

**Charles University in Prague, Faculty of Science  
Department of Parasitology  
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta  
Katedra Parazitologie**

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

Summary of the Ph.D. Thesis  
Autoreferát disertační práce



**Proteomic Analysis of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome  
Proteomická analýza hydrogenosomů**

**Neritza Campo Beltrán**

Supervisor: Prof. Jan Tachezy, Ph.D.  
Školitel: Prof. Jan Tachezy, Ph.D.

**Prague, June 2016**



## ABSTRACT

*Trichomonas vaginalis* is a human pathogen that affects annually approximately 258 million people worldwide. This parasite possesses organelles of mitochondrial origin called hydrogenosomes, which generate ATP under anaerobic conditions. The identification of the protein content at the subcellular level may provide new targets for antiparasitic drugs developments as well as it contributes for our understanding of the organelles function and evolution. The availability of protocols for organelles purification and the complete genome sequence allow the study of the organellar proteomes using mass spectrometry and bioinformatics, providing a powerful strategy that combine cell biology and proteomics. In our research, we used several approaches to identify the protein composition in hydrogenosomes and mitosomes. We performed transcriptomic and proteomic analysis to investigate the molecular responses of *Trichomonas vaginalis* upon iron availability. Furthermore, the changes in the proteome during the development of metronidazole resistance were also studied. The organelles separated by differential and Optiprep-sucrose gradient centrifugation were analyzed with nano-RP-HPLC/MALDI-TOF/TOF. We also used Triton X-114 phase partitioning to separate membrane proteins and iTRAQ technique to label the peptides of the samples used for comparative proteomic analyses. In order to confirm the mitochondrion localization of the proteins, the data was analyzed using 5 different bioinformatic tools such as PSORT II, TargetP, Euk-mPLoc 2.0, Yloc and Hunter. The present study makes a significant contribution to understanding the overall organelles network.

## ABSTRAKT

*Trichomonas vaginalis* je lidský parazit, který ročně ohrožuje přibližně 258 milionů lidí. U tohoto parazita byla popsána organela mitochondriálního původu nazvaná hydrogenosom, která je schopná vytvářet energii v podobě ATP za anaerobních podmínek. Zkoumání a popisování nových proteinů, vyskytujících se v této organelce, může přispět k objevení nových cílů pro antiparazitární léčbu. Zároveň nám tento výzkum pomůže porozumět fungování a evolučnímu původu této odvozené organely. Dostupnost již popsaných protokolů pro izolaci hydrogenosomů společně s kompletně zmapovaným genomem *T. vaginalis* umožňuje studovat tyto organely pomocí moderních metod hmotnostní spektrometrie a bioinformatických analýz. V rámci našeho výzkumu jsme použili různé přístupy umožňující popsat proteiny v těchto organelách. Jednalo se o transkriptomické a proteomické analýzy zjišťující buněčnou odpověď parazita *T. vaginalis* na změny koncentrace železa v prostředí. A dále změny v obsahu proteinů hydrogenosomů u *T. vaginalis* rezistentních na metronidazol. Organely byly v obou případech izolovány pomocí diferenciální centrifugace gradientu OptiPrepu. Takto připravené hydrogenosomy byly analyzovány hmotnostním spektrometrem pomocí nano-RP-HPLC/MALDI-TOF/TOF. Zároveň jsme pomocí Tritonu X-114 oddělili membránové a matrixové proteiny a značením iTRAQ tyto frakce analyzovali. K potvrzení hydrogenosomální lokalizace identifikovaných proteinů jsme použili 5 různých bioinformatických programů jako PSORT II, TargetP, Euk-mPLoc 2.0, Yloc a Hunter. Tato studie přináší důležitý příspěvek k porozumění těchto organel.

## Contents / Obsah

### English version / anglická verze

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Aims of the study</b> .....	<b>2</b>
<b>Material and methods</b> .....	<b>3</b>
<b>Results and discussion</b> .....	<b>3</b>

### Czech version / česká verze

<b>Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>Cíle práce</b> .....	<b>10</b>
<b>Materiál a metodika</b> .....	<b>10</b>
<b>Výsledky a diskuse</b> .....	<b>11</b>
<b><u>References / Použitá literatura</u></b> .....	<b>14</b>
<b><u>Curriculum vitae</u></b> .....	<b>16</b>
<b><u>Selected publications / Seznam publikací</u></b> .....	<b>18</b>
<b><u>Financial support</u></b> .....	<b>19</b>



**English version / Anglická verze**

## INTRODUCTION

Mitochondria play a key role in iron metabolism. Iron is a component of catalytic and redox cofactors such as heme and iron-sulfur (Fe-S) clusters, prosthetic groups that are utilized by proteins in various critical processes. In addition to their well-established role in providing the cell with ATP, mitochondria are important for formation of iron-sulfur clusters as well as heme synthesis. The synthesis and insertion of Fe-S clusters to the apoproteins is mediated by iron sulfur cluster (ISC) assembly machinery (Smid et al., 2006; Lill and Kispal, 2000; Lill et al., 1999; Lill et al., 2005; Rouault and Tong, 2005). On the other hand, the steps leading to heme synthesis are distributed between the cytosol and mitochondria. While many of the intermediate steps are cytoplasmic, the first and last step of the synthesis takes place in the organelle. The process ends with the insertion of the ferrous iron into the porphyrin ring by the aid of the ferrochelatase enzyme (Camadro et al., 1988).

The human parasite *T. vaginalis* lacks the classical aerobic mitochondria. Instead, trichomonads possess an organelle of mitochondrial origin called hydrogenosome (Martin and Müller, 1998). Similarly to mitochondria, hydrogenosomes possess the multiprotein machinery responsible for iron-sulfur cluster biosynthesis (Šutak et al., 2004). Initial experiments in trichomonads have revealed the iron-dependent changes in enzyme activities and host cell interactions associated with pathogenicity (Vanáčová et al., 2001; Lehker et al., 1992; Arroyo et al., 1992; Alderete et al., 1995; Arroyo and Alderete, 1995; Garcia et al., 2003; Moreno-Brito et al., 2005). The most significant changes upon iron availability were observed in the expression of hydrogenosomal proteins, including the Fe-S and non-FeS proteins involved in energy metabolism (Vanáčová et al., 2001).

Trichomoniasis is a sexual transmitted disease (STD) caused by *T. vaginalis*. The infection has been efficiently treated with derivatives of the 5-nitroimidazoles although presence of resistant strains has been reported (Dunne et al., 2003; Kirkcaldy et al., 2012; Upcroft et al., 2009). The proteins involved in the activation of the drug to its toxic form localize to the hydrogenosome and it is in the organelle where metabolic changes leading to development of drug resistance take place (Kulda et al., 1984; Kulda et al., 1993; Brown et al., 1999), although alternative cytosolic flavin-based mechanism has been proposed (Leitsch et al., 2010).

*T. vaginalis* is the most extensively studied member of the Parabasala group. The genome sequence was published in 2007 (Carlton et al., 2007). Approximately 60 000



protein-coding genes were predicted, which opened new perspectives to study the metabolism of the parasite. This information has to be corroborated with research at the proteome level which will provide a more direct knowledge about biological processes.

In the present study we perform comparative proteomic analyses of highly purified hydrogenosomes from *T. vaginalis* grown under iron rich and iron depleted conditions. Protein levels were rigorously analyzed and the proteins were classified into groups according to their biological functions. The observed changes in protein levels were supported by a transcriptomic analysis. We identified 179 proteins, of which 58 were differentially expressed. Iron deficiency led to the upregulation of proteins involved in Fe-S cluster assembly and the downregulation of enzymes involved in carbohydrate metabolism.

In addition, a proteomic analysis of highly purified hydrogenosomes isolated from metronidazole-susceptible parent strain TV10-02 and from the *in vitro* developed resistant derivatives growing with 3, 5 and 100 µg/ml metronidazole (MR3, MR5, and MR100) was compared, to observe the changes in the expression during the development of metronidazole resistance in the parasite. From a total of 700 proteins identified, approximately 140 were hydrogenosomal proteins found in all cell lines. Changes in protein expression were rather low in MR3 and MR5 strains while the highly resistant strain MR100 displayed marked downregulation of the enzymes involved in energy and amino acid metabolism. In contrast, increased protein levels were observed for key components of ISC assembly machinery and for hydrogenase maturases. Interestingly, the highest increase was observed for hybrid cluster protein (HCP) which might be involved in scavenging of toxic products of nitrate metabolism including hydroxylamine. These data has not been published yet.

## AIMS OF THE THESIS

- To develop the method for isolation of highly purified hydrogenosomes and mitosomes from *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis* respectively.
- To compare the gene expression in *Trichomonas vaginalis* cultivated under different iron level.
- To analyze iron-dependent changes in the proteome of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome using mass spectrometry.

- To investigate changes in the proteome of *Trichomonas vaginalis* strains during *in vitro* induction of resistance to metronidazole.

## MATERIALS AND METHODS

The materials and methods that were used in the present work are described in detail in the publications that are part of this study.

- The following is a short description of the materials and methods that were used:
- Cell Fractionation and organelles Isolation using Optiprep-sucrose gradient
- Transmission electron microscopy for the identification of the highly-purified organellar fraction.
- SDS electrophoresis and western blot analysis of cellular fractions.
- Spectrophotometric determinations of enzymatic activities in cellular fractions of *T. vaginalis* and *G. intestinalis*
- Protein Digestion and iTRAQ Labeling
- Isoelectric Focusing, Extraction and HPLC
- Mass spectrometry
- Proteomic data analysis based on protein BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) and hidden Markov models (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) and five different bioinformatic tools for subcellular localization ((PSORT II, TargetP, EukmPLoc 2.0, and Yloc and Hunter) were used to verify hydrogenosomal localization and manually edit TrichDB annotations.
- Cloning and preparation of recombinant proteins (Unpublished data)
- Immunofluorescence analysis of *T. vaginalis* cells. (Unpublished data)

## RESULTS AND DISCUSSION

The effect of iron in the gene expression of the human parasite *T. vaginalis* was studied by comparative transcriptomic and proteomic analysis using cells cultured in the presence and absence of iron. The role of iron in the protein expression of *T. vaginalis* was

consistent in the results of both analyzes. Previous studies had shown that iron availability significantly affects the pathogenicity of the parasite and the expression of genes encoding proteins involved in energy metabolism. The aim of these studies was to show in more depth the gene regulation and thus to understand the adaptive capacity of *T. vaginalis* under iron rich and iron restricted conditions. In our first experiment, we observed iron regulation in 308 genes using DNA microarrays and 336 genes using EST library sequencing. In both methods, it was observed that approximately 50% of the genes were upregulated in iron enriched conditions while the other 50% were upregulated under iron restricted conditions. Genes that showed upregulation in the presence of iron, were those involved in carbohydrate metabolism both in the cytosol and the hydrogenosome, and also the genes involved in the catabolism of methionine. In the absence of iron, there was upregulation of the components of the ISC assembly machinery and various cysteine proteases. It was observed the differential expression of individual copies of the expanded gene group showing that not all of the copies were affected by iron. From this, one could deduce that the gene duplication observed in *T. vaginalis* genome sequence could be a strategy of the parasite to respond and adapt efficiently to the constant changes in its natural habitat.

Proteomic analysis was conducted specifically in hydrogenosomes of *T. vaginalis*. Data was analyzed based on protein expression under iron restricted conditions, for which hydrogenosomes from cells cultured in the presence of iron were taken as a control. The hydrogenosomal proteome confirmed the data obtained in our transcriptomic study. We have identified 179 proteins, of which 58 were differentially expressed. Iron deficiency showed upregulation of proteins involved in ISC assembly machinery and downregulation of proteins involved in carbohydrate metabolism. We confirmed that iron affects the expression of only some of the multiple protein paralogues while the expression of others was iron independent. We can conclude that changes in protein expression in components of the iron-sulfur cluster assembly machinery and energy metabolism are an adaptative mechanism of the parasite in response to the lack of iron. Hydrogenosomal Fe-S proteins with a role in pyruvate catabolism are downregulated to minimize the iron needs while the machinery for ISC assembly maximized its function for the efficient Fe-S clusters formation which is necessary for the core metabolism in the organelle.

In addition, we observed that components involved in oxidative stress protection were affected by iron availability as well. Two thioredoxins and one protein with homology to bacterial OsmC which was recently found involved in detoxification of peroxides were upregulated, while the Fe-containing proteins, rubrerythrin and superoxide dismutase were

downregulated under iron depleted conditions. One paralogue of the bacterial-type FeS flavoprotein with a role in hydrogen peroxide and oxygen detoxification was downregulated too. Interestingly, one of the two detected homologues of the  $\beta$ -barrel protein Hmp35 was significantly downregulated under iron restricted conditions. This protein has been detected only in hydrogenosomes of *T. vaginalis* and a role as an iron transporter has been suggested.

In another series of experiments, we compared the protein expression in hydrogenosomes of *T. vaginalis* from a metronidazole-sensitive strain and three strains with *in vitro* developed metronidazole resistance. Protein expression in the highly metronidazole resistant strain (MR100) revealed similar changes when compared with the parent strain as that found in trichomonads that were grown under iron depleted conditions. ISC assembly machinery was upregulated in the MR100 strain whereas the enzymes from the carbohydrate metabolism were downregulated. Interestingly, two homologues of the hybrid cluster protein (HCP) were identified among the most upregulated proteins in MR100. This protein catalyzes reduction of hydroxylamine and thus it might be involved in the detoxification of toxic products from the nitrogen metabolism including the metronidazole. Another interesting protein is an unknown protein with a RIC and ScdA domain, which was significantly upregulated in MR100. The protein is similar to the bacterial protein FeS\_repair\_RIC, iron-sulfur cluster repair di-iron protein. The protein in bacteria is stimulated by nitrosative stress and iron starvation. Additionally, RIC protein has homology with the ScdA protein identified in *Staphylococcus aureus*, which participate in cell wall biosynthesis and could be involved in drug resistance by increasing the cell wall permeability or the efflux pumps of active drugs. However, the role of this protein in *T. vaginalis* remain to be elucidated. HCP and the unknown protein with the RIC domain did not reveal a significant regulation under iron depleted conditions.

In a different experiment we have demonstrated that the hydrogenosome of *T. vaginalis* does not possess Alternative 2-keto acid oxidoreductases (KORs) as it was reported in a previous study. It has been suggested that the protein could replace the activity of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (PFOR) in metronidazole-resistant trichomonads. We used a standard assay with methyl viologen as an acceptor but we were unable to detect this activity in metronidazole-resistant cells lacking PFOR. We have concluded that the KOR activity was caused by the non-enzymatic reduction of the indicator dye, nitroblue tetrazolium, by indolepyruvate, which is facilitated by Triton X-100 used to prepare the membrane fractions. Therefore the low level indolepyruvate-dependent activity that is present in *T. vaginalis* strains sensitive to metronidazole is catalyzed by PFOR.

We have carried out an experiment to identify the hydrogenosomal membrane proteins in *T. vaginalis*. The data revealed some homologues of the mitochondrial membrane transporters and other functional components that are necessary for the organelle biogenesis. These findings corroborate a common origin for hydrogenosomes and mitochondria from an ancestral symbiont. However, important differences between the hydrogenosomal and mitochondrial membrane machineries were also observed.

We have identified proteins from the outer membrane of the hydrogenosomes, some of them do not present homology with the mitochondrial counterparts; this is the case of the 12 monotopic C-tailed anchored proteins identified. In addition, components of SAM and TOM complex were found too and 4 isoforms of  $\beta$ -barrel proteins HMP35 and HMP36 which were found exclusively in hydrogenosomes of *T.vaginalis*, so far. A cystein motif at the C-terminus of HMP35 with predicted role in metal transport makes this protein a suitable candidate for iron transport to supply the need of iron for Fe-S cluster formation in the organelle. An important difference between mitochondrial and hydrogenosomal membrane proteins is the absence of N-terminal signal-anchor sequences in the hydrogenosomal membrane proteins. In the study we did not identify clear homologues of the VDAC protein family, hence the metabolite exchange across the membrane of *T.vaginalis* hydrogenosomes is probably carried out by Tom40.

Components of the TIM and PAM complex from inner hydrogenosomal membrane were revealed. Five homologues of the MCF carriers were found but apparently they are all involved in ADP/ATP transport across the membranes, which make us wonder how other metabolites, such as pyruvate or amino acids are transported.

Mia40 and Erv1 were not found in the proteome. This is consistent with the analyses of the genome of *T. vaginalis* that did not detect genes coding for these two proteins.

Additionally, 58 unknown membrane proteins were identified, these proteins could be highly divergent from the mitochondrial homologues and this could avoid its recognition by the bioinformatic tools, although it is possible that these proteins are unique to the hydrogenosome of *T. vaginalis*.

The mitosomal proteome of *Giardia intestinalis* revealed an important reduction of the protein content in the organelle by comparison with hydrogenosomes and mitochondria. We have identified 139 proteins using mass spectrometry and 20 of them were experimentally localized in the mitosomes. The analysis revealed the presence of components of the ISC assembly machinery including IscS, IscA, IscU, Nfu and Glutaredoxin. It was shown that just a few components of the protein import machineries are present in the mitosomal membranes of

*G. intestinalis*. Tom40, Pam 16/18 and molecular chaperones have been identified so far and we could not identify homologues of Sam50, Tim17/22/23 or VDAC protein family. It is a very intriguing matter to know how the organelle assembles Tom40 channel, transport matrix proteins and exchange metabolites in the absence of these components.

Based on these findings it is possible to conclude that ISC assembly machinery is the only known function of the organelle; however any MCF carrier that could be involved in ADP/ATP transport was not found and hence it is not clear how the mitosomes of *G. intestinalis* could obtain the energy necessary for Fe-S cluster assembly, organelle replication and protein import. It is also unclear if the mitosomes export a product necessary for cytosolic Fe-S cluster assembly as in other organisms since Atm1 and Erv1 transporters were not identified.

Altogether, our studies significantly contributed to the understanding of the evolution of hydrogenosomes and mitosomes, anaerobic forms of mitochondria in *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, respectively. Our results provide basis for the study of the expression of multiple gene families under different environmental conditions and we give clues for the better understanding of the development of metronidazole resistance in anaerobic parasites.

**Czech version / Česká verze**

## ÚVOD

Mitochondrie jsou organely endosymbiotického původu, které jsou významnou součástí skoro každé eukaryotické buňky. Hrají důležitou roli v energetickém metabolismu, vytváření železo-sirných (Fe-S) center a podílejí se na syntéze hemu. Železo, jakožto součást katalytických a redoxních kofaktorů v hemu a Fe-S centrech, je důležitou součástí mnoha mitochondriálních procesů. Syntézu a vkládání Fe-S center do apoproteinů zajišťuje speciální mitochondriální ISC dráha (Smid et al., 2006; Lill and Kispal, 2000; Lill et al., 1999; Lill et al., 2005; Rouault and Tong, 2005). Přestože se řada mezikroků syntézy hemu odehrává v cytosolu, první a poslední krok se nachází vždy v mitochondrii. Proces syntézy hemu je ukončen vložením železnatého iontu do porfyrinového kruhu enzymem ferrochelatázou (Camadro et al., 1988).

Lidský parazit *T. vaginalis* postrádá klasické mitochondrie. Místo nich u něj byly objeveny organely mitochondriálního původu nazvané hydrogenosomy (Martin and Müller, 1998). Podobně jako u mitochondrií, i u hydrogenosomů nacházíme ISC dráhu syntetizující Fe-S centra (Šutak et al., 2004). První pokusy u trichomonád ukázaly změnu enzymatických aktivit a patogenicity v závislosti na přítomnosti železa (Vanáčová et al., 2001; Lecker et al., 1992; Arroyo et al., 1992; Alderete et al., 1995; Arroyo and Alderete, 1995; Garcia et al., 2003; Moreno-Brito et al., 2005). Nejvýznamnější změny závislé na množství železa byly pozorovány u produkce hydrogenosomálních proteinů obsahujících Fe-S centra a účastnících se energetického metabolismu (Vanáčová et al., 2001).

Trichomoniáza je sexuálně přenosné onemocnění (STD) způsobované prvokem *T. vaginalis*. Toto onemocnění se nejčastěji léčí deriváty 5-nitroimidazolu. Avšak rezistentní kmeny *T. vaginalis* již byly hlášeny (Dunne et al., 2003; Kirkcaldy et al., 2012; Upcroft et al., 2009). Proteiny účastnící se aktivace neaktivního léčiva v aktivní toxin se nachází právě v hydrogenosomu. Změny těchto metabolických drah vedou ke vzniku rezistence (Kulda et al., 1984; Kulda et al., 1993; Brown et al., 1999), přestože alternativní cytosolická dráha aktivující neúčinnou drogu byla také popsána (Leitsch et al., 2010).

*T. vaginalis* je nejvíc studovaný zástupce skupiny Prabasala. Genom *T. vaginalis* byl publikován v roce 2007 (Carlton et al., 2007). V genomu bylo predikováno přibližně 60 000 genů kódující proteiny, což podnítilo další studium metabolických drah tohoto parazita. Množství navrhovaných proteinů však musí být ještě potvrzeno pomocí proteomické analýzy. V této studii jsme se zabývali srovnávací proteomickou analýzou izolovaných hydrogenosomů z *T. vaginalis* rostoucí v prostředí se zvýšenou a sníženou koncentrací železa.



Identifikované proteiny byly rozříděny do skupin podle jejich biologické funkce. Pozorované změny na proteinové úrovni byly podpořeny transkriptomickou analýzou. Identifikovali jsme zde 179 proteinů, z nichž 58 se vyznačovalo rozdílnou expresí. Snížení železa v kultivačním médiu vedlo ke zvýšené produkci proteinů obsahující Fe-S centra a ke snížení produkce enzymů účastnících se karbohydrátového metabolismu.

Proteomická analýza izolovaných hydrogenosomů z kmenu trichomonád ne-rezistentních na metronidazol (TV10-02) a jejich in vitro vytvořených rezistentních linií rostoucích při 3, 5 a 100 µg/ml metronidazolu (MR3, MR5, MR100) prokázala změny v expresi v průběhu vytváření rezistence. Z celkově identifikovaných 700 proteinů, bylo přibližně 140 proteinů nalezeno ve všech liniích. Hlavní změny exprese byly pozorovány u málo rezistentních linií MR3 a MR5 v porovnání s vysoce rezistentní linií MR100. Jednalo se zejména o sníženou expresi enzymů účastnících se energetického metabolismu a metabolismu aminokyselin u vysoce rezistentní MR100. Naopak zvýšená produkce byla popsána u komponent ISC dráhy a enzymů pomáhajících skládat aktivní centrum enzymu hydrogenázy. Nejvýznamnější zvýšení exprese bylo zaznamenáno u „hybrid cluster protein“ (HPC), který se ta může významně podílet na odstraňování toxických produktů nitrátového metabolismu včetně hydroxylaminu. Tyto data nebyla ještě publikována.

## CÍLE PRÁCE

- Vyvinout metodu pro izolaci vysoce-čistých hydrogenosomů a mitosomů u *T. vaginalis* a *Giardia intestinalis*.
- Porovnat genovou expresi trichomonád pěstovaných v různých koncentracích železa.
- Analyzovat změny v proteonu *T. vaginalis* související se změnami železa pomocí hmotnostní spektrometrie.
- Porovnat změny u proteinů *T. vaginalis* při vývoji rezistence na metronidazol.

## MATERIÁLY A METODY

Materiály a metody jsou podrobně popsány v originálních publikacích, pouze v krátkosti byly použity zejména tyto metody:

- Buněčná frakcionace a izolace organel pomocí gradientu Optiprepu.
- Transmisní elektronová mikroskopie pro identifikaci vysoce-čisté hydrogenosomální frakce
- SDS elektroforéza a western blotová analýza frakcí
- měření aktivit vybraných enzymů v buněčných frakcích *T. vaginalis* a *G. intestinalis*
- iTRAQ značení
- isoelektrická fokusace, extrakce a HPLC
- hmotnostní spektrometrie
- analýza proteomických dat pomocí BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) a hidden Markova modelu (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). 5 různých bioinformatických modelů pro určení buněčné lokalizace (PSORT II, TargetP, EukmPLoc 2.0, and Yloc and Hunter) bylo použito pro potvrzení hydrogenosomální lokalizace. Proteiny byly manuálně editovány také v TrichDB.
- Klonování a příprava rekombinantních proteinů (nepublikovaná data)
- Imunofluorescenční mikroskopie u *T. vaginalis* (nepublikovaná data)

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Efekt železa na genovou expresi u parazita *T. vaginalis* byl zkoumán pomocí srovnávací transkriptomické a proteomické analýzy. V pokusech byly použity kultury parazita rostoucí ve snížené a normální koncentraci železa. Účinek železa na expresi proteinů u *T. vaginalis* byl shodný u obou analýz. Předchozí studie ukázali, že železo významně ovlivňuje patogenicitu parazita a expresi genů kódujících proteiny energetického metabolismu. Cíl naší studie byl ukázat ve hlubším detailu regulaci genů a tím porozumět schopnosti parazita přizpůsobovat se měnícím se podmínkám v závislosti na koncentraci železa v okolí. V prvních pokusech jsme pomocí DNA microarrays pozorovali změnu u 308 genů a pomocí sekvenování cDNA knihovny u 336 genů. U obou použitých metod jsme zaznamenali zvýšenou expresi u přibližně 50% genů v podmínkách zvýšené koncentrace železa. Jednalo se zejména o geny účastnící se karbohydrátového metabolismu v cytosolu i hydrogenosomech a dále o geny podílející se na katabolismu methioninu. V podmínkách snížené koncentrace železa byla zvýšená exprese u dalších 50% genů. A to zejména u proteinů ISC dráhy a různých cysteinových proteáz. Také byla pozorována rozdílná exprese

jednotlivých kopií daného genu, což ukazuje že ne všechny kopie daného genu byly ovlivněny koncentrací železa stejnoměrně. Z toho lze usoudit, že genová duplikace, která je abnormálně rozsáhlá právě u *T. vaginalis*, může být jednou ze strategií parazita jak se přizpůsobit měnícím se podmínkám prostředí.

Proteomická analýza byla zkoumána na izolovaných hydrogenosomech *T. vaginalis* rostoucích při snížené a normální koncentraci železa. Hydrogenosomální proteom potvrdil data získaná z transkriptomických studií. Identifikovali jsme 179 proteinů z nichž 58 mělo změněnou úroveň exprese. U hydrogenosomů izolovaných z parazita rostoucího za snížené koncentrace železa měli zvýšenou expresi proteiny účastníci se ISC dráhy, zatímco proteiny karbohydrátového metabolismu měly expresi sniženou. Potvrdili jsme tak, že železo ovlivňuje pouze určité proteinové paralogy, zatímco ostatní nejsou ovlivněny vůbec. Z toho lze usoudit, že proteiny ISC dráhy a energetického metabolismu jsou součástí mechanismu umožňujícímu přizpůsobení se parazita snížené koncentraci železa v prostředí. Exprese hydrogenosomálních proteinů obsahujících Fe-S centra a účastnících se metabolismu pyruvátu je za těchto podmínek snížena na minimum, zatímco exprese proteinů ISC dráhy (produkující Fe-S centra) je maximálně zvýšená.

Také proteiny účastníci se ochrany proti oxidativního stresu jsou ovlivněny přítomností železa. U dvou thioredoxinů a jednoho bakteriálního homologu proteinu OsmC (který se podílí na detoxifikaci peroxidu) jsme zaznamenali zvýšenou expresi, zatímco proteiny s podílem Fe-S center (jako je rubrerytrin, superoxid dismutáza a jeden paralog bakteriálního Fe-S flavoproteinu) měli expresi sniženou. Zároveň i jeden ze dvou paralogů proteinu Hmp35 obsahujícího  $\beta$ -barel měl významně sniženou expresi. Tento protein by se mohl podílet na transportu železa do hydrogenosomů *T. vaginalis*.

V další sérii experimentů jsme zkoumali expresi proteinů ovlivněnou rezistencí k metronidazolu. Proteinová exprese u vysoce rezistentního kmene *T. vaginalis* (MR100) vykazovala podobné změny jako u trichomonád rostoucích ve snížené koncentraci železa. Proteiny ISC dráhy měli zvýšenou expresi, zatímco u proteinů karbohydrátového metabolismu byla exprese snižená. Dva paralogy proteinu „hybrid cluster protein“ (HCP) měli také zvýšenou expresi u kmene MR100. Tento protein se podílí na likvidaci toxických produktů dusíkového metabolismu zahrnujícího i metronidazol. Dalším významně produkovaným a zajímavým proteinem u kmene MR100 je protein s RIC a ScdA doménami, který je podobný bakteriálním proteinům „FeS\_repair\_RIC“ účastníci se opravných procesů ISC dráhy a který se u *Staphylococcus aureus* podílí na syntéze buněčné stěny a mohl by se

tak účastnit i vzniku rezistence proti léčivům. Bohužel role těchto proteinů u *T. vaginalis* není zatím prozkoumána.

V dalších pokusech jsme ukázali, že hydrogenosomy *T. vaginalis* neobsahují alternativní 2-keto oxidoreduktázu (KORs), přestože to bylo v předchozích studiích naznačeno. Bylo navrženo, že tento enzym může nahradit funkci pyruvát: ferredoxin oxidoreduktázy (PFOR) u metronidazol-rezistentních kmenů. V našem pokusu jsme použili klasickou biochemickou metodu měření aktivity pomocí methyl viologenu jako elektronového akceptoru u metronidazol-rezistentních kmenů. Zde jsme prokázali, že předchozí měřená aktivita KOR byla způsobena ne-enzymovou redukcí indikátoru „nitroblue tetrazolium“ v přítomnosti indolpyruvátu. Nízká aktivita pozorovaná u rezistentních kmenů byla způsobena enzymem PFOR.

V dalších pokusech jsme identifikovali proteiny hydrogenosomálních membrán u *T. vaginalis*. Naše data, kde jsme popsali homology transportérů mitochondriálních membrán a dalších komponent pro biogenesi, podporují společný evoluční původ mitochondrie a hydrogenosomů. Mezi popsané mitochondriální homology patří komponenty SAM a TOM. Některé proteiny z vnější hydrogenosomální membrány neukazují podobnost s mitochondriálními proteiny např. 12 „C-tailed“ proteinů nebo 4 isoformy proteinu Hmp35 a Hmp36, které by se mohly účastnit transportu železa v buňce *T. vaginalis*. Významným rozdílem mezi mitochondriálními a hydrogenosomálními membránovými proteiny je absence N-terminálních sekvencí u hydrogenosomálních membránových proteinů. Zároveň jsme neobjevili žádné homology proteinové rodiny VDAC, přestože je přítomen transportér Tom40. Dále jsme popsali komponenty TIM a PAM vnitřní hydrogenosomální membrány a dále 5 homologů MCF transportérů, které ale pravděpodobně účastní ADP/ATP transportu přes membránu. Proteiny Mia40 a Erv1 nebyly nalezeny, což odpovídá genomickým datům, kde žádné podobné geny nebyly také popsány. Zároveň jsme našli dalších 58 neznámých membránových proteinů, které by mohly být unikátní pro hydrogenosomy.

Mitosomální proteom *G. intestinalis* ukázal významnou redukci proteinů ve srovnání s hydrogenosomy a mitochondriemi. Pomocí hmotnostní spektrometrie jsme popsali 139 proteinů, z nichž 20 bylo experimentálně lokalizováno do mitosomu *G. intestinalis*. Potvrdili jsme přítomnost proteinů pro ISC dráhu (IscS, IscA, IscU, Nfu a glutaredoxin), několika membránových transportérů (Tom40, Pam 16/18) a molekulárních chaperonů. Objeveny však nebyli homology Sam50, Tim17/22/23 nebo VDAC proteiny. Takže zůstává otázkou jak mitosom může fungovat bez těchto důležitých komponent.

Na základě těchto zjištění můžeme říci, že ISC dráha pro syntézu Fe-S center je jediná funkce mitosomů *G. intestinalis*. Žádný homolog MCF proteinu zajišťující ADP/ATP přenos nebyl identifikován, takže není jasné jak mitosomy získávají energii pro formování Fe-S center nebo vlastní dělení. Také není jasné jak mitosomy exportují Fe-S centra do cytosolu, když nebyly identifikovány homology Atm1 a Erv1.

Přes tyto nejasnosti, naše studie přinesla významné informace o anaerobních formách mitochondrií: hydrogenosomech a mitosomech u parazitů *T. vaginalis* a *G. intestinalis*, stejně ta jako vlivu prostředí na expresi jednotlivých genů a porozumění vzniku rezistence na metronidazol.

### **REFERENCES/ POUŽITÁ LITERATURA**

- Alderete JF, O'Brien JL, Arroyo R, Engbring JA, Musatovova O, Lopez O, Lauriano C, Nguyen J. (1995) Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol Microbiol.* 1:69-83.
- Arroyo R, Alderete JF. (1995) Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Arch Med Res.* 3:279-85
- Arroyo R, Engbring J, Alderete JF. (1992) Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol.* 7:853-62.
- Brown DM, Upcroft JA, Dodd HN, Chen N, Upcroft P. (1999) Alternative 2-keto acid oxidoreductase activities in *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol.* 98(2):203-14.
- Camadro, J. M., and P. Labbe. 1988. Purification and properties of ferrochelatase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a precursor form of the protein. *J. Biol. Chem.* 263:11675-11682.
- Carlton, J.M., Hirt, R.P., Silva, J.C., Delcher, A.L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J.R., Bidwell, S.L., Alsmark, U.C., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C.J., Dacks, J.B., Foster, P.G., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G.J., Westrop, G.D., Müller M., S., Dessi, D., Fiori, P.L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F.D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M.T., Hayes, R.D., Mukherjee, M., Okumura, C.Y., Schneider, R., Smith, A.J., Vanáčová, S., Villalvazo, M., Haas, B.J., Perlea, M., Feldblyum, T.V., Utterback, T.R., Shu, C.L., Osoegawa, K., de Jong, P.J., Hrdý, I., Horváthová, L., Zubacova, Z., Doležal, P., Malik, S.B., Logsdon, J.M., Jr., Henze, K., Gupta, A., Wang, C.C., Dunne, R.L., Upcroft, J.A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S.L., Tang, P., Chiu, C.H., Lee, Y.S., Embley, T.M., Coombs, G.H., Mottram, J.C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C.M., and Johnson, P.J. (2007). Draft

- genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315, 207-212.
- Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, O'Donoghue PJ, Upcroft JA (2003) Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Res* 132:239–249.
- Garcia AF, Chang TH, Benchimol M, Klumpp DJ, Lehker MW, Alderete JF (2003) Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol.* 2003 5:1207-24.
- Kirkcaldy, R.D. et al. (2012) *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD Surveillance Network, 2009–2010. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 939–943.
- Kulda J, Cerkasov J, Demes P, Cerkasovová A.(1984) *Trichomonas foetus*: stable anaerobic resistance to metronidazole in vitro. *Exp Parasitol.*1:93-103.
- Kulda J, Tachezy J, Čerkasovová A. (1993) In vitro induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *J Eukaryot Microbiol.* 3:262-9.
- Lehker MW, Alderete JF (1992) Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Mol Microbiol* 6: 123–132.
- Leitsch D, Kolarich D, Duchêne M. (2010) The flavin inhibitor diphenyleneiodonium renders *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole, inhibits thioredoxin reductase and flavin reductase, and shuts off hydrogenosomal enzymatic pathways. *Mol Biochem Parasitol.* 171(1):17-24.
- Leitsch D, Janssen BD, Kolarich D, Johnson PJ, Duchêne M. (2014) *Trichomonas vaginalis* flavin reductase 1 and its role in metronidazole resistance. *Mol. Microbiol.* 91(1): 198-208.
- Lill R & Muhlenhoff U. (2005) Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 30, 133-141
- Lill R, Diekert K, Kaut A, Lange H, Pelzer W, Prohl C, Kispal G. (1999). The essential role of mitochondria in the biogenesis of iron-sulfur proteins. *Biol Chem.* 380(10):1157-66.
- Lill R, Kispal G. (2000). Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 25(8):352-6. Review.
- Martin W, Müller M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature.* 392(6671):37-41.
- Moreno-Brito V, Yáñez-Gómez C, Meza-Cervantez P, Avila-González L, Rodríguez MA, Ortega-López J, González-Robles A, Arroyo R. (2005) A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cell Microbiol.* 2:245-58.

- Rouault TA, Tong WH. (2005) Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(4):345-51.
- Smid, O., E. Horakova, V. Vilimova, I. Hrdý, R. Cammack, A. Horvath, J. Lukes, and J. Tachezy. 2006. Knock-downs of iron-sulfur cluster assembly proteins IscS and IscU down-regulate the active mitochondrion of procyclic *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 281:28679-28686.
- Šutak, R., P. Doležal, H. L. Fiumera, I. Hrdý, A. Dancis, M. Delgadillo-Correa, P. J. Johnson, M. Müller, and J. Tachezy (2004). Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:10368-10373.
- Upcroft, J.A. et al. (2009). Metronidazole resistance in *Trichomonas vaginalis* from highland women in Papua New Guinea. *Sex. Health* 6,334–338 50
- Vanáčová S, Rasoloson D, Rázga J, Hrdý I, Kulda J, Tachezy J. (2001) Iron-induced changes in pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and involvement of iron in expression of hydrogenosomal proteins. *Microbiology.* 147(Pt 1):53-62.

## **CURRICULUM VITAE**

**Mgr. Neritza Campo Beltrán**

**Date and place of birth**

11.10.1972, Bogotá – Colombia

**Address**

Laboratory of Molecular and Biochemical Parasitology Department of Parasitology Faculty of Science Charles University in Prague Viničná 7, 128 44 Prague 2, Czech republic.

**ACADEMIC EDUCATION**

**Charles University in Prague**

To Date

Postgraduate student and researcher at the department of parasitology, Faculty of Science.

Prague – Czech Republic

**Pontificia Universidad Javeriana**

August 1997

Master Degree: Microbiology

Bogotá – Colombia

**Colegio de la presentación Sans Facon**

December 1990

Degree: Bachelors

Bogotá - Colombia

**OTHER COURSES**

**Sample preparation/Two dimensional electrophoresis workshop**

Biorad

Prague – Czech Republic

**Progress in molecular biology and genetics**

Academy of Science

Prague – Czech Republic

**Computational Genomics**

Charles University in Prague

Prague – Czech Republic

**CONFERENCES**

**4th International Conference on Anaerobic Protist – ICAP 2008**

Poster Presentation

Taoyuan –Taiwan

May 12–16, 2008.

**International Congress of Protozoology – ICOP 2009**

Oral Presentation



Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brazil

August 23-28, 2009

**60th annual meeting of the International Society of Protistologist – ISOP 2010**

Poster Presentation

Canterbury- UK

July 18-24, 2010.

**XX Congreso Latinoamericano de Parasitología y XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical**

Poster Presentation

Bogota – Colombia

September 27th – October 1st, 2011.

**SELECTED PUBLICATIONS / SEZNAM PUBLIKACÍ**

**Beltrán NC**, Horváthová L, Jedelský PL, Sedinová M, Rada P, Marcinčíková M, Hrdý I, Tachezy J. (2013) **Iron-induced changes in the proteome of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes.** PLoS One. 5:e65148.

Horváthová L, Šafariková L, Basler M, Hrdý I, **Campo NB**, Shin JW, Huang KY, Huang PJ, Lin R, Tang P, Tachezy J (2012) **Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated *Trichomonas vaginalis* genome.** Genome Biol Evol. 10:1017-29.

Rada P, Doležal P, Jedelský PL, Bursac D, Perry AJ, Šedinová M, Smíšková K, Novotný M, **Beltrán NC**, Hrdý I, Lithgow T, Tachezy J. (2011) **The core components of organelle biogenesis and membrane transport in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*.** PLoS One. 9:e24428.

Jedelský PL, Doležal P, Rada P, Pyrih J, Smíd O, Hrdý I, Sedinová M, Marcinčíková M, Voleman L, Perry AJ, **Beltrán NC**, Lithgow T, Tachezy J. (2011) **The minimal proteome in**

**the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*.** PLoS One. 2:e17285.

Zedníková V, **Beltrán NC**, Tachezy J, Hrdý I. (2012) **Alternative 2-keto acid oxidoreductases in *Trichomonas vaginalis*: artifact of histochemical staining.** Mol Biochem Parasitol. 1:57-9.

#### **UNPUBLISHED DATA**

**Beltrán NC**, Jedelský P, Šedinová M, Smutná T, Šutak R, Hrdý I and Tachezy J. **Changes of hydrogenosomal proteomes during development of metronidazole resistance in *Trichomonas vaginalis*.**

#### **FINANCIAL SUPPORT**

This work was supported by the Czech Ministry of Education (MSM 0021620858) and Charles University in Prague (UNCE 204017).



