

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA PARAZITOLOGIE

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE, FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF PARASITOLOGY

Doktorský studijní program: Parazitologie
Ph.D. study program: Parasitology

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Kofaktory obsahující železo u anaerobního parazita *Giardia intestinalis*

Iron containing cofactors in anaerobic parasite *Giardia intestinalis*

Mrg. Jan Pyrih

Školitel/Supervisor: prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.
Školitel-konzultant/Supervisor-consultant: doc. RNDr. Ivan Hrdý, Ph.D.

Praha, 2015

Obsah / Content

Abstrakt	3
Abstract.....	4
Česká část:	
1. Úvod.....	6
2. Cíle práce	7
3. Materiál a metodika	7
4. Výsledky a diskuze	7
5. Závěr	9
English part:	
1. Introduction.....	12
2. Aims	13
3. Material and methods	13
4. Results and discussion	13
5. Conclusion	15
Seznam publikací / List of publications	17
Curriculum vitae	18
Seznam citací/ References	21

Abstrakt

Železo je nepostradatelným prvkem téměř pro všechny organismy. Nejčastěji je v buňce přítomné jako součást železitosirných (FeS) klastrů a hemu. Díky těmto kofaktorům mají proteiny schopnost katalyzovat enzymatickou reakci, přenášet elektrony a plyny a nebo detekovat signál. Mnoho FeS a hemových proteinů se účastní dobře prostudovaných drah, jako je fotosyntéza nebo dýchací řetězec. Nicméně o syntéze FeS klastrů v různých buněčných kompartmentech nebo o roli nově objevených FeS nebo hemo-proteinů se stále mnoho informací neví. Velmi málo je známo především o tom, jak jsou u anaerobně žijících protistů FeS klastry formovány nebo jak je využíván hem. V těchto organismech se totiž dráhy dýchacího řetězce či fotosyntézy nevyskytují. Rozhodli jsme se proto zaměřit na železo obsahující kofaktory u anaerobního parazita *Giardia intestinalis*. Tento organismus prošel dramatickou reduktivní evolucí, jejímž výsledkem je vznik jednoho z nejmenších eukaryotických genomů a nejvíce redukované formy mitochondrie - mitosomu. Charakterizovali jsme některé komponenty mitochondriální (ISC) a cytoplasmatické (CIA) FeS klastrovací dráhy. Pomocí proteomické analýzy jsme nejprve detekovali komponenty dráhy ISC v mitosomu. Poté jsme analyzovali přítomnost a buněčnou lokalizaci CIA proteinů. V genomu *G. intestinalis* jsme identifikovali pouze některé komponenty dráhy CIA (Nbp35, Nar1, Cia1, Cia2 a dva geny podobné Tah18). Pro některé z nich jsme navíc ukázali, že mají duální cytoplasmaticko-mitosomální lokalizaci. Tyto proteiny by mohly umožňovat spojení ISC a CIA dráhy.

Mezi známé hemo-proteiny u *G. intestinalis* patří pouze flavohemoglobin a čtyři cytochromy *b*₅. Ukázali jsme, že cytochromy *b*₅ v *G. intestinalis* (gCYTb₅) patří do prozatím necharakterizované skupiny proteinů (cytb₅ typ II). Nemají typickou transmembránovou doménu na C-konci a obsahují specifickou aminokyselinovou sekvenci v okolí esenciálních histidinů, které váží hem. Navíc jsme zjistili, že cytochromy *b*₅ typ II jsou u eukaryot všudepřítomné na rozdíl od typických cytochromů *b*₅ (typ I), které se vyskytují pouze v aerobních eukaryotických buňkách. Ukázali jsme, že jsou všechny paralogy gCytb₅ proteinů přítomné v cytoplasmě *G. intestinalis* a že rekombinantní gCytb₅ proteiny váží hem *in vitro*. Navíc jsme ještě prokázali, že je *G. intestinalis* schopná importovat hem z extracelulárního prostředí a zabudovávat ho do cytoplasmatického gCYTb₅-IV. Dříve se předpokládalo, že anaerobní prvoci žijí zcela bez hemu. Naše experimenty poprvé prokázaly, že je hem přítomen a využíván anaerobním protistem *Giardia intestinalis* a pravděpodobně i dalšími anaeroby majícími cytb₅ proteiny.

Abstract

Iron is an essential element in nearly all organisms. It is present mainly as a component of iron sulfur (FeS) clusters or as a heme iron. These cofactors enable proteins to transfer electrons or diatomic gasses, signal sensing and enzyme catalysis. Numerous FeS and heme depending proteins are involved in photosynthesis and respiratory chain pathways, which are well described processes. However, there is still much to learn about more recently discovered pathways such as formation of FeS clusters in various cell compartments and about roles of novel FeS or heme proteins. Particularly, only limited information is available about how FeS clusters are assembled or how heme is used in anaerobic protists, in which cytochrome-dependent respiration and photosynthesis does not occur. We decided to focus on iron cofactors in anaerobic parasite *Giardia intestinalis*. This organism undergone dramatic reductive evolution that resulted in formation of one of the smallest eukaryotic genome and the most reduced form of mitochondria, the mitosome. We characterized some components of mitochondrial (ISC) and cytoplasmic (CIA) FeS assembly machineries. We have detected ISC components in mitosome by proteomic analysis. Furthermore we investigated the presence and subcellular localization of CIA proteins in *Giardia*. In the *Giardia* genome, we identified only some components of CIA machinery including Nbp35, Nar1, Cia1, Cia2 and two genes with similarity to Tah18. Moreover, we found that some CIA proteins display dual cytoplasmic/ mitosomal localization, which may facilitate the connection between ISC and CIA machineries.

Known set of *Giardia* hemoproteins is limited to a single flavohemoglobin and four cytochrome *b*₅ proteins. We showed that *Giardia* cytochromes *b*₅ (gCYTb₅) belong to yet uncharacterized group of proteins (cyt_b₅ type II). They lack typical C-terminal transmembrane domain and possess specific amino acid motif around essentials heme binding histidines. Moreover, we found, that cyt_b₅ type II are ubiquitously present in eukaryotes in contrary to typical cytochromes *b*₅ (type I), which are present only in aerobic eukaryotic cells. We showed that gCYTb₅ paralogues are all present in *Giardia* cytosol and we proved that recombinant gCYTb₅ proteins bind heme *in vitro*. Additionally, we demonstrated that *Giardia* can import extracellular heme and incorporate it into the cytoplasmic gCYTb₅-IV. Previously it was believed that anaerobic protists live entirely without heme. Therefore, our experiments demonstrated for the first time that heme is present and utilized by anaerobic protist *Giardia intestinalis* and most likely by other anaerobes possessing cyt_b₅.

Česká část / Czech part

1. Úvod

Železo je přechodný prvek, který je schopný tvořit kationty s nekompletní sadou elektronů. Díky tomu je v přírodě přítomné především ve dvou hlavních oxidačních stavech, Fe^{2+} a Fe^{3+} . V proteinech nalezneme železo nejčastěji jako součást složitějších anorganických struktur, které nazýváme kofaktory. Tyto kofaktory umožňují proteinům přenášet plyny a také elektrony v rámci různých metabolických drah. Navíc se podílí na detekci signálu a při velké škále katalytických reakcí. Proto je železo nepostradatelný prvek pro většinu žijících organismů.

Železo ale může být pro buňku toxické díky své schopnosti katalyzovat tvorbu volných radikálů. Příjem a uskladnění železa je proto regulovaný proces (1). Při vyšší koncentraci je železo skladováno ve své nerozpustné formě (Fe^{3+}) v proteinech jako je feritin.

Mezi dráhy závislé na přítomnosti železa patří například dobře prostudovaná dráha dýchacího řetězce v mitochondriích. U anaerobních organismů byla tato dráha redukována, nicméně železo potřebují pro funkci proteinů obsahujících FeS klastry (FeS proteiny), které se účastní anaerobního energetického metabolismu a replikace buňky. Většina redukovaných anaerobních mitochondrií má zachovanou dráhu pro syntézu železo-sirných klastrů (2). V nejredukovanějších formách mitochondrie, jako jsou mitosomy u *Giardia intestinalis*, je dokonce syntéza FeS klastrů jediná dosud identifikovaná dráha (3). Její nepostradatelnost je nejspíše důvodem ponechání si mitosomu v průběhu reduktivní evoluce.

Železitosirné klastry jsou kofaktory obsahující železné ionty spojené pomocí sulfidových iontů, které zaujmají různé oxidační stavy. Jejich důležitost byla v současné době zdůrazněna objevem FeS proteinů, které se účastní DNA metabolismu a biogeneze ribozomu (4-6).

Dalším všudypřítomným železným kofaktorem je hem, porfyrin obsahující železo. Proteiny vázající hem se účastní transportu elektronů, přenosu plynů a obrany proti oxidativnímu stresu. Dráha syntézy hemu je vysoce konzervovaná a je nezbytná pro většinu organismů (7,8). Může být nicméně nahrazena importem hemu z vnějšího prostředí (9,10). U anaerobů jsou dráhy závislé na hemu silně redukované. Například u *Entamoeba histolytica* nebyly identifikovány žádné vnitrobuněčné hemoproteiny (11). U *G. intestinalis* byl nalezen pouze jeden gen pro flavohemoglobin a tři geny pro proteiny podobné cytochromu b_5 (12,13). Jejich funkce je ale nejasná.

2. Cíle práce

- Charakterizovat cytochromy b_5 a jejich schopnost vázat hem *in vitro* a v buňce *G. intestinalis*
- Testovat přítomnost hemu v buňce *G. intestinalis*
- Charakterizovat Tah18-like oxidoreduktázy u *G. intestinalis*
- Zkoumat složení ISC a CIA dráhy a buněčnou lokalizaci jejich komponent

3. Materiál a metodika

Materiály a metody jsou podrobně popsány v originálních publikacích. Byly použity zejména tyto metody: Detekce hemu; Enzymová kinetika; Nízkoteplotní analýza spektra; SDS page a western blot analýza buněčných frakcí; Imunofluorescenční lokalizace proteinů v *G. intestinalis*; Produkce rekombinantních proteinů v bakteriích

4. Výsledky a diskuze

- Nový typ cytochromů b_5 u *Giardia intestinalis* a dalších eukaryot

V genomu *G. intestinalis* jsme identifikovali nový gCYT b_5 paralog s názvem gCYT b_5 -IV, který je odlišný od dosud známých gCYT b_5 proteinů (14). Ukázali jsme, že jsou rekombinantní gCYT b_5 -IV a také gCYT b_5 -II a III proteiny v nativní formě schopné vázat hem *in vitro* (14), což bylo již dříve demonstrováno pro gCYT b_5 -I (13). Navíc jsme prokázali, že je gCYT b_5 -IV schopný vázat hem i uvnitř buněk *G. intestinalis*. Pomocí *in vitro* experimentů jsme dále objevili, že je schopnost vázat hem u gCYT b_5 -IV po mutaci prvního axiálního hem-vázajícího histidinu na leucin drasticky snížená. Stejného efektu bylo dosaženo i v žijících buňkách *G. intestinalis*, ve kterých byl tento mutovaný protein exprimován (14).

Na základě imunofluorescenční mikroskopie a analýzy sub-buněčných frakcí jsme potvrdili lokalizaci všech gCYT b_5 proteinů v cytosolu, což souhlasí s absencí transmembránové domény.

Analýza primární struktury a fylogenetická studie porovnávající 102 sekvenčí pro cyt b_5 proteiny napříč všemi eukaryotickými skupinami odhalila přítomnost tří podskupin cyt b_5 proteinů (pojmenovány typ I, II a III). Mezi cyt b_5 typ I patří charakterizované cyt b_5 z

mitochondrie a endoplasmatického retikula. Proteiny *G. intestinalis* patří do skupiny II. Tato skupina je charakterizována absencí transmembránové domény na C-konci a pozměněným místem pro vazbu hemu. U *cytb₅* proteinů typu II není první histidinový motiv obklopen kyselými zbytky a druhé místo je součástí H-X-WV(N/S) motivu.

- Charakterizace Tah18-like oxidoreduktáz u *G. intestinalis*

Giardia má dva geny pro proteiny (GiOR-1 and 2) podobné Tah18 proteinu (15). Naše data nicméně ukázala, že Tah18 a GiOR proteiny mají odlišnou evoluční historii (Pyrih, nepublikovaná data). GiOR proteiny se větví společně s CPR doménou fúzních CPR-hydrogenáz, které se vyskytují u blízce příbuzných metamonád. Tah18 homology naproti tomu tvoří samostatnou linii. V GiOR-1 a GiOR-2 proteinech byla hydrogenázová doména pravděpodobně sekundárně ztracena, protože u více "ancestrálních" metamonád, jako je např. *Trimastix* nebo *Carpediemonas*, je přítomný fúzní protein. Dre2 protein, který tvoří v kvasinkách s Tah18 proteinem elektron donorový komplex, není přítomný v celé linii metamonád. Proto je pravděpodobné, že mají GiOR proteiny odlišnou funkci než Tah18. Ani v jednom genomu osekvenovaných kmenů *G. intestinalis* nebyl nalezen gen pro ferredoxin reduktázu, která je obvykle součástí ISC dráhy. GiOR-1 protein identifikovaný v mitosomech *G. intestinalis* je diflavin oxidoreduktáza se schopností přenosu elektronů z NADPH na arteficielní akceptory jako je např. dichlorophenolindophenol, methyl viologen, a *cytb₅* (15). Oxidoreduktázy klastrovacích drah (Arh1 v ISC dráze a SufB v SUF dráze) koupodivu také obsahují FAD vázající doménu a mají NADH nebo NADPH oxidoreduktázovou aktivitu. Většina proteinů co-precipitovaných s GiOR-1 proteinem navíc náleží do ISC dráhy (Pyrih, nepublikovaná data). Proto je možné, že GiOR-1 slouží jako oxidoreduktáza mitosomálního ferredoxinu (GiFdx) *in vivo*. Tuto hypotézu se nám nicméně nepodařilo potvrdit. GiOR-1 protein připravený a vyizolovaný z bakterií nebyl schopný redukovat rekombinantní GiFdx (15).

- ISC dráha u *G. intestinalis*

První proteom mitosomu *G. intestinalis* jsme publikovali v roce 2011. Mitosomální frakce byly získány pomocí diferenciální ultra-centrifugace v optiprepovém gradientu (15). Nedávno

jsme navíc k obohacení mitosomálního proteomu použili odlišný nástroj založený na *in vivo* biotinylaci (16). Cílový protein byl zaklonován s biotin akceptorovým tagem a exprimován spolu s biotin ligázou, která zajistila jeho biotinylaci *in vivo*. Dále byl zkroslinkován s možnými interagujícími proteiny a celý komplex byl následně zachycen pomocí "Dyna-Beads", které obsahují streptavidin.

Dohromady tato proteomická data poskytují užitečné informace pro rekonstrukci ISC mitosomální dráhy. Některé ISC komponenty, které jsou konzervované a nezbytné v dalších eukaryotech (např. frataxin, ferredoxin reductase and Isd11, Iba57) se nám překvapivě v *G. intestinalis* identifikovat nepodařilo. Krom ISC dráhy a komponent mitochondriálního systému pro import proteinů jsme ale v mitosomu navíc nalezli proteiny s neznámou homologií. Je možné, že některé z těchto proteinů (např. GL50803_3491, GL50803_9696, GiOR-1) jsou funkční homology frataxingu, ferredoxin reduktázy a Isd11 proteinu. Blízká homologie k rhodanese-like proteinu byla zjištěna pro protein GL50803_27910. Jelikož jsou rhodanese-like proteiny obvykle zapojeny v metabolismu síry (17), je účast tohoto proteinu v ISC dráze pravděpodobná.

- CIA dráha u *G. intestinalis*

Identifikace homologů CIA dráhy v genomu *G. intestinalis* odhalila přítomnost genů pro Nbp35, Nar1, Cia1 a Cia2, zatímco geny pro MMS19, Cfd1, Tah18 (viz předešlá diskuze) a Dre2 protein v genomu *G. intestinalis* nebyly nalezeny.

Pro zjištění jejich buněčné lokalizace jsme odpovídající geny zaklonovali pro expresi značených proteinů nebo jsme proti nim připravili specifické protilátky. Přestože jsou všechny CIA komponenty zastoupeny v cytoplasmě, několik z nich zaujímá duální lokalizaci jak v cytoplasmě tak mitosomu. Pomocí ko-precipitačních technik se nám podařilo ukázat, že se dva Nbp35 paralogy nachází na povrchu mitosomů a Cia2 protein je pravděpodobně v jejich mezimembránovém prostoru (Pyrih, nepublikovaná data).

5. Závěr

G. intestinalis má minimalistický genom obsahující pouze několik intronů. Navíc obsahuje zjednodušené dráhy pro DNA replikaci, transkripci, RNA metabolismus a většinu

metabolických drah (18). Podařilo se nám ukázat, že jsou v mitosomu *G. intestinalis* přítomny i některé proteiny s neznámou homologií. Na základě našich dat proto usuzujeme, že byla ztráta některých mitochondriálních genů a drah během mitosomální evoluce souběžně spojená s invencí nových proteinů, specifických pro *G. intestinalis* (16).

Není známo, zdali jsou ISC dráha v mitosomu a CIA dráha v cytopasmě spojené, neboť Atm1 a Erv1 geny chybí (18). Proto je možné, že jsou obě dráhy na sobě nezávislé. Nicméně žádná cystein desulfuráza (možný donor síry pro CIA) nebyla v cytoplasmě *G. intestinalis* identifikována. Nbp35 proteiny (komponenty CIA dráhy) byly navíc nalezeny na povrchu mitosomů. V mitosomu nebyl identifikován žádný kandidát pro esenciální FeS protein (kromě proteinů účastnících se syntézy FeS klastrů). Proto se zdá pravděpodobné, že je mitosomální ISC dráha spojená s cytoplasmatickou CIA dráhou pro formování FeS klastrů v cytoplasmě. Pro porozumění možného spojení ISC a CIA dráhy je nicméně zapotřebí dalšího podrobného výzkumu.

Naše data také dokazují, že je *Giardia* schopná importovat extacelulární hem a že je ho schopná zabudovávat do *cytb₅* proteinů typu II (14). Je to první důkaz o přítomnosti hemu v anaerobní eukaryotní buňce. *Cytb₅* proteiny typu II navíc reprezentují novou skupinu *cytb₅* proteinů, která je všudypřítomná jak u aerobních tak i u anaerobních eukaryotických buněk (14). Funkce těchto proteinů je nicméně neznámá a dosud nebyla studována.

Anglická část / English part

1. Introduction

Iron is a transition metal, which is able to form cation with an incomplete set of electrons in d orbital. Iron is present in nature mainly in two oxidative states, Fe^{2+} and Fe^{3+} . The most common way how to incorporate iron within the protein is as a part of more complicated inorganic structures called cofactors. These cofactors enables proteins to transfer diatomic gasses as well as electrons in various metabolic pathways. Moreover, they are involved in signal sensing and in a wide scale of chemical catalysis. Therefore, iron is an essential element in vast majority of living organisms.

However, intracellular iron is also toxic due to its ability to catalyze the formation of free radicals. Therefore, the iron uptake and storage is tightly regulated process (1). In higher concentrations iron is stored in its insoluble form (Fe^{3+}) in proteins such as ferritin.

Although organisms living in anaerobic conditions have reduced well-known iron-dependent pathways such as mitochondrial respiratory chain, they require iron for FeS cluster containing proteins (FeS-proteins) involved in anaerobic energy metabolism and for their multiplication. Various reduced types of anaerobic mitochondria are unified by conservation of Iron-sulfur (FeS) clusters (ISC) assembly pathway (2). In the most reduced forms of mitochondria, such as mitosomes of *Giardia intestinalis*, FeS cluster assembly is the only pathway identified so far (3). The essentiality of ISC machinery is most likely the reason for keeping the organelle during the reductive evolution.

Iron sulfur clusters are cofactors containing iron ions bridged by sulfide ions in variable oxidation states. The importance of iron sulfur proteins has been recently underlined by discoveries of iron containing protein involved in DNA metabolism and ribosome biogenesis (4-6).

Another ubiquitous iron cofactor is heme, an iron coordinating porphyrin. Heme proteins are involved in electron transport, diatomic gasses carriage and oxidative stress defense. Heme synthesis pathway is highly conserved, and it is essential in most organisms (7,8), although it can be bypassed by heme import from external environment (9,10). Heme dependent pathways are highly reduced in anaerobes, for example no intracellular hemoproteins have been identified in *Entamoeba histolytica* (11) and the only gene for flavohemoglobin and three genes for cytochrome b_5 like proteins with unknown cellular function were identified in *G. intestinalis* (13).

2. Aims

- To characterize cytochromes b_5 proteins and their ability to bind heme *in vitro* and in *G. intestinalis*
- To test the presence of heme in *G. intestinalis*
- To characterize Tah18-like oxidoreductases from *G. intestinalis*
- To investigate the composition of ISC and CIA pathways and cellular localization of their components

3. Material and methods

The material and methods are described in detail in original publications. Briefly, mainly these methods were used: Heme detection; Enzyme kinetics; Low temperature spectra analysis; SDS page and western blot analysis of the cellular fractions; Immunofluorescence localization of proteins in *G. intestinalis*; production of recombinant proteins in bacteria.

4. Results and discussion

- **Novel type of cytochrome b_5 in *Giardia* and other eukaryotes**

We identified new gCYT b_5 parologue in *Giardia* genome named gCYT b_5 -IV that is divergent from known gCYT b_5 proteins (14). We demonstrated that native recombinant gCYT b_5 -IV as well as gCYT b_5 II and III proteins are able to bind heme *in vitro* (14) as was previously showed for gCYT b_5 -I (12). Moreover, we demonstrated that gCYT b_5 -IV is able to bind heme within the cell of *Giardia intestinalis*. Furthermore, we showed *in vitro* that heme binding ability is drastically lowered when first axial heme-binding histidine in gCYT b_5 -IV is mutated to leucine. The same effect was observed in living *Giardia* cells, when mutated protein was overexpressed (14).

Based on immunofluorescence microscopy and analysis of subcellular fractions, all four gCYT b_5 appeared to be cytosolic proteins, which is consistent with the lack of transmembrane domain.

Analysis of primary structure and phylogeny comparing set of 102 cyt b_5 protein sequences across all eukaryotic supergroups revealed the existence of three subgroups of

cyt b₅ proteins (named type I, II III). Type I *cyt b₅* group consists of already characterized *cyt b₅* from mitochondria or endoplasmic reticulum. *Giardia* gCYTb₅ proteins belong to type II. This group is characterized by lack of C-terminal transmembrane domain and possess modified heme binding site. In type II *cyt b₅* proteins, first axial histidine is not surrounded by acidic residues and the second one is part of the H-X-WV(N/S) motif.

- **Characterization of Tah18-like oxidoreductases from *G. intestinalis***

Giardia possesses two genes coding for proteins with similarity to Tah18 (GiOR-1 and 2) (15). Our data revealed, that Tah18 and GiORs have different evolutional origin (Pyrih, unpublished data). GiORs clustered together with CPR domain of CPR-hydrogenase fusion proteins, which are present in closely related metamonads, whereas Tah18 homologues formed distinct branch. In GiOR-1 and GiOR-2, hydrogenase domain was likely secondarily lost, as the fusion protein is present in ancestral metamonads such as *Trimastix* or *Carpediemonas*. Considering the absence of Dre2 which forms electron donor complex with Tah18 in all metamonad lineage, it is likely that GiOR proteins possess different function than Tah18.

No homologue of ferredoxin reductase, that is usually involved in ISC pathway, is present in genomic data of all sequenced *Giardia* strains. GiOR-1 protein identified in *Giardia* mitosomes is diflavin oxidoreductase with ability to transfer electron from NADPH to artificial acceptors such as dichlorophenolindophenol, methyl viologen, and *cyt b₅* (15). Interestingly, oxidoreductases of cluster assembly machineries (Arh1 in ISC pathway and SufB in SUF pathway) contain FAD binding domain and NADH or NADPH oxidoreductase activity. Moreover, most of proteins co-precipitated with GiOR-1 belong to ISC pathway (Pyrih, unpublished data). Therefore, it is possible that GiOR-1 serves as the reductase of mitosomal ferredoxin (GiFdx) *in vivo*. Nevertheless, we failed to confirm this hypothesis. GiOR-1 protein prepared and isolated from bacteria was unable to reduce recombinant GiFdx (15).

- **ISC pathway in *Giardia***

In 2011, we published the first proteome of *Giardia* mitosome. Mitosomal fractions were obtained via differential ultracentrifugation in optiprep gradient (15). Recently, another approach was used to explore mitosomal proteome (16). Reporter mitosomal proteins were subcloned with biotin acceptor peptide and expressed together with biotin ligase. Proteins of

interest were then biotinylated *in vivo*. The protein was subsequently crosslinked with its putative protein partners and whole complex was purified by streptavidin coupled to Dynabeads.

Altogether, these proteomic datasets provide useful tool for reconstruction of ISC mitosomal pathway. Interestingly, some ISC proteins that are conserved and essential in other eukaryotes are missing in *Giardia* (e.g frataxin, ferredoxin reductase and Isd11, Iba57). In addition to ISC pathway, proteins from mitochondrial protein import machinery were identified together with several proteins with unknown homologues. It is possible, that some of those unknown proteins (for example GL50803_3491, GL50803_9696, GiOR-1) might be functional homologs of frataxin, ferredoxin reductase or Isd11 proteins. For protein (GL50803_27910) close sequence homology to rhodanese was observed. As rhodanese-like proteins are usually involved in sulfur metabolism (17), involvement of this protein in ISC pathway is possible.

- **Characterization of CIA machinery**

Searches for homologues of CIA pathway in *Giardia* genome database revealed genes for Nbp35, Nar1, Cia1, and Cia2. CIA machinery in *G. intestinalis* is apparently devoid of MMS19, Cdf1, Tah18 (see discussion above), and Dre2 proteins.

To investigate cellular localization of CIA proteins, corresponding genes were subcloned for epitope tagged protein expression in *Giardia* or specific antibodies were raised against them. While all CIA components share expected cytoplasmic distribution, several proteins displayed additional mitosomal distribution. In combination with co-precipitation techniques, two Nbp35 paralogues were identified on the surface of the mitosome and Cia2 protein is likely in intermembrane space of mitosome (Pyrih, unpublished data).

5. Conclusion

Giardia possesses minimalistic genomic sequence with just few introns and is known to possess simplified machinery for DNA replication, transcription, RNA processing, and most metabolic pathways (18). We were able to show that some proteins with unknown homology are present within the mitosome of *Giardia*. Therefore our data suggest that during the evolution of mitosome, loss of some mitochondrial genes and pathways happened simultaneously with invention of new *Giardia* specific proteins (16).

It is unknown whether ISC pathway in mitosome and CIA pathway in cytoplasm are connected, as Atm1 and Erv1 genes are absent (18). Therefore, it is possible that both pathways act independently. However, no cysteine desulfurase (possible sulfur donor for CIA) was identified in cytoplasm of *Giardia*. Moreover, Nbp35 proteins, which are initial CIA proteins were identified on the surface of the mitosome. Additionally, no essential Fe-S protein candidate apart from ISC pathway members itself was identified within the mitosome of *Giardia*. Therefore, it seems likely that mitosomal ISC pathway is connected with CIA for FeS cluster assembly in cytoplasm. Further research needs to be done to understand the possible interaction between ISC and CIA machineries in *Giardia*.

Moreover, our data demonstrated, that *Giardia* is able to import extracellular heme and incorporate it in the *cytb₅* type II proteins (14). This is the first report that heme is present within the eukaryotic anaerobic cell. Importantly, *cytb₅* type II represent a novel group of *cytb₅* proteins that are ubiquitous in both aerobes and anaerobes (14). However, the function of type II *cytb₅* is unknown and it has not been studied so far.

Seznam publikací / List of publications

- Martincová E., Voleman L., Pyrih J., Zarsky V., Vondrackova P., Kolisko M., Tachezy J., Dolezal P. **Probing the biology of *Giardia intestinalis* mitosomes using in vivo enzymatic tagging.** Molecular and Cellular Biology. 2015 Jun;35(16):2864-74.
- Pyrih J., Harant K., Martincová E., Sutak R., Lesuisse E., Hrdy I., Tachezy J. ***Giardia intestinalis* incorporates heme into cytosolic cytochrome b₅.** Eukaryot Cell. 2014 Feb;13(2):231-9.
- Jedelský P.L., Doležal P., Rada P., Pyrih J., Šmíd O., Hrdý I., Šedinová M., Marcinčíková M., Voleman L., Perry A.J., Beltrán N.C., Lithgow T., Tachezy J. **The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*.** PLoS One. 2011 Feb 24;6(2):e17285.

Unpublished data/ Nepublikovaná data

- Pyrih J., Martincová E., Kolisko M., Stojanovová D., Somsuvro B., Lukeš J., Roger A., Tachezy J. **Iron Sulphur cluster assembly in cytoplasm of anaerobic living protist *G. intestinalis*.** Manuscript in preparation.

Curriculum vitae

Jan Pyrih, MSc

Charles University, Prague,
Vinicna 7, Praha 2, 12844, Czech republic
jan.pyrih@gmail.com,
tel. +420728738010

Scientific Vita

- 2004-2015 Charles University in Prague, Faculty of Science
 - 2009-2015 Parasitology PhD program: "Iron-containing co-factors in the anaerobic parasite *Giardia intestinalis*"
 - 2007-2009 MSc: Parasitology: "Gene silencing in *Giardia intestinalis*"
 - 2004-2007 BSc: Biology
- 2009-2015 Graduate student researcher in laboratory of Molecular and Biochemical Parasitology, Charles University, Prague
- 2012 Participation at the seven week course "Biology of Parasitism", at the Marine Biological Laboratories (MBL), Woods Hole, USA
- 2011 Oct.-Dec Research stay in laboratory of Prof. Maria C.Touz, INIMEC, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Teaching Experience

- 2013 & 2014 **Teaching assistant** during Prof. Jan Tachezy's two week module of the "Biology of Parasitism" course at the Marine Biological Laboratories(MBL), Woods Hole, USA
- 2010- 2013 Teaching of a microscopy techniques course at Charles University

Funding, Grants and Awards

- 2015 Young attendant award, FeS 2015, Bergamo
- 2012-2013 Award from Czech literary fund trust in years (travel scholarship)
- 2013 Best oral presentation at Jirovec's Protozoological meeting, Czech republic, 2013
- 2010-2012 **Project lead researcher: GAUK153010:** Electron transfer and Iron/

- Sulfur clusters development in mitosome of parasitic protist *Giardia intestinalis*, 2010-2012, Grant agency of Charles University (GAUK)
- 2012 Fund of mobility UK (travel scholarship)
 - 2012 MBL scholarship for the 2012 course of **Biology of Parasitism**
 - 2009 Graduation with honors from the MSc study program

List of publications

- Martincova E., Voleman L., Pyrih J., Zarsky V., Vondrackova P., Kolisko M., Tachezy J., Dolezal P. **Probing the biology of *Giardia intestinalis* mitosomes using in vivo enzymatic tagging.** Molecular and Cellular Biology. 2015 Jun;35(16):2864-74.
- Pyrih J., Harant K., Martincova E., Sutak R., Lesuisse E., Hrdy I., Tachezy J. ***Giardia intestinalis* incorporates heme into cytosolic cytochrome b₅.** Eukaryot Cell. 2014 Feb;13(2):231-9.
- Jedelský P.L., Doležal P., Rada P., Pyrih J., Šmíd O., Hrdý I., Šedinová M., Marcinčíková M., Voleman L., Perry A.J., Beltrán N.C., Lithgow T., Tachezy J. **The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*.** PLoS One. 2011 Feb 24;6(2):e17285.
- Rada P., Šmíd O., Šuťák R., Doležal P., Pyrih J., Žárský V., Montagne J.J., Hrdý I., Camadro J.M., Tachezy J. **The monothiol single-domain glutaredoxin is conserved in the highly reduced mitochondria of *Giardia intestinalis*.** Eukaryot Cell. 2009 Oct;8(10):1584-91.e17285.

Meetings and presentations:

- **FeS 2015 - Iron Sulfur Cluster Biogenesis and Regulation**, Bergamo, Italy, 2015 (oral presentation: Cytosolic Iron/Sulphur cluster Assembly machinery in *Giardia intestinalis*)
- **International Giardia and Cryptosporidium Conference**, IGCC, Uppsala, Sweden, 2014 (oral presentation: Iron/Sulphur cluster Assembly machinery in *Giardia intestinalis*.)
- **International Congress of Protistology**, ICOP XIV, Vancouver ,Canada, 2013 (oral presentation: Heme in anaerobic parasite *Giardia intestinalis*.)

- **22nd Molecular Parasitology Meeting**, Woods Hole, USA, 2011 (poster: Cytochrome b5: heme binding protein in *Giardia intestinalis*.)
- **5th Short course for young parasitologists**, Hamgurg, Germany, 2011 (oral presentation: Unknown mitosomal protein of *Giardia intestinalis* and its possible role in controversial apoptosis.)

Seznam citací/ References

1. **Outten, C. E. and A. N. Albetel.** 2013. Iron sensing and regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Ironing out the mechanistic details. *Current Opinion in Microbiology* **16**:662-668.
2. **Makiuchi, T. and T. Nozaki.** 2014. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie* **100C**:3-17.
3. **Tovar, J., G. Leon-Avila, L. B. Sanchez, R. Sutak, J. Tachezy, M. van der Giezen, M. Hernandez, M. Muller, and J. M. Lucocq.** 2003. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* **426**:172-176.
4. **Stehling, O., A. A. Vashisht, J. Mascarenhas, Z. O. Jonsson, T. Sharma, D. J. A. Netz, A. J. Pierik, J. A. Wohlschlegel, and R. Lill.** 2012. MMS19 assembles Iron-Sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity. *Science* **337**:195-199.
5. **Kispal, G., P. Csere, C. Prohl, and R. Lill.** 1999. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *Embo Journal* **18**:3981-3989.
6. **Luo, D. X., D. G. Bernard, J. Balk, H. Hai, and X. F. Cui.** 2012. The DUF59 family gene AE7 acts in the cytosolic Iron-Sulfur cluster assembly pathway to maintain nuclear genome integrity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**:4135-4148.
7. **Awa, Y., N. Iwai, T. Ueda, K. Suzuki, S. Asano, J. Yamagishi, K. Nagai, and M. Wachi.** 2005. Isolation of a new antibiotic, alaremycin, structurally related to 5-aminolevulinic acid from *Streptomyces sp* A012304. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **69**:1721-1725.
8. **Ke, H. J., P. A. Sigala, K. Miura, J. M. Morrisey, M. W. Mather, J. R. Crowley, J. P. Henderson, D. E. Goldberg, C. A. Long, and A. B. Vaidya.** 2014. The heme biosynthesis pathway is essential for *Plasmodium falciparum* development in mosquito stage but not in blood stages. *Journal of Biological Chemistry* **289**:34827-34837.
9. **Lara, F. A., U. Lins, G. H. Bechara, and P. L. Oliveira.** 2005. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Journal of Experimental Biology* **208**:3093-3101.
10. **Rao, A. U., L. K. Carta, E. Lesuisse, and I. Hamza.** 2005. Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:4270-4275.

11. **Hernandez-Cuevas, N. A., C. Weber, C. C. Hon, and N. Guillen.** 2014. Gene expression profiling in *Entamoeba histolytica* identifies key components in iron uptake and metabolism. *Plos One* **9**.
12. **Rafferty, S., B. Luu, R. E. March, and J. Yee.** 2010. *Giardia lamblia* encodes a functional flavohemoglobin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **399**:347-351.
13. **Alam, S., J. Yee, M. Couture, S. J. Takayama, W. H. Tseng, A. G. Mauk, and S. Rafferty.** 2012. Cytochrome b(5) from *Giardia lamblia*. *Metalomics* **4**:1255-1261.
14. **Pyrih, J., K. Harant, E. Martincova, R. Sutak, E. Lesuisse, I. Hrdy, and J. Tachezy.** 2014. *Giardia intestinalis* incorporates heme into cytosolic cytochrome b(5). *Eukaryotic Cell* **13**:231-239.
15. **Jedelsky, P. L., P. Dolezal, P. Rada, J. Pyrih, O. Smid, I. Hrdy, M. Sedinova, M. Marcincikova, L. Voleman, A. J. Perry, N. C. Beltran, T. Lithgow, and J. Tachezy.** 2011. The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS.One*. **6**:e17285.
16. **Martincova, E., L. Voleman, J. Pyrih, V. Zarsky, P. Vondrackova, M. Kolisko, J. Tachezy, and P. Dolezal.** 2015. Probing the biology of *Giardia intestinalis* mitosomes using in vivo enzymatic tagging. *Molecular and Cellular Biology* **35**:2864-2874.
17. **Ramirez, P., H. Toledo, N. Giuliani, and C. A. Jerez.** 2002. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:1837-1845.
18. **Morrison, H. G., A. G. McArthur, F. D. Gillin, S. B. Aley, R. D. Adam, G. J. Olsen, A. A. Best, W. Z. Cande, F. Chen, M. J. Cipriano, B. J. Davids, S. C. Dawson, H. G. Elmendorf, A. B. Hehl, M. E. Holder, S. M. Huse, U. U. Kim, E. Lasek-Nesselquist, G. Manning, A. Nigam, J. E. J. Nixon, D. Palm, N. E. Passamanec, A. Prabhu, C. I. Reich, D. S. Reiner, J. Samuelson, S. G. Svard, and M. L. Sogin.** 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* **317**:1921-1926.