

**Charles University in Prague, Faculty of Science**  
**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta**

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

Summary of the Ph.D. thesis/autoreferát dizertační práce



**Mgr. Eva Pyrihová**

Charakterizace importu proteinů do mitosomů *Giardia intestinalis*  
Characterization of the protein import into *Giardia intestinalis* mitosomes

Supervisor/Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Prague, 2017

## OBSAH/CONTENT

**Abstrakt**.....3

**Abstract**.....4

Česká část:

1. Úvod.....6

2. Cíle práce.....6

3. Materiál a metodika.....7

4. Výsledky a diskuze.....7

5. Závěr.....10

English part:

1. Introduction .....12

2. Aims of the study .....12

3. Materials and methods .....13

4. Results and discussion.....13

5. Conclusions .....16

**Seznam publikací/list of publications** .....17

**Curriculum vitae** .....17

**Použitá literatura/References** .....19

## ABSTRAKT

Pohlčení eubakterie a její přeměna v mitochondrii je klíčovým okamžikem v evoluci eukaryot. Jejich proteom se postupně vyvinul v jedinečnou kombinaci původních bakteriálních komponent s eukaryotickými evolučními novinkami. Dnes můžeme u eukaryot najít obrovskou variabilitu mitochondriálních forem – od klasických mitochondrií s křisty a složitým proteinovým systémem pro údržbu vlastního genomu přes hydrogenosomy se schopností produkovat molekulární vodík a konečně mitosomy, které zcela ztratily jak genom, tak většinu původních mitochondriálních funkcí a proteinů.

Srovnávání různých podob dnešních mitochondrií můžeme použít pro studium jejich evoluce. Jejich jedinými společnými znaky jsou dvojitá membrána, syntéza železo-sírných center pomocí ISC dráhy a centrální komponenty dráhy pro import proteinů. Proto předpokládáme, že právě tyto znaky představují původní a nezbytné vlastnosti mitochondrií. Mitosomy parazitických protist byly objeveny u zcela nepříbuzných druhů, vznikly tedy nezávisle a přesto byly u všech zachovány podobné proteiny mitochondriálního importu. Tyto komponenty jsou proto považovány za esenciální a nenahraditelné. Import proteinů do mitosomů byl dlouhou dobu považován za zcela minimalistický. Nicméně nejnovější studie ukazují, že mitosomální proteomy obsahují druhově-specifické proteiny, které pravděpodobně nahradily stávající komponenty této dráhy.

Mitosomy *Giardia intestinalis* jsou považovány za jedny z nejvíce redukováných forem mitochondrie vůbec. S neustálým vylepšováním bioinformatických metod však nacházíme další homology proteinů účastnících se importu proteinů, jako Tom40, Tim44 a Tim17. Navíc s identifikací mnoha nových giardiově-specifických proteinů lze očekávat objev nových unikátních funkcí této organely.

## ABSTRACT

Mitochondrial endosymbiosis was a key event in the evolution of eukaryotes. Its proteome evolved into a unique combination of inherited bacterial components as well as novel eukaryotic inventions. Today, mitochondria show a huge variety across eukaryotic species – from aerobic mitochondria with cristae and complex protein apparatus for maintaining its own genome to hydrogen-producing hydrogenosomes and tiny anaerobic mitosomes without their own genome and with only a single metabolic pathway.

Comparing the existing spectra of mitochondria is beneficial for studying their evolution. The only ubiquitous and unifying features are double membrane, ISC pathway for iron-sulfur cluster synthesis and the core of protein import pathway. Therefore, these features could be considered as truly ancestral and essential to mitochondria. Mitosomes of various parasitic protists have evolved independently from complex mitochondria, since they are present in completely unrelated species and yet their evolution led in a surprisingly similar composition of protein import pathway. These retained components are thus believed to be functionally essential and for some reason hard to be replaced by alternate proteins. Mitosomal import pathways were considered very minimalistic for a long time. Nevertheless, the latest research shows, that some of them possess many unique lineage or even species-specific proteins, which likely substitute the loss of canonical components of this pathway.

Mitosomes of *Giardia intestinalis* are one of the most reduced mitochondrial forms discovered so far. However, with the improvement of bioinformatic tools, many distant homologues of proteins involved in protein import pathway such as Tom40, Tim44 and Tim17 were discovered over the last years. Moreover, with the identification of many new *Giardia*-specific proteins, novel unique functions and pathways are likely yet to be discovered.

## ČESKÁ ČÁST

# 1. ÚVOD

Mitochondrie je organela endosymbiotického původu, která vznikla transformací pohlcené eubakterie u společného předka všech eukaryot (Gray and Doolittle, 1982). Zavedení funkčního transportního systému do mitochondrií tak bylo nezbytnou podmínkou pro zachování této nově nabyté organely. Importní systém je tedy tvořen kombinací bakteriálních translokáz spolu s eukaryotickými novinkami. Srovnávání eukaryotických genomů ukazuje, že podstatné komponenty systému jsou zachovány u všech eukaryotických linií a byly tak pravděpodobně využívány i posledním společným předkem všech eukaryot (LECA) (Fukasawa *et al.*, 2017). Nicméně konkrétní podobu původní dráhy u LECA je z dnes dostupných informací obtížné charakterizovat.

V poslení době dochází k sekvenaci mnoha organismů s bohatými mitochondriálními genomy, pomocí nichž můžeme nahlédnout do evoluce mitochondriálního genomu (Yang *et al.*, 2017). Pro studium evoluce mitochondrií jsou často využívány jakobidi a malawimonády-protista s největšími známými mitochondriálními genomy, kde můžeme najít mnoho původních zachovalých bakteriálních prvků (Lang *et al.*, 1997).

Na opačném konci spektra stojí mitochondrie parazitických protist, u kterých došlo k masivní sekundární redukci – hydrogenosomy a mitosomy. Ač mají tyto organely s mitochondriemi společný evoluční původ, k jejich redukci došlo v jednotlivých liniích nezávisle pod vlivem anaerobního životního prostředí a parazitického způsobu života (Leger *et al.*, 2017; van der Giezen and Tovar, 2005). Obrovská rozmanitost těchto mitochondriálních forem nám umožňuje rozlišit minimální set proteinů potřebných pro import, protože většina pomocných komplexů a receptorů byla ztracena. Tyto zjednodušené dráhy nám umožňují porozumět principům první funkční importní dráhy, a to ještě předtím, než se u jednotlivých linií vyvinuly specifické pomocné komponenty. Studium anaerobních parazitických prvků je však značně ztíženo nedostatkem zavedených molekulárně biologických metod. Navíc jejich extrémě divergentními proteinové sekvence znesnadňují nalézt homology proteinů známých z jiných eukaryot.

Nedávné proteomické studie mitosomů některých anaerobních protist ukázaly, že tyto organely nejsou pravděpodobně zdaleka tak primitivní jak se předpokládalo. Ačkoli se může zdát, že se u nich zachovaly pouze nejdůležitější komponenty mitosomálních drah, ukázalo se, že zároveň obsahují mnoho liniově či druhově specifických proteinů. Jejich funkce je z velké většiny neznámá. U mitochondrie *Trypanosoma brucei* se ukázalo, že proteiny specifické pouze pro trypanosomy spolupracují se standardními komponenty importní mitochondriální dráhy (Singha *et al.*, 2012). Podobná situace byla navíc navržena i pro mitosomy *Entamoeba histolytica* (Santos *et al.*, 2016) a *Giardia intestinalis* (Martincova *et al.*, 2015; Rout *et al.*, 2016).

## 2. CÍLE PRÁCE

- Charakterizovat mitosomální proteom *Giardia intestinalis*
- Otestovat způsob importu proteinů do mitosomů *Giardia intestinalis*
- Identifikovat nové mitosomální proteiny a dráhy s mitosomy spojené u *Giardia intestinalis*
- Najít kanál pro import proteinů ve vnitřní mitosomální membráně v *Giardia intestinalis*

### 3. MATERIÁL A METODIKA

Detailní informace o použitých metodách a materiálech jsou uvedeny v příslušných publikacích. Byly použity zejména tyto metody: Klonování, příprava rekombinantních proteinů v *E. coli*, příprava mutantních proteinů, příprava buněčných frakcí, SDS-PAGE a Western blot, imunofluorescence, *in-vivo* biotinylace proteinů, imunoprecipitace, Blue-Native PAGE, kvasinkový a bakteriální dvojhybridní systém.

### 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

#### **Cytochromy b<sub>5</sub> v *Giardia intestinalis* obsahují hem.**

Hem je prostetická skupina obsažená v hemoproteinech, které jsou důležité pro transport elektronů v dýchacím řetězci, obraně vůči oxidativnímu stresu, přenosu plynů a další funkce (Shimizu *et al.*, 2015). Anaerobní patogenní organismy jako giardia ztratily dráhu pro syntézu hemu. Zároveň nemají ani hemoproteiny typické pro obranu proti stresu, ty jsou u nich obvykle nahrazeny jinými bakteriálními proteiny, které hem neobsahují (Coombs *et al.*, 2004; Nixon *et al.*, 2002). Přesto jsou u těchto organismů některé geny pro hemoproteiny zachovány, typicky z rodiny cytochromů b<sub>5</sub> (cytb<sub>5</sub>) (Koreny *et al.*, 2013). Charakteristická pro ně je C-terminální transmembránová doména, která je kotví v membráně retikula či mitochondrie s N-terminální doménou v cytosolu. Nikdy však nebylo přímo prokázáno, že tyto proteiny skutečně obsahují hemový kofaktor. Dodnes byl popsán pouze jeden prvok schopný života zcela bez hemu – *Phytomonas serpens*, který obsahuje geny pro 19 proteinů cytb<sub>5</sub> rodiny (Koreny *et al.*, 2012).

U giardie bylo popsáno několik hemoproteinů, například flavohemoglobin, který pravděpodobně hraje roli v obraně proti oxidativnímu stresu (Rafferty *et al.*, 2010). Dále byly popsány tři cytb<sub>5</sub> s neznámou funkcí (Alam *et al.*, 2012). Bioinformatickou analýzou jsme identifikovali krom již známých tří cytochromů – gCYTb5-I, gCYTb5-2 a gCYTb5-3 (Alam *et al.*, 2012) dva další podobné proteiny - gCYTb5-4 a GiTax. Všechny gCYTb5 překvapivě postrádají C-terminální transmembránovou doménu známou z jiných organismů. Všechny geny byly proto fúzované s HA-tagem a jejich lokalizace ověřena jako cytosolická, což odpovídá ztrátě transmembránové domény.

Dále jsme testovali schopnost čtyř gCYTb5 proteinů vázat hem. Použili jsme UV-viditelnou spektroskopii a HPLC analýzu. Potvrdili jsme, že všechny gCYTb5 proteiny jsou schopny *in-vitro* vázat hemový kofaktor. Dále jsme mutovali gen pro gCYTb5-4 a zaměnili histidin zodpovědný za vazbu hemu. Tento mutovaný protein poté vykazoval značný pokles ve schopnosti vázat hem.

Giardie neobsahuje proteiny typické pro redukci cytb<sub>5</sub>, jako je například P450 reduktáza. Proto jsme testovali, jestli je cytochromy schopen redukovat protein GiOR-1, jehož sekvence je P450 reduktáze podobná (Jedelsky *et al.*, 2011; Koreny *et al.*, 2013). Výsledky jasně ukazují, že GiOR-1 je schopen *in-vitro* redukovat cytochromy. Nicméně GiOR-1 byl již dříve lokalizován v mitosomech (Jedelsky *et al.*, 2011), není proto jasné, zda může tento redoxní systém fungovat v buňkách.

Dále jsme testovali, zda je v buňkách giardie hemový kofaktor skutečně přítomen. Porovnávali jsme množství hemu v normálních buňkách a s buňkami produkujícími gCYTb5-4 a také s linií produkující gCYTb5-4 s mutovaným místem pro vazbu hemu. Ukázali jsme, že hem přidaný do média byl inkorporován do gCYTb5-4. U těchto buněk bylo naměřeno dvakrát více hemu než u divokého kmene.

V této studii jsme prokázali, že giardie je schopná získávat hem z prostředí a vázat ho do svých hemoproteinů. Nicméně zatím nelze zjistit, zda je hem pro život buněk nezbytný, jelikož nemáme k dispozici definované médium.

### **Minimalistická cytosolická dráha pro syntézu železo-sírných center je u *Girdia intestinalis* částečně asociována s mitosomy.**

Jediná dosud objevená funkce mitosomů je syntéza Fe-S center pomocí ISC dráhy (Iron-Sulfur cluster assembly). Tyto kofaktory jsou pro buňku nezbytné, zajišťují například přenos elektronů nebo příjem signálů. V eukaryotech jsou součástí dýchacího řetězce, fotosyntézy, DNA metabolismu nebo růstu buněk. Kromě ISC dráhy známe také dráhu cytosolickou – CIA (cytosolic iron-sulphur cluster assembly). Ta je složená z minimálně osmi proteinů (Tah18, Dre2, Nbp35, Cfd1, Nar1, Cia1, Cia2 a MMS19) a je závislá na mitochondriální ISC dráze (Netz *et al.*, 2014). Z mitochondrie je za tímto účelem transportována dosud neznámá sloučenina obsahující síru, a to pomocí proteinů Atm1 a Erv1 (Kispal *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2001).

Hledali jsme homology všech komponentů CIA dráhy u metamonád, ale našli jsme pouze čtyři, které se vyskytují u všech (Nbp35, Nar1, Cia1 and Cia2). Cfd1 byl pravděpodobně přítomen u předka metamonád a ztracen sekundárně, protože jsme ho identifikovali u některých méně odvozených druhů. Dre2 a MMS19 chybí u všech metamonád. Překvapivě chybí i Erv1 a Atm1, proteiny propojující u jiných organismů mitochondriální ISC dráhu s cytosolickou CIA.

V genomu giardie jsme našli jeden gen pro Nar1, Cia1 a Cia2. Nbp35 jsme našli ve třech kopiích (Nbp35-1, Nbp35-2, Nbp35-3). Dva domělé homology Tah18 – GiOR-1 and GiOR-2 byly již dříve charakterizovány (Jedelsky *et al.*, 2011). Fúzovali jsme všechny geny s C-terminálním HA-tagem a zjišťovali jejich lokalizaci pomocí fluorescenční mikroskopie a buněčné frakcionace. Proteiny Nar1, Cia1 and Nbp35-3 jsme lokalizovali v cytosolu. Cia2 překvapivě ukázal dvojí lokalizaci – v cytosolu i uvnitř mitosomů. Nbp35-1 a Nbp35-2 jsou také v cytosolu i mitosomech, ale jsou spíše periferně asociované s vnější mitosomální membránou. GiOR-1 se nachází v mitosomální matrix.

Následná *in-vivo* biotinylace a koprecipitace GiOR-1 ukázala, že interaguje především s proteiny mitosomální matrix. Mezi partnery Cia2 proteinu jsme naopak žádné matrixové proteiny neidentifikovali. Působením proteáz na mitosomální frakci jsme však ukázali, že je tento protein uvnitř mitosomů. U Cia2 proto předpokládáme lokalizaci v mezimembránovém prostoru.

Protože GiOR-1 a GiOR-2 jsou sekvenčně podobné s Tah18, testovali jsme jejich zapojení do CIA dráhy. Zkoumali jsme jejich schopnost zastoupit Tah18 protein u *T. brucei*. Použili jsme kmen *T. brucei* s dvojitým RNAi knock-downem pro Tah18 a Dre2. Oba proteiny GiOR-1 a GiOR-2 byly schopné částečně obnovit růst RNAi buněčné linie. Navíc byla obnovena i funkce akonitázy, která je závislá na funkčním Fe-S centru, a jejíž aktivita byla u knockdown linií snížena. Nicméně ačkoli jsou tyto proteiny schopny plnit funkci Tah18 u *T. brucei*, jejich funkce v giardii je pravděpodobně odlišná. Fylogenetická analýza ukázala, že proteiny GiOR-1 a GiOR-2 mají u metamonád jiný evoluční původ než klasické Tah18 proteiny. Navíc GiOR-1 je protein mitosomální matrix a GiOR-2 je asociován s dosud neznámými periferními váčky (Jedelsky *et al.*, 2011). Oba tak nejspíš fungují v jiných kompartmentech než cytosolická CIA dráha.

Giardie tak představuje jednoho z mála eukaryot, kterému zcela chybí Tah18/Dre2 komplex. Je možné, že funkce Atm1 a Erv1 je částečně nahrazena proteiny Nbp35-1 a Nbp35-2 asociovanými s vnější mitosomální membránou a proteinem Cia2 v mezimembránovém prostoru. Ty pravděpodobně zajišťují spojení mezi cytosolickou CIA dráhou a mitosomální ISC dráhou.



## **Charakterizace mitosomů pomocí *in-vivo* biotinylace**

Současné znalosti mitosomálního proteomu giardie jsou limitované hlavně díky obtížnosti purifikace těchto organel a divergentních proteinových sekvencí, které ztěžují identifikaci homologů známých mitochondriálních proteinů. Proto jsme vyvinuli novou metodu pro studium proteinových interakcí v giardii. Využili jsme bakteriální enzym Biotin ligázu (BirA) schopný přenášet biotin na specifickou sekvenci – biotin-akceptorový peptid (BAP) (Howarth and Ting, 2008). Biotinylovaný protein lze použít pro proteinovou purifikaci pomocí streptavidinových kuliček díky silné interakci biotin-streptavidin. Vytvořili jsme chimerický konstrukt BirA s N-terminální targetovací mitosomální sekvencí a C-terminálním HA-tagem. Další vektor obsahoval mitosomální protein s C-terminálním BAP-tagem. Giardie byly kotransformovány oběma vektory a úspěšnost transformace byla sledována jako specifická biotinylace daného proteinu pomocí fluorescenční mikroskopie a Western blotu.

Jako cílový protein jsme vybrali jediný do té doby známý protein vnitřní mitosomální membrány Pam18 (Jedelsky *et al.*, 2011). Buňky produkující biotinylovaný Pam18 byly použity pro izolaci frakce obohacené o mitosomy. Ta byla chemicky cross-linkována, solubilizována a lyzát purifikován na magnetických streptavidinových kuličkách. Eluát jsme analyzovali pomocí hmotnostní spektrometrie. Mezi nalezenými proteiny jsme identifikovali jeden, který jsme po *in-silico* analýze pomocí HHpred označili jako homolog Tim44 – klíčovou součást TIM komplexu. Jeho sekvence je však velmi divergentní a chybí mu N-terminální část, která je zodpovědná na vazbu na TIM komplex a interakci s Hsp70 (Ting *et al.*, 2014). Lokalizaci Tim44 v mitosomech jsme ověřili i experimentálně.

Nově objevený Tim44 protein byl použit jako další cílový protein pro biotinylacii. Získali jsme dataset proteinů, který ukázal jeho blízkost k chaperonu Hsp70 a dalším mitosomálním proteinům. To ukazuje na jeho možné zapojení do mitosomálního TIM komplexu, ale charakterizace jeho přesné funkce bude vyžadovat další experimenty. Překvapivě se nepodařilo identifikovat žádný protein z Tim17 rodiny, který by mohl fungovat jako translokáza vnitřní membrány. To ovšem mohlo být způsobeno také limitací techniky hmotností spektrometrie, kdy se peptidy pro měření získávají pomocí trypsinového štěpení, které není schopné rozštěpit některé hydrofobní proteiny. Jako cílový protein pro biotinylacii jsme použili také kanál vnější membrány Tom40 a identifikovali tak protein MOMP35. Je to protein vnější membrány, který je schopen způsobit agregaci mitosomů, když je overexprimován.

Celkem jsme identifikovali 16 nových mitosomálních proteinů a ověřili jejich lokalizaci. Překvapivě žádný z nich nesdílí homologii s proteiny ostatních eukaryotických či prokaryotických organismů. Tyto giardie-specifické proteiny naznačují, že mitosomy pravděpodobně plní dosud neznámé unikátní funkce pro giardii.

Technika *in-vivo* biotinylace nám navíc umožnila sledovat způsob mitosomálního transportu. Použili jsme cytosolickou BirA, která byla schopna biotinylovat protein s BAP-tagem translatovaný v cytosolu před jeho transportem do mitosomu. Zda jsou proteiny do mitosomů transportovány ve sbaleném stavu jsme testovali pomocí myší dihydrofolát reduktázy (DHFR). Ta se sbalí po přidání analogů folátu (Eilers and Schatz, 1986). Fúzní protein s N-terminální mitosomální signální sekvencí a DHFR nebyl po přidání analogů folátu transportován do mitosomů a hromadil se v cytosolu.

## **Hledání homologu Tim17 u *Giardia intestinalis***

Pro hledání translokázy vnitřní mitosomální membrány giardie jsme využili nedávno publikovaná transkriptomická data příbuzných Metamonád (Leger *et al.*, 2017). Tyto sekvence jsme použili k obohacení Hidden-Markov modelů. Po každé HMM analýze jsme model znova obohatili o nově nalezené sekvence metamonád. Tento krok byl opakován třikrát, kdy už nedošlo k identifikaci žádných nových sekvencí. Podařilo se nám najít kandidáta pro vzdálený homolog Tim17 translokázy u giardie. Fylogenetická analýza ukázala, že je tento protein blízký Tim17 proteinům u příbuzných metamonád. To ukazuje, že je pravděpodobně evolučně odvozený od proteinů Tim17 rodiny.

Nicméně tento kandidát ztratil některé důležité charakteristiky klasického Tim17. Například postrádá několik GxxxG motivů zodpovědných za vazbu Tim23 (Demishtein-Zohary *et al.*, 2015) nebo konzervované cysteinové zbytky důležité pro otvírání kanálu membránovým napětím (Ramesh *et al.*, 2016). Jsou zde však zachovány čtyři transmembránové domény a dva konzervované argininové zbytky pro vazbu Tim44. Ačkoli proteinu Tim44 u giardie chybí N-terminální část, nedávno se ukázalo, že právě C-terminální část je zodpovědná za přímou interakci s Tim17 (Banerjee *et al.*, 2015). Je tak možné, že spolu tyto dva proteiny v giardii skutečně interagují.

Proto jsme nejprve testovali lokalizaci proteinu Tim17 u giardie. Ukázali jsme, že je to protein vnitřní mitosomální membrány a je v buňkách přirozeně exprimován. Tim17 jsme použili jako cíl pro *in-vivo* biotinylation a následnou koprecipitaci. Z výsledků vyplývá jeho blízkost k proteinům importního komplexu, jako jsou Tim44 nebo Hsp70. Mezi identifikovanými proteiny bylo i několik giardie-specifických proteinů. Tyto proteiny by mohly nahrazovat některé komponenty známé z jiných organismů, jak bylo popsáno i u *T. brucei*, kde je mnoho proteinů nahrazeno trypanosoma-specifickými proteiny (Singha *et al.*, 2012).

Ačkoli se nepodařilo získat přímý důkaz o funkci Tim17 jako mitosomálního transportéru, všechny naše výsledky naznačují, že tento protein byl skutečně u giardie zachován pro plnění své původní funkce. Domníváme se, že kanál by mohl být tvořen dimerem Tim17, protože jsme pomocí kvasinkového dvouhybridního systému ukázali, že je schopen interagovat sám se sebou. Použitím SDS-page se vzorkovým pufrům bez merkaptetanolu jsme zjistili, že se v buňce vyskytuje v komplexu vázaném disulfidickým můstkem o dvojnásobné velikosti Tim17. Navíc *po in-vitro* translaci jsme na Blue-Native PAGE pozorovali komplex odpovídající velikosti.

Zdá se, že importní systém vnitřní mitosomální membrány giardie je mozaikou původních konzervovaných proteinů v kombinaci s giardiově-specifickými proteiny. Ty se tak pravděpodobně vyvinuli k naplnění specifík importu do této extrémně divergentní organely.

## 5. ZÁVĚR

*Giardia intestinalis* byla dlouhou dobu považována za amitochondriálního prvoka. Až po objevení extrémně redukováných mitochondrií – mitosomů postupně přibývají studie zabývající se jejich funkcí a proteomem. Ačkoli se za jedinou mitosomální funkci i nadále považuje syntéza Fe-S center (Tovar *et al.*, 2003), nedávne studie naznačují, že se pravděpodobně jedná o mnohem komplexnější organelu (Martincova *et al.*, 2015; Rout *et al.*, 2016).

Mitosomy, které patří mezi extrémně malé buněčné organely se dosud nepodařilo izolovat v čisté frakci. To představuje hlavní limitaci při studiu jejich proteomu. Odhalování homologů známých mitochondriálních proteinů je velmi ztížené kvůli velmi divergentním sekvencím. Nicméně se ukazuje, že použitím transkriptomů nově sekvenovaných příbuzných organismů, jako například *Chilomastix* či *Carpodomonas*, lze snadněji tyto homology identifikovat. Tento postup posloužil

například pro identifikaci homologu Tim17 (Martincova et al., 2017, manuskript). Můžeme tedy očekávat, že postupně budou nalezeny homology i pro některé další divergentní mitosomální proteiny.

Kromě těchto „standardních“ proteinů obsahuje mitosom i několik giardiově-specifických proteinů, jejich funkce však zůstává neznámá. Pravděpodobně se bude jednat o unikátní dráhy bez jakékoli homologie k ostatním organismům, nebo o asociované proteiny importní dráhy jako u *T. brucei*.

## **ENGLISH PART**

## 1. INTRODUCTION

Mitochondrion is an organelle of endosymbiotic origin, which originated from the transformation of the endosymbiotic eubacterion in the common eukaryotic ancestor (Gray and Doolittle, 1982). The establishment of effective transport system into the mitochondria was thus a crucial moment for the maintenance of the newly acquired organelle during the evolution. The system is a combination of bacterial transporters as well as new eukaryotic inventions. Comparative genomics indicate that the overall design of the protein import machinery is shared among all eukaryotic supergroups and thus was also used by LECA (last eukaryotic common ancestor) (Fukasawa *et al.*, 2017). However, the detailed composition of the mitochondrion in LECA and its protein import apparatus is difficult to infer from current data.

Recently, several new species with rich mitochondrial genomes were sequenced giving some more insight into mitochondrial genome evolution (Yang *et al.*, 2017). Typical organisms which might reflect the early steps in mitochondrial evolution are jakobids and malawimonads, which retained many ancestral bacterial features (Lang *et al.*, 1997).

On the other end of the spectra, parasitic protists often contain highly reduced mitochondria, so called mitochondria-related organelles (MROs). Mitochondria and MROs arose from the single endosymbiotic event and they underwent the reductive evolution independently in different eukaryotic lineages due to the anaerobic and parasitic lifestyle (Leger *et al.*, 2017; van der Giezen and Tovar, 2005). The huge variety of mitochondrial forms enables us to distinguish the minimal set of components of mitochondrial import, while the peripheral subunits of the complexes were lost. These simplified pathways may help us understand the principles of the first functional import pathway in the first mitochondria, before all the additional receptors and enhancers were established. However, studying these organisms comprises many struggles, such as the presence of highly divergent sequences, which limits us to identify more distant homologues of already-known proteins from other eukaryotes.

Recent proteomic studies of mitosomes from different anaerobic protists have shown, that these organelles are much more complex than it was considered previously. Mitosomes show yet-undiscovered variety of lineage-specific proteins. Their exact function mostly remains elusive, but in similar case of *Trypanosoma brucei*, several trypanosome-specific proteins were proven to interact with components of canonical import system (Singha *et al.*, 2012). Similar situation was therefore proposed in case of mitosomes in *Entamoeba histolytica* (Santos *et al.*, 2016) or *Giardia intestinalis* (Martincova *et al.*, 2015; Rout *et al.*, 2016).

However, experimental approaches are quite limited in vast majority of parasitic protists and therefore it is difficult to characterize the newly identified proteins. Given the number of specific proteins identified recently, we can expect new specialized functions and pathways to be discovered in mitosomes.

## 2. AIMS OF THE STUDY

- To characterize mitosomal proteome in *Giardia*
- To test the mode of mitosomal protein targeting in *Giardia*
- To identify new mitosomal proteins and pathways associated with mitosomes in *Giardia*
- To find the putative mitosomal inner membrane translocase in *Giardia*

### 3. MATERIAL A METHODS

Material and methods are described in detail in given publications. We used mainly these methods: Cloning, production of recombinant proteins in *E. coli*, production of mutated proteins, cell fractionation, SDS-PAGE and western blot, immunofluorescence, in-vivo biotinylation, coprecipitation, Blue-Native PAGE, yeast and bacterial two hybrid system.

### 4. RESULTS AND DISCUSSION

#### *Giardia intestinalis* incorporates heme into cytosolic cytochrome b<sub>5</sub>

Heme is a prosthetic group of hemoproteins, which are important for transporting electrons in the respiration chain, oxidative stress defense, carrying diatomic gases and other vital functions (Shimizu *et al.*, 2015). Anaerobic pathogens, such as *Giardia*, do not possess the pathway for heme synthesis. They are also devoid of typical hemoproteins involved in stress defense and this function is overtaken by different heme-independent proteins of bacterial origin (Coombs *et al.*, 2004; Nixon *et al.*, 2002). However, these organisms usually retained several genes for hemoproteins from cytochrome b<sub>5</sub> (cytb<sub>5</sub>) family (Koreny *et al.*, 2013). They typically possess C-terminal transmembrane domain which anchors them in the membrane of ER or mitochondria with N-terminal heme-binding domain facing cytosol. Nevertheless, whether these organisms indeed harbor heme cofactor remained unknown. The only organism which was proven to be able to survive without heme is *Phytomonas serpens*, protist encoding for 19 cytochrome b<sub>5</sub> genes (Koreny *et al.*, 2012).

*Giardia* contains only few heme-binding proteins, namely flavohemoglobin functioning as a protection against oxygen and nitric oxide (Rafferty *et al.*, 2010) and three cytb<sub>5</sub> with yet unknown function (Alam *et al.*, 2012). By bioinformatic searches we identified three known cytb<sub>5</sub>- gCYTb5-I, gCYTb5-2 and gCYTb5-3 (Alam *et al.*, 2012) and two cytb<sub>5</sub>-like proteins named gCYTb5-4 and GiTax. Surprisingly, all gCYTb lack the C-terminal anchoring domain typical for previously described cytochromes b<sub>5</sub>. All genes were subcloned with HA-tag and their localization was shown to be cytosolic, which is in agreement with the lack of the C-terminal transmembrane domain.

Furthermore, we tested the ability of four recombinant gCYTb5 proteins to bind heme using UV/VIS-spectroscopy and HPLC analysis. We confirmed that all gCYTb5 proteins are able to bind heme *in vitro*. Moreover, we inserted a mutation into gCYTb5-4 to replace the heme-binding histidine. Consequently, the mutated protein showed significant decrease in the heme-binding ability.

*Giardia* does not have typical proteins for cytb<sub>5</sub> reduction such as P450 reductase. Hence we tested the ability of protein GiOR-1 to reduce cytochromes as it shows sequence similarity to P450 reductase (Jedelsky *et al.*, 2011; Koreny *et al.*, 2013). Our results clearly indicate that GiOR-1 is capable of cytb<sub>5</sub> reduction *in vitro*. However, given that GiOR-1 was shown to be associated with mitosomes (Jedelsky *et al.*, 2011), it is unknown whether this redox system is functionally relevant for the cells.

Furthermore, we also tested whether the heme cofactor is indeed present in *Giardia* cells. We compared the amount of endogenous heme in wild type cells to the cell line overexpressing gCYTb5-4 and also to gCYTb5-4 with mutated heme-binding site. The heme added to the culture media was incorporated to gCYTb5 as its level was 2-fold larger in gCYTb5-4 overexpressing strain.

In this study, we provided evidence, that *Giardia* is able to utilize heme from the environment and incorporate it into its hemoproteins. Nevertheless the necessity of heme for *Giardia* survival is yet to be discovered due to the lack the defined growth media.

## **Minimal cytosolic iron-sulfur cluster assembly machinery of *Giardia intestinalis* is partially associated with mitosomes**

The only mitochondrial function known in *Giardia* is Fe-S cluster assembly via ISC (iron-sulfur cluster) pathway. The Fe-S clusters are essential for the cells as they enable proteins to transport electrons or sense signals. In eukaryotes, Fe-S proteins are involved in respiration, photosynthesis, DNA metabolism or cell growth. Besides the ISC pathway, there is a cytosolic pathway called CIA machinery (cytosolic iron-sulphur cluster assembly). The CIA machinery is typically formed of at least 8 proteins (Tah18, Dre2, Nbp35, Cfd1, Nar1, Cia1, Cia2 and MMS19) and is dependent on ISC pathway (Netz *et al.*, 2014). The yet-unknown sulfur-containing compound is likely transported from mitochondria to cytosol via Atm1 and Erv1 proteins (Kispal *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2001).

We searched for CIA homologues in metamonads which resulted in the identification of four components present in all of them (Nbp35, Nar1, Cia1 and Cia2). Cfd1 was present in the ancestor of all metamonads and was likely lost secondarily as it is present in less-derived members of the genera. Dre2 and MMS19 are absent in all metamonada. Interestingly, Erv1 and Atm1, two key components which link CIA and ISC machineries are missing in metamonads as well.

In *Giardia*, Nar1, Cia1 and Cia2 are encoded as a single-copy genes, Nbp35 was found in three copies (Nbp35-1, Nbp35-2, Nbp35-3). Two putative Tah18 homologues – GiOR-1 and GiOR-2 were previously characterized (Jedelsky *et al.*, 2011). We fused all the genes with the C-terminal HA-tag and addressed their localization using fluorescent microscopy as well as cell fractionation. Cytosolic localization was observed in case of Nar1, Cia1 and Nbp35-3. Interestingly, Cia2 was found to be localized both in cytosol as well as inside mitosomes. Nbp35-1 and Nbp35-2 also localize both in cytosol and mitosomes, whereas they are rather peripherally associated with the outer mitochondrial membrane. The GiOR-1 protein was shown to be inner mitochondrial protein.

The subsequent *in vivo* biotinylation and coprecipitation of GiOR-1 protein revealed, that it mainly interacts with matrix proteins. However, Cia2 coprecipitation revealed no matrix proteins as its interaction partners. Given that the protease protection assay showed its clear distribution inside mitosomes, we propose that Cia2 is likely to be localized in the intermembrane space.

As GiOR-1 and GiOR-2 proteins show sequence similarity to Tah18, we further addressed their possible involvement in CIA pathway. Their ability to rescue the function of Tah18 in *T. brucei* was tested. We used the strain with double RNAi knock-down for Tah18 and Dre2. Both *Giardia* proteins were able to partially rescue the growth of RNAi cell line. Moreover, both proteins were able to rescue Fe-S cluster dependent activity of aconitase. Nevertheless, despite the fact that the proteins are able to partially rescue the RNAi phenotype, they are likely not functioning in CIA pathway in *Giardia*. The phylogenetic analysis revealed that Tah18-like proteins including GiOR-1 and GiOR-2 in metamonads are of different evolutionary origin than canonical Tah18 proteins. Moreover, GiOR-1 is mitochondrial matrix protein and GiOR-2 was identified to be associated with unknown peripheral vesicles in *Giardia* (Jedelsky *et al.*, 2011). Therefore they likely act in different cellular compartments than CIA machinery.

Taken together, we propose, that GiOR proteins in *Giardia* are not a part of CIA machinery, although their function remains to be characterized. It thus makes *Giardia* one of few eukaryotes lacking Tah18/Dre2 complex. Furthermore, we further hypothesize, that the function of proteins Atm1 and Erv1 linking the ISC and CIA pathways was probably overtaken by Nbp35-1 and Nbp35-2 associated with outer membrane as well as Cia2 in intermembrane space.

### **Probing the biology of *Giardia intestinalis* mitosomes using *in vivo* enzymatic tagging**

Current knowledge of mitosomal proteome in *Giardia* is limited due to the difficulty of their purification and very divergent sequences, which restrain the search for homologues of typical mitochondrial proteins. Hence we developed a new method for studying protein-protein interactions in *Giardia*. We made use of bacterial enzyme Biotin ligase (BirA). This enzyme is able to add biotin to the short specific sequence called biotin acceptor peptide (BAP) (Howarth and Ting, 2008). Biotinylated protein can be used for protein purification with streptavidin-coupled beads, since streptavidin-biotin bond is very strong. Therefore, we made a chimeric construct containing *E. coli* BirA fused with N-terminal mitosomal targeting signal and C-terminal HA-tag. Another vector was carrying a bait mitosomal protein with C-terminal BAP-tag. *Giardia* cells were cotransfected with both vectors and the successful transformation was observed as specific biotinylation of given protein on Western blot and fluorescent microscopy.

As a bait we used the only known inner membrane protein Pam18 (Jedelsky *et al.*, 2011). Cells expressing biotinylated Pam18 were used for isolation of mitosome enriched fraction. This fraction was then chemically crosslinked, solubilized and the lysate was purified on magnetic streptavidin-coupled beads. The obtained eluate was measured using mass spectrometry. Amongst the identified proteins we found one, which was after profile-sequence comparisons conducted with HHpred assigned as putative homologue of Tim44, a key component of the TIM complex. This protein was shown to localize in mitosomes when episomally expressed. However, bioinformatic analysis showed high divergence of the sequence as well as truncation of N-terminal part of the protein, which is responsible for TIM binding and interaction with Hsp70 (Ting *et al.*, 2014).

Nevertheless, using Tim44 as a biotinylation bait, we obtained another dataset of proteins, which revealed its proximity to Hsp70 and other mitosomal proteins so it might function in mitosomal TIM complex. However, the exact role of the truncated Tim44 in mitosomes remains to be investigated. Interestingly, no possible candidate for inner membrane import channel from Tim17 family was identified. This might be due to the limitations of mass spectrometry analysis, which uses trypsin cleavage of the proteins and which may thus be affected by inefficiency of trypsin to cleave hydrophobic proteins. Using outer membrane channel Tom40 as a biotinylation bait, we identified new mitosomal protein MOMP35. It is an outer membrane protein, which can trigger mitosomal aggregation when overexpressed.

In total, we identified 16 new mitosomal proteins and verified their localization. Surprisingly, most of them share no homology to proteins from other organisms. These *Giardia*-specific proteins indicate that mitosomes bear yet unknown functions unique for *Giardia*.

Furthermore, *in vivo* biotinylation tagging allowed us to follow the mode of mitosomal targeting. Using cytosolic BirA, we showed that a newly translated BAP-tagged protein is biotinylated in cytosol before its transport into mitosome. We also tested whether the proteins are transported in folded or unfolded state. We used mouse dihydrofolate reductase (DHFR), which can be folded upon addition of folate analog (Eilers and Schatz, 1986). Construct comprising mitosomal leader fused to DHFR was unable to be transported into mitosome after addition of folate analog and remained in cytosol.

### **Single Tim translocase in the mitosomes of *Giardia intestinalis* illustrates the convergence of the protein import machines in anaerobic eukaryotes**

Since proteomics have failed to identify possible mitosomal inner membrane translocase, we used the newly published transcriptomic data from related Metamonads (Leger *et al.*, 2017). These sequences

were used to enrich Hidden-Markov models and after the HMMsearch, the model was enriched again with newly identified metamonad sequences. This step was repeated three times until no new sequences were identified. We found a candidate sequence which shows weak homology to Tim17 in HHpred analysis. Phylogenetic analysis revealed its affinity to Tim17 homologues in *Giardia* closest relatives – Carpediomonas-like organisms. The protein is thus likely of Tim17 family origin.

However, it lacks some of the conserved features of canonical Tim17, such as multiple GxxxG motifs responsible for Tim23 binding (Demishtein-Zohary *et al.*, 2015) or conserved cysteine residues functioning in voltage-dependent gating (Ramesh *et al.*, 2016). Nevertheless, it has four transmembrane domains, and the two arginine residues responsible for Tim44 binding. Although Tim44 is N-terminally truncated, it was recently shown, that the C-terminal part of Tim44 is responsible for direct interaction of Tim44 and Tim17 (Banerjee *et al.*, 2015). Therefore these proteins are likely to interact together in *Giardia*.

Therefore, we addressed the function and localization of the hypothetical Tim17. We revealed, that it is localized in the mitosomal inner membrane and that it is expressed under natural conditions. We also used it as a biotinylation bait for the co-precipitation experiments. The results indicated its close proximity to Tim44 and Hsp70, which points to its function in protein import pathway. It also interacts with some *Giardia*-specific proteins, which could reflect the loss of other components typically involved in other organisms. The similar situation was described for *T. brucei*, where the canonical pathway is reduced and consists of many kinetoplastid-specific proteins (Singha *et al.*, 2012).

Although we were not able to bring direct evidence of Tim17 functioning as a protein translocase, all our results indicated that the protein probably retained its original function. We propose, that the channel could be formed of Tim17 dimer as the protein is able to dimerize. Using yeast two hybrid system we showed that the protein interacts with itself. Moreover, Tim17 is a part of a protein complex bound by disulfide bond of approximately doubled size of single protein, which was observed on SDS-PAGE using the sample buffer without mercaptoethanol. The ability to dimerize is further supported by the appearance of complex of appropriate size in BN-PAGE upon *in vitro* translation.

Altogether, it seems that the inner membrane transport complex in *Giardia* is a mosaic of ancestral and *Giardia*-specific proteins which has evolved to meet the special needs of this extremely divergent organelle.

## 5. CONCLUSIONS

*Giardia intestinalis* has long been considered as amitochondriate protist. Since the discovery of extremely reduced mitochondria – mitosomes, many publications dedicated to mitosomal proteome were released. Although the only described function so far is the Fe-S cluster synthesis via ISC machinery (Tovar *et al.*, 2003), recent studies suggest that mitosome is much more complex organelle (Martincova *et al.*, 2015; Rout *et al.*, 2016).

Mitosomal proteome characterization is very difficult, since these extremely small organelles cannot be purified in clean fraction and also due to very divergent protein sequences. Nevertheless the newly sequenced closely related organisms can be used for identification of more divergent proteins, as was recently demonstrated on Tim17 homologue (Martincova *et al.*, 2017, manuscript). We can thus expect to find more and more extremely divergent proteins.

Mitosome contains many *Giardia*-specific proteins function of which remains elusive. We propose that these are involved in unique functions without homology to any other organisms.



## **LIST OF PUBLICATIONS / SEZNAM PUBLIKACÍ**

- Pyrih, J., Harant, K., Martincová, E., Šuťák, R., Lesuisse, E., Hrdý, I., Tachezy, J. (2014) ***Giardia intestinalis* incorporates heme into cytosolic cytochrome b(5)**. *Eukaryotic Cell* **13**: 231-239.
- Pyrih, J., Pyrihová, E., Kolísko, M., Stojanovová, D., Basu, S., Harant, K., Haindrich, A. C., Doležal, P., Lukeš, J., Roger, A., Tachezy, J. (2016) **Minimal cytosolic iron-sulfur cluster assembly machinery of *Giardia intestinalis* is partially associated with mitochondria**. *Mol Microbiol* **102**: 701-714.
- Martincová E., Voleman L., Pyrih J., Žárský V., Vondráčková P., Kolísko M., Tachezy J., Doležal, P. (2015) **Probing the biology of *Giardia intestinalis* mitochondria using in vivo enzymatic tagging**. *Molecular and Cellular Biology*. 2015 Jun;35(16):2864- 74.
- Pyrihová, E., Krupičková, A., Voleman L., Wandyszewska, N., Roger, A., Kolísko, M., Doležal, P. **Single Tim translocase in the mitochondria of *Giardia intestinalis* illustrates the convergence of the protein import machines in anaerobic eukaryotes**. Manuscript in preparation

## **CURRICULUM VITAE**

Name: **Eva Pyrihová, Mgr.**

Maiden name: Martincová

Date of birth: 20/03/1988

Nationality: Czech

phone: +420736657881; email: eva.pyrihova@gmail.com

### **Education:**

- 2012 – on: Ph.D. in Parasitology, Charles University in Prague  
Research topic: Characterization of the protein import into *Giardia intestinalis* mitochondria
- 2012 (Oct-Nov): Research stay in laboratory of Prof. Scott Dawson, University of California, Davis, USA
- 2010 – 2012: Mgr. in Parasitology, Charles University in Prague, Faculty of Science  
Research topic: Protein import into mitochondria of *Giardia intestinalis*
- 2007 – 2010: Bc. in General biology, Charles University in Prague, Faculty of Science  
Research topic: Cellular functions of tail-anchored proteins

### **Research activities:**

- sterile cell culture work (*G. intestinalis*, *Saccharomyces*)
- Microscopy (including both immunofluorescence assays and live cell imaging techniques)
- Western blotting, native-gel electrophoresis and radioactive labelling
- PCR, RNA isolation, Northern blotting

- Preparation of recombinant proteins in *E. coli*
- Cell fractionation, density gradient
- Immunoprecipitation, crosslinking, mass spectrometry sample preparation and data analysis using Scaffold software
- Genetic manipulations such as epitope-tagging of endogenous proteins

### **Funding, Grants and Awards:**

- Protein import into mitosomes of *Giardia intestinalis*, 2014-2015; GAUK 98214; Principal investigator
- Electron transfer and Iron/Sulfur clusters development in mitosome of parasitic protist *Giardia intestinalis*, 2010-2012; GAUK 153010; Member of the research team
- Award from Czech literary fund trust in years (travel scholarship), 2012
- Fund of mobility UK (travel scholarship), 2012
- The best oral presentation at International Giardia and Cryptosporidium Conference, IGCC, Uppsala, Sweden, 2014

### **Meetings and presentations**

- **Mechanisms and regulation of protein translocation**, Dubrovnik, Croatia, 2015 (oral presentation)
- **International Giardia and Cryptosporidium Conference**, IGCC, Uppsala, Sweden, 2014 (oral presentation)
- **Protist international meeting**, Oslo, Norway, 2012 (poster)
- **22<sup>nd</sup> Molecular Parasitology Meeting**, Woods Hole, USA, 2011 (poster)
- **5<sup>th</sup> Short course for young parasitologists**, Hamgurg, Germany, 2011 (oral presentation)

### **Publications:**

- Pyrih, J., **Pyrihova, E.**, Kolisko, M., Stojanovova, D., Basu, S., Harant, K. *et al.* (2016) Minimal cytosolic iron-sulfur cluster assembly machinery of *Giardia intestinalis* is partially associated with mitosomes. *Mol Microbiol* **102**: 701-714.
- **Martincova, E.**, Voleman, L., Pyrih, J., Zarsky, V., Vondrackova, P., Kolisko, M. *et al.* (2015) Probing the biology of *Giardia intestinalis* mitosomes using in vivo enzymatic tagging. *Molecular and Cellular Biology* **35**: 2864-2874.
- Pyrih, J., Harant, K., **Martincova, E.**, Sutak, R., Lesuisse, E., Hrdy, I. *et al.* (2014) *Giardia intestinalis* incorporates heme into cytosolic cytochrome b(5). *Eukaryotic Cell* **13**: 231-239.
- **Martincova, E.**, Voleman, L., Najdrova, V., De, N. M., Eshar, S., Gualdrón, M. *et al.* (2012) Live imaging of mitosomes and hydrogenosomes by HaloTag technology. *Plos One* **7**: e36314.

## Použitá literatura/References

- Alam, S., Yee, J., Couture, M., Takayama, S. J., Tseng, W. H., Mauk, A. G. *et al.* (2012) Cytochrome b(5) from *Giardia lamblia*. *Metallomics* **4**: 1255-1261.
- Banerjee, R., Gladkova, C., Mapa, K., Witte, G., and Mokranjac, D. (2015) Protein translocation channel of mitochondrial inner membrane and matrix-exposed import motor communicate via two-domain coupling protein. *Elife* **4**: e11897.
- Coombs, G. H., Westrop, G. D., Suchan, P., Puzova, G., Hirt, R. P., Embley, T. M. *et al.* (2004) The amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis* contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system. *J Biol Chem* **279**: 5249-5256.
- Demishtein-Zohary, K., Marom, M., Neupert, W., Mokranjac, D., and Azem, A. (2015) GxxxG motifs hold the TIM23 complex together. *FEBS J* **282**: 2178-2186.
- Eilers, M. and Schatz, G. (1986) Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature* **322**: 228-232.
- Fukasawa, Y., Oda, T., Tomii, K., and Imai, K. (2017) Origin and Evolutionary Alteration of the Mitochondrial Import System in Eukaryotic Lineages. *Mol Biol Evol.*
- Gray, M. W. and Doolittle, W. F. (1982) Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol Rev* **46**: 1-42.
- Howarth, M. and Ting, A. Y. (2008) Imaging proteins in live mammalian cells with biotin ligase and monovalent streptavidin. *Nat Protoc* **3**: 534-545.
- Jedelsky, P. L., Dolezal, P., Rada, P., Pyrih, J., Smid, O., Hrdy, I. *et al.* (2011) The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS One* **6**: e17285.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., and Lill, R. (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *Embo Journal* **18**: 3981-3989.
- Koreny, L., Obornik, M., and Lukes, J. (2013) Make it, take it, or leave it: heme metabolism of parasites. *Plos Pathogens* **9**.
- Koreny, L., Sobotka, R., Kovarova, J., Gnipova, A., Flegontov, P., Horvath, A. *et al.* (2012) Aerobic kinetoplastid flagellate *Phytomonas* does not require heme for viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 3808-3813.
- Lang, B. F., Burger, G., O'Kelly, C. J., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C. *et al.* (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* **387**: 493-497.
- Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Muhlenhoff, U., Kispal, G., and Lill, R. (2001) An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *Embo Reports* **2**: 715-720.
- Leger, M. M., Kolisko, M., Kamikawa, R., Stairs, C. W., Kume, K., Cepicka, I. *et al.* (2017) Organelles that illuminate the origins of *Trichomonas* hydrogenosomes and *Giardia* mitosomes. *Nat Ecol Evol* **1**: 0092.
- Martincova, E., Voleman, L., Pyrih, J., Zarsky, V., Vondrackova, P., Kolisko, M. *et al.* (2015) Probing the biology of *Giardia intestinalis* mitosomes using in vivo enzymatic tagging. *Molecular and Cellular Biology* **35**: 2864-2874.

- Netz, D. J. A., Mascarenhas, J., Stehling, O., Pierik, A. J., and Lill, R. (2014) Maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Trends in Cell Biology* **24**: 303-312.
- Nixon, J. E., Wang, A., Field, J., Morrison, H. G., McArthur, A. G., Sogin, M. L. *et al.* (2002) Evidence for lateral transfer of genes encoding ferredoxins, nitroreductases, NADH oxidase, and alcohol dehydrogenase 3 from anaerobic prokaryotes to *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* **1**: 181-190.
- Rafferty, S., Luu, B., March, R. E., and Yee, J. (2010) *Giardia lamblia* encodes a functional flavohemoglobin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **399**: 347-351.
- Ramesh, A., Peleh, V., Martinez-Caballero, S., Wollweber, F., Sommer, F., van der Laan, M. *et al.* (2016) A disulfide bond in the TIM23 complex is crucial for voltage gating and mitochondrial protein import. *J Cell Biol* **214**: 417-431.
- Rout, S., Zumthor, J. P., Schraner, E. M., Faso, C., and Hehl, A. B. (2016a) An Interactome-Centered Protein Discovery Approach Reveals Novel Components Involved in Mitosome Function and Homeostasis in *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog* **12**: e1006036.
- Santos, H. J., Imai, K., Hanadate, Y., Fukasawa, Y., Oda, T., Mi-ichi, F. *et al.* (2016) Screening and discovery of lineage-specific mitochondrial membrane proteins in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **209**: 10-17.
- Shimizu, T., Huang, D., Yan, F., Stranova, M., Bartosova, M., Fojtikova, V. *et al.* (2015) Gaseous O<sub>2</sub>, NO, and CO in signal transduction: structure and function relationships of heme-based gas sensors and heme-redox sensors. *Chem Rev* **115**: 6491-6533.
- Singha, U. K., Hamilton, V., Duncan, M. R., Weems, E., Tripathi, M. K., and Chaudhuri, M. (2012) Protein translocase of mitochondrial inner membrane in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* **287**: 14480-14493.
- Ting, S. Y., Schilke, B. A., Hayashi, M., and Craig, E. A. (2014) Architecture of the TIM23 inner mitochondrial translocon and interactions with the matrix import motor. *J Biol Chem* **289**: 28689-28696.
- Tovar, J., Leon-Avila, G., Sanchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M. *et al.* (2003) Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* **426**: 172-176.
- van der Giezen, M. and Tovar, J. (2005) Degenerate mitochondria. *EMBO Rep* **6**: 525-530.
- Yang, J., Harding, T., Kamikawa, R., Simpson, A. G. B., and Roger, A. J. (2017) Mitochondrial Genome Evolution and a Novel RNA Editing System in Deep-Branching Heteroloboseids. *Genome Biol Evol* **9**: 1161-1174.