Induktion mit 0,1-1 mM IPTG variierte zwischen 30 °C für 3 h und 16 °C über Nacht.

2.8.2 Aufschluss von Expressionskulturen und Reinigung rekombinanter Enzyme

Für einen nativen Aufschluss einer Expressionskultur wurden die *E. coli* Zellen 10 min bei 4000 rpm und 4 °C pelletiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus) und das Pellet in Lysispuffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis durch Ultraschall (Sonolus HD60, Bandelin) in 6 Intervallen von je 10 s bei 50 % Intensität und je 10 s Pause. Die Proben wurden mit RNase A (10 µg/µl) und DNase I (5 µg/µl) versetzt und die Zelltrümmer durch 30 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C (Biofuge Fresco, Heraeus) abgetrennt. Der Überstand wurde für Aktivitätsbestimmungen, Reinigung der rekombinanten Enzyme und Analysen durch SDS-PAGE eingesetzt. Das Pellet wurde nur für gelelektrophoretische Analysen verwendet.

Die Reinigung rekombinanter Enzyme mit His-Anhang wurde mittels Ni-NTA Agarose (Qiagen) unter nativen Bedingungen nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.9 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Die folgenden allgemeinen Arbeiten mit Nukleinsäuren erfolgten nach Standardmethoden nach Sambrook *et al.* (1989):

- Phenol-, Ethanol- und Isopropanolextraktion von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese
- Restriktion von DNA
- Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren mit Hilfe der T4-DNA-Ligase
- Kontrolle rekombinanter Plasmid-DNA durch Blau-Weiß-Selektion

2.9.1 Isolierung von genomischer DNA aus *Trichomonas vaginalis*

Die Isolation genomischer DNA aus *Trichomonas vaginalis* erfolgte mit der DEPC-Triton X-100 Methode nach Riley und Krieger (1992). Aus einer 500 ml *Trichomonas* Kultur (siehe 2.7.1) wurden 150 µg genomische DNA isoliert, in 50 µl TE aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.9.2 Amplifikation über Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von spezifischen DNA Sequenzen erfolgte mit 100 ng genomischer oder Plasmid-DNA in 25 oder 50 µl PCR-Ansätzen mit 1 x *Taq*- bzw. *Pfu*-Puffer, je 0,2 mM dNTP, je 2 µM Oligonukleotid und 1 U *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase. In einem Thermocycler (MWG oder Eppendorf) wurden nach einer anfänglichen Denaturierung von 5 min bei 95 °C 30 Zyklen von 30 s bei 95 °C, 30 s bei 45-70 °C (abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide) und 1-2 min bei 72 °C durchgeführt. Nach einer abschließenden Elongationszeit von 5 min bei 72 °C wurde die Reaktion beendet und auf einem 1 %igen Agarosegel kontrolliert.

2.9.3 Klonierung von PCR-Fragmenten

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten wurden diese in einem Agarosegel aufgetrennt, die entsprechende Bande mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) aus dem Gel eluiert und die Fragmente in den Vektor pGEM-T Easy (Promega) nach Herstellerangaben ligiert.

2.9.4 Isolation von Plasmid-DNA

Für eine Kontrolle der rekombinanten Plasmid-DNA wurden Plasmid-Präparationen mittels alkalischer Lyse durchgeführt. Dazu wurden pelletierte *E. coli* Zellen aus 1,5-3 ml Kultur in 200 µl Lösung A (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM Glucose) resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl Lösung B (200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS) denaturiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lösung C (3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure). Die renaturierte Plasmid-DNA lag nach 30 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm (Biofuge Fresco, Heraeus) im Überstand vor und wurde mit Isopropanol gefällt.

2.9.5 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Didesoxymethode nach Sanger *et al.* (1977) als Laserfluoreszenz-Sequenzierung mit Hilfe eines *DNA Sequencer Long ReadIR 4200* (Licor). Für die Sequenzierung wurden 1-2 µg Plasmid DNA in einem Volumen von 12 µl HPLC-gereinigtem H₂O eingesetzt. Die Sequenzierreaktionen wurden mit dem *CycleReaderTM Auto DNA Sequencing Kit* (Fermentas) nach Herstellerangaben mit den IRDye-700 und IRDye-800 Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden (je 1 pmol/Reaktion) angesetzt. Die PCR-Reaktion erfolgte mit einer Annealing-Temperatur von 61,5 °C in einem Thermocycler (MWG) nach Herstellerangaben. Nach Abschluss der PCR wurden die Proben mit 6 µl Formamid-Ladepuffer (200 µl 0,5 M EDTA pH 8,0, 100 ml Paraosanilin (100 mg/ml), 9,5 ml Formamid) versetzt und für 3 min bei 70 °C denaturiert. Auf das Sequenziergel wurden je 1,5 µl der Proben aufgetragen. Die Sequenzierung erfolgte nach Herstellerangaben und wurde mit der Software *e-seq* (Licor) ausgewertet.

2.9.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Trichomonas vaginalis*

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus *Trichomonas vaginalis* wurde eine 12 ml Kultur (siehe 2.7.1) 10 min bei 1000 x g zentrifugiert und die pelletierten Zellen in 100 µl TRIzol[®] Reagenz (Invitrogen) lysiert. Die Gesamt-RNA wurde nach Herstellerangaben isoliert, in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

2.9.7 Isolierung von mRNA aus der hydrogenosomalen Fraktion mit anschließender cDNA Synthese

Hydrogenosomen wurden über zwei aufeinander folgende Percoll-Gradienten gereinigt (siehe 2.7.4) und aus dieser Fraktion Gesamt-RNA (*Total RNA Isolation NucleoSpin RNA II Kit*, Macherey-Nagel) isoliert. Die Erst-Strang-Synthese der cDNA erfolgte mit dem *SMART PCR cDNA Synthesis Kit* (Clontech) nach Herstellerangaben. Die anschließende PCR erfolgte mit dem vom Hersteller angegebenen Programm mit 2 µl Erst-Strang cDNA, 10 µl 10 x *Taq*-Puffer, 2 µl 50 x dNTP Mix, 4 µl 5' PCR Primer II A und 2 µl *Taq*-Polymerase in einem Volumen von 100 µl. Die cDNA wurde in den Vektor pGEM-T Easy (Promega) nach Herstellerangaben kloniert und *E. coli* XL1-Blue Zellen mit 3 µl dieses Ligationsansatzes transformiert.

2.9.8 RNA-Transfer auf eine Nylon-Membran (Northern Transfer)

Alle verwendeten Geräte wurden mit 0,1 % Na-Hypochlorid gesäubert, und alle Lösungen wurden mit 0,1 % DEPC-H₂O angesetzt, um vorhandene RNasen zu zerstören. Für Northern Analysen wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA in einem denaturierenden Formaldehyd-Gel (1 % Agarose in 1 x MOPS-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,0) mit 0,6 % (v/v) Formaldehyd und 0,02 % (w/v) Ethidiumbromid) aufgetrennt. Dazu wurden die Proben mit 1/5 Volumen Probenpuffer (4 mM EDTA pH 8,0, 2,7 % (v/v) Formaldehyd, 20 % (v/v) Glycerin, 30 % (v/v) deionisiertes Formamid, 4 x MOPS-Puffer, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 65 °C denaturiert. Als RNA-Größenstandard wurde der *RiboRulerTM RNA Ladder, High Range* von Fermentas verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit 2 V/cm Elektrodenabstand in einer *Wide Mini-Sub[®] Cell GT* von Bio-Rad. Das Gel wurde anschließend 3 x 20 min in 0,1 % DEPC-H₂O mit jeweils einer Spatelspitze Proteinase K gewaschen. Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine *Hybond N* Nylonmembran

(GE Healthcare) erfolgte mittels Kapillar-Transfer mit 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0) über Nacht, wie von Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte für 3 min unter UV-Licht. Die Membran wurde bis zur Hybridisierung in Frischhaltefolie eingeschlagen und dunkel bei Raumtemperatur gelagert.

2.9.9 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Mit der Methode des *Random Primed Labeling* nach Feinberg und Vogelstein (1983, 1984) wurde DNA hochspezifisch radioaktiv markiert. Pro Ansatz wurden 100 ng DNA denaturiert (15 min bei 100 °C) und in 1 x Oligo-Puffer (5 OD₂₆₀ p(dN)₆ von GE Healthcare, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 7,0, je 50 µM dATP, dGTP und dTTP, 7 mM β-Mercaptoethanol), 5 µg BSA, 1,1 MBq [³²P]dCTP und 2,5 U Klenow-Fragment in einem Volumen von 50 µl 3 h bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt, nicht eingebaute Nukleotide über eine Sephadex G50 Säule entfernt und die Sonde nach Denaturierung mit 100 mM NaOH für 3 min und Neutralisation mit 100 mM HCl für die Hybridisierung verwendet.

2.9.10 Northern-Hybridisierung und Detektion

Die Vorhybridisierung der Nylonmembran (siehe 2.9.8) erfolgte für 1 h in 6 x SSPE (6 mM EDTA, 1 M NaCl, 60 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) mit 0,1 % (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) Ficoll 400, 0,02 % (w/v) PVP und 50 ng/µl Fischsperma-DNA (Roche) bei 68 °C. Die anschließende Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 °C in 3 x SSPE mit 0,1 % (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) Ficoll 400, 0,02 % (w/v) PVP, 50 ng/µl Fischsperma-DNA und der denaturierten DNA-Sonde (siehe 2.9.9). Das Waschen der hybridisierten Membran erfolgte für 2 x 20 min in 2 x SSPE mit 0,1 % (w/v) SDS bei 68 °C. Die Membran wurde getrocknet in Folie eingeschlagen und abhängig von der Signalstärke für 4-44 Stunden mit einem Detektions-Film aus Polyester mit Barium-Fluorhalogen-Phosphor-Kristallen (*imaging plate*, IP, Fuji) in einer IP-Kassette von Fuji Photo Film bei Raumtemperatur inkubiert. Die Signale wurden mit einem Fuji FLA3000 Fluoreszenz-Scanner detektiert, mit dem Programm *Image Reader* FLA-3000 (Version 1.8 E) visualisiert und dem Programm *Image Gauge* (Version 3.0) (Fuji Photo Film Co.) quantifiziert.

2.10 Proteinbiochemische Methoden

2.10.1 Bestimmung der Protein-Konzentration

Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford (1976) bestimmt. Dazu wurden 0,5-200 μ l Probe zu 1 ml 1:5 verdünntem Bradfordreagenz (*Bio-Rad Protein Assay*) gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm photometrisch gegen eine Blindprobe gemessen und die Konzentration anhand einer Kalibrierungsgerade (mit Rinderserumalbumin als Standard) ermittelt.

2.10.2 1D-SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Die PAGE erfolgte mit 5 % Sammel- und 12 % Trenngelen (Sambrook *et al.* 1989) in *PerfectBlue Twin M* Doppelsystemen (PeqLab) nach Herstellerangaben. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/5 Volumen Probenpuffer (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 5 mM EDTA, 5 % (w/v) SDS, 25 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 50 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert.

2.10.3 2D-SDS-PAGE

Bei einer 2D-Elektrophorese werden Proteine in der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und in der zweiten Dimension in einer SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennt. Für eine 2D-PAGE werden Probenpuffer verwendet, die Chaotrope, Detergentien und Trägerampholyte beinhalten. Das neutrale Chaotrop Harnstoff solubilisiert und denaturiert Proteine, indem hydrophobe Wechselwirkungen von Proteinen verhindert werden, und somit die Löslichkeit erhöht wird. Thioharnstoff erhöht zusätzlich zu Harnstoff die Löslichkeit der Proteine. Durch Zusatz von Detergentien werden Wechselwirkungen zwischen freiliegenden hydrophoben Resten der Proteine und die Bildung von Aggregaten verhindert. Welche Detergentien (-kombinationen) eingesetzt werden, muss für jedes Probenmaterial empirisch ermittelt werden. Der Zusatz von IPG (immobilisierte pH-Gradienten-) Puffern, die sogenannte Träger-Ampholyte beinhalten,

erhöhen die Löslichkeit und die Leitfähigkeit innerhalb des pH-Gradienten, ohne die IEF zu stören.

Die Auftrennung von alkalischen Proteinen wird meist durch zwei Phänomene gestört: durch den elektroosmotischen Wassertransport während der isoelektrischen Fokussierung und durch die Migration des DTT in alkalischen Gradienten. Diesen Störfaktoren kann durch Zusatz von Isopropanol, Glycerin und DTT in dem Rehydratationspuffer entgegengewirkt werden (Hoving *et al.* 2002). Der Zusatz von Isopropanol minimiert den elektroosmotischen Wasserfluss, und Glycerin vermindert den Effekt dadurch, dass die Gelmatrix durch Glycerin flexibler wird.

Probenvorbereitung

Die Hydrogenosomen (0,5-4 mg) wurden 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Biofuge Fresco, Heraeus) und der Überstand abgenommen. Für die pH-Bereiche 4-7 und 3-10 wurde das Pellet in 180 µl Lysispuffer R (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 40 mM Tris-HCl pH 9,0) resuspendiert, 1/10 Vol 10 % (w/v) DTT für die Reduktion der Disulfidbrücken hinzugegeben und eine Stunde bei RT inkubiert. Die Alkylierung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 3 % (v/v) Acrylamid (Pharmacia) und Inkubation für 3 Stunden bei RT. Für den pH-Bereich 6-11 wurde die Reduktion der Proteine in 100 µl Lysispuffer R mit 1,2 µl *DeStreak-Solution* (GE Healthcare) und Inkubation für 4 Stunden bei RT durchgeführt.

Die Proteine wurden mittels *Ettan 2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare) gefällt, in 380 µl Rehydratationspuffer R (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 2 % (w/v) Bromphenolblau, 0,5 % (v/v) IPG-Puffer pH 3-10, pH 4-7 bzw. pH 6-11; bei pH 6-11 zusätzlich 10 % (v/v) Isopropanol und 5 % (v/v) Glycerol) mit 1 % (w/v) DTT, bzw. bei pH 6-11 mit Zusatz von 4,56 µl *DeStreak-Solution*, aufgenommen und eine Stunde bei RT inkubiert. Vor dem Auftragen auf die IEF-Streifen (*Immobiline Dry Strips* pH 3-10, pH 4-7, pH 6-11, je 18 cm, GE Healthcare) wurden die Proben 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Rehydratation und erste Dimension

Die Rehydratation erfolgte für 12 h bei 20 °C und 50 µA pro IEF-Streifen in der Ettan IPGphor IEF Einheit (GE Healthcare) in 18 cm Keramik-Kammern (*Strip Holder*, GE Healthcare). Für die isoelektrische Fokussierung wurden die Streifen in 24 cm Keramik-Kammern überführt und folgendes Programm bei 20 °C und 50 µA pro IEF-Streifen verwendet:

1 h	200 V	Step-n-hold
1 h	200 V	Step-n-hold
1 h	500 V	Step-n-hold
1 h	1000 V	Gradient
1 h	8000 V	Gradient
5 h	8000 V	Step-n-hold

Die fokussierten Streifen wurden in einem geschlossenen Gefäß bei -80 °C gelagert.

Äquilibrierung und zweite Dimension

Die aufgetauten IEF-Streifen wurden zunächst 15 min in 10 ml Äquilibrierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 2 ‰ (w/v) Bromphenolblau) mit 100 mg DTT und anschließend 15 min in 10 ml Äquilibrierungspuffer mit 250 mg Iodacetamid (ICN) geschwenkt.

Für die zweite Dimension wurden die Streifen neben ein Filterpapier (*Sample application pieces*, GE Healthcare) mit Proteingrößenstandard (*Protein Molecular Weight*, Fermentas) auf ein 12 % SDS-Gel gelegt und mit Agarose-Lösung (1 x Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS), 0,5 % (w/v) Agarose M, 2 ‰ (w/v) Bromphenolblau), die zuvor in der Mikrowelle erwärmt worden war, überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte bei 12 °C und 20-40 mA pro Gel.

2.10.4 Blaue Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Probenvorbereitung

Die Proben wurden bei 4 °C für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und zweimal mit 500 µl Waschpuffer (250 mM Sorbitol, 50 mM Bis-Tris pH 7,0) gewaschen. Das Pellet wurde in Probenpuffer (750 mM Aminocaprinsäure, 50 mM Bis-Tris pH 7,0), mit 1 % (w/v) Lauryl Maltosid resuspendiert, 1 Stunde auf Eis inkubiert und der Ansatz regelmäßig gemischt. Nach einer Ultrazentrifugation für 20 min bei 30000 rpm und 4 °C (Optima Max-E, Beckmann) in dem MLS-50 Rotor (Beckmann) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 0,25 % (w/v) Coomassie Serva Blue G (Serva) versetzt (halbes Maltosidvolumen) und bis zum Auftragen auf das Gel bei 4 °C gelagert.

Erste Dimension

Das Gradientengel für die erste Dimension wurde mit folgender Zusammensetzung gegossen und auf 4 °C vorgekühlt:

	15 %	10 %	5 % Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid (32,1:1)	3,13 ml	2,09 ml	0,528 ml
3 x Gelpuffer pH 7,0 1,5 M Aminocaprinsäure, 150 mM Bis-Tris	3,4 ml	3,4 ml	2,2 ml
80 % (v/v) Glycerol	2,6 ml	0,66 ml	-
H ₂ O	1,04 ml	4,09 ml	3,78 ml
TEMED	9,89 µl	9,89 µl	9,89 µl
10 % (w/v) APS	27,47 µl	27,47 µl	35,2 µl

Nach 1/3 des Laufes bei 12 mA und 4 °C wurde der Kathodenpuffer I (50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris, 0,02 % Coomassie Blue Serva G, pH 7,0) durch den Kathodenpuffer II (50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris, 0,002 % Coomassie Blue Serva G, pH 7,0) ersetzt. Als Anodenpuffer wurde 50 mM Bis-Tris (pH 7,0) verwendet.

Zweite Dimension

Aus dem Gel der ersten Dimension wurden die zu untersuchenden Spuren mit einem Skalpell ausgeschnitten, 30 min in 1 x Tris-Glycin-Puffer mit 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol und 2 x 10 min in 1 x Tris-Glycin-Puffer gewaschen. Die Gelspur wurde auf ein 1D-SDS-Trenngel (12 %) in ein 5 % Sammelgel (siehe 2.10.2) eingegossen. Neben die Gelspur wurde mit Hilfe eines Spacers eine Tasche für den Proteingrößenstandard geformt und die Proteinkomplexe bei 15-40 mA pro Gel der Größe nach aufgetrennt.

2.10.5 Coomassie Brilliant Blau-Färbung von Proteingelen

Die heiße Coomassie-Färbung wurde nach einer modifizierten Methode von Heukeshofen und Dernick (1988) durchgeführt. Eine Tablette *Phast Gel Blue R-350* (GE Healthcare) wurde in 60 % (v/v) Methanol unter Rühren gelöst, filtriert und bei 4 °C gelagert. Für die Färbelösung wurde die Stammlösung 1:10 mit 10 % (v/v) Essigsäure verdünnt, auf 90 °C erhitzt und heiß auf das zu färbende Gel gegeben. Nach 1 Stunde wurde die Lösung gegen 10 % (v/v) Essigsäure ausgetauscht und das Gel darin über Nacht entfärbt.

2.10.6 Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung von Proteingelen erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Blum *et al.* (1987). Die Fixierung der Proteine erfolgte in 30 % (v/v) Methanol und 12 % (v/v) Essigsäure für 1 Stunde. Die Gele wurden 2 x 30 min in deion. H₂O gewaschen und 3 x 20 min in 30 % (v/v) EtOH geschwenkt. Nach 1 min in 0,02 % (w/v) Na₂S₂O₃ und 3 x 20 s in deion. H₂O wurden die Gele 30 min in 0,2 % (w/v) Silbernitrat mit 0,075 % (v/v) Formaldehyd geschwenkt und anschließend 2 x 5 min in deion. H₂O gewaschen. Entwickelt wurden die Gele in 6 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,4 % (w/v) Natriumthiosulfat und 0,05 % (v/v) Formaldehyd. Die Reaktion wurde mit 50 % (v/v) Methanol und 12 % (v/v) Essigsäure abgestoppt.

2.10.7 Proteolyse von Proteinen im Gel

Die Proteolyse der Proteine erfolgte nach einer modifizierten Methode von Jensen *et al.* (1998). Die Proteine wurden mit sauberen Pipettenspitzen aus dem Gel ausgestochen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zweimal in doppeltem Volumen Milli-Q-Wasser (MQW) /Acetonitril (ACN) im Verhältnis 1:1 (v/v) unter Schütteln für 15 min inkubiert (1 Volumen entspricht der Menge, die das Gelstück vollständig bedeckt). Die Waschlösungen wurden entfernt, ein Volumen ACN zugegeben, und die Gelstücke 5 min bei RT dehydriert. Das ACN wurde abgenommen, ein Volumen 100 mM Ammoniumbicarbonat (BiCa) zugegeben, und die Proben 5 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Zu dem BiCa wurde ein Volumen ACN gegeben und die Ansätze für 15 min bei RT geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde vollständig abgenommen und die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf) getrocknet.

Zu den trockenen Gelstücken wurden 10 µl Trypsinlösung (10 ng/µl in 50 mM BiCa, Promega) zugeben, und die Proben 10 min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis die Gelstücke nicht mehr weiter quollen und vollständig von der Trypsinlösung bedeckt waren. Die überschüssige Trypsinlösung wurde entfernt und die Gelstücke mit 25 mM BiCa vollständig bedeckt. Die Proben wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Extraktion der Peptide erfolgte durch Inkubation der Ansätze für 2 min im Ultraschallbad (VWR). Die Flüssigkeit wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu den Gelstücken wurde ein Volumen 25 mM BiCa gegeben, unter Schütteln für 20 min inkubiert, ein Volumen ACN zugegeben und für weitere 15 min bei RT geschüttelt. Die Ansätze wurden

für 2 min im Ultraschallbad inkubiert und die Flüssigkeit im gleichen 1,5 ml Reaktionsgefäß wie oben gesammelt.

Die Gelstücke wurden für zweimal 15 min in einem Volumen 5 % (v/v) Ameisensäure / ACN (1:1) unter Schütteln inkubiert und die Flüssigkeiten gesammelt. Die vereinigten Überstände wurden in der Vakuumzentrifuge bei 60 °C bis auf 10-15 µl eingengt und die Proben bei -20 °C gelagert.

2.10.8 Proteinsequenzierung

Die Peptide wurde in 4 % (v/v) Methanol / 1 % (v/v) Ameisensäure gelöst, über C18 ZipTips (Millipore) entsalzt und in 60 % (v/v) Methanol / 1 % (v/v) Ameisensäure eluiert. Die Sequenzierung der Proben wurde unter Verwendung eines Elektrospray-Ionisators (ESI)-Q-TOF-MS/MS (Applied Biosystems QSTAR XL) durchgeführt. Als ESI-Quelle wurden Borosilikat-Kapillaren mit Gold/Palladium-Überzug von Proxeon verwendet. Mit dem Programm *Analyst QS* (Applied Biosystems) wurden Übersichtsspektren in einem Massenbereich von 350-1000 m/z bei positiver Polarität aufgenommen. Zweifach und dreifach geladene Peptide (Vorläufer-Ionen) wurden durch kollisionsinduzierten Zerfall (*collision induced dissociation*, CID) fragmentiert und die erhaltenen Spektren der Produkt-Ionen mit Unterstützung des Programms *Analyst QS* sequenziert. Diese Peptidsequenzen wurden durch BLASTp der TIGR *Trichomonas vaginalis* Genom-Datenbank identifiziert (<http://tigrblast.tigr.org/er-blast/index.cgi?project=tv>).

2.10.9 Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran (Western Transfer)

Proteine, die zuvor in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden (siehe 2.10.2), können mittels elektrophoretischen Transfers auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Dieser Transfer erfolgte nach Gershoni und Palade (1983) in einer Halbtrockenzelle (Nova Blot Multiphor II, GE Healthcare). Auf die mit deion. H₂O befeuchtete Anode wurden drei Lagen Whatman Papier gelegt, die in Transferpuffer (40 mM Glycin, 50 mM Tris, 1 mM SDS, 20 % (v/v) Methanol) getränkt waren. Die gewässerte Nitrocellulosemembran wurde auf das Whatman Papier luftblasenfrei aufgelegt. Das Trenngel wurde in Transferpuffer geschwenkt und ebenfalls luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Abschließend folgten drei in Transferpuffer getränkte Lagen Whatman Papier. Der Transfer erfolgte bei einem konstanten Stromfluss von 0,8 mA/cm² für 60 min. Die Membran wurde nach dem Transfer in 0,5 %

(w/v) Ponceau S / 1 % (v/v) Essigsäure reversibel angefärbt und mit deion. H₂O die Hintergrundfärbung entfernt.

2.10.10 Immunodetektion von Proteinen

Die Nitrocellulosemembran wurde für das Absättigen der freien Proteinbindestellen 1 Stunde in 3 % (w/v) BSA in TBS (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran 1 Stunde bei RT mit dem primären Antikörper in 3 % (w/v) BSA in TBS auf einem 3D-Taumelschüttler (Multi 3D-Shaker, Peqlab) inkubiert. Zum Nachweis rekombinanter Proteine mit einem His-Anhang wurde der monoklonale Maus IgG His-Antikörper der Firma Novagen (0,1 µg/ml) verwendet. Nach Waschen der Membran für 2 x 10 min mit TBST (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20, 0,2 % (v/v) Triton X-100) und 1 x 10 min mit TBS folgte die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper (ImmunoPure Goat Anti-Mouse IgG, (H+L) Peroxidase Conjugated, Pierce) 1:30000 verdünnt in 10 % (w/v) Magermilchpulver in TBS für 1 Stunde bei RT oder 4 °C über Nacht, gefolgt von erneutem Waschen mit TBST und TBS.

Die Nachweisreaktion der Meerrettich-Peroxidase erfolgte in 4 ml Lösung A (1,25 mM Luminol (Sigma) in 0,1 M Tris-HCl pH 8,6), 400 µl Lösung B (6 mM para-Hydroxycoumarinsäure (Sigma) in DMSO) und 1,2 µl 30 % (v/v) H₂O₂. Die enzymatische Lichtemission wurde durch Auflegen eines *Lumi-Film Chemiluminescent Detection* Films von Roche nachgewiesen.

2.10.11 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der Aktivität der lysosomalen Sauren Phosphatase (EC 3.1.3.2) erfolgte nach Moss (1984). Die Reduktion von NADP durch die hydrogenosomale decarboxylierende Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.39) wurde, wie von Kremer *et al.* (1989) beschrieben, gemessen. Die Aktivität der cytosolischen Laktat-Dehydrogenase (LDH) (EC 1.1.1.27) wurde über die Oxidation von NADH nach Wu *et al.* (1999) bestimmt. Die Glucokinase (GK) Aktivität (EC 2.7.1.2) wurde, wie bei Henze *et al.* (2001) beschrieben, gemessen. Die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase (EC 3.1.3.9) des endoplasmatischen Retikulums wurde mit Malachitgrün nach Petrolinis *et al.* (2004) bestimmt.

2.10.12 Thermolysin- und Triton X-100-Behandlung der hydrogenosomalen Fraktion

Die Protease-Behandlung erfolgte mit Thermolysin und Triton X-100 abgewandelt nach Bradley *et al.* (1997). Es wurden 1 mg Hydrogenosomen zweimal in SM-Puffer (0,25 mM Saccharose, 10 mM MOPS pH 7,2) gewaschen, in 1,5 ml SM-Puffer mit 10 mM CaCl₂ und 400 µg Thermolysin resuspendiert und 1 Stunde bei RT inkubiert. Für die Triton X-100 Behandlung wurde dem Ansatz 1 % (v/v) Triton X-100 zugefügt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 mM EGTA (pH 8) gestoppt und die Organellen zweimal mit SM-Puffer mit 3 mM EGTA (pH 8) gewaschen.

2.10.13 Enzymatischer Test zur Bestimmung der Rubrerythrin Aktivität

Die Aktivität von rekombinantem Rubrerythrin wurde nach Coulter und Kurtz (2001) bestimmt (Abb. 2.1A). Der Reaktionsansatz beinhaltete 100 µM β-NADPH, 0,5 µM Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase von *Spinacia oleracea* (FNR), 0,5 µM Rubredoxin von *Clostridium pasteurianum* (Rub) und 250 µM H₂O₂ in 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) mit 0,1 mM EDTA und 25 µg rekombinantes Rubrerythrin. Um den vorhandenen Sauerstoff in dem Reaktionsansatz zu eliminieren wurden 20 mM Glucose und 0,1 U/ml Glucose-Oxidase zugegeben (Abb. 2.1B).

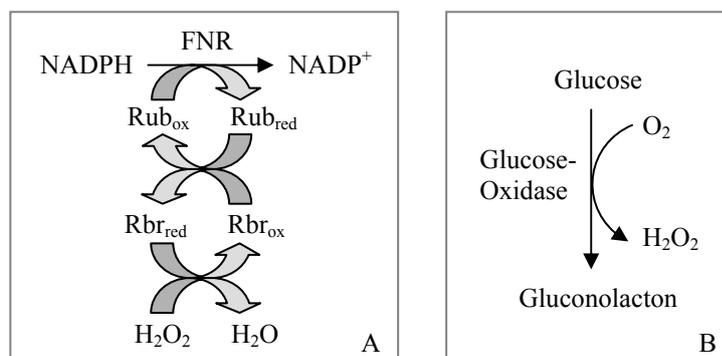


Abb. 2.1: Reaktionsschema in dem Rubrerythrin Aktivitätstest; A: von NADPH überträgt die Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase (FNR) die Elektronen auf Rubredoxin (Rub), das wiederum die Elektronen auf Rubrerythrin (Rbr) überträgt, so dass H₂O₂ zu H₂O reduziert werden kann; B: Glucose wird von der Glucose-Oxidase unter Sauerstoff-Verbrauch zu Gluconolacton und H₂O₂ umgesetzt.

Die Reaktion wurde in einem Endvolumen von 100 µl durch Zugabe von NADPH gestartet und der Reaktionsansatz in der Küvette mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Die Aktivität wurde bei RT über die Abnahme der Extinktion bei 340 nm bestimmt (Genesys 10UV, Thermo).

2.11 Bioinformatische Methoden

2.11.1 Sequenzanalysen, Datenbankvergleiche und phylogenetische Netzwerke

Zur Eingabe, Analyse und weiteren Bearbeitung von Sequenzen wurde das GCG Programmpaket (Version 10.3) der Genetics Computer Group, University of Wisconsin, verwendet (Devereux *et al.* 1984).

Für die Suche nach homologen Sequenzen in GenBank wurden die Programme *BLASTn*, *BLASTx* und *BLASTp* des BLAST (*basic local alignment search tool*)-Pakets am NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) verwendet (Altschul *et al.* 1990).

In den TIGR (*the institute for genomic research*) Genom-Datenbanken von *T. vaginalis* (www.tigr.org/tdb/e2k1/tvg/) und *E. histolytica* (www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1/) wurden für die Suche nach homologen Sequenzen die Programme *BLASTn*, *BLASTx* und *BLASTp* des WU BLAST 2.08 verwendet (Gish 1996, unveröffentlicht).

Globale, multiple Alignments wurden mit *Clustal W* erstellt (Thompson *et al.* 1994). Basierend auf diesen *Clustal W* Alignments wurden mit Hilfe der Programme *LDDist* (Thollesson 2004) und *Neighbor-Net* (Bryant und Moulton 2004) phylogenetische Analysen der molekularen Daten durchgeführt: Die Lücken in den Alignments wurden mit *sortal3* entfernt, mit *LogDet* wurden Distanzen auf der Grundlage von paarweisen Alignments berechnet. *Neighbor-Net* verwendet diese Distanzen, um mit einer Variante des *Neighbor-joining*-Algorithmus (Saitou und Nei 1987) ein Netzwerk zu berechnen, das mit dem Programm *SplitsTree4* (Huson 1998) graphisch dargestellt wurde.

2.11.2 Voraussagen über mögliche Transitpeptide, das Molekulargewicht und den isoelektrischen Punkt von Proteinen

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

Das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt eines Proteins wurden mit Hilfe des Online-Tools *Compute pI/Mw* (www.expasy.ch/cgi-bin/pi-tool) berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung von Hydrogenosomen

Aus *Trichomonas vaginalis* wurden Hydrogenosomen in einem Percoll-Gradienten über Dichtegradientenzentrifugation gereinigt, um das Proteom der Organellen durch 1D- und 2D-Gelelektrophoresen analysieren zu können.

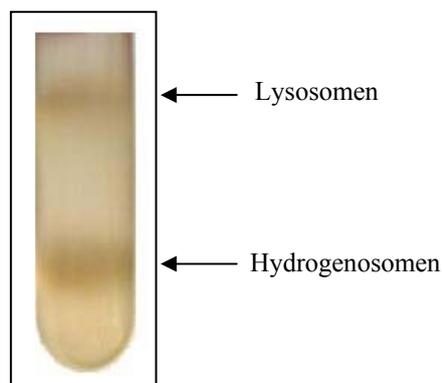


Abb. 3.1: Separation der Hydrogenosomen aus *Trichomonas vaginalis* in einem 45 % Percoll-Gradienten; nach der Ultrazentrifugation befinden sich die Lysosomen im oberen und die hydrogenosomale Fraktion im unteren Drittel des Gradienten.

Die lysosomalen und hydrogenosomalen Banden (Abb. 3.1) wurden isoliert (siehe 2.7.4) und die Reinheit der Fraktionen über spezifische Enzymaktivitäten der Fraktionen bestimmt (Abb. 3.2). Als lysosomales Enzym wurde die Saure Phosphatase (SP) gewählt und als hydrogenosomales Enzym die decarboxylierende Malat-Dehydrogenase (MDH). Für einen Hinweis auf mögliche cytosolische Verunreinigungen wurden spezifische Aktivitäten von Glucokinase (GK) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) bestimmt (siehe 2.10.11). Die lysosomale Fraktion (Lys) wurde nach Isolierung aus dem ersten Percoll-Gradienten nicht weiter behandelt, so dass hohe Aktivitäten der cytosolischen Enzyme GK und LDH zu messen waren. Nach einem Percoll-Gradienten waren in der hydrogenosomalen Fraktion (H1) signifikante Aktivitäten der lysosomalen und cytosolischen Enzyme messbar. Um diese Verunreinigungen zu minimieren, wurde eine zweite Ultrazentrifugation der hydrogenosomalen Fraktion durchgeführt (H2), was die LDH- und SP-Aktivitäten um weitere 50 % bzw. 70 % im Vergleich zu Fraktion H1 verringerte, während die spezifische Aktivität der Glucokinase um 8 % anstieg. Nach Behandlung der Hydrogenosomen des zweiten Gradienten mit der Protease Thermolysin (H2T) (siehe 2.10.12) war keine LDH-Aktivität mehr messbar, und die GK-Aktivität war um

63 % reduziert, während die MDH- und SP-Aktivitäten anstiegen. Nach Lyse der Organellen mit Triton-X 100 (siehe 2.10.12) wurde die MDH-Aktivität um 93 % reduziert (H2TT).

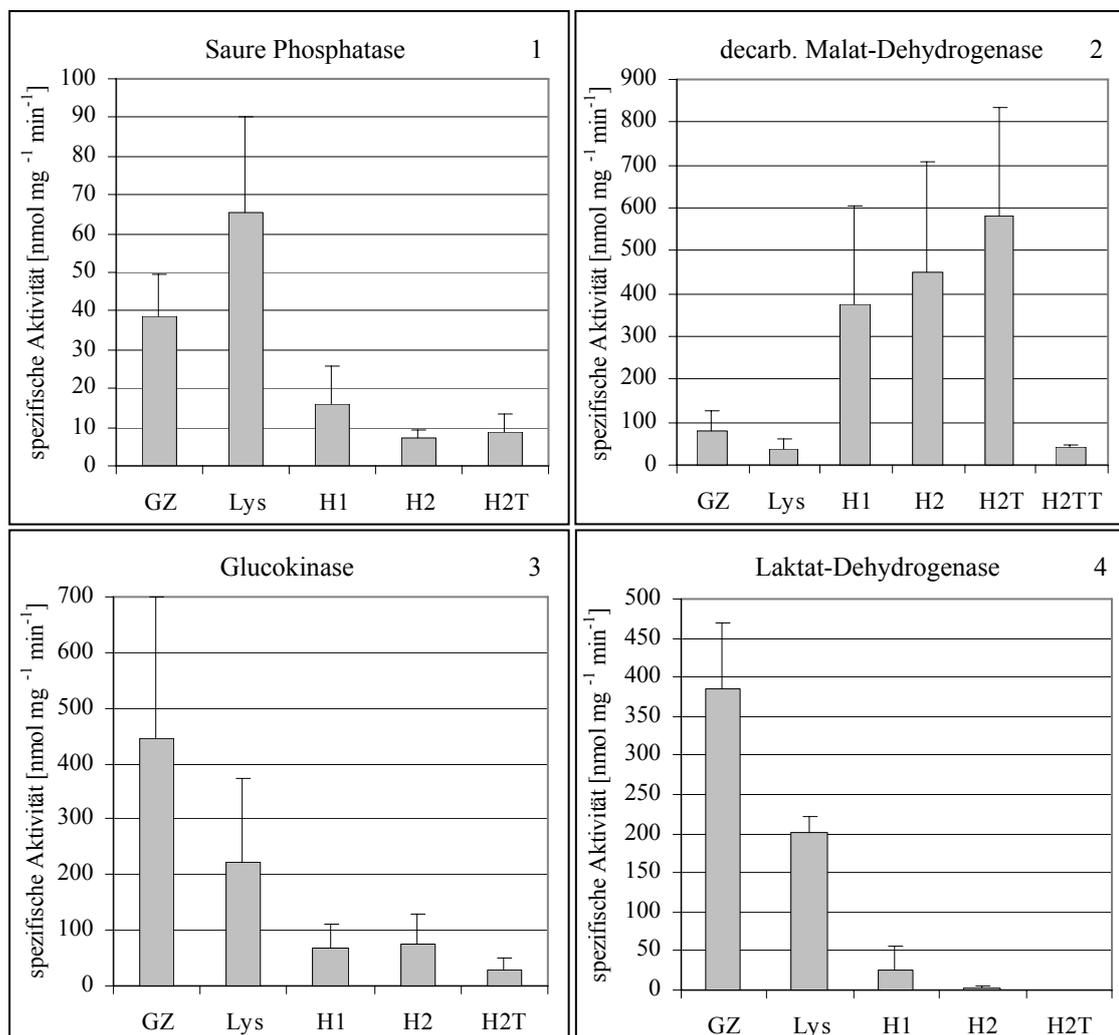


Abb. 3.2: Spezifische Enzymaktivitäten [nmol·min⁻¹·mg⁻¹ ± SD] von Gesamtzellextrakt (GZ), Lysosomen- (Lys) und Hydrogenosomen-Fractionen, 1: Saure Phosphatase, 2: decarboxylierende Malat-Dehydrogenase, 3: Glucokinase, 4: Laktat-Dehydrogenase, H1: Hydrogenosomen nach einem Percoll-Gradient, H2: Hydrogenosomen nach zwei Percoll-Gradienten, H2T: Hydrogenosomen aus H2 mit Thermolysin behandelt, H2TT: Hydrogenosomen aus H2 mit Thermolysin und Triton-X 100 behandelt; n ≥ 3.

In einer 12 % SDS-PAGE wurden jeweils 25 µg Protein des Gesamtzellextraktes, der lysosomalen und der hydrogenosomalen Fractionen aufgetrennt (Abb. 3.3; siehe 2.10.2). In den Fractionen H1, H1T, H2 und H2T sind die bereits aus früheren Analysen der Hydrogenosomen (Dyall und Johnson 2000) bekannten Banden der Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR), der MDH und der Succinyl-CoA-Synthase (SCS) deutlich erkennbar. Nach Inkubation mit Triton-X 100 (H1TT und H2TT) (siehe 2.10.12) sind diese Banden abgebaut und eine Bande bei ~35 kDa angereichert. Diese Bande liegt in den Fractionen H1TT und H2TT ebenfalls vor und könnte von Thermolysin stammen, das ein Molekulargewicht von 34,6 kDa besitzt.

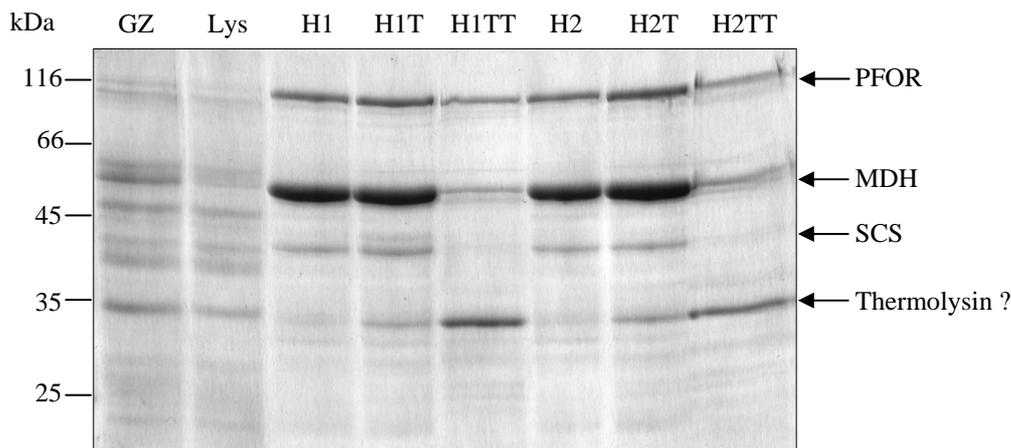


Abb. 3.3: 12 % SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung; aufgetragen wurden jeweils 25 μ g Protein der Fraktionen Gesamtzellextrakt (GZ), Lysosomen (Lys) und Hydrogenosomen, H1: Hydrogenosomen nach einem Percoll-Gradient, H2: Hydrogenosomen nach zwei Percoll-Gradienten, H1T/H2T: Hydrogenosomen aus H1/H2 mit Thermolysin behandelt, H1TT/H2TT: Hydrogenosomen aus H1/H2 mit Thermolysin und Triton-X 100 behandelt; PFOR: Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase, MDH: Malat-Dehydrogenase, SCS: Succinyl-CoA-Synthase.

Der Anstieg der GK-Aktivität nach zwei Gradienten und die Reduktion dieser Aktivität durch Thermolysin (Abb. 3.2) könnten darauf hindeuten, dass die GK mit den Hydrogenosomen assoziiert, jedoch nicht von einer Membran vor Protease-Abbau geschützt ist. Nach Reinigung der Hydrogenosomen über zwei Percoll-Gradienten konnten somit intakte Organellen erhalten werden, da die decarboxylierende MDH nach Protease-Behandlung weiterhin aktiv war, jedoch nach Inkubation mit Triton-X 100 die MDH-Aktivität drastisch reduziert wurde. Da nach zwei Gradienten nur noch geringfügige cytosolische und lysosomale Kontaminationen vorlagen, wurde für weiterführende Experimente stets die hydrogenosomale Fraktion nach Reinigung über zwei Percoll-Gradienten verwendet.

3.2 2D-Elektrophorese der hydrogenosomalen Fraktion von *T. vaginalis*

In einer 2D-SDS-PAGE können Proteome eines Organismus bzw. eines Organells soweit aufgetrennt werden, dass für einen Großteil der Proteine ein spezifisches Signal in der zweiten Dimension detektiert werden kann. Für das hydrogenosomale Proteom wurden als erste Dimension eine isoelektrische Fokussierung (IEF) und als zweite Dimension eine denaturierende SDS-PAGE gewählt. Die hydrogenosomalen Proteine von *T. vaginalis* wurden zunächst durch IEF in einem kontinuierlichen pH-Gradienten von 3-10 aufgetrennt (siehe 2.10.3). Dazu wurden Lysis- und Rehydratationspuffer R mit 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff und 2 % (w/v) CHAPS verwendet. Die Proteine wurden mit 1 % DTT reduziert und durch Zugabe von 4 % Acrylamid alkyliert. Für den basischen Bereich (pH 6-11) wurden

verschiedene Puffer und Zusätze getestet. Der Zusatz von 10 % (v/v) Isopropanol und 5 % (v/v) Glycerin im Rehydratationspuffer R verbesserte die Fokussierung der Proteine im basischen Bereich (Abb. 3.4).

Durch unvollständige Alkylierung waren jedoch viele Artefakte auf dem Gel zu erkennen. Durch Zusatz von *DeStreak-Solution* (GE Healthcare) und Inkubation für 4 h bei RT anstelle der Inkubation mit DTT/Acrylamid (siehe 2.10.3) konnten diese Strukturen minimiert werden (Abb. 3.5). Für den pH-Bereich 4-7 konnte ebenfalls der Puffer R verwendet werden.

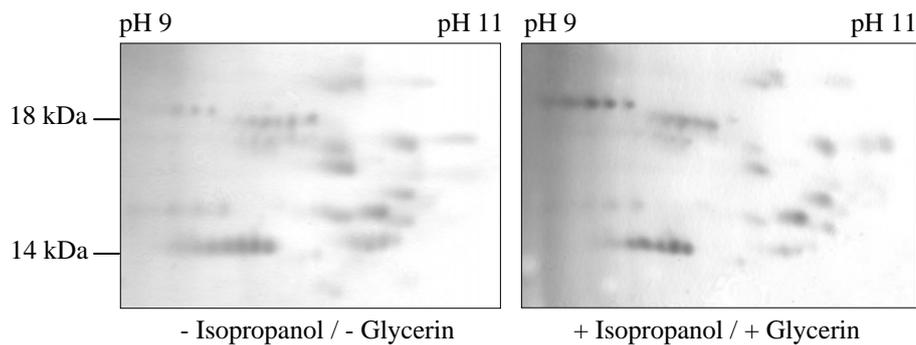


Abb. 3.4: Ausschnitt aus dem basischen Bereich von silbergefärbten 2D-SDS-Polyacrylamidgelen der hydrogenosomalen Fraktion von *T. vaginalis*. Die Auftrennung der Proteine (1 mg) mit dem verwendeten Puffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % (w/v) CHAPS) wurde ohne (links) und mit Zusatz von 10 % (v/v) Isopropanol und 5 % (v/v) Glycerin (rechts) im Rehydratationspuffer verglichen.

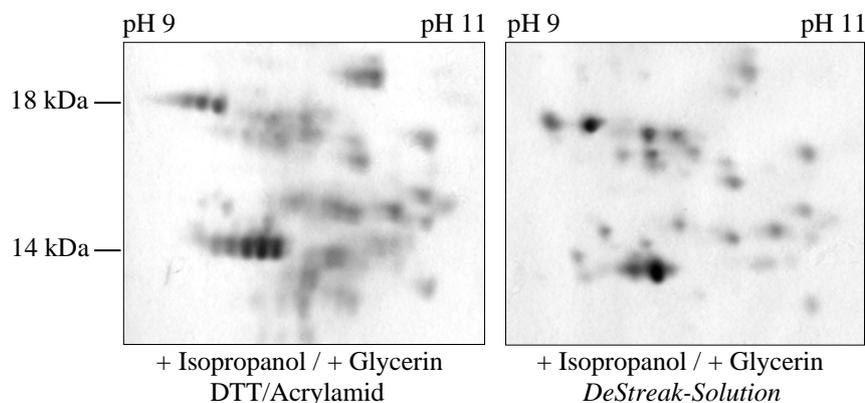


Abb. 3.5: Ausschnitt aus dem basischen Bereich von silbergefärbten 2D-SDS-Polyacrylamidgelen der hydrogenosomalen Fraktion von *T. vaginalis*. Die Reduktion der Proteine (1 mg) erfolgte in dem verwendeten Puffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 10 % (v/v) Isopropanol und 5 % (v/v) Glycerin) mit DTT/Acrylamid (links) bzw. mit *DeStreak-Solution* (rechts).

Proteine der hydrogenosomalen Fraktion wurden durch zweidimensionale Gelelektrophorese in drei pH-Bereichen der isoelektrischen Fokussierung (pH 3-10, pH 4-7 und pH 6-11) aufgetrennt (Abb. 3.6). Die größte Anzahl der Proteine wies isoelektrische Punkte von pI 5-10 und ein Molekulargewicht von 20-100 kDa auf. Nur wenige Proteine waren bei einem pI < 5 detektierbar. Es sind zwei deutliche Banden bei ~116 kDa und 65 kDa sichtbar, die den

Proteinen Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR) und Malat-Dehydrogenase (MDH) zugeordnet werden konnten (vgl. Abb. 3.3), da diese Banden bereits aus eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgelen bekannt waren (Dyall und Johnson 2000).

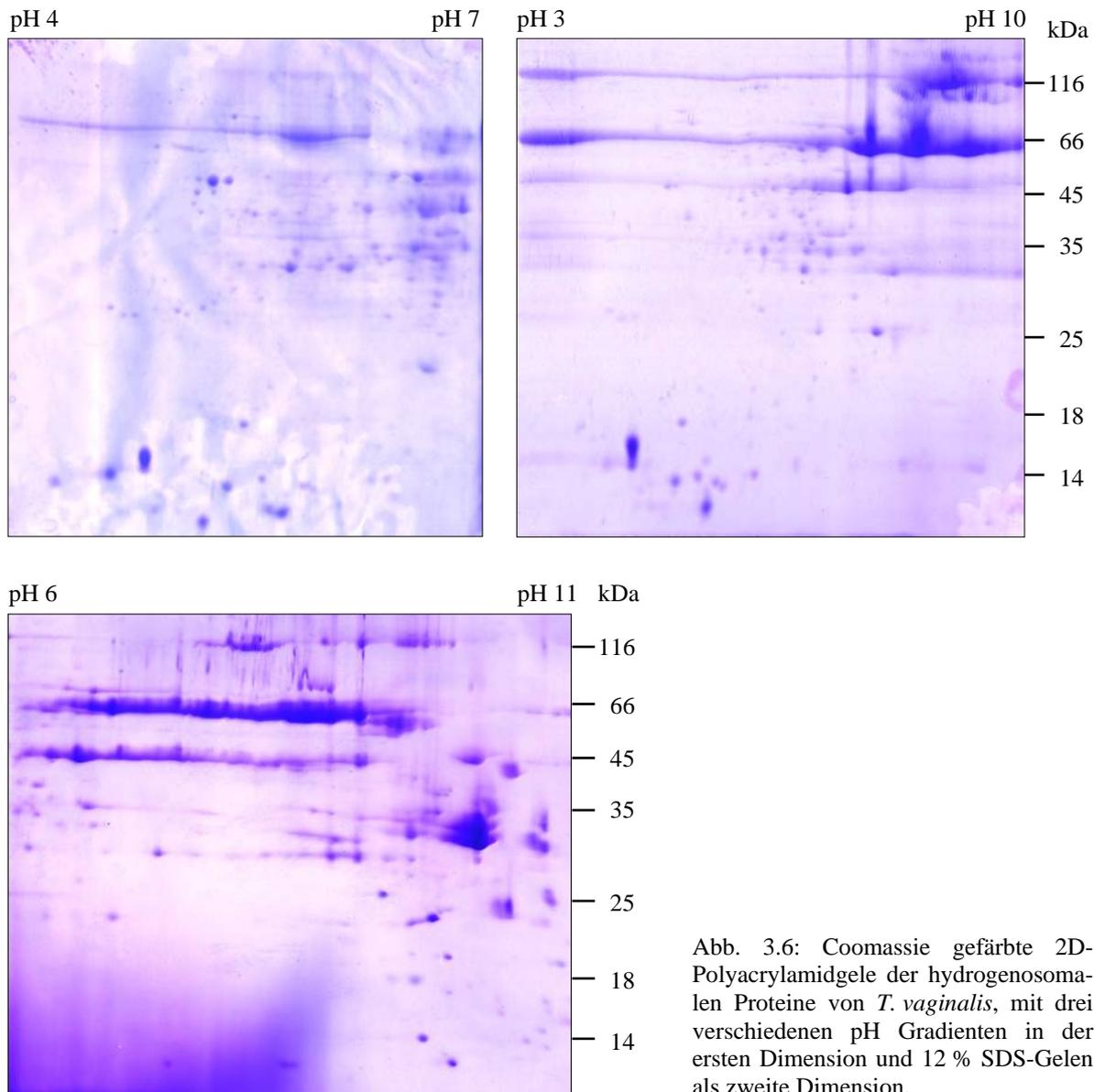


Abb. 3.6: Coomassie gefärbte 2D-Polyacrylamidgelen der hydrogenosomalen Proteine von *T. vaginalis*, mit drei verschiedenen pH Gradienten in der ersten Dimension und 12 % SDS-Gelen als zweite Dimension.

Von verschiedenen 2D-SDS-Polyacrylamidgelen wurden insgesamt 257 Proteine isoliert (77 Proteine im pH-Bereich 6-11, 60 Proteine pH 4-7 und 120 Proteine pH 3-10, siehe Anhang 1), mit der Protease Trypsin hydrolysiert (siehe 2.10.7) und massenspektrometrisch sequenziert (siehe 2.10.8). Es wurden 108 unterschiedliche Gene identifiziert, die in einer Tabelle im Anhang 2 zusammengefasst sind. Von diesen 108 Sequenzen besaßen 43 Proteine mögliche N-terminale Signalpeptide, von denen 35 als Transitpeptide vorhergesagt wurden (Carlton *et al.* 2007). Diese Sequenzen sind im Anhang 2 kenntlich gemacht. Es wurden insgesamt 58 Proteine als mögliche hydrogenosomale Proteine eingeordnet, von denen 11 Proteine nur

bakterielle Homologe in der NCBI-Datenbank haben: HydG, Rubrerythrin, eine Thiolperoxidase, ein OsmC-ähnliches Protein, vier bakterielle Phosphofruktokinasen (PFK) und drei unterschiedliche NADH:Flavin Oxidoreduktasen. Sechs Proteine haben keine bekannte Funktion, 20 Proteine konnten als cytosolisch und weitere drei als glycolytische Enzyme identifiziert werden: eine Enolase und zwei Fructosebisphosphat-Aldolasen (FBA). Ferner wurden 17 ribosomale Proteine und vier an Transkription bzw. Translation beteiligte Proteine identifiziert. In Abbildung 3.7 sind die Gruppierungen der identifizierten Gene zusammengefasst.

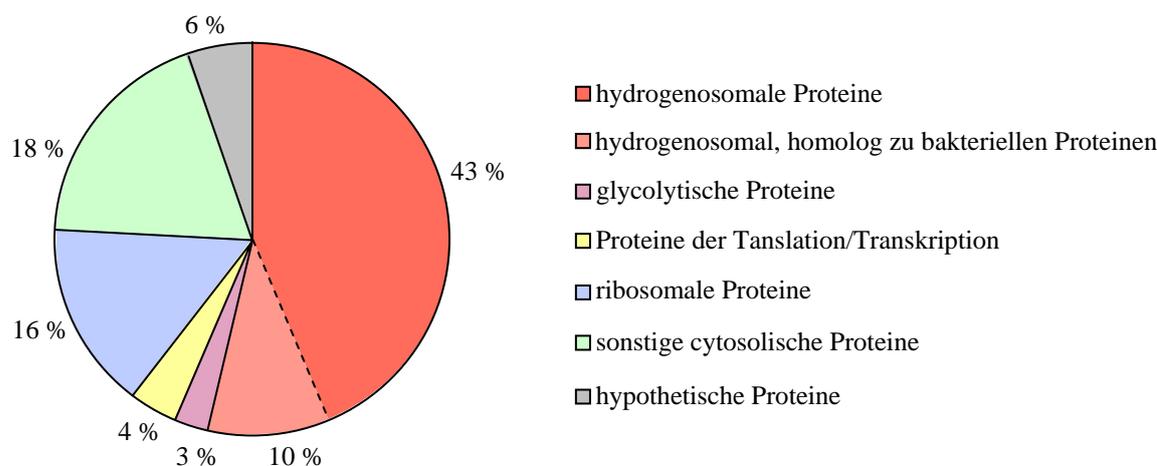


Abb. 3.7: Verteilung der 108 Gene von *T. vaginalis*, die anhand sequenzierter Peptide aus 2D-Polyacrylamidgelen der hydrogenosomalen Fraktion identifiziert wurden.

Diese 108 verschiedenen Proteine umfassen jedoch nur 84 unabhängige bekannte Funktionen, da z.B. von der SCS und der decarboxylierenden Malat-Dehydrogenase (*malic enzyme*) jeweils drei Isoformen der α - und β -Untereinheiten identifiziert wurden. Ferner konnten von der hydrogenosomalen MDH zahlreiche N-terminale bzw. C-terminale Fragmente mit Molekulargewichten von 31 kDa identifiziert werden (Abb. 3.8).

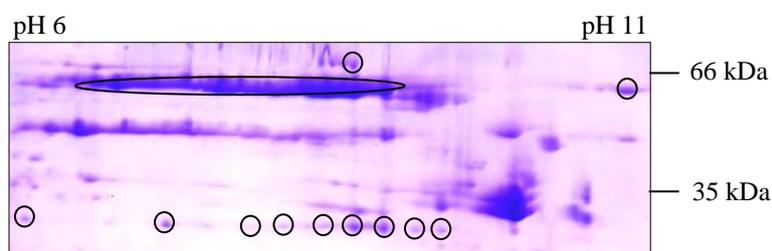


Abb. 3.8: Ausschnitt einer Coomassie gefärbten 2D-SDS-PAGE pH 6-11 der hydrogenosomalen Fraktion von *T. vaginalis*. Die umrandeten Proteine wurden als Fragmente von MDHs identifiziert.

3.3 Analyse der hydrogenosomalen Fraktion von *Tritrichomonas foetus*

Zum Vergleich des hydrogenosomalen Proteoms von *Trichomonas vaginalis* mit einem hydrogenosomalem Proteom eines weiteren Trichomonaden wurde der Parasit *Tritrichomonas foetus* gewählt. Aus *T. foetus* konnten, wie für *T. vaginalis* beschrieben, Hydrogenosomen isoliert werden (siehe 2.7.4). Auch die für *T. vaginalis* verwendeten Lysis- und Rehydrationspuffer für 2D-Elektrophoresen konnten unter gleichen Bedingungen verwendet werden (siehe 2.10.3). Proteine der hydrogenosomalen Fraktion von *T. foetus* nach zwei Percoll-Gradienten wurden in 2D-SDS-Polyacrylamidgelen der pH Bereiche pH 3-10 und pH 6-11 aufgetrennt (Abb. 3.9).

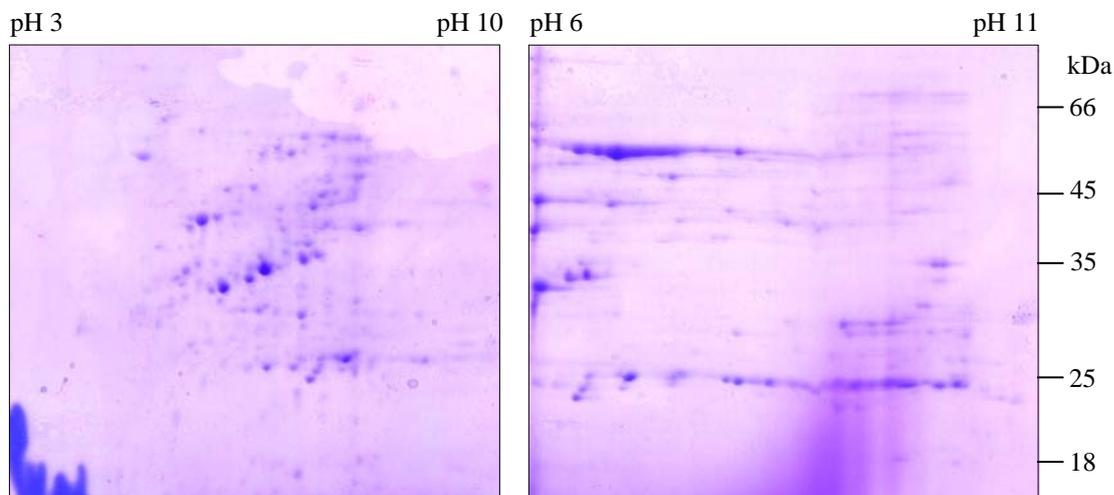


Abb. 3.9: Coomassie gefärbte 2D-Polyacrylamidgelen der hydrogenosomalen Proteine von *Tritrichomonas foetus*, mit zwei verschiedenen pH-Gradienten in der ersten Dimension und 12 % SDS-PAGE als zweite Dimension.

Die größte Anzahl der Proteine wies isoelektrische Punkte zwischen pI 5-8 und ein Molekulargewicht von 20-70 kDa auf. Wie bei *T. vaginalis* waren nur wenige Proteine bei einem pI < 5 detektierbar.

Es ist keine Bande bei 100 kDa sichtbar, die dem Protein Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR) zugeordnet werden konnte. Die decarboxylierende Malat-Dehydrogenase (MDH) konnte bei einer Größe von ~55 kDa identifiziert werden, was auf den Gelen des pH-Gradienten pH 6-11 in einer deutlichen Bande sichtbar wurde.

Die Gesamtanzahl an detektierbaren Proteinen von *T. foetus* ist mit der von *T. vaginalis* vergleichbar. Die Verteilung der Proteine ist jedoch anders: Es konnten 10 Proteine der PFOR von *T. foetus* identifiziert werden, die jedoch nur den N-terminalen Bereich repräsentierten. Ferner wurden 21 Signale der MDH und 19 Proben einer hydrogenosomalen Oxido-Reduktase identifiziert, die sich über das Gel verteilten. Die α -Untereinheit der Succinyl-CoA-Synthase

(SCS) wurde 10 x und die β -Untereinheit 11 x identifiziert. Allerdings wurden bisher keine ribosomalen Proteine sequenziert. Die Signale der SCS sind bei *T. vaginalis* deutlich intensiver auf den Gelen detektierbar als bei *T. foetus*, und es konnte insgesamt eine größere Anzahl an unterschiedlichen Proteinen identifiziert werden. Von den *T. foetus* Proteingelen wurden 192 Proteine isoliert und bisher 140 Proben massenspektrometrisch sequenziert. Es wurden jedoch nur 41 unabhängige Proteine isoliert (siehe Anhang 3), von denen 31 Proteine identifiziert werden konnten (Abb. 3.10).

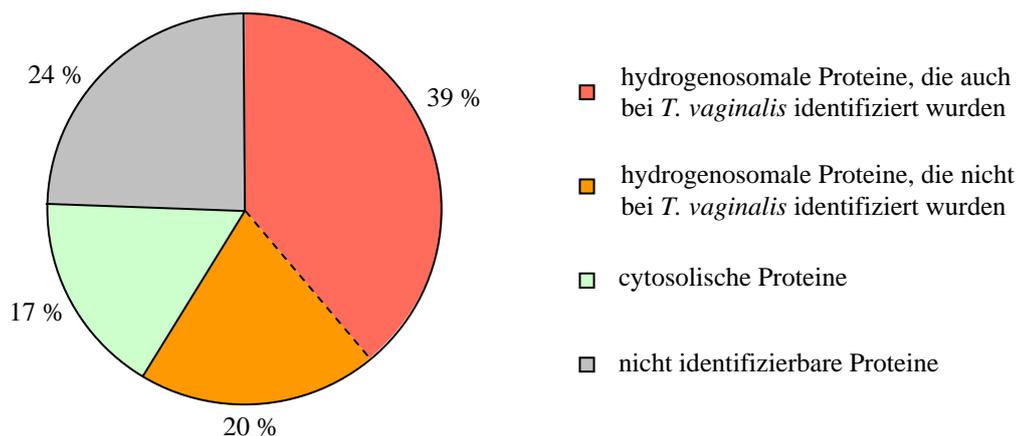


Abb. 3.10: Verteilung der 41 unabhängigen Proteine von *T. foetus* aus 2D-Polyacrylamidgelen der hydrogenosomalen Fraktion.

Es wurden insgesamt 24 Proteine als mögliche hydrogenosomale Proteine eingeordnet, von denen 16 Proteine auch bei *T. vaginalis* identifiziert wurden. Eine mögliche hydrogenosomale Transitsequenz besitzen 18 Proteine, von denen 12 ebenfalls von Carlton *et al.* (2007) als Transitpeptide vorhergesagt wurden.

3.4 Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Auf 2D-SDS-Polyacrylamidgelen von *T. vaginalis* konnte nur ein Membranprotein (Hmp31) identifiziert werden. Wahrscheinlich ist die Solubilisierung der hydrophoben Membranproteine unter den gewählten Bedingungen problematisch. Eine Alternative zu der 2D-SDS-PAGE stellt die Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) dar. Aus jeweils 2 mg Hydrogenosomen wurden Membranproteine extrahiert (siehe 2.7.5) und auf nativen 10-15 % Polyacrylamidgelen aufgetragen (Abb. 3.11).

In der ersten Dimension sind zwei Proteinkomplexe sichtbar, die in der denaturierenden zweiten Dimension der Größe entsprechend aufgetrennt wurden (die obere Bande erscheint als Doppelbande, da das Gel zwischen zwei Glasplatten liegend gescannt wurde).

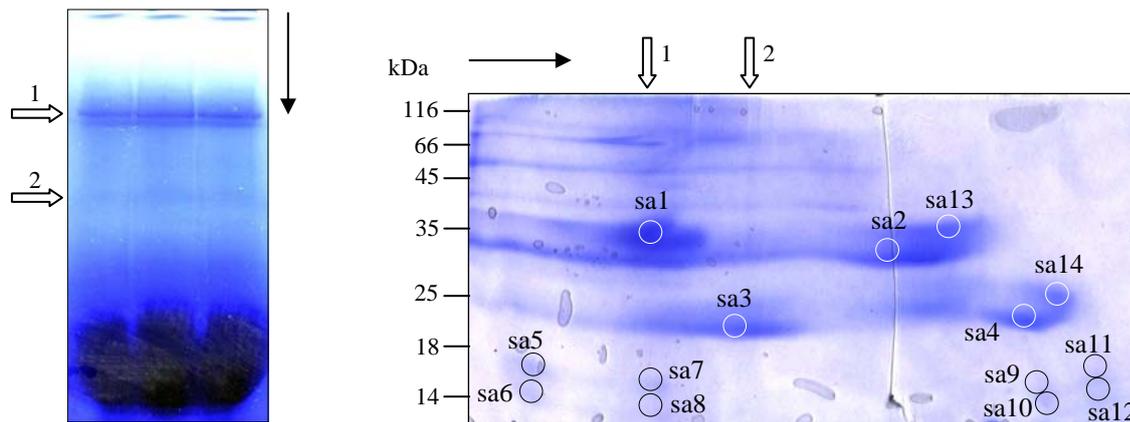


Abb. 3.11: Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Membranproteinen der hydrogenosomalen Fraktion aus *T. vaginalis*; links: erste Dimension (nativ), rechts: zweite Dimension (denaturierend); die schwarzen Pfeile geben die Laufrichtung der ersten Dimension an; die Blockpfeile kennzeichnen Proteinkomplexe der ersten Dimension; isolierte Proteine sind markiert.

Die sequenzierten Peptide der Proben sa1 bis sa14 sind in einer Tabelle in Anhang 4 zusammengefasst. Die membranständigen Proteine Hmp35 (sa1) und Hmp31 (sa2, sa13) konnten anhand sequenzierter Peptide mit der TIGR *T. vaginalis* Genomdatenbank identifiziert werden (Abb. 3.12). Die Peptide der Proben sa5, sa6, sa7 und sa8 identifizieren eine vakuoläre ATPase (84843.m00306), die Peptide der Proben sa3 und sa4/sa14 identifizieren hypothetische Proteine (95509.m00053 bzw. 137653.m00003), während die Peptide der Proben sa9-sa12 nicht eindeutig mittels TIGR Datenbank identifiziert werden konnten, da die Peptide homolog zu unterschiedlichen hypothetischen Proteinen waren.

Hmp35
(sa1) `MEPKTFETVGDsa1EATKLNKPLGVCVEENGTKVGVFTDLQLQNPSINSSFKLPVGTVDCN
IAKDGsa1VVGVVLKsa1PDLKQHGVTVSINPIEKNFTFSVKKECTCTHYEATLGYNsa1SAKKAsa1EAH
LYKQFAVKDSKVNsa1CYLDITGVNNTKPDVNYRIRYDLDKIGLRTYWDGKQsa1RFAAFLDLKK
AMIGTHFFFNKAVKsa1SVDIYGLKSFKCGKASLIATVsa1LGEQRCRLNFEsa1GCCDsa1CSYGAsa1KIDY
LHGEKPEITAKsa1FGGASKCCSHFsa1SCKYLATVTKsa1KEATTFGIQTSsa1SGTFPLHGsa1FGKATVGCAL
ADVsa1KDYKNIGYSFLV`

Hmp31
(sa2, sa13) `MAQPAEQILsa2IATSPKPSLSPVERLSVGFsa2IAGTsa2LSRsa2TLTsa2SPLDVVKMLMQVSSRGGSAKDT
IAQLWKEQGIAGsa2FWRGNWAACIRLGPQSAIKFYAYEsa2ELEKRIGKsa2GKPLVGIQRTVFGSLS
GVISQVLTYPsa2LDVIRTRITVYSGKYTGIFNCAFTMLKEEGFTSLFAGIVPTVMGVIPYEG
AQFYAYGGLKQLYsa2TTKIAPGKPIsa2SPWANCLIGAAAGMFSQTFsa2SYPFsa2DVIRKRMMLKDEKsa2G
KPIYSGMMQAFsa2STVYAKEGVAGLYRGVGLNLIKVVPFAALQFTILEETRRAFFKsa2VRAAID
QKKVEEIKGKVAPKKK`

Abb. 3.12: Sequenzen der Proteine Hmp35 (137855.m00003) und Hmp31 (88271.m00409) aus der TIGR *T. vaginalis* Genomdatenbank; sequenzierte Peptide der Proben sa1 bzw. sa2 und sa13 sind hervorgehoben.

Die Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese stellt möglicherweise den Weg zur Identifizierung der hydrogenosomalen Membranproteine dar.

3.5 Ribosomale Proteine in der hydrogenosomalen Fraktion von *Trichomonas vaginalis*

Auf den 2D-Polyacrylamidgelen der *T. vaginalis* Hydrogenosomen nach zwei Percoll-Gradienten wurden in dem Bereich pH 9-11 15 ribosomale Proteine mit Größen zwischen 14 und 25 kDa identifiziert (Abb. 3.13).

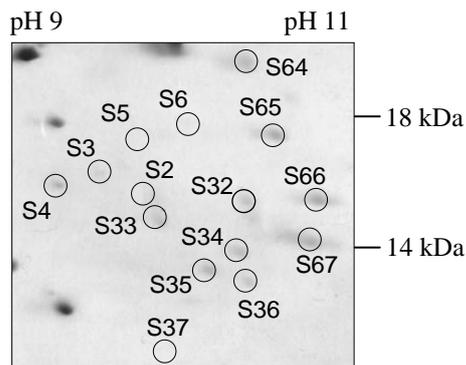


Abb. 3.13: Ausschnitt aus der 2D-SDS-PAGE pH 6-11 der hydrogenosomalen Fraktion nach zwei Percoll-Gradienten; die ribosomalen Proteine sind markiert.

Weitere an der Translation beteiligten Proteine wurden ebenfalls identifiziert: ein Protein des NAC (*nascent chain associated complex*, Proteine 105-107), ein poly-A bindendes Protein (Proteine 121 und 165) und der Elongationsfaktor EF-1 α (Proteine S48, S50). Das Vorhandensein dieser Proteine in der hydrogenosomalen Fraktion kann zwei mögliche Ursachen haben: eine Kontamination der Fraktion mit rauem endoplasmatischem Retikulum (ER) oder freien Ribosomen oder Co-translationaler Import von hydrogenosomalen Enzymen in das Organell.

Um die Möglichkeit einer Kontamination mit rauem endoplasmatischem Retikulum (ER) auszuschließen, wurde die Aktivität des ER-Enzyms Glucose-6-Phosphatase (G-6-Pase) in Gesamtzellextrakt und der hydrogenosomalen Fraktion bestimmt (siehe 2.10.11). Im Gesamtzellextrakt wurden $18,24 \pm 3,75 \text{ nmol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ gebildet, während in der hydrogenosomalen Fraktion kein Umsatz von Glucose-6-Phosphat messbar war.

Ein weiteres spezifisches Enzym des ER ist Calreticulin. Für eine Immunodetektion (siehe 2.10.10) wurde der Anti-Spinat-Calreticulin Antikörper (Navazio *et al.* 1995) mit einer Verdünnung von 1:2000 in 10 % (w/v) Milchpulver in TBS eingesetzt (Abb. 3.14). Als sekundärer Antikörper wurde der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Anti-Kaninchen Antikörper (Sigma), 1:3000 in 10 % (w/v) Milchpulver in TBS verdünnt, verwendet.

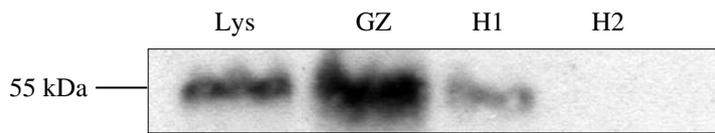


Abb. 3.14: Immunodetektion mit Anti-Spinat-Calreticulin Antikörper; Lys: Lysosomen, GZ: Gesamtzellextrakt, H1/H2: Hydrogenosomen nach 1 bzw. 2 Percoll Gradient(en); je 25 µg Protein.

Im Gesamtzellextrakt ist die größte Menge an Calreticulin vorhanden, die lysosomale Fraktion weist ebenfalls erhebliche Verunreinigungen mit ER auf. In der hydrogenosomalen Fraktion nach einem Gradienten ist Calreticulin in geringen Mengen vorhanden, während keine Verunreinigung mit ER in der hydrogenosomalen Fraktion nach zwei Gradienten detektierbar ist.

Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Hydrogenosomen nach zwei Percoll-Gradienten (siehe 2.7.6) konnte eine Verunreinigung zusätzlich ausgeschlossen werden, da kein raues ER sichtbar war (Abb. 3.15).

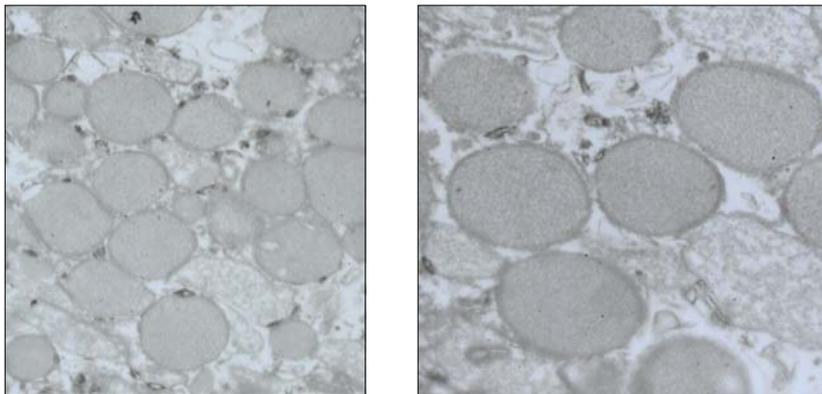


Abb. 3.15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* nach zwei Percoll-Gradienten, Vergrößerung links 1:12.000, rechts 1:20.000.

In diesen Dünnschnitten waren allerdings auch keine Ribosomen sichtbar. An Hefe-Mitochondrien konnte jedoch durch Sequenzierung isolierter mRNA ein co-translatinaler Import von mitochondrialen Proteinen nachgewiesen werden (Marc *et al.* 2002; Ades und Butow 1980). Es wurde daher getestet, ob aus der hydrogenosomalen Fraktion von *T. vaginalis* mRNA isoliert und somit ein Indiz für co-translatinalen Import in Hydrogenosomen festgestellt werden konnte.

3.6 mRNA Analyse der hydrogenosomalen Fraktion

Die Zusammensetzung der mRNAs, die an den Ribosomen in der hydrogenosomalen Fraktion translatiert werden, sollte untersucht werden. Dazu wurden Hydrogenosomen mit dem

Antibiotikum Cycloheximid als Zusatz im SMDI-Puffer (20 mg / 100 ml) isoliert und aus dieser Fraktion cDNA erstellt (siehe 2.9.7). Durch Cycloheximid wird die Translation bei Eukaryoten gehemmt und somit der Abbau von mRNAs verhindert. Aus Gesamtzellextrakt (GZ) von *T. vaginalis* wurde unter gleichen Bedingungen RNA isoliert und daraus cDNA synthetisiert (Abb. 3.16). Die Banden der ribosomalen RNA sind in der GZ-RNA deutlich zu erkennen, während in der RNA der hydrogenosomalen Fraktion durch die hohe RNA-Konzentration auf dem Gel die Banden nicht separiert wurden.

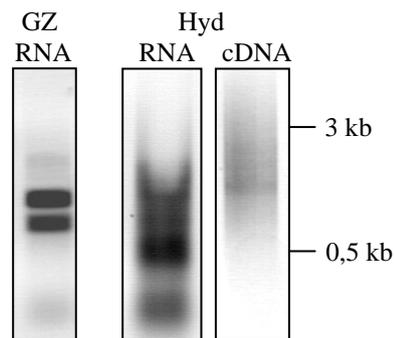


Abb. 3.16: Isolierte Gesamt-RNA aus Gesamtzellextrakt (GZ) und aus der hydrogenosomalen Fraktion (Hyd) von *T. vaginalis*, sowie aus Hyd-RNA synthetisierte cDNA; aufgetrennt wurden 0,5 µg GZ-RNA, 5 µg Hyd-RNA und 0,5 µg Hyd-cDNA.

Aus der „Gesamtzell-cDNA“ wurden 90 zufällige Sequenzen identifiziert, aus der hydrogenosomalen cDNA 99 Sequenzen (Anhang 5). Somit konnten die Zusammensetzungen der cDNAs aus hydrogenosomaler Fraktion und Gesamtzellextrakt miteinander verglichen werden (Abb. 3.17).

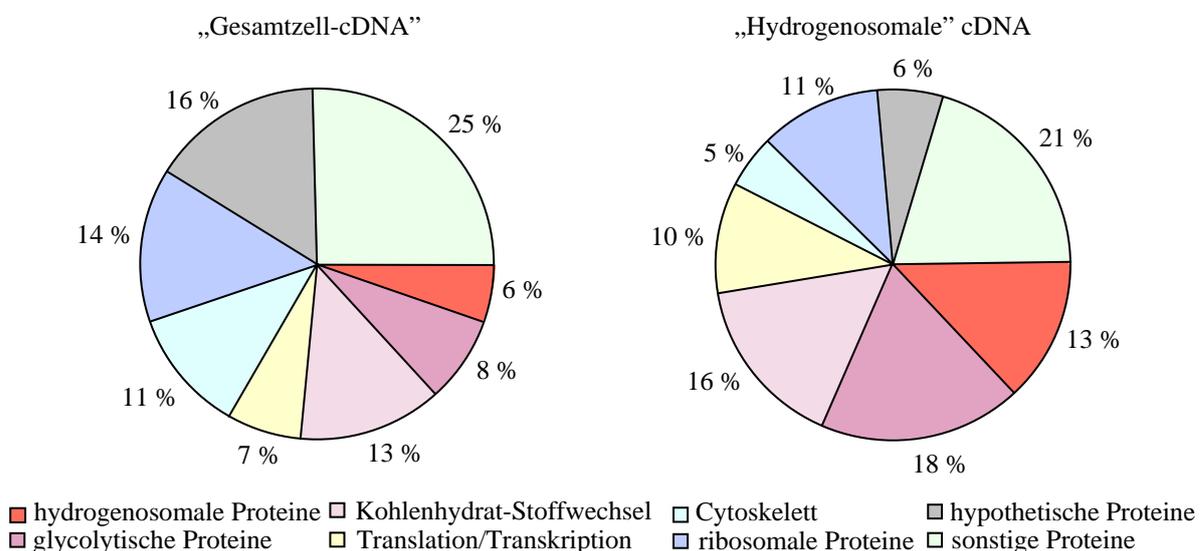


Abb. 3.17: Zusammenfassung der identifizierten Fragmente aus „Gesamtzell-cDNA“ und cDNA aus der hydrogenosomalen Fraktion von *T. vaginalis*.

Der Anteil an Sequenzen, die bekannte hydrogenosomale Proteine codieren, ist in der cDNA aus der „hydrogenosomalen“ mRNA doppelt so hoch wie der hydrogenosomale Anteil in der Gesamtzell-mRNA. Der Anteil der cDNAs glycolytischer Enzyme ist in der hydrogeno-

somalen Fraktion um das 2,25-fache (125 %) höher, und die Anzahl der Enzyme des Kohlenhydrat-Stoffwechsels ist um 23 % erhöht. Die Anzahl der an Transkription und Translation beteiligten Proteine ist um 43 % höher, während die Anteile der Proteine des Cytoskeletts um 55 % geringer und der ribosomalen Proteine um 22 % geringer sind. Der Anteil der hypothetischen, nicht identifizierbaren Proteine ist in der Gesamtzell-Fraktion um das 2,6-fache (167 %) und der Anteil der identifizierten Proteine, die in keine der spezifischen Gruppen einzuordnen sind, um 19 % höher als in der „hydrogenosomalen“ cDNA.

3.7 Analysen spezieller Proteine der hydrogenosomalen Fraktion

Verschiedene Proteine der hydrogenosomalen Fraktion von *T. vaginalis*, die keine weiteren eukaryotischen Homologe aufwiesen, bzw. deren Funktion zuvor nur in Bakterien beschrieben wurde, wurden näher untersucht. Sequenzen möglicher Fe-Hydrogenase Maturasen könnten Hinweise auf die Herkunft der Fe-Hydrogenase von *T. vaginalis*, und Proteine, die an Entgiftungsmechanismen reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sind, Aufschluss über den Schutz sauerstoffempfindlicher Proteine in Hydrogenosomen (wie z.B. PFOR, Hydrogenasen) vor oxidativem Stress liefern.

3.7.1 Fe-Hydrogenase Maturasen in *T. vaginalis*

Die massenspektrometrisch sequenzierten Peptide des Proteins S29 von 2D-Polyacrylamidgelen der pH-Gradienten 6-11 wurden als Peptide des ORF 88811.m00081 der TIGR Genom-Datenbank identifiziert (Abb. 3.18). In der Datenbank ist eine weitere sehr ähnliche Sequenz vorhanden (96484.m00069), die allerdings um 71 Aminosäuren am C-Terminus verkürzt ist und somit das Peptid EVQNITDEK nicht beinhaltet (Abb. 3.19).

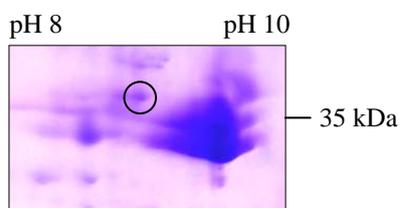


Abb. 3.18: Ausschnitt aus der 2D-SDS-PAGE pH 6-11, das Protein S29 (HydG) ist markiert.

Die vollständige Proteinsequenz des ORF 88811.m00081 weist eine abgeschätzte Größe von 58 kDa und einen pI von 8,8 auf. Da die identifizierten Peptide dem C-terminalen Abschnitt des Proteins entsprechen, war auf der SDS-PAGE wahrscheinlich ein N-terminal verkürztes Protein vorhanden. Werden die ersten 150 Aminosäuren des Proteins nicht miteinbezogen, so

als ThiH annotiert sind, ein Enzym der bakteriellen Thiamin Biosynthese. Die prokaryotischen Sequenzen waren bis zu 49 % mit der hydrogenosomalen Sequenz identisch. Ein Aminosäure-Alignment (siehe 2.11.1) der HydG Sequenzen aus *T. vaginalis* und *C. reinhardtii* ist in Abb. 3.19 dargestellt.

In den Chloroplasten der Grünalge *C. reinhardtii* ist neben dem *S*-Adenosylmethionin (SAM)-abhängigem Protein HydG ein Fusionsprotein aus einem weiteren SAM-Protein (HydE) und einer GTPase (HydF) an der Reifung der Fe-Hydrogenase beteiligt (Posewitz *et al.* 2004).

Eine BLAST Suche der *T. vaginalis* Genom-Datenbank (www.tigr.org; siehe 2.11.1) nach Homologen zu HydE und HydF mit dem HydEF Fusionsprotein von *C. reinhardtii* identifizierte unabhängige Leseraster für HydE (81202.m00098, 91566.m00125 und 93793.m00242, kodierend für Proteine von 44 kDa) und HydF (87122.m00057, kodierend für ein Protein von 48 kDa). Somit sind die drei Proteine im Genom von *T. vaginalis* vorhanden, die als Maturasen der Fe-Hydrogenase in *C. reinhardtii* identifiziert wurden.

Diese Gene, die für Homologe von HydG, HydE und HydF kodieren, werden alle in *T. vaginalis* exprimiert, da ihre Transkripte in der EST (*expressed sequence tag*)-Datenbank von P. Tang (Chang Universität, Taiwan) identifiziert bzw. über RT-PCR-Reaktionen amplifiziert werden konnten (durchgeführt in Kooperation mit Prof. J. Tachezy, Prag; Abb. 3.20) (Pütz *et al.* 2006).

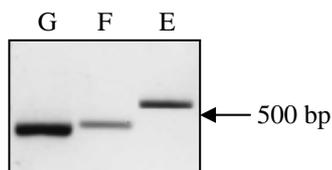


Abb. 3.20: Detektion der Transkripte von HydG, HydF und HydE durch RT-PCR; G: HydG (88811.m00081), F: HydF (87122.m00057), E: HydE (81202.m00098).

Die Beziehungen von HydG, HydE und HydF von *T. vaginalis* und *C. reinhardtii* zu homologen prokaryotischen Sequenzen wurden in Neighbor-Net Analysen untersucht (siehe 2.11.1). Die SAM-abhängigen Enzyme – Homologe zu HydG und HydE – sind miteinander verwandt und wurden in einem Netzwerk zusammengefasst (Abb. 3.21). Die eukaryotischen HydG gruppieren monophyletisch in einer Teilmenge prokaryotischer ThiH Sequenzen, während die eukaryotischen HydE einen gemeinsamen Ast innerhalb prokaryotischer Biotin-Synthasen bilden.

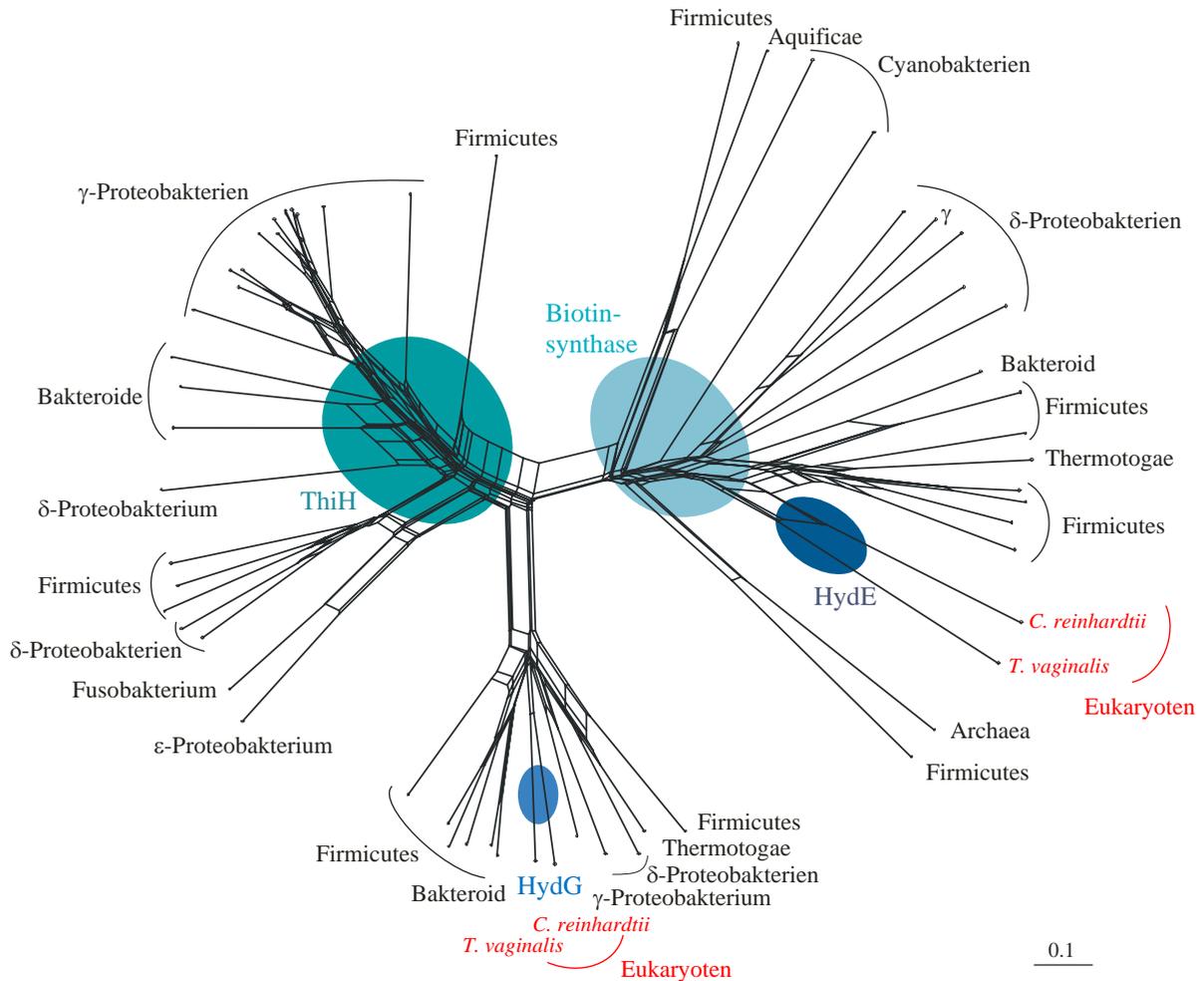


Abb. 3.21: Neighbor-Net Analyse der Sequenzähnlichkeiten von HydG und HydE (rot) und verwandte prokaryotische Sequenzen. Die eukaryotischen HydG Sequenzen gruppieren in einer Teilmenge prokaryotischer ThiH Sequenzen; eukaryotische HydE gruppieren in prokaryotischen Biotinsynthase Sequenzen. Die Zugangsnummern der verwendeten Sequenzen sind im Anhang 6 aufgeführt.

Die eukaryotischen HydF Sequenzen gehören zu einer Familie möglicher GTPasen und gruppieren in dem phylogenetischen Netzwerk nicht zusammen (Abb. 3.22). Die eubakteriellen homologen Sequenzen bilden zwei Gruppen. In der oberen Gruppe dieses Netzwerkes befinden sich die HydF Sequenzen von *T. vaginalis* und *E. histolytica*. Der zweiten Gruppe des Netzwerkes ist eine weitere eukaryotische Sequenz des Nukleomorphs des Cryptomonaden *Guillardia theta* zugeordnet.

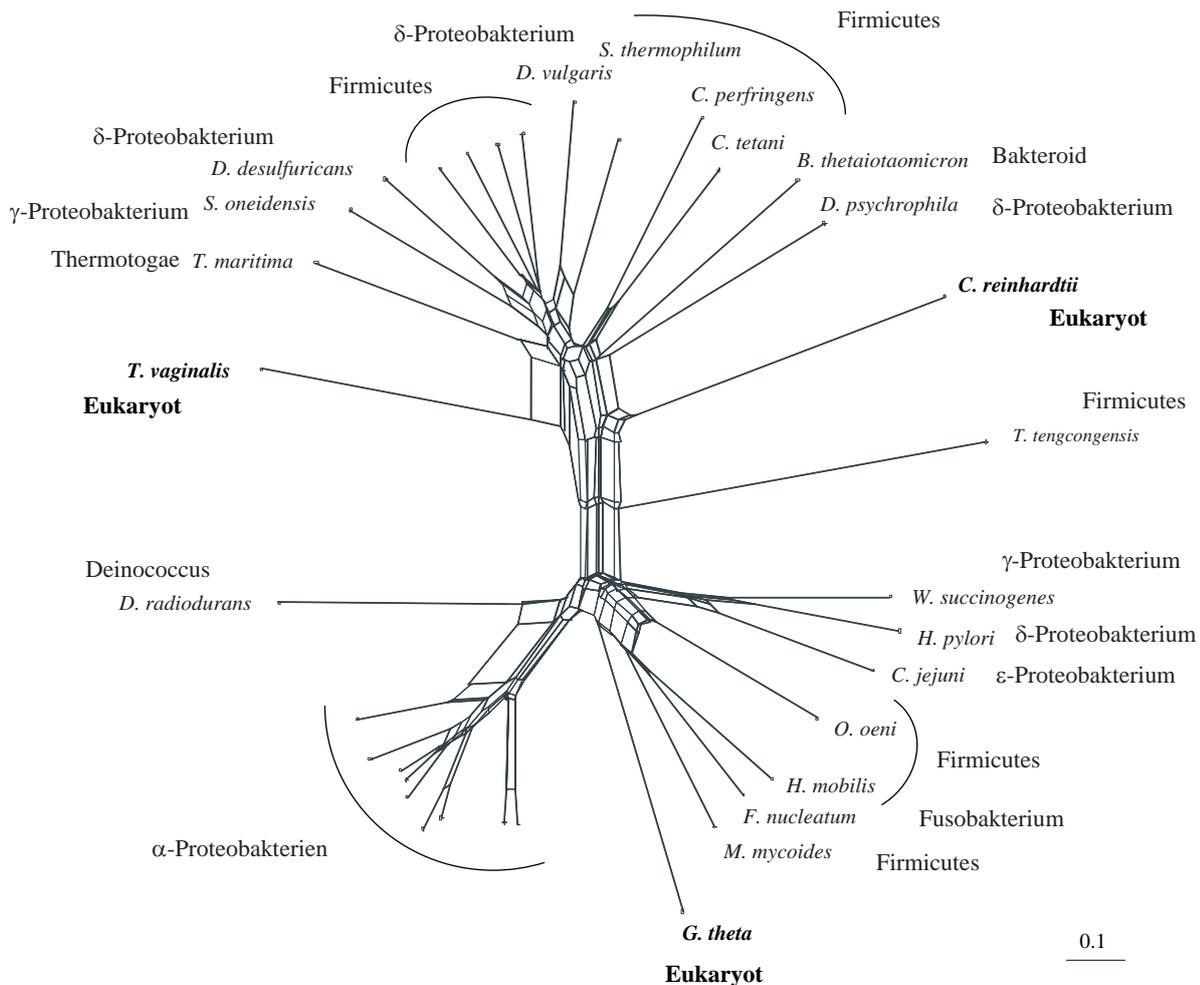


Abb. 3.22: Neighbor-Net Analyse von HydF und verwandten GTPasen. Die eukaryotischen HydF von *T. vaginalis* und *C. reinhardtii* liegen in der gleichen Gruppe von GTPasen, bilden jedoch keine monophyletische Gruppe. Eukaryotische Sequenzen sind fett hervorgehoben.

3.7.2 Intrazelluläre Lokalisierung der Proteine HydG, HydE und HydF

Die Proteinsequenzen von *T. vaginalis* für HydG, HydE und HydF weisen im Vergleich zu bekannten hydrogenosomalen Proteinen mögliche Transitpeptide an den N-Termini auf (Tab. 3.1; siehe 2.11.2). Aus genomischer DNA von *T. vaginalis* wurden die Sequenzen für die Hyd Proteine mit den unter 2.6 angegebenen Oligonukleotiden amplifiziert (siehe 2.9.2) und in den Expressionsvektor pTagvag2 kloniert, so dass die Plasmide pTvhydG, pTvhydE und pTvhydF erhalten wurden.

Für *in vivo* Lokalisierungs-Versuche wurden *T. vaginalis* T1 Zellen mit diesen Plasmiden transformiert (siehe 2.7.3). Die Lokalisierungen der überexprimierten Proteine mit Hämagglutinin (HA)-Anhang in der hydrogenosomalen Fraktion konnten mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie (HydG, HydF) (siehe 2.7.7) und einer Immunodetektion (HydG, HydE, HydF) gezeigt werden (Abb. 3.23 und 3.24).

Tab. 3.1: Vergleich der N-terminalen Transitpeptide der hydrogenosomalen Proteine Hsp60 und α -SCS mit den Hyd Proteinen; • bekannte Protease Schnittstelle, · vermutliche Protease Schnittstelle; das Arginin (R) an Position -2 der Protease Schnittstelle von hydrogenosomalen Transitpeptiden ist in rot gekennzeichnet.

Protein	N-terminale Sequenz	mitochondriale Lokalisierung vorhergesagt von iPSORT / TargetP
Hsp60	MSLIEAAKHFT R AF•AKA	+
α -SCS	MLAGDF S R N•LHK	+
HydG	MLASL S R S·YGK	+
HydE	MSHDHIV R L·LNP	-
HydF	MLTSIG R Y·FAK	+

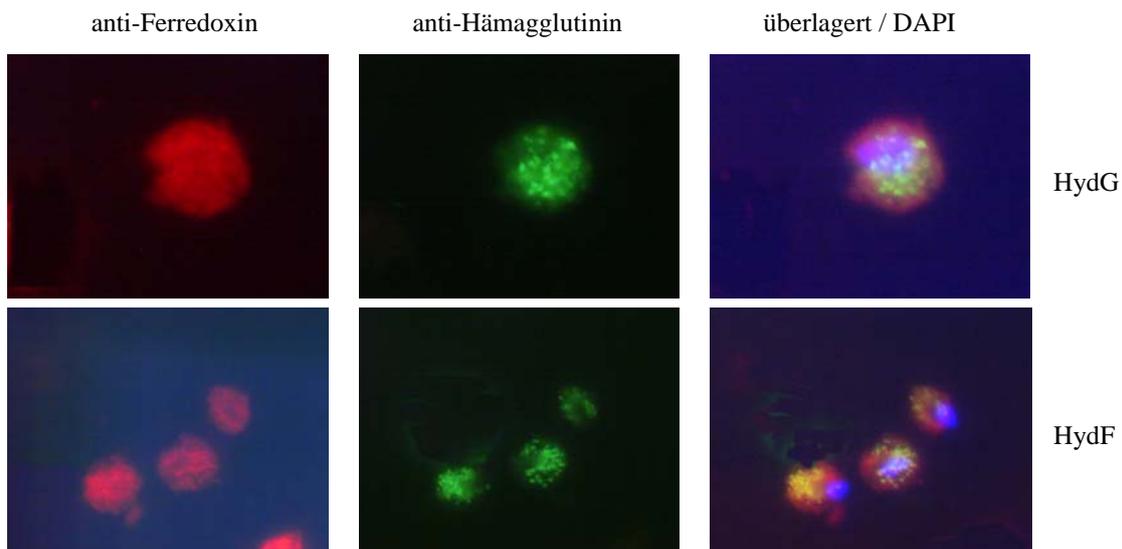


Abb. 3.23: Co-Lokalisierung von HydG und HydF mit HA-Anhang mit dem hydrogenosomalen Enzym Ferredoxin in den Hydrogenosomen; DAPI: mit DAPI angefärbter Zellkern.

Als hydrogenosomales Enzym wurde für die Immunodetektion die decarboxylierende Malat-Dehydrogenase und in den Immunofluoreszenz-Versuchen Ferredoxin verwendet.

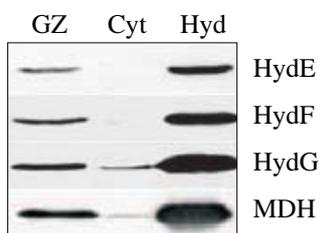


Abb. 3.24: Lokalisierung der HA-markierten hydrogenosomalen Proteine HydE, HydF und HydG in *T. vaginalis* mittels Immunodetektion; als Positivkontrolle wurde das hydrogenosomale Enzym Malat-Dehydrogenase (MDH) eingesetzt; GZ: Gesamtzellextrakt, Cyt: cytosolische Fraktion, Hyd: hydrogenosomale Fraktion.

Die Transformationen von *T. vaginalis*, die Immunodetektion, sowie die *in vivo* Nachweise der Lokalisierung der möglichen Maturasen erfolgten in Kooperation mit Prof. J. Tachezy (Prag, Tschechische Republik).

3.7.3 Mögliche Peroxidasen in den Hydrogenosomen von *T. vaginalis*

Auf den 2D-Polyacrylamidgelen pH 3-10 und pH 6-11 wurden zwei Proteine identifiziert, die Homologien zu bakteriellen Peroxidasen aufweisen: eine Thiolperoxidase (Tpx) und Rubrerythrin (Rbr) (Abb. 3.25).

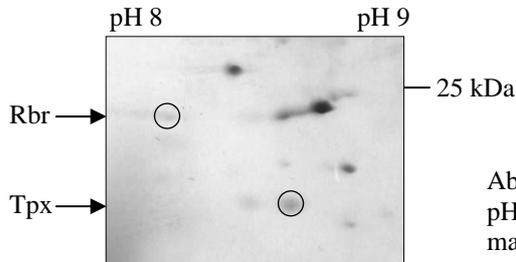


Abb. 3.25: Ausschnitt aus der 2D-SDS-PAGE pH 6-11, die Proteine S24 (Tpx) und S38 (Rbr) sind markiert.

3.7.3.1 Hydrogenosomale Thiolperoxidase

Die Peptide der Proben S24, S73 und 138 stimmen mit der Sequenz 82140.m00099 der *T. vaginalis* TIGR Datenbank überein. Die Sequenz kodiert eine Peroxidase, die zu der Gruppe der Peroxiredoxine gehört, der vorher nur eubakterielle Sequenzen zugeordnet waren. Diese Sequenz kodiert ein Protein mit einem geschätzten Molekulargewicht von 18,12 kDa und einem pI von 8,93, was der Position der Proteinprobe entspricht.

In der *T. vaginalis* Datenbank sind zwei weitere Sequenzen vorhanden, die für eine mögliche Tpx kodieren: 85876.m00193 und 84105.m00110. Letztere wurde bereits als cytosolische Thiolperoxidase identifiziert (Coombs *et al.* 2004). Alle drei Tpx gehören zu der 2-Cys Peroxiredoxin Untergruppe, und die Sequenz 82140.m00099 besitzt die drei hochkonservierten Cysteine (Cys⁶¹, Cys⁸² und Cys⁹⁵), die im Clustal W Alignment in Abb. 3.26 gekennzeichnet sind. Eine phylogenetische Analyse nach der Neighbor-Net Methode (Bryant und Moulton 2004; siehe 2.11.1) ist in Abbildung 3.27 dargestellt.

Das cytosolische Peroxiredoxin von *T. vaginalis* besitzt ein geschätztes Molekulargewicht von 22 kDa und ist den eubakteriellen AhpC (*alkyl hydroperoxide reductase peroxidase component*) genauso ähnlich wie den archaebakteriellen Sequenzen (Coombs *et al.* 2004), die Molekulargewichte von 20 kDa bzw. 24-25 kDa besitzen. Die hydrogenosomalen Sequenzen von *T. vaginalis* (jeweils 18 kDa), gruppieren mit den Sequenzen der periplasmatischen Tpx aus Eubakterien mit einem Molekulargewicht von 17-18 kDa.

Tv 82140	-----MIKTAFQGTP-VSLAGQFVKVGAKAPAFKLTKGDL
Tv 85876	-----MTTALQGNP-VTVKGNFVKVGGQAPFELVKGD
Tv 84105	-----MLVGKPAPAFKQAVFP-----DTDF
<i>Y. pestis</i>	MLYPSCCCYLKLFVLHICKRDPIMTQTVHFQGNP-VSVAGKLPQIGDKAKDFTLVAKDL
<i>E. coli</i>	-----MSQTVHFQGNP-VTVANSIPQAGSKAQTFTLVAKDL
<i>P. gingivalis</i>	-----MSLKIIFLTALSVMATVTLQKININTNGQLPGVGSVAPDFKAVRADL
	: * . . . *
	∇ ∇
Tv 82140	SSFTEKDINGK YAVLNIFP SMDTGVCAASVRKFNKLAASLPNA--VVLCSKDLPPFAQGR
Tv 85876	SSFHLS SDVKGYAVLNIFP SMDTGVCAASVRKFNVLATSLSDT--VVLAIKDLPPFAQTR
Tv 84105	KEVSLEQYK GKWLVLFSY PLDFTFVCPT EEIIEFS NKYEEFKKIGCEVLGLSVDSVFTHLA
<i>Y. pestis</i>	SDVALSSFAGKRKVLNIFPSIDTGVCAASVRKFNQLAGELENT--VVLCSIDLPPFAQSR
<i>E. coli</i>	SDVTLGQFAGKRKVLNIFPSIDTGCAVSVRKFNLQATEIDNT--VVLCSADLPPFAQSR
<i>P. gingivalis</i>	SEVSLSEFKGKR VVINIFP SIDTGVCAASVRRFNQEASSLNT--VVLCLSKDLPPFAQAR
 ** *: :* * **...: *. .: . ** : * * **:
	∇
Tv 82140	FCAA----EGIKNVVPLSDYK YTSKFAENY GVLMDGPLEGLLARSVVVVNPGQKVIYRE
Tv 85876	FCAN----EGIKNVIPLSDFRYTSHFAEDYGVLASGPMNGLLARAVVLDPTGKVIYTE
Tv 84105	WINTPRKEGGLGEIKYPLIGDLGAKIAKEYGFYMCEA---GHTLRGTAIIDPEGLIRHVQ
<i>Y. pestis</i>	FCGA----EGLSNVITLSTLR-GADFKQAYGVAITEGPLAGLTARAVVLDGQDNVIYSE
<i>E. coli</i>	FCGA----EGLNNVITLSTFR-NAEFLQAYGVAIADGPLKGLAARAVVVIDENDNVIFSQ
<i>P. gingivalis</i>	FCGA----EGLDKVITVSAFR-CDCFEKGYGLLMTDGPLKGLLARAVVVVDENKIIYEE
	: * : : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : :
Tv 82140	MVP-----EIVHEPNYDAAIAAIKNE--
Tv 85876	MVP-----EITHEPNYDAAMAALKH---
Tv 84105	MNHPDVGRNVDEILRLIKAYQFAAKHGEVCPAQWHGEGDLTIKPNPKASKEYFGKANN
<i>Y. pestis</i>	LVN-----EITTEPNYDAALAALK---
<i>E. coli</i>	LVD-----EITTEPDYEAALAVLKA---
<i>P. gingivalis</i>	LVP-----EITQEPNYEAAIAALK---
	: : : * : * : :

Abb. 3.26: Clustal W Alignment der Tpx Sequenzen von *T. vaginalis* (82140.m00099, 85876.m00193, 84105.m00110), *Yersinia pestis* (AAS62338), *Escherichia coli* (ZP_00703677) und *Porphyromonas gingivalis* (NP_90583); sequenzierte Peptide sind hervorgehoben; ∇ markieren die konservierten Cysteine Cys⁶¹, Cys⁸² und Cys⁹⁵.

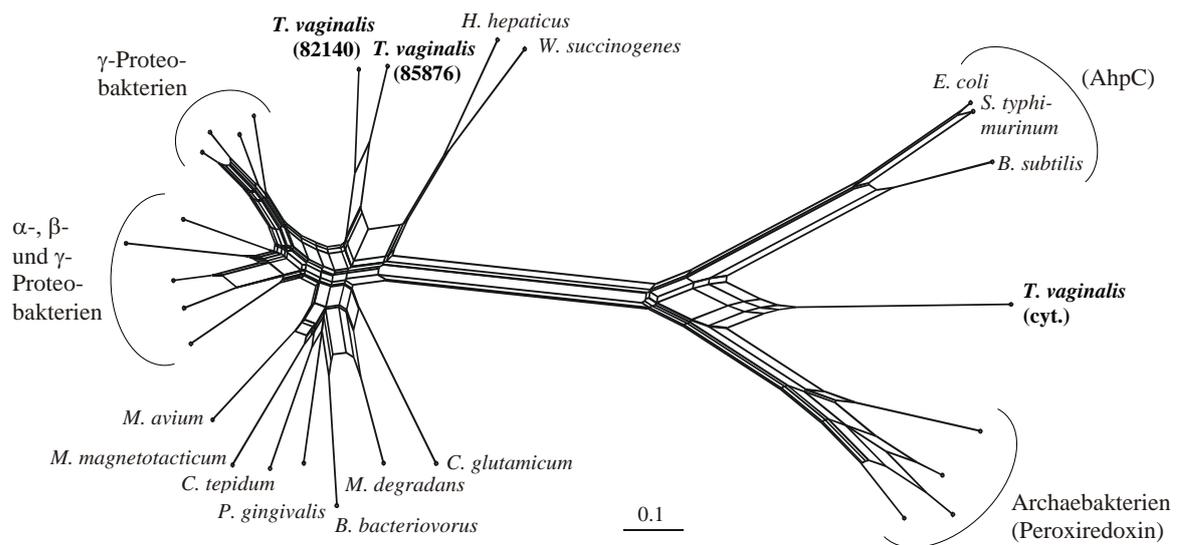


Abb. 3.27: Neighbor-Net Analyse der Peroxiredoxin Sequenzen; die *T. vaginalis* Sequenzen sind fett hervorgehoben.

In der Genomdatenbank von *T. vaginalis* sind fünf Sequenzen vorhanden, die Homologien zu Thioredoxin Reduktasen (TrxR) aufweisen: 92349.m00258 (L92), 89667.m00077 (L89) und 88289.m00178 (L88), mit einer durchschnittlichen Länge von 340 Aminosäuren, und 4394.m00089 (k84) und 96723.m00098 (k96), die am N-terminus um 33 bzw. 40 Aminosäuren verkürzt sind. Alle fünf TrxR-Proteinsequenzen besitzen ein aktives Zentrum mit dem Motiv CAxC (Abb. 3.28). Die Sequenz k96 wurde bereits als cytosolische Sequenz identifiziert (Coombs *et al.* 2004). Die intrazelluläre Lokalisierung von TrxR L88, L89 und L92 wird zurzeit im Rahmen einer Diplomarbeit untersucht, da die N-terminalen Verlängerungen dieser Sequenzen nicht eindeutig als Transitpeptide zu erkennen sind.

```

TRXR_84394 k84 -----MSGDIDWTKAETVDIAIIGSGPGGSTA
TRXR_96723 k96 -----MSAQAFDLVIGSGPGGSTA
TRXR_92349 L92 MLPILLPFLFRASCEDDDESDFGWGLDDLELPKEINWDEVPVIDVILGSGPAGCTA
TRXR_89667 L89 --MFSIIFFSRFSYSTDDDDDEMFWGDISKKFQPKSIDWSKAPLYDVIILGSGPAGSTA
TRXR_88289 L88 MMIFCFLFFWNTSPKEDYDED-----LQEEPIDWDETPLYDVIILGSGPAGSTA
                                     .      * : * : * * * . * : * *

TRXR_84394  ALYAARAGFKVIVLHGEVPGGQLTTTTTELENFPGWKGTGPGLVEAIEKQATEAGAEYKYE
TRXR_96723  ALYAARAGLKTIVLHGEVPGGQLTTTTTELENFPGWKGTGPGLVEHIEQQATAAGAEYRYE
TRXR_92349  ALYAARAGYNTVVLHGDVPGGQLVYTTTEVENFPSFNGTGPQLVDAMKEQAIRNGAKFLTD
TRXR_89667  ALYSARAALKTLVFHGHLLGGQLTTTTTEIENFPGFTGTGTNLVNIQTQATAAGAIYKKE
TRXR_88289  AIYTAQAGFSTLVIHGELPGGQLSKTTEVINFPFTFKGTGPELVKAIEMQATEYGAERYFD
* : * : * . . : * : * . : * * * * * * * : * * * : * * * : * * : :

TRXR_84394  VVTKVDVFSVNPKLLSTDMTHYKARSVIVATGAKALYLGLPNEERLKGKGVSGCATCDGP
TRXR_96723  VVTKVDVFSVNPKRLETDMGTTYDAKTVIIATGATAVYLGIPSEERLKGKRVSAACATCDGP
TRXR_92349  TIVKVNLSVFPRLLESYDNGYKCRSLIIATGAKAKYLGIPSEERLKNRGSVACAICDGA
TRXR_89667  SITKVNLTTSFKRIETDLGNAYLAHSIIATGANPRFLSLKNEENFRNRGLCVCATCDGA
TRXR_88289  TIVKTDLKSFPRLTTANGELRCRSLIIATGGRARMLGLESEHRLMGRGICTCAHCDGH
. * : * : . * : : : . : * : * : * * * . * : . * : : * : * * * *

TRXR_84394  LYKGDVAVVVGDDAAAEAAIFLSKICKSVKLVHRRDQLRASLPMRKRVEASSIQMIWNT
TRXR_96723  LYKGNVCVVGDDAAAEALFLNNICKSVHMIHRRDQLRASLPMRKRVEKSTIKMVWDS
TRXR_92349  LYSNQDAIVVGGDVAAEEALYLAKICRTVCLFHRDELRLASNPMKRRLAASKVQIIYDT
TRXR_89667  LYANKDVAVVVGDDSAVHESIYLSNICSSVKLFVRSSELRASAAAMKQVLAKSTVEVIYNT
TRXR_88289  LFKGKSVVVGDDMASIHEALYLSKICSNVTLVSQSSKLRTITNMDETPSSNGIKVITNT
* : . : * : * * * : . * : * : * * . * : . : * : * : . : * : * : : :

TRXR_84394  VIEDVLGENKVTGVKKNVVTNEVSEIPCDGLFVAIGHKPATEVFKDYLTQDEQGYFLTN
TRXR_96723  EVDEILGENKVTAVRVKNKKTGETQEIPCDGIFIAIGHRPATAIFKEYLETDAQGYFVTN
TRXR_92349  VIDEVLGEDFVTGVQKNVKTNELTNHTVSALFVAIGHFPETSIFEGQLDRDKGGYFITD
TRXR_89667  EIKGYLQQFLTAVDTKNSKTGEVKRYKLSAVFLAIGQNPATKEFEGQLELDKNKYIVLK
TRXR_88289  VVKNITGTYGVSQVTLFDKINNRMYNICCSGVFISIGQIPETSIFRDVLPVKNKYFITD
. . * : * : * : . . . . . : * : * : * * * * * : * : * : .

TRXR_84394  GTPVTSIPGVFVCGDCADRHYRQAITSAAATGCQAALLAEKYLTD-----
TRXR_96723  GSPATKVPGVFVCGDCADRRTYRQAITSAGTGCQAALLAERYLSD-----
TRXR_92349  GTPRTKVPGVFVAGDCADKQVYRQAITSAGTGCQAALLAEHYLADLDAEENQE
TRXR_89667  NGAETSVKGVFAAGDVANPEYRQAIYAAGTGCQAALQAEKYISQVKAI----
TRXR_88289  GTPKTKIPGVFVAGDCTSQEIKQAVTAAGDGCKAGIYAAKYLQTL-----
. . * : * : * * . * * : . : * : * : * * : * : * : * : * :

```

Abb. 3.28: Clustal W Alignment der fünf Thioredoxin Reduktasen aus der Genom-Datenbank von *T. vaginalis*; das aktive Zentrum mit der Sequenz CAxC ist hervorgehoben.

Ein hydrogenosomales Thioredoxin (Trx) konnten anhand des Proteins 104 identifiziert

werden. Die Sequenz der TIGR Datenbank, welcher die sequenzierten Peptide entsprechen, (83152.m00031), weist ein mögliches Transitpeptid für Hydrogenosomen auf (Abb. 3.29). In der Datenbank sind eine Reihe weiterer Trx Sequenzen annotiert, allerdings weisen nur zwei Sequenzen eine N-terminale Verlängerung von 8 Aminosäuren auf, die eine Transitsequenz darstellen könnten: 83152.m00031 und 93656.m00039. Die bereits charakterisierte Trx Sequenz 84394.m00066 (Coombs *et al.* 2004) ist als cytosolische Sequenz dem Alignment beigelegt worden.

```

TRX_83152      MLSSISSFSRFALEHFEGNVDALKAYVNKKDGLVVVDFADWCGPCKQIGKILPSIADKYP
TRX_93656      MLSSISSFARFALDHFEGSHIDLKGLVDNTNGLVVVDFADWCGPCKNIGRILPKIAEAYP
TRX_84394      -----MSDP IVHFNGTHEALLNRIKEAPGLVLDVDFATWCGPCQRLGQILPSIAEANK
                **:* . * :.: **:* **:* **:* :.: **:* **:*

TRX_83152      KVTFLKANVDESADLAEHFKVEVVPQFKFFKGG--EFKEIRTIVGADVDTLNKYVEELQ
TRX_93656      KVTILKANVDESPDLAEHFKEVVPQFKFFKSGSNELKEIRTIVGADVDTLTKYIDELQ
TRX_84394      DVTFIKVDVDKNGNAADAYGVSSIPALFFVKKEG-NEIKTLDQFVGADVSRKADIEKFK
                .**:* .:**: . : * : * . : * : * . ** * ** * : : **:* . . : : : :

```

Abb. 3.29: Clustal W Alignment von drei Trx Sequenzen aus *T. vaginalis*; die sequenzierten Peptide sind hervorgehoben und die möglichen Transitpeptide kursiv dargestellt; der N-Terminus wurde aufgrund geringer Konservierung manuell bearbeitet.

In den Hydrogenosomen von *T. vaginalis* ist somit mit großer Wahrscheinlichkeit ein komplettes Thioredoxin-abhängiges Peroxidase-System vorhanden.

3.7.3.2 Rubrerythrin

In der hydrogenosomalen Fraktion von *T. vaginalis* wurden die Peptide der Proben 18, 20, 22, S38 und S39 der Proteinsequenz 82414.m00151 der TIGR Datenbank zugeordnet (Abb. 3.30). Das Protein weist Homologien zu dem Nicht-Häm Eisenprotein Rubrerythrin aus anaeroben Bakterien auf. Rubrerythrin (Rbr) ist ein Homodimer aus 21 kDa großen Untereinheiten mit einer C-terminalen Rubredoxin-ähnlichen $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$ Domäne und einem N-terminalen Di-Eisen-Zentrum (Jin *et al.* 2002). In der *T. vaginalis* Genom Datenbank sind weitere fünf homologe Sequenzen vorhanden (89416.m00120, 93440.m00615, 86319.m00266, 92945.m0005, 92945.m00045), welche jedoch nicht mit den sequenzierten Peptiden übereinstimmen. Ferner entsprechen die Molekulargewichte und pIs dieser fünf Proteine nicht der Position der identifizierten Proteine (Tab. 3.2).

bzw. 58 % Identität zu der RbrT Sequenz auf. Den Sequenzen RbrA und RbrB, die zu 78 % identisch sind, fehlt ein Glutamat (Glu⁹⁷) des Di-Eisen-Zentrums, und sie sind zu 50 % mit der Sequenz 82414 identisch. Diese Isoformen konnten bisher auf keinem 2D-Gel identifiziert werden.

Eine Sequenz mit nur 27 % Aminosäure-Identität ist in dem Genom der Cyanellen von *Cyanophora paradoxa* (NCBI Zugangsnummer T06933) kodiert. Eine homologe Sequenz, mit einer Aminosäure-Identität von 42 % zu der *T. vaginalis* Rbr Sequenz, konnte in dem Genom von *Entamoeba histolytica* (TIGR Zugangsnummer 131.m00144) identifiziert werden. In der Genomdatenbank von *Giardia intestinalis* (www.ncbi.nlm.nih.gov) konnte keine homologe Sequenz ermittelt werden, und es sind keine weiteren eukaryotischen Rbr Sequenzen bekannt.

In dem in Abb. 3.30 dargestellten multiplen Alignment der *T. vaginalis* und *E. histolytica* Rbr Sequenzen sind die in den bakteriellen Sequenzen konservierten fünf Glutamat-Reste und der Histidin-Rest, die das Sauerstoff-überbrückte Di-Eisen-Zentrum bilden, sowie die Cystein-Reste, die an dem [Fe(SCys)₄] Zentrum beteiligt sind, markiert (Jin *et al.* 2002).

3.7.3.3 Intrazelluläre Lokalisierung von Rubrerythrin

Die Rubrerythrin Sequenzen weisen keine typischen hydrogenosomalen N-terminalen Transit-Sequenzen auf, die in den meisten Fällen Serin-reich sind, mit einem Methionin-Leucin Dipeptid starten und ein Arginin an zweiter Position nach der Prozessierungsstelle aufweisen (Dyall *et al.* 2000). Um die Lokalisierung von Rubrerythrin in *T. vaginalis* zu untersuchen, wurde die Rbr-Sequenz 82414 aus genomischer DNA mit den Primern „Rubr forS1“ und „Rubr revS1“ amplifiziert (siehe 2.9.2) und in den Vektor pTagvag2 kloniert. *T. vaginalis* T1 Zellen wurden mit dem resultierenden Plasmid pTvrbr transformiert (siehe 2.7.3) und die Lokalisierung des überexprimierten Rbr mit Hämagglutinin-Anhang mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 3.31; siehe 2.7.7).

Das Hämagglutinin Epitop des rekombinanten Rubrerythrin wurde in einer großen Anzahl kleiner Organellen lokalisiert. Der Vergleich mit dem hydrogenosomalen Enzym Ferredoxin (Bradley *et al.* 1997) veranschaulichte die Co-Lokalisierung der beiden Proteine und somit die hydrogenosomale Lokalisierung von Rubrerythrin.

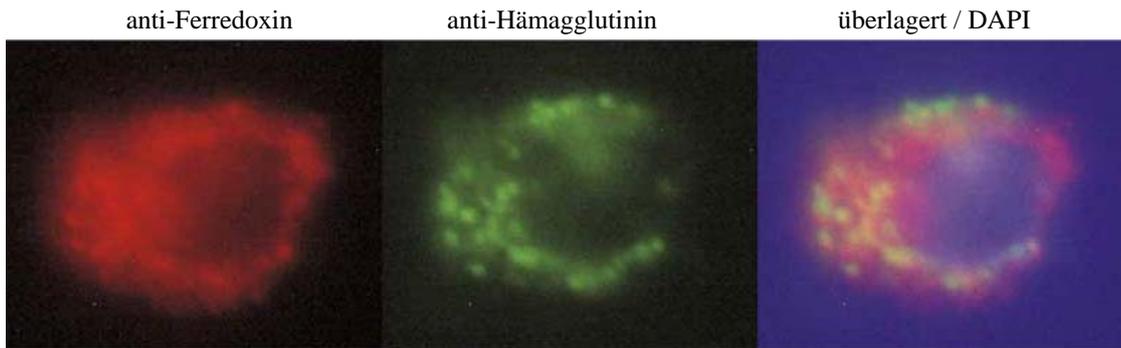


Abb. 3.31: Co-Lokalisierung von Rbr mit HA-Anhang mit dem hydrogenosomalen Enzym Ferredoxin in den Hydrogenosomen von *T. vaginalis*; DAPI: mit DAPI angefarbter Zellkern.

3.7.3.4 Phylogenetische Analyse von Rubrerythrin

Eine Neighbor-Net Analyse (siehe 2.11.1) der Rubrerythrin Sequenzen aus *T. vaginalis* und *E. histolytica* mit homologen Sequenzen von Eubakterien und Archaeobakterien ergab das Netzwerk in Abb. 3.32. Die einzige definierte monophyletische Gruppe, die in diesem Netzwerk sichtbar ist, sind die Cyanobakterien.

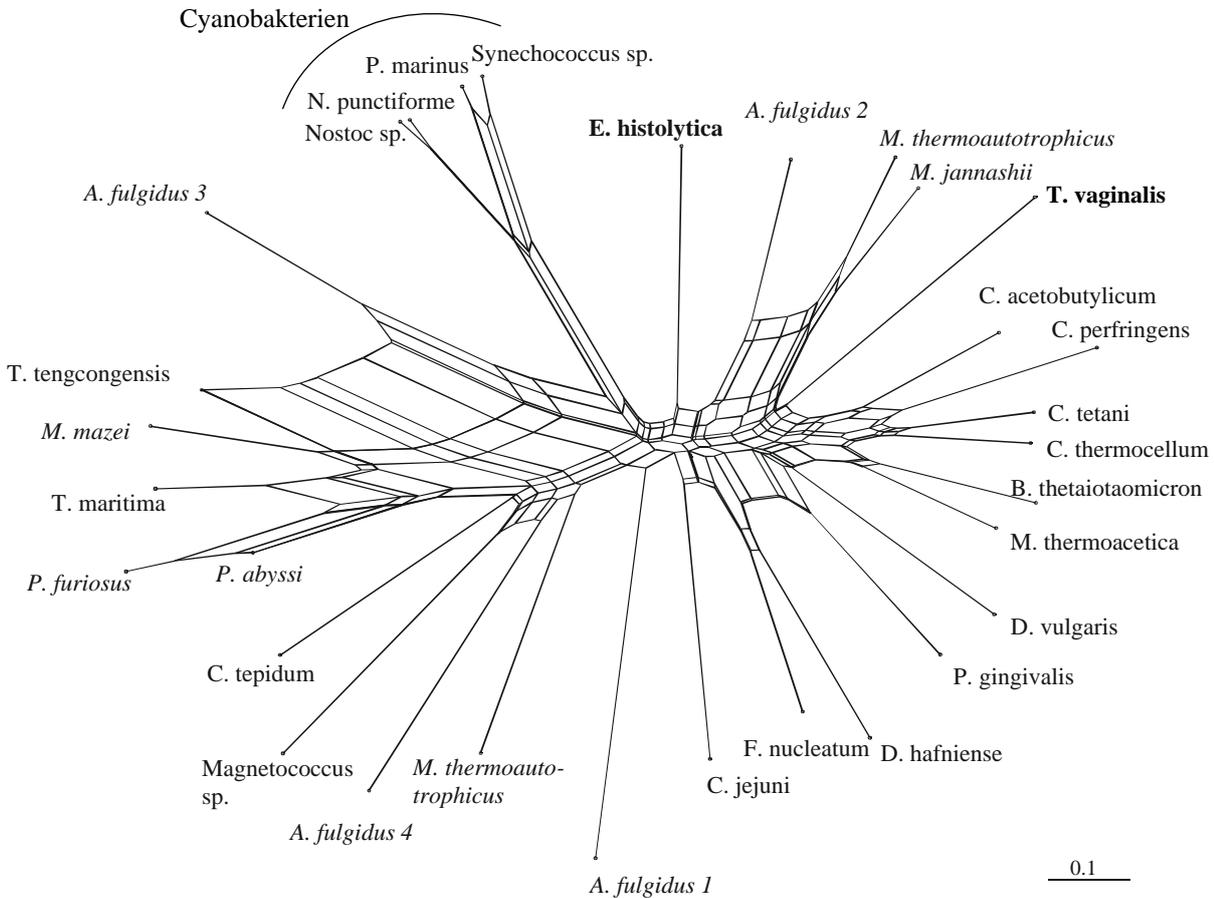


Abb. 3.32: Neighbor-Net Analyse der Rubrerythrin Sequenzen; Archaeobakterien sind kursiv und die eukaryotischen Sequenzen von *T. vaginalis* und *E. histolytica* sind fett dargestellt.

Die zwei prokaryotischen Reiche der Eubakterien und Archaeobakterien gruppieren nicht zu einer monophyletischen Gruppe, sogar die vier Isoformen des Archaeobakteriums *A. fulgidus* sind innerhalb des Netzwerkes verstreut. In dieser Neighbor-Net Analyse gruppieren die beiden eukaryotischen Sequenzen von *T. vaginalis* und *E. histolytica* nicht zusammen.

3.7.3.5 Heterologe Expressionen von Rubrerythrin

Für Expressionsversuche wurde die Sequenz des Rubrerythrins, das auf 2D-Polyacrylamidgelen identifiziert wurde (RbrT), in den Vektor pTrcHis2A kloniert, der für einen C-terminalen His-Anhang kodiert. Zusätzlich wurde diese Sequenz in den Expressionsvektor pET-32a inseriert (RbrR), da dieser Vektor einen N-terminalen His-Anhang, sowie einen N-terminalen Thioredoxin- und S-Anhang, gefolgt von einer Enterokinase-Prozessierungsstelle kodiert. Durch diese Prozessierungsstelle besteht die Möglichkeit den gesamten N-terminalen Anhang mittels Enterokinase von dem exprimierten Rubrerythrin zu spalten, falls der Anhang die Reaktion des Enzyms stört. Ferner wurden die Rubrerythrin Sequenzen von RbrB, das einen Aminosäureaustausch (Glu⁹⁷) innerhalb des Di-Eisen-Zentrums besitzt, RbrK, das N-terminal verkürzt ist (Abb. 3.30), und Rubrerythrin aus *E. histolytica* (EntRbr) in den Expressionsvektor pTrcHis2A kloniert. Für die Amplifikationen dieser Sequenzen aus genomischer DNA von *T. vaginalis* bzw. *E. histolytica* wurden die unter 2.6 aufgeführten Oligonukleotide verwendet (siehe 2.9.2). *E. coli* XL1-Blue bzw. BL21(DE3) Zellen wurden mit den erhaltenen Plasmiden transformiert, 50 ml Expressionskulturen mit 1 mM IPTG induziert und über Nacht bei 16 °C inkubiert (siehe 2.8.1). Die Zellen wurden unter nativen Bedingungen lysiert und die Proteine mit His-Anhang über Ni-NTA Agarose gereinigt (Abb. 3.33 und 3.34).

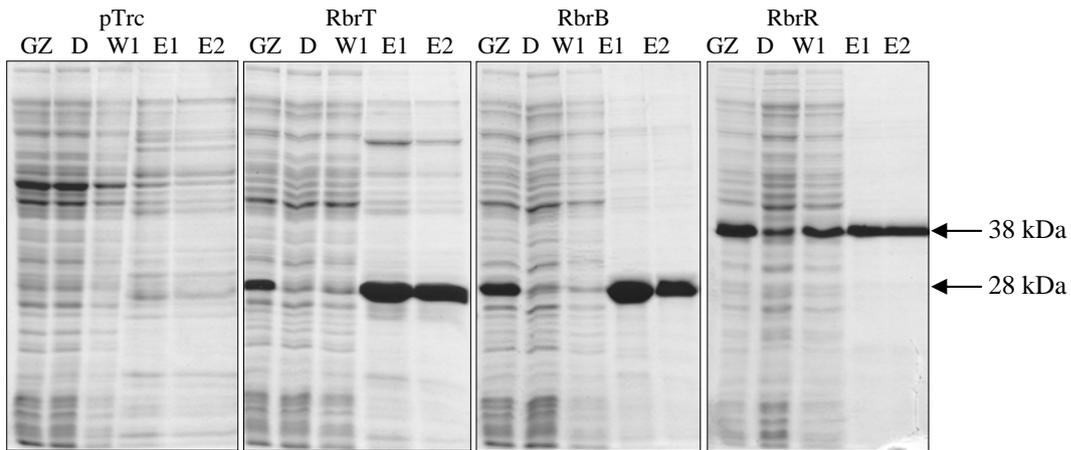


Abb. 3.33: Coomassie-gefärbte 12 % SDS-PAGE der Reinigungsschritte von dem Leervektor pTrcHis2A und den rekombinanten Proteinen RbrT, RbrB und RbrR aus *E. coli* Expressionskulturen über Ni-NTA Agarose; induziert wurde mit 1 mM IPTG; die Expression erfolgte ÜN bei 16 °C; GZ: Gesamtzellextrakt vor der Ni-NTA Zugabe, D: Durchfluss, W1: erster Waschschrift, E1/E2: Elutionen.

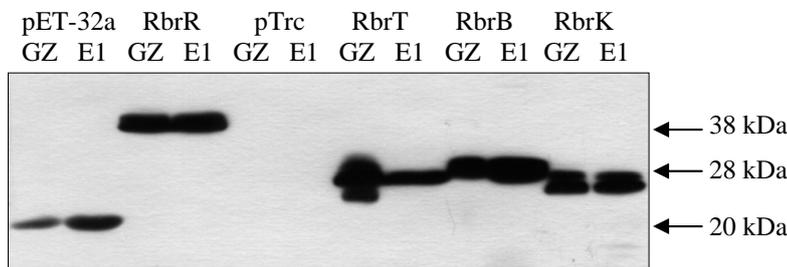


Abb. 3.34: Immunodetektion des His-Anhangs der Rbr-Konstrukte in pET-32a bzw. pTrsHis2A mit *E. coli* BL21 (DE3) bzw. XL1-Blue als Expressionsstamm; induziert wurde mit 1 mM IPTG; die Expression erfolgte ÜN bei 16 °C; GZ: Gesamtzellextrakt, E1: Elution nach Ni-NTA Reinigung.

Für die Expression von EntRbr wurden 200 ml Kulturen verwendet, da aus kleineren Kulturvolumina keine ausreichende Menge des Proteins erhalten wurde. Dem Lysispuffer wurde 30 % (w/v) Glycerin zugefügt, wodurch eine bessere Löslichkeit des Proteins im Überstand erreicht werden konnte (Abb. 3.35).

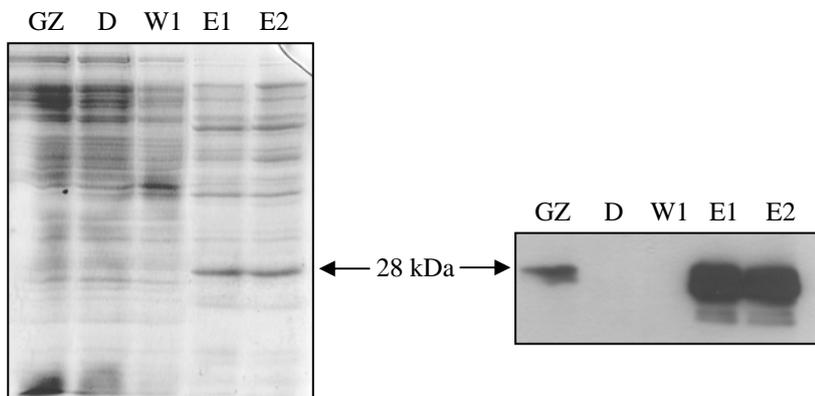


Abb. 3.35: Coomassie-gefärbte 12 % SDS-PAGE (links) und Immunodetektion des His-Anhangs (rechts) der Reinigungsschritte des rekombinanten Proteins EntRbr aus *E. coli* XL1-Blue Expressionskulturen über Ni-NTA Agarose; induziert wurde mit 0,5 mM IPTG; die Expression erfolgte ÜN bei 16 °C; GZ: Gesamtzellextrakt vor der Ni-NTA Zugabe, D: Durchfluss, W1: erster Waschschrift, E1/E2: Elutionen.

Für Untersuchungen, welchen Einfluss der N-Terminus von RbrT auf die Aktivität dieses Proteins hat, wurde ein um 10 Aminosäuren verkürztes RbrT Protein (RbrTK) mit den unter 2.6 aufgeführten Oligonukleotiden amplifiziert (Abb. 3.36).

```
RbrT      atgtctcttaaaggcaccagacagaaaagaatcttgcttgcgctttcgccggtgagtc
RbrT      M  S  L  K  G  T  Q  T  E  K  N  L  A  C  A  F  A  G  E  S
RbrTK                               L  A  C  A  F  A  G  E  S
```

Abb. 3.36: Vergleich der N-terminalen Proteinsequenzen von RbrT und RbrTK; die verwendeten Oligonukleotide wurden so gewählt, dass RbrTK am N-Terminus um 10 Aminosäuren verkürzt wurde; das Start-Methionin wird durch die verwendeten Vektoren kodiert und ist daher kursiv dargestellt; zusätzlich ist die Nukleotidsequenz des RbrT beigefügt.

In dem Vektor pTrcHis2A konnte das Protein RbrTK nicht exprimiert werden. Daher wurden RbrT und RbrTK zusätzlich in den Vektor pET-21b kloniert (RbrT21 und RbrTK21), wodurch eine Expression des RbrTK erzielt werden konnte. Die Expressionen wurden über Immunodetektionen kontrolliert (Abb. 3.37).

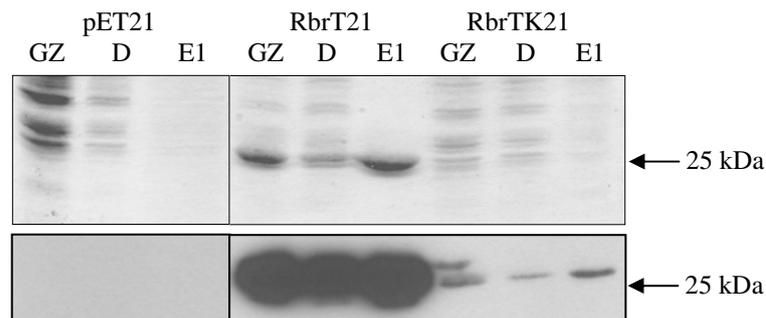


Abb. 3.37: Coomassie-gefärbte 12 % SDS-PAGE (oben) und Immunodetektion des Leervektors pET-21b und des His-Anhangs (unten) der Rbr-Konstrukte RbrT21 und RbrTK21 in pET-21b aus *E. coli* BL21 (DE3); induziert wurde mit 0,1 mM IPTG; die Expression erfolgte ÜN bei 16 °C; GZ: Gesamtzellextrakt, D: Durchfluss, E1: Elution nach Ni-NTA Reinigung.

Bei den Kulturen von RbrT21 reichte ein Kulturvolumen von 50 ml aus, um detektierbare Mengen an überexprimiertem Protein zu erhalten. Obwohl die Sequenz von RbrTK21 im gleichen Vektor unter gleichen Bedingungen exprimiert wurde, konnten auch in 200 ml Kultur keine vergleichbare Anreicherung des Proteins RbrTK21 in den Eluatn erzielt werden.

3.7.3.6 Anti-Rubrerithrin Antikörper

Für die Herstellung eines Anti-Rubrerithrin Antikörpers wurden *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit dem Plasmid pET-RbrR (siehe 3.7.3.5) transformiert. Die Expression erfolgte nach Induktion mit 1 mM IPTG bei 30 °C für 3 h. Die Zellen wurden unter nativen Bedingungen

lysiert und das Protein RbrR mit His-Anhang über Ni-NTA Agarose gereinigt (Abb. 3.38). Für die Antikörperproduktion in Kaninchen wurden von einem 50 ml Versuchsansatz drei Proben mit jeweils > 100 mg Protein einer ausgeschnittenen RbrR-Bande an die Firma Eurogentec (Liège, Belgien) geschickt.

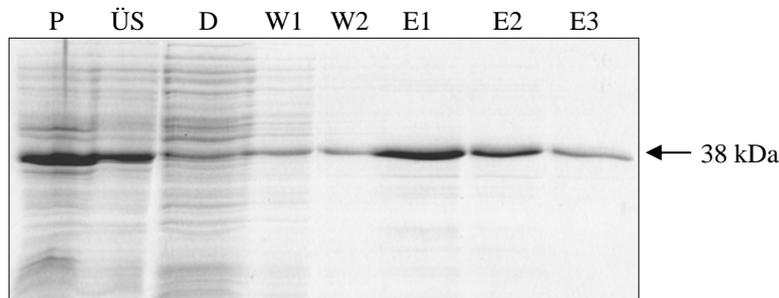


Abb. 3.38: Coomassie-gefärbte 12 % SDS-PAGE mit den Reinigungsschritten des RbrR/His für die Antikörperproduktion; aufgetragen sind die Fraktionen der Ni-NTA Reinigung; P: Pellet, ÜS: Überstand nach nativem Aufschluss, D: Durchfluss nach Ni-NTA Inkubation, W1/W2: Waschschrte, E1/E2/E3: Elutionen.

Zum Test des erhaltenen Antikörpers wurden die Fraktionen Gesamtzellextrakt und Elution 1 der in *E. coli* überexprimierten Proteine RbrT, RbrB und RbrR in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pTrcHis2A verwendet. Der Anti-Rbr-Antikörper wurde 1:1000 in 10 % (w/v) Milchpulver in TBS verdünnt, und als sekundärer Antikörper wurde der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Anti-Kaninchen Antikörper (Sigma), 1:70.000 in 10 % (w/v) Milchpulver in TBS verdünnt, verwendet (Abb. 3.39).

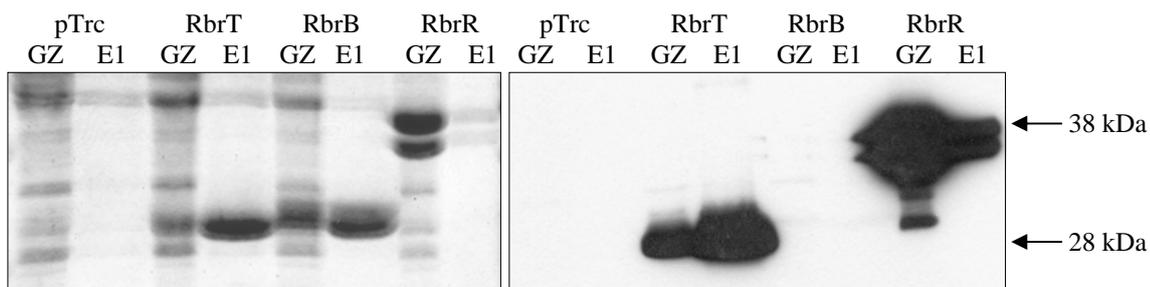


Abb. 3.39: 12 % SDS-PAGE nach Coomassiefärbung (links) und Test des Anti-Rbr-Antikörpers (rechts) mit Immunodetektion des RbrT und RbrR exprimiert in *E. coli*; RbrB wurde von dem verwendeten Antikörper nicht detektiert; GZ: Gesamtzellextrakt, E1: Elution nach Ni-NTA Reinigung.

Der Antikörper band spezifisch an die Proteine RbrT und RbrR, bei dem Leervektor und RbrB waren keine Signale detektierbar.

Der Nachweis von Rubrerythrin in *T. vaginalis* wurde durch Immunodetektion mit Gesamtzellextrakt und hydrogenosomaler Fraktion durchgeführt (Abb. 3.40). Als Positivkontrolle wurde angereichertes RbrT aufgetragen. Ferner wurden die Fraktionen des Prä-Immun-Serums (Rbr 0) und des ersten Testblutens (Rbr 1) eingesetzt.

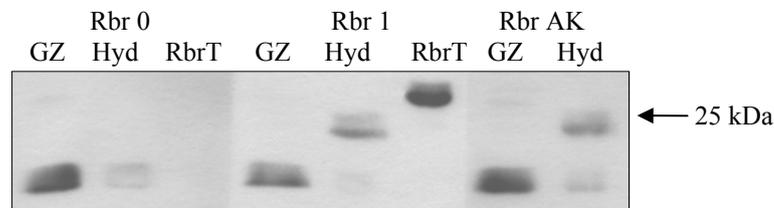


Abb. 3.40: Immunodetektion des Rbr in Gesamtzellextrakt (GZ) und hydrogenosomaler (Hyd) Fraktion von *T. vaginalis*; es wurden jeweils 200 μg von GZ und Hyd und als Kontrolle 1,8 μg heterolog exprimiertes RbrT einer Elutionsfraktion aufgetragen; Rbr 0: Prä-Immun-Serum, Rbr 1: Serum des Antikörpers nach dem ersten Testbluten, Rbr AK: Rbr Antikörper Serum des Endblutens; die Erstantikörper wurden 1:500 (Rbr AK) in 3 % BSA verdünnt, und der Zweitantikörper (Anti-Kaninchen IgG) 1:40.000 in 10 % Milchpulver.

Die Banden < 20 kDa in der GZ- und Hyd-Fraktion sind unspezifisch, da sie auch bei der Detektion mit Prä-Immun-Serum vorliegen. Somit detektiert der Rbr-Antikörper neben der Positivkontrolle RbrT spezifisch eine Bande bei ~ 23 kDa in der hydrogenosomalen Fraktion, die der Größe von Rubrerythrin entspricht (vgl. Abb. 3.25).

3.7.3.7 *In vitro* NADPH-abhängige Peroxidase Aktivität des FNR/Rub/Rbr-Systems

Für Rubrerythrin-Aktivitätstests nach Coulter und Kurtz (2001), in denen mittels Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase (FNR) und Rubredoxin (Rub) eine Peroxidase-Aktivität von Rubrerythrin gemessen wird (siehe 2.10.13), wurden jeweils 25 μg heterolog exprimiertes Rbr eingesetzt. Die Messungen aus unabhängigen Expressionen mit anschließender Ni-NTA Reinigung sind in Abb. 3.41 zusammengefasst.

Für RbrT, RbrR und EntRbr konnten spezifische Peroxidase-Aktivitäten in den Eluat-Fractionen von über 100 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ gemessen werden, während für RbrB, RbrK und RbrTK keine Aktivitätserhöhung in den Eluaten nach Ni-NTA Reinigung festzustellen war. Im Vergleich zu den Leervektoren pTrcHis2A, pET-32a bzw. pET-21b sind somit die Proteine RbrB, RbrK und RbrTK nicht aktiv. RbrT und RbrR unterscheiden sich lediglich durch die Position und Größe des Anhangs – bei RbrT ist der Anhang C-terminal, bei RbrR N-terminal. Dies scheint Einfluss auf die Aktivität zu haben, da bei RbrR trotz des größeren Anhangs eine um 16,5 % höhere Aktivität gemessen wurde.

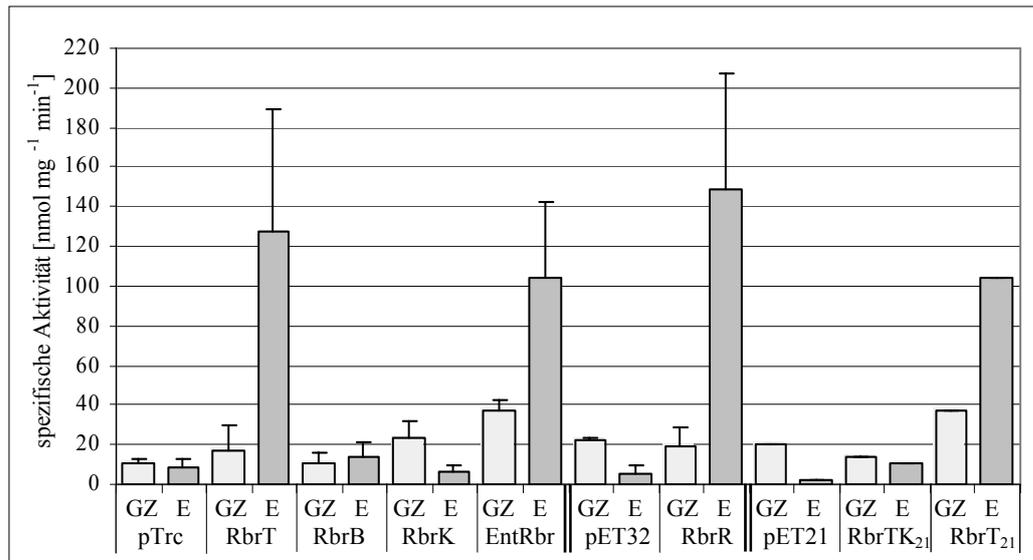


Abb. 3.41: Spezifische Aktivitäten [$\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \pm \text{SD}$] Ni-NTA gereinigter Rbr/His und entsprechender Leervektoren aus *E. coli* Expressionskulturen; in den Eluat von RbrT, RbrR und EntRbr konnte aktives Rbr angereichert werden; GZ: Gesamtzellextrakt vor Ni-NTA Reinigung, E: Elution; $n \geq 3$, bei den pET21-Proben $n = 1$.

3.7.4 SOD und Rubrerythrin in *Tritrichomonas foetus*

In den Hydrogenosomen von *Tritrichomonas foetus* konnten unter anderem sowohl die Superoxiddismutase (SOD) (Tf9) als auch Rubrerythrin (Tf14, Tf61, Tf84 und Tf114) identifiziert werden (Abb. 3.42).

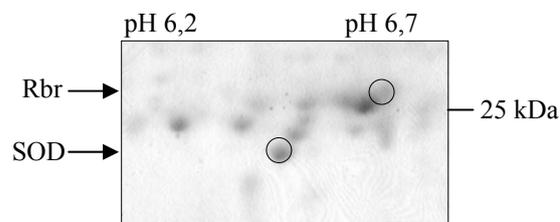


Abb. 3.42: Ausschnitt aus der 2D-SDS-PAGE pH 3-10 von *T. foetus* Hydrogenosomen; die identifizierten Proteine Tf9 (SOD) und Tf14 (Rbr) sind markiert.

Die sequenzierten Peptide der SOD stimmen mit der *T. foetus* SOD der NCBI Datenbank bis auf das in Tab. 3.3 unterstrichene Alanin, das in der NCBI-Sequenz fehlt, überein (Abb. 3.43). Das Protein hat eine abgeschätzte Größe von 22,17 kDa mit einem pI von 6,44, was der Lage des Proteins Tf9 entspricht.

Tab. 3.3: Sequenzierte Peptide der Proteine Tf9 (SOD) und Tf14, Tf61, Tf84 und Tf114 (Rbr); die Sequenzen wurden von 2D-SDS-Polyacrylamidgelen der Hydrogenosomen aus *T. foetus* durch massenspektrometrische Sequenzierung der tryptisch verdauten Proteine identifiziert. Die von der Datenbanksequenz (NCBI) abweichende Aminosäure ist unterstrichen.

	Peptid Masse [Da]	Sequenz
Tf9 SOD	2261	IAPIPYMETGLSGFLTK
	1415	ATGPLFNNVAQ
	1802	VFGSGWCYLAQNK
	1661	SINQYSNALNPVK
	1658	DA <u>A</u> CNWEFLEK
Tf14 Rbr	1487	NLAMSYAGECMAR
	1063	YTYFAENR
	1108	FIETAENER oder FLETAENER
	2635	VEVPAGVPLTGIGNTLENLK
	1435	LKQVESGSVFK
	1401	NCGYVHERAAPK
	1952	FPQAYFEIK

MFSIAPIPYMETGISGFLTKHAVEIHVTKHHQAYVDFANKNVPGTEFEGKPIEEIIQKAT
 GPLFNNVAQHFNHAAFFWNCLTAKKQEVPAVASFLAKHFESVDNFKAQFVQKASTVFGSG
 WCYLAQNKDKTISINQYSNALNPVKDGGVPLLCVDTWEHAWYIDYENRKAEYFNKFWDAC
 NWEFLEKNLKAAGLI

Abb. 3.43: *T. foetus* SOD Sequenz aus der NCBI Datenbank, Zugangsnummer AAC47734.1; sequenzierte Peptide der Probe Tf9 sind markiert.

Sieben sequenzierte Peptide des Rubrerythrins aus *T. foetus* (Tab. 3.3) weisen Homologien zu Rbr Sequenzen aus *T. vaginalis* auf. In Abb. 3.44 sind die Peptide mit den homologen *T. vaginalis* Sequenzen RbrT, RbrK und Rbr4 dargestellt.

			FLETAENER
		NLAMSYAGECMAR	YTYFAENR
			FIETAENER
Tf Rbr			
82414	RbrT	--MSLKGTQTEKNLACAFAGESMARNRYTFFAEVAKKQGYEQIAQLFIETAENEKVHANY	
89416	RbrK	-----LHFVAVGECMARNRYTFFAEVAKKQGYEQIANIFIETAENEKVHANY	
93440	Rbr4	MSIPIKGSRTTEKNLAIAFAGESMARTRYTFFASKAKKQGFQISAIFFLETAENEREHGKI	
		VEVPAGVPLTGIGNTLENLK	
82414		FWSQIKGLGS-VKIETEVPAQGVNDTLTNLRNAAAGEYAEHTTDYPHFADVAEKEGFAKI	
89416		FWSLIKGLGS-VKIEMEVPYGVNDTLTNLRNAAAGEYAEHTSEYPHFADVAEKEGFPKI	
93440		FLKFLKEANPEVHVQMTIPSYTIGTTLENLKYAAHGENEWTPTYPHMADIAEEEGFTEI	
		LKQVESGSVFK	NCGYVHERA-APK
82414		AKAFRGIAAVEKEHEIRFNTLAKQVESSTVFKREAVVAWKCRNCGYVVRVAKVAPKACPVC	
89416		ANSFCGIATVEKEHEMRFNTLAKQVETSSVFKRETVVAVWKCRYCGAIVRAKETPERCPVC	
93440		ANKFRLIAQVEKEHEARFALLAQVETGTVWKKTRVVQWKCRNCGYTTEAIEAPEKCPVC	
		FPQAYFEIK	
82414		FKPQGWFIEKEVLE	
89416		FKPQGFIEKETI-	
93440		GHTQSFMEIKEVLE	

Abb. 3.44: Vergleich der Rbr-Peptide aus *T. foetus* mit den Sequenzen RbrT (82414.m00151), RbrK (89416.m00120) und Rbr4 (93440.m00615) aus der *T. vaginalis* TIGR Datenbank.

Das Protein Tf14 liegt bei einer Größe von > 25 kDa und einem pI von $\sim 6,6$. Das Protein des Leserasters 93440.m00615 hat eine abgeschätzte Größe von 22,15 kDa mit einem pI von 6,12, und das Protein des Leserasters 89416.m00120 hat eine abgeschätzte Größe von 19,40 kDa mit einem pI von 5,88. Diese Sequenzen stimmen mit der Lage des Tf-Proteins im Bezug auf den pI besser überein als RbrT mit einem abgeschätzten pI von 8,16 und einem Molekulargewicht von 21,35 kDa. Die exakte Rbr-Sequenz aus *T. foetus* konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden.

3.7.5 *In vivo* Expressionsstudien der Peroxidasen unter oxidativem Stress

T. vaginalis Kulturen wurden unter normalen anaeroben Kulturbedingungen und unter oxidativem Stress mit 5 % O_2 bzw. 1 mM H_2O_2 inkubiert (siehe 2.7.1). Aus diesen Kulturen wurde Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.9.6) und in denaturierenden Formaldehyd-Gelen aufgetrennt. Die RNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert (siehe 2.9.8) und mit radioaktiven Sonden für RbrT, RbrB und RbrK hybridisiert (siehe 2.9.10) (Abb. 3.45). Bei den Ansätzen der RbrT Sonde ist eine deutliche Bande bei ~ 600 bp sichtbar, während für RbrB und RbrK keine Transkription nachweisbar war.

Für Quantifizierungen der radioaktiven Signale wurden weitere Northern Analysen durchgeführt und die Bandenintensitäten verglichen. Als Kontrollen dienten bei diesen Versuchen Sonden von Aktin und Superoxid-Dismutase (SOD), die aus genomischer DNA von *T. vaginalis* hergestellt wurden. Ferner wurde eine Sonde von Tpx eingesetzt, um auch für diese Peroxidase eine mögliche Veränderung in der Expression feststellen zu können (Abb. 3.46).

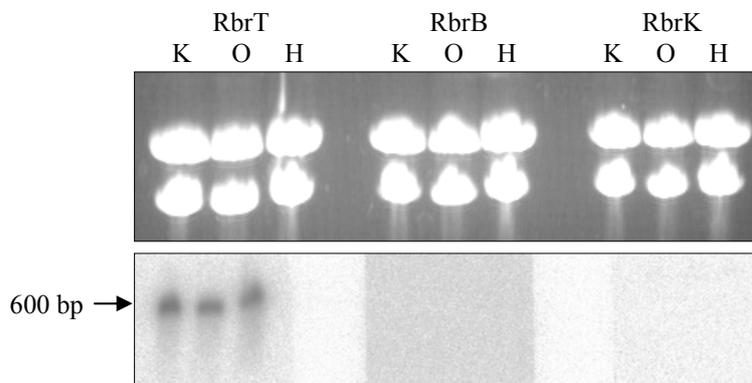


Abb. 3.45: Northern Analyse mit Gesamt-RNA aus *T. vaginalis*; oben: mit EtBr angefärbte rRNA in einem Formaldehyd-Gel, unten: hybridisierte Nylon-Membran mit den radioaktiv markierten Sonden von RbrT, RbrB und RbrK; K: RNA aus Kontrollansätzen, O: RNA aus O_2 -begasteten Kulturen, H: RNA aus Kulturen, die mit H_2O_2 inkubiert wurden.

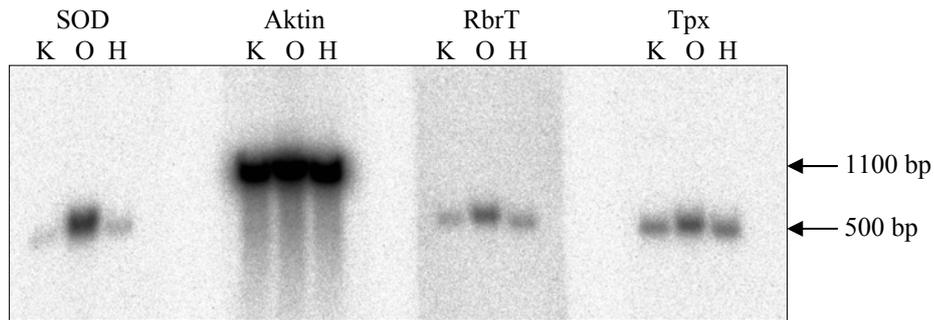


Abb. 3.46: Northern Analyse mit Gesamt-RNA aus *T. vaginalis*; hybridisierte Nylon-Membran mit den radioaktiv markierten Sonden von SOD, Aktin, RbrT und Tpx; K: RNA aus Kontrollansätzen, O: RNA aus O₂-begasteten Kulturen, H: RNA aus Kulturen, die mit H₂O₂ inkubiert wurden.

Die Werte aus drei unabhängigen RNA-Isolationen und anschließenden Northern Transfer Analysen wurden ausgewertet (siehe 2.9.10) und die Ergebnisse in Abb. 3.47 zusammengefasst.

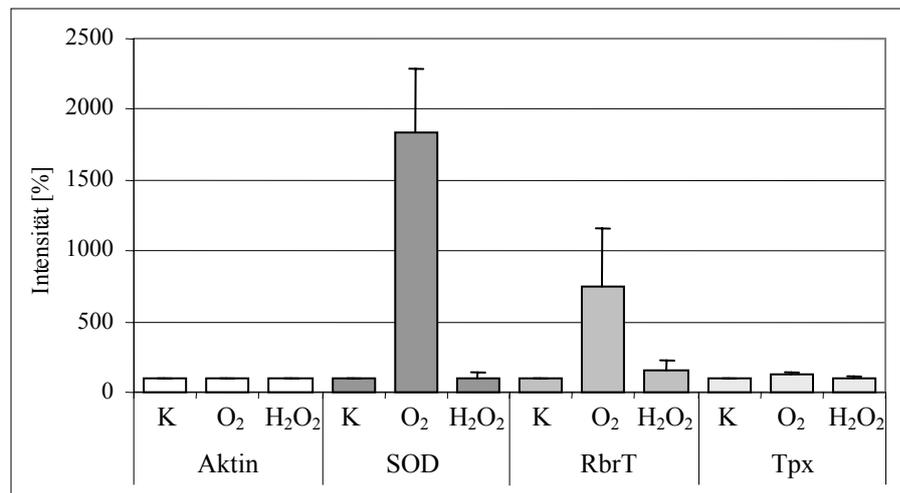


Abb. 3.47: Banden-Intensitäten der Northern Transfer Analysen von Aktin, SOD, RbrT und Tpx; die Werte der Aktin-Signale sind jeweils auf 100 % gesetzt, um Schwankungen der Intensitäten durch RNA-Konzentrationen zu eliminieren; K: RNA aus Kontrollansätzen, O₂: RNA aus O₂-begasteten Kulturen, H₂O₂: RNA aus Kulturen, die mit H₂O₂ inkubiert wurden; n = 3.

Die Transkription der SOD ist durch Begasung mit O₂ um das 170-fache erhöht worden, und die Expression von RbrT unter O₂-Begasung um das 60-fache gesteigert worden, während für die Tpx eine Erhöhung der Expressionsrate um 30 % nachweisbar war. Durch Inkubation der *T. vaginalis* Kulturen mit H₂O₂ ist für RbrT eine Erhöhung von 50 % ermittelt worden, während die Expressionsraten von SOD (- 7 %) und Tpx (+ 1 %) nahezu unverändert blieben.

4 Diskussion

Trichomonas vaginalis besitzt keine *bona fide* Mitochondrien, sondern anaerobe Hydrogenosomen, in denen Pyruvat fermentativ zu Acetat, CO₂ und H₂ umgesetzt wird (Müller 1993). Neben der Produktion von ATP sind die Aufgaben der Hydrogenosomen noch weitestgehend ungeklärt. Eine Proteomanalyse dieser Organellen sollte Aufschluss darüber geben, welche möglichen Stoffwechsel-Funktionen in den Hydrogenosomen von *T. vaginalis* lokalisiert sind und welche Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zu Mitochondrien bestehen.

4.1 Isolierung von Hydrogenosomen und Auftrennung der Proteine durch 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Hydrogenosomen wurden über einen 45 % Percoll-Gradienten aus *T. vaginalis* isoliert (siehe 3.1; Bradley *et al.* 1997). Nach einem Percoll-Gradienten waren noch signifikante Aktivitäten der lysosomalen Sauren Phosphatase (SP) und der cytosolischen Enzyme Glucokinase (GK) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) in der hydrogenosomalen Fraktion messbar (siehe Abb. 3.2), so dass diese Fraktion für eine Proteomanalyse nicht sauber genug war. Über eine anschließende zweite Ultrazentrifugation konnten die spezifischen Aktivitäten der SP um 70 % und der LDH um 50 % verringert werden, so dass keine signifikanten Kontaminationen mit diesen lysosomalen bzw. cytosolischen Proteinen mehr vorlagen. Die spezifische Aktivität der hydrogenosomalen decarboxylierenden Malat-Dehydrogenase (MDH) stieg nach der zweiten Zentrifugation um 20 % an, was ebenfalls eine weitere Reinigung der hydrogenosomalen Fraktion anzeigt.

Durch die Behandlung der Hydrogenosomen mit der Protease Thermolysin konnten die Aktivitäten der cytosolischen Enzyme GK und LDH minimiert werden, da sie nicht wie die Proteine in den Organellen vor Abbau durch diese Protease geschützt waren. Durch Inkubation der Organellen mit dem nicht-ionischen Detergens Triton X-100 und Thermolysin wurden die Membranen der Organellen aufgelöst und auch die Proteine, die zuvor in den Organellen vorlagen, von der Protease hydrolysiert. Die spezifische Aktivität der MDH war in diesem Ansatz um 93 % reduziert. Dies bestätigt, dass intakte Organellen in hoher Reinheit isoliert werden konnten.

Im Unterschied zu der LDH-Aktivität stieg die Aktivität der GK nach zwei Gradienten um 8 % an (siehe Abb. 3.2). Dieser Anstieg und die Reduktion der GK-Aktivität durch Thermolysin könnten darauf hindeuten, dass die GK mit den Hydrogenosomen assoziiert, jedoch nicht von einer Membran vor Protease-Abbau geschützt war. Bei der Acker-Schmalwand *Arabidopsis thaliana* liegen glycolytische Enzyme nicht nur löslich im Cytosol vor, sondern sind z.T. mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert (Giegé *et al.* 2003). Durch Inkubation der Mitochondrien mit Thermolysin konnte bei *Arabidopsis* gezeigt werden, dass z.B. die Aldolase außen an den Mitochondrien anhaftet und nicht von Membranen vor Protease-Abbau geschützt wird. Aktivitätsmessungen zeigten, dass alle Enzyme der Glycolyse in der mitochondriellen Fraktion vorhanden und 3-12 % der Gesamt-Aktivität dieser Enzyme mit den Mitochondrien assoziiert sind, so dass dadurch das gebildete Pyruvat direkt in das Mitochondrium transportiert werden kann (Giegé *et al.* 2003). Es ist denkbar, dass solche Assoziationen auch bei Hydrogenosomen vorliegen. Dafür spricht auch, dass obwohl Hydrogenosomen verwendet wurden, die über zwei aufeinander folgende Gradienten gereinigt worden waren, aus diesen Proben drei glycolytische Enzyme (eine Enolase und zwei Fructosebisphosphat-Aldolasen, siehe Anhang 2) sequenziert wurden.

Aus dem Trichomonaden *Tritrichomonas foetus* wurden die hydrogenosomalen Proteine mit den gleichen Puffern wie für *T. vaginalis* unter gleichen Bedingungen isoliert und in 2D-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (siehe Abb. 3.9). Die Verteilung der Proteine auf den Polyacrylamidgelen war von *T. vaginalis* deutlich zu unterscheiden, wenngleich bei beiden Trichomonaden die größte Anzahl der Proteine pIs zwischen 5-8 und ein Molekulargewicht von 20-70 kDa aufwies. Die typische Bande der PFOR, die bei *T. vaginalis* im pH-Bereich 3-10 und einem Molekulargewicht von ~116 kDa identifiziert werden konnte, fehlte bei *T. foetus*, dafür konnten unter 192 sequenzierten *T. foetus* Proteinen 19 als PFOR identifiziert werden, die sich über den pH-Bereich 5-8 und einem Molekulargewicht von 26-37 kDa erstreckten (siehe Anhang 1). Die Peptide konnten dem C-Terminus, dem N-Terminus oder einem „mittleren“ Sequenzabschnitt einer PFOR Sequenz zugeordnet werden (siehe Anhang 3), so dass die PFOR von *T. foetus* fragmentiert war, obwohl die Proben unter gleichen Bedingungen wie bei *T. vaginalis* aufgetrennt wurden.

In denaturierenden 2D-Elektrophoresen von *T. vaginalis* waren Membranproteine unterrepräsentiert, da diese stark hydrophoben Proteine unter den gewählten Bedingungen schwer löslich waren. Hydrogenosomale Membranproteine wurden mittels Na_2CO_3 -Waschung nach Fujiki *et al.* (1982) und anschließendem Waschen mit Aceton isoliert und gereinigt. Die Auftrennung der Membranproteine erfolgte anschließend in Blau-Nativen-

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (BN-PAGE; siehe Abb. 3.11). Es ist nicht bekannt, wie viele hydrogenosomale Membranproteine *T. vaginalis* besitzt, jedoch wird von 90 % löslichen und 10 % unlöslichen hydrogenosomalen Proteinen in Form von integralen Membranproteinen ausgegangen (Dyall und Johnson 2000). Die bereits veröffentlichten Sequenzen der hydrogenosomalen Membranproteine Hmp31 und Hmp35 (Dyall *et al.* 2000, 2003), drei hypothetische Proteine und eine vakuoläre ATPase konnten mit dieser Methode identifiziert werden (siehe Anhang 4), so dass die BN-PAGE eine Möglichkeit zur Auftrennung und Identifizierung der hydrogenosomalen Membranproteine darstellt.

4.2 Das hydrogenosomale Proteom von *Trichomonas vaginalis*

Von *T. vaginalis* wurden 257 Proteine der hydrogenosomalen Fraktion aus den 2D-Polyacrylamidgelen (siehe Abb. 3.6) isoliert und massenspektrometrisch sequenziert. Es wurden jeweils fünf bis zehn Peptide in einem Bereich von 450-1000 m/z pro Protein sequenziert, die in der Regel 8 bis 20 Aminosäuren lang waren. Einige Proteine wurden sowohl aus dem pH-Bereich 3-10 als auch aus den Bereichen 4-7 bzw. 6-11 isoliert (z.B. die NADH-Dehydrogenase bei pH 8,9, Probe 191 und S7), und z.B. von der hydrogenosomalen MDH und der SCS gibt es jeweils sechs Isoformen, von denen Fragmente mehrfach auf den Gelen vorlagen. Insgesamt wurden daher nur 108 Gene identifiziert, die für 84 Proteine unterschiedlicher Funktion kodieren (siehe Anhang 2): zwei glycolytische Proteine (drei Gene), vier Proteine der Translation bzw. Transkription, 17 ribosomale Proteine, 18 sonstige cytosolische Proteine (20 Gene) und sechs Proteine mit unbekannter Funktion. 37 unterschiedliche Proteine (58 Gene) wurden aufgrund ihrer Funktion als mögliche hydrogenosomale Proteine eingeordnet, die jedoch nicht alle eindeutige Transitsequenzen aufweisen, wie z.B. die Aminomethyltransferase (H-Protein des Glycin-Stoffwechsels) oder das Membranprotein Hmp31.

Transitsequenzen für hydrogenosomale Matrixproteine sind meist nur 5-14 Aminosäuren lang, starten mit einem Methionin-Leucin Dipeptid, sind reich an Serin, Leucin und Arginin und haben ausnahmslos ein Arginin an Position -2 oder -3 von der potentiellen Prozessierungsstelle (Dyall *et al.* 2000). Im *T. vaginalis* Genom wurden 138 Gene mit hydrogenosomalen Signalpeptiden der Aminosäure-Motive ML(S/T/A)X_(1..15)R(N/F/E/XF), MSLX_(1..15)R(N/F/XF) bzw. MLR(S/N)F identifiziert (Carlton *et al.* 2007). Diese Liste umfasst jedoch nicht alle hydrogenosomalen Proteine, da bereits bekannte hydrogenosomale Proteine wie z.B. TvhydB (Bui und Johnson 1996) oder Hsp10 (Bui *et al.* 1996) kein

Transitpeptide dieser Motive besitzen. Hydrogenosomale Membranproteine wurden durch die gewählten Aminosäuresequenzen in dieser Untersuchung ebenfalls nicht erfasst. Zusätzlich konnten hydrogenosomale Lokalisierungen von Proteinen ohne eindeutige Transitpeptide nachgewiesen werden (diese Arbeit; Pütz *et al.* 2005, 2006).

Von den 58 Genen dieser Arbeit, die mögliche hydrogenosomale Proteine kodieren, weisen 35 mögliche genannte Transitsequenzen (Carlton *et al.* 2007) auf, was im Anhang 2 kenntlich gemacht wurde. Bei weiteren 8 Sequenzen sind mögliche Transitpeptide vorhanden, die allerdings nicht den gewählten Kriterien für Präsequenzen entsprechen (Carlton *et al.* 2007), wie z.B. das Motiv MLSSSSRA der Sequenz 93909.m00117 (Proben S54, S55) oder MLASSSRA der Fe-Hydrogenase TvhydB (Proben S23, S30).

Zu den durch Proteinanalysen identifizierten hydrogenosomalen Proteinen zählen sowohl die bekannten Enzyme des Pyruvat-Stoffwechsels (MDH, PFOR, SCS, Hydrogenase) als auch z.B. Ferredoxin, Hitzeschockproteine, sowie Thioredoxin und eine mögliche ASCT (siehe 4.4). Zwei weitere mit mitochondriellen Enzymen verwandte Proteine wurden identifiziert: ein Enzym des Glycin-Stoffwechsels (H-Protein; Proben 101 und 161), was die Lokalisierung dieses Aminosäure-Stoffwechselwegs in den Hydrogenosomen bestätigt (Mukherjee 2006a, 2006b), und die zum mitochondriellen Protein NuoF des Komplex I der Atmungskette homologe NADH-Dehydrogenase (Probe S45). Diese NADH-Dehydrogenase könnte in Hydrogenosomen NADH, das von der decarboxylierenden MDH gebildet wird, reoxidieren, oder eine NADH:Ferredoxin Oxidoreduktase Aktivität katalysieren und ein alternatives Reduktionsmittel zu der PFOR sein. Eine weitere Möglichkeit ist die Interaktion mit der NAD-abhängigen *T. vaginalis* 65-kDa Fe-Hydrogenase (Hrdy *et al.* 2004).

Elf Proteine haben keine bzw. nur vereinzelte eukaryotische Homologe in der NCBI-Datenbank: HydG (eine homologe Sequenz aus *C. reinhardtii*; siehe 4.5), drei unterschiedliche NADH:Flavin Oxidoreduktasen, eine Thiolperoxidase, Rubrerythrin (je eine homologe Sequenzen aus *E. histolytica* und der Cyanelle von *C. paradoxa*), ein OsmC-ähnliches Protein (siehe 4.6) und vier bakterielle Phosphofruktokinase (PFK).

Diese vier PFK besitzen ein Molekulargewicht von 34-35 kDa und unterscheiden sich somit deutlich von den bereits beschriebenen cytosolischen PFK von *T. vaginalis* mit Molekulargewichten von ~50 kDa (Mertens *et al.* 1998).

Obwohl die hydrogenosomale Fraktion über zwei aufeinander folgende Percoll-Gradienten gereinigt wurde, konnten zwei glycolytische Enzyme, 17 ribosomale Proteine und vier an Transkription bzw. Translation beteiligte Proteine in dieser Fraktion identifiziert werden (siehe Anhang 2). Dies könnte entweder ein Indiz für eine Kontamination mit rauem

endoplasmatischem Retikulum und cytosolischen Enzymen oder für co-translationalen Import von hydrogenosomalen Enzymen in das Organell sein (siehe 4.3).

Das Proteom des ursprünglichen Proto-Mitochondriums kann durch phylogenetische Analysen auf 630 Orthologe abgeschätzt werden (Gabaldón und Huynen 2003). Spezifische Genverluste in den verschiedenen Eukaryoten führten zu der großen Variabilität der Proteome eukaryotischer Mitochondrien, die die funktionelle Adaption an unterschiedliche Lebensräume widerspiegeln (Gabaldón und Huynen 2005).

Aus *S. cerevisiae* Mitochondrien wurden von 2D-Polyacrylamidgelen 209 Proteine isoliert und 109 unterschiedliche Proteine identifiziert. Zusätzlich wurde die mitochondrielle Fraktion mittels multidimensionaler Flüssig-Chromatographie und 1D-Polyacrylamidgele analysiert, um das Problem, dass ein signifikanter Proteinanteil in einer einzelnen Methode nicht detektiert wird, zu minimieren. Es wurden insgesamt 750 Proteine identifiziert, von denen 58 % bekannte mitochondrielle Proteine waren (Sickmann *et al.* 2003). Für das mitochondrielle Proteom der Hefe wird von ~700 Proteinen ausgegangen, während das Spektrum von 180 mitochondriellen Proteinen bei *Plasmodium falciparum* bis zu 4162 Proteinen in menschlichen Mitochondrien reicht (Richly *et al.* 2003). Im Vergleich zu der Gesamtanzahl der Gene im Genom entspricht das einem Anteil von 3,4 % der mitochondriellen Proteine bei *P. falciparum*, 11 % beim Menschen und *S. cerevisiae*. Spezifisch für die Mitochondrien dieser Organismen sind 61 % der mitochondriellen Proteine bei *P. falciparum*, 59 % beim Menschen und 49 % bei *S. cerevisiae* (Richly *et al.* 2003).

Von dem ~160 Mb großen Genom von *T. vaginalis* stellen 65 % repetitive Sequenzen dar. Das Genom enthält ca. 60.000 offene Leseraster und 138 Gene wurden als hydrogenosomal benannt (Carlton *et al.* 2007), die jedoch wie bereits erwähnt nicht alle Proteine des Organells umfassen. Wird von ~300 hydrogenosomalen Proteinen ausgegangen, entspräche das nur 0,5 % der Gene im Genom.

Die hydrogenosomalen Proteome von *T. foetus* und *T. vaginalis* weisen unterschiedliche Protein-Verteilungen in 2D-Polyacrylamidgelen auf (siehe Abb. 3.6 und 3.9). Sequenzierte Peptide von bisher 31 verschiedenen Proteinen von *T. foetus* wurden durch Vergleich mit der *T. vaginalis* TIGR Datenbank identifiziert (siehe Anhang 3). Von den 24 hydrogenosomalen Proteinen wurden 16 Proteine ebenfalls bei *T. vaginalis* identifiziert. Es wurden allerdings z.B. 19 Proben der hydrogenosomalen O₂-Reduktase bei *T. foetus* und nur eine Probe dieses Enzyms bei *T. vaginalis* isoliert, aber bei *T. vaginalis* 24 Proben von vier verschiedenen bakteriellen PFK, während bei *T. foetus* nur eine PFK detektiert wurde. Bei dem hydrogeno-

somalen Proteom des Chytridiomyceten *Neocallimastix frontalis* ist eine Mehrzahl an Proteinen im pH-Bereich 3-5 detektierbar und die decarboxylierende MDH ist bei *N. frontalis* weniger abundant als bei *T. vaginalis* (Gelius-Dietrich, unveröffentlichte Daten).

Hydrogenosomale Proteome unterschiedlicher Organismen weisen vermutlich eine ebenso große Diversität zueinander auf, wie die Proteome der Mitochondrien. In *Neocallimastix frontalis* wird z.B. Pyruvat nicht von einer PFOR decarboxyliert, sondern mittels Pyruvat-Format-Lyase zu Acetyl-CoA und Format umgesetzt (Akhmanova *et al.* 1999; Gelius-Dietrich und Henze 2004). Ein weiterer Unterschied ist, dass *N. frontalis* eine hydrogenosomale Ornithintranscarbamylase (OTC) besitzt, die in den Organellen an der Arginin Biosynthese beteiligt ist (Gelius-Dietrich *et al.* 2007), während in *T. vaginalis* OTC im Cytosol Teil des ATP-produzierenden Arginin-Dihydrolase-Wegs ist (Yarlett *et al.* 1994). Ferner besitzt der Ciliat *Nyctotherus ovalis* im Gegensatz zu den Pilzen und Trichomonaden ein hydrogenosomales Genom (Akhmanova *et al.* 1998).

In einer integrativen Analyse für das mitochondrielle Proteom von Hefe wurde bereits diskutiert, dass eine Methode alleine nicht ausreicht um einen vollständigen Überblick eines Organell-Proteoms zu erhalten (Prokisch *et al.* 2004). Hydrophobe Proteine, wie z.B. Membranproteine, und gering exprimierte Proteine sind mit der Methode der 2D-PAGE schlecht zu identifizieren, so dass eine Vielzahl hydrogenosomaler Proteine nicht detektiert werden konnte. Hinzu kommt, dass *T. vaginalis* sehr redundant sowohl im Genom als auch im Proteom ist, d.h. mehrere Isoformen eines Proteins liegen im hydrogenosomalen Proteom vor (z.B. MDH oder SCS). Ferner ist die decarboxylierende MDH in den Organellen sehr abundant. Durch Abtrennung dieses Proteins aus der hydrogenosomalen Fraktion könnten Proteine geringerer Konzentration leichter detektiert werden.

Für das hydrogenosomale Proteom müssen wie für das mitochondrielle Proteom mehrere kombinierte Methoden zusammen angewendet werden, um einen größeren Teil des Proteoms identifizieren zu können, wie z.B. die systematische Identifizierung der hydrogenosomalen Proteine durch mRNA-Expressionsanalysen unter verschiedenen Bedingungen (DeRisi *et al.* 1997; Lascaris *et al.* 2003), DNA-Mikroarray Analysen der mit Hydrogenosomen-gebundenen Polysomen assoziierten mRNA-Populationen (Marc *et al.* 2002), ein Deletions-Phänotyp-Screening (Dimmer *et al.* 2002; Steinmetz *et al.* 2002), groß dimensionierte Lokalisierungs-Studien (Kumar *et al.* 2002), Protein-Protein Interaktions-Studien (Uetz *et al.* 2000; Ito *et al.* 2001; Gavin *et al.* 2002; Ho *et al.* 2002) sowie Protein Lokalisierungs-Studien mittels GFP (*green fluorescent protein*)-Anhang (Huh *et al.* 2003).

4.3 Ribosomale Proteine an Hydrogenosomen

In der hydrogenosomalen Fraktion von *T. vaginalis* wurden in 2D-Polyacrylamidgelen 17 eukaryotische 40S- und 60S-ribosomale Proteine identifiziert (siehe Anhang 2). Dies ließ zunächst eine Verunreinigung der Fraktion mit rauem endoplasmatischem Retikulum (ER) vermuten, da *T. vaginalis* Hydrogenosomen kein Genom besitzen und hydrogenosomale Proteine an freien Ribosomen im Cytosol gebildet werden (Lahti und Johnson 1991). Die Aktivität des ER-Enzyms Glucose-6-Phosphatase wurde mit $18,24 \pm 3,75 \text{ nmol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ in Gesamtzellextrakt gemessen, während in der hydrogenosomalen Fraktion kein Umsatz von Glucose-6-Phosphat messbar war. In einer Immunodetektion des ER-Enzyms Calreticulin mit dem Anti-Spinat-Calreticulin Antikörper (Navazio *et al.* 1995) war im Gegensatz zu den Fraktionen Gesamtzellextrakt, Lysosomen und Hydrogenosomen nach einem Percoll-Gradienten keine Verunreinigung mit ER in der hydrogenosomalen Fraktion nach zwei Gradienten detektierbar (siehe Abb. 3.14). Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Dünnschnitten der Hydrogenosomen nach zwei Percoll-Gradienten wurde eine Verunreinigung zusätzlich ausgeschlossen, da kein raues ER sichtbar war (siehe Abb. 3.15). Ribosomen-ähnliche Partikel an Hydrogenosomen wurden bisher auch nur dann in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtet, wenn die Organellpräparationen mit dem Mikrofilament-Inhibitor Cytochalasin B behandelt waren. Cytochalasin B greift die Stabilität der Mikrofilamente an und kann ihre Desorientierung und dadurch die Fehlanordnung der Ribosomen bewirken (Benchimol 2001). Eine generelle Anreicherung von Ribosomen mit den Hydrogenosomen war somit nicht zu erwarten.

Vier weitere an der Translation beteiligte Proteine wurden identifiziert (siehe Anhang 2): ein Protein des NAC (*nascent chain associated complex*, Proteine 105-107), ein Protein mit NAC Domäne (Protein 120), ein poly-A bindendes Protein (Proteine 121 und 165) und der Elongationsfaktor EF-1 α (Proteine S48, S50). NAC ist eine Komponente der cytosolischen Ribosomen in Eukaryoten und an der Translokation von mitochondriellen Proteinen beteiligt (George *et al.* 1998, 2002). Poly-A bindende Proteine binden mRNAs am 3'-poly(A)-Ende, die an den meisten eukaryotischen mRNAs vorliegen, und sind zusammen mit diesem poly(A)-Schwanz an der Stabilisierung und Translation der mRNA beteiligt (Gorlach *et al.* 1994). Der Elongationsfaktor EF-1 α ist ein Ribosom-assoziiertes Faktor, der für die Lieferung von Aminoacyl-tRNA zum Ribosom verantwortlich ist.

Aufgrund der Anwesenheit dieser Proteine und der großen Anzahl ribosomaler Proteine in der hydrogenosomalen Fraktion wurde getestet, ob aus dieser Fraktion von *T. vaginalis*

mRNA isoliert und somit ein Indiz für co-translationalen Import in Hydrogenosomen festgestellt werden konnte. Aus der hydrogenosomalen Fraktion, die mit Cycloheximid in den verwendeten Aufschlusspuffern erhalten wurde, konnte mRNA isoliert werden. Durch das Antibiotikum Cycloheximid wird die Translation, genauer gesagt die Peptidyltransferase-Aktivität der 60S-Ribosomenuntereinheit bei Eukaryoten, und somit der Abbau der mRNA gehemmt. Aus der erhaltenen mRNA wurde cDNA synthetisiert (siehe Abb. 3.16) und sequenziert. Diese zufällig sequenzierten cDNAs (siehe Anhang 5) sind ein Indiz für co-translationalen Import, da der Anteil der Sequenzen für hydrogenosomale Proteine, z.B. die decarboxylierende MDH, in der „hydrogenosomalen“ cDNA mehr als doppelt so hoch ist wie in der „Gesamtzell-cDNA“ und die generelle Zusammensetzung der mRNAs deutlich divergiert (siehe Abb. 3.17). Aus 99 zufällig sequenzierten Proben der cDNA der hydrogenosomalen Fraktion wurden 13 mRNAs identifiziert, die für acht verschiedene hydrogenosomale Proteine kodieren, während bei 90 identifizierten Proben der Gesamt-cDNA nur fünf mögliche hydrogenosomale Sequenzen vorlagen (siehe Anhang 5). Auch der Anteil an cDNAs für glycolytische Proteine war in der hydrogenosomalen Fraktion um 125 % höher als in der Fraktion der Gesamt-cDNA. Dieser Effekt steht möglicher Weise in Zusammenhang mit der beobachteten Assoziation glycolytischer Enzyme mit der hydrogenosomalen Fraktion.

In Hefe (Marc *et al.* 2002), Trypanosomen (Tittawella und Baranov 2000) und Säugetieren (MacKenzie und Payne 2004) wurde bereits gezeigt, dass Ribosomen spezifisch an Mitochondrien binden und Proteine co-translational in die Organellen importiert werden. Aktive Ribosomen mit mRNAs für mitochondrielle Proteine akkumulieren an der Oberfläche von Hefe-Mitochondrien (Kellems *et al.* 1974, 1975; Ades und Butow 1980). Obwohl angenommen wurde, dass eine Lokus-spezifische Translation nur eine unbedeutende Rolle am mitochondriellen Import hat (Suissa und Schatz 1982), bestätigen einige Beobachtungen die Hypothese, dass ein co-translationaler Prozess an dem Import von mitochondriellen Proteinen beteiligt ist (Verner 1993; Lithgow 2000). Die mRNA-Populationen von *S. cerevisiae* wurden an freien und an Mitochondrien-gebundenen Polysomen untersucht (Marc *et al.* 2002). Zahlreiche mRNAs, die an Mitochondrien-gebundenen Polysomen translatiert werden, kodieren für mitochondrielle Proteine. Die Gene dieser Proteine sind meist bakteriellen Ursprungs, während die Gene der mRNAs an freien Ribosomen meist eukaryotischen Ursprungs sind (Marc *et al.* 2002).

Bei *Arabidopsis thaliana* wurden an gereinigten Mitochondrien in der Fraktion des Intermembranraums und der äußeren mitochondriellen Membran die glycolytischen Enzyme Aldolase, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Phosphoglyceratmutase

und Enolase identifiziert. Zusätzlich wurde die *in vivo* Lokalisierung von Aldolase und Enolase im Cytosol und assoziiert an den Mitochondrien von *Arabidopsis* mittels Fluoreszenz-Fusionsproteinen nachgewiesen (Giegé *et al.* 2003). Wie bereits erwähnt (siehe 4.1) konnten alle glycolytischen Enzyme in der mitochondriellen Fraktion nachgewiesen werden. Diese Enzyme sind außen an die Mitochondrien assoziiert, so dass ein direkter Pyruvat-Import gewährleistet werden kann (Giegé *et al.* 2003).

In der hydrogenosomalen Fraktion des Chytridiomyceten *Neocallimastix frontalis* wurden anhand von 2D-Elektrophoresen ebenfalls sechs glycolytische Enzyme identifiziert: Hexokinase, Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase, Triosephosphat-Isomerase, GAPDH, Phosphoglyceratmutase und Phosphoglyceratkinase (persönliche Mitteilung von G. Gelius-Dietrich, Institut für Botanik III, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Dies könnte auf eine vergleichbare Assoziation der glycolytischen Enzyme und Translation dieser Proteine an Hydrogenosomen und Mitochondrien hindeuten.

Durch weiterführende Experimente soll die Zusammensetzung der an den Organellen translatierten Proteine näher untersucht und Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu dem co-translationalen Import bei Mitochondrien geklärt werden.

Verschiedene Proteine der hydrogenosomalen Fraktion von *T. vaginalis* wurden näher untersucht, da sie keine weiteren bzw. nur vereinzelte eukaryotische Homologe aufwiesen, bzw. ihre Funktionen zuvor nur aus Bakterien bekannt waren. Ein Protein, das wahrscheinlich den hydrogenosomalen Pyruvat-Stoffwechsel vervollständigt (siehe 4.4), wurde ebenfalls weiter bearbeitet. Sequenzen möglicher Fe-Hydrogenase Maturasen (siehe 4.5) könnten Hinweise auf die Herkunft der Fe-Hydrogenase von *T. vaginalis* geben. Proteine, die an Entgiftungsmechanismen reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sind (siehe 4.6), liefern möglicherweise Aufschluss über den Schutz sauerstoffempfindlicher Proteine in Hydrogenosomen vor oxidativem Stress.

4.4 ASCT - das letzte noch nicht klonierte Enzym des hydrogenosomalen Pyruvat-Stoffwechsels

Die Acetat:Succinat-CoA-Transferase (ASCT) ist ein Acetat produzierendes Enzym, das in anaeroben Mitochondrien (McLaughlin *et al.* 1986; Saz *et al.* 1996) und aeroben Mitochondrien der Trypanosomen (van Hellemond *et al.* 1998; Rivière *et al.* 2004) vorkommt. Untersuchungen an *T. vaginalis* Hydrogenosomen weisen ebenfalls darauf hin, dass Acetat durch eine sukzessive Aktivität von ASCT und Succinyl-CoA-Synthase (SCS) gebildet wird (Lindmark *et al.* 1975): der Pyruvat Abbau in den Hydrogenosomen ist abhängig von der Anwesenheit von ADP, P_i, Mg²⁺ und Succinat. Ist eine dieser Substanzen nicht vorhanden, so wird die Produktion von Acetat und H₂ drastisch verringert. Ferner stimuliert Succinat schon in geringen Konzentrationen die Bildung von Acetat, H₂ und CO₂ (Steinbüchel und Müller 1986). Dies sind alles Hinweise darauf, dass in *T. vaginalis* Acetyl-CoA nicht hydrolysiert, sondern die CoA-Gruppe auf Succinat transferiert wird. Allerdings war bisher keine ASCT-Sequenz von *T. vaginalis* bekannt, und in der TIGR *T. vaginalis* Genom-Datenbank ist keine Sequenz als ASCT annotiert, so dass die ASCT das letzte noch nicht klonierte Enzym des Pyruvat-Stoffwechsels der Hydrogenosomen ist.

Eine mögliche ASCT-Sequenz wurde durch 2D-Elektrophoresen der Hydrogenosomen von *T. vaginalis* identifiziert (siehe Anhang 2, Proben S54 und S55). Die *T. vaginalis* Sequenz ist als hypothetisches Protein in der TIGR Datenbank annotiert und weist Homologien zu Acetat:Succinat-CoA-Hydrolasen aus δ -Proteobakterien und Ascomyceten auf (van Weelden 2005). Allerdings wurde nachgewiesen, dass einige Genprodukte der Acetyl-CoA-Hydrolase-Familie eine CoA-Transferase Funktion besitzen (Buu *et al.* 2003; Söhling und Gottschalk 1996; Witkowski *et al.* 1994). Die Aktivität der identifizierten *T. vaginalis* Sequenz konnte durch heterologe Expressionen in *E. coli* nicht ermittelt werden, da weder eine Transferase- noch eine Hydrolase-Aktivität messbar war. Dies kann z.B. durch einen fehlenden Cofaktor oder unkorrekte Faltung des Proteins bedingt sein (van Weelden 2005).

Vergleiche der *T. vaginalis* Sequenz mit einer Acetyl-CoA-Hydrolase aus *S. cerevisiae* und CoA-Transferasen aus *Neurospora crassa* und *Clostridium kluyveri* verdeutlichten einen Aminosäure-Austausch im reaktiven Zentrum dieser Enzyme: die Hydrolase besitzt ein Aspartat anstelle eines Glutamats (van Weelden 2005). Eine Konversion der Glutaconat-CoA-Transferase von *Acidaminococcus fermentans* zu einer Acetyl-CoA-Hydrolase aufgrund

dieses Aminosäure-Austausches wurde durch gerichtete Mutagenese erzielt (Mack und Buckel 1997). Die *T. vaginalis* Sequenz besitzt ein Glutamat an der entsprechenden Position, was ein Indiz für die Transferase-Aktivität dieses Enzyms darstellt (van Weelden 2005).

Weitere Versuche auf biochemischer und genomischer Ebene wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tielens (Universität Utrecht, Niederlande) durchgeführt. Eine Korrelation der *T. vaginalis* ASCT-Aktivität mit Anreicherung des Proteins konnte bereits durch Western Analysen nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten; Manuskript ist eingereicht).

Die einzige bekannte ASCT-Proteinsequenz wurde für *Trypanosoma brucei* beschrieben (Rivière *et al.* 2004). Diese Sequenz hat die höchste Sequenzähnlichkeit zu Succinyl-CoA:3-Oxosäure-CoA-Transferasen (SCOT, EC 2.8.3.5) von Schweineherzen. SCOT ist ein mitochondrielles Enzym, das Acetoacetyl-CoA durch den Transfer der CoA-Gruppe von Succinyl-CoA auf Acetoacetat bildet (White und Jencks 1976). Es konnte keine homologe Sequenz zu *T. brucei* SCOT in der *T. vaginalis* TIGR Genom-Datenbank identifiziert werden, so dass diese ASCT-Sequenzen phylogenetisch nicht verwandt sind (van Weelden 2005). Entweder war keine ASCT in dem ursprünglichen Endosymbionten vorhanden und evolvierte später von unterschiedlichen Enzymen in den verschiedenen Spezies, z.B. aus einer Acetyl-CoA-Hydrolase, oder lateraler Gentransfer ist für eine oder beide, die mitochondrielle und hydrogenosomale ASCT-Sequenz, verantwortlich.

4.5 Fe-Hydrogenase Maturasen ?

Durch Peptidsequenzierungen der Probe S29 wurde eine Sequenz aus *T. vaginalis* in der TIGR Genom-Datenbank identifiziert (88811.m00081), die bei einer BLAST Suche (BLASTp) in der NCBI-Datenbank die größte Aminosäure-Identität zu der HydG Sequenz aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Zugangsnummer AAS92602; 54 % identisch) und zu prokaryotischen Proteinsequenzen aufweist. Die prokaryotischen Sequenzen sind bis zu 49 % mit der hydrogenosomalen *T. vaginalis* Sequenz identisch und in der Datenbank als ThiH annotiert, ein Enzym der bakteriellen Thiamin Biosynthese (Begley *et al.* 1999).

HydG ist ein *S*-Adenosylmethionin (SAM)-abhängiges Enzym, das zusammen mit dem SAM-abhängigen HydE und der GTPase HydF in dem Chloroplast der Grünalge *C. reinhardtii* identifiziert wurde (Posewitz *et al.* 2004). HydG, HydE und HydF sind Homologe zu drei verschiedenen prokaryotischen Proteinen, die in allen Genomen von Eubakterien mit Fe-Hydrogenasen vorkommen, bisher aber nur aus einem Eukaryoten

(*C. reinhardtii*) bekannt waren (Posewitz *et al.* 2004). In *C. reinhardtii* werden HydG, HydE und HydF, letztere liegen hier als Fusionsprotein HyDEF vor, für die Bildung einer aktiven Fe-Hydrogenase durch Insertion des reaktiven FeS-Zentrums, den so genannten H-Cluster, benötigt (Posewitz *et al.* 2004). In der Genom-Datenbank von *T. vaginalis* sind ebenfalls homologe Sequenzen für HydE und HydF vorhanden. Die Lokalisierung dieser drei Enzyme (HydG, HydE, HydF) in den Hydrogenosomen, in denen ebenfalls die Fe-Hydrogenasen lokalisiert sind (Müller 1988, 1993), wurde durch Western Analysen (siehe Abb. 3.24) und Immunofluoreszenz-Mikroskopie (siehe Abb. 3.23) bestätigt (Pütz *et al.* 2006).

In Neighbor-Net Analysen gruppieren die Maturasen HydG und HydE von *C. reinhardtii* und *T. vaginalis* in unabhängige Untergruppen der SAM-abhängigen Proteine (siehe Abb. 3.21). Die HydG Sequenzen gruppieren mit prokaryotischen Sequenzen, die als ThiH annotiert sind, aber nicht mit den weiteren prokaryotischen ThiH Sequenzen gruppieren. Diese ThiH Sequenzen sind im Gegensatz zu HydG von *C. reinhardtii* nicht funktionell charakterisiert. Ferner besitzen alle Organismen dieser Gruppe Fe-Hydrogenasen, was die Vermutung nahe legt, dass die prokaryotischen, als ThiH annotierten Proteine eher als Maturasen fungieren und nicht als Enzyme der Thiamin Biosynthese.

Die beiden eukaryotischen HydE Sequenzen liegen zusammen in der prokaryotischen Gruppe möglicher Biotinsynthesen, was auf einen gemeinsamen Ursprung dieser HydE Sequenzen hindeutet. Aufgrund der geringen Auflösung der prokaryotischen Gruppe in dem Netzwerk kann keine spezifische Gruppe an Prokaryoten für den Ursprung der eukaryotischen Homologe benannt werden. Ferner kann nicht ausgeschlossen werden, dass die vorliegende Monophylie von HydG und HydE von *T. vaginalis* und *C. reinhardtii* nur aufgrund der geringen Anzahl an eukaryotischen Sequenzen vorliegt.

Die HydF Sequenzen von *C. reinhardtii* und *T. vaginalis* liegen in dem Netzwerk zwar in der gleichen Gruppe der GTPasen, bilden allerdings keinen monophyletischen Ursprung (siehe Abb. 3.22). Eine dritte eukaryotische Sequenz des Nukleomorphs von *Guillardia theta* liegt in der anderen Teilgruppe der GTPasen. Von *G. theta* ist bislang keine Fe-Hydrogenase bekannt, so dass vermutet werden kann, dass die GTPasen dieser Gruppe in einer anderen Reaktion involviert sind als die GTPasen/HydE Sequenzen der zweiten Teilgruppe.

Die möglichen Maturasen HydG, HydE und HydF sind eubakteriellen Ursprungs, da bis auf eine archaebakterielle Biotinsynthase-Sequenz von *M. barkeri* nur eubakterielle homologe Sequenzen in der Datenbank vorliegen. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Sequenzen von dem α -proteobakteriellen Vorläufer der Mitochondrien/Hydrogenosomen stammen, denn für HydG und HydE lagen keine homologen α -proteobak-

teriellen Sequenzen vor. Phylogenetische Analysen von Fe-Hydrogenasen zeigten, dass die cytosolischen und hydrogenosomalen Fe-Hydrogenase von *Entamoeba*, *Spironucleus* und *Trichomonas* monophyletisch sind (Horner *et al.* 2000). Es gibt jedoch ebenfalls keinen Hinweis darauf, dass die eukaryotischen Hydrogenasen einen α -proteobakteriellen Ursprung haben (Hackstein 2005). Allerdings müssen nicht alle Gene, die α -proteobakteriellen Ursprungs sind, zwingend als Homologe identifizierbar sein, da bakterielle Genome nicht statisch sind und gegenwärtige α -proteobakterielle Genome Sammlungen von Genen unterschiedlicher Quellen sind (Esser *et al.* 2007).

Die Fe-Hydrogenase von *Nyctotherus* gruppiert nicht mit o.g. Hydrogenasen, sondern bildet mit der Hydrogenase von *Desulfovibrio vulgaris* eine benachbarte Gruppe, so dass sie entweder von einem anderen Paralog stammt oder durch horizontalen Gentransfer erworben wurde (Horner *et al.* 2000).

Da die Aktivität der Fe-Hydrogenase von *C. reinhardtii* von der Anwesenheit der Maturasen abhängig ist, kann vermutet werden, dass die Sequenzen für die Maturasen gemeinsam mit der Fe-Hydrogenase Sequenz in einem einzelnen Schritt erworben wurden. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass die bakteriellen Homologe von HydG, HydE und HydF oft in einem Operon mit ihren Fe-Hydrogenasen organisiert sind (Posewitz *et al.* 2004). Durch einen gemeinsamen Gentransfer konnte die Aktivität der Fe-Hydrogenase sichergestellt werden.

Fe-Hydrogenasen sind nur in wenigen Eukaryoten vorhanden, während eine Gruppe zu Fe-Hydrogenasen homologer Proteine, so genannte Narfs (*nuclear prelamins A recognition factor*), bei Eukaryoten weit verbreitet ist. Diese Enzyme katalysieren unterschiedliche Hydrogenase-untypische Reaktionen, z.B. die Heranreifung von Lamin A im menschlichen Zellkern (Barton und Worman 1999) oder die cytosolische Bildung von FeS-Zentren in Hefe (Balk *et al.* 2004). Diese Narfs könnten durch eine Duplikation der Hydrogenase-Sequenzen entstanden sein, nachdem die Sequenzen für die Fe-Hydrogenasen einschließlich der Maturase-Sequenzen erworben wurden. In Organismen, in denen die Aktivität der Fe-Hydrogenase verloren ging, wurden die Maturasen nicht weiter benötigt, so dass keine homologen Sequenzen der Maturasen in diesen Organismen vorliegen.

Im Gegensatz zu der Fe-Hydrogenase von *C. reinhardtii*, die nur ein FeS-Zentrum, den so genannten H-Cluster, besitzt, weisen die Fe-Hydrogenasen von *T. vaginalis* zusätzliche FeS-Zentren in den N-terminalen Domänen auf (Hackstein 2005; Horner *et al.* 2000, 2002). In Mitochondrien werden FeS-Zentren durch das ISC-System (*iron sulfur cluster*) gebildet, das aus mindestens 10 verschiedenen Proteinen besteht (Lill und Mühlenhoff 2005). Eine

Hauptkomponente dieses Systems (IscS) wurde in dem Genom von *T. vaginalis* identifiziert und ihre Funktion in der Bildung des FeS-Zentrums von Ferredoxin demonstriert (Sutak *et al.* 2004). Somit bleibt zu klären, ob die Maturasen HydG, HydE und HydF für die Generierung sämtlicher FeS-Zentren der Fe-Hydrogenasen oder nur für den H-Cluster verantwortlich sind, während die weiteren FeS-Zentren durch das ISC-System gebildet werden.

NiFe-Hydrogenasen sind hauptsächlich in der H₂-Aufnahme bei Archaeobakterien und Eubakterien involviert (Casalot und Rousset 2001) und phylogenetisch nicht mit Fe-Hydrogenasen verwandt. Sie benötigen ein anderes spezifisches System von zusätzlichen Proteinen für die Cluster-Synthesen (Casalot und Rousset 2001), z.B. sind in *E. coli* mindestens sieben Proteine (HypABCDEF und HycI) an dieser Reifung beteiligt (Hube *et al.* 2002).

Die anaeroben Eukaryoten *Entamoeba histolytica* (Nixon *et al.* 2003) und *Giardia intestinalis* (Lloyd *et al.* 2002) produzieren ebenfalls H₂, obwohl sie keine Hydrogenosomen besitzen. Die Genome dieser Organismen weisen zwar homologe Sequenzen zu Fe-Hydrogenasen auf, jedoch keine Gene, die homolog zu den Sequenzen von HydG, HydE oder HydF sind. Ferner konnte – im Gegensatz zu der Fe-Hydrogenase von *C. reinhardtii* (Posewitz *et al.* 2004) – für die Fe-Hydrogenase von *E. histolytica* eine Aktivität bei heterologer Expression in *E. coli* ohne Co-Expression zusätzlicher Proteine gemessen werden (Nixon *et al.* 2003). Somit liegt voraussichtlich bei *E. histolytica* und *G. intestinalis* ein anderer Reifungsmechanismus der Fe-Hydrogenase als bei der Grünalge und wahrscheinlich *T. vaginalis* vor. Die Anwesenheit homologer Proteine zu HydG, HydE und HydF in anaeroben Eukaryoten mit aktiven Fe-Hydrogenasen und Hydrogenosomen, wie z.B. in Ciliaten (Akhmanova *et al.* 1998) oder Chytridiomyceten (Voncken *et al.* 2002b), bleibt nachzuweisen.

4.6 Oxidativer Stress in *T. vaginalis*

T. vaginalis ist mikroaerophil und benötigt eine geringe Konzentration an Sauerstoff für optimales Wachstum (Paget und Lloyd 1990). In seinem natürlichen Lebensraum ist *T. vaginalis* Sauerstoffkonzentrationen bis zu 60 µM ausgesetzt (Wagner und Levin 1978). Obwohl wichtige Enzyme des Pyruvat-Metabolismus, wie die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR) und die Fe-Hydrogenase, sehr empfindlich gegenüber Sauerstoff sind (Hrdy und Müller 1995; Page-Sharp *et al.* 1996), wird in den Hydrogenosomen von *T. vaginalis* Sauerstoff aktiv zu H₂O₂ umgesetzt (Chapman *et al.* 1999). Somit benötigt

T. vaginalis ein System, das die Enzyme vor Sauerstoff und den entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies schützt. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie z.B. ein Superoxid-Radikal (O_2^{\bullet}), können durch Übertragung eines Elektrons auf Sauerstoff entstehen. Das Elektron wird z.B. von reduziertem Ferredoxin, das bei der Reaktion der PFOR gebildet wird, durch Oxidasen auf Sauerstoff übertragen (Ellis *et al.* 1992).

Die Fe-Superoxid-Dismutase (SOD) setzt im Cytosol und in den Hydrogenosomen von *T. vaginalis* Superoxid zu Wasserstoffperoxid um (Kitchener *et al.* 1984; Lindmark und Müller 1974; Rasoloson *et al.* 2001). Zunächst wurde angenommen, dass Cystein – neben den aktiven cytosolischen NADH- und NADPH-abhängigen Oxidasen (Linstead und Bradley 1988) – der hauptsächliche Redox-Puffer in Trichomonaden ist (Ellis *et al.* 1994). Bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen wurde jedoch auch Ascorbat-Peroxidase-Aktivität in *T. foetus* und *T. vaginalis* gemessen, wodurch H_2O_2 zu Wasser reduziert wird (Page-Sharp *et al.* 1996). Während Katalase-Aktivität bei *T. foetus* gemessen wurde (Page-Sharp *et al.* 1996), konnte jedoch in *T. vaginalis* weder Glutathion-Peroxidase- noch Katalase-Aktivität nachgewiesen werden (Ellis *et al.* 1994). Neuere Untersuchungen identifizierten ein cytosolisches Thioredoxin-gekoppeltes Peroxiredoxin System in *T. vaginalis*, das für den Abbau von H_2O_2 verantwortlich sein könnte, denn die Expressionsrate des Peroxiredoxins und des Thioredoxins waren unter oxidativem Stress erhöht (Coombs *et al.* 2004). Es war jedoch kein System bekannt, das in den Hydrogenosomen H_2O_2 und/oder Alkylhydroperoxide (ROOH) entgiftet. Die beschriebenen Systeme des Sauerstoff-Abbaus sind in Abb. 4.1 zusammengefasst.

Im Zuge der Proteomanalyse von *T. vaginalis* Hydrogenosomen wurden drei NADH:Flavin Oxidoreduktasen der Familie der *Old yellow enzymes* (OYE, EC 1.6.99.1; NADPH-Dehydrogenasen) identifiziert. Diese Enzyme nutzen Flavin als nicht-kovalenten Cofaktor und NAD(P)H als Reduktionsmittel. Für das OYE homologe Protein aus *Bacillus subtilis* (YqjM) wurde gezeigt, dass es unter oxidativem Stress durch H_2O_2 induziert wird (Fitzpatrick *et al.* 2003), so dass eine Funktion im Zuge einer H_2O_2 -Entgiftung vermutet wird.

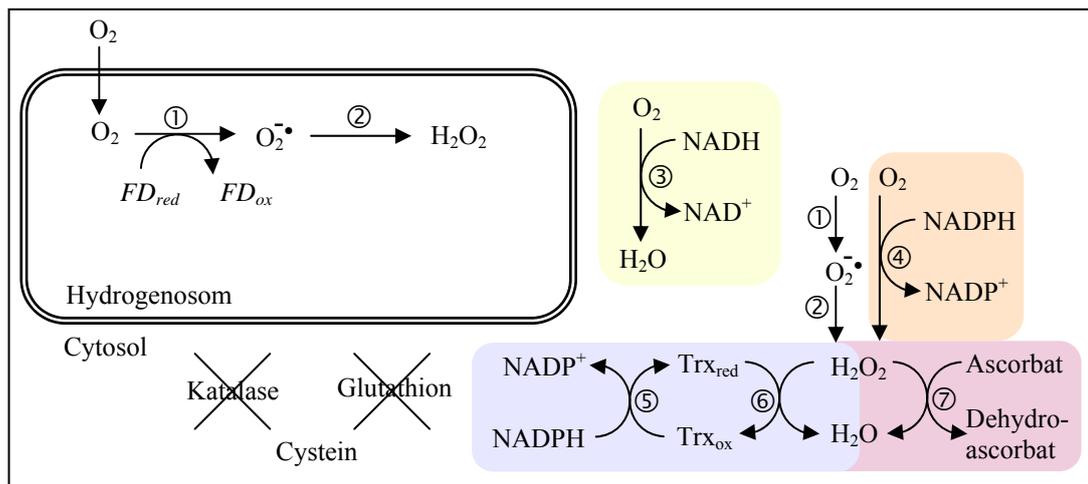


Abb. 4.1: Schematische Übersicht der Sauerstoff-Entgiftung in *T. vaginalis*; ① Oxidase, ② Superoxid Dismutase, ③ NADH-Oxidase, ④ NADPH-Oxidase, ⑤ Thioredoxin Reduktase, ⑥ Thiolperoxidase, ⑦ Ascorbat Peroxidase, FD: Ferredoxin.

In der hydrogenosomalen Fraktion von *T. vaginalis* wurden drei weitere Enzyme identifiziert, die nur aus Bakterien bekannt waren und an Schutzsystemen vor ROS beteiligt sein könnten: Tpx – eine Thiolperoxidase der Gruppe der Peroxiredoxine, Rubrerythrin – ein Nicht-Häm Eisen Protein und OsmC – ein osmotisch induzierbares Protein.

4.6.1 Tpx/Trx/TrxR – ein hydrogenosomales Peroxidase System ?

Auf 2D-Polyacrylamidgelen von *T. vaginalis* wurden eine hydrogenosomale Thiolperoxidase (Tpx) und ein Thioredoxin (Trx) identifiziert (siehe Anhang 2, Proben S24, S37, 138, 189 bzw. 104; Pütz *et al.* 2005). Thiolperoxidasen sind Peroxiredoxine – Peroxidasen mit geringer Effizienz, die Thiole als Reduktionsmittel nutzen. Zu der Untergruppe der 2-Cys Peroxiredoxine gehören die bakteriellen periplasmatischen Thiolperoxidasen, bakterielle Alkylhydroperoxid-Reduktasen (AhpC), Peroxiredoxine (Prx-I-IV) von Säugern, Pflanzen und Pilzen und Tryparedoxin-Peroxidasen der Trypanosomen. Die Peroxiredoxine der Archaeobakterien zählen zu 1-Cys Peroxiredoxinen (Hofmann *et al.* 2002). In der *T. vaginalis* TIGR Genom-Datenbank sind insgesamt drei Tpx Sequenzen annotiert (82140.m00099, 85876.m00193 und 84105.m00110). Diese Tpx zählen zu den 2-Cys Peroxiredoxinen, und 84105.m00110 ist bereits als cytosolische Tpx identifiziert worden (Coombs *et al.* 2004).

Eine Netzwerk-Analyse der Tpx Sequenzen separiert die 17-18 kDa großen eubakteriellen, periplasmatischen Tpx zusammen mit den möglichen hydrogenosomalen Sequenzen von den eubakteriellen AhpC und archaeobakteriellen Peroxiredoxinen (siehe Abb. 3.27). Zwischen den letztgenannten Gruppen liegt die cytosolische Tpx aus *T. vaginalis* (Coombs *et al.* 2004),

da sie den AhpC genauso ähnlich ist wie den archaebakteriellen Peroxiredoxinen. Diese Analyse weist auf einen unabhängigen Ursprung der cytosolischen und der hydrogenosomalen Thiolperoxidase hin. Die hydrogenosomale Tpx ist eubakteriellen Ursprungs, da bisher weder archaebakterielle noch eukaryotische Homologe bekannt sind, und kann entweder vom proteobakteriellen Vorfahren der Organellen stammen oder wurde durch lateralen Gentransfer erworben. Die cytosolische Sequenz gruppiert in phylogenetischen Analysen ebenfalls nicht mit eukaryotischen Tpx Sequenzen, so dass mehrfacher horizontaler Gentransfer von Prokaryoten zu Eukaryoten vermutet wird (Coombs *et al.* 2004).

Drei Cysteine sind in den bakteriellen Tpx Sequenzen konserviert: Cys⁶¹, Cys⁸² und Cys⁹⁵ der *E. coli* Sequenz. Die Cysteine Cys⁶¹ und Cys⁹⁵ sind für die Aktivität der Peroxidase essentiell, während der Verlust des Cys⁸² nur einen geringen Effekt auf die Aktivität hat (Baker und Poole 2003). In der *T. vaginalis* Sequenz 82140.m00099 sind alle drei Cysteine vorhanden, in den Sequenzen 85876.m00193 und 84105.m00110 ist das Cys⁸² gegen ein Alanin bzw. Glycin ausgetauscht, und alle drei Sequenzen besitzen keine eindeutigen N-terminalen Transitsequenzen (siehe Abb. 3.26).

Tpx sind mit Trx und Thioredoxin Reduktasen (TrxR) an einem H₂O₂-Schutzsystem in Eubakterien beteiligt (Abb. 4.2; Cha *et al.* 2004; Wan *et al.* 1997).

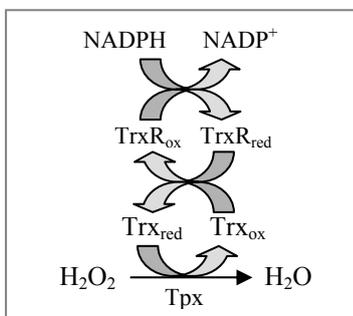


Abb. 4.2: Reduktion von H₂O₂ mittels Tpx/Trx/TrxR-System; die Elektronen werden von NADPH über TrxR, Trx und Tpx auf H₂O₂ übertragen.

Ein ähnliches System wurde im Cytosol von *T. vaginalis* identifiziert. Bei oxidativem Stress wird die Expression der cytosolischen Trx und Tpx sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene induziert, was darauf hindeutet, dass dieses System *in vivo* an der Reduktion von Hydroperoxiden beteiligt ist (Coombs *et al.* 2004).

In der *T. vaginalis* TIGR Genom-Datenbank sind 60 Trx Sequenzen annotiert, von denen nur zwei eine N-terminale Präsequenz aufweisen (siehe Abb. 3.29). Eines dieser Trx mit Präsequenz entspricht dem hydrogenosomalen Protein (83152.m00031; siehe Abb. 3.29). Eine TrxR konnte bisher in der hydrogenosomalen Fraktion von *T. vaginalis* nicht identifiziert werden, jedoch sind in der *T. vaginalis* Genom-Datenbank fünf TrxR Sequenzen annotiert. Drei TrxR Sequenzen weisen im Vergleich zu der cytosolischen TrxR (Coombs *et*

al. 2004) verlängerte N-Termini auf (siehe Abb. 3.28), die nicht den typischen Transitsequenzen entsprechen (Carlton *et al.* 2007).

Die cytosolische TrxR gehört zu den L-TrxR, die ein Molekulargewicht von ~35 kDa haben, im Vergleich zu den H-TrxR mit ~55 kDa (Hirt *et al.* 2002). Die L-TrxR kommen in Archaeobakterien, Eubakterien und Eukaryoten inklusive Pilzen, Pflanzen und dem Darmparasiten *Entamoeba* vor (Becker *et al.* 2000; Bruchhaus *et al.* 1997) und sind mit den Alkylhydroperoxid-Reduktasen F52A (AhpF) verwandt (Poole *et al.* 2000). Die cytosolische TrxR der Trichomonaden unterscheidet sich deutlich in der Aminosäuresequenz von der TrxR des Menschen, die im Gegensatz zu den L-TrxR von *T. vaginalis* zu den H-TrxR gehört (Hirt *et al.* 2002). Die cytosolische TrxR von *T. vaginalis* könnte somit ein gutes Ziel für neue Medikamente gegen Trichomoniasis werden (Coombs *et al.* 2004).

Trx und Tpx sind in der hydrogenosomalen Fraktion vorhanden, so dass lediglich die Lokalisierung von TrxR nachgewiesen werden muss. Es bleibt zu bestätigen, dass neben dem cytosolischen System auch das hydrogenosomale Tpx/Trx/TrxR-System H₂O₂ und/oder Alkylhydroperoxide reduziert.

4.6.2 Rubrerythrin – eine NADPH-abhängige Peroxidase

In der hydrogenosomalen Fraktion von *T. vaginalis* wurde das Protein Rubrerythrin identifiziert (siehe 3.7.3.2). Rubrerythrin (Rbr) ist ein Homodimer mit 21 kDa großen Untereinheiten, einer C-terminalen Rubredoxin-ähnlichen [Fe(SCys)₄] Domäne und einem N-terminalen Di-Eisen-Zentrum. Rbr ist aus anaeroben und mikroaeroben Eubakterien und Archaeobakterien bekannt (Lumppio *et al.* 2001), allerdings war zu Beginn dieser Arbeit keine Sequenz aus Eukaryoten und aeroben Prokaryoten veröffentlicht.

In der *T. vaginalis* TIGR Genom-Datenbank sind fünf weitere Rubrerythrin Sequenzen annotiert (siehe Tab. 3.2), und in der NCBI-Datenbank wurden zwei weitere eukaryotische Sequenzen für Rubrerythrin aus *Entamoeba histolytica* und der Cyanelle von der Grünalge *Cyanophora paradoxa* identifiziert (Pütz *et al.* 2005). Das Netzwerk aus 31 Rubrerythrin Sequenzen ist schlecht aufgelöst, d.h. es sind keine klaren Gruppierungen außer der Cyanobakterien zu erkennen (siehe Abb. 3.32). Ferner gruppieren die eukaryotischen Sequenzen von *T. vaginalis* und *E. histolytica* nicht zusammen, und es ist nicht zu sagen, ob die Sequenzen einen eubakteriellen oder archaeobakteriellen Ursprung haben.

Der Nachweis, dass Rubrerythrin in den Hydrogenosomen von *T. vaginalis* lokalisiert ist, wurde durch den Anti-Rbr-Antikörper in Western Analysen und durch *in vivo* Immunofluoreszenz Versuche bestätigt (siehe Abb. 3.40 und 3.31). Diese Versuche zeigen gleichzeitig, dass Proteine mit N-Termini, die nicht den definierten Transitpeptiden für Hydrogenosomen (Dyall *et al.* 2000) entsprechen, dennoch in die Organellen importiert werden können. Der Anti-Rbr-Antikörper wurde ebenfalls in Western Analysen bei *E. histolytica* getestet, die Mitosomen (rudimentäre Mitochondrien) besitzen (Leon-Avila und Tovar 2004), und konnte Rubrerythrin in der cytosolischen Fraktion detektieren (persönliche Mitteilung von Dr. J. Tovar, London, England).

In Northern Analysen konnte RbrT in der Gesamt-RNA von *T. vaginalis* identifiziert werden (siehe Abb. 3.45). Die Sequenzen von RbrK und RbrB sind wahrscheinlich Pseudogene, da in einer Northern Analyse keine Transkripte dieser Proteine nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 3.45). Dennoch wurden auch diese Proteine heterolog exprimiert und eine mögliche Aktivität untersucht, weil RbrK N-terminal verkürzt ist und RbrB einen Aminosäureaustausch besitzt, der das Di-Eisen-Zentrum betrifft (siehe Abb. 3.30).

In einem *in vitro* Aktivitätstest mit NADH, H₂O₂ und bakterieller NADH-Oxidoreduktase wurde Rubrerythrin aus *Desulfovibrio vulgaris* und *Clostridium perfringens* eine NADH-Peroxidase Aktivität zugeordnet (Coulter *et al.* 1999). In diesen Experimenten war die Oxidation von reduziertem Rubrerythrin mit H₂O₂ um ein zehnfaches schneller als die Oxidation mit O₂. Ein Katalase-negativer H₂O₂-resistenter Stamm von *Spirillum volutans*, in dem Rubrerythrin überexprimiert wurde, besitzt eine NADH-Peroxidase Aktivität, die nicht im Wildtyp detektiert wurde (Alban *et al.* 1998), und eine Rubrerythrin-defiziente Mutante von *Porphyromonas gingivalis* ist sensitiver gegenüber Sauerstoff und H₂O₂ als der Wildtyp (Sztukowska *et al.* 2002). Ferner kann Rubrerythrin aus *D. vulgaris* Katalase-defiziente *E. coli* Mutanten komplementieren und die Überlebensrate dieser Mutanten unter H₂O₂ erhöhen (Lumppio *et al.* 2001). Daher wird angenommen, dass Rubrerythrin an einem Schutzmechanismus vor oxidativem Stress beteiligt ist.

Die *in vitro* Aktivität von rekombinantem Rubrerythrin aus *T. vaginalis* und *E. histolytica* wurde wie bei *Desulfovibrio vulgaris* bestimmt (Coulter und Kurtz 2001) (Abb. 4.3). In diesem Aktivitätstest wird ersatzweise eine Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase (FNR) aus Spinat als NADPH:Rubredoxin Reduktase eingesetzt, da die von FNR katalysierte Reduktion von Rubredoxin durch NADPH bereits charakterisiert (Przysiecki *et al.* 1985), jedoch eine Rubredoxin Reduktase aus *D. vulgaris* noch nicht identifiziert wurde. Rubredoxin (Rub) katalysiert in *D. vulgaris* die Reduktion aller Fe³⁺ in Rubrerythrin zu Fe²⁺ durch NADPH

unter anaeroben Bedingungen, so dass das System aus FNR/Rub/Rbr eine NADPH-Peroxidase Aktivität besitzt und die Abnahme der NADPH-Konzentration gemessen werden kann. Im Genom von *T. vaginalis* wurden keine Sequenzen für ein Rubredoxin und eine Rubredoxin-Reduktase identifiziert. Es ist bisher nicht bekannt, wodurch oxidiertes Rubrerythrin *in vivo* in *T. vaginalis* reduziert wird, so dass die Aktivitätsmessungen für *T. vaginalis* Rbr ebenfalls mit Rub und FNR durchgeführt wurden.

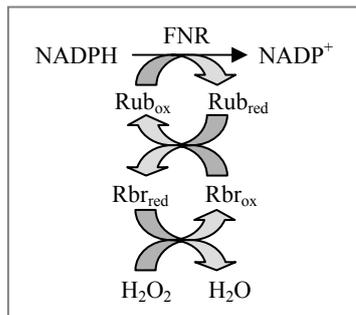


Abb. 4.3: Elektronenfluss in dem Rubrerythrin Aktivitätstest: von NADPH überträgt die Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase (FNR) die Elektronen auf Rubredoxin (Rub), das wiederum die Elektronen auf Rubrerythrin (Rbr) überträgt, so dass H₂O₂ zu H₂O reduziert werden kann.

Für das Rubrerythrin (RbrT/R), das auch in den 2D-Polyacrylamidgelen identifiziert wurde (Proben 18, 20, 22, S38 und S39), liegt eine spezifische Aktivität von $>100 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ in den Eluaten nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie vor. Das Protein RbrT hat allerdings eine um 16,5 % geringere Aktivität als RbrR (siehe Abb. 3.41), obwohl es das gleiche Rbr-Protein mit lediglich einem anderen Anhang ist: Der Vektor pTrcHis2A kodiert bei RbrT für einen C-terminalen His-Anhang, während durch den Vektor pET-32a bei RbrR ein N-terminaler His-, Thioredoxin- und S-Anhang, gefolgt von einer Enterokinase-Prozessierungsstelle kodiert wurde. Die N-Termini des Proteins sind in einem Rubrerythrin Dimer von *D. vulgaris* nach außen gerichtet, während die C-Termini im Innern des Dimers lokalisiert sind (Abb. 4.4; Jin *et al.* 2002). Somit ist ein N-terminaler Anhang an das überexprimierte Protein wahrscheinlich weniger störend als ein C-terminaler Anhang.

Das Dimer liegt in einer so genannten „head-to-tail“ Form vor, so dass die Fe(SCys)₄ Domäne einer Rbr-Untereinheit in der Nähe des Di-Eisenzentrums der zweiten Untereinheit lokalisiert ist (Abb. 4.4). Die Elektronen werden vermutlich auf das Eisen der Fe(SCys)₄ Domäne übertragen, das wiederum die Elektronen an die Eisenatome des Di-Eisenzentrums weitergibt und H₂O₂ in dem Di-Eisenzentrum reduziert wird.

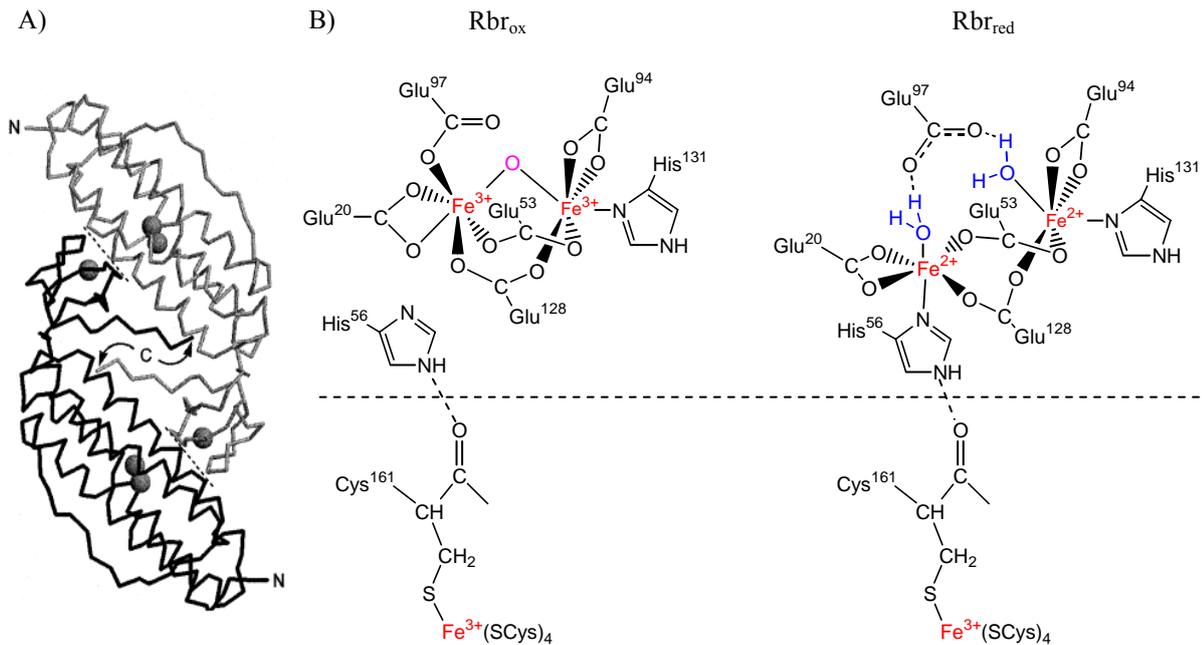


Abb. 4.4: Schematische Darstellung des Rubrerythrin Dimers (A) und des Di-Eisenzentrums in oxidiertem (Rbr_{ox}) und reduziertem (Rbr_{red}) Zustand mit der Dimer-Grenzfläche (B) verändert nach Jin *et al.* (2002, 2004). A) Die Eisenatome sind als Kugeln dargestellt, Amino-(N) und Carboxyl-(C) Termini sind gekennzeichnet; gestrichelte Linien deuten die Grenzfläche zwischen den Fe(SCys)₄ und Di-Eisen Zentren an. B) Die Eisenatome sind rot, die Sauerstoffbrücke violett und die H₂O Moleküle blau hervorgehoben; die gestrichelte Linie deutet die Grenzfläche zwischen den Fe(SCys)₄ und Di-Eisenzentren an.

An dem Di-Eisenzentrum sind fünf Glutamat-Reste und ein Histidin-Rest beteiligt: Glu²⁰, Glu⁵³, Glu⁹⁴, Glu⁹⁷, Glu¹²⁸ und His¹³¹ (Coulter *et al.* 2000). In der *T. vaginalis* RbrB Sequenz ist das Glu⁹⁷ gegen ein Glycin ausgetauscht (siehe Abb. 3.30), und die Aktivität ist um das 10-fache geringer als bei RbrT (siehe Abb. 3.41). Wahrscheinlich ist die Re-Oxidation des Rbr_{red} durch diesen Aminosäureaustausch gestört, da in den *D. vulgaris* Mutanten E97A und E97F, in denen Glu⁹⁷ durch ein Alanin bzw. Phenylalanin ausgetauscht war, ebenfalls keine NADH-Peroxidase Aktivität nachgewiesen wurde (Coulter *et al.* 2000).

Überexprimiertes RbrK und N-terminal verkürztes RbrT (RbrTK) konnten nur in sehr geringem Maße exprimiert und in der löslichen Fraktion nach einem nativen Aufschluss der *E. coli* Kulturen erhalten werden. Es wurden keine Aktivitätserhöhungen in den Eluaten nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie gemessen, so dass im Vergleich zu den Leervektoren pTrcHis2A bzw. pET-21b die Proteine RbrK und RbrTK nicht aktiv waren (siehe Abb. 3.41). Der N-Terminus von Rubrerythrin könnte einen Einfluss auf die richtige Konformation bzw. Löslichkeit dieses Proteins und somit auf die Aktivität haben.

Es wurde zusätzlich zu den *T. vaginalis* Rbr-Proteinen ein Rbr aus *Entamoeba histolytica* in *E. coli* überexprimiert (EntRbr; siehe Abb. 3.35). Für dieses Protein konnte eine spezifische Aktivität von >100 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ in den Eluaten nach Ni-NTA-Affinitäts-

chromatographie gemessen werden (siehe Abb. 3.41). *E. histolytica* besitzt somit ein cytosolisches Rbr, das ebenfalls eine Peroxidase Aktivität besitzt.

In *Tritrichomonas foetus* konnten in 2D-Polyacrylamidgelen die Proteine SOD und Rubrerythrin identifiziert werden (Tf9 bzw. Tf14). Die Rbr-Sequenz konnte bisher nicht isoliert, jedoch die Transkription von Rbr mit heterologen Sonden aus *T. vaginalis* in Northern Analysen nachgewiesen werden (Kohlert 2006). Im Gegensatz zu *T. vaginalis* wurde in *T. foetus* biochemisch Katalase-Aktivität nachgewiesen (Page-Sharp *et al.* 1996; Müller 1973), so dass H_2O_2 in *T. foetus* im Cytosol durch Katalase zu H_2O reduziert werden kann.

Die mikroaerophilen Eukaryoten *T. vaginalis*, *T. foetus* und *E. histolytica* nutzen somit alle ein Rbr-System bakteriellen Ursprungs zur Reduktion von H_2O_2 .

4.6.3 OsmC – eine Alkylhydroperoxid Reduktase ?

Die sequenzierten Peptide der Proben 23, 24, 157, 158, S56 und S57 identifizierten eine Proteinsequenz, die Sequenzähnlichkeit zu dem bakteriellen Enzym OsmC aufweist (siehe Anhang 2). OsmC ist ein osmotisch induzierbares Protein und hat Ähnlichkeit zu dem besser charakterisierten Protein OHR (*organic hydroperoxide resistance*) (Mongkolsuk *et al.* 1998). OsmC defiziente *E. coli* Zellen sind sensitiv gegenüber Wasserstoffperoxid und *tert*-Butylhydroperoxid, was darauf hindeutet, dass OsmC ebenso wie OHR organische Hydroperoxide reduziert (Conter *et al.* 2001). Der katalytische Mechanismus des OsmC ist analog zu dem Mechanismus des OHR und der strukturell nicht verwandten Peroxiredoxine: OsmC und OHR verwenden hoch reaktive Cystein-Thiolgruppen (Cys⁵⁹ und Cys¹²⁵) um die Reduktion von Hydroperoxiden auszulösen (Lesniak *et al.* 2002, 2003; Mongkolsuk *et al.* 1998; Atichartpongkul *et al.* 2001). In der *T. vaginalis* OsmC Sequenz sind die korrespondierenden Cysteine an Positionen 57 und 122 vorhanden (Daten nicht gezeigt). Somit kann angenommen werden, dass OsmC aus *T. vaginalis* wie das OsmC aus *E. coli* (Lesniak *et al.* 2003) die Reduktion von Alkylhydroperoxiden (ROOH) zu Alkoholen (ROH) mittels eines Reduktionsmittels (RSH) katalysiert (Abb. 4.5).

4.6.4 Auswirkungen von oxidativem Stress auf SOD- und Peroxidase-Expressionen und der Zusammenhang mit Metronidazol-Resistenzen

Durch Inkubation von *T. vaginalis* unter oxidativem Stress sollte nachgewiesen werden, wie sich erhöhte O₂- und H₂O₂-Konzentrationen auf die Expression der an der ROS-Entgiftung beteiligten Enzyme auswirken. Die Transkriptionsrate von *T. vaginalis* RbrT konnte durch Sauerstoff-Begasung um 650 %, die Transkriptionsrate der hydrogenosomalen SOD um 1740 % und die Transkriptionsrate für Tpx um 30 % erhöht werden (siehe Abb. 3.47).

In Kulturen, die mit 1 mM H₂O₂ inkubiert wurden, konnte eine Erhöhung der RbrT-Transkriptionsrate um 50 % ermittelt werden, während die Transkriptionsraten von SOD und Tpx nahezu unverändert blieben. Durch weiterführende Experimente wurde festgestellt, dass die Transkriptionsrate des RbrT bei 2,5 mM H₂O₂ um mehr als 100 % gesteigert wird. Ab einer Konzentration von 3 mM H₂O₂ sterben die *T. vaginalis* Zellen jedoch ab (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine erhöhte Konzentration von H₂O₂ induziert ebenfalls die Expressionsrate von RbrT, was die Vermutung bestätigt, dass Rubrerythrin an dem Abbau von H₂O₂ und somit am Schutz vor ROS beteiligt ist.

Sauerstoff spielt eine entscheidende Rolle in der Resistenz gegen das Antibiotikum Metronidazol. Elektronen werden von der PFOR auf Ferredoxin und unter anaeroben Bedingungen von Hydrogenasen anschließend auf Protonen übertragen (siehe Abb. 1.2). In der Anwesenheit von Metronidazol überträgt Ferredoxin die Elektronen bevorzugt auf dieses Antibiotikum (Abb. 4.5), so dass cytotoxische Nitroradikale gebildet werden. Bei der so genannten „aeroben Resistenz“, die bei *T. foetus* entdeckt wurde (Meingassner *et al.* 1978), konkurriert O₂ mit Metronidazol um diese Elektronen und inhibiert die Aktivierung des Antibiotikums. Liegt eine erhöhte O₂-Konzentration in den Zellen vor, wird Metronidazol nicht aktiviert und diese Zellen sind gegen Metronidazol resistent. Eine O₂-unabhängige „anaerobe Resistenz“ gegen Metronidazol kann *in vitro* auftreten, wenn die Enzyme, die für Elektronenübertragungen nötig sind (PFOR, Hydrogenase) nicht aktiv sind (Cerkasovová *et al.* 1984; Kulda 1999).

In *T. vaginalis* Stämmen, die „aerobe“ Metronidazol-Resistenz besitzen wurde die SOD-Aktivität durch Inkubation mit 5 % Sauerstoff um das 9-fache gesteigert (Rasoloson *et al.* 2001). *E. histolytica* besitzt wie *T. vaginalis* weder eine Katalase (Dierickx *et al.* 1990) noch ein Glutathion-basiertes Antioxidant-System (Fahey *et al.* 1984), sondern baut H₂O₂ durch Peroxiredoxin ab (Bruchhaus *et al.* 1997). In Metronidazol-resistenten *E. histolytica* wurde ebenfalls erhöhte Fe-SOD Aktivität gemessen und induzierte Expression der Fe-SOD und des

Tpx nachgewiesen (Samarawickrema *et al.* 1997; Wassmann *et al.* 1999). Somit liegt bei diesem Protisten wahrscheinlich ein ähnliches System wie bei *T. vaginalis* zum Schutz vor ROS vor, in dem cytosolische Fe-SOD und Tpx involviert sind.

Eine aktuelle Übersicht, welche Systeme zum Schutz vor ROS in *T. vaginalis* identifiziert wurden, ist in Abb. 4.5 dargestellt.

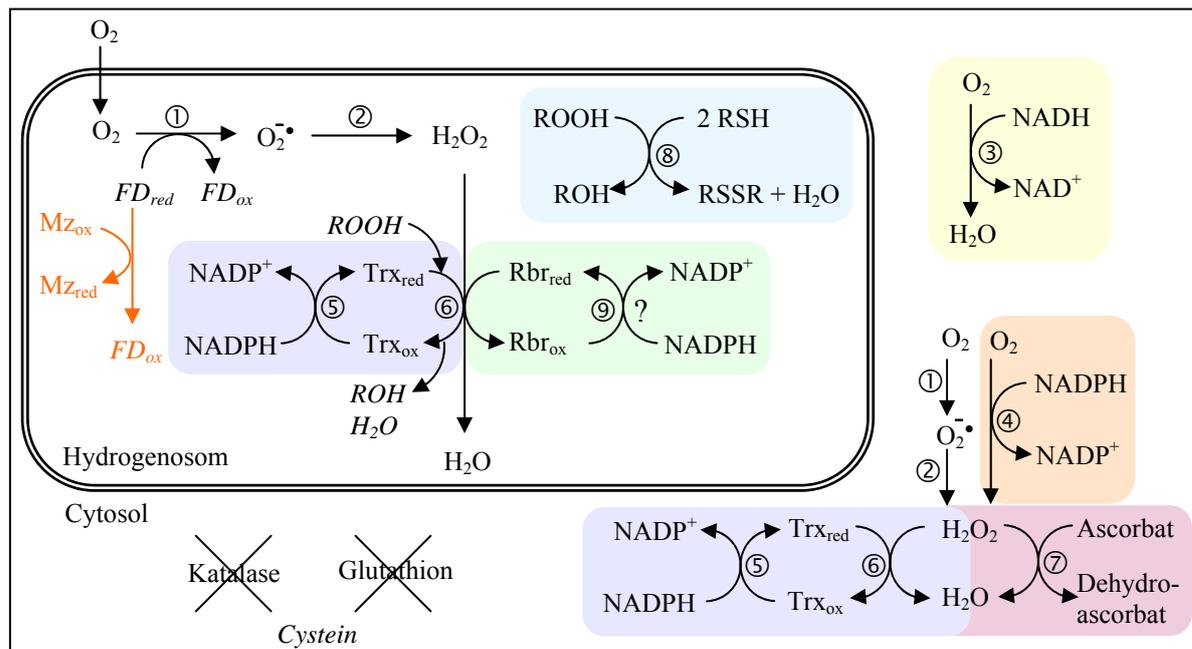


Abb. 4.5: Erweiterte schematische Übersicht der Sauerstoff-Entgiftung in *T. vaginalis*; ① Oxidase, ② Superoxid Dismutase, ③ NADH-Oxidase, ④ NADPH-Oxidase, ⑤ Thioredoxin Reduktase, ⑥ Thiolperoxidase, ⑦ Ascorbat Peroxidase, ⑧ OsmC, ⑨ Rubredoxin/Rubredoxin-Reduktase ?; FD: Ferredoxin, ROOH: Alkylhydroperoxid, ROH: Alkohol, RSH: Reduktant, RSSR: Reduktant mit Disulfidbrücke, Rbr: Rubredoxin, Trx: Thioredoxin; in kursiv sind mögliche involvierte Komponenten dargestellt; die Aktivierung von Metronidazol (Mz) durch Elektronenübertragung von FD_{red} ist orange eingezeichnet.

In den Hydrogenosomen von *T. vaginalis* wird O_2 aktiv zu H_2O_2 umgesetzt (Chapman *et al.* 1999), obwohl in diesen Organellen die O_2 -sensitiven Enzyme PFOR und Fe-Hydrogenase lokalisiert sind. Zusätzlich zu den cytosolischen Systemen zum Schutz vor ROS gibt es wahrscheinlich mindestens drei weitere hydrogenosomale Systeme, die H_2O_2 und/oder Alkylhydroperoxide reduzieren: Tpx/Trx/TrxR, Rbr und OsmC. Diese Systeme sind bakteriellen Ursprungs, bisher aus Mitochondrien nicht bekannt, und es liegen nur für Rbr weitere homologe eukaryotische Sequenzen aus *Entamoeba histolytica* und der Cyanelle aus *Cyanophora paradoxa* vor. Diese ROS-Detoxifizierungs-Mechanismen können für andere amitochondriate Eukaryoten wie z.B. die Protisten *Entamoeba* und *Giardia* wichtig sein, da sie ebenfalls weder Glutathion noch Katalasen oder Hämperoxidasen besitzen (Müller *et al.*

2003; Flohe *et al.* 1999). In *E. histolytica* wurde bereits cytosolisches Rbr mittels Western Analyse nachgewiesen (J. Tovar, unveröffentlicht). Zusätzlich besitzt *E. histolytica* ein zu dem bakteriellen AhpF/AhpC-System homologen Mechanismus, der nicht Trx als Elektronenüberträger nutzt (Bruchhaus *et al.* 1997, 1998). *Giardia* setzt O₂ hauptsächlich durch NAD(P)H-Oxidasen um (Brown *et al.* 1998). Eine SOD-Aktivität konnte ebenso wenig nachgewiesen werden (Brown *et al.* 1995) wie Katalase und unspezifische Peroxidase Aktivitäten (Biagini *et al.* 1997). In diesem Protisten wurde Pyruvat als intrazellulärer, nicht-enzymatischer Radikalfänger der ROS nachgewiesen, der mit H₂O₂ (und O₂•) zu Acetat und CO₂ reagiert (Biagini *et al.* 2001). Eine TrxR Sequenz wurde bei *Giardia* identifiziert (Brown *et al.* 1995), aber es ist noch keine Funktion dieses Enzyms beschrieben worden.

In aeroben Mitochondrien werden ROS hauptsächlich durch die Reaktionen der Elektronentransportkette gebildet, schädigen die mitochondriellen Proteine und DNA und werden als Grund für das Altern angesehen (Allen 1996). Mitochondrien besitzen zum Schutz vor ROS u.a. Mn-SOD, Cytochrom c, Katalase, das Glutathion-System und Peroxiredoxine (Andreyev *et al.* 2005). In Mitochondrien, Hydrogenosomen und Organismen mit Mitosomen liegen unterschiedliche Systeme zum Schutz vor ROS vor, die aus dem ursprünglichen Vorfahren dieser Organellen stammen können oder durch lateralen Gentransfer erworben wurden.

4.7 Ausblick

Die Methode der zweidimensionalen PAGE ist geeignet, um einen Überblick über die Proteinverteilung in einer Fraktion zu erhalten, jedoch ist keine Vollständigkeit aller Proteine gewährleistet. Zum einen können nicht alle Proteine unter den gewählten Bedingungen solubilisiert werden, zum anderen sind Proteine, die nur in geringer Menge exprimiert werden, auf Coomassie-gefärbten SDS-Gelen schwer detektierbar. In der Analyse des hydrogenosomalen Proteoms von *T. vaginalis* (und *T. foetus*) wurde eine große Anzahl Proteine mehrfach auf den 2D-Polyacrylamidgelen identifiziert, da *T. vaginalis* ein sehr redundantes Genom besitzt (Carlton *et al.* 2007) und diese Proben von sehr abundanten Proteinen stammten (decarboxylierende MDH, SCS, PFOR).

Mit einer Software könnte die Detektion gering exprimierter Proteine vereinfacht und Einflüsse der Inkubationsbedingungen auf der Ebene der Translation verfolgt und analysiert werden. 2D-DIGE-Analysen (*difference gel electrophoresis*) für den Vergleich von Proteomen nach unterschiedlichen Inkubations-Bedingungen wäre eine weitere Möglichkeit,

den Einfluss von oxidativem Stress zu untersuchen. Das Proteom der Organellen aus verschiedenen Organismen kann ebenfalls durch 2D-Analysen verglichen werden, z.B. von *T. vaginalis*, *T. foetus* und dem Chytridiomyceten *Neocallimastix frontalis*, denn 2D-Polyacrylamidgele der Organellen dieser Organismen weisen eindeutig unterschiedliche Proteinverteilungen auf.

Andere 2D-Systeme fraktionieren Proteine nicht nach ihrem pI in der ersten Dimension, sondern trennen z.B. unter nativen Bedingungen Proteinkomplexe auf (BN-PAGE) oder verwenden in der ersten Dimension ein saures Puffersystem und anstelle des anionischen SDS kationische Detergentien wie z.B. 16-BAC (Benzoldimethyl-n-hexadecylammoniumchlorid). Alternative Verfahren zur 2D-PAGE sind z.B. Flüssigkeitschromatographie (HPLC) oder Kapillarelektrophorese, die sich direkt mit massenspektrometrischen Detektionsverfahren koppeln lassen. Durch Proteinchips können Proteine nach bestimmten biochemischen Kriterien (Polarität, adsorptive Eigenschaften, Affinitäten u.a.) auf den Chipoberflächen vorgereinigt werden und über biophysikalische oder biochemische Parameter der Bindungseigenschaften strukturelle Informationen gewonnen und somit Proteine identifiziert und genauer charakterisiert werden.

Durch eine Isolierung der Proteine, die außen an den Hydrogenosomen lokalisiert sind, z.B. durch Natriumcarbonat-Waschungen, soll die Fraktion näher charakterisiert werden. Dadurch soll die Vermutung einer Co-Translation an den Organellen bestätigt und die Zusammensetzung dieser Fraktion mit mitochondriellen Daten verglichen werden. Für die glycolytischen Enzyme Enolase, Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase und Phosphoglucosomutase werden *in vivo* Lokalisierungs-Experimente vorbereitet, mit denen eine Assoziation an den Organellen nachgewiesen werden soll.

Durch die vorliegende Arbeit sind weitere Fragestellungen aufgeworfen worden: Welche spezifischen Funktionen haben HydG, HydE und HydF bei der Reifung der Fe-Hydrogenasen? Wie wird in *T. vaginalis* die Expression des komplexen Peroxidase-Systems geregelt? Welche Spezifitäten weisen diese Systeme im Hinblick auf H₂O₂ und/oder Alkylhydroperoxide auf? Liegt zusätzlich zum cytosolischen Tpx/Trx/TrxR System in *T. vaginalis* ebenfalls ein hydrogenosomales System vor? Ist dieses System spezifisch für H₂O₂ oder setzt es auch Alkylhydroperoxide um? Sind die noch nicht untersuchten Rubrerythrin Sequenzen (Rbr3 und Rbr4) im Hydrogenosom lokalisiert? Lassen sich die Expressionen von Rbr3 und Rbr4 durch oxidativen Stress induzieren, und weisen diese Enzyme ebenfalls eine Peroxidase Aktivität auf? Wodurch wird Rubrerythrin *in vivo* reduziert? Welche Aktivität hat Rbr in *T. foetus*, und wie werden Rbr und Katalase reguliert,

wenn *T. foetus* tatsächlich hydrogenosomale Katalase besitzt? Ist OsmC eine hydrogenosomale Alkylhydroperoxid-Reduktase?

Antworten auf diese Fragen sollen z.B. durch Co-Expressionen der möglichen Maturasen mit den Hydrogenasen gegeben werden. Die Auswirkungen auf die Hydrogenase-Aktivitäten sollen dadurch bestimmt und durch *Knock-out* Experimente der *T. vaginalis* Maturasen *in vivo* die Hydrogenase-Aktivität mit und ohne Maturasen verglichen werden. Ferner sollen Auswirkungen dieser *Knock-outs* auf Proteinexpressionen mittels 2D-Elektrophoresen untersucht werden. Die Lokalisierung der Peroxidasen soll durch Immunofluoreszenz-Versuche und ihre Aktivitäten durch heterologe Expressionen mit anschließenden Aktivitätsmessungen geklärt werden.

In dieser Arbeit wurden einige Proteine identifiziert, deren Funktionen nicht bekannt waren und deren Lokalisierung überprüft werden muss. Diese Arbeit ist somit ein erster Schritt in der hydrogenosomalen Proteomanalyse von *T. vaginalis*, die durch weiterführende Studien vertieft und vervollständigt werden muss.

5 Literaturverzeichnis

- Ades IZ und Butow RA (1980).** The products of mitochondria-bound cytoplasmic polysomes in yeast. *J Biol Chem.* **255** (20): 9918-9924.
- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF (2005).** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol.* **52** (5): 399-451.
- Akhmanova A, Voncken F, van Alen T, van Hoek A, Boxma B, Vogels G, Veenhuis M, Hackstein JH (1998).** A hydrogenosome with a genome. *Nature.* **396** (6711): 527-528.
- Akhmanova A, Voncken FGJ, Hosea KM, Harhangi H, Keltjens JT, op den Camp HJ, Vogels GD, Hackstein JH (1999).** A hydrogenosome with pyruvate formate-lyase: anaerobic chytrid fungi use an alternative route for pyruvate catabolism. *Mol Microbiol.* **32** (5): 1103-1114.
- Alban PS, Popham DL, Rippere KE, Krieg NR (1998).** Identification of a gene for a rubrerythrin/nigerythrin-like protein in *Spirillum volutans* by using amino acid sequence data from mass spectrometry and NH₂-terminal sequencing. *J Appl Microbiol.* **85** (5): 875-882.
- Allen JF (1996).** Separate sexes and the mitochondrial theory of ageing. *J Theor Biol.* **180**: 135-140.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990).** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005).** Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc).* **70** (2): 200-214.
- Arroyo R, Gonzalez-Robles A, Martinez-Palomo A, Alderete JF (1993).** Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Mol Microbiol.* **7** (2): 299-309.
- Atichartpongkul S, Loprasert S, Vattanaviboon P, Whangsuk W, Helmann JD, Mongkolsuk S (2001).** Bacterial Ohr and OsmC paralogues define two protein families with distinct functions and patterns of expression. *Microbiology.* **147** (7): 1775-1782.
- Baker LM und Poole LB (2003).** Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*. Sulfenic acid formation and overoxidation of essential CYS61. *J Biol Chem.* **278** (11): 9203-9211.

- Balk J, Pierik AJ, Netz DJ, Muhlenhoff U, Lill R (2004).** The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *EMBO J.* **23** (10): 2105-2115.
- Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, Miyano S (2001).** Views: Fundamental building blocks in the process of knowledge discovery, In: *Proceedings of the 14th International FLAIRS Conference*. AAAI Press. 233-238.
- Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, Miyano S (2002).** Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics.* **18**: 298-305.
- Barton RM und Worman HJ (1999).** Prenylated prelamins A interacts with Narf, a novel nuclear protein. *J Biol Chem.* **274** (42): 30008-30018.
- Beach DH, Holz GG Jr, Singh BN, Lindmark DG (1990).** Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol.* **38** (2): 175-190.
- Becker K, Gromer S, Schirmer RH, Müller S (2000).** Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *Eur J Biochem.* **267** (20): 6118-6125.
- Begley TP, Downs DM, Ealick SE, McLafferty FW, Van Loon AP, Taylor S, Campobasso N, Chiu HJ, Kinsland C, Reddick JJ, Xi J (1999).** Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch Microbiol.* **171** (5): 293-300.
- Benchimol M (2001).** Hydrogenosome morphological variation induced by fibronectin and other drugs in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res.* **87** (3): 215-222.
- Benchimol M, Almeida JC, de Souza W (1996a).** Further studies on the organization of the hydrogenosome in *Tritrichomonas foetus*. *Tissue Cell.* **28** (3): 287-299.
- Benchimol M, Elias CA, De Souza W (1982).** *Tritrichomonas foetus*: ultrastructural localization of calcium in the plasma membrane and in the hydrogenosome. *Exp Parasitol.* **54** (3): 277-284.
- Benchimol M und Engelke F (2003).** Hydrogenosome behavior during the cell cycle in *Tritrichomonas foetus*. *Biol Cell.* **95** (5): 283-293.
- Benchimol M, Johnson PJ, de Souza W (1996b).** Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study. *Biol Cell.* **87** (3): 197-205.
- Benchimol M und de Souza W (1983).** Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. *J Protozool.* **30** (2): 422-425.
- Biagini GA, Park JH, Lloyd D, Edwards MR (2001).** The antioxidant potential of pyruvate in the amitochondriate diplomonads *Giardia intestinalis* and *Hexamita inflata*. *Microbiology.* **147** (12): 3359-3365.

- Biagini GA, Suller MTE, Finlay BJ, Lloyd D (1997).** Oxygen uptake and antioxidant responses of the free-living diplomonad *Hexamita* sp. *J Eukaryot Microbiol.* **44**: 447-453.
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987).** Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* **8**: 93-99.
- Boxma B, de Graaf RM, van der Staay GW, van Alen TA, Ricard G, Gabaldon T, van Hoek AH, Moon-van der Staay SY, Koopman WJ, van Hellemond JJ, Tielens AG, Friedrich T, Veenhuis M, Huynen MA, Hackstein JH (2005).** An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature.* **434**: 74-79.
- Boxma B, Voncken F, Jannink S, van Alen T, Akhmanova A, van Weelden SW, van Hellemond JJ, Ricard G, Huynen M, Tielens AG, Hackstein JH (2004).** The anaerobic chytridiomycete fungus *Piromyces* sp. E2 produces ethanol via pyruvate:formate lyase and an alcohol dehydrogenase E. *Mol Microbiol.* **51** (5): 1389-1399.
- 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, Plumper E, Johnson PJ (1997).** Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist *Trichomonas*: similarities with mitochondrial protein import. *EMBO J.* **16** (12): 3484-3493.
- Broers CAM, Stumm CK, Vogels GD (1990).** *Psalteriomonas lanterna* gen. nov., sp. nov., a free-living amoeboflagellate isolated from freshwater anaerobic sediments. *Europ J Protistol.* **25**: 369-380.
- Brondijk TH, Durand R, van der Giezen M, Gottschal JC, Prins RA, Fevre M (1996).** *scsB*, a cDNA encoding the hydrogenosomal beta subunit of succinyl-CoA synthetase from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Mol Gen Genet.* **253** (3): 315-323.
- Brown DM, Upcroft JA, Edwards MR, Upcroft P (1998).** Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Int J Parasitol.* **28** (1): 149-164.
- Brown DM, Upcroft JA, Upcroft P (1995).** Free radical detoxification in *Giardia duodenalis*. *Mol Biochem Parasitol.* **72** (1-2): 47-56.
- Bruchhaus I, Richter S, Tannich E (1997).** Removal of hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of *Entamoeba histolytica*. *Biochem J.* **326** (3): 785-789.
- Bruchhaus I, Richter S, Tannich E (1998).** Recombinant expression and biochemical characterization of an NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem J.* **330** (3): 1217-1221.
- Brul S, Veltman RH, Lombardo MC, Vogels GD (1994).** Molecular cloning of hydrogenosomal ferredoxin cDNA from the anaerobic amoeboflagellate *Psalteriomonas lanterna*. *Biochim Biophys Acta.* **1183** (3): 544-546.

- Bryant D und Moulton V (2004).** Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol Biol Evol.* **21** (2): 255-265.
- Bui ET, Bradley PJ, Johnson PJ (1996).** A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93** (18): 9651-9656.
- Bui ET und Johnson PJ (1996).** Identification and characterization of [Fe]-hydrogenases in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol.* **76** (1-2): 305-310.
- Buu LM, Chen YC, Lee FJ (2003).** Functional characterization and localization of acetyl-CoA hydrolase, Ach1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **278** (19): 17203-17209.
- Carafoli E und Crompton M (1978).** The regulation of intracellular calcium by mitochondria. *Ann NY Acad Sci.* **307**: 269-284.
- Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UC, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Muller 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 CL, Osoegawa K, de Jong PJ, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik SB, Logsdon JM Jr, Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzberg SL, Tang P, Chiu CH, Lee YS, 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** (5809): 207-212.
- Casalot L und Rousset M (2001).** Maturation of the [NiFe] hydrogenases. *Trends Microbiol.* **9** (5): 228-237.
- Cerkasovová A, Cerkasov J, Kulda J (1984).** Metabolic differences between metronidazole resistant and susceptible strains of *Trichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol.* **11**: 105-118.
- Cerkasovová A, Cerkasov J, Kulda J, Reischig J (1976).** Circular DNA and cardiolipin in hydrogenosomes, microbody-like organelles of trichomonads. *Folia Parasitol (Praha).* **23** (1): 33-37.
- Cha MK, Kim WC, Lim CJ, Kim K, Kim ICH (2004).** *Escherichia coli* periplasmic thiol peroxidase acts as lipid hydroperoxide peroxidase and the principal antioxidative function during anaerobic growth. *J Biol Chem.* **279** (10): 8769-8778.
- Chapman A, Linstead DJ, Lloyd D (1999).** Hydrogen peroxide is a product of oxygen consumption by *Trichomonas vaginalis*. *J Biosci.* **24**: 339-344.
- Clark CG und Diamond LS (2002).** Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev.* **15** (3): 329-341.

- Clemens DL und Johnson PJ (2000).** Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. *Mol Biochem Parasitol.* **106**: 307-313.
- Conter A, Gangneux C, Suzanne M, Gutierrez C (2001).** Survival of *Escherichia coli* during long-term starvation: effects of aeration, NaCl, and the *rpoS* and *osmC* gene products. *Res Microbiol.* **152** (1): 7-26.
- 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 Bio Chem.* **279**: 5249-5256.
- Coulter ED, Shenvi NV, Beharry ZM, Smith JJ, Prickril BC, Kurtz DM Jr. (2000).** Rubrerythrin-catalyzed substrate oxidation by dioxygen and hydrogen peroxide. *Inorganica Chimica Acta.* **297**: 231-241.
- Coulter ED, Shenvi NV, Kurtz DM Jr. (1999).** NADH peroxidase activity of rubrerythrin. *Biochem Biophys Res Commun.* **255** (2): 317-323.
- Coulter ED und Kurtz DM Jr (2001).** A role for rubredoxin in oxidative stress protection in *Desulfovibrio vulgaris*: catalytic electron transfer to rubrerythrin and two-iron superoxide reductase. *Arch Biochem Biophys.* **394** (1): 76-86.
- de Andrade Rosa I, Einicker-Lamas M, Roney Bernardo R, Previatto LM, Mohana-Borges R, Morgado-Diaz JA, Benchimol M (2006).** Cardiolipin in hydrogenosomes: evidence of symbiotic origin. *Eukaryot Cell.* **5** (4): 784-787.
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO (1997).** Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science.* **278** (5338): 680-686.
- Devereux J, Haerberli P, Smithies O (1984).** A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **2**: 387-395.
- Dierickx PJ, Almar MM, De Jonckheere JF (1990).** Glutathione transferase activity in some flagellates and amoebae, and purification of the soluble glutathione transferases from *Acanthamoeba*. *Biochem Int.* **22** (4): 593-600.
- Dimmer KS, Fritz S, Fuchs F, Messerschmitt M, Weinbach N, Neupert W, Westermann B (2002).** Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* **13** (3): 847-853.
- Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ (2004a).** Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science.* **304**: 253-257.
- Dyall SD und Johnson PJ (2000).** The trichomonad hydrogenosome. In: Tschudi C, Pearce EJ, Editors. *Biology of Parasitism*. Boston: Kluwer Academic Publishers. 168-193.
- Dyall SD, Koehler CM, Delgadillo-Correa MG, Bradley PJ, Plumper 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, Plumper 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. *J Biol Chem.* **278** (33): 30548-30561.

Dyall SD, Yan W, Delgadillo-Correa MG, Lunceford A, Loo JA, Clarke CF, Johnson PJ (2004b). Non-mitochondrial complex I proteins in a hydrogenosomal oxidoreductase complex. *Nature.* **431**: 1103-1107.

Edwards DI (1993). Nitroimidazole drugs - action and resistance mechanisms, I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother.* **31** (1): 9-20.

Ellis JE, Cole D, Lloyd D (1992). Influence of oxygen on the fermentative metabolism of metronidazole-sensitive and resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol.* **56** (1): 79-88.

Ellis JE, Yarlett N, Cole C, Humphreys MJ, Lloyd D (1994). Antioxidant defences in the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis*: comparison of metronidazole-resistant and sensitive strains. *Microbiology.* **140**: 2489-2494.

Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**: 1005-1016.

Embley TM, Finlay BJ, Dyal PL, Hirt RP, Wilkinson M, Williams AG (1995). Multiple origins of anaerobic ciliates with hydrogenosomes within the radiation of aerobic ciliates. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **262**: 87-93.

Embley TM und Martin W (1998). A hydrogen-producing mitochondrion. *Nature.* **396** (6711): 517-519.

Embley TM und Martin W (2006). Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature.* **440** (7084): 623-630.

Embley TM, van der Giezen M, Horner DS, Dyal PL, Bell S, Foster PG (2003). Hydrogenosomes, mitochondria and early eukaryotic evolution. *IUBMB Life.* **55**: 387-395.

Esser C, Martin W, Dagan T (2007). The origin of mitochondria in light of a fluid prokaryotic chromosome model. *Biol Lett.* Dec 19; [im Druck]

Fahey RC, Newton GL, Arrick B, Overdank-Bogart T, Aley SB (1984). *Entamoeba histolytica*: a eukaryote without glutathione metabolism. *Science.* **224** (4644): 70-72.

Feinberg AP und Vogelstein B (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* **132** (1): 6-13.

- Feinberg AP und Vogelstein B (1984).** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* **137** (1): 266-267.
- Finlay BJ und Fenchel T (1989).** Hydrogenosomes in some anaerobic protozoa resemble mitochondria. *FEMS Microbiol Lett.* **65**: 311-314.
- Fitzpatrick TB, Amrhein N, Macheroux P (2003).** Characterization of YqjM, an Old Yellow Enzyme homolog from *Bacillus subtilis* involved in the oxidative stress response. *J Biol Chem.* **278** (22): 19891-19897.
- Flohe L, Hecht HJ, Steinert P (1999).** Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radic Biol Med.* **27** (9-10): 966-984.
- 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** (1): 97-102.
- Gabaldón T und Huynen MA (2003).** Reconstruction of the proto-mitochondrial metabolism. *Science.* **301** (5633): 609.
- Gabaldón T und Huynen MA (2005).** Lineage-specific gene loss following mitochondrial endosymbiosis and its potential for function prediction in eukaryotes. *Bioinformatics.* **21** Suppl 2: ii144-ii150.
- Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Hofert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier MA, Copley RR, Edlmann A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G, Superti-Furga G (2002).** Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature.* **415** (6868): 141-147.
- Gelius-Dietrich G und Henze K (2004).** Pyruvate formate lyase (PFL) and PFL activating enzyme in the chytrid fungus *Neocallimastix frontalis*: a free-radical enzyme system conserved across divergent eukaryotic lineages. *J Eukaryot Microbiol.* **51** (4): 456-463.
- Gelius-Dietrich G, Braak MT, Henze K (2007).** Mitochondrial steps of arginine biosynthesis are conserved in the hydrogenosomes of the chytridiomycete *Neocallimastix frontalis*. *J Eukaryot Microbiol.* **54** (1): 42-44.
- George R, Beddoe T, Landl K, Lithgow T (1998).** The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95** (5): 2296-2301.
- George R, Walsh P, Beddoe T, Lithgow T (2002).** The nascent polypeptide-associated complex (NAC) promotes interaction of ribosomes with the mitochondrial surface *in vivo*. *FEBS Lett.* **516** (1-3): 213-216.

- Germot A, Philippe H, Le Guyader H (1996).** Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93** (25): 14614-14617.
- Gershoni JM und Palade GE (1993).** Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem*. **131** (1): 1-15.
- Giegé P, Heazlewood JL, Roessner-Tunali U, Millar AH, Fernie AR, Leaver CJ, Sweetlove LJ (2003).** Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells. *Plant Cell*. **15** (9): 2140-2151.
- Gorlach M, Burd CG, Dreyfuss G (1994).** The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance, and RNA-binding specificity. *Exp Cell Res*. **211** (2): 400-407.
- Hackstein JH (2005).** Eukaryotic Fe-hydrogenases – old eukaryotic heritage or adaptive acquisitions? *Biochem Soc Trans*. **33** (1): 47-50.
- Hackstein JHP, Akhmanova A, Boxama B, Harhangi HR, Voncken FGJ (1999).** Hydrogenosomes: eukaryotic adaptations to anaerobic environments. *Trends Microbiol*. **7**: 441-447.
- Hausmann K, Hülsmann N, Radek R (2003).** Protistology. 3rd completely revised edition. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Henze K, Horner DS, Suguri S, Moore DV, Sanchez LB, Müller M, Embley TM (2001).** Unique phylogenetic relationships of glucokinase and glucosephosphate isomerase of the amitochondriate eukaryotes *Giardia intestinalis*, *Spironucleus barkhanus* and *Trichomonas vaginalis*. *Gene*. **281** (1-2): 123-131.
- Heukeshoven J und Dernick R (1988).** Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem Development Unit. *Electrophoresis*. **9**: 60-61.
- Hirt RP, Müller S, Embley TM, Coombs GH (2002).** The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives. *Trends Parasitol*. **18** (7): 302-308.
- Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutillier K, Yang L, Wolting C, Donaldson I, Schandorff S, Shewnarane J, Vo M, Taggart J, Goudreault M, Muskat B, Alfarano C, Dewar D, Lin Z, Michalickova K, Willems AR, Sassi H, Nielsen PA, Rasmussen KJ, Andersen JR, Johansen LE, Hansen LH, Jespersen H, Podtelejnikov A, Nielsen E, Crawford J, Poulsen V, Sorensen BD, Matthiesen J, Hendrickson RC, Gleeson F, Pawson T, Moran MF, Durocher D, Mann M, Hogue CW, Figeys D, Tyers M (2002).** Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*. **415** (6868): 180-183.
- Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L (2002).** Peroxiredoxins. *Biol Chem*. **383** (3-4): 347-364.

- Honigberg BM, Volkmann D, Entzeroth R, Scholtyseck E (1984).** A freeze-fracture electron microscope study of *Trichomonas vaginalis* Donne and *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller). *J Protozool.* **31** (1): 116-131.
- Horner DS, Foster PG, Embley TM (2000).** Iron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol Biol Evol.* **17** (11): 1695-1709.
- Horner DS, Heil B, Happe T, Embley TM (2002).** Iron hydrogenases – ancient enzymes in modern eukaryotes. *Trends Biochem Sci.* **27** (3): 148-153.
- 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** (1373): 1053-1059.
- Hoving S, Gerrits B, Voshol H, Muller D, Roberts RC, van Oostrum J (2002).** Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. *Proteomics.* **2** (2): 127-134.
- Hrdy I und Müller M (1995).** Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *J Mol Evol.* **41** (3): 388-396.
- Hrdy I, Hirt RP, Dolezal P, Bardonova L, Foster PG, Tachezy J, Embley TM (2004).** *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature.* **432**: 618-622.
- Hube M, Blokesch M, Bock A (2002).** Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli*: role of accessory proteins HypA and HybF. *J Bacteriol.* **184** (14): 3879-3885.
- Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK (2003).** Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature.* **425** (6959): 686-691.
- Huson DH (1998).** SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics.* **14** (1): 68-73.
- Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y (2001).** A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98** (8): 4569-4574.
- Jensen ON, Wilm M, Schevchenko A, Mann M (1998).** Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2D gels. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol 112: Proteome analysis protocols, 513-530, Link AJ Hrsg., Humana Press, Totowa, New York.
- Jin S, Kurtz DM Jr, Liu ZJ, Rose J, Wang BC (2002).** X-ray crystal structures of reduced rubrerythrin and its azide adduct: a structure-based mechanism for a non-heme diiron peroxidase. *J Am Chem Soc.* **124**: 9845-9855.

- Jin S, Kurtz DM Jr, Liu ZJ, Rose J, Wang BC (2004).** X-ray crystal structure of *Desulfovibrio vulgaris* rubrerythrin with zinc substituted into the [Fe(SCys)₄] site and alternative diiron site structures. *Biochemistry*. **43** (11): 3204-3213.
- Karlberg O, Canback B, Kurland CG, Andersson SG (2000).** The dual origin of the yeast mitochondrial proteome. *Yeast*. **17** (3): 170-187.
- Kellems RE, Allison VF, Butow RA (1974).** Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. II. Evidence for the association of cytoplasmic ribosomes with the outer mitochondrial membrane in situ. *J Biol Chem*. **249** (10): 3297-3303.
- Kellems RE, Allison VF, Butow RA (1975).** Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *J Cell Biol*. **65** (1): 1-14.
- Kitchener KR, Meshnick SR, Fairfield AS, Wang CC (1984).** An ironcontaining superoxide dismutase in *Tritrichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol*. **12**: 95-99.
- Kohlert S (2006).** Molekulare und biochemische Charakterisierung von Rubrerythrin aus *Tritrichomonas foetus*. Diplomarbeit. Institut für Ökologische Pflanzenphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Kremer DR, Nienhuis-Kuiper HE, Timmer CJ, Hansen TA (1989).** Catabolism of malate and related dicarboxylic acids in various *Desulfovibrio* strains and the involvement of an oxygen-labile NADPH dehydrogenase. *Arch Microbiol*. **151**: 34-39.
- Kulda J (1999).** Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int J Parasitol*. **29** (2): 199-212.
- Kulda J, Vojtěchovská M, Tachezy J, Demeš P, Kunzová E (1982).** Metronidazole resistance of *Trichomonas vaginalis* as a cause of treatment failure in trichomoniasis. *Br J Vener Dis*. **58**: 394-399.
- Kumar A, Agarwal S, Heyman JA, Matson S, Heidtman M, Piccirillo S, Umansky L, Drawid A, Jansen R, Liu Y, Cheung KH, Miller P, Gerstein M, Roeder GS, Snyder M (2002).** Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev*. **16** (6): 707-719.
- Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lahti CJ, Bradley PJ, Johnson PJ (1994).** Molecular characterization of the alpha-subunit of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal succinyl CoA synthetase. *Mol Biochem Parasitol*. **66** (2): 309-318.
- Lahti CJ und Johnson PJ (1991).** *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal proteins are synthesized on free polyribosomes and may undergo processing upon maturation. *Mol Biochem Parasitol*. **46** (2): 307-310.

- Lascaris R, Bussemaker HJ, Boorsma A, Piper M, van der Spek H, Grivell L, Blom J (2003).** Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome Biol.* **4** (1): R3.
- Leon-Avila G und Tovar J (2004).** Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. *Microbiol.* **150**: 1245-1250.
- Lesniak J, Barton WA, Nikolov DB (2002).** Structural and functional characterization of the *Pseudomonas* hydroperoxide resistance protein Ohr. *EMBO J.* **21** (24): 6649-6659.
- Lesniak J, Barton WA, Nikolov DB (2003).** Structural and functional features of the *Escherichia coli* hydroperoxide resistance protein OsmC. *Protein Sci.* **12** (12): 2838-2843.
- Li J, Kogan M, Knight SA, Pain D, Dancis A (1999).** Yeast mitochondrial protein, Nfs1p, coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake, and iron distribution. *J Biol Chem.* **274** (46): 33025-33034.
- Lill R und Kispal G (2000).** Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* **25** (8): 352-356.
- Lill R und Mühlenhoff U (2005).** Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci.* **30** (3): 133-141.
- Lindmark DG und Müller M (1973).** Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate, *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J Biol Chem.* **248**: 7724-7728.
- Lindmark D und Müller M (1974).** Superoxide dismutase in the anaerobic flagellates *Tritrichomonas foetus* and *Monocercomonas* sp. *J Biol Chem.* **249**: 4634-4637.
- Lindmark DG, Müller M, Shio H (1975).** Hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol.* **61**: 552-554
- Linstead DJ und Bradley S (1988).** The purification and properties of two soluble reduced nicotinamide:acceptor oxidoreductases from *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol.* **27**: 125-133.
- Lithgow T (2000).** Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Lett.* **476** (1-2): 22-26.
- Lloyd D, Ralphs JR, Harris JC (2002).** Hydrogen production in *Giardia intestinalis*, a eukaryote with no hydrogenosomes. *Trends Parasitol.* **18** (4): 155-156.
- Lossik JG, Müller M, Gorrell TE (1986).** *In vitro* drug susceptibility and doses of metronidazole required for cure in cases of refractory vaginal trichomoniasis. *J Infect Dis.* **153**: 948-955.
- Lumppio HL, Shenvi NV, Summers AO, Voordouw G, Kurtz DM Jr (2001).** Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a novel oxidative stress protection system. *J Bacteriol.* **183** (1): 101-108.

- Mack M und Buckel W (1997).** Conversion of glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans* into an acyl-CoA hydrolase by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* **405** (2): 209-212.
- MacKenzie JA und Payne RM (2004).** Ribosomes specifically bind to mammalian mitochondria via protease-sensitive proteins on the outer membrane. *J Biol Chem.* **279** (11): 9803-9810.
- Malik SB, Pightling AW, Ramesh MA, Hulstrand AM, Sahni N, Stefaniak LM, Schurko AM, Logsdon JM (2006).** Early evolution of meiosis-specific genes by gene duplications in protists. In: Abstract Book, *16th Meeting of the International Society for Evolutionary Protistology*, Polen.
- Marc P, Margeot A, Devaux F, Blugeon C, Corral-Debrinski M, Jacq C (2002).** Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep.* **3** (2): 159-164.
- Marcotte EM, Xenarios I, van Der Blik AM, Eisenberg D (2000).** Localizing proteins in the cell from their phylogenetic profiles. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97** (22): 12115-12120.
- Martin W, Hoffmeister M, Rotte C, Henze K (2001).** An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biol Chem.* **382** (11): 1521-1539.
- Martin W und Müller M (1998).** The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature.* **392** (6671): 37-41.
- Martin FW und Müller M (2007).** Origin of mitochondria and hydrogenosomes. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- McLaughlin GL, Saz HJ, deBruyn BS (1986).** Purification and properties of an acyl CoA transferase from *Ascaris suum* muscle mitochondria. *Comp Biochem Physiol B.* **83** (3): 523-527.
- Mehlhorn H und Piekarski G (1995).** Grundriss der Parasitenkunde. Parasiten des Menschen und der Nutztiere. UTB für Wissenschaft.
- Meingassner JG, Mieth H, Czok R, Lindmark DG, Müller M (1978).** Assay conditions and the demonstration of nitroimidazole resistance in *Tritrichomonas foetus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **13** (1): 1-3.
- Meingassner JG und Thurner J (1979).** Strain of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole and other 5-nitroimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother.* **15**: 254-257.
- Mereschkowsky C (1905).** Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreich. *Biol. Centralbl.* **25**: 593-604.
- Mertens E, Lador US, Lee JA, Miretsky A, Morris A, Rozario C, Kemp RG, Müller M (1998).** The pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of the protist, *Trichomonas vaginalis*, and the evolutionary relationships of protist phosphofructokinases. *J Mol Evol.* **47** (6): 739-750.

- Mongkolsuk S, Praituan W, Loprasert S, Fuangthong M, Chamnongpol S (1998).** Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (ohr) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli. *J Bacteriol.* **180** (10): 2636-2643.
- Moss DW (1984).** Acid Phosphatases. In: Bergey HU, editor. *Methods in enzymatic analysis 4*. Weinheim, Verlag Chemie, 3rd edition; 92-106.
- Müller M (1973).** Biochemical cytology of trichomonad flagellates. I. Subcellular localization of hydrolases, dehydrogenases, and catalase in *Tritrichomonas foetus*. *J Cell Biol.* **57** (2): 453-474.
- Müller M (1986).** Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. *Biochem Pharmacol.* **35** (1): 37-41.
- Müller M (1988).** Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annu Rev Microbiol.* **42**: 465-488.
- Müller M (1993).** The hydrogenosome. *J Gen Microbiol.* **139**: 2879-2889.
- Müller M, Meingassner JG, Miller WA, Ledger WJ (1980).** Three metronidazole resistant strains of *Trichomonas vaginalis* from the United States. *Am J Obstet Gynecol.* **138**: 808-812.
- Müller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL (2003).** Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends Parasitol.* **19** (7): 320-328.
- Mukherjee M, Brown MT, McArthur AG, Johnson PJ (2006a).** Proteins of the glycine decarboxylase complex in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell.* **5** (12): 2062-2071.
- Mukherjee M, Sievers SA, Brown MT, Johnson PJ (2006b).** Identification and biochemical characterization of serine hydroxymethyl transferase in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell.* **5** (12): 2072-2078.
- Navazio L, Baldan B, Dainese P, James P, Damiani E, Margreth A, Mariani P (1995).** Evidence that spinach leaves express calreticulin but not calsequestrin. *Plant Physiol.* **109** (3): 983-990.
- Nielsen MH (1975).** The ultrastructure of *Trichomonas vaginalis* donne before and after transfer from vaginal secretion to Diamonds medium. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl.* **83** (6): 581-589.
- Nixon JE, Field J, McArthur AG, Sogin ML, Yarlett N, Loftus BJ, Samuelson J (2003).** Iron-dependent hydrogenases of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: activity of the recombinant entamoebic enzyme and evidence for lateral gene transfer. *Biol Bull.* **204** (1): 1-9.

- Page-Sharp M, Behm CA, Smith GD (1996).** *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*: the pattern of inactivation of hydrogenase activity by oxygen and activities of catalase and ascorbate peroxidase. *Microbiology*. **142**: 207-211.
- Paget TA und Lloyd D (1990).** *Trichomonas vaginalis* requires traces of oxygen and high concentrations of carbon dioxide for optimal growth. *Mol Biochem Parasitol*. **41** (1): 65-72.
- Palmer JD (1997).** Organelle genomes: going, going, gone! *Science*. **275** (5301): 790-791.
- Petrolonis AJ, Yang Q, Tummino PJ, Fish SM, Prack AE, Jain S, Parsons TF, Li P, Dales NA, Ge L, Langston SP, Schuller AGP, An WF, Tartaglia LA, Chen H, Hong SB (2004).** Enzymatic characterization of the pancreatic Islet-specific glucose-6-phosphatase-related protein (IGRP). *J Biol Chem*. **249** (14): 13976-13983.
- Poole LB, Reynolds CM, Wood ZA, Karplus PA, Ellis HR, Li Calzi M (2000).** AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*. **267** (20): 6126-6133.
- Posewitz MC, King PW, Smolinski SL, Zhang L, Seibert M, Ghirardi ML (2004).** Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *J Biol Chem*. **279**: 25711-25720.
- Prokisch H, Scharfe C, Camp DG 2nd, Xiao W, David L, Andreoli C, Monroe ME, Moore RJ, Gritsenko MA, Kozany C, Hixson KK, Mottaz HM, Zischka H, Ueffing M, Herman ZS, Davis RW, Meitinger T, Oefner PJ, Smith RD, Steinmetz LM (2004).** Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol*. **2** (6): 795-804.
- Przysiecki CT, Bhattacharyya AK, Tollin G, Cusanovich MA (1985).** Kinetics of reduction of *Clostridium pasteurianum* rubredoxin by laser photoreduced spinach ferredoxin:NADP⁺ reductase and free flavins. Electron transfer within a protein-protein complex. *J Biol Chem*. **260** (3): 1452-1458.
- Pütz S, Dolezal P, Gelius-Dietrich G, Bohacova L, Tachezy J, Henze K (2006).** Fe-hydrogenase maturases in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot. Cell*. **5** (3): 579-586.
- Pütz S, Gelius-Dietrich G, Piotrowski M, Henze K (2005).** Rubrerythrin and peroxiredoxin: two novel putative peroxidases in the hydrogenosomes of the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*. **142** (2): 212-223.
- Rasoloson D, Tomková E, Cammack R, Kulda J, Tachezy J (2001).** Metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen. *Parasitology*. **123**: 45-56.
- Rendón-Maldonado JG, Espinosa-Cantellano M, Gonzalez-Robles A, Martinez-Palomo A (1998).** *Trichomonas vaginalis*: *in vitro* phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Exp Parasitol*. **89** (2): 241-250.

- Reynolds ES (1963).** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* **17**: 208-212.
- Richly E, Chinnery PF, Leister D (2003).** Evolutionary diversification of mitochondrial proteomes: implications for human disease. *Trends Genet.* **19** (7): 356-362.
- Riley DE und Krieger JN (1992).** Rapid and practical DNA isolation from *Trichomonas vaginalis* and other nuclease-rich protozoa. *Mol Biochem Parasitol.* **51**: 161-164.
- Rivière L, van Weelden SW, Glass P, Vegh P, Coustou V, Biran M, van Hellemond JJ, Bringaud F, Tielens AG, Boshart M (2004).** Acetyl:succinate CoA-transferase in procyclic *Trypanosoma brucei*. Gene identification and role in carbohydrate metabolism. *J Biol Chem.* **279** (44): 45337-45346.
- Roger AJ, Clark CG, Doolittle WF (1996).** A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93** (25): 14618-14622.
- Saitou N und Nei M (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **4** (4): 406-425.
- Samarawickrema NA, Brown DM, Upcroft JA, Thammapalerd N, Upcroft P (1997).** Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *J Antimicrob Chemother.* **40** (6): 833-840.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2nd edition.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci.* **74**: 5463-5467.
- Saz HJ, deBruyn B, de Mata Z (1996).** Acyl-CoA transferase activities in homogenates of *Fasciola hepatica* adults. *J Parasitol.* **82** (5): 694-696.
- Schwebke JR und Burgess D (2004).** Trichomoniasis. *Clin Microbiol Rev.* **17** (4): 794-803.
- Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schonfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C (2003).** The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100** (23): 13207-13212.
- Söhling B und Gottschalk G (1996).** Molecular analysis of the anaerobic succinate degradation pathway in *Clostridium kluyveri*. *J Bacteriol.* **178** (3): 871-880.
- Steinbüchel A und Müller M (1986).** Anaerobic pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Mol Biochem Parasitol.* **20** (1): 57-65.

- Steinmetz LM, Scharfe C, Deutschbauer AM, Mokranjac D, Herman ZS, Jones T, Chu AM, Giaever G, Prokisch H, Oefner PJ, Davis RW (2002).** Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet.* **31** (4): 400-404.
- Stempak JG und Ward RT (1964).** An improved staining method for electron microscopy. *J Cell Biol.* **22**: 697-701.
- Strugger S (1956).** Die Uranylacetat-Kontrastierung für die elektronenmikroskopische Untersuchung von Pflanzenzellen. *Naturw.* **43**: 357-358.
- Suissa M und Schatz G (1982).** Import of proteins into mitochondria. Translatable mRNAs for imported mitochondrial proteins are present in free as well as mitochondria-bound cytoplasmic polysomes. *J Biol Chem.* **257** (21): 13048-13055.
- Sutak R, Dolezal P, Fiumera HL, Hrdy I, Dancis A, Delgadillo-Correa M, Johnson PJ, Müller M, Tachezy J (2004).** Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101** (28): 10368-10373.
- Sztukowska M, Bugno M, Potempa J, Travis J, Kurtz DM Jr (2002).** Role of rubrerythrin in the oxidative stress response of *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Microbiol.* **44** (2): 479-488.
- Tachezy J, Sanchez LB, Müller M (2001).** Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. *Mol Biol Evol.* **18** (10): 1919-1928.
- Thollessen M (2004).** LDDist: a Perl module for calculating LogDet pair-wise distances for protein and nucleotide sequences. *Bioinformatics.* **20** (3): 416-418.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22** (22): 4673-4680.
- Tielens AG, Rotte C, van Hellemond JJ, Martin W (2002).** Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem Sci.* **27** (11): 564-572.
- Tittawella I und Baranov V (2000).** Localization of riboproteins in a trypanosomatid mitochondrion. *FEBS Lett.* **470** (3): 319-324.
- Tovar J, Fischer A, Clark CG (1999).** The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol.* **32** (5): 1013-1021.
- Tovar J, Leon-Avila G, Sanchez LB, Sutak R, Tachezy J, van der Giezen M, Hernandez M, Müller M, Lucocq JM (2003).** Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature.* **426** (6963): 172-176.
- Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, Qureshi-Emili A, Li Y, Godwin B, Conover D,**

- Kalbfleisch T, Vijayadamodar G, Yang M, Johnston M, Fields S, Rothberg JM (2000).** A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. **403** (6770): 623-627.
- van der Giezen M, Sjollem KA, Artz RR, Alkema W, Prins RA (1997).** Hydrogenosomes in the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* have a double membrane but lack an associated organelle genome. *FEBS Lett*. **408**: 147-150.
- van Hellemond JJ, Opperdoes FR, Tielens AG (1998).** Trypanosomatidae produce acetate via a mitochondrial acetate:succinate CoA transferase. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95** (6): 3036-3041.
- van Hoek AH, Akhmanova AS, Huynen MA, Hackstein JH (2000).** A mitochondrial ancestry of the hydrogenosomes of *Nyctotherus ovalis*. *Mol Biol Evol*. **17** (1): 202-206.
- van Weelden S (2005).** Bioenergetics of parasitic protozoa. Diplomarbeit. Department of Biochemistry and Cell Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Niederlande.
- Verner K (1993).** Co-translational protein import into mitochondria: an alternative view. *Trends Biochem Sci*. **18** (10): 366-371.
- Voncken F, Boxma B, Tjaden J, Akhmanova A, Huynen M, Verbeek F, Tielens AG, Haferkamp I, Neuhaus HE, Vogels G, Veenhuis M, Hackstein JH (2002a).** Multiple origins of hydrogenosomes: functional and phylogenetic evidence from the ADP/ATP carrier of the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. *Mol Microbiol*. **44** (6): 1441-1454.
- Voncken FGJ, Boxma B, van Hoek AH, Akhmanova AS, Vogels GD, Huynen M, Veenhuis M, Hackstein JH (2002b).** A hydrogenosomal [Fe]-hydrogenase from the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. L2. *Gene*. **284** (1-2): 103-112.
- Wagner G und Levin R (1978).** Oxygen tension of the vaginal surface during sexual stimulation in the human. *Fertil Steril*. **30** (1): 50-53.
- Wan XY, Zhou Y, Yan ZY, Wang HL, Hou YD, Jin DY (1997).** Scavengase p20: a novel family of bacterial antioxidant enzymes. *FEBS Lett*. **407** (1): 32-36.
- Wassmann C, Hellberg A, Tannich E, Bruchhaus I (1999).** Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *J Biol Chem*. **274** (37): 26051-26056.
- Weinstock H, Berman S, Cates W Jr. (2004).** Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health*. **36** (1): 6-10.
- White H und Jencks WP (1976).** Properties of Succinyl-CoA:3-Ketoacid Coenzyme A Transferase. *J Biol Chem*. **251** (6): 1708-1711.

- Williams BA, Hirt RP, Lucocq JM, Embley TM (2002).** A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature*. **418** (6900): 865-869.
- Witkowski A, Witkowska HE, Smith S (1994).** Reengineering the specificity of a serine active-site enzyme. Two active-site mutations convert a hydrolase to a transferase. *J Biol Chem*. **269** (1): 379-383.
- Wu G, Fiser A, ter Kuile B, Sali A, Müller M (1999).** Convergent evolution of *Trichomonas vaginalis* lactate dehydrogenase from malate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96** (11): 6285-6290.
- Yarlett N, Lindmark DG, Goldberg B, Moharrami MA, Bacchi CJ (1994).** Subcellular localization of the enzymes of the arginine dihydrolase pathway in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *J Eukaryot Microbiol*. **41** (6): 554-559.
- Yarlett N, Orpin CG, Munn EA, Yarlett NC, Greenwood CA (1986).** Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochem J*. **236** (3): 729-739.
- Yarlett N und Hackstein JHP (2005).** Hydrogenosomes: one organelle, multiple origins. *BioScience*. **55**: 657-667.

6 Anhang

Anhang 1: 2D-Polyacrylamidgele von *T. vaginalis* und *T. foetus* Hydrogenosomen mit unterschiedlichen pH-Gradienten in der ersten Dimension.

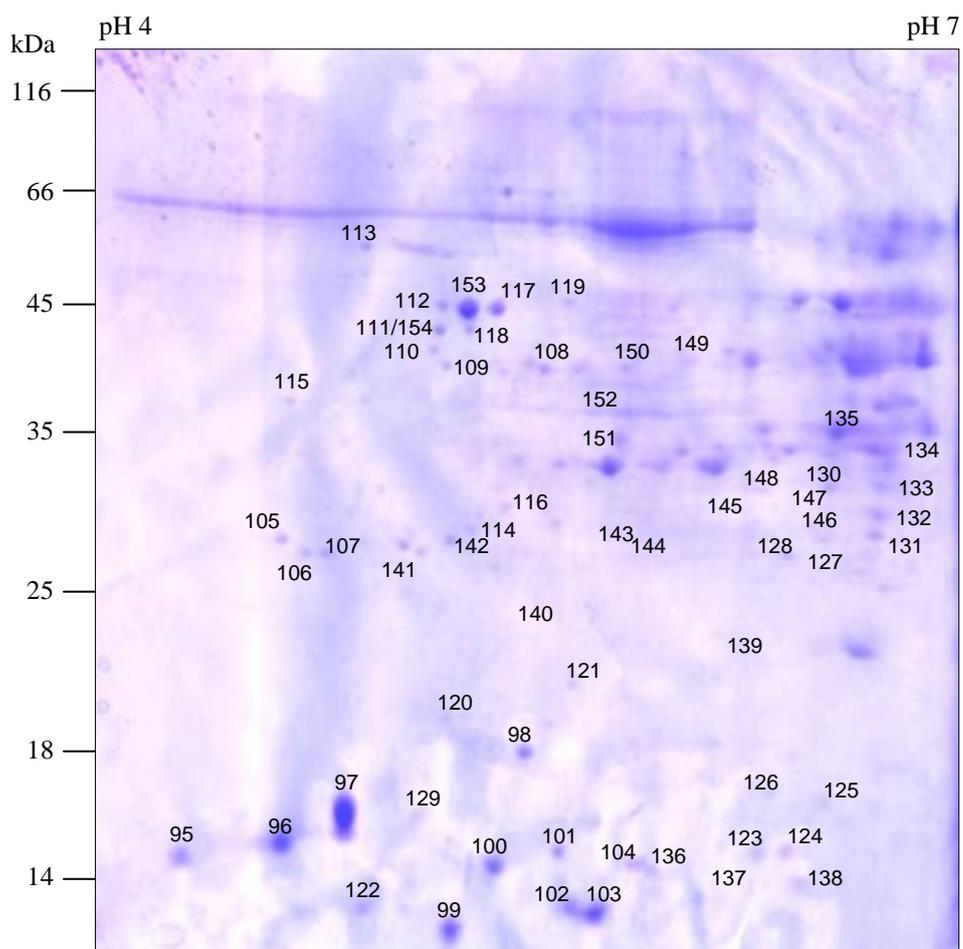


Abb. A1.1: Coomassie-gefärbte 2D-SDS-PAGE der hydrogenosomalen Proteine von *T. vaginalis*, pH 4-7; die sequenzierten Proteine Nr. 95 bis 154 sind gekennzeichnet.

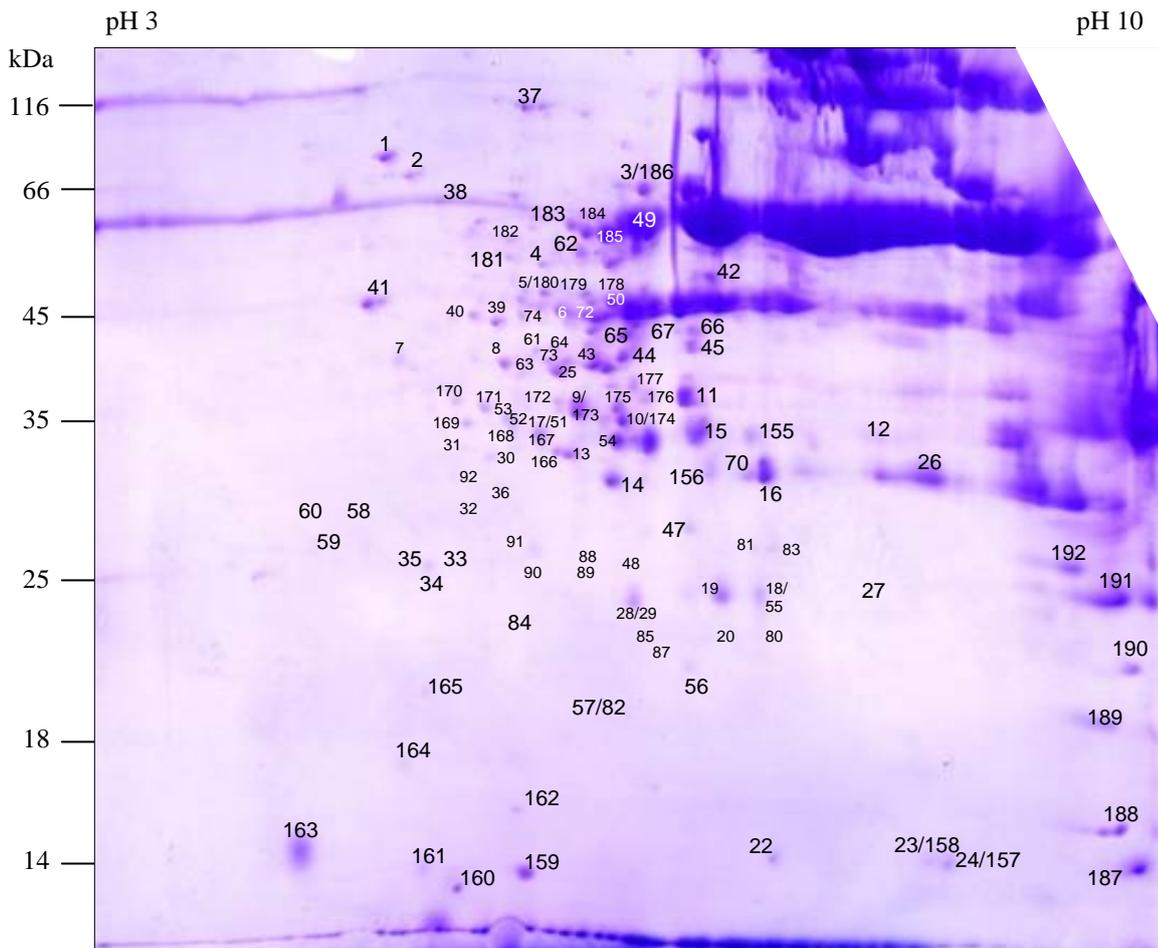


Abb. A1.2: Coomassie-gefärbte 2D-SDS-PAGE der hydrogenosomalen Proteine von *T. vaginalis*, pH 3-10; die sequenzierten Proteine Nr. 1-92 und 155-192 sind gekennzeichnet; die Nummern 21, 46, 68, 69, 71, 75-79, 86, 93, 94 wurden nicht verwendet.

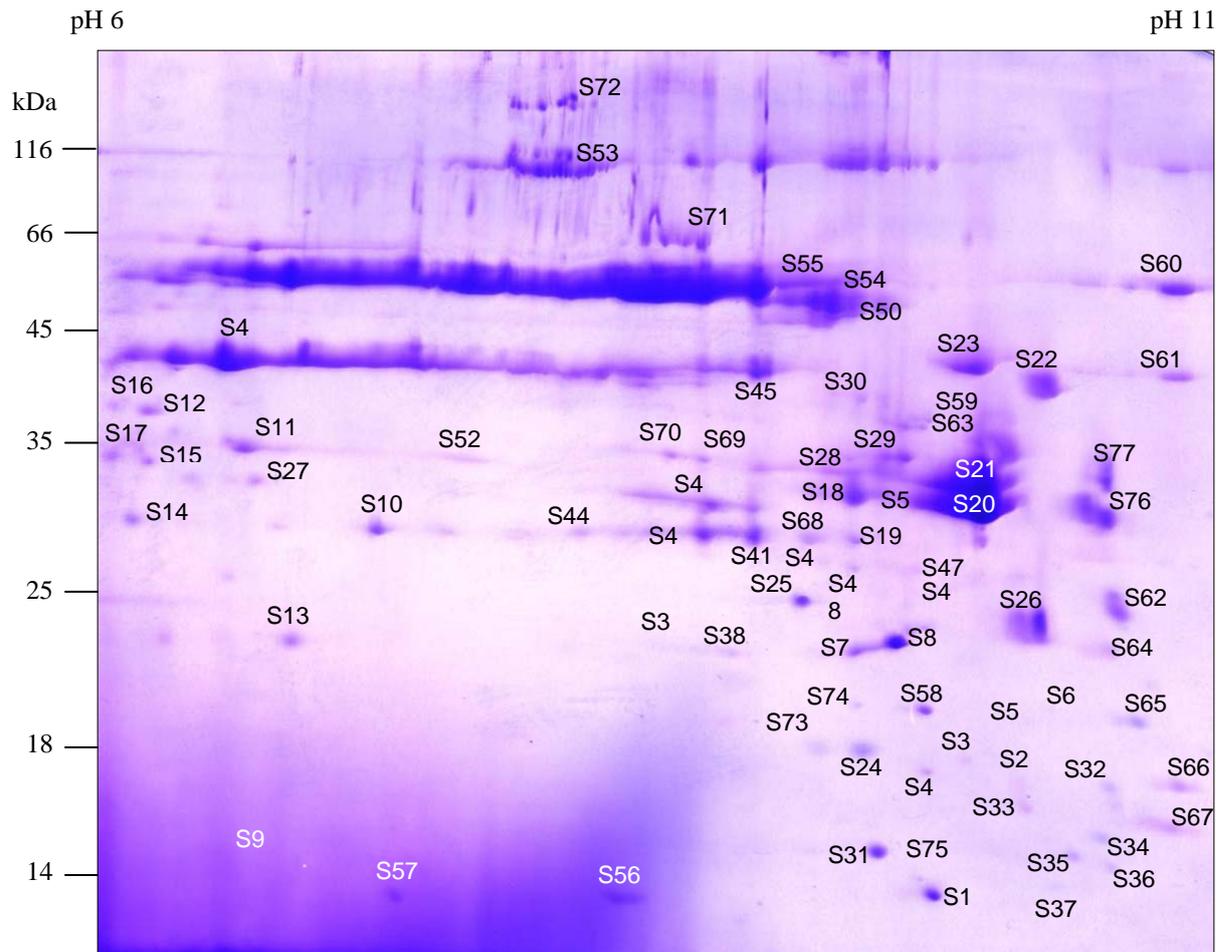


Abb. A1.3: Coomassie-gefärbte 2D-SDS-PAGE der hydrogenosomalen Proteine von *T. vaginalis*, pH 6-11; die sequenzierten Proteine Nr. S1 bis S77 sind gekennzeichnet.

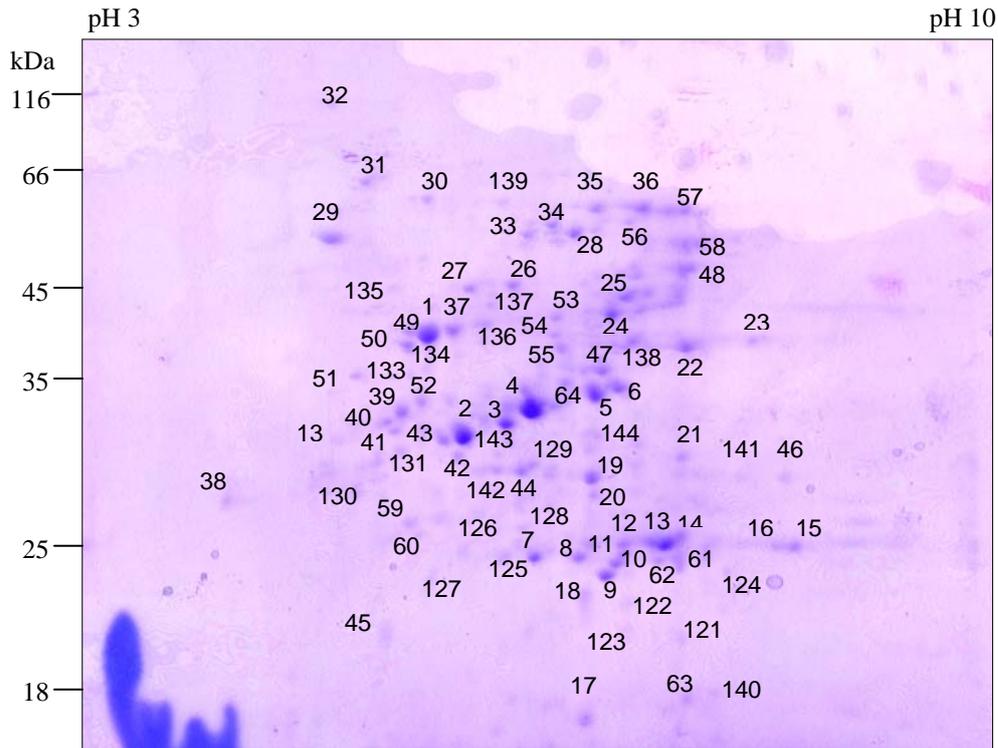


Abb. A1.4: Coomassie-gefärbte 2D-SDS-PAGE der hydrogenosomalen Proteine von *T. foetus*, pH 6-11; die sequenzierten Proteine Nr. Tf1 bis Tf64 und Tf121 bis Tf144 sind gekennzeichnet.

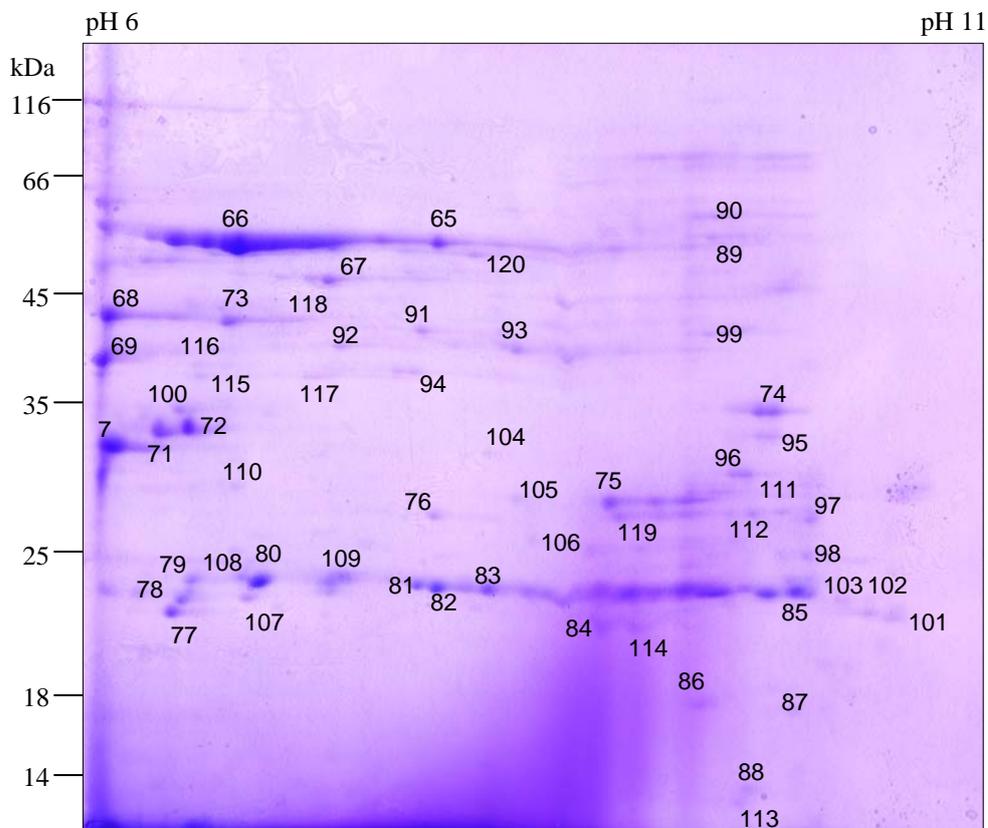


Abb. A1.5: Coomassie-gefärbte 2D-SDS-PAGE der hydrogenosomalen Proteine von *T. foetus*, pH 3-10; die sequenzierten Proteine Nr. Tf65 bis Tf120 sind gekennzeichnet.

Anhang 2: Sequenzierte Proteine aus 2D-Polyacrylamidgelen der Hydrogenosomen von *T. vaginalis*. Die mittels der sequenzierten Peptide identifizierten Sequenzen der TIGR Genom Datenbank sind aufgeführt; Sequenzen mit möglichen Transitpeptiden sind mit *, von Carlton *et al.* (2007) vorhergesagte Transitsequenzen mit einem zusätzlichen * markiert; für die vorliegende Arbeit wichtige Sequenzen sind fett hervorgehoben; Proben, deren Peptide zu mehr als einer Isoform passen sind kursiv dargestellt.

Proben	TIGR Nr.	Identität	pI	MW [kDa]
mögliche hydrogenosomale Proteine				
104	83152.m00031**	Thioredoxin	5,68	13,39
95, 96, 97, 129, 163	80378.m00198**	Ferredoxin	4,75	10,75
192, S25	97190.m00053**	hydrog. Adenylate Kinase	9,02	25,58
3, 186	92066.m00128**	Hsp70, hydrogenosomal	6,76	68,70
186	88271.m00506**	Hsp70, hydrogenosomal	7,98	68,85
S75	81719.m00025**	Hsp10	9,60	11,68
S74	86485.m00555**	Hsp70, Co-Faktor GrpE	8,94	21,54
190, S58	90210.m00251**	Hsp70, Co-Faktor GrpE	9,40	21,62
124, 159	86647.m00157**	Cpn10	6,11	11,89
53, 151, 183, 184, 185	83260.m00099**	Cpn60	6,53	59,11
53, 151, 183, 184, 185	87054.m00104**	Cpn60	6,93	59,22
42, 48, 132, S72	86827.m00425**	PFOR-A	8,30	127,97
42	88728.m00102**	PFOR-A	8,38	128,07
88, 89, 131, 132, S53, S72	88026.m00155**	PFOR-B	8,23	127,99
42, 132, S53, S72	88399.m00060**	PFOR-B	8,16	128,05
5, 14, 26, 49, 87, 90, 91, 125, 155, 167, S19	94483.m00078**	decarboxyl. MDH A	8,15	62,95
5, 26, 49, 85, 90, 91, 133, 167, S19, S68	89154.m00274**	decarboxyl. MDH A	8,33	63,12
5, 49, 90, 91, 125, 167, S19	94635.m00002**	decarboxyl. MDH A	7,67	42,93
5, 16, 38, 49, 50, 51, 56, 80, 83, 90, 91, 102, 122, 128, 130, 133, 137, 145, 146, 147, 156, 167, 178, 179, S10, S40, S41, S42, S44, S60, S68	92066.m00127**	decarboxyl. MDH B, AP65-1	7,22	63,27
5, 26, 49, 90, 91, 167, S19, S68	86485.m00602**	decarboxyl. MDH B, AP65-3	8,57	63,10
5, 17, 32, 38, 49, 51, 57, 62, 74, 82, 90, 91, 123, 125, 135, 139, 167, 168, 180, S14, S19, S71	88273.m00372**	decarboxyl. MDH B	6,45	63,22
27, S20, S21, S46, S47	85876.m00224**	α -SCS , AP33-1	9,50	32,51
27, S20, S21, S46, S47	81907.m00068**	α -SCS , AP33-1	9,48	32,65
27, S20, S21, S46, S47	91100.m00020**	α -SCS , AP33-1	9,48	32,47
8, 25	86485.m00473**	β -SCS, AP51-3	7,63	43,79
64, 73, S49	88864.m00118**	β -SCS	6,53	43,80
30, 31, 36, 43, 44, 45, 52, 63, 65, 66, 67, 140, 149, 150, 170, 171, S61	85208.m00060**	β -SCS, AP51-2	7,05	43,78
S69, S70	81877.m00057**	Glyoxalat-Reduktase	8,37	35,74
188, S31	96044.m00344**	HesB-ähnliche Domäne, ähnlich IscA	8,87	14,39

S45	84692.m00190**	NADH-DH 51 kDa (nuoF)	8,38	46,77
191, S7	90175.m00111**	NADH-DH 24 kDa	8,98	21,96
39	94095.m00080**	64 kDa-Hydrogenase	6,89	55,82
81	81529.m00518**	hydrogenosomale O ₂ -Reduktase	7,95	46,39
15, S27	83680.m00050**	Fructokinase, ROK Familie	6,70	33,06
29,127	96423.m00237**	YjeF - Zucker Kinase	5,98	24,80
S54, S55	93909.m00117*	Acetyl-CoA Hydrolase / ASCT	8,93	57,21
S23, S30	86485.m00476*	Fe-Hydrogenase TvhydB	9,17	50,88
100	90052.m00090*	Ferredoxin	5,23	11,72
99, 103	93494.m00041*	prokaryotisches Hsp20	5,76	12,32
119	85889.m00502*	Hsp60, hydrogenosomal	6,26	59,99
S8	91522.m00026*	FeS Flavoprotein, WrbA	9,03	24,76
19, S13	81958.m00091	SOD	6,79	22,22
187, S1	82952.m00135	Dihydrolipoamid-Acyltransferase, Thioesterase oder PDH E2	9,25	13,99
101, 161	86288.m00028	Aminomethyltransferase (H-Protein des Glycin-Stoffwechsels)	5,90	14,65
98, 164	83007.m00284	Glyoxalase	5,47	15,15
S76, S77	88271.m00409	Hmp31	9,88	34,66
S22	82039.m00036	homolog zu Hmp31-a	9,67	44,59
hydrogenosomale Proteine, homolog zu bakteriellen Proteinen (nicht aus Mitochondrien bekannt)				
S29	88811.m00081*	HydG	8,88	58,68
23, 24, 157, 158, S56, S57	94426.m00136*	OsmC-ähnlich	8,32	15,16
18, 20, 22, S38, S39	82414.m00151	Rubryerythrin	8,16	21,35
138, 189, S24, S73	82140.m00099	Thiol-Peroxidase Tpx	8,93	18,12
S59	89123.m00101	NADH:Flavin OR	8,94	39,70
S63	92477.m00196	NADH:Flavin OR	8,84	41,84
S28	94102.m00178	NADH:Flavin OR	8,91	37,75
11, 13, 116, 134, 142, 166, 176, S11, S52	97360.m00078	bakterielle PFK	6,82	35,21
12, 47, 70, S18	93857.m00276	bakterielle PFK	8,66	34,76
58, 60, 61, 141, 143, 144, S43	96252.m00323	bakterielle PFK	8,26	34,55
84, 92, 114, 148	90093.m00054	bakterielle PFK	8,25	34,57
Glycolyse				
182	92720.m00083	Enolase	5,65	52,51
S15	81812.m00080	FBA	5,79	36,24
10, 172, 173, 174	81812.m00097	FBA	5,84	36,26
Translation / Transkription				
S48, S50	82490.m00257	EF1- α	8,57	48,36
105, 106, 107	81529.m00419	NAC	4,81	18,43
120	95378.m00081	Protein mit NAC Domäne	7,75	15,12
121, 165	80421.m00016	polyA-Bindeprotein	5,34	19,50
ribosomale Proteine				
S2	83996.m00305	euk. 40S rib. Protein S20	9,60	13,80
S3	85120.m00009	euk. 40S rib. Protein S7	9,57	18,68
S5	85859.m00329	euk. 40S rib. Protein S5	9,30	21,63
S34	82736.m00200	euk. 40S rib. Protein S19	10,18	16,25
S36	80896.m00099	euk. 40S rib. Protein S16	9,91	15,60
S37	80459.m00172	euk. 40S rib. Protein S15a	9,79	14,56
S65	88874.m00013	euk. 40S rib. Protein S9	10,27	21,69
7, 156	88278.m00125	euk. 40S rib. Protein S2	5,08	28,55
S4	90428.m00029	euk. 60S rib. Protein L6	9,38	16,32
S6	94631.m00050	euk. 60S rib. Protein L18	9,84	19,80

S32	83007.m00233	euk. 60S rib. Protein L22	9,93	18,50
S33	85522.m00042	euk. 60S rib. Protein L12	9,76	17,21
S35	84959.m00005	euk. 60S rib. Protein L27	10,00	15,92
S64	92204.m00060	euk. 60S rib. Protein L13	10,08	22,37
S66	81841.m00103	euk. 60S rib. Protein L11	10,15	19,34
S67	82775.m00059	euk. 60S rib. Protein L24	10,47	15,76
175	92921.m00304	euk. 60S rib. Protein L10	5,47	3,14
sonstige cytosolische Proteine				
41	82114.m00023	Aktin	5,12	41,82
108, 111, 112, 117, 118, 153, 154	85746.m00231	Aktin	5,50	41,84
40	92553.m00048	Aktin-ähnliches Protein	5,59	44,08
4	86280.m00020	Coronin, Gen 2 (Aktin assoziiert)	5,40	48,24
2	84874.m00060	Hsp70, cytosolisch	5,28	71,10
109	85522.m00029	Hsp90, cytosolisch	4,82	28,96
160	89831.m00060	Hsp20, cytosolisch	8,80	12,04
136	86824.m00127	Hsp20, cytosolisch	7,76	11,99
125	88613.m00086	Mannose-6-P-Isomerase	5,96	17,27
37	85506.m00085	4- α -Glucanotransferase	5,71	108,80
S17	87079.m00083	cytosolische Malatdehydrogenase	6,01	35,71
177, S12	95218.m00073	GTB-bindendes Protein	6,51	36,82
1, 113	83450.m00067	Hsp70, ER	5,06	71,38
181	87349.m00188	Peptidase (Peptidase Familie M20/M25/M40)	5,58	50,39
35	92429.m00127	RAS spezifisches Protein	5,39	21,97
33	85997.m00029	RAS spezifisches Protein Rab11c	5,58	23,14
34	85746.m00183	Rab 7	5,54	22,39
S51	96829.m00043	Dioxygenase	9,36	33,93
115	89282.m00179	cec-1 spezifisch	4,62	22,85
126, 162	89002.m00198	ribosomales Inaktivierungs-Enzym	5,95	14,97
Proteine mit unbekannter Funktion				
6	83746.m00152	hypothetisches Protein	6,11	47,89
28	94962.m00222	hypothetisches Protein	6,37	23,18
59	84874.m00053	hypothetisches Protein	8,94	39,70
169	89470.m00204	hypothetisches Protein	5,49	36,48
S26	95978.m00083	hypothetisches Protein	9,65	22,66
S62	95509.m00053	hypothetisches Protein	9,86	25,95

Anhang 3: Sequenzierte Proteine aus 2D-Polyacrylamidgelen von *T. foetus* Hydrogenosomen. Die mittels der sequenzierten Peptide identifizierten *T. vaginalis* Sequenzen der TIGR Genom Datenbank sind aufgeführt; Sequenzen mit möglichen Transitpeptiden sind mit *, von Carlton *et al.* (2007) vorhergesagte Transitsequenzen mit einem zusätzlichen * markiert; die Proteine, die ebenfalls bei *T. vaginalis* identifiziert wurden, sind mit # gekennzeichnet.

Proben	TIGR Nr.	Identität	pI	MW [kDa]
hydrogenosomale Proteine				
46, 74, 75, 76, 95, 96, 105, 106, 119	91100.m00020**#	α -SCS, AP33-1	9,48	32,47
1, 18, 37, 49, 50, 52, 68, 69, 73, 131, 136	88864.m00118**#	β -SCS	6,53	43,80
2, 3, 4, 6, 42, 43, 70, 122, 123, 126, 20, 21, 85, 19, 22, 23 87, 88	88026.m00155**#	PFO B N-term PFO B Mitte PFO B C-term	8,23	127,9
94	86827.m00425**#	PFO A	8,30	127,9
7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 62, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 93, 107, 108, 109	81529.m00518**#	Hydrogenosomale O ₂ -Reduktase	7,95	46,39
24, 25, 26, 27, 28, 44, 48, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 66, 67, 110, 115, 118, 129, 137, 138	86485.m00602**#	decarboxyl. MDH B, AP65-3	8,57	63,10
35, 36	92066.m00127**#	decarboxyl. MDH B, AP65-1	7,22	63,27
71, 72	83680.m00050**#	Fructokinase, ROK Familie	6,70	33,06
51	92066.m00128**#	mitoch. Hsp70	6,76	68,70
30, 40, 41, 139	85889.m00502**#	hydrog. Hsp60	6,26	59,99
90	81599.m00076**	64 kDa Fe-Hydrogenase	8,00	65,08
31	88271.m00506**	mitoch. Hsp70	7,98	68,84
57, 65	84088.m00314**#	ASCT	8,85	57,39
17	83473.m00061*	N-Acetyltransferase GNAT Familie	7,69	16,16
47, 64, 91, 92, 100, 116, 120	87150.m00180*	Hybrid-Cluster Protein HCP	8,58	59,93
89, 99	91127.m00212*	Fe-Hydrogenase TvhydA	9,27	50,47
121, 124	85874.m00031*	Acetyl-CoA Hydrolase/Transferase	8,83	57,37
125	91895.m00064*	Hydroxylamine Reduktase	8,08	59,92
9, 77	84270.m00674 #	SOD (NCBI: AAC47734.1)	6,44	22,17
14, 61, 84, 114	93440.m00615 # 89416.m00120	Rubr (unvollst.)	6,12 5,88	22,15 19,40
101	88271.m00409 #	Hmp31	9,88	34,65
127	82511.m00166 #	decarboxyl. MDH A	8,46	29,54
130	96252.m00323 #	bakt. Phosphofruktokinase (PFK3)	8,26	34,55
128	96603.m00040	decarboxyl. MDH ?	6,32	24,79
cytosolische Proteine				
135	82114.m00023 #	Aktin	5,12	41,82
5	96718.m00087	Rho-Kinase, cytopl.	6,71	33,61
132, 133	82360.m00223	β -Tubulin	4,82	49,95
29	86772.m00062	α -Tubulin (NCBI: AAQ19206)	6,07	42,65
38	81907.m00048 97026.m00041 94426.m00128	Papain Familie – Protein mit Cystein Protease	7,50 6,24 6,78	33,91 32,18 35,04
60	89294.m00051	Rac1-verwandtes Protein	4,99	22,46
117	90174.m00039	vakuoläre ATPase ?	4,25	43,70

Anhang 4: Sequenzierte Peptide der BN-PAGE der hydrogenosomalen Membranproteine von *T. vaginalis*.

Protein	Peptid-Größe [Da]	Sequenz	Identität
sa1	2094 1286	TDLQLQNPSINSSFNK LPVGTVDCNIAK	Hmp35 137855.m00003
sa2 sa13	1375 1459 1063 1072 1622 1392	FYAYEELEKR SQTFSYFPDVIR EQGIAGFWR TLTSPLDVVK YTGIFNCAFALLK AALQFTILEETR	Hmp31 88271.m00409
sa3	1303 1389 1132 1425	LAANLTAPQFR CAISGQVQVAK LFGTPLWGNK LCILLVPHLLP	hypothetisches Protein 95509.m00053
sa4 sa14	1147 1004	TTVSPTEVASR VLSDAFPK	hypothetisches Protein 137653.m00003
sa5 sa6, sa7, sa8	1419	AACALHPELFYK	V-Typ ATPase 84843.m00306
sa9 sa10 sa11 sa12	1508 1435 1548 1679 1218 1173 1259 1291	ISAIEDEFEINTK TLSQEPTEEFVR YQGLQLPLNDA FTELEFQ IENPALSAEFK IVSSLQTGK YFANTVNYIR IISLSIQSPLEK	hypothetisches Protein 89692.m00387 87361.m00121 81368.m00082 89692.m00387

Anhang 5: Identifizierte cDNA-Sequenzen der mRNA aus dem Gesamtzellextrakt bzw. der hydrogenosomalen Fraktion von *T. vaginalis*. Sequenzen mit Transitpeptiden nach Carlton *et al.* (2007) sind mit * markiert, weitere mögliche Transitpeptide mit (*); die Proteine, die ebenfalls auf *T. vaginalis* 2D-Polyacrylamidgelen identifiziert wurden, sind mit # gekennzeichnet.

GESAMT CDNA	HYDROGENOSOMALE CDNA
mögliche hydrogenosomale Proteine	
T82-92066.m00127*# decarb. MDH, AP65-1 T53-93440.m00615 Rubrerythrin (Rbr4) T55-81907.m00068*# α -SCS T127-87481.m00161 Hmp35-ähnlich T10-93857.m00276 # Phosphofruktokinase (PFK 2)	H1-80378.m00198*# Ferredoxin H4-92066.m00127*# decarb. MDH, AP65-1 H33-92066.m00127*# decarb. MDH, AP65-1 H71-92066.m00127*# decarb. MDH, AP65-1 H74-92066.m00127*# decarb. MDH, AP65-1 H83-92066.m00127*# decarb. MDH, AP65-1 H95-92066.m00127*# decarb. MDH, AP65-1 H27-86485.m00602*# decarb. MDH, AP65-1 H85-88026.m00155*# PFO B H54-81958.m00091 # [Fe] SOD H37-93656.m00048 (*) Peptidase der C13 Familie H53-86726.m00066 (*) mögliches MORN Protein H58-91895.m00064 (*) Hybrid-Cluster Protein
Glycolyse	
T67-81839.m00110 Enolase T70-81839.m00110 Enolase T68-135865.m00003 GAPDH T78-96726.m00107 GAPDH T123-96726.m00107 GAPDH T135-135865.m00003 GAPDH T14-83581.m00073 Triosephosphat Isomerase	H3-81839.m00110 Enolase H28-81839.m00110 Enolase H60-81839.m00110 Enolase H67-81839.m00110 Enolase H84-81839.m00110 Enolase H11-96726.m00107 GAPDH H13-96726.m00107 GAPDH H19-96726.m00107 GAPDH H20-96726.m00107 GAPDH H48-96726.m00107 GAPDH H82-81812.m00080 # Fructose-1,6-bisphosphate aldolase II H56-93239.m00053 Pyruvatkinase H90-93239.m00053 Pyruvatkinase H61-90371.m00103 Phosphogluco-/ -mannomutase H73-90371.m00103 Phosphogluco-/ -mannomutase H93-90371.m00103 Phosphogluco-/ -mannomutase H30-89154.m00220 Phosphoglyceratkinase H70-89154.m00220 Phosphoglyceratkinase
Kohlenhydrat-Stoffwechsel	
T76-96829.m00054 PEP Carboxykinase T83-96829.m00054 PEP Carboxykinase T90-96829.m00054 PEP Carboxykinase T32-89311.m00099 Transaldolase A T63-89311.m00099 Transaldolase A T4-87079.m00083 # cytosolische MDH T5-87079.m00083 # cytosolische MDH T60-87079.m00083 # cytosolische MDH T108-87079.m00083 # cytosolische MDH T111-87079.m00083 # cytosolische MDH T16-96647.m00122 Galactokinase Familie	H24-90655.m00168 PEP Carboxykinase H35-90655.m00168 PEP Carboxykinase H59-90655.m00168 PEP Carboxykinase H62-90655.m00168 PEP Carboxykinase H102-90655.m00168 PEP Carboxykinase H52-87079.m00083 # cytosolische MDH H66-87079.m00083 # cytosolische MDH H79-87079.m00083 # cytosolische MDH H92-87079.m00083 # cytosolische MDH H100-87079.m00083 # cytosolische MDH H42-85506.m00085 # 4- α -Glucanotransferase

T64-96647.m00122 Galactokinase Familie	H31-85337.m00258 oligo-1,4-Glucanotransferase H34-85337.m00258 oligo-1,4-Glucanotransferase H41-86045.m00046 L-Laktat-Dehydrogenase H80-96647.m00122 Galactokinase Familie H51-82862.m00082 beta-Amylase
Transkription / Translation	
T23-84874.m00060 # cytosolisches Hsp70 T37-85889.m00390 Nucleosid-Diphosphat-Kinase T65-85889.m00390 Nucleosid-Diphosphat-Kinase T49-80906.m00329 RRM = RNA bind. T86-89154.m00237 RRM = RNA bind. T96-86141.m00121 Nuclear RNA bind.	H9-92546.m00122 Tumor-Susceptibility Gen 101 H17-89419.m00188 Elongationsfaktor 2 H32-89419.m00188 Elongationsfaktor 2 H21-80710.m00042 Histon H4 H22-85889.m00390 Nucleosid-Diphosphat-Kinase H57-85889.m00390 Nucleosid-Diphosphat-Kinase H78-85889.m00390 Nucleosid-Diphosphat-Kinase H65-82490.m00257 # Elongationsfaktor 1 alpha H88-82490.m00257 # Elongationsfaktor 1 alpha H81-97064.m00083 Transkriptionsfaktor C-MYB
Cytoskelett	
T1-43456.m00105 CTA2p / Aktin ? T12-85728.m00160 mögliches I-connectin T19-88613.m00095 Tvp14 – Fibronectin-ähnlich T52-97090.m00121 Microtubuli assoziiertes Protein 1A/1B T84-88444.m00023 Adseverin (Aktin-bind.) T85-88444.m00023 Adseverin T112-82178.m00156 Ankyrin-repeat Protein T113-94275.m00100 Aktin-related Protein T125-97064.m00078 3D Domäne, Enterotoxin Zellwand-bind. T138-87054.m00115 Tubulin-Tyrosin-Ligase Fam.	H6-97267.m00032 Profilin A-related (Aktin-bind.) H15-93234.m00142 beta-Adaptin-ähnliches Protein C H18-85661.m00070 alpha-Actinin H39-93331.m00037 Aktin-bind. Protein Fragmin P H76-92477.m00256 Fimbrin (Cytoskelett)
hypothetische Proteine	
T17-95725.m00241 hypothetisches Protein T25-94426.m00132 hypothetisches Protein T29-87640.m00200 hypothetisches Protein T42-95721.m00173 hypothetisches Protein T44-115246.m00003 hypothetisches Protein T57-119226.m00006 hypothetisches Protein T66-86677.m00072 hypothetisches Protein T71-92424.m00057 hypothetisches Protein T95-92580.m00156 hypothetisches Protein T100-80906.m00386 hypothetisches Protein T103-93703.m00003 hypothetisches Protein T105-82736.m00190 hypothetisches Protein T115-91117.m00123 hypothetisches Protein T124-94426.m00132 hypothetisches Protein	H8-88601.m00560 (*) hypothetisches Protein H16-91330.m00007 hypothetisches Protein H23-85686.m00137 hypothetisches Protein H26-86800.m00087 hypothetisches Protein H36-90053.m00081 hypothetisches Protein H47-92066.m00118 hypothetisches Protein
ribosomale Proteine	
T7-82578.m00562 40S rib. Protein S23 T22-82012.m00109 40S rib. Protein S28e T27-85859.m00329 # 40S rib. Protein S5 T30-85522.m00042 # 60S rib. Protein L12 T39-92349.m00197 60S rib. Protein P1 T41-81528.m00055 60S rib. Protein L44 T62-89075.m00084 40S rib. Protein S30 T74-89075.m00084 40S rib. Protein S30	H14-86673.m00359 60S rib. Protein L35Ae H40-87349.m00181 60S rib. Protein L31 H49-86485.m00562 60S rib. Protein L13 H55-96550.m00018 60S rib. Protein L32 H75-96550.m00018 60S rib. Protein L32 H63-80459.m00145 60S rib. Protein L19-3 H86-89444.m00058 60S rib. Protein L21 H89-83680.m00054 60S rib. Protein L21

T79-89004.m00057 60S rib. Protein L14 T91-81090.m00008 60S rib. Protein L23 T97-82578.m00562 40S rib. Protein S23 T101-90316.m00089 40S rib. Protein S14 T104-83007.m00235 60S rib. L29	H94-130413.m00002 60S rib. Protein L4 H98-82736.m00200 # 60S rib. Protein S19 H101-89444.m00058 60S rib. Protein L21
sonstige	
T6-90655.m00148 nuclear-movement Protein nudc T15-86498.m00609 putatives Zelloberfl. Protein T58-86498.m00609 putatives Zelloberfl. Protein T20-94102.m00172 Cystein-Protease T33-89075.m00091 Polyubiquitin T34-89650.m00198 Protein der Tetraspanin Familie T35-97340.m00054 vac. ATPase T45-85377.m00028 Protein der SNF7 Familie T48-95537.m00091 Format/Nitrit Transporter T59-87328.m00132 Prot. mit Cys-reicher Domäne T80-87328.m00132 Prot. mit Cys-reicher Domäne T61-80213.m00082 Oberflächen-Protein B T69-87617.m00030 Histidin Acid-Phosphatase T73-85337.m00301 Prot. der Tautomerase Familie T93-85337.m00301 Prot. der Tautomerase Familie T75-95940.m00263 Prot. mit DHHC Zink-Finger Domäne T87-93091.m00061 Cystein-Protease T98-86693.m00100 Oberflächen Antigen BspA-ähnliches Protein T102-82862.m00082 beta-Amylase T107-94131.m00019 Ubiquitin C-term. Hydrolase T114-96732.m00450 Peptidase Familie M3 T116-92286.m00076 Diacylglycerolkinase T133-95455.m00033 vac. ATPase E	H2-83399.m00070 ähnlich zu Proteinkinase CDC7 H10-83399.m00070 ähnlich zu Proteinkinase CDC7 H5-82775.m00069 Protein-Transport sec23 (Golgi)? H7-96723.m00098 Thioredoxin Reduktase TrxR H12-85284.m00031 Methionin-Gamma-Lyase H25-84511.m00261 PQ-loop Protein H29-81877.m00062 RhoGAP (Protein kiaa1688) H38-83923.m00152 Dipeptidyl-Peptidase III H44-85522.m00029 # cytosolisches Hsp 90 H45-102962.m00005 Cystein-Protease H46-82538.m00093 SNARE Domäne - Syntaxin 8 H50-94275.m00081 Inositol-3-phosphat-Synthase H87-91362.m00072 ATP-Synthase / lysosomale ATPase H72-80459.m00137 lysosomale ATPase H97-94174.m00145 Protein-Kinase homologes Protein H96-86285.m00049 Helicase homologes Protein H43-94939.m00050 NADPH-abh. Butanol-Dehydrog. H64-96086.m00069 Protein mit Tudor Domäne Protein F10G7 [importiert] H77-91895.m00072 Euk. Aspartyl-Protease (Cathepsin) H99-91895.m00072 Euk. Aspartyl-Protease (Cathepsin)

Anhang 6: Zugangsnummern der in phylogenetischen Analysen verwendeten Sequenzen:

ThiH / HydG	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	ZP_00134792
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	AAO76943
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	AAO75756
	<i>Campylobacter jejuni</i>	NP_282194
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AAS92602
	<i>Chlorobium tepidum</i>	NP_661592
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	NP_347984
	<i>Clostridium perfringens</i>	NP_561026
	<i>Clostridium perfringens</i>	NP_562516
	<i>Clostridium tetani</i>	NP_781953
	<i>Clostridium thermocellum</i>	ZP_00312080
	<i>Clostridium thermocellum</i>	ZP_00313326
	<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	ZP_00309850
	<i>Desulfotalea psychrophila</i>	YP_065476
	<i>Desulfotalea psychrophila</i>	YP_066113
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	ZP_00130167
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	ZP_00129808
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	YP_011306
	<i>Erwinia carotovora</i>	YP_048355
	<i>Escherichia coli</i>	AAN83374
	<i>Escherichia coli</i>	NP_312940
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	NP_602569
	<i>Moorella thermoacetica</i>	ZP_003303866
	<i>Moorella thermoacetica</i>	ZP_003313151
	<i>Photorhabdus luminescens</i>	NP_927834
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	AAQ67066
	<i>Salmonella enterica</i>	NP_457915
	<i>Salmonella typhimurium</i>	NP_463028
	<i>Shewanella oneidensis</i>	NP_718030
	<i>Shewanella oneidensis</i>	NP_719454
	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	AAM24772
	<i>Thermotoga maritima</i>	NP_229072
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	88811.m00081 (TIGR)
	<i>Vibrio cholerae</i>	AAF93244
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NP_799401	
<i>Vibrio vulnificus</i>	NP_935995	
<i>Wigglesworthia glossinidia</i>	NP_871507	
<i>Yersinia pestis</i>	NP_407193	
Biotinsynthase / HydE	<i>Aquifex aeolicus</i>	AAC07061
	<i>Bacillus sphaericus</i>	P19206
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	AAO76942
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AAS92601
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	NP_348258
	<i>Clostridium perfringens</i>	NP_563376
	<i>Clostridium thermocellum</i>	ZP_00313490
	<i>Crocospaera watsonii</i>	ZP_00178245
	<i>Desulfobacterium hafniense</i>	ZP_00099636
	<i>Desulfotalea psychrophila</i>	YP_066112
	<i>Desulfotalea psychrophila</i>	YP_064211
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	ZP_00129809
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	YP_010985
	<i>Methanosarcina barkeri</i>	ZP_002975727
	<i>Moorella thermoacetica</i>	ZP_00330387
	<i>Nostoc punctiforme</i>	ZP_00109918
	<i>Shewanella oneidensis</i>	NP_719456
	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	AAM24230
	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	NP_623465
	<i>Thermotoga maritima</i>	NP_229074
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	81202.m00098 (TIGR)

GTPase / HydF	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	NP_355257
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	AAO76944
	<i>Bartonella henselae</i>	YP_033248
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	NP_770692
	<i>Brucella suis</i>	NP_697406
	<i>Campylobacter jejuni</i>	NP_281576
	<i>Caulobacter crescentus</i>	NP_420464
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AAS92601
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	NP_348277
	<i>Clostridium perfringens</i>	NP_561024
	<i>Clostridium tetani</i>	AAO35889
	<i>Clostridium thermocellum</i>	ZP_00314036
	<i>Deinococcus radiodurans</i>	NP_296029
	<i>Desulfotalea psychrophila</i>	YP_066114
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	ZP_00129810
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	YP_010986
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ZP_00143552
	<i>Guillardia theta</i>	CAC26996
	<i>Helicobacter pylori</i>	NP_207627
	<i>Heliobacillus mobilis</i>	AAN87364,
	<i>Mesorhizobium loti</i>	NP_107728
	<i>Mesorhizobium sp.</i>	ZP_00194071
	<i>Moorella thermoacetica</i>	ZP_00329474
	<i>Mycoplasma mycoides</i>	NP_975398
	<i>Oenococcus oeni</i>	ZP_00318880
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	CAE28536
	<i>Shewanella oneidensis</i>	NP_719457
	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	NP_437661
	<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	BAD39337
	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	AAM25900
	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	AAM24071
	<i>Thermotoga maritima</i>	NP_228255
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	87122.m00057 (TIGR)
<i>Wolinella succinogenes</i>	CAE11040	
Peroxioredoxin	<i>Archeoglobus fulgidus</i>	O29969
	<i>Bacillus subtilis Ahpc</i>	P80239
	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	NP_967317
	<i>Burkholderia fungorum</i>	ZP_00029806
	<i>Chlorobium tepidum</i>	NP_661649
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	NP_900540
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	NP_600314
	<i>Escherichia coli</i>	NP_287864
	<i>Escherichia coli Ahpc</i>	NP_286332
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ZP_00154345
	<i>Helicobacter hepaticus</i>	NP_861349
	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	ZP_00054735
	<i>Methanococcus jannaschii</i>	Q58146
	<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	O26262
	<i>Microbulbifer degradans</i>	ZP_00066556
	<i>Mycobacterium avium</i>	NP_960587
	<i>Photorhabdus luminescens</i>	NP_929814
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	NP_905837
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ZP_00088267
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	NP_520911
	<i>Salmonella enterica</i>	NP_455822
	<i>Salmonella typhimurium Ahpc</i>	P19479
	<i>Salmonella typhimurium</i>	NP_460640
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	P95895
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	82140.m00099 (TIGR)
	<i>Wolinella succinogenes</i>	NP_907737
<i>Yersinia pestis</i>	NP_669305	

Rubrerythrin	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> rbr1	NP_069666
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> rbr2	NP_069665
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> rbr3	NP_070468
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i> rbr4	NP_071137
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	NP_812094
	<i>Campylobacter jejuni</i>	NP_281234
	<i>Chlorobium tepidum</i>	NP_662214
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	NP_349184
	<i>Clostridium perfringens</i>	NP_561051
	<i>Clostridium tetani</i>	NP_783150
	<i>Clostridium thermocellum</i>	ZP_00312134
	<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	ZP_00099396
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	BAC10581
	<i>Entamoeba histolytica</i>	XM_647039.1
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	NP_603352
	<i>Magnetococcus</i> sp.	ZP_00290291
	<i>Methanococcus jannaschii</i>	F64391
	<i>Methanosarcina mazei</i>	NP_634213
	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	NP_275961
	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	NP_275898
	<i>Moorella thermoacetica</i>	ZP_00180596
	<i>Nostoc punctiforme</i>	ZP_00108713
	<i>Nostoc</i> sp.	NP_485217
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Q9AGG3
	<i>Prochlorococcus marinus</i>	CAE22340
	<i>Pyrococcus abyssi</i>	NP_126574
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	NP_579012
	<i>Synechococcus</i> sp.	CAE08884
	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	NP_622163
	<i>Thermotoga maritima</i>	NP_228466
<i>Trichomonas vaginalis</i>	82414.m00151 (TIGR)	

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	GK	Glucokinase
μA	Mikroampere (10 ⁻⁶ A)	Glu	Glutamat
μF	Mikrofaraday (10 ⁻⁶ F)	h	Stunde
μg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)	HA	Hämagglutinin
μl	Mikroliter (10 ⁻⁶ l)	His	Histidin
μM	Mikromolar (10 ⁻⁶ M)	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
1D, 2D, 3D	ein-, zwei-, dreidimensional	IEF	isoelektrische Fokussierung
Abb.	Abbildung	IgG	Immunglobulin G
ACN	Acetonitril	IP	<i>imaging plate</i> (Detektions-Film)
ADP	Adenosindiphosphat	IPG	immobilisierte pH-Gradienten
AhpC	Alkylhydroperoxid-Reduktase C	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
APS	Ammoniumpersulfat	ISC	<i>iron-sulfur cluster</i>
ASCT	Acetat-Succinat-CoA-Transferase	kb	Kilobasen (10 ³ bp)
ATP	Adenosintriphosphat	kDa	Kilodalton (10 ³ Da)
BiCa	Ammoniumbicarbonat	LDH	Laktat-Dehydrogenase
bidest.	bidestilliert	M	Molar
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan	m/z	Masse pro Ladung
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	mA	Milliampere (10 ⁻³ A)
BN	Blau-Native	Mb	Megabasen (10 ⁶ bp)
bp	Basenpaare	MBq	Megabecquerel (10 ⁶ Bq)
BSA	Rinderserumalbumin	MDH	Malat-Dehydrogenase
cDNA	komplementäre DNA	mg	Milligramm (10 ⁻³ g)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat	min	Minute
cm	Zentimeter (10 ⁻² m)	ml	Milliliter (10 ⁻³ l)
CoA	Coenzym A	mM	Millimolar (10 ⁻³ M)
Cys	Cystein	mol	6,3 x 10 ²³ Teilchen
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol	MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	mRNA	<i>messenger RNA</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	MS	Massenspektrometer
deion.	deionisiert	ms	Millisekunde (10 ⁻³ s)
DEPC	Diethylpyrocarbonat	MW	Molekulargewicht
dest.	destilliert	n	Anzahl Einzelmessungen
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
DMSO	Dimethylsulfoxid	NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NCBI	<i>National Center for Biotechnology and Information</i>
DNase	Desoxyribonuklease	ng	Nanogramm (10 ⁻⁹ g)
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat	Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
DTT	Dithiothreitol	nm	Nanometer (10 ⁻⁹ m)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	OD	optische Dichte
EC	<i>Enzyme Commission numbers</i>	ORF	<i>open reading frame</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	OTC	Ornithintranscarbamylase
EGTA	Ethylene-bis(oxyethylennitrilo)tetraacetat	ox	oxidiert
ER	Endoplasmatisches Retikulum	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ESI	Elektrospray-Ionisierung	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
EST	<i>expressed sequence tags</i>	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
ExPASy	<i>Expert Protein Analysis System</i>	PFK	Phosphofruktokinase
FBA	Fructosebisphosphat-Aldolase	PFL	Pyruvat-Format-Lyase
FD	Ferredoxin	PFOR	Pyruvat: Ferredoxin
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ -Reduktase		Oxidoreduktase
g	Gramm oder Erdbeschleunigung (g = 9,81 m/s ²)	pH	-log ₁₀ [H ⁺]
G-6-Pase	Glucose-6-Phosphatase	pI	isoelektrischer Punkt
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase	P _i	Phosphat
		pmol	Pikomol (10 ⁻¹² mol)
		PVP	Polyvinylpyrrolidon

Rbr	Rubrerythrin
red	reduziert
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
Rub	Rubredoxin
s	Sekunde
SAM	S-Adenosylmethionin
SCOT	Succinyl-CoA:3-Oxosäure-CoA- Transferase
SCS	Succinyl-CoA-Synthase
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHMT	Serin-Hydroxymethyl-Transferase
SM	Puffer mit Saccharose und MOPS
SMB	Puffer mit Saccharose, MOPS und β-Mercaptoethanol
SMDI	Puffer mit Saccharose, MOPS, DTT und Inhibitoren
SOD	Superoxiddismutase
SP	Saure Phosphatase
SSC	Natriumcitratpuffer
SSPE	Natriumphosphatpuffer mit EDTA
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	TBS mit Tween und Triton
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEM	Transmissions- Elektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i>
TLCK	N _α -Tosyl-L-lysinchloromethyl- ketonhydrochlorid
T _m	Schmelztemperatur
TOF	<i>Time of flight</i>
Tpx	Thiolperoxidase
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin-Reduktase
U	<i>unit</i> = μmol/min
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Danke...

Ich danke Herrn **Prof. Dr. W. Martin** herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Ökologische Pflanzenphysiologie, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Herrn **Prof. Dr. F. Wunderlich** danke ich für das Übernehmen des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau **PD Dr. Katrin Henze** für das interessante Thema, die freundschaftliche, intensive und geduldige Betreuung dieser Promotion, im praktischen sowie im theoretischen Bereich.

Ich danke allen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe, insbesondere **Dr. Katrin Henze, Dr. Ursula Theißen, Silke Rosnowsky, Sara Tucci, Margarete Stracke, Claudia Kirberich** und der Office-Besatzung für die tolle Zusammenarbeit, ihre Unterstützung, die ständige Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Ein herzliches Dankeschön an die „Chefin“ dieses Institutes, Frau **Marianne Limpert**, die mir bei Fragen und Problemen mit Verwaltung und Verträgen allzeit hilfsbereit zur Seite stand. **Ursula** und **Silke** möchte ich zusätzlich ganz besonders für die unermüdliche Hilfestellung und für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Frau **Dr. Sabine Metzger** und ihren Kollegen des BMFZ danke ich für die Hilfsbereitschaft am ESI.

Frau Nissen und **Gabriel Gelius-Dietrich** danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und **Gabriel** zusätzlich für seine Hilfestellung bei bioinformatischen Fragen.

Meiner **Familie** möchte ich dafür danken, dass sie immer an mich geglaubt, mich bedingungslos unterstützt und mir Mut zugesprochen hat.

Meinem Mann **Dr. André Pütz** danke ich von ganzem Herzen für das Korrekturlesen, seine Geduld, sein Verständnis, seine Motivation und die vielen aufmunternden Worte.

Wir haben es endlich geschafft...

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

Düsseldorf, den 14.03.2007

(Simone Pütz)