

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA PARAZITOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

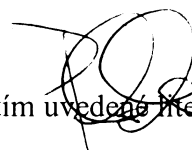
PRAHA 2006

**TRANSPORT PROTEINŮ MITOCHONDIÁLNÍHO TYPU *GIARDIA INTESTINALIS* DO
HYDROGENOSOMŮ *TRICHOMONAS VAGINALIS***

Petr Rada

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně a s použitím uvedené literatury.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the end.

Rád bych poděkoval všem, kteří mi pomáhali. Děkuji zejména vedoucímu diplomové práce Doc. RNDr. J. Tachezemu, Ph.D. a RNDr. P. Doležalovi za vydatnou pomoc a to nejen v laboratoři. Děkuji ti Mrtvá Rybo za poskytnutý odpočinek.

1. Úvod	1
1.1. Vznik eukaryotické buňky	1
1.2. Hydrogenosomy a mitosomy	3
2. Biogeneze Fe-S proteinů	7
2.1. Biosyntéza Fe-S center v mitochondriích	8
2.1.1. Cytosolická dráha maturace extramitochondriálních proteinů	10
2.2 Biogeneze Fe-S proteinů u <i>Trichomonas vaginalis</i> a <i>Giardia intestinalis</i>	11
3. Transport proteinů do mitochondrií	13
3.1. Cytosolické faktory	14
3.1.1. Transport proteinů do mitochondriální matrix	15
3.1.2. Proteiny vnitřní mitochondriální membrány	18
3.1.2.1 Proteiny vnitřní mitochondriální membrány kódované mitochondriální DNA	18
3.1.2.2 Proteiny vnitřní mitochondriální membrány kódované jadernou DNA	20
3.1.2.2.1. Transport proteinů do vnitřní mitochondriální membrány komplexem TIM22	21
3.1.3. Transport proteinů do mezimembránového prostoru	24
3.1.4. Transport proteinů do vnější mitochondriální membrány	26
4. Transport proteinů do hydrogenosomů	28
4.1. Proteiny hydrogenosomální matrix	28
4.2. Membránové proteiny	32
5. Transport proteinů do mitosomů	33

6. Cíle práce	35
7. Materiál a metodika	36
7.1. Použité organismy	36
7.1.1. <i>Trichomonas vaginalis</i>	36
7.1.2. <i>Giardia intestinalis</i>	36
7.1.3. <i>Escherichia coli</i>	36
7.1.4. Použité roztoky a média	36
7.2. Příprava konstruktů	37
7.2.1. PCR	38
7.2.1.1. GiiscU	38
7.2.1.2. ΔnGiiscU	38
7.2.1.3. GiiscS	39
7.2.1.4. ΔNGiiscS, ΔNGiiscS $\frac{1}{2}$	39
7.2.1.5. ΔCGiiscS, ΔCGiiscS $\frac{1}{2}$	39
7.2.1.6. ΔGiiscS	40
7.2.1.7. TviscS	41
7.2.1.8. ΔnTviscS	41
7.2.1.9. Giβ-tubulin	41
7.2.1.10. 5'-GiiscU. β-tubulin	41
7.2.1.11. Určení pozitivních klonů metodou PCR	42
7.2.2. Příprava expresního vektoru Master-Neo	42
7.2.3. Miniprecipitace rekombinantních plasmidů	42
7.2.4. Izolace rekombinantních plasmidů metodou „Merlin maxiprep“	43

7.3. Výpočet optimální koncentrace DNA pro transfekci	
trichomonád	44
7.4. Transfekce trichomonád expresním vektorem Master-Neo	44
7.5. Detekce rekombinantních proteinů v buňce	44
7.5.1. Příprava buňečných frakcí diferenciální centrifugací	45
7.5.2. Příprava buňečných frakcí izopyknicou centrifugací	45
7.5.3. Odstranění proteinů z povrchu hydrogenosomů trypsinem	46
7.5.4. SDS PAGE	46
7.5.5. Přeblování proteinů na nitroceluózovou membránu	46
7.5.6. Detekce rekombinantních proteinů na nitroceluózové membráně	47
7.5.7. Imunofluorescence	47
8. Výsledky	49
8.1. Identifikace signálních sekvencí pro transport do mitosomů a hydrogenosomů	49
8.1.1. Směrování mitosomálních proteinů do hydrogenosomů na základě N-koncových oblastí	50
8.1.2. Směrování mitosomálních proteinů do hydrogenosomů na základě předpokládaných interních sekvencí	56
9. Diskuze	62
10. Závěr	67
11. Seznam literatury	70
12. Příloha	86

1. Úvod

1.1. Vznik eukaryotní buňky

Vznik mitochondrie byl významnou událostí v evoluci eukaryotické buňky, ke které došlo před více než 1,5 mld let. Mitochondrie se patrně vyvinuly endosymbiózou v hostitelské buňce (Margulis a Bermudes, 1985; Margulis, 1996). Studium mitochondriálního proteomu a fylogenetické analýzy mitochondriálního genomu odhalilo, že endosymbiotický předek je patrně α -proteobakteriálního původu (Gray et al., 1999). Prozatím však není zcela jasné, jestli hostitelská buňka byla podobná dnešním archebakteriím anebo zdali se jednalo již o částečně vyvinutého eukaryota, který měl jádro, cytoskelet a jednoduchý endomembránový systém (tzv. archezoon) (Dyall et al., 2004). Během vývoje endosymbiontů v autonomní organely došlo k přenosu genetické informace do jádra hostitelské buňky a vzniku specializovaných transportérů, které zajišťovaly přenos metabolitů a transport proteinů kódovaných jádrem zpět do organel.

Podle ox-tox hypotézy získal archezoon endosymbiotického předka mitochondrie jako možnou selekční výhodu proti stoupající koncentraci kyslíku v zemské atmosféře. Metabolická aktivita endosymbionta chránila hostitele před oxidativním stresem patrně přeměnou kyslíku na vodu. V průběhu evoluce se hostitel naučil využívat ATP produkovanou oxidativním metabolismem pre-mitochondriálního endosymbionta (Kurland a Andersson, 1999).

Podle archezoální hypotézy se z archezoona, který endosymbionta nikdy nezískal, vyvinuli dnešní amitochondriální eukaryota, tzv. Archezoa (Cavalier-Smith, 1986, 1989) (obr. 1A). Mezi Archezoa patřily diplomonády, trichomonády, mikrosporidie a archaméby. Fylogenetické analýzy SSU rRNA malé ribosomální podjednotky a

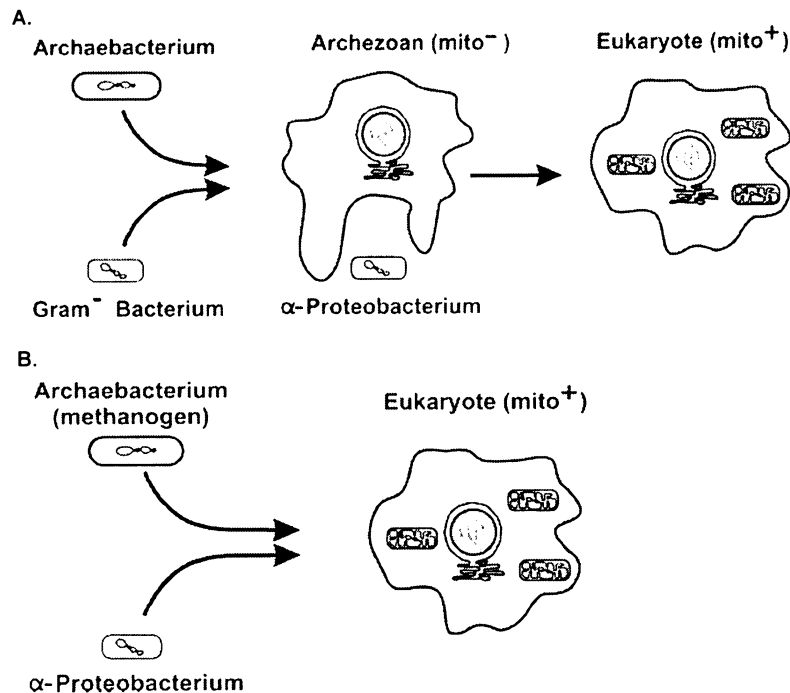
elongačních faktorů EF-1 α a EF-2 podpořily předpoklad, že diplomonády, trichomonády a mikrosporidie jsou starobylá eukaryota, která se oddělila od eukaryotní linie ještě před endosymbiózou mitochondriálního předka (Gray et al., 1999).

Podle vodíkové hypotézy došlo v anaerobním prostředí k endosymbióze mezi α -proteobakterií, která produkovala vodík a oxid uhličitý a metanogenní archebakterií, která tyto metabolity potřebovala pro svůj energetický metabolismus (obr. 1B). Po změně ve složení plynů v zemské atmosféře se metanogenní archebakterie stala na α -proteobakterii zcela závislá. Potlačení nebo ztráta anaerobního metabolismu vedla v aerobním prostředí ke vzniku mitochondrie, ztráta respirace směřovala vývoj endosymbionta v anaerobním prostředí ke vzniku hydrogenosomu (viz. níže) (Martin a Müller, 1998). Vodíková hypotéza tedy předpokládá, že na prvopočátku všech eukaryot byla endosymbióza mezi archebakterií a předkem mitochondrie. Nepřímým důkazem vodíkové hypotézy je intracelulární syntrofie mezi metanogenními bakteriemi a hydrogenosomy u volně žijících nálevníků *Trimyema* sp. a *Plagiopyla frontata*.

Přítomnost proteinů mitochondriálního typu u amitochondriálních eukaryot, jako např. valyl-tRNA syntetázy nebo proteinů tepelného šoku u diplomonád a trichomonád a dále fylogenetické analýzy tubulinu a RNA polymerázy II u mikrosporidií naznačily, že diplomonády, trichomonády, mikrosporidie a archaméby se možná oddělily od eukaryotní linie až po endosymbióze a že během evoluce patrně došlo ke druhotné ztrátě mitochondrie (Gray et al., 1999).

U amitochondriálních eukaryot se v průběhu evoluce vyvinuly organely ohraničené dvojitou membránou a to hydrogenosomy produkující vodík a ATP nebo nedávno objevené mitosomy. Studium biogeneze hydrogenosomů a mitosomů

naznačuje, že mitochondrie, hydrogenosomy a mitosomy se buďto vyvinuly ze společného endosymbionta α -proteobakteriálního původu anebo hydrogenosomy a mitosomy představují redukovanou formu mitochondrie (Embley et al., 2003; Dyall et al., 2004; Doležal et al., 2005).



Obr. 1. Alternativní hypotézy vzniku eukaryotní buňky

A. Vznik eukaryotní buňky podle archezoální hypotézy. Endosymbiotická teorie (SET, serial endosymbiotic theory) předpokládá, že endosymbióza mezi archebakterií a gram-negativní bakterií vedla především ke vzniku jádra a cytoskeletu archezoona (Margulis, 1996). B. Vznik eukaryotní buňky podle vodíkové hypotézy.

1.2. Hydrogenosomy a mitosomy

Hydrogenosomy nacházíme u prvoků a nižších hub, které žijí v anaerobním nebo mikroaerobním prostředí. Poprvé byly objeveny u trichomonád, parazitických prvoků kmene Parabasala (Lindmark a Müller, 1973; Čerkasovová et al., 1976). V současné době je známe také u volně žijících anaerobních nálevníků *Plagyopyla frontata*, *Trimyema* sp., *Sonderia* sp., dále bachorových nálevníků *Dasytrichia ruminantium*, *Isotricha* sp., *Dasytricha* sp., *Entodinium* sp., nálevníka *Nyctotherus ovalis* ze

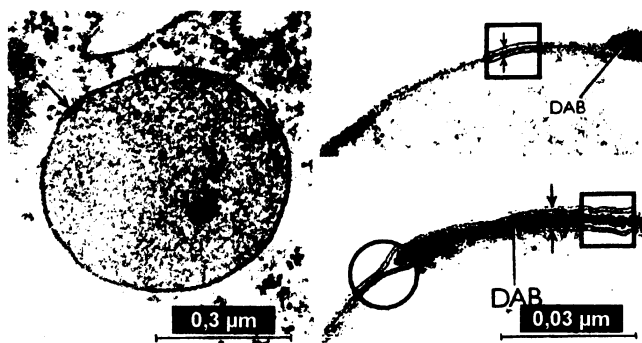
zaživacího traktu švába amerického, bachorových symbiotických chytridiomycet *Neocallimastix frontalis*, *Piromyces* sp. a améboflageláta *Psalterinomonas lanterna* (Yarlett et al., 1981, 1986; van Bruggen et al., 1984; Paul et al., 1990; Fenchel a Finlay, 1991; O'Fallon et al., 1991; Marvin-Sikkema et al., 1994; Hackstein et al., 1999; Boxma et al., 2005). Hydrogenosomy se u jednotlivých evolučně vzdálených skupin anaerobních protist liší jak strukturou tak i metabolickými dráhami. To naznačuje, že hydrogenosomy vznikly v průběhu evoluce u jednotlivých skupin nezávisle na sobě jako důsledek adaptace v prostředí chudém na kyslík (Müller, 1993). Společným rysem všech hydrogenosomů je produkce vodíku, dvojitá membrána, produkce ATP substrátovou fosforylací a absence DNA. Hydrogenosomy nálevníka *Nyctotherus ovalis* jsou jediným známým příkladem hydrogenosomální DNA. Vnitřní membrána těchto hydrogenosomů vytváří kristy a obsahuje kardiolipin. Některé geny hydrogenosomální DNA jsou homologní se svými protějšky mitochondriálního genomu volně žijících aerobních nálevníků. Přítomnost aktivity mitochondriálního respiračního komplexu I a II společně s produkcí vodíku naznačují, že hydrogenosomy *Nyctotherus ovalis* představují mezistupeň ve vývoji mezi mitochondrií a hydrogenosomem (Boxma et al., 2005).

Nejlépe jsou prozkoumané hydrogenosomy u parazitického prvoka *Trichomonas vaginalis*, který způsobuje lidské infekční onemocnění urogenitální trichomonózu a u *Tritrichomonas foetus*, významného patogena skotu. Hydrogenosomy *Trichomonas vaginalis* jsou orgány o velikosti 0,5-1,5 μm ohraničené dvěma těsně přiléhajícími membránami, které tvoří kristy a uzavírají granulární hydrogenosomální matrix. Matrix postrádá DNA a obsahuje amorfni elektrondensní nitro. V některých místech dochází k oddělení dvojice membrán za vzniku mezimembránových měchýřků s vysokou koncentrací vápenatých kationtů (obr. 2) (Benchimol et al., 1982;

Benchimol a De Souza, 1983). Hydrogenosomy se dělí podobně jako mitochondrie segmentací a příčným dělením (Benchimol et al., 1996). Hydrogenosomy *Trichomonas vaginalis* mají centrální úlohu v metabolismu karbohydrátů (Müller, 1993). Malát a pyruvát slouží jako substrát pro reakce prodloužené glykolýzy v hydrogenosomech. [4Fe4S] pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza (PFOR) katalyzuje oxidativní dekarboxylaci pyruvátu na acetyl-CoA a CO₂. Uvolněné elektrony přenáší [2Fe2S] ferredoxin mitochondriálního typu na [Fe] hydrogenázu, kde slouží k syntéze vodíku. Makroergní vazba acetyl-CoA se využívá pro syntézu ATP na úrovni substrátové fosforylace (Müller, 1993). NAD(P) jablečný enzym katalyzuje oxidativní dekarboxylaci malátu na pyruvát (Drmota et al., 1996). Elektrony uvolněné z NADH přenáší na [2Fe2S] ferredoxin katalytické podjednotky komplexu I mitochondriálního typu (Hrdý et al., 2004). Koncovými produkty hydrogenosomálního metabolismu je acetát, CO₂, vodík a ATP. Oproti mitochondriím neobsahují hydrogenosomy cytochromy ani enzymy Krebsova cyklu a nevykazují ani F₁F₀ ATPázovou aktivitu. Oxidativní dekarboxylaci pyruvátu katalyzuje namísto multimerního pyruvátdehydrogenázového komplexu (PDH) PFOR (Williams et al., 1987; Dyall a Johnson, 2000). Hydrogenosomy *Trichomonas vaginalis* katalyzují syntézu Fe-S center a maturaci Fe-S proteinů *in vitro* (Šut'ák et al., 2004). Fylogenetické analýzy genů pro IscS (viz. níže) ukázaly, že IscS homology anaerobních protist jsou blízce příbuzné svým α -proteobakteriálním protějškům (Tachezy et al., 2001; Emelyanov., 2003). Hydrogenosomy dále obsahují chaperony mitochondriálního typu Hsp70, Hsp60 a Hsp10 a membránový protein Hmp31, který je vzdáleně příbuzný s ADP/ATP transporéry vnitřní mitochondriální membrány

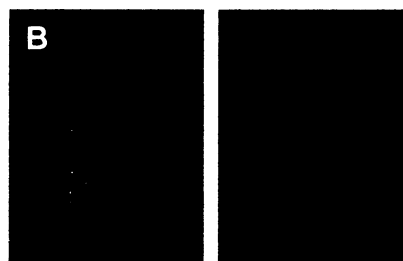
(Dyall a Johnson, 2000). Proteiny kódované jádrem se transportují v přítomnosti ATP do hydrogenosomální matrix posttranslačně a to podobným způsobem, jako je tomu u mitochondrií (Bradley et al., 1997; Dyall et al., 2000, 2003; Doležal et al., 2005a).

Obr. 2. Hydrogenosomy *Trichomonas vaginalis*



A. elektronová mikroskopie.

Vysvětlivky: cr, elektrondensní jádro; DAB, mezimembránové měchýřky s Ca^{2+} .



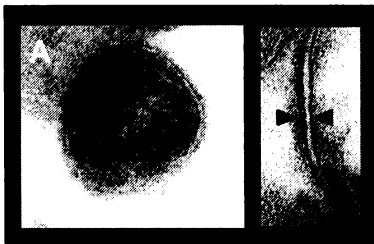
B. fluorescenční mikroskopie.

Detekce primární α -HA protilátky proti hydrogenosomálnímu jablečnému enzymu (viz. metodika).

Mitosomy (také kryptom) představují vysoce redukované, kryptické formy mitochondrie. Mitosomy byly popsány u améby *Entamoeba histolytica* a diplomonády *Giardia intestinalis* (obr. 3) (Tovar et al., 1999; Tovar et al., 2003). Přítomnost mitosomů byla předpovězená u mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* a poté nalezena u mikrosporidie *Trachipleistophora hominis* (Katinka et al., 2001; Williams et al., 2002). Organela s podobnou charakteristikou byla identifikovaná také u zástupce apikomplex *Cryptosporidium parvum* (Riordan et al., 2003). Mitosomy ohraničuje dvojice membrán, neobsahují DNA a narozdíl od mitochondrií a hydrogenosomů neprodukují ATP. Jedinou doposud známou funkcí mitosomů *Giardia intestinalis* je *de novo* syntéza Fe-S center a maturace Fe-S proteinů (Tovar et al., 2003). Mitosomy *Entamoeba histolytica* a *Cryptosporidium parvum* obsahují chaperon mitochondriálního typu Hsp60, mitosomy *Trachipleistophora hominis* a *Cryptosporidium parvum* obsahují homolog mitochondriálního chaperonu Hsp70

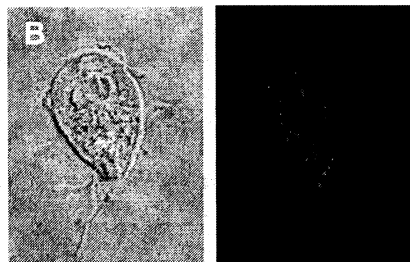
(Tovar et al., 1999; Riordan et al., 2003). *Cryptosporidium parvum* kóduje některé proteiny biosyntézy Fe-S center a to IscS, IscU a [2Fe2S] ferredoxin s předpokládanou signální sekvencí pro transport do mitosomů (LaGier et al., 2003).

Obr. 3. Mitosomy *Giardia intestinalis*



A. Elektronová mikroskopie.

Detekce primární α -HA protilátky proti rekombinantnímu GiiscU. Šipky označují dvojitou mitosomální membránu (Doležal et al., 2005).



B. Konfokální fluorescenční mikroskopie.

Detekce primární α -HA protilátky proti rekombinantnímu GiiscU (Doležal et al., 2005).

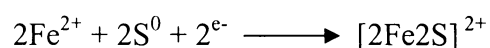
2. Biogeneze Fe-S proteinů

Fe-S centra jsou prostetické skupiny řady esenciálních proteinů, které se podílejí především na regulaci genové exprese, enzymové katalýze a na přenosu elektronů v elektron-transportních systémech (Lill a Müllenhof, 2005). Doposud známe tři hlavní systémy, které se podílejí na syntéze Fe-S center u bakterií. NIF systém je zodpovědný za syntézu Fe-S centra nitrogenázy u bakterií, které fixují dusík. ISC systém se podílí na syntéze Fe-S center a maturaci řady esenciálních proteinů. SUF systém syntetizuje a opravuje Fe-S centra především při oxidativním stresu a při nedostatku železa (Lill a Müllenhof, 2005). Systém proteinů podílejících se na tvorbě Fe-S center v mitochondriích je obdobný s ISC systémem syntézy Fe-S center u bakterií (Zheng et al., 1998). Syntéza Fe-S center a biogeneze Fe-S proteinů je esenciální funkcí mitochondrie.

2.1. Biosyntéza Fe-S center v mitochondriích

Současný model biosyntézy Fe-S center v mitochondriích je založený na poznatcích získaných především na kvasince *Saccharomyces cerevisiae* a na lidských tkáňových kulturách (obr. 4) (Lill a Müllenhof, 2005; Tong et al., 2003).

Biosyntézu Fe-S center katalyzují proteiny mitochondriální matrix¹. Pyridoxal-5-fosfát-dependentní cystein desulfuráza IscS (Nfs1) katalyzuje produkci L-alaninu a elementární síry z L-cysteinu (Schwartz et al., 2000). Vzniklá síra se po uvolnění z IscS transportuje na IscU, kde dochází k vazbě redukováného železa a vzniku přechodného Fe-S centra. Zdrojem železa je pravděpodobně frataxin (Yfh1) (Yoon a Covan, 2003). Frataxin váže a přenáší železo na IscU *in vitro*, *in vivo* interaguje s IscU nebo s IscS/IscU komplexem v přítomnosti železnatých kationtů (Gerber et al., 2003). Deficience frataxinu má za následek narušení biogeneze Fe-S proteinů, akumulaci železa v mitochondrii, pokles hemu a oxidativní stres, u lidí způsobuje neurodegenerativní nemoc Fridreichovu ataxii (Lange et al., 2004; Puccio a Koenig, 2002). Pro biosyntézu Fe-S center je nezbytná redukce elementární síry (S⁰) na persulfid (S²⁻), který tvoří Fe-S centra :



Dva elektrony poskytují železnaté kationty, původ dalších dvou je prozatím nejasný (Krebs et al., 2001). Pravděpodobně je však poskytuje redukováný ferredoxin (Yah1), který získává elektrony z NADH ferredoxin reduktázy (Arh1) (Müllenhof et al., 2002; Lill a Müllenhof, 2005). Absence Yah1 v kvasinkách má za následek výrazný pokles maturace mitochondriálních a extramitochondriálních proteinů (Lange et al., 2000; Li et al., 2001).

¹ Pokud není uvedeno jinak, v závorkách jsou napsané homology bakteriálních proteinů v kvasince.

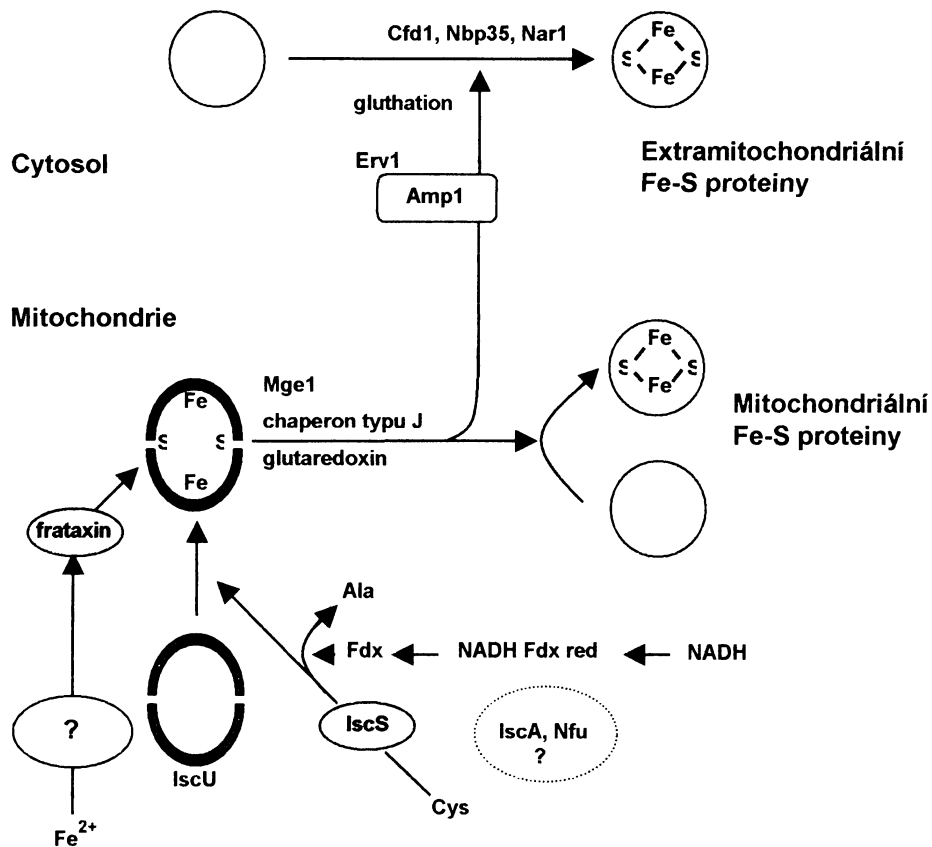
Disociaci a přenos přechodného Fe-S centra z IscU (Isu1) na Fe-S apoproteiny pravděpodobně umožňují chaperony Hsp70 (Ssq1), chaperony tzv. typu J (Jac1) a Mge1. Jac1 stimuluje ATPázovou aktivitu Ssq1, který se po hydrolyze ATP váže na specifickou oblast IscU (Isu1) (Dutkiewitz et al., 2004). Výměna ADP/ATP vyžaduje přítomnost faktoru Mge1 a vede k disociaci Ssq1 z IscU (Isu1). Homologní bakteriální systém Hsc20 (Jac1) / Hsc66 (Ssq1) vzhledem k nižší afinitě chaperonu Hsc66 k ADP zřejmě žádný faktor (bakteriální homolog GrpE) k výměně ADP/ATP nepotřebuje (Lill a Müllenhof, 2005). Dalším článkem v biosyntéze Fe-S center je IscA (Isa1, Isa2). IscA (Isa1, Isa2), podobně jako IscU (Isu1) slouží jako lešení pro tvorbu přechodného Fe-S centra (Kaut et al., 2000; Lill a Kispal., 2000). Další hypotéza předpokládá, že IscA je v prostředí chudém na železo schopné přenášet a poskytovat mononukleární železo IscU pro biosyntézu Fe-S center (Ding et al., 2004). Delece genů kódujících Isa1/Isa2 proteiny má za následek narušení biogeneze *de novo* a ztráty aktivit několika mitochondriálních proteinů (Kaut et al., 2000; Pelzer et al., 2000). Dalším doposud objeveným proteinem, který se účastní biosyntézy Fe-S center v mitochondrii je Nfu1. Předpokládá se, že Nfu1 vytváří alternativní lešení pro přechodná Fe-S centra. Delece Nfu1 není pro buňku letální, delece Nfu1 společně s Isu1 však ano. To vysvětluje doplňující, dodatečnou funkci Nfu1 k Isu1 v biosyntéze Fe-S center (Schilke et al., 1999). Zajímavostí je homologie Nfu1 k C-terminální a homologie IscU (Isu1, Isu2) k N-terminální doméně bakteriálního NifU (Yuvaniyama et al., 2000). NifU se účastní tvorby Fe-S centra nitrogenázy jako součást NIF systému bakterií, které fixují dusík v podobě amoniaku (Reeds a Howard, 2000). Mitochondriální dráha je zapotřebí pro maturaci nejen mitochondriálních, ale i cytosolických a jaderných Fe-S proteinů (Kispal et al., 1999). Způsob, jakým se Fe-S centra transportují z mitochondriální matrix do cytosolu je

prozatím ne zcela jasný. Doposud byly identifikovány tři komponenty : Atm1, Erv1 a glutation, které se podílejí na tomto procesu. Atm1 je jediný doposud známý ABC transportér v mitochondriích kvasinek. ABC transportéry hydrolyzují ATP v kompartmentu odkud probíhá export. Protože ATP-vazebná oblast Atm1 směřuje do matrix, může Atm1 transportovat Fe-S centra z matrix do cytosolu (Kispal et al., 1999). V mezimembránovém prostoru mitochondrie je lokalizovaná sulfhydryl oxidáza Erv1. Erv1 je nezbytná k maturaci extramitochondriálních Fe-S proteinů. Způsob, jakým se podílí na transportu Fe-S center je prozatím neznámý (Lange et al., 2001). Tripeptid glutation jako hlavní zdroj redukční síly chrání buňku před oxidativním stresem. Jeho delece má za následek, kromě inhibice růstu, akumulaci železa v mitochondrii a inaktivaci extramitochondriálních Fe-S proteinů. Předpokládá se, že glutation slouží jako chelátor a tím stabilizuje Fe-S centra během transportu do cytosolu (Sipos et al., 2002).

2.1.1. Cytosolická dráha maturace extramitochondriálních proteinů

Doposud tři identifikované cytosolické faktory se podílejí na maturaci cytosolických a jaderných Fe-S proteinů (Roy et al., 2003). Cfd1 a Nbp35 jsou homologní s tzv. solubilními „P-loop“ ATPázami a blízkce příbuzné Mrp proteinům, které se podílejí na tvorbě Fe-S center u bakterií (Roy et al., 2003; Hausmann et al., 2005). Až na N-terminální doménu Nbp35, která obsahuje Fe-S centrum, jsou si Cfd1 a Nbp35 strukturně velice podobné. Jejich delece má za následek výrazné snížení aktivit cytosolických a jaderných Fe-S proteinů, metabolismus železa v mitochondrii je bez defektu. Prozatím poslední objevený cytosolický faktor podílející se na maturaci extramitochondriálních Fe-S proteinů je Nar1. Nar1 je Fe-S protein homologní s [Fe] hydrogenázami, ale neprodukuje ani nespotřebovává vodík (Balk et al., 2004). Je

zajímavé, že tyto proteiny byly nově identifikovány také v jádře. Je otázkou, kde dochází k maturaci jaderných proteinů, zdali získají Fe-S centrum již v cytosolu nebo až v jádře.



Obr. 4. Model maturace mitochondriálních a extramitochondriálních Fe-S proteinů u eukaryot.

Vysvětlivky: Fdx, ferredoxin; NADH Fdx red, NADH ferredoxin reduktáza. Přesná funkce IscA a Nfu není známá.

2.2 Biogeneze Fe-S proteinů u *Trichomonas vaginalis* a *Giardia intestinalis*

K tvorbě Fe-S center dochází u *Trichomonas vaginalis* v hydrogenosomech. Systém proteinů, které katalyzují *de novo* syntézu Fe-S center v těchto organelách je homologní s mitochondriálním systémem. (Tachezy et al., 2001; Šuťák et al., 2004). Homology IscU (TviscU), IscA (TviscA), [2Fe2S] ferredoxinu (Tvfdx), frataxinu, IscS (TviscS-2), Hsp70, Saq1, Mge1 a Isd11 a obsahují předpokládané krátké N-

koncové sekvence pro transport do hydrogenosomální matrix. Hydrogenosomální lokalizace je experimentálně ověřená u výše zmíněných proteinů s výjimkou IscA, Saq1, Mge1 a Isd11 (Doležal et al., 2005a; Doležal et al., 2005b; Tachezy, nepub. data). Homology Atm1, Erv1 a glutationu, které se v mitochondriích patrně podílejí na transportu Fe-S center do cytosolu nejsou u trichomonád doposud objevené. V genomu *Trichomonas vaginalis* jsou přítomné homology proteinů Narf1 a Nbp35, které se v cytosolu kvasinek podílejí na biogenezi extramitochondriálních proteinů. Biogeneze Fe-S proteinů odehrávající se v cytosolu trichomonád není doposud známá (Doležal, nepub. data). Na rozdíl od mitochondrie *Trichomonas vaginalis* kóduje homology bakteriálního HYD systému, který je nezbytný pro biogenezi specifického Fe-S centra (tzv. H centrum) [Fe] hydrogenáz (Putz et al., 2006; Forestier et al., 2003).

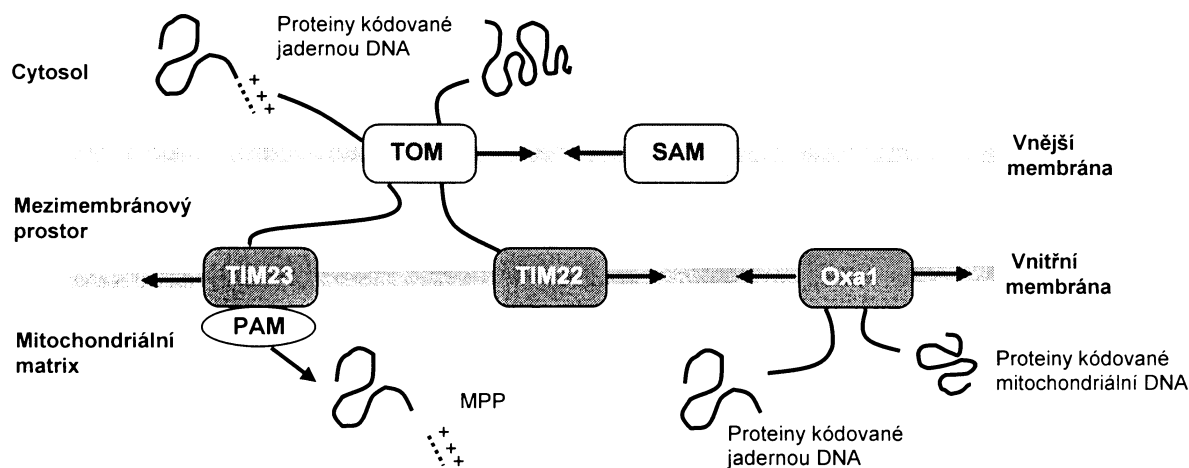
Jedinou doposud známou funkcí mitosomů *Giardia intestinalis* je *de novo* syntéza Fe-S center a maturace Fe-S proteinů *in vitro* (Tovar et al., 2003). Homology IscU (GiiscU), [2Fe2S] ferredoxinu (Gifdx), glutaredoxinu a IscA (GiiscA) obsahují podobně jako hydrogenosomální homology předpokládanou krátkou N-koncovou signální sekvenci pro transport do mitosomů (Tab. 3). Homology IscS (GiiscS) a Hsp60 (GiHsp60) směřují do mitosomů patrně prozatím neidentifikované interní signály. Mitosomální lokalizace je experimentálně ověřená u výše uvedených s výjimkou GiiscA a glutaredoxinu (Tachezy, nepub. data; Doležal et al., 2005a; Regoes et al., 2005).

3. Transport proteinů do mitochondrií

Současný model transporu proteinů do mitochondrií je založený především na poznatcích získaných na kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, na plísni *Neurospora crassa* a na lidských tkáňových kulturách. Mitochondrie kvasinek obsahují přibližně 800 a lidské mitochondrie asi 1500 odlišných proteinů. Jaderná DNA kóduje přibližně 99 % všech mitochondriálních proteinů. Mitochondriální DNA kóduje u kvasinek 8 a u lidí 13 proteinů (Sickmann et al., 2003; Taylor et al., 2003; Westerman a Neupert, 2003). Počet identifikovaných mitochondriálních proteinů však s velkou pravděpodobností není konečný. Původní předpoklad se neshoduje se studiemí mitochondriálního proteomu, které zdaleka ještě nejsou u konce (Rehling et al., 2004).

Mitochondriální proteiny, které kóduje jaderná DNA, se syntetizují v cytosolu na volných ribosomech. Proteiny se transportují do mitochondrií na základě specifických signálů. Proteiny transportují na místo určení transportéry vnější mitochondriální membrány TOM a SAM (syn. TOB) a transportéry vnitřní mitochondriální membrány TIM22, TIM23, PAM a Oxa1 (obr. 5). TOM, TIM23 a PAM transportují proteiny do mitochondriální matrix. TOM, TIM22, TIM23 a Oxa1 transportují proteiny do vnitřní mitochondriální membrány, TOM a SAM (syn. TOB) transportují proteiny do vnější mitochondriální membrány.

Proteiny vnitřní mitochondriální membrány, které kóduje mitochondriální DNA, se syntetizují na ribosomech v mitochondriální matrix a do vnitřní mitochondriální membrány se transportují komplexem Oxa1 (obr. 5).



Obr. 5. Transport proteinů do mitochondrií.

Po transportu prekurzoru do mitochondriální matrix odštěpí jeho signální sekvenci proteáza mitochondriální matrix (MPP).

3.1. Cytosolické faktory

Po exportu mRNA mitochondriálního prekurzoru do cytosolu začnou volné cytosolické ribosomy s jejím překladem. Přeložené nascentní prekurzory (tzv. časná fáze překladu) se za asistence molekulárních chaperonů (Hsp70, Hsp90, MSF) a v přítomnosti ATP transportují do mitochondrie post-translačně.

V tzv. pozdní fázi překladu vytvoří mRNA společně s ribosomy stabilní polysomální komplex, který se za asistence molekulárních chaperonů dostane do kontaktu s mitochondriálním povrchem a právě syntetizované prekurzory začnou vstupovat do mitochondrie ko-translačně (Knox et al., 1998; Lithgow, 2000).

Krátké a hydrofilní prekurzory pravděpodobně asistenci chaperonů pro transport do mitochondrií nepotřebují.

3.1.1. Transport proteinů do mitochondriální matrix

Vstupní branou do mitochondrie je transportér vnější mitochondriální membrány TOM. Komplex tvoří 7 různých podjednotek o celkové relativní molekulové hmotnosti 450 kDa, které můžeme rozdělit podle struktury a funkce do tří skupin. Do první skupiny patří receptory Tom20, Tom22 a Tom70, do druhé hlavní podjednotka transportního póru Tom40 a do třetí malé strukturní proteiny Tom5, Tom6 a Tom7 (Hill et al., 1998; van Wilpe et al., 1999). Proteiny určené pro funkci v mitochondriální matrix nebo některé proteiny vnitřní mitochondriální membrány s jedním transmembránovým úsekem se syntetizují v cytosolu jako prekurzory s N-koncovou signální sekvencí. Signální sekvence jsou bohaté na základní aminokyseliny arginin, lysin a na hydroxylované aminokyseliny serin a threonin. Kyselina asparagová a kyselina glutamová se v sekvencích nevyskytují (Hendrick et al., 1989). N-koncová sekvence má za fyziologických podmínek v buňce kladný náboj a vytváří amfipatické α -helixy. Hydrofobní část helixu rozeznává specifickou oblastí receptor Tom20, kladně nabitou část receptor Tom22 (Brix et al., 1999; Muto et al., 2000). Za účasti malé podjednotky Tom5 vstupuje prekurzor do transportního kanálu (GIP). Transportní kanál tvoří esenciální podjednotka Tom40 a dále se na jeho struktuře podílejí receptory Tom20 a Tom22. β -struktura Tom40 vytváří v membráně sudovitý kanál s hydrofobním povrchem a hydrofilním vnitřkem (Hill et al., 1998; Model et al., 2002). Malé podjednotky Tom6 a Tom7 jsou nezbytné pro stabilitu a správnou funkci komplexu TOM (Model et al., 2001). Jakmile prekurzor vystoupí z transportního kanálu do mezimembránového prostoru, interaguje s jeho signální sekvencí C-koncová doména receptoru Tom22 (Ishihara et al., 1998).

Transportér vnitřní mitochondriální membrány tvoří transmembránový komplex TIM23 a k němu směrem z matrix asociovaný komplex PAM (Mokranjac et al.,

2003a,b; Chacinska et al., 2005). Tim21 interaguje za asistence Tim17 s C-koncovou doménu receptoru Tom22. Tímto způsobem přidrží Tim21 komplex TOM v těsném kontaktu s komplexem TIM23 a napomáhá transportu prekurzorů do dalších mitochondriálních oddílů (Chacinska et al., 2005). C-koncová doména Tim50, která je v těsném kontaktu s TOM komplexem směřuje prekurzory z Tom22 do transportního kanálu Tim23 (Truscott et al., 2001a,b). N-koncová doména transportního kanálu slouží jako receptor pro signální sekvence mitochondriálních prekurzorů, C-koncová doména tvoří transportní kanál o průměru ~ 13Å (Truscott et al., 2001a,b). Transport proteinů vyžaduje transmembránový elektrochemický potenciál $\Delta\psi$ ustanovený skrze vnitřní mitochondriální membránu. V mezimembránovém prostoru je kladný, v matrix záporný. Membránový potenciál ovlivňuje strukturu transportního kanálu a dále funguje jako hnací síla pro transport amfipatických α -helixů, které prostupují přes transportní kanál do mitochondriální matrix (Hill et al., 1998; Truscott et al., 2001a,b).

Komplex PAM slouží během translokace jako molekulární motor, který za hydrolýzy ATP pohání transport prekurzorů do mitochondriální matrix. Komplex tvoří několik podjednotek, které zahrnují Hsp70 chaperon mitochondriálního typu a protein tzv. DnaJ typu, Pam18 (syn. Tim14). Pam18 je integrální membránový protein. Po uvolnění Tim21 interaguje krátký N-koncový úsek Pam18 s integrální podjednotkou Tim17 a tím funkčně propojuje TIM23 komplex s PAM komplexem (Chacinska et al., 2005; Perry a Lithgow, 2005). J-doména Pam18 je homologní s DnaJ proteiny bakterií a obsahuje specifický HPD motiv (histidin, prolin, asparagová kyselina). HPD motiv Pam18 je esenciální pro stimulaci ATPázové aktivity mtHsp70 směrem k hydrolýze ATP (Liu et al., 2003; Truscott et al., 2003b). Pam16 (syn. Tim16) má C-koncovou oblast homologní k J-doméně Pam18. Narozdíl od Pam18 postrádá J-doména Pam16 HPD motiv. Degenerovaná J-doména Pam16 interaguje s J-doménou Pam18 a

umísťuje ji do těsné blízkosti transportního kanálu (D'Silva et al., 2005). Stabilní interakce mezi Pam16, Pam18 a mtHsp70 je esenciální pro import proteinů. Ke stabilizaci komplexu Pam16/Pam18/mtHsp70 a k jeho interakci s komplexem TIM23 přispívá integrální membránový protein Pam17 a periferní membránový protein Tim44 (D'Silva et al., 2004; Laan et al., 2005; Perry a Lithgow, 2005). MtHsp70 je homologní s bakteriálními DnaK proteiny. N-koncová doména váže a hydrolyzuje ATP, C-koncová doména komunikuje s peptidy. Cyklus navázání, hydrolyzy a disociace ATP u mtHsp70 je nezbytný pro transport prekurzorů. ATP hydrolyzu stimuluje Pam18, výměnu ADP za ATP zprostředkuje Mge1 (bakteriální homolog GrpE) (Ostermann et al., 1990; Scherer et al., 1990; Hartl, 1996; Bukau a Horwich, 1998; Liu et al., 2003; D'Silva et al., 2004). Zim17 (Tim15) sice není součástí PAM komplexu, ale interaguje s mtHsp70 a zabraňuje jejich agregaci (van der Laan et al., 2005). Po úspěšném transportu prekurzoru do matrix oddisociuje PAM komplex z Tim17 a uvolní místo pro Tim21 (Perry a Lithgow, 2005).

Po transportu prekurzoru do mitochondriální matrix odštěpí jeho N-koncovou signální sekvenci proteáza mitochondriální matrix (MPP) (Wiedemann et al., 2004). MPP je dimer. Podjednotka β -MPP váže do aktivního místa zinečnaté kationty, podjednotka α -MPP váže signální sekvenci prekurzoru. Katalytickou aktivitu proteázy má podjednotka β -MPP (Brown et al., 2004).

Proteiny s mnohačetnými transmembránovými úseky se dále transportují do vnitřní mitochondriální membrány Oxa1 komplexem, proteiny mitochondriální matrix se za asistence chaperonů mtHsp70, Hsp60, Hsp10 a hydrolyzy ATP sbalí do funkčního stavu (Schatz, 1996).

3.1.2. Proteiny vnitřní mitochondriální membrány

3.1.2.1. Proteiny vnitřní mitochondriální membrány kódované mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA (obr. 6) kóduje vysoce hydrofobní podjednotky komplexů respiračního řetězce, jako např. cytochrom *b* podjednotku cytochrom *bc*₁ komplexu, Cox1, Cox2 a Cox3 podjednotky cytochrom *c* oxidázy nebo některé podjednotky F₁F₀ ATPázy (Stuart, 2002). Proteiny transportuje z matrix do vnitřní mitochondriální membrány komplex Oxa1. Oxa1 komplex váže C-koncovou hydrofilní oblastí v matrix aktivní ribosomy a zprostředkovává ko-translační transport proteinů (Stuart, 2002). Ko-translační transport brání hydrofobním proteinům asociovat v hydrofilním prostředí matrix do multiproteinových komplexů a zároveň vytváří hnací sílu pro jejich vložení do vnitřní membrány (Stuart, 2002).

Cox2 podjednotka cytochrom *c* oxidázy se syntetizuje v matrix jako prekurzor s N-koncovou hydrofobní sekvencí (pCox2). Transport hydrofilních oblastí pCox2 s negativním nábojem vyžaduje dostatečný membránový potenciál $\Delta\psi$ ustanovený skrze vnitřní mitochondriální membránu. N-koncovou hydrofobní sekvenci odštěpí v mezimembránovém prostoru za asistence chaperonu Cox20 proteáza Imp1/Imp2 (Nunnari et al., 1993; Stuart, 2002). Podjednotky Cox1, Cox3 nebo cytochrom *b* transportuje komplex Oxa1 do vnitřní membrány i bez přítomnosti membránového potenciálu $\Delta\psi$ (Stuart, 2002).

Proteiny, jako např. cytochrom *b* nebo Su6 podjednotka F₁F₀ ATPázy se transportují do vnitřní membrány odlišnou, alternativní cestou, která pro transport proteinů nutně funkční Oxa1 komplex nepotřebuje (Preuss et al., 2001; Truscott et al., 2003a).

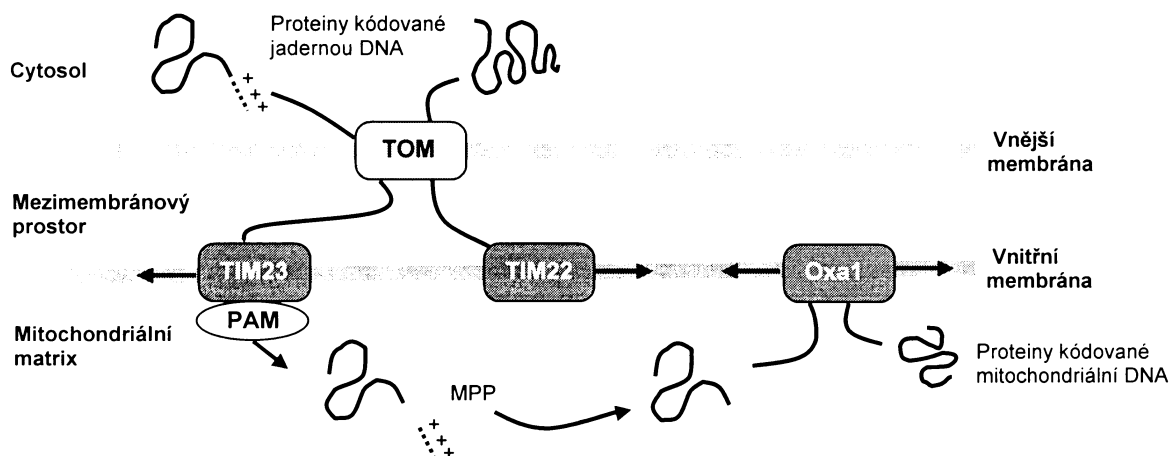
U prokaryot transportuje proteiny do vnitřní membrány SecYEG transportér (Sec-závislý transport) nebo YidC transportér (Sec-nezávislý transport). Oxa1 podjednotka je homologní společně s Albino3 (Alb3) proteinem thylakoidní membrány chloroplastů a s YidC homology gram-pozitivních a gram-negativních bakterií, s kterými tvoří evolučně homogenní skupinu proteinů. Prapředeck Oxa1 komplexu byl tedy patrně bakteriálního původu a zastával klíčovou úlohu v biogenezi budoucí mitochondrie a plastidů (Samuelson et al., 2000; Stuart a Neupert, 2000; Stuart, 2002).

SecYEG transportér je homologní s Sec61 $\alpha\beta\gamma$ transportérem endoplasmatického retikula eukaryot. SecY/Sec61 α podjednotka vytváří v membráně kanál, skrze který jsou proteiny transportovány do periplasmy bakterií nebo do lumen endoplasmatického retikula. Proteiny s transmembránovými úseky se začleňují při průchodu transportérem SecYEG/ Sec61 $\alpha\beta\gamma$ do lipidové dvojvrstvy příslušných membrán. Bakterie vyžadují pro transport proteinů ATPázu SecA a membránový potenciál ustanovený skrze vnitřní bakteriální membránu. SecA specificky interaguje s N-koncem polypeptidu a s podjednotkou SecY transportéru SecYEG. N-konec polypeptidu je během transportu specificky navázaný na ATPázu SecA a podjednotku SecY. Prekurzor se transportuje za hydrolýzy ATP ATPázou SecA skrze kanál SecY do periplasmy ve směru od N k C-konci transportovaného polypeptidu. Nakonec disociuje N-konec polypeptidu z SecA/SecY a prekurzor je uvolněn periplasmy. Prekurzory jsou transportovány do endoplasmatického retikula ko-translačně nebo post-translačně. Během kotranslačního transportu interaguje v cytosolu N-konec právě překládaného polypeptidu s SRP (signal recognition particle) a s transportérem Sec61 $\alpha\beta\gamma$. Hnací sílu pro transport poskytují aktivní ribosomy, které jsou navázané na povrch transportéru Sec61 $\alpha\beta\gamma$. Prekurzor je podobně jako u bakterií transportován do

lumen endoplasmatického retikula ve směru od N k C-konci transportovaného polypeptidu. Nakonec disociuje N-konec polypeptidu z transportéru Sec61 $\alpha\beta\gamma$ a prekurzor je uvolněn do lumen endoplasmatického retikula. Při post-translačním transportu je prekurzor po syntéze v cytosolu udržovaný cytosolickými chaperony v nesbaleném stavu. N-konec polypeptidu naváže transportér Sec61 $\alpha\beta\gamma$. Prekurzor je částečně transportován Sec α kanálem do lumen endoplasmatického retikula, kde s transportovaným polypeptidem prekurzoru interagují chaperony BiP. Chaperony se za hydrolyzy ATP pevně vážou na polypeptidivý řetězec transportovaného prekurzoru. Výměna ATP za ADP způsobí uvolnění chaperonů z polypeptidu. Cyklus hydrolyzy a výměny ADP za ATP vede k transportu polypeptidu do lumen endoplasmatického retikula. Ko-translační ani post-translační transport nevyžadují membránový potenciál ustanovený skrze membránu endoplasmatického retikula. Homology podjednotek SecY/Sec61 α a SecE/Sec61 β jsou přítomné u archebakterií, eubakterií a eukaryot. Podjednotka SecE/Sec61 β chybí u eubakterií. Narozdíl od podjednotek Sec α a Sec γ není podjednotka Sec β u kvasinek esenciální pro transport proteinů. Fylogenetické analýzy homologů podjednotek transportéru SecYEG/ Sec61 $\alpha\beta\gamma$ jsou nezbytné pro pochopení, jakým způsobem se předek tohoto transportéru podílel na vývoji vznikající eukaryotní buňky (Osborne et al., 2005).

3.1.2.2 Proteiny vnitřní mitochondriální membrány kódované jadernou DNA

Doposud známe tři hlavní cesty transportu proteinů do vnitřní mitochondriální membrány, které kóduje jaderná DNA (obr. 6). Proteiny s N-koncovou signální sekvencí následovanou jedním transmembránovým úsekem se začleňují do vnitřní mitochondriální membrány během transportu TIM23 komplexem (viz. níže) (Stuart a Neupert, 1996). Proteiny s N-koncovou signální sekvencí následovanou několika



Obr. 6. Transport proteinů do vnitřní mitochondriální membrány.

transmembránovými úseky se transportují do mitochondriální matrix. Po odštěpení signální sekvence proteázou mitochondriální matrix (MPP) se proteiny transportují do vnitřní membrány komplexem Oxa1. Hydrofobní membránové proteiny s několika transmembránovými úseky se transportují do vnitřní mitochondriální membrány na základě interních signálů komplexem TIM22.

3.1.2.2.1. Transport proteinů do vnitřní mitochondriální membrány komplexem TIM22

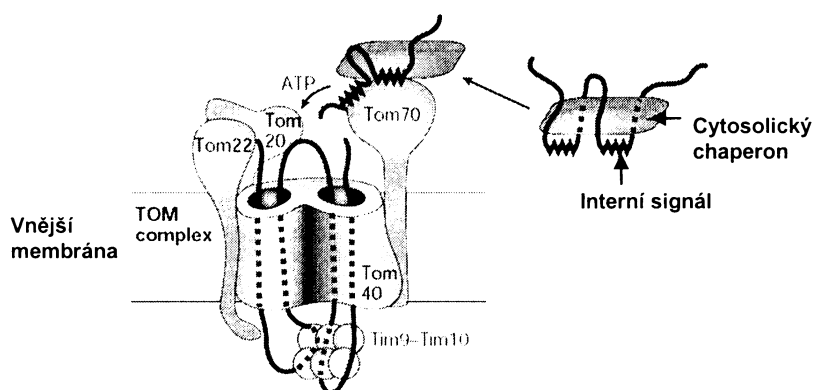
Proteiny, jako např. ADP/ATP transportéry, přenašeče fosfátu, podjednotka Tim23 komplexu TIM23, podjednotky Tim17 a Tim22 komplexu TIM22, se transportují do vnitřní mitochondriální membrány komplexem TIM22.

Předčasnému sbalení a agregaci prekurzorů v hydrofilním prostředí cytosolu brání cytosolické chaperony Hsp70, popř. Hsp90 (Hsp90 je homodimer, obě podjednotky mají ATPázovou aktivitu) (Young et al., 2003). Komplex prekurzoru s navázanými chaperony rozpozná receptor TOM komplexu Tom70 (Rehling et al., 2001). Tom70 obsahuje dvě vazebná místa. Jedno pro interní signály prekurzoru, druhé pro

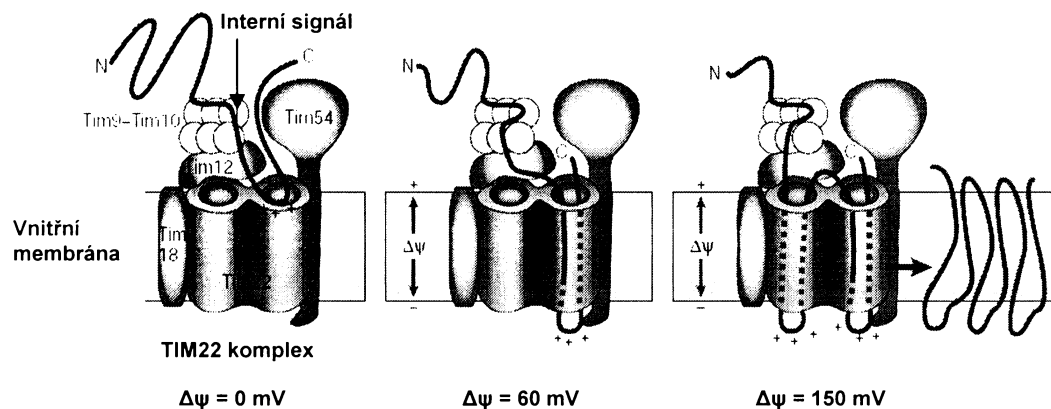
cytosolické chaperony. Je zajímavé, že až tři dimery Tom70 jsou zapotřebí pro rozpoznání prekurzoru (Meisinger et al., 1999). Následný transport vyžaduje přítomnost ATP pro disociaci prekurzoru od receptoru a navázaných chaperonů (Rehling et al., 2004). Prekurzor při průchodu dvěma kanály Tom40 vytvoří dvojitou vlásenku (obr. 7). Oba její konce směřují do cytosolu, cípy vlásenky směřují do mezimembránového prostoru. Tim9-Tim10 komplex okamžitě rozpozná hydrofobní úseky vlásenky jakmile se objeví v mezimembránovém prostoru a následně transportuje prekurzor k TIM22 komplexu vnitřní mitochondriální membrány (Rehling et al., 2001). Tim9-Tim10 komplex tvoří tři Tim9 a tři Tim10 podjednotky. Strukturně a funkčně podobný Tim8-Tim13 komplex je zapotřebí pro transport Tim23 podjednotky TIM23 komplexu do vnitřní membrány (Koehler et al., 1998; Rehling et al., 2004). Tyto tzv. malé Tim proteiny vytvářejí motiv zinkového prstu. Je otázkou, jakým způsobem se motiv podílí na funkci malých Tim proteinů a tím pádem i na biogenezi mitochondriálních proteinů (Rehling et al., 2004).

TIM22 je hlavním transportérem proteinů vnitřní mitochondriální membrány. Komplex TIM22 tvoří tři transmembránové podjednotky Tim18, Tim22 a Tim54 a směrem z mezimembránového prostoru pevně navázaná malá Tim12 podjednotka o celkové relativní molekulové hmotnosti 320 kDa. Tim22 podjednotka vytváří průchozí kanál o dvou otvorech, každý o průměru 16Å. To odpovídá předpokladu, že podobně jako Tom40 je Tim22 schopný transportovat zároveň dva α -helixy najednou a že prekurzor může v kanálu vytvářet strukturu dvojité vlásenky (Rehling et al., 2003). Membránový potenciál $\Delta\psi$ je jediným zdrojem vnější energie pro transport prekurzorů do vnitřní mitochondriální membrány. Za fyziologických podmínek má membránový potenciál ustanovený skrze vnitřní mitochondriální membránu hodnotu mezi 150-180

mV (Kovermann et al., 2002). Současná představa o funkci TIM22 komplexu vychází především ze studií *in vitro* transportu proteinů do mitochondrií kvasinek (obr. 8). Transportovaný prekurzor s navázaným Tim9-Tim10 komplexem vstupuje do mezimembránového prostoru, kde při nulovém membránového potenciálu asociuje na základě hydrofobních interakcí s Tim12 podjednotkou TIM22 komplexu. Při malém membránovém potenciálu (60 mV) dojde k částečnému transportu prekurzoru do prvního kanálu TIM22 komplexu. Některé pozitivně nabitě části prekurzoru se dostanou působením elektroforetické síly do negativní matrix, polypeptid vytvoří v kanálu vlásenku a malé Tim proteiny disociují do mezimembránového prostoru. Dostatečně velký membránový potenciál (150 mV) a také přítomnost interního signálu vyvolá strukturální změny v TIM22 komplexu, které vedou k uzavření prvního kanálu a otevření druhého. To umožní transportovat další hydrofobní α -helixy prekurzoru. Ke vložení prekurzoru do vnitřní mitochondriální membrány je zapotřebí, aby se oba kanály spojily v jeden. Následně se vzniklý kanál na základě narušení van der Waalsových interakcí laterálně otevře a uvolněný prekurzor se za asistence TIM22 komplexu postupně vloží do vnitřní mitochondriální membrány (Rehling et al., 2004).



Obr. 7. Transport proteinů do vnitřní membrány komplexem TOM.



Obr. 8. Transport proteinů do vnitřní membrány komplexem TIM22.

Interní signál je pro orientaci zvýrazněný červeně (podle Rehling et al., 2004).

3.1.3. Transport proteinů do mezimembránového prostoru

Neexistuje jednotný způsob transportu proteinů do mezimembránového prostoru.

Cytochrom *c* nebo malé Tim proteiny (Tim8, Tim9, Tim10, Tim12, Tim13) se syntetizují v cytosolu bez N-koncové signální sekvence. Prekurzory se délkou polypeptidového řetězce shodují s velikostí maturovaných proteinů ($M_r \leq 20$ kDa) (Lutz et al., 2003; Chacinska et al., 2004). Malé Tim proteiny nevyžadují pro transport do mezimembránového prostoru membránový potenciál $\Delta\psi$ ani přítomnost ATP (Lutz, 2003). Prekurzory nespecificky procházejí TOM komplexem ve velice slabě sbaleném stavu a v mezimembránovém prostoru interagují s proteinem vnitřní mitochondriální membrány Mia40. Mia40 je esenciální pro kompletní transport prekurzoru do mezimembránového prostoru a dále je zapotřebí pro sbalení malých Tim proteinů (Chacinska et al., 2004). Prekurzory obsahují cysteiny, které jsou uspořádané do specifické oblasti polypeptidu a poskytují volné thioly pro navázání zinečnatých kationtů nebo vytvářejí disulfidické můstky. Navázání zinečnatých kationtů a vytvoření disulfidických můstků je zapotřebí pro správnou funkci malých Tim proteinů (Lutz, 2003; Koehler, 2004). Tento způsob transportu by mohly využívat

i podobně strukturované proteiny mezimembránového prostoru. Výjimkou je cytochrom *c*. Nesbalený prekurzor cytochromu *c* (apocytochrom *c*) prochází TOM komplexem do mezimembránového prostoru. Stejnou cestou se apocytochrom *c* navrácí usnadněnou difuzí zpátky do cytosolu. Maturovaný cytochrom *c* s navázanou hemovou skupinou již nemůže do cytosolu z mezimembránového prostoru TOM komplexem procházet (Diekert et al., 2001; Lutz et al., 2003).

Proteiny o relativně vysoké molekulové hmotnosti, jako např. cytochrom *b₂* nebo cytochrom *b₅* reduktáza se syntetizují v cytosolu s N-koncovou signální sekvencí následovanou hydrofobním α -helixem. N-koncová sekvence směřuje polypeptid do mitochondriální matrix, hydrofobní α -helix zakotví transportovaný prekurzor do vnitřní mitochondriální membrány během transportu TIM23 komplexem. Prekurzor od transmembránového α -helixu odštěpí Imp1 proteáza vnitřní mitochondriální membrány (Haucke et al., 1997).

Jiné vysokomolekulární proteiny, jako např. adenylát kináza nebo cytochrom *c₁* hem lyáza, se transportují do mezimembránového prostoru nezávisle na přítomnosti ATP a membránovém potenciálu $\Delta\psi$. Adenylát kinázu směřuje do mezimembránového prostoru dlouhá N-koncová sekvence a prozatím neurčený interní signál. N-koncová sekvence postrádá kladný náboj a pravděpodobně nevytváří strukturu amfipatického α -helixu, během transportu nedochází k jejímu odštěpení. TIM23 komplex se na transportu nepodílí, hnací silou je možná samovolné sbalení prekurzoru probíhající směrem od N-konce polypeptidu při průchodu TOM komplexem (Steiner et al., 1995; Schricker et al., 2002).

3.1.4. Transport proteinů do vnější mitochondriální membrány

Transmembránové proteiny vnější mitochondriální membrány tvoří amfipatické, antiparalelní β -řetězce, které jsou vzájemně propojené smyčkami o různé velikosti. Prozatím známe u kvasinek několik proteinů tohoto typu: podjednotku Tom40 komplexu TOM, β -porin, Mdm34 (Mmm2), Mdm10 a Sam50. β -porinem prostupují malé metabolity usnadněnou difuzí, Mdm34 (Mmm2) společně s Mdm10 v průběhu buňčného cyklu udržují správný tvar mitochondrií, Mdm10 se dále podílí na biogenezi TOM komplexu a Sam50 na biogenezi transmembránových proteinů vnější mitochondriální membrány (Youngman et al., 2004; Paschen et al., 2005). Některé proteiny vnější mitochondriální membrány, jako např. podjednotka Tom20 komplexu TOM, mají transmembránovou část tvořenou hydrofobními α -helixy (Pfanner et al., 2004; Paschen et al., 2005).

Prekurzory proteinů vnější mitochondriální membrány rozeznávají nejprve receptory komplexu TOM: Tom20/Tom70 a následně Tom22. Prekurzory s transmembránovými α -helixy se za asistence komplexu TOM postupně vloží do vnější membrány, prekurzory s amfipatickými β -řetězci procházejí kanálem Tom40 směrem do mezimembránového prostoru, kde za účasti malých Tim proteinů interagují s komplexem SAM (Paschen et al., 2005).

Transmembránové proteiny, které tvoří tvoří amfipatické a antiparalelní β -řetězce, jsou schopné se po denuraci opět složit do původního tvaru a začlenit do lipidové dvojvrstvy *in vitro* bez asistence vnějších faktorů (Tamm et al., 2004). Jde však o pomalý a neorientovaný proces. Rychlé a specifické vložení prekurzoru do vnější membrány vyžaduje přítomnost funkčního komplexu SAM. Komplex SAM (syn. TOB komplex) tvoří transmembránová podjednotka Sam50 a směrem z cytosolu navázané podjednotky Sam35 a Sam37 o celkové relativní molekulové hmotnosti 250

kDa. Sam35 se podílí podobně jako Sam37 na biogenezi a stabilitě komplexu SAM. Sam37 navíc napomáhá vložení prekurzorů do vnější membrány (Paschen et al., 2005). Protože malé Tim proteiny nejsou pro transport prekurzoru esenciální a prozatím také není prokázána přímá interakce mezi TOM a SAM komplexem, je možné předpokládat, že hydrofilní N-koncová oblast Sam50 interaguje v mezimembránovém prostoru s transportovanými prekurzory a přenáší je z TOM k SAM komplexu. Experimentální důkaz však stále chybí (Ellis, 2003; Paschen et al., 2003; Sanchez-Pulido et al., 2003). C-koncová doména Sam50 vytváří v membráně kanál o průměru několika nanometrů, který by mohl sloužit jako lešení pro vytvoření optimální struktury prekurzoru vhodné pro vložení do vnější membrány. N-koncová oblast Sam50 by mohla během tohoto procesu plnit funkci chaperonů (Kozjak et al., 2003; Gentle et al., 2004; Pfanner et al., 2004; Habib et al., 2005; Paschen et al., 2005). Je pravděpodobné, že sbalený prekurzor nejdříve opustí kanál komplexu SAM a poté se následně začlení do vnější mitochondriální membrány. Laterální otevření a opětovné uzavření kanálu by totiž mohlo narušit jeho stabilitu a také by tento postup byl energeticky velice náročný. Naproti tomu transmembránové podjednotky komplexu TIM23 a TIM22 tvoří α -helixy. Laterální otevření kanálu a následné uvolnění α -helixu prekurzoru směrem do vnitřní membrány se v tomto případě uskutečňuje na základě disociace van der Waalsových interakcí (Rapaport, 2002; Johnson a Jensen, 2004; Paschen et al., 2005).

Sam50 podjednotka je homologní s proteinem vnější membrány gram-negativních bakterií Omp85. Zachovanou C-koncovou oblast Sam50 nacházíme od bakterií až po člověka (Paschen et al., 2003). Omp85, podobně jako komplex SAM, transportuje proteiny s transmembránovými antiparalelními β -řetězci do vnější membrány bakterií (Voulhoux et al., 2003). Bakteriální prekurzory se dostanou do periplasmy

transportérem SecYEG. Periplasma a mezimembránový prostor jsou hydrofilním prostředím, kde hydrofobní části prekurzorů stabilizují chaperony. Zúčastněné bakteriální Skp a Sur chaperony sice nejsou s malými Tim proteiny homologní, princip transportu je však stejný. Protože se komplex TOM vyvinul až v eukaryotní buňce, je možné se domnívat, že předchůdce podjednotky Sam50 zastával klíčovou úlohu v biogenezi vznikající mitochondrie (Paschen et al., 2005).

4. Transport proteinů do hydrogenosomů

4.1. Proteiny hydrogenosomální matrix

Prekurzory hydrogenosomálních proteinů se syntetizují v cytosolu s krátkou N-koncovou signální sekvencí, která je odštěpena po transportu proteinu v hydrogenosomální matrix (Tab. 1, 2)². Signální sekvence, podobně jako je tomu u mitochondrií, začínají většinou methioninem a leucinem, popř. methioninem, leucinem a serinem. Mutace leucinu v druhé pozici od N-konce signální sekvence za glycin naruší transport ferredoxinu do hydrogenosomů *Trichomonas vaginalis* (Bradley et al., 1997). Obdobně jako v případě mitochondriálních signálních sekvencí má většina hydrogenosomálních prekurzorů arginin ve druhé pozici nebo ve třetí pozici směrem k N-konci signální sekvence od místa štěpení (Tab 1, 2). Arginin, leucin a serin jsou hojně zastoupené v signálních sekvencích mitochondriálních a u většiny hydrogenosomálních prekurzorů. N-koncové oblasti prekurzorů mají potenciál vytvářet amfipatické α -helixy (Bradley et al., 1997).

² Přístupové kódy k jednotlivým proteinům jsou uvedeny na konci přílohy.

Tab. 1. Experimentálně ověřené N-koncové hydrogenosomální signální sekvence

	Hydrogenosomální protein	Signální sekvence	▼ N-konec maturovaného proteinu	
Tv	PFO 1	MLRNF	SKRV	(Hrdý a Müller, 1995)
Tv	PFO 2	MLRSF	GKRI	(Hrdý a Müller, 1995)
Tv	β-sukcinyl-Coa syntetáza	MLSSSFARN	FNIL	(Johnson et al., 1993)
Tv	α-sukcinyl-Coa syntetáza 1	MLAGDFSRN	LKOP	(Lahti et al., 1994)
Tv	α-sukcinyl-Coa syntetáza 2	MLSSSFERN	LHQP	(Lahti et al., 1994)
Tv	α-sukcinyl-Coa syntetáza 3	MLSSSFERN	LHQP	(Lahti et al., 1994)
Tv	Adenylát kináza	MLSGVSRN	AART	(Lange et al., 1994)
Tv	Jablečný enzym A	MLTSSVSVVVRN	ICRA	(Hrdý a Müller, 1995)
Tv	Jablečný enzym B	MLTSSVNFPAE	LSRN	(Dyall et al., 2000)
Tv	Jablečný enzym C	MLTSVSYVVRN	ICRS	(Hrdý a Müller, 1995)
Tv	Jablečný enzym D	MLTSVSLVVRN	ICRS	(Dyall et al., 2000)
Tv	Hsp60	MSLIEAAKHFTRAF	AKAR	(Bui et al., 1996)
Tv	Ferredoxin 1	MLSQCSP LRF	GSVT	(Johnson et al., 1990)
Tv	Hmp31	MAQP AEQIL IAT	SPKP	(Dyall et al., 2000)
Tf	ferredoxin	MALSFPSQSFRRF	GSIV	(Suchan et al., 2003)
Nf	Jablečný enzym	MLLAPIQTIARPVSSILPATGALAAKRT	FFAP	(van der Giezen et al., 1997)
Nf	β-sukcinyl-Coa syntetáza	MLANVTRSTSKAAPALASIAQTAQKRF	LSVH	(Brondijk et al., 1996)
PI	Ferredoxin	MVSGVSRN	AART	(Brul et al., 1994)

Vysvětlivky : Tv, *Trichomonas vaginalis*; Tf, *Trichomonas foetus*; Nf, *Nyctotherus frontalis*; PI, *Psalteriomonas lanterna*.
 Symbol ▼ označuje N-konec maturovaného proteinu a tedy i místo odštěpení signální sekvence. Modrou barvou je označený leucin ve druhé pozici od N-konce signální sekvence, červenou je označený arginin ve druhé pozici od C-konce signální sekvence.

Tab. 2. Předpokládané N-koncové hydrogenosomální signální sekvence.

Tv	Ferredoxin 2	MLSQVCRF↓GTITAVKG	0,5227	(Doležal et al., 2005)
Tv	IscS-2	MLGVSRS↓YFKGHYLD	0,1271	(Tachezy et al., 2001)
Tv	IscU	MLAAVSRS↓SALNMMKP	0,3377	(Doležal et al., 2005)
Tv	NuoF	MLAAYGHRF↓QTKFLDPK	0,1465	(Hrdý et al., 2004)
Tv	NuoE	MLASVNTSRFARL↓NKKS VLIQ	0,9702	(Hrdý et al., 2004)
Tv	α MPP	MDCVSSVLPNGIHLKLMKGPRG↓VCSIGAVF	0,2329	(Doležal et al., 2005)
Tv	β MPP	MSIISRYAVPQISKLSNGVRV↓ATIPVIGE	0,8202	(Doležal et al., 2005)

Vysvětlivky : Tv, *Trichomonas vaginalis*. Symbol ↓ označuje předpokládané místo štěpení podle programu PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp>). Modrou barvou je označený leucin ve druhé pozici od N-konce signální sekvence, červenou je označený arginin ve druhé pozici od C-konce signální sekvence předpokládaného místa štěpení. Předpokládané signální sekvence podle programu MITOPROT (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) jsou zvýrazněny tučným písmem, číslo udává pravděpodobnost transportu do mitochondrie. NuoE a NuoF, katalytické podjednotky komplexu I mitochondriálního typu.

Patrným rozdílem mezi hydrogenosomálními a mitochondriálními sekvencemi je jejich délka. Hydrogenosomální signální sekvence jsou krátké, jejich délka se pohybuje mezi 5-14 aminokyselinami (Tab 1). Naproti tomu mitochondriální sekvence mají obvykle mezi 20-80 aminokyselinami. Hydrogenosomální signální sekvence membránového proteinu Hmp31 *Trichomonas vaginalis* a jablečného enzymu *Nyctotherus ovalis* jsou dostačující pro směrování proteinů do mitochondrií kvasinek *in vivo* (van der Giezen et al., 1998; Dyall et al., 2000).

Transport proteinů do mitochondrií vyžaduje cytosolické chaperony, které inaktivuje N-ethylmaleimid (NEM) (Murakami et al., 1988). Přítomnost N-ethylmaleimidu v cytosolické složce *in vitro* transportního systému *Trichomonas vaginalis* zabrání v transportu ferredoxinu do hydrogenosomů (Bradley et al., 1997). Zdali se na hydrogenosomálním transportu proteinů podílejí cytosolické faktory podobným způsobem, jako je tomu u mitochondrie, je však prozatím nejasné.

Přítomnost ATP je nezbytná pro stabilizaci právě překládaných prekurzorů v nesbaleném, transportním stavu, uvolnění chaperonů od transportovaného polypeptidu, popř. od membránových receptorů, transport přes biomembrány a správné sbalení prekurzoru v organele. Velmi nízká koncentrace, popř. absence ATP je dostačující pro specifické navázání hydrogenosomálního nebo mitochondriálního prekurzoru na povrch organely, pro transport prekurzorů je však zapotřebí koncentrace ATP mnohem vyšší (Goldfrab, 1992; Bradley et al., 1997).

Hydrogenosomy trichomonád vytvářejí malý membránový potenciál $\Delta\psi$ (Humphreys et al., 1994). Transport proteinů do hydrogenosomů a do mitochondrií vyžaduje membránový potenciál $\Delta\psi$ (Bradley et al., 1997). Hydrogenosomy narozdíl od mitochondrií postrádají mitochondriální respirační řetězec a F_1F_0 ATPázovou aktivitu. Mutanty kvasinek, které nemají funkční respiraci ani F_1F_0 ATPázu, vytvářejí

malý membránový potenciál pravděpodobně výměnou ATP/ADP mezi mitochondriální matrix a mezimembránovým prostorem (Schatz a Mason, 1974). Hydrogenosomální membránový protein Hmp31 je vzdáleně homologní s mitochondriálními ATP/ADP transportéry, je však otázkou, jestli se podílí na vytvoření malého membránového potenciálu podobně jako je tomu u výše zmíněných mutantů kvasinek (viz. kap. 4.2) (Bradley et al., 1997).

Některé podjednotky TOM a TIM komplexů, jako např. Tom22, Tom7 a Tom40 nebo Tim22 vznikly v prvopočátku vývoje budoucí mitochondrie ještě před oddělením hlavních eukaryotních linií (Hermann, 2003; Macasev et al., 2004). Trichomonády transportují do hydrogenosomů funkční homolog Pam18 (TvPam18) podjednotky komplexu PAM. Přítomnost Pam18 v hydrogenosomech naznačuje, že některé podjednotky transportní mašinerie proteinů u těchto organel a mitochondrií mají společnou evoluční historii (Doležal et al., 2005a).

Po transportu prekurzoru do hydrogenosomu dojde k odštěpení signální sekvence a maturaci polypeptidového řetězce (Bradley et al., 1997). *Trichomonas vaginalis* kóduje homology α a β podjednotky MPP (α -HPP a β -HPP) s předpokládanou N-koncovou signální sekvencí pro transport do hydrogenosomů. Podjednotka β -HPP, která obsahuje charakteristický His-X-X-Glu-His motiv, se transportuje do těchto organel *in vivo* (Brown et al., 2004; Doležal et al., 2005a). Rekombinantní podjednotka β -HPP účinně a specificky štěpí signální sekvence hydrogenosomálních prekurzorů *in vitro* (Brown et al., 2004). Hydrogenosomy obsahují homology mitochondriálních chaperonů Hsp10, Hsp60 a Hsp70. Předpokládaná N-koncová signální sekvence je experimentálně ověřená u Hsp60 (Dyall a Johnson, 2000). Jestli se chaperony trichomonád podílejí na maturaci proteinů v matrix hydrogenosomu obdobným způsobem jako je tomu u mitochondrie, je prozatím nejasné.

4.2. Membránové proteiny

Významným předpokladem vývoje endosymbionta v organelu bylo zajištění komunikace mezi buňkou a organelou. V případě organely produkující ATP se jednalo především o výměnu ATP za cytosolický ADP. Hydrogenosomální membránový protein Hmp31 *Trichomonas vaginalis* je vzdáleně příbuzný s mitochondriálními ATP/ADP transportéry (AAC). Fylogenetické analýzy ukazují, že Hmp31 a mitochondriální ATP/ADP transportéry mají společný původ. Hmp31 se účinně transportuje za asistence Tim9-Tim10 komplexu do mitochondrií kvasinek a naopak mitochondriální AAC se účinně transportují do hydrogenosomů. ATP/ADP transportér *Neocallimastix frontalis* dokáže účinně obnovit přenos ATP u mutantních kmenů kvasinek s vlastním nefunkčním AAC (van der Giezen et al., 2002). Hmp31 a jeho homology směřují na místo určení interní signály. U mitochondriálních AAC nachází na dvou odhadovaných místech proteinu (Pfanner a Neupert, 1987; Smagula a Douglas, 1988a,b). Maturovaný Hmp31 postrádá N-koncovou sekvenci, která sice není pro transport do hydrogenosomu nezbytná, pravděpodobně však zvyšuje jeho účinnost (Dyall et al., 2000). Protože ATP/ADP transportéry nemají doposud žádné známé α -proteobakteriální nebo archebakteriální homology, je velice pravděpodobné, že předkové ATP/ADP transportérů vznikly až *de novo* v časně fázi vývoje budoucí organely, která by mohla představovat společného předka dnešních mitochondrií a hydrogenosomů (Dyall et al., 2000).

Dalším hojně zastoupeným hydrogenosomálním membránovým proteinem *Trichomonas vaginalis* je 300 kDa oligomerní komplex Hmp35. Hmp35 by se mohl podílet na transportu proteinů nebo na přenosu metabolitů, protože jeho

transmembránové antiparalelní β -řetězce vytvářejí v hydrogenosomální membráně předpovězenou strukturu sudovitého tvaru podobně jako některé proteiny ve vnější membráně gram-negativních bakterií, mitochondrií nebo plastidů (viz. kap. 3.1.4.) (Dyall et al., 2003). Hmp35 nemá žádné známé eubakteriální, archebakteriální ani eukaryotní homology (Dyall et al., 2003). Kvasinky však dokážou účinně transportovat Hmp35 do mitochondrií. To naznačuje, že předek Hmp35 pravděpodobně vznikl u předpokládného společného endosymbiotického předka hydrogenosomů a mitochondrií *de novo*. U mitochondrií patrně došlo během evoluce k jeho ztrátě.

5. Transport proteinů do mitosomů

Většina proteinů mitochondriálního typu u *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum* a u *Entamoeba histolytica* má N-koncové oblasti nápadně podobné N-koncovým signálním sekvencím hydrogenosomálních a mitochondriálních proteinů. N-koncové oblasti jsou bohaté především na serin a arginin, mají schopnost vytvářet amfipatické α -helixy a obsahují s vysokou pravděpodobností předpovězené místo pro odštěpení signální sekvence mitochondriální peptidázou (MPP) (LaGier et al., 2003). N-koncové oblasti IscS a IscU *Cryptosporidium parvum* (CpiscS a CpiscU) směřují proteiny do mitochondrií kvasinek (LaGier et al., 2003). Předpokládaná N-koncové signální sekvence IscU *Giardia intestinalis* (GiiscU) je pravděpodobně zapotřebí pro transport do mitosomů (Tovar et al., 2003).

Mitochondriální homology Hsp70 *Trachipleistophora hominis*, Hsp60 a IscS *Giardia intestinalis* (Gicpn60 a GiiscS), podobně jako některé proteiny mitochondriální matrix (viz. diskuze), směřují do matrix organel na místo určení zatím

neidentifikované signály (Tachezy et al., 2001; Williams et al., 2002; Sickmann et al., 2003; Regoes et al., 2005).

6. Cíle práce

V zadání diplomové práce jsem dostal za úkol:

- Zjistit, zda vytypované proteiny *G. intestinalis* mitochondriálního typu mohou být transportovány do hydrogenosomů *T. vaginalis*.
- Určit, zda tyto proteiny využívají k transportu N-koncové nebo interní signální sekvence.

7. Materiál a Metodika

7.1. Použité organismy

7.1.1. *Trichomonas vaginalis*

Axenická kultura *Trichomonas vaginalis* kmen T1 (J.H. Tai, Taiwan) byla použita pro níže uvedené studie transportu proteinů do hydrogenosomů. Axenická kultura byla udržovaná v médiu TYM s agarem pH 6,2 při 37 °C. Pro kryoprezervaci experimentálních linií trichomonád byl použit roztok 5 % DMSO (Merck).

7.1.2. *Giardia intestinalis*

Za účelem izolace genomové DNA poskytl prof. Jaroslav Kulda (Přf UK, Praha) kulturu *Giardia intestinalis* kmen HP-1 X2118.

7.1.3. *Escherichia coli*

Pro namnožení rekombinantních plasmidů se používal bakteriální kmen *Escherichia coli* XL-1 blue. Transformace buněk se prováděla tepelným šokem podle standartního protokolu (Qiagen). Bakterie byly kultivovány v médiu LB s příslušným antibiotikem (podle typu plasmidu) pro selekci pozitivních klonů.

7.1.4 Použité roztoky a média

- **Médium TYM, pH = 6,2:** 10 g kaseinového hydrolyzátu; 5 g kvasinkového autolyzátu; 2,5 g maltózy; 0,1 g kyseliny askorbové; 0,5 g L-cysteinu; 0,4 g KH₂PO₄; 0,4 g K₂HPO₄; 0,25 g agaru; 450 ml dest. H₂O; po sterilizaci při 120 °C a 20 minutách přidat 50 ml inaktivovaného koňského séra (57 °C 30 minut).
- **Médium LB:** 2,5 g kvasinkového autolyzátu; 5 g kaseinového hydrolyzátu; 5g NaCl; 7,5 g agaru; 500 ml dest. H₂O; pH = 7; sterilizovat.
- **STET pufr:** 8 % sacharóza; 5 % Triton X-100; 50 mM EDTA, pH = 8, 50 mM Tris, pH = 8.
- **Lysozym:** 10 mg/ml.
- **RNAáza:** 10 mg/ml. Před použitím inaktivovat přítomné DNAázy při 100 °C po dobu 5 minut.
- **Merlin I:** 50 mM glukóza; 25 mM Tris, pH = 8; 10 mM EDTA pH = 8; povařená RNAáza o konečné koncentraci 10μg/ml.

- **Merlin II:** 0,2 M NaOH; 1 % SDS.
- **Merlin III:** 3 M CH₃COOK, pH = 5,5. Na přípravu 500 ml roztoku rozpustit 61,35 g CH₃COOK a 35,70 ml ledové kyseliny octové v dest. H₂O do konečného objemu 500 ml.
- **Merlin IV:** Na přípravu 200 ml roztoku rozpustit 133,68 guanidin hydrochloridu v 66,67 ml Merlinu III a 40 ml dest. H₂O. Rozpouštět za mírného zahřívání, část guanidin hydrochloridu vytvoří nerozpustný precipitát; pH upravit 10 mM NaOH do hodnoty 5,5.
- **Merlin V:** Přidat 30 g křemeliny (Sigma, D5384) do 200 ml Merlinu IV.
- **Merlin VI:** 200 mM NaCl; 20 mM Tris, pH = 7,5; 5 mM EDTA; 50 % ethanol. Fyziologický roztok: 9 g NaCl; destil. H₂O 1000 ml.
- **Izolační médium:** Sacharóza 77,00 g; KH₂ PO₄ 1,36 g; Tris 2,42 g; KCl 1,49 g; 0,5 M MgCl₂ 10 ml; 0,1 M EDTA 10 ml; destil. H₂O do 1000 ml; pH = 7,2.
- **Zásobní roztoky inhibitorů proteáz:** Tosyl-lysin-clorometylketon (TLCK) 25 mg/ml; leupeptin 5 mg/ml.
- **2 x ST médium:** 250 mM Sacharóza 85,60 g; 10 mM Tris 1,20 g; 0,5 mM KCl 0,04 g; destil. H₂O do 500 ml; pH = 7,2.
- **45 % Percoll:** 2 x ST 18 ml; Percoll (Sigma) 16,2 ml; destil. H₂O 1,8 ml.
- **Trypsin:** 5 mg/ml (Sigma).
- **Sójové inhibitory trypsinu:** 250 mg/ml (Sigma).
- **Blotovací pufr:** 10 x SDS pufr 50 ml; methanol 100 ml; dest. H₂O 350 ml. 10 x SDS pufr: Glycin 30,3 g; SDS 144 g; dest. H₂O do 1000 ml.
- **Blokovací pufr, Western blot:** Nízkotučný sunar 10 g; PBS 100 ml; pH = 7,2.
- **Promývací pufr:** Nízkotučný sunar 10 g; Tween20 (0,5 %) 500 µl; PBS 100 ml; pH = 7,2.
- **PBS:** NaCl 8 g; KCL 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,53 g; Dest. H₂O do 1000 ml; pH = 7,2.
- **Blokovací pufr, fluorescence:** 0,25 % BSA (hovězí albumín) a 0,25 % želatina (Sigma, #G2500) v PBS, pH = 7,2.

7.2. Příprava konstruktů

Podle sekvencí (viz. Tab. 4) byly navrženy priméry pro amplifikaci a klonování požadovaných úseků DNA do vektorů pGEM[®]-T easy nebo pCR[®]2,1-TOPO[®] (Invitrogen). Priméry pro následnou amplifikaci a klonování do expresního vektoru Master-Neo obsahují restrikční místa pro restriktázy NdeI a Acc65I. Templát pro amplifikaci příslušného genu pro GiiscU, GiiscS a TviscS poskytl doc. Jan Tachezy

(Přf UK, Praha), rekombinantní Gifdx zaklonovaný do vektoru Master-Neo poskytl Mgr. Zuzana Zubáčová (Přf UK, Praha) a genomová DNA *Giardia intestinalis* posloužila jako předloha pro amplifikaci Gi- α tubulinu.

Nukleové kyseliny byly smíchány se vzorkovým pufrem (Fermentas) a analyzovány horizontální elektroforézou v 1 % agarózovém gelu a TAE pufru při napětí cca. 8V/ cm délky gelu. Nukleové kyseliny byly detekovány ethidium bromidem pomocí UV záření. Na extrakci DNA z agarózového gelu byl používán Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen).

Tab. 4. Přístupové kódy k jednotlivým sekvencím (www.pubmed.com).	
GiiscU	AAM14634
Gifdx	AAL95709
GiiscS	AAK39427
TviscS	AF321006
Gi- α tubulin	AY145881

7.2.1. PCR

Příslušné sekvence byly pro další použití amplifikovány metodou PCR (Kary Mullis, 1983).

7.2.1.1. GiiscU

- Priméry:

Restrikční místa pro NdeI nebo Acc65I jsou označena podtržením.

GiiscU NdeI 5' TTAgACCATATgACAAGCCTTCAg 3'

GiiscU Acc65I 5' CATCgAGGTACCAgAAgACTTTgATAC 3'

- Složení PCR reakce, počet a délka cyklů:

1.	denaturace	94°C	5 min.
2.	denaturace	94°C	1 min.
3.	renaturace	50°C	2 min.
4.	syntéza	72°C	2 min.
krok č. 2 až 4			35 x
5.	syntéza	72°C	10 min.
		15°C	∞

H ₂ O	35,2 μ l
10 x PCR Pufr	5 μ l
dNTP	1 μ l
MgCL ₂	5 μ l
DNA	1 μ l
Primér1	1 μ l
Primér2	1 μ l
Taq/Pfu 1:1	0,8 μ l

7.2.1.2 Δ nGiiscU

- Priméry:

Δ nGiiscU NdeI 5' ATTgACCATATgCTCACAAAgAAgACC 3'

GiiscU Acc65I 5' CATCgAGGTACCgAAgACTTTgATAC 3'

- Složení PCR reakce, počet a délka cyklů jako u GiiscU.

7.2.1.3. GiiscS

- Priméry:

GiiscS NdeI 5' TTAGACCATATgATTTACCTggAC 3'

GiiscS Acc65I 5' CATCgAggTACCgTCATgCTTCCACTC 3'

- Složení PCR reakce, počet a délka cyklů:

1.	denaturace	94°C	5 min.
2.	denaturace	94°C	1 min.
3.	renaturace	50°C	30 sek.
4.	syntéza	72°C	2 min.
krok č. 2 až 4			35 x
5.	syntéza	72°C	10 min.
		15°C	∞

H ₂ O	35,2 µl
10 x PCR Pufr	5 µl
dNTP	1 µl
MgCL ₂	5 µl
DNA	1 µl
Primér1	1 µl
Primér2	1 µl
Taq/Pfu 1:1	0,8 µl

7.2.1.4. ΔNGiiscS, ΔNGiiscS ½

Základní schéma a popis delece nukleotidů interních sekvencí metodou PCR je znázorněno na obr. 9.

- Priméry:

GiiscS R1 5' CTTCAggAggTCCTG 3'

GiiscS F1 5' CAgCTCCAaggACCTCCTGAAGTCGAAGgTggCCATTgTgAgC 3'

GiiscS NdeI 5' TTAGACCATATgATTTACCTggAC 3'

GiiscS Acc65I 5' CATCgAggTACCgTCATgCTTCCACTC 3'

ΔNGiiscS ½ Acc65I 5' CATCgAggTACCCAgATCAATCTTgTC 3'

- Složení PCR reakce, počet a délka cyklů:

1.	denaturace	94°C	2 min.
2.	denaturace	94°C	15 sek.
3.	renaturace	55°C	30 sek.
4.	syntéza	72°C	2 min.
krok č. 2 až 4			3 x
5.	denaturace	94°C	1 min.
6.	renaturace	50°C	30 sek.
7.	syntéza	72°C	2 min.
Krok č. 5 až 7			27 x
8.	syntéza	72°C	10 min.
		15°C	∞

H ₂ O	33,2 µl
10 x PCR Pufr	5 µl
dNTP	1 µl
MgCL ₂	5 µl
DNA	1 µl
Primér1	1 µl
Primér2	1 µl
Pfu	0,8 µl

7.2.1.5. ΔCGiiscS, ΔCGiiscS ½

- Priméry:

GiiscS R2 5' TggAAACggCCCATT 3'

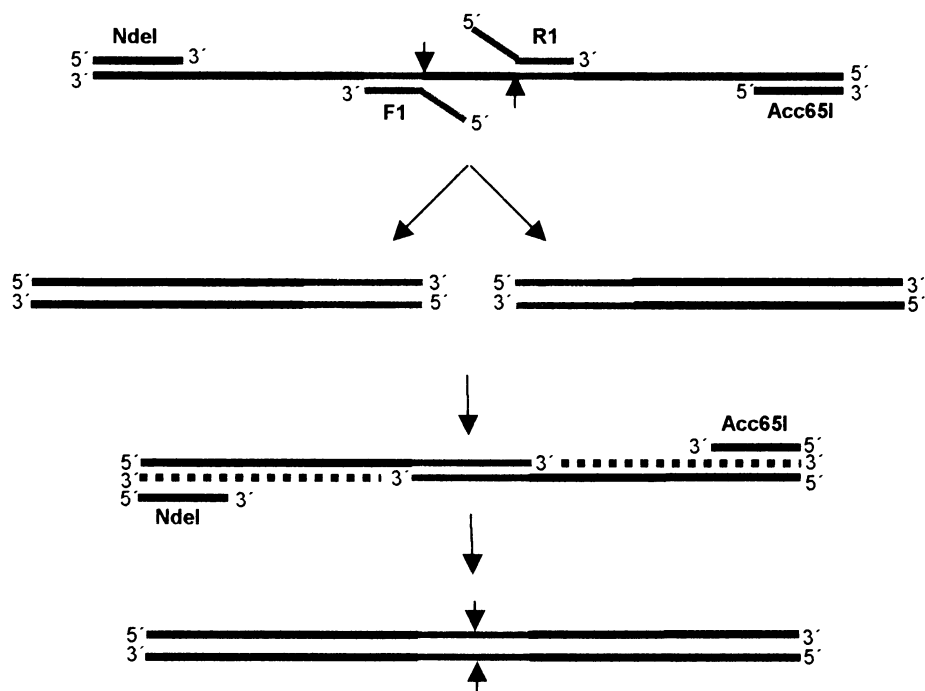
GiiscS F2 5' AggCTTATTgggCCgTTTCCAAAgCgCATTCTTAACAACATg 3'

GiiscS NdeI 5' TTAgACCATATgATTTACCTggAC 3'

GiiscS Acc65I 5' CATCgAggTACCgTCATgCTTCCACTC 3'

Δ CGiiscS 1/2 5' gCAATTCATATgAgTCTCTCgggg 3'

- Složení PCR reakce, počet a délka cyklů stejná jako u Δ NGiiscS.



Obr. 9. Základní schéma pro delecí nukleotidů metodou PCR.

Po dvou odděleně probíhajících PCR reakcích NdeI/F1 a R1/Acc65I smíchat oba produkty ve vhodném poměru. V počátečních cyklech PCR reakce asociují komplementární úseky obou produktů a tím slouží jako priméry pro syntézu komplementárních DNA řetězců. Pro AT-klonování je nezbytné dosyntetizovat dATP na 3' konce DNA.

7.2.1.6. Δ GiiscS

- Priméry:

GiiscS R1 5' CTTC Λ gg Λ ggTCCTG 3'

GiiscS F1 5' CAgCTCCAggACCTCCTGAAGTCGAAGgTggCCATTgTgAgC 3'

GiiscS R2 5' TggAAACggCCCATT 3'

GiiscS F2 5' AggCTTATTgggCCgTTTCCAAAgCgCATTCTTAACAACATg 3'

GiiscS NdeI 5' TTAgACCATATgATTTACCTggAC 3'

GiiscS Acc65I 5' CATCgAggTACCgTCATgCTTCCACTC 3'

- Složení PCR reakce, počet a délka cyklů stejná jako u Δ NGiiscS.

7.2.1.7. TviscS

- Priméry:

TviscS NdeI 5' CTAgACCATATgTTAggATCAgTC 3'

TviscS Acc65I 5' CATCgAggTACCCTggATCCATTCgAC 3'

- Složení PCR reakce, počet a délka cyklů:

1.	denaturace	94°C	5 min.	
2.	denaturace	94°C	1 min.	
3.	renaturace	50°C	2 min.	
4.	syntéza	72°C	2 min.	
krok č. 2 až 4			31 x	
5.	syntéza	72°C	10 min.	
			15°C	∞

H ₂ O	33,2 µl
10 x PCR Pufr	5 µl
dNTP	1 µl
MgCL ₂	5 µl
DNA	1 µl
Primér1	1 µl
Primér2	1 µl
Taq/Pfu 1:1	0,8 µl
DMSO 4 %	2 µl

7.2.1.8. ΔnTviscS

- Priméry:

ΔnTviscS NdeI 5' TCAgATCATATgTACTTCAAggCCAT 3'

TviscS Acc65I 5' CATCgAggTACCCTggATCCATTCgAC 3'

- Složení PCR reakce, počet a délka cyklů jako u TviscS.

7.2.1.9. Giα-tubulin

- Priméry:

Giαtubulin NdeI 5' TTAgACCATATgCgTgAgTgCATCTCg 3'

Giαtubulin Acc65I 5' CATCgAggTACCgTgAgCgTCgTCCTC 3'

- Složení PCR reakce, počet a délka cyklů jako u GiiscS.

7.2.1.10. 5'-GiiscU. α-tubulin

Restrikční místa pro NdeI, Acc65I a NcoI jsou označena podtržením.

- Konstrukt byl sestavený s restrikčním místem pro NcoI na vektoru pGEM[®]-7Zf(+) (Promega).

- Priméry:

5'-GiiscU. αtubulin NcoIF 5' CATATCCCCATggATgCgTgAgTgCATC 3'

5'-GiiscU. αtubulin NcoIR 5' CTTgTCCCCATggACTggTCTTCTTTgT 3'

GiiscU NdeI 5' TTAgACCATATgACAgCCTTCg 3'

Giαtubulin Acc65I 5' CATCgAggTACCgTgAgCgTCgTCCTC 3'

- Složení PCR reakce, počet a délka cyklů pro GiiscU N-koncovou signální sekvenci jako u GiiscU, pro αtubulin jako u GiiscS.

- Složení PCR reakce, počet a délka cyklů pro GiiscU N-koncovou signální sekvenci jako u GiiscU, pro α tubulin jako u GiiscS.

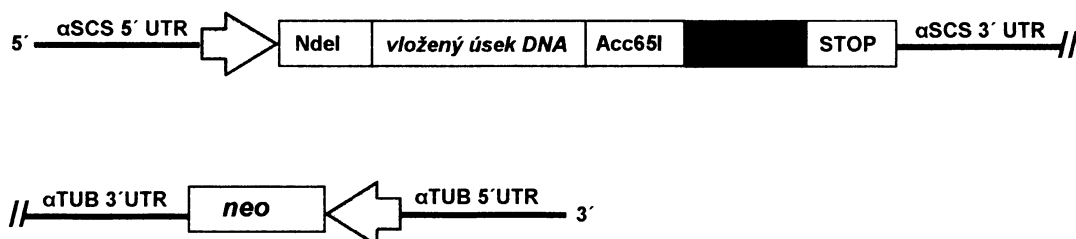
7.2.1.11. Určení pozitivních klonů metodou PCR

Kolonie testované na přítomnost jednotlivých konstruktů byly resuspendovány v 10 μ l dest. H₂O a poté podstoupily níže uvedenou teplotní reakci. Vzniklá směs denaturovaných buněk byla následně použita pro jednotlivé PCR reakce příslušných konstruktů.

1.	96°C	5 min.
2.	50°C	1 min. 30 sek.
3.	96°C	1 min. 30 sek.
4.	45°C	1 min.
5.	96°C	1 min.
6.	40°C	1 min.
7.	4°C	2 min.

7.2.2. Příprava expresního vektoru Master-Neo

Po vložení části příslušné DNA do vektorů pro AT-klonování pGEM[®]-T easy nebo pCR[®]2,1-TOPO[®] byly příslušné konstrukty pro kontrolu sekvenovány. Po ověření správnosti vložených sekvencí byly konstrukty vyštěpeny a vloženy přes restriční místa pro NdeI a Acc65I do expresního vektoru Master-Neo pro transfekci trichomonád (obr. 10).



Obr. 10. Zkrácená mapa expresního vektoru Master neo

Vysvětlivky: α SCS UTR, regulační promotorová oblast sukcinát thiokinázy. NdeI, Acc65I, restriční místa pro vložení příslušné DNA. NdeI obsahuje ATG kterým začíná translace. HAHA, hemagglutinin pro značení primární protilátkou na C-konci rekombinantního proteinu. Stop, stop kodóny pro ukončení translace. Neo, gen pro neomycin fosfotransferázu, která je u příjemce zodpovědná za rezistenci vůči genetickému G 418. Šipky označují směr přepisu DNA.

7.2.3. Minipreparace rekombinantních plasmidů

1. Narostlou bakteriální kulturu centrifugovat při 4 °C 9000 x g 10 minut.
2. Sediment resuspendovat ve 360 µl pufru STET.
3. Přidat 40 µl lyozymu, vortexovat 1 sekundu a okamžitě povařit 1 minutu.
4. Centrifugovat při 4 °C 13000 x g 15 minut.
5. Odebrat sediment a k supernatantu přidat 0,6 objemu izopropanolu, promíchat.
6. Centrifugovat při 4 °C 13000 x g 10 minut.
7. Odebrat supernatant, sediment promýt 70 % ethanolem.
8. Promytý sediment vysušit a rozpustit v 50 µl H₂O (s 20 µg/ml RNAázy).

7.2.4. Izolace rekombinantních plasmidů metodou „Merlin maxiprep“

Pro transfekci trichomonád je zapotřebí většího množství plasmidové DNA o vysoké koncentraci (cca. 1 až 5 mg/ml).

Pracovní postup:

1. Bakteriální kulturu centrifugovat při 4 °C a 9000 x g 10 minut.
2. Sediment resuspendovat v 10 ml Merlinu I.
3. Přidat 10 ml Merlinu II, opatrně míchat po dobu 5 minut při laboratorní teplotě.
4. Přidat 10 ml Merlinu III, zamíchat a nechat stát v ledové lázni 30 minut.
5. Centrifugovat při 4°C a 9000 x g 30 minut. Supernatant odebrat do nové zkumavky.
6. Přidat 0,6 objemu isopropanolu, dobře promíchat a centrifugovat při 4 °C a 9000 x g 1 hodinu. V tomto kroku je možné postup zastavit, tzn. po přidání isopropanolu nechat DNA při -20 °C do druhého dne vysrážet.
7. Po centrifugaci odebrat supernatant, sediment DNA vysušit.
8. Sediment DNA rozpustit ve 2 ml HPLC H₂O.
9. Přidat 15 ml Merlinu IV a 5 ml Merlinu V. Merlin V před použitím dostatečně protřepat.
10. Opatrně míchat 20 minut, nanést na kolonu (Econo-Pac[®], Biorad) a odsát vývěvou. 2 x promýt 20 ml Merlinu V, po posledním přidání a odsátí veškerého promývacího pufru a po vysušení křemeliny nechat běžet vývěvu 5 minut naprázdno (tímto způsobem se odstraní poslední zbytky ethanol).
11. Kolonu odpojit od vývěvy a nanést 1,5 ml 80 °C HPLC H₂O. Centrifugovat při laboratorní teplotě 9000 x g 5 minut, 3 x opakovat.
12. DNA vysrážet 2,5 objemem ethanolu.
13. Centrifugovat při 4 °C, sediment vysušit a rozpustit v 0,5 ml HPLC H₂O.

7.3. Výpočet optimální koncentrace DNA pro transfekci trichomonád

Optickou densitu (OD) DNA změřit spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm.

Ze získaných údajů vypočítat výslednou koncentraci rekombinantního plasmidu podle vzorce:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 50 \times A_{260} \times \text{ředění vzorku}$$

Pro elektroporaci použít 50 μg DNA.

7.4. Transfekce trichomonád expresním vektorem Master-Neo

Pracovní postup:

1. Sterilně centrifugovat 1 litr trichomonád při 4 °C a 1000 x g 15 minut. Vždy pracovat na ledě !.
2. Zvážit pelet a na každý gram přidat 0,5 ml média TYM 6,2 bez agaru s amikacinem (250 U/ml) a penicilinem (1000 U/ml).
3. Suspenzi trichomonád 4 x resuspendovat přes G 23 jehlu.
4. Do 4 mm kyvety (4 MM Gene pulser Cuvette, Biorad) přidat 300 μl buněk a 50 μg DNA o maximálním objemu 50 μl .
5. Elektroporovat při časové konstantě 175 ms a napětí 350 V nebo při kapacitanci 975 μF a napětí 350 V.
6. K buňkám okamžitě přidat vytemperovaný TYM 6,2 bez agaru s amikacinem a s penicilinem a po 4 hodinách kultivace při 37 °C přidat geneticin o výsledné koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$.
7. Poté, co je kultura dobře narostlá, odstranit pelet a centrifugovat při 4 °C a 1000 x g 15 minut. Odebrat horních 45 ml média a sediment resuspendovat v TYM médiu 6,2 s agarem a s antibiotiky (geneticin 100 $\mu\text{g/ml}$, amikacin 250 U/ml, penicilin 1000 U/ml).
8. Kulturu udržovat v TYM médiu 6,2 s agarem nebo bez a pro selekci pozitivních transformantů používat geneticin o výsledné koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$.

7.5. Detekce rekombinantních proteinů v buňce

Transfekované trichomonády, které exprimovaly příslušné proteiny, byly analyzovány imunofluorescenční metodou anebo byly rozděleny na buněčné frakce a to na celkový buněčný lyzát, cytoplasmu a hydrogenosomy. Pro odstranění nespecificky i specificky navázaných proteinů navázaných na povrch hydrogenosomů bylo zapotřebí ošetřit hydrogenosomální povrch trypsinem. Proteiny byly rozděleny na

základě svých molekulových hmotností na SDS PAGE a přebílotovány na nitrocelulóзовou membránu.

Jednotlivé rekombinantní proteiny byly detekovány primární α -HA protilátkou a příslušnou sekundární protilátkou.

7.5.1 Příprava buňečných frakcí diferenciální centrifugací

1. Kulturu trichomonád v logaritmické fázi růstu centrifugovat při 4 °C a 1000 x g 10 minut. Sediment buněk od této chvíle držet neustále na ledové lázni.
2. Sediment buněk 2 x promýt fyziologickým roztokem a 1 x IM při stejné teplotě a otáčkách.
3. Sediment buněk resuspendovat v IM a přidat inhibitory proteáz do výsledné koncentrace: TLCK 50 μ g/ml, leupeptin 10 μ g/ml.
4. Buněčnou suspenzi probublát 5 minut mírným proudem dusíku.
5. Buněčnou suspenzi sonikovat třikrát 1 minutu při amplitudě 40 a délce pulzů 1 sec. Po každé sonikaci promíchat a provést kontrolu pod mikroskopem.
6. Buňky po sonikaci centrifugovat při 4 °C a 500 x g 10 minut. Sediment tvoří frakci jader a celých buněk, supernatant I. obsahuje hydrogeosomy, lysozomy a cytosol.
7. Supernatant I. centrifugovat při 4 °C a 14000 x g 30 minut. Sediment tvoří hydrogenosomální a lysozomální frakci, tzv. LGF („large granule fraction“). Supernatant II. obsahuje mikrosomy. Střed LGF obsahuje nahnědlé hydrogenosomy, okraj LGF obsahuje bílé lysozomy. Lysozomy manuálně oddělit savičkou a pasteurovou pipetou od hydrogenosomů. Hydrogenosomy 2 x promýt IM s inhibitory proteáz při 4 °C a 14000 x g 5 minut. Sediment tvoří relativně čistou hydrogenosomální frakci bez větší kontaminace lysozomy.
8. Supernatant II. centrifugovat při 4 °C a 100000 x g 30 minut. Sediment tvoří mikrosomální frakci, supernatant III. cytosolickou frakci.

7.5.2. Příprava buňečných frakcí izopyknickou centrifugací

1. Připravit LGF frakci podle předešlého postupu, namísto IM používat 1 x ST médium.
2. Cytosolickou frakci připravit podle předešlého postupu.
3. Do centrifugační zkumavky (Opti Seal 36,2 ml) pro vertikální rotor Beckman VC-53 připravit 45 % percoll.
4. LGF resuspendovat v 1 ml 1 x ST. Suspenzi přenést do centrifugační zkumavky s percollem, přidat inhibitory proteáz. Vzniklou směs promíchat.

5. Centrifugovat na centrifuze Beckman ve vertikálním rotoru při 4 °C a 30000 rpm 30 minut, nepoužívat brzdu.
6. Hydrosomální frakci odsát pasteuovou pipetou, třikrát promýt v 1 x ST s inhibitory proteáz.

7.5.3. Odstranění proteinů z povrchu hydrogenosomů trypsinem

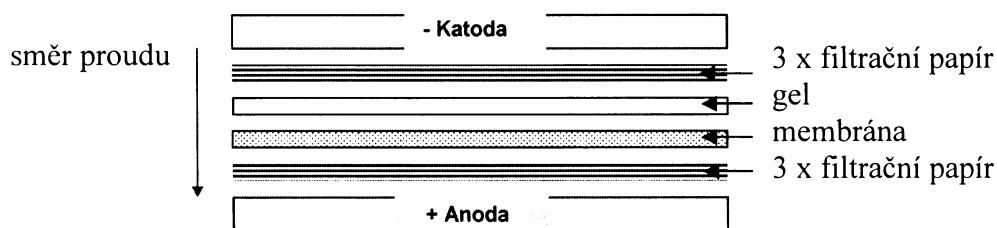
1. Připravit čisté hydrogenosomy izopyknická centrifugací podle protokolu kap. 7.5.1.
2. K hydrogenosomálnímu sedimentu přidat 1 x ST pufr s trypsinem o výsledné koncentraci 200 µg/ml. Pečlivě resuspendovat.
3. Část ponechat na ledu a část inkubovat 30 minut při 37 °C, přesně !.
4. 3 x promýt v 1x ST se sójovými inhibitory trypsinu o výsledné koncentraci 5 mg/ml společně s TLCK a leupeptinem. Při každém promytí nechat inkubovat 5 minut s inhibitory na ledu.
5. 1 x promýt v 1 x ST společně s TLCK a leupeptinem.
6. Dlouhodobě skladovat při -80 °C.

7.5.4. SDS page

Denaturované proteiny jednotlivých frakcí rozdělit na základě molekulových hmotností za redukcujících podmínek elektroforézou ve vertikálním 12 % polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným. Před nanesením na elektroforézu vzorky nejdříve rozmíchat a denaturovat po dobu 5 min. při 100 °C v 1 x SDS-PAGE vzorkovacím pufru. Pro určení relativní molekulové hmotnosti použít standart Sigma VII-L. Po elektroforéze detekovat proteiny obarvením gelu v roztoku Coomassie Brilliant Blue R.

7.5.5. Přeblování proteinů na nitrocelulóзовou membránu

- Schéma použití polosuchého a mokrého blotu:



1. Po proteinové elektroforéze za denaturujících podmínek (SDS page) změřit velikost gelu a nastříhat 6 filtračních papírů a nitrocelulóзовou membránu o přesně stejné velikosti.
2. Nitrocelulóзовou membránu ponořit na 5 min. do dest. H₂O a potom společně s filtračními papíry ponořit na 5 min. do blotovacího pufru.
3. Nitrocelulóзовou membránu a filtrační papíry společně s gelem navrstvit podle přiloženého schématu do polosuchého nebo do mokrého blotu.
4. Blotovat v přístroji pro polosuché blotování při proudu 1,5 mA/cm² po dobu 1 hodinu a 30 minut. nebo blotovat v přístroji pro mokré blotování 1 hodinu při proudu 350 mA.
5. Přeblotování proteinů ověřit promytím membrány v roztoku ponceau S.
6. Po promytí v dest. H₂O lze membránu skladovat při 4 °C před dalším zpracováním.

7.5.6. Detekce rekombinantních proteinů na nitrocelulóзовé membráně

1. Nitrocelulóзовou membránu inkubovat s přeblovanými proteiny v blokovacím pufru 1 hodinu při laboratorní teplotě nebo přes noc při 4 °C.
2. Membránu inkubovat s primární monoklonální myší α -HA (α -hemagglutinin) protilátkou v blokovacím pufru po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Protilátku ředit v poměru 1:1000.
3. Membránu promýt 3 x 20 minut promývacím pufrem při laboratorní teplotě.
4. Membránu inkubovat se sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidázou (1:1500) nebo s alkalickou fosfatázou (1:1500) v blokovacím pufru po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě.
5. Membránu promýt 3 x 20 minut promývacím pufrem bez nízkotučného sunaru při laboratorní teplotě.
6. Membránu promýt po dobu 5 minut PBS pufrem. Membránu inkubovat se substrátem pro peroxidázu (chemiluminiscence) nebo alkalickou fosfatázu (chromogenní reakce). Signál z chemiluminiscence vyvolat na autoradiografickém papíře.

7.5.7. Imunofluorescence

▪ Příprava podložních skel

1. Očištěné podložní sklo inkubovat 20 minut v 1 M HCl.
2. Skla promýt mírným proudem tekoucí vody po dobu 30 minut.
3. Skla opláchnout v dest. H₂O 2 x 5 minut.
4. Skla inkubovat 30 minut v acetonu.

5. Skla osušit a ponořit do 2 % roztoku 3-aminopropyltriethoxylanu (Sigma) v acetonu po dobu 30 minut.
6. Skla promýt mírným proudem tekoucí vody po dobu 30 minut.
7. Skla opláchnout v dest. H₂O 2 x 5 minut.
8. Skla zapéct při 100 °C po dobu 60 minut.

▪ **Příprava preparátů**

1. Nechat vychladit aceton a methanol při -20 °C.
2. Narostlou kulturu trichomonád nachat přilnout na připravená skla v inkubační komůrce při 37 °C po dobu 15 minut.
3. Buňky fixovat ve vychlazeném methanolu 5 minut a potom permeabilizovat ve vychlazeném acetonu.
4. Preparáty nechat uschnout.
5. Preparáty blokovat v blokovacím pufru 1 hodinu ve vlhké komůrce.
6. Inkubovat v blokovacím pufru s primární myší monoklonální protilátkou proti hemagglutininovému značení na C-konci rekombinantních proteinů (protilátku ředit 1:250) a s primární králičí protilátkou proti hydrogenosomálnímu jablečnému enzymu (protilátku ředit 1:500) 1 hodinu ve vlhké komůrce.
7. Preparáty promýt 3 x 5 minut v PBS.
8. Inkubovat v blokovacím pufru se sekundární protilátkou ALEXA FLUOR 488 proti myší monoklonální primární protilátce společně se sekundární protilátkou ALEXA FLUOR 594 proti králičí primární protilátce 1 hodinu ve vlhké komůrce. Protilátky ředit 1:1000.
9. Preparáty promýt 3 x 5 minut v PBS.
10. Preparáty zalít médiem Vacta-shield s DAPI pro značení jaderné DNA (Vector laboratories).

▪ **Analýza preparátů**

Preparáty byly analyzovány fluorescenčním mikroskopem (Leica) nebo konfokálním fluorescenčním mikroskopem (Leica). Obraz získaný z fluorescenčního a konfokálního fluorescenčního mikroskopu byl zpracován programem Adobe Photoshop (Adobe) a Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

8. Výsledky

8.1. Identifikace signálních sekvencí pro transport do mitosomů a hydrogenosomů

Amimokyselinové sekvence homologů mitochondriálních proteinů nalezené v genomech „amitochondriálních“ prvoků nesoucích mitosomy: IscU, [2Fe-2S] ferredoxin, IscA, β -MPP, PAM18 *G. intestinalis*, IscS, IscU a [2Fe-2S] ferredoxinu *Cryptosporidium parvum* a Hsp60 *Entamoeba histolytica* byly analyzovány programy PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp>) a MITOPROT (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>). Tyto programy se používají na vyhledávání N-koncových signálních sekvencí, které směřují proteiny do matrix mitochondrií. Na základě informací poskytnutých programy PSORT II a MITOPROT byly u většiny proteinů identifikovány předpokládané N-koncové signální sekvence, které by tyto proteiny mohly směřovat do mitosomů (Tab. 3)³. Výjimkou byl IscS *G. intestinalis* (GiiscS), u kterého nebyla rozpoznána předpokládaná N-koncová signální sekvence pro transport do organel. Nalezené N-koncové signální sekvence pro transport do mitosomů jsou 4-35 AK dlouhé, hojně obsahují arginin a serin, mají schopnost vytvářet amfipatické α -helixy a obsahují arginin ve druhé pozici od předpokládaného místa štěpení mitochondriální procesovací proteázou (MPP). Sekvence začínají většinou methioninem a leucinem. Podobným způsobem byla u hydrogenosomálního proteinu TviscS rozpoznána předpokládaná N-koncová signální sekvence pro transport do hydrogenosomů (Tab. 3). Sekvence je 8 AK dlouhá, je bohatá na serin, má potenciál pro vytvoření amfipatického α -helixu a obsahuje arginin ve druhé pozici od předpokládaného místa štěpení proteázou MPP. Tato sekvence začíná, podobně jako většina předpokládaných N-koncových signálních sekvencí pro transport do mitosomů, methioninem a

³ Přístupové kódy k jednotlivým proteinům jsou uvedeny v příloze.

leucinem.

Tab. 3. Předpokládané N-koncové signální sekvence proteinů mitochondriálního typu u amitochondriálních prvoků.		
Tv	IscS	MLGSVSR S↓YFKGHYLDTQAT
Gi	IscS	MIYLDNQATTAIDPRVLAKMV
Gi	IscU	MTSLQLSSTSL LQSVARF↓ LTKKTS SDEVYS
Gi	IscA*	MLPALITPLVRS�TKNGIKITDAAV
Gi	Ferredoxin 1	MDQINGGLFPKALALTRYAS RG↓LILGII SAAGAE
Gi	Glutaredoxin	MDQINGGLFPKALALTRYAS RG↓LILGII SAAGAE
Gi	PAM18*	MLRVLSENRFPLSLVAGVVAGFY
Gi	β-MPP	MLIRD ↓IVPGALPSATVV
Cp	Hsp70	MSMIINSSFN GVVNSSGIAARILKRSPLVFSRY↓MSSKCEGKSSN
Cp	IscS	MIVHRYCRQWAPS VVRGISKLAFFSSMSIAKRP↓AYFDYQATTPVD
Cp	IscU	MLQLRQLIDKRILIKKCVPIQRL↓FYSDTVHDHFRN
Cp	Ferredoxin	MVNNLIWRISRP ISSRV↓ FS ¹⁹⁻³³ KRF FHSD
Eh	Hsp60*	MLSSSSHYNGKLLSLNIDCRE▼NVLSGIKKVADA

Vysvětlivky : Tv, *Trichomonas vaginalis*; Gi, *Giardia intestinalis*; Cp, *Cryptosporidium parvum*; Eh, *Entamoeba histolytica*.
 Symbol ↓ označuje předpokládané místo štěpení podle programu PSORT. Předpokládané signální sekvence podle programu MITOPROT jsou zvýrazněny tučným písmem. Červenou barvou je označený arginin ve druhé pozici od C-konce signální sekvence předpokládaného místa štěpení, modrou barvou leucin. * Symbol ▼ označuje N-konec maturovaného proteinu a tedy i místo odštěpení signální sekvence.
 * U IscA a PAM18 byly předpokládané signální sekvence vytypovány na základě porovnání homologu IscA a PAM 18.

8.1.1. Směrování mitosomálních proteinů do hydrogenosomů na základě N-koncových oblastí

Pro ověření, zda předpokládané N-koncové signální sekvence mitosomálních proteinů umožňují jejich transport nejen do mitosomů, ale rovněž i do příbuzných organel, hydrogenosomů, byly vybrány geny pro IscU a [2Fe-2S] ferredoxin *Giardia intestinalis* (GiiscU, Gifdx). Jako kontrolní hydrogenosomální protein byl vybrán IscS *Trichomonas vaginalis* (TviscS). Přeložené proteiny vybraných genů obsahují N-koncové sekvence, které jsou dlouhé 16 AK u GiiscU, 19 AK u Gifdx a 8 AK u TviscS (obr. 11).

IscU

<i>G. intestinalis</i>	<u>MTSLQLSSTSLLOQSVARFLTKKTSSE</u> DEVYSELAMQHYRTPVNIQTLDLDDDEHVGSGL	55---161
<i>T. vaginalis</i>	<u>MLAAVSRSSALNMMKPLGIMFYHENVNKHFKNPQNTGSLDMKAPDVGTTGI</u>	61---152
<i>E. coli</i>	MAYSEKVIDHYENPRNVGSFDNNDENVGSGM	42---128
<i>S. cerevisiae</i>	<u>MLPVITRFARPALMAIRPVNAMGVLRASSITKRLYHPKVIETHYTHPRNVGSLDKKLPNVGTGL</u>	74---165
<i>H. sapiens</i>	<u>MAAAGAFRLRRAASALLRLSPRLFARELSAPARLY</u> HKKVVDHYENPRNVGSLDKTSKNVGTGL	61---167

Ferredoxin

<i>G. intestinalis</i>	MSLLSSIRRFITFRVVQ	VEHTVSGAV	28---133
<i>T. vaginalis</i>	<u>MLSQVCRFGTITAVKGGVKKQLKFED</u>		26---100
<i>E. coli</i>	MPKIVILPHQDLCPDG--AVLEANS		23---111
<i>S. cerevisiae</i>	<u>MLKIVTRAGHTARISNIAA (AK₁₃) TTTTRFLPFSTSSFLNHGHLKKPKPGEELKITDGSQKTYEVCE</u>		75---172
<i>H. sapiens</i>	<u>MAAAGGARLLRAAS (AK₃₃) EASRSLVSARARSSSE</u> DKITVHDGETLTTKGV		81---184

IscS

<i>G. intestinalis</i>	MIYLDNQATTAIDPRVLAKMV		23---433
<i>E. coli</i>	MKLPITYLDYSATTPVDPVVAEKMM		26---404
<i>T. vaginalis</i>	MLKSTATRSITRLSQVYNVPAATYRACLVSRRFY (AK ₃₃)	IYLDNQATTPDPRVLDTML	121---497
<i>S. cerevisiae</i>	<u>MLKSTATRSITRLSQVYNVPAATYRACLVSRRFY (AK₃₃)</u>		
<i>H. sapiens</i>	<u>MLLRVAWRRAAVAVTAAPG PKPAAPTRGLRLRV (AK₃₅)</u>	LYMDVQATTPLDPRVLDAML	80---457

Obr. 11. Porovnání signálních sekvencí N-koncových oblastí homologů IscU, IscS a ferredoxinu.

Předpokládané signální sekvence jsou podle programu PSORT II označené podtržením (<http://psort.nibb.ac.jp>) a podle programu MITOPROT tučným písmem (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>). Předpokládání signální sekvence, které byly testované v diplomové práci jsou zvýrazněné červenou barvou.

Geny kódující GiiscU, Gifdx a TviscS byly zaklonovány do vektoru Master-Neo, který umožňuje expresi rekombinantních proteinů s C-terminálním HA-tagem v *T. vaginalis*. V trichomonádách byly rekombinantní proteiny detekovány imunofluorescencí (obr. 12) nebo v buněčných frakcích pomocí imunoblotingu (obr. 13). Ke studii byly použity následující kompletní geny a geny zkrácené o sekvence, které kódují předpokládané N-koncové signální sekvence a další konstrukty (viz. příloha):

- **GiiscU**: Kompletní IscU s předpokládanou signální sekvencí pro transport do organel.
- **ΔnGiiscU**: IscU zkrácený o předpokládanou signální sekvenci pro transport do organel.
- **Gifdx**: Kompletní [2Fe-2S] ferredoxin s předpokládanou signální sekvencí pro transport do organel.

- **Δ nGifdx:** [2Fe-2S] ferredoxin zkrácený o předpokládanou signální sekvenci pro transport do organel.
- **G α -tubulin:** Homolog podjednotky α -tubulinu *G. intestinalis* jako negativní kontrola pro transport proteinů do hydrogenosomů.
- **5'-GiiscU. α -tubulin:** Homolog podjednotky α -tubulinu s předpokládanou N-koncovou signální sekvencí GiiscU.
- **TviscS:** Kompletní TviscS s předpokládanou signální sekvencí pro transport do hydrogenosomů.
- **Δ nTviscS:** TviscS zkrácený o předpokládanou signální sekvenci pro transport do hydrogenosomů.

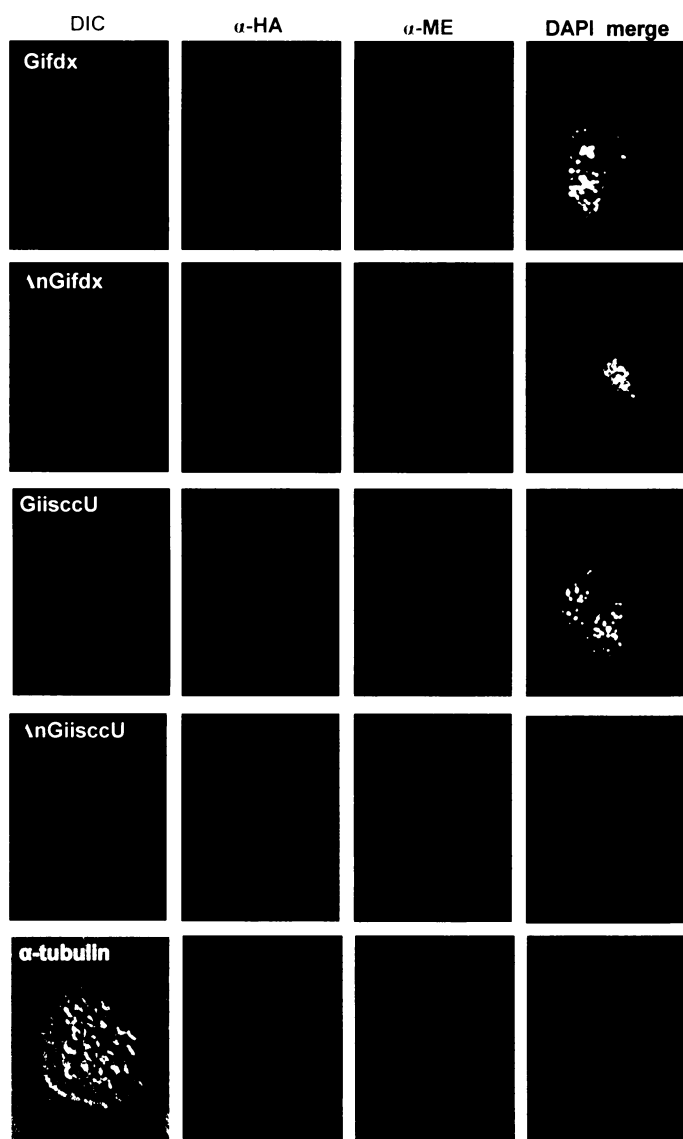
GiiscU, Gifdx a TviscS byly účinně transportovány do hydrogenosomů.

Imunofluorescence transformovaných trichomonád ukázala, že signál pro GiiscU, Gifdx je patrný v drobných kulovitých organelách odpovídajícím hydrogenosomům v blízkosti jádra a cytoskeletárních struktur kosty a axostylu (obr. 12). Signál pro GiiscU, Gifdx a TviscS kolokalizoval se signálem pro jablečný enzym, který je typickým hydrogenosomálním proteinem. Odstranění předpokládaných signálních sekvencí způsobilo u Δ nGiiscU výrazné snížení a u Δ nGifdx úplné zastavení transportu těchto proteinů do hydrogenosomů. Tyto proteiny byly detekovány v cytosolu. Cytoskeletární protein G α -tubulin, který nemá N-koncovou signální sekvenci pro transport do organel, zůstal výhradně v cytosolu.

Podobné výsledky ukázala analýza rekombinantních proteinů v buněčných frakcích *T. vaginalis* pomocí imunoblotingu (obr. 13). K analýze byly použity vzorky celkových buněčných lyzátů a frakcí cytosolu a hydrogenosomů. Proteiny navázané pouze na povrch hydrogenosomů, které nebyly transportovány do matrix organel, byly

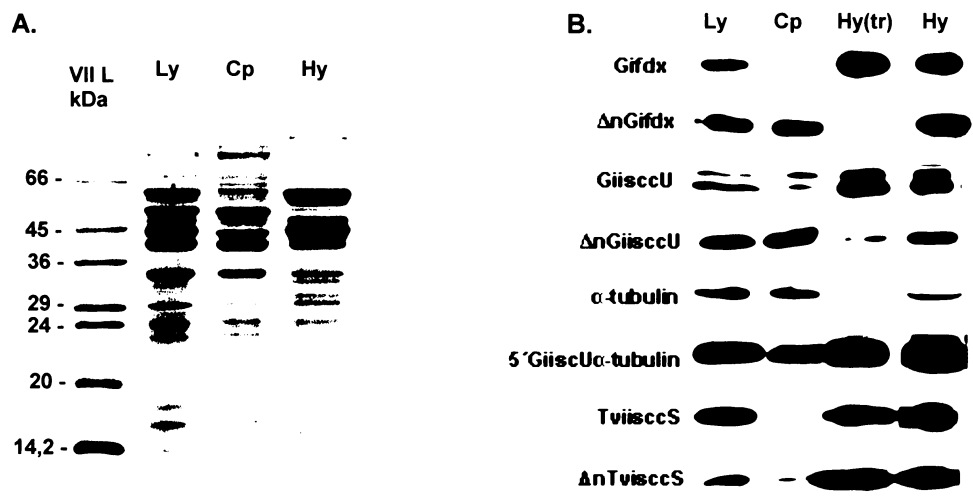
odstraněny trypsinem. Signál pro GiiscU, Gifdx a TviscS je patrný v hydrogenosomech, jejichž povrch byl ošetřen trypsinem. To znamená, že GiiscU, Gifdx a TviscS byly transportovány do matrix hydrogenosomů. Hydrogenosomální frakce GiiscU ukazuje dva signály o velikosti 17 kDa a 20 kDa. Je pravděpodobné, že signál o velikosti 17 kDa by mohl představovat maturovaný GiiscU po odštěpení předpokládané signální sekvence proteázou v matrix hydrogenosomu. Zkrácený Δ NGifdx byl zadržen výhradně v cytosolu. Zkrácený Δ NGiiscU byl zadržen především v cytosolu avšak částečně transportován i do hydrogenosomů. Odstranění signální sekvence u Δ NTviscS mělo nepatrný vliv na narušení transportu do hydrogenosomů. Malá část Δ NTviscS byla směřována do cytosolu, téměř všechny Δ NTviscS byl transportován do hydrogenosomů. $\text{G}\alpha$ -tubulin bez N-koncové signální sekvence zůstal výhradně v cytosolu. Přidání N-koncové signální sekvence GiiscU k N-konci $\text{G}\alpha$ -tubulinu způsobilo transport výrazného podílu tohoto fúzního proteinu do hydrogenosomů.

Výše uvedené výsledky potvrdily předpoklad, že N-koncové oblasti GiiscU a Gifdx jsou schopné směřovat mitosomální proteiny do hydrogenosomů a mají tedy funkci signálních sekvencí pro transport proteinů do organel. N-koncová signální sekvence GiiscU navíc dokáže směřovat $\text{G}\alpha$ -tubulin do hydrogenosomů. Naproti tomu předpokládaná signální sekvence TviscS měla nepatrný vliv na transport do hydrogenosomů. Její odstranění z TviscS nezpůsobilo u Δ NTviscS téměř žádné znatelné snížení transportu do hydrogenosomů a způsobilo pouze nepatrné zadržení tohoto proteinu v cytosolu. Je pravděpodobné, (i) že TviscS je transportován do hydrogenosomů na základě prozatím neidentifikovaných interních signálů a (ii) že předpokládaná N-koncová signální sekvence tohoto proteinu má pouze pomocnou funkci.



Obr. 12. Vliv N-koncových signálních sekvencí na transport mitosomálních proteinů *G. intestinalis* do hydrogenosomů *T. vaginalis*.

Kompletní proteiny (Gifdx, GiiscU) a proteiny bez N-koncové signální sekvence (Δ nGifdx, Δ nGiiscS, α -tubulin) byly produkovány v transformovaných trichomonádách s C-koncovým HA tagem (zelená barva). Králičí polyklonální protilátka proti hydrogenosomálnímu jablečnému enzymu byla použita pro značení hydrogenosomů (červená barva). Jádra trichomonád jsou značená DAPI (modrá barva). DIC, nomarského diferenciální interferenční kontrast.



Obr. 13 Detekce kompletních a zkrácených rekombinantních proteinů Gifdx, GiiscU a α-tubulinu v transformovaných trichomonádách pomocí imunoblotingu.

Proteiny byly rozděleny na SDS PAGE (A) a detekovány pomocí imunoblotingu (B). Signál pro rekombinantní proteiny byl detekován primární monoklonální myší α-HA protilátkou a sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidázou nebo s alkalickou fosfatázou. Ly, celkový buněčný lyzát. Cp, cytosol. Hy, hydrogenosomy. Hy(tr), hydrogenosomy ošetřené trypsinem.

8.1.2. Směrování mitosomálních proteinů do hydrogenosomů na základě předpokládaných interních sekvencí

Programy PSORT II a MITOPROT nerozpoznaly u mitosomálního proteinu GiiscS žádný předpokládaný N-koncový signál pro transport do organel. Porovnání několika desítek eukaryotních a bakteriálních homologů GiiscS odhalilo přítomnost dvou vložených sekvencí, které nejsou přítomny u IscS jiných organismů. Tyto sekvence neobsahují aminokyseliny, které se podílejí na enzymatické aktivitě GiiscS (obr. 14) (Tachezy et al., 2001). Pro základní analýzu 3D struktury GiiscS a zjištění polohy vložených sekvencí, byl použit program swiss-PdbViewer v 3.7 (obr. 15). První sekvence je 9AK dlouhá a nachází se v N-koncové části proteinu (N-IS, N-koncový interní signál). Sekvence je bohatá na kyselinu glutamovou a vytváří smyčku, která propojuje α -helix a β -řetězec polypeptidového řetězce GiiscS na povrchu tohoto proteinu. Druhá sekvence je dlouhá 23AK a nachází se v C-koncové části proteinu (C-IS, C-koncový interní signál). Sekvence je bohatá na basický lyzin a jsou v ní hojně zastoupeny kyseliny asparagová a glutamová. Sekvenci tvoří tři β -řetězce, které jsou vzájemně propojené dvěma smyčkami na povrchu GiiscS. Kompletní otevřené čtecí rámce GiiscS nebo jejich části byly zaklonovány do vektoru Master-Neo, který umožňuje expresi rekombinantních proteinů s C-terminálním HA-tagem v *T. vaginalis*. V trichomonádách byly rekombinantní proteiny detekovány imunofluorescencí (obr. 16) nebo v buněčných frakcích pomocí imunoblotingu (obr. 17). Pro zjištění, jakým způsobem se tyto sekvence podílejí na transportu GiiscS do hydrogenosomů, byly připraveny následující otevřené čtecí rámce (viz. příloha):

- **GiiscS**: Kompletní IscS s předpokládanými interními sekvencemi pro transport do organel.
- **Δ NGiiscS**: IscS bez interní sekvence, která se nachází v N-koncové části proteinu.



Obr.15. Model 3D struktury GiiscS a vložených interních sekvencí.

Model 3D struktury GiiscS (A). Aminokyselinové složení a 3D struktura vložených sekvencí N-IS a C-IS GiiscS (B). Model byl vytvořen programem swiss-PdbViewer na základě údajů získaných ze struktury krystalu IscS *E.coli* (1P3W, www.pubmed.com).

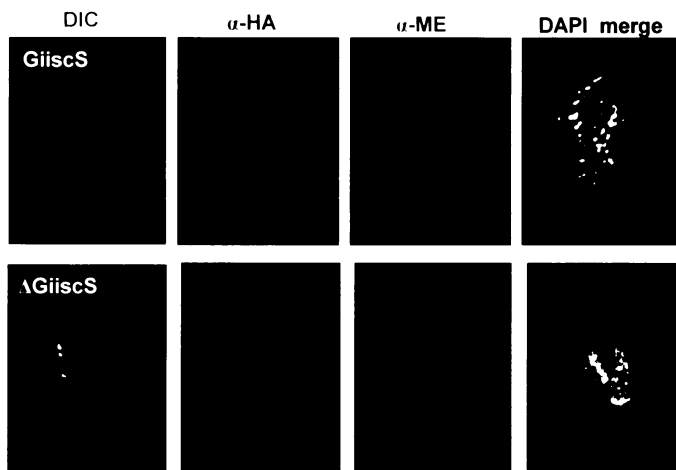
GiiscS byl účinně transportován do hydrogenosomů. Imunofluorescence transformovaných trichomonád ukázala, že signál pro GiiscS je patrný v organelách odpovídajícím hydrogenosomům (obr. 13). Signál pro GiiscS kolokalizoval se signálem pro jablečný enzym, který je typickým hydrogenosomálním proteinem. Odstranění obou interních sekvencí způsobilo u Δ GiiscS výrazné narušení transportu do hydrogenosomů. Většina Δ GiiscS byla detekována v cytosolu.

Pro studium funkce vložených sekvencí N-IS a C-IS byla také použita detekce rekombinantních proteinů v buněčných frakcích pomocí imunoblotingu (obr. 14). K analýze rekombinantních proteinů byly podobně jako v předešlé kapitole použity vzorky celkových buněčných lyzátů a frakcí cytosolu a hydrogenosomů. Proteiny navázané pouze na povrch hydrogenosomů, které nebyly transportovány do matrix organel, byly odstraněny trypsinem. Signál pro GiiscS je patrný v hydrogenosomech, jejichž povrch byl ošetřen trypsinem. To znamená, že GiiscS byl transportován do matrix hydrogenosomů. Odstranění N-IS, která se nachází v N-koncové části GiiscS (Δ NGiiscS) a odstranění C-koncové poloviny Δ NGiiscS (Δ NGiiscS $\frac{1}{2}$) nenarušilo žádným způsobem transport do hydrogenosomů. Naproti tomu odstranění C-IS, která se nachází v C-koncové části GiiscS (Δ CGiiscS), způsobilo, že výrazná část Δ CGiiscS zůstala v cytosolu. Část Δ CGiiscS byla však také transportována do hydrogenosomů. Odstranění N-koncové poloviny Δ CGiiscS (Δ CGiiscS $\frac{1}{2}$) způsobilo, že signál pro Δ CGiiscS $\frac{1}{2}$ je patrný pouze v celkovém buněčném lyzátu a v hydrogenosomech, jejichž povrch nebyl ošetřen trypsinem. To naznačuje, že Δ CGiiscS $\frac{1}{2}$ byl patrně během transportu do matrix hydrogenosomů zachycen v membránách těchto organel. Signál pro Δ GiiscS je patrný v cytosolu a částečně v hydrogenosomech, které byly ošetřeny trypsinem. Odstranění obou interních

sekvencí u Δ GiiscS tedy způsobilo pokles transportu do hydrogenosomů. Výrazná část Δ GiiscS byla zadržena v cytosolu.

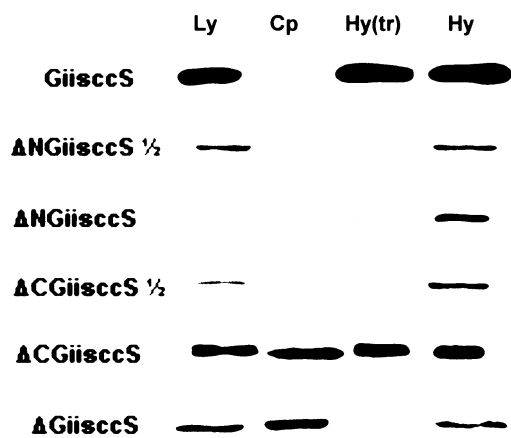
Výsledky ukázaly, že:

1. Unikátní vložená sekvence, která se nachází v C-koncové části GiiscS patrně obsahuje interní signál pro transport do hydrogenosomů.
2. N-koncová polovina GiiscS obsahuje interní signál pro transport do hydrogenosomů, tímto signálem však není unikátní vložená sekvence v N-koncové části tohoto proteinu.



Obr. 16. Vliv unikátních vložených sekvencí na transport GiiscS do hydrogenosomů *T. vaginalis*.

GiiscS a Δ GiiscS, u kterého byly odstraněny obě unikátní vložené sekvence, které se nacházejí v N-koncové a C-koncové části GiiscS (N-IS a C-IS), byly produkovány v transformovaných trichomonádách s C-koncovým HA tagem (zelená barva). Králičí polyklonální protilátka proti hydrogenosomálnímu jablečnému enzymu byla použita pro značení hydrogenosomů (červená barva). Jádra trichomonád jsou značena DAPI (modrá barva). DIC, nomarského diferenciální interferenční kontrast.



Obr. 17. Vliv N- a C-koncových sekvencí N-IS a C-IS na lokalizaci GiiscS v buněčných frakcích *T. vaginalis*.

Rekombinantní proteiny byly detekovány imunoblotingem. Signál pro rekombinantní proteiny byl detekován primární monoklonální myší α -HA protilátkou a sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidázou nebo s alkalickou fosfatázou. Ly, celkový buněčný lyzát. Cp, cytosol. Hy, hydrogenosomy. Hy(tr), hydrogenosomy ošetřené trypsinem.

9. Diskuze

Mitochondrie jsou typické orgány eukaryotních organismů, které se vyvinuly endosymbiózou z α -proteobakterií v hostitelské buňce (Gray et al., 1999). Doposud není zcela jasné, jestli hostitelská buňka byla podobná dnešním archebakteriím anebo zdali se jednalo již o částečně vyvinutého eukaryota, který měl jádro, cytoskelet a jednoduchý endomembránový systém (tzv. archezoon) (Dyall et al., 2004). Podle archezoální hypotézy se z archezoona, který endosymbionta nikdy nezískal, vyvinuli dnešní amitochondriální eukaryota, tzv. Archezoa (Cavalier-Smith, 1986, 1989). U amitochondriálních protist byly objeveny orgány endosymbiotického původu, hydrogenosomy a mitosomy. Velice málo se ví o původu a biogenezi mitosomů. Společnou funkcí mitosomů, hydrogenosomů a mitochondrií je však tvorba Fe-S center. Mitosomy a hydrogenosomy používají také obdobný mechanismus pro transport jaderně kódovaných proteinů, který je znám u mitochondrií. V diplomové práci jsem se pokusil zjistit, zda jsou N-koncové oblasti mitosomálních proteinů mitochondriálního typu *G. intestinalis* schopné směřovat tyto proteiny do hydrogenosomů *T. vaginalis*.

Výsledky uvedené v diplomové práci ukázaly, že mitosomální proteiny mitochondriálního typu GiiscU a Gifdx mohou být transportovány na základě rozpoznání předpokládaných N-koncových signálních sekvencí do hydrogenosomů *T. vaginalis*. N-koncová signální sekvence GiiscU byla schopná směřovat i cytoskeletární protein α -tubulin do matrix hydrogenosomů trichomonád. V současných pracích bylo zároveň ukázáno, že GiiscU a Gifdx jsou transportovány na základě rozpoznání předpokládaných N-koncových signálních sekvencí do mitosomů *G. intestinalis* (Regoes et al., 2005; Doležal et al., 2005). Regoes et al. (2005) rovněž ukázali, že N-koncová signální sekvence Gifdx je dostačující pro

směrování GFP (green fluorescent protein) do matrix mitochondrií lidských kmenových buněk ledvin. Signální sekvence hydrogenosomálních a mitochondriálních proteinů a předpokládané signální sekvence mitosomálních proteinů mají schopnost vytvářet amfipatické α -helixy, jsou bohaté na arginin a serin a obsahují předpokládané místo pro odštěpení mitochondriální procesovací proteázou (MPP) (Bradley et al., 1997; Adamec et al., 1999; Doležal et al., 2005). Odštěpení signální sekvence GiiscU katalyzuje hydrogenosomální lyzát z trichomonád a mitochondriální lyzát z kvasinek. Inhibice reakce chelátorem EDTA naznačuje, že odštěpení signální sekvence katalyzuje metalopeptidáza (Doležal et al., 2005). Homolog podjednotky β -MPP *Trichomonas vaginalis* (β -HPP, hydrogenosomální procesovací peptidáza), který obsahuje charakteristický His-X-X-Glu-His motiv, je transportován do hydrogenosomů *in vivo* a specificky štěpí signální sekvence hydrogenosomálních prekurzorů *in vitro* (Brown et al., 2004). V hydrogenosomech trichomonád byly detekovány signály pro GiiscU o velikosti 17 kDa a 20 kDa. Signál pro GiiscU o velikosti 17 kDa by mohl patrně představovat maturovaný GiiscU po odštěpení předpokládané signální sekvence β -HPP v matrix hydrogenosomu, přímý důkaz však chybí. *G. intestinalis* kóduje a transportuje do mitosomů homolog podjednotky β -MPP s charakteristickým His-X-X-Glu-His motivem (Doležal et al., 2005). Doležal et al. (2005) ukázali, že u GiiscU došlo k odštěpení N-koncové signální sekvence v mitosomech *G. intestinalis in vivo* a to mezi fenylalaninem v 18 pozici a leucinem v 19 pozici od N-konce signální sekvence. Signální sekvenci GiiscU specificky štěpí krysí rekombinantní proteáza (MPP) *in vitro*. K odštěpení N-konce GiiscU dochází po inkubaci s krysí rekombinantní proteázou (MPP) v místě, které se shoduje s výsledky práce Doležal et al. (2005) a s předpovědí podle programu PSORT II. Naproti tomu

Tovar et al. (2003) ukázali místo pro odštěpení proteázou MPP, které se neshoduje s výše uvedenými výsledky.

IscS je jedním z klíčových proteinů pro tvorbu Fe-S center, ke které dochází v matrix mitochondrií. Jak lze očekávat u proteinů mitochondriální matrix, byla u hydrogenosomálního homologu IscS *T. vaginalis* (TviscS) identifikována předpokládaná N-koncová signální sekvence pro transport do organel. Navzdory očekávání měla vytypovaná N-koncová sekvence TviscS pouze nepatrný vliv na transport do hydrogenosomů trichomonád. Podobný fenomén byl však dříve popsán u IscU *Saccharomyces cerevisiae* (Isu1p). Podobně jako u TviscS, odstranění N-koncové signální sekvence nezpůsobilo výraznější pokles transportu proteinu do matrix mitochondrií kvasinek. Transportu Isu1p do mitochondrií nezabránilo ani přidání sekvence s negativním nábojem na N-konec zkráceného proteinu (Gerber et al., 2004). TviscS a Isu1p jsou tedy pravděpodobně transportovány do matrix organel na základě prozatím neidentifikovaných interních signálů.

U mitosomálního homologu IscS *G. intestinalis* (GiiscS) nebyla rozpoznána žádná N-koncová signální sekvence. Naproti tomu byly v N- a C-koncové části tohoto proteinu rozpoznány unikátní vložené sekvence, které nejsou u ostatních homologů IscS přítomny a které by mohly obsahovat interní signál pro transport do organel. Výsledky ukázaly, že C-koncová vložená sekvence ovlivňuje transport GiiscS do hydrogenosomů trichomonád a může tedy představovat interní signální sekvenci. Naproti tomu N-koncová vložená sekvence však neměla na transport GiiscS do hydrogenosomů vliv. Proteiny mitochondriálního typu Hsp70 *Trachipleistophora hominis* a Hsp60 *Giardia intestinalis* nebo některé proteiny mitochondriální matrix, jako např. Hsp10, β -oxoacyl-CoA thioláza a přenašeče síry STs (sulfur transferases, syn. rhodanese) neobsahují podobně jako GiiscS, N-koncové signální sekvence pro

transport do organel (Regoes et al., 2005). Doposud se ví jen velmi málo o tom, na základě jakých signálů jsou tyto proteiny transportovány do matrix organel.

Přítomnost interního signálu v C-koncové části GiiscS je zcela ojedinělým doloženým případem, kdy je tento protein transportován do matrix organel pouze na základě interních signálů.

N-koncové signální sekvence proteinů, které jsou transportovány do matrix mitochondrií, jsou rozpoznávány a translokovány komplexy TOM, TIM a PAM. Přesný mechanismus transportu proteinů do matrix hydrogenosomů a mitosomů není známý, stejně tak jako translokázy, které transportují proteiny do matrix těchto organel. Hledání genů podobným podjednotkám TOM, TIM a PAM odhalilo u giardií a trichomonád pouze některé z podjednotek těchto translokáz. U giardií a trichomonád byl rozpoznán homolog PAM18. U giardií byl objeven homolog transportního kanálu Tom40, ale nikoliv Tim23. Naopak u trichomonád byl objeven homolog Tim23, ale žádný homolog Tom40. Pam18 *G. intestinalis* (GiPam18) a *T. vaginalis* (TvPam18) obsahují N-koncové signální sekvence pro transport do mitosomů a hydrogenosomů. GiPam18 je transportován do mitosomů giardií a hydrogenosomů trichomonád a stejně tak je do těchto organel transportován TvPam18 (Doležal et al., 2005; Doležal et al., 2006). V genomu trichomonád byla také rozpoznána sekvence podobná podjednotce Sam50 komplexu SAM, který transportuje proteiny do vnější mitochondriální membrány (Doležal et al., 2006). V genomu *G. intestinalis* byl identifikován homolog SecY podjednotky transportéru SecYEG/Sec61 $\alpha\beta\gamma$ archebakterií, eubakterií a endoplasmatického retikula eukaryot. Prozatím můžeme pouze hypotetizovat, zda by se SecY mohl u giardií podílet na transportu proteinů do mitosomů. Pro pochopení, jakým způsobem by se výše uvedené homology mohly

podílet na transportu proteinů do mitosomů a hydrogenosomů, je zapotřebí provést další experimentální studie.

Z výsledků diplomové práce a z poznatků uvedených publikací vyplývá, že mitosomální proteiny *G. intestinalis* se transportují do mitosomů, hydrogenosomů a mitochondrií podobným mechanismem na základě rozpoznání N-koncových nebo interních sekvencí. Výše uvedená zjištění podporují předpoklad, že hydrogenosomy, mitosomy a mitochondrie jsou blízce příbuzné organely, které se pravděpodobně vyvinuly ze společného symbiotického předka. Je tedy otázkou, zda se do současné doby dochovali potomci původních amitochondriálních organismů a zda v průběhu eukaryogeneze takové organismy kdy existovaly.

10. Závěr

V genomu *Trichomonas vaginalis* a *Giardia intestinalis* byly identifikovány homology proteinů mitochondriálního typu IscU, IscS a [2Fe-2S] ferredoxinu, které se v mitochondriích podílejí na syntéze Fe-S center mitochondriálních a extramitochondriálních proteinů. Hydrogenosomy *Trichomonas vaginalis* a mitosomy *Giardia intestinalis* katalyzují syntézu Fe-S center *in vitro*. V hydrogenosomech trichomonád a v mitosomech giardií byly identifikovány homology IscU a IscS. Počítačové programy PSORT II a MITOPROT, které slouží pro vyhledávání N-koncových signálních sekvencí pro transport proteinů do matrix mitochondrií, rozpoznaly u homologů IscU a [2Fe-2S] ferredoxinu *Giardia intestinalis* (GiiscS a Gifdx) předpokládané N-koncové signálních sekvence pro transport do mitosomů a u homologu IscS *Trichomonas vaginalis* (TviscS) předpokládanou N-koncovou signální sekvenci pro transport do hydrogenosomů. Naproti tomu u homologu IscS *Giardia intestinalis* (GiiscS) nebyla rozpoznána žádná N-koncová signální sekvence pro transport do mitosomů. U GiiscS byla zjištěna přítomnost dvou unikátních vložených sekvencí (N-IS a C-IS), které nebyly u ostatních homologů přítomny a které by se mohly podílet u GiiscS na transportu do mitosomů. V zadané diplomové práci jsem se pokusil zjistit, (i) zda jsou N-koncové signální sekvence mitosomálních proteinů schopné směřovat tyto proteiny do hydrogenosomů a (ii) jakým způsobem se unikátní vložené sekvence GiiscS podílejí na transportu tohoto proteinu do organel. Výsledky ukázaly, že:

1. Předpokládané signální sekvence GiiscU a Gifdx směřují tyto proteiny do hydrogenosomů.

2. Odstranění předpokládaných signálních sekvencí způsobilo zadržetí zkrácených forem Δ nGiiscU a Δ nGifdx v cytosolu.
3. Předpokládaná N-koncová signální sekvence GiiscU směřovala výrazný podíl typického cytoskeletárního proteinu α -tubulinu do hydrogenosomů.
4. Odstranění předpokládané N-koncové signální sekvence z TviscS nezpůsobilo téměř žádné znatelné snížení transportu do hydrogenosomů a způsobilo pouze nepatrné zadržetí Δ nTviscS v cytosolu. TviiscS je tedy transportován do hydrogenosomů nejen na základě N-koncové signální sekvence, ale je směřován do matrix hydrogenosomů patrně i na základě hypotetických interních signálů.
5. Mitosomální protein IscS *Giardia intestinalis* (GiiscS) byl transportován do hydrogenosomů *T. vaginalis*.
6. Odstranění N-IS, která se nachází v N-koncové části GiiscS (Δ NGiiscS), neovlivnilo transport GiiscS do hydrogenosomů.
7. Odstranění C-IS, která se nachází v C-koncové části GiiscS (Δ CGiiscS), způsobilo pokles v transportu GiiscS do hydrogenosomů. Odstranění obou interních sekvencí GiiscS způsobilo u Δ GiiscS výrazné narušení transportu do hydrogenosomů.

Výše uvedené výsledky podpořily předpoklad, že:

- Homology mitochondriálních proteinů GiiscU, Gifdx se transportují do hydrogenosomů na základě rozpoznání předpokládaných N-koncových signálních sekvencí, které jsou podobné N-koncovým oblastem prekurzorů mitochondriální matrix.
- C-IS, která se nachází v C-koncové části GiiscS patrně obsahuje interní signál pro transport do hydrogenosomů. N-IS, která se nachází v N-koncové části GiiscS

neobsahuje interní signál pro transport do hydrogenosomů. Interní signál pro transport do hydrogenosomů se také nachází v N-koncové polovině GiiscS.

- Schopnost mitosomů, hydrogenosomů a mitochondrií rozpoznat obdobné signální sekvence proteinů transportovaných z cytoplasmy do matrix těchto organel poskytuje silný argument pro hypotézu, že mitosomy, hydrogenosomy a mitochondrie mají společný endosymbiotický původ.

11. Seznam literatury

1. Adamec,J., Gakh,O., Spizek,J. & Kalousek,F. Complementation between mitochondrial processing peptidase (MPP) subunits from different species. *Arch. Biochem. Biophys.* **370**, 77-85 (1999).
2. Adrian,G.S., McCammon,M.T., Montgomery,D.L. & Douglas,M.G. Sequences required for delivery and localization of the ADP/ATP translocator to the mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol.* **6**, 626-634 (1986).
3. Andersson,S.G. & Kurland,C.G. Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 535-541 (1999).
4. Balk,J., Pierik,A.J., Netz,D.J., Muhlenhoff,U. & Lill,R. The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *EMBO J.* **19;23**, 2105-2115 (2004).
5. Benchimol,M., Elias,C.A. & De Souza,W. Tritrichomonas foetus: ultrastructural localization of calcium in the plasma membrane and in the hydrogenosome. *Exp. Parasitol.* **54**, 277-284 (1982).
6. Benchimol,M. & De Souza,W. Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of Tritrichomonas foetus. *J. Protozool.* **30**, 422-425 (1983).
7. Benchimol,M., Johnson,P.J. & De Souza,W. Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study. *Biol. Cell.* **87**, 197-205 (1996).
8. Boxma,B. *et al.* An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature.* **434**, 74-79 (2005).
9. Bradley,P.J., Lahti,C.J., Plumper,E. & Johnson,P.J. Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist Trichomonas: similarities with mitochondrial protein import. *EMBO J.* **16**, 3484-3493 (1997).
10. Brix,J., Rudiger,S., Bukau,B., Schneider-Mergener,J. & Pfanner,N. Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70

- in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *J. Biol. Chem.* **274**, 16522-16530 (1999).
11. Brown, M.T., Weihong, Y. & Johnson, P.J. A hydrogenosomal processing peptidase in *Trichomonas vaginalis*. Woods Hole. 2004.
Ref Type: Abstract
 12. Bukau, B. & Horwich, A.L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell.* **92**, 351-366 (1998).
 13. Cavalier-Smith, T. The kingdoms of organisms. *Nature.* **324**, 416-417 (1986).
 14. Cavalier-Smith, T. Molecular phylogeny. Archaeobacteria and Archezoa. *Nature.* **339**, 100-101 (1989).
 15. Cerkasovova, A., Cerkasov, J., Kulda, J. & Reischig, J. Circular DNA and cardiolipin in hydrogenosomes, microbody-like organelles of trichomonads. *Folia Parasitol. (Praha).* **23**, 33-37 (1976).
 16. Chacinska, A. *et al.* Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J.* **23**, 3735-3746 (2004).
 17. Chacinska, A. *et al.* Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell.* **120**, 817-829 (2005).
 18. D'Silva, P., Liu, Q., Walter, W. & Craig, E.A. Regulated interactions of mtHsp70 with Tim44 at the translocon in the mitochondrial inner membrane. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1084-1091 (2004).
 19. D'Silva, P.R., Schilke, B., Walter, W. & Craig, E.A. Role of Pam16's degenerate J domain in protein import across the mitochondrial inner membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12419-12424 (2005).
 20. Diekert, K. *et al.* Apocytochrome c requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane. *EMBO J.* **20**, 5626-5635 (2001).

21. Dietmeier,K. *et al.* Targeting and translocation of the phosphate carrier/p32 to the inner membrane of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **268**, 25958-25964 (1993).
22. Ding,H., Clark,R.J. & Ding,B. IscA mediates iron delivery for assembly of iron-sulfur clusters in IscU under the limited accessible free iron conditions. *J. Biol. Chem.* **279**, 37499-37504 (2004).
23. Dolezal,P. *et al.* Giardia mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 10924-10929 (2005).
24. Dolezal,P., Dancis,A., Lesuisse,E., Embley,T.M. & Tachezy,J. Functional frataxin in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. 2006.
Ref Type: Thesis/Dissertation
25. Dolezal,P., Likic,V., Tachezy,J. & Lithgow,T. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. 2006.
Ref Type: Thesis/Dissertation
26. Drmota,T. *et al.* Iron-ascorbate cleavable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: purification and characterization. *Mol Biochem. Parasitol.* **20;83**, 221-234 (1996).
27. Dutkiewicz,R. *et al.* Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their in vivo function. *J. Biol. Chem.* **279**, 29167-29174 (2004).
28. Dyall,S.D. *et al.* Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Mol Cell Biol.* **20**, 2488-2497 (2000).
29. Dyall,S.D. & Johnson,P.J. Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 404-411 (2000).
30. Dyall,S.D. *et al.* *Trichomonas vaginalis* Hmp35, a putative pore-forming hydrogenosomal membrane protein, can form a complex in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **278**, 30548-30561 (2003).

31. Dyall,S.D., Brown,M.T. & Johnson,P.J. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science*. **304**, 253-257 (2004).
32. Ellis,R.J. Molecular chaperones: Plugging the transport gap. *Nature*. **421**, 801-802 (2003).
33. Embley,T.M. *et al.* Hydrogenosomes, mitochondria and early eukaryotic evolution. *IUBMB. Life*. **55**, 387-395 (2003).
34. Embley,T.M. & Martin,W. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature*. **440**, 623-630 (2006).
35. Emelyanov,V.V. Phylogenetic affinity of a Giardia lamblia cysteine desulfurase conforms to canonical pattern of mitochondrial ancestry. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**, 257-266 (2003).
36. Fenchel,T. & Finlay,B.J. Endosymbiotic methanogenic bacteria in anaerobic ciliates: significance for growth efficiency of the host. *J Protozool.* **38**, 18-22 (1991).
37. Forestier,M. *et al.* Expression of two [Fe]-hydrogenases in Chlamydomonas reinhardtii under anaerobic conditions. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2750-2758 (2003).
38. Gaume,B. *et al.* Unfolding of preproteins upon import into mitochondria. *EMBO J.* **16**, 6497-507 (1998).
39. Gentle,I., Gabriel,K., Beech,P., Waller,R. & Lithgow,T. The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J. Cell Biol.* **164**, 19-24 (2004).
40. George,R., Beddoe,T., Landl,K. & Lithgow,T. The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2296-2301 (1998).
41. Gerber,J., Muhlenhoff,U. & Lill,R. An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* **4**, 906-911 (2003).

42. Gerber,J., Neumann,K., Prohl,C., Muhlenhoff,U. & Lill,R. The yeast scaffold proteins Isu1p and Isu2p are required inside mitochondria for maturation of cytosolic Fe/S proteins. *Mol Cell Biol.* **24**, 4848-4857 (2004).
43. Goldfarb,D.S. Are the cytosolic components of the nuclear, ER, and mitochondrial import apparatus functionally related? *Cell.* **70**, 185-188 (1992).
44. Gray,M.W., Burger,G. & Lang,B.F. Mitochondrial evolution. *Science.* **283**, 1476-1481 (1999).
45. Habib,S.J., Waizenegger,T., Lech,M., Neupert,W. & Rapaport,D. Assembly of the TOB complex of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**, 6434-6440 (2005).
46. Hackstein,J.H., Akhmanova,A., Boxma,B., Harhangi,H.R. & Voncken,F.G. Hydrogenosomes: eukaryotic adaptations to anaerobic environments. *Trends Microbiol.* **7**, 441-447 (1999).
47. Hartl,F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* **381**, 571-579 (1996).
48. Haucke,V. *et al.* Analysis of the sorting signals directing NADH-cytochrome b5 reductase to two locations within yeast mitochondria. *Mol Cell Biol.* **17**, 4024-4032 (1997).
49. Hausmann,A. *et al.* The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: an essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3266-3271 (2005).
50. Heimpel,S., Basset,G., Odoy,S. & Klingenberg,M. Expression of the mitochondrial ADP/ATP carrier in *Escherichia coli*. Renaturation, reconstitution, and the effect of mutations on 10 positive residues. *J. Biol. Chem.* **276**, 11499-11506 (2001).
51. Hendrick,J.P., Hodges,P.E. & Rosenberg,L.E. Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 4056-4060 (1989).

52. Herrmann, J.M. Converting bacteria to organelles: evolution of mitochondrial protein sorting. *Trends Microbiol.* **11**, 74-79 (2003).
53. Hill, K. *et al.* Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature.* **395**, 516-521 (1998).
54. Hines, V. *et al.* Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70. *EMBO J.* **9**, 3191-3200 (1990).
55. Hrdy, I. & Muller, M. Primary structure of the hydrogenosomal malic enzyme of *Trichomonas vaginalis* and its relationship to homologous enzymes. *J Eukaryot Microbiol.* **42**, 593-603 (1995)
56. Hrdy, I. & Muller, M. Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *J Mol Evol.* **41**, 388-96 (1995)
57. Hrdy, I. *et al.* *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature.* **432**, 618-622 (2004).
58. Humphreys, M.J., Ralphs, J., Durrant, L. & Lloyd, D. Hydrogenosomes in trichomonads are calcium stores and have a transmembrane electrochemical potential. *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 324S (1994).
59. Ishihara, N., Komiya, T., Sakaguchi, M., Ito, A. & Mihara, K. Characterization of the initial steps of precursor import into rat liver mitoplasts. *J. Biochem. (Tokyo).* **124**, 824-834 (1998).
60. Johnson, A.E. & Jensen, R.E. Barreling through the membrane. *Nat. Struct. Mol Biol.* **11**, 113-114 (2004).
61. Katinka, M.D. *et al.* Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature.* **414**, 450-453 (2001).
62. Kaut, A., Lange, H., Diekert, K., Kispal, G. & Lill, R. Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function. *J. Biol. Chem.* **275**, 15955-15961 (2000).

63. Kispal,G., Csere,P., Prohl,C. & Lill,R. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* **18**, 3981-3989 (1999).
64. Koehler,C.M. *et al.* Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *EMBO J.* **17**, 6477-6486 (1998).
65. Koehler,C.M. The small Tim proteins and the twin Cx3C motif. *Trends Biochem. Sci.* **29** , 1-4 (2004).
66. Kovermann,P. *et al.* Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Mol Cell.* **9**, 363-373 (2002).
67. Kozjak,V. *et al.* An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* **278**, 48520-48523 (2003).
68. Krebs,C. *et al.* IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry.* **20;40**, 14069-14080 (2001).
69. LaGier,M.J., Tachezy,J., Stejskal,F., Kutisova,K. & Keithly,J.S. Mitochondrial-type iron-sulfur cluster biosynthesis genes (IscS and IscU) in the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology.* **149**, 3519-3530 (2003).
70. Lange,H., Kaut,A., Kispal,G. & Lill,R. A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1050-1055 (2000).
71. Lange,H. *et al.* An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep.* **2**, 715-720 (2001).
72. Lange,H., Muhlenhoff,U., Denzel,M., Kispal,G. & Lill,R. The heme synthesis defect of mutants impaired in mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis is caused by reversible inhibition of ferrochelatase. *J. Biol. Chem.* **279**, 29101-29108 (2004).

73. Li,J., Saxena,S., Pain,D. & Dancis,A. Adrenodoxin reductase homolog (Arh1p) of yeast mitochondria required for iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **276**, 1503-1509 (2001).
74. Lill,R. & Kispal,G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 352-356 (2000).
75. Lill,R. & Muhlenhoff,U. Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 133-141 (2005).
76. Lindmark,D.G. & Muller,M. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Trichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* **248**, 7724-7728 (1973).
77. Lithgow,T. Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Lett.* **476**, 22-26 (2000).
78. Liu,Q., D'Silva,P., Walter,W., Marszalek,J. & Craig,E.A. Regulated cycling of mitochondrial Hsp70 at the protein import channel. *Science.* **300**, 139-141 (2003).
79. Lutz,T., Neupert,W. & Herrmann,J.M. Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *EMBO J.* **22**, 4400-4408 (2003).
80. Macasev,D. *et al.* Tom22', an 8-kDa trans-site receptor in plants and protozoans, is a conserved feature of the TOM complex that appeared early in the evolution of eukaryotes. *Mol Biol. Evol.* **21**, 1557-1564 (2004).
81. Margulis,L. & Bermudes,D. Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory. *Symbiosis.* **1:101-24.**, 101-124 (1985).
82. Margulis,L. Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1071-1076 (1996).
83. Martin,W. & Muller,M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature.* **392**, 37-41 (1998).
84. Marvin-Sikkema,F.D., Driessden,A.J.M., Gottschal,J.C. & Prins,R.A. Metabolic energy generation in hydrogenosomes of the anaerobic fungus *Neocallimastix-*

evidence for a functional relationship with mitochondria. 98, 205-212. 1994.

Ref Type: Generic

85. Meisinger,C., Brix,J., Model,K., Pfanner,N. & Ryan,M.T. The preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: receptors and a general import pore. *Cell Mol Life Sci.* **56**, 817-824 (1999).
86. Model,K. *et al.* Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 361-370 (2001).
87. Model,K. *et al.* Protein translocase of the outer mitochondrial membrane: role of import receptors in the structural organization of the TOM complex. *J. Mol Biol.* **316**, 657-666 (2002).
88. Mokranjac,D., Sichting,M., Neupert,W. & Hell,K. Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *EMBO J.* **22**, 4945-4956 (2003).
89. Mokranjac,D. *et al.* Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J.* **22**, 816-825 (2003).
90. Mokranjac,D. & Neupert,W. Protein import into mitochondria. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1019-1023 (2005).
91. Muhlenhoff,U., Richhardt,N., Gerber,J. & Lill,R. Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria. A requirement for ATP, NADH, and reduced iron. *J. Biol. Chem.* **277**, 29810-29816 (2002).
92. Muller,M. The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2879-2889 (1993).
93. Murakami,H., Pain,D. & Blobel,G. 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. *J Cell Biol.* **107**, 2051-2057 (1988).
94. Muto,T. *et al.* NMR identification of the Tom20 binding segment in mitochondrial presequences. *J. Mol Biol.* **306**, 137-143 (2001).

95. Nunnari,J., Fox,T.D. & Walter,P. A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science*. **262**, 1997-2004 (1993).
96. O'Fallon,J.V., Wright,R.W., Jr. & Calza,R.E. Glucose metabolic pathways in the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. *Biochem. J.* **274**, 595-599 (1991).
97. Osborne,A.R., Rapoport,T.A. & van den,B.B. Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21:529-50.**, 529-550 (2005).
98. Ostermann,J. *et al.* Precursor proteins in transit through mitochondrial contact sites interact with hsp70 in the matrix. *FEBS Lett.* **277**, 281-284 (1990).
99. Paschen,S.A. *et al.* Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature*. **426**, 862-866 (2003).
100. Paschen,S.A., Neupert,W. & Rapoport,D. Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 575-582 (2005).
101. Paul,R.G., Williams,A.G. & Butler,R.D. Hydrogenosomes in the rumen entodiniomorphid ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 1981-1989 (1990).
102. Pelzer,W. *et al.* Mitochondrial Isa2p plays a crucial role in the maturation of cellular iron-sulfur proteins. *FEBS Lett.* **476**, 134-139 (2000).
103. Perry,A.J. & Lithgow,T. Protein targeting: entropy, energetics and modular machines. *Curr. Biol.* **15**, R423-R425 (2005).
104. Pfanner,N. & Neupert,W. Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **262**, 7528-7536 (1987).
105. Pfanner,N., Hartl,F.U., Guiard,B. & Neupert,W. Mitochondrial precursor proteins are imported through a hydrophilic membrane environment. *Eur. J. Biochem.* **169**, 289-293 (1987).
106. Pfanner,N., Wiedemann,N., Meisinger,C. & Lithgow,T. Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nat. Struct. Mol Biol.* **11**, 1044-1048 (2004).

107. Preuss,M. *et al.* Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **153**, 1085-1096 (2001).
108. Puccio,H. & Koenig,M. Friedreich ataxia: a paradigm for mitochondrial diseases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 272-277 (2002).
109. Putz,S. *et al.* Fe-hydrogenase maturases in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot. Cell.* **5**, 579-586 (2006).
110. Rapaport,D. Biogenesis of the mitochondrial TOM complex. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 191-197 (2002).
111. Rees,D.C. & Howard,J.B. Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 559-566 (2000).
112. Rehling,P., Wiedemann,N., Pfanner,N. & Truscott,K.N. The mitochondrial import machinery for preproteins. *Crit Rev. Biochem. Mol Biol.* **36**, 291-336 (2001).
113. Rehling,P. *et al.* Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science.* **299**, 1747-1751 (2003).
114. Rehling,P., Brandner,K. & Pfanner,N. Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat. Rev. Mol Cell Biol.* **5**, 519-530 (2004).
115. Riordan,C.E., Ault,J.G., Langreth,S.G. & Keithly,J.S. *Cryptosporidium parvum* Cpn60 targets a relict organelle. *Curr. Genet.* **44**, 138-147 (2003).
116. Roy,A., Solodovnikova,N., Nicholson,T., Antholine,W. & Walden,W.E. A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. *EMBO J.* **22**, 4826-4835 (2003).
117. Samuelson,J.C. *et al.* YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature.* **406**, 637-641 (2000).
118. Sanchez-Pulido,L., Devos,D., Genevrois,S., Vicente,M. & Valencia,A. POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 523-526 (2003).

119. Schatz,G. & Mason,T.L. The biosynthesis of mitochondrial proteins. 43, 51-87. 1974.
Ref Type: Generic
120. Schatz,G. The protein import system of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **271**, 31763-31766 (1996).
121. Scherer,P.E., Krieg,U.C., Hwang,S.T., Vestweber,D. & Schatz,G. A precursor protein partly translocated into yeast mitochondria is bound to a 70 kd mitochondrial stress protein. *EMBO J.* **9**, 4315-4322 (1990).
122. Schilke,B., Voisine,C., Beinert,H. & Craig,E. Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10206-10211 (1999).
123. Schricker,R. *et al.* Redundant mitochondrial targeting signals in yeast adenylate kinase. *J. Biol. Chem.* **277**, 28757-28764 (2002).
124. Schwartz,C.J., Djaman,O., Imlay,J.A. & Kiley,P.J. The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9009-9014 (2000).
125. Sickmann,A. *et al.* The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13207-13212 (2003).
126. Sipos,K. *et al.* Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J. Biol. Chem.* **277**, 26944-26949 (2002).
127. Smagula,C. & Douglas,M.G. Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier protein in *Saccharomyces cerevisiae*. Sequences required for receptor binding and membrane translocation. *J. Biol. Chem.* **263**, 6783-6790 (1988).
128. Smagula,C.S. & Douglas,M.G. ADP-ATP carrier of *Saccharomyces cerevisiae* contains a mitochondrial import signal between amino acids 72 and 111. *J. Cell Biochem.* **36**, 323-327 (1988).
129. Smith,A.D. *et al.* Sulfur transfer from IscS to IscU: the first step in iron-sulfur cluster biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11103-11104 (2001).

130. Steiner,H., Zollner,A., Haid,A., Neupert,W. & Lill,R. Biogenesis of mitochondrial heme lyases in yeast. Import and folding in the intermembrane space. *J. Biol. Chem.* **270**, 22842-22849 (1995).
131. Stuart,R. Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: the role of the Oxa1 complex. *Biochim. Biophys. Acta.* **1592**, 79-87 (2002).
132. Stuart,R.A. & Neupert,W. Topogenesis of inner membrane proteins of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 261-267 (1996).
133. Stuart,R.A. & Neupert,W. Making membranes in bacteria. *Nature.* **406**, 575, 577 (2000).
134. Suchan,P. *et al.* Incorporation of iron into Tritrichomonas foetus cell compartments reveals ferredoxin as a major iron-binding protein in hydrogenosomes. *Microbiology.* **149**, 1911-1921 (2003).
135. Sutak,R. *et al.* Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote Trichomonas vaginalis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10368-10373 (2004).
136. Tachezy,J., Sanchez,L.B. & Muller,M. Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes Trichomonas vaginalis and Giardia intestinalis, as indicated by the phylogeny of IscS. *Mol Biol. Evol.* **18**, 1919-1928 (2001).
137. Tamm,L.K., Hong,H. & Liang,B. Folding and assembly of beta-barrel membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1666**, 250-263 (2004).
138. Taylor,S.W., Fahy,E. & Ghosh,S.S. Global organellar proteomics. *Trends Biotechnol.* **21**, 82-88 (2003).
139. Tong,W.H., Jameson,G.N., Huynh,B.H. & Rouault,T.A. Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9762-9767 (2003).

140. Tovar,J., Fischer,A. & Clark,C.G. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol.* **32**, 1013-1021 (1999).
141. Tovar,J. *et al.* Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature.* **426**, 172-176 (2003).
142. Truscott,K.N. *et al.* A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 1074-1082 (2001).
143. Truscott,K.N., Pfanner,N. & Voos,W. Transport of proteins into mitochondria. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* **143:81-136.**, 81-136 (2001).
144. Truscott,K.N. *et al.* Mitochondrial import of the ADP/ATP carrier: the essential TIM complex of the intermembrane space is required for precursor release from the TOM complex. *Mol Cell Biol.* **22**, 7780-7789 (2002).
145. Truscott,K.N. *et al.* A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J. Cell Biol.* **163**, 707-713 (2003).
146. Truscott,K.N., Brandner,K. & Pfanner,N. Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr. Biol.* **13**, R326-R337 (2003).
147. van Bruggen,J.J.A., Zwart,K.B., van Assema,R.M., Stumm,C.K. & Vogels,G.D. *Methanobacterium formicium*, an endosymbiont of the anaerobic ciliate *Metopus striatus* McMurrich. *J Mol Biol.* 130, 1-7. 1984.
Ref Type: Generic
148. van der,G.M., Kiel,J.A., Sjollem,K.A. & Prins,R.A. The hydrogenosomal malic enzyme from the anaerobic fungus *neocallimastix frontalis* is targeted to mitochondria of the methylotrophic yeast *hansenula polymorpha*. *Curr. Genet.* **33**, 131-135 (1998).
149. van der,G.M. *et al.* Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: a common origin for both organelles. *EMBO J.* **21**, 572-579 (2002).
150. van der,L.M. *et al.* Pam17 is required for architecture and translocation activity of the mitochondrial protein import motor. *Mol Cell Biol.* **25**, 7449-7458 (2005).

151. van Wilpe,S. *et al.* Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature*. **401**, 485-489 (1999).
152. Voulhoux,R., Bos,M.P., Geurtsen,J., Mols,M. & Tommassen,J. Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science*. **299**, 262-265 (2003).
153. Westermann,B. & Neupert,W. 'Omics' of the mitochondrion. *Nat. Biotechnol.* **21**, 239-240 (2003).
154. Wiedemann,N., Frazier,A.E. & Pfanner,N. The protein import machinery of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **279**, 14473-14476 (2004).
155. Williams,B.A., Hirt,R.P., Lucocq,J.M. & Embley,T.M. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature*. **418**, 865-869 (2002).
156. Williams,K., Lowe,P.N. & Leadlay,P.F. Purification and characterization of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from the anaerobic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Biochem. J.* **246**, 529-536 (1987).
157. Yarlett,N., Hann,A.C., Lloyd,D. & Williams,A. Hydrogenosomes in the rumen protozoon *Dasytricha ruminantium* Schuberg. *Biochem. J.* **200**, 365-372 (1981).
158. Yarlett,N., Yarlett,N.C. & Lloyd,D. Metronidazole-resistant clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* have lowered oxygen affinities. *Mol Biochem. Parasitol.* **19**, 111-116 (1986).
159. Yoon,T. & Cowan,J.A. Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6078-6084 (2003).
160. Young,J.C., Barral,J.M. & Ulrich,H.F. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 541-547 (2003).
161. Youngman,M.J., Hobbs,A.E., Burgess,S.M., Srinivasan,M. & Jensen,R.E. Mmm2p, a mitochondrial outer membrane protein required for yeast mitochondrial shape and maintenance of mtDNA nucleoids. *J. Cell Biol.* **164**, 677-688 (2004).

162. Yuvaniyama,P., Agar,J.N., Cash,V.L., Johnson,M.K. & Dean,D.R. NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 599-604 (2000).
163. Yuvaniyama,P., Agar,J.N., Cash,V.L., Johnson,M.K. & Dean,D.R. NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 599-604 (2000).
164. Zheng,L., Cash,V.L., Flint,D.H. & Dean,D.R. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **273**, 13264-13272 (1998).

12. Příloha

V příloze jsou uvedeny podrobné mapy konstruktů, které byly použity v této práci. Sekvence, které jsou komplementární s priméry pro amplifikaci + DNA řetězce jsou označeny červeně. Sekvence, které jsou komplementární s priméry pro amplifikaci - DNA řetězce jsou označeny zeleně. Šipky označují směr přepisu DNA. Předpokládané signální sekvence jsou označeny modře a podtržením. Na konci přílohy jsou uvedeny kódy k jednotlivým proteinům z tab.1, 2 a 3 a publikace, která obsahuje výsledky uvedené v diplomové práci.

GiiscU

(161 AK; 17,3 kDa; pI = 7,2)

GiiscU NdeI

ATGACAGCCCTTCAGCTCTCTAGCACTTCCCTTTTGGCAGTCTGTTGCACCCGCTTCCACAGAAGACCAGTTTCAGACGAGTTTATTCTGAGCTAAGCCA 100
M T S L Q L S S T S L L Q S V A R F L T K K T S S D E V Y S E L A
TGCAGCATTACCGCACCCCGTTTAACAATAGGAAACCCCTTGATGACGATGACGAACAATGTCCGCTCCGCGTCTAGTCCGCGCCCTGCTGTGTAATGTTAT 200
M Q H Y R T P V N I G T L D D D D E H V G S G L V G A P A C G D V M
GGCCCTCAGATCAAGGTCCGGGACGATGTAAGATTTCCGAAGCCAAAGTTCAAGCATTGGATGTGGCCAGCCTATCCGCGTTCGAGCTACGCCACC 300
R L Q I K V G D D G K I S E A K F K T F G C G A A I A S S S Y A T
TCTTCTCCAGGCAAGATTTGGAAAGAGGCGCTTCAGATCAAGAATAACGATTAAGTAAAGCTCGGTCCTCCCTCCTGTCAAGCTACACTGCAGCG 400
S L L Q G K S L E E A S Q I K N T D I S D K L G L P P V K L H C S
TTCTGGGGAGGACCCATCAGACAAAGCTATAGACGACTACAGAAGAAAGGGGGGAAGCAAGATCAGGTAATCAAAAGTCTTTT 483
V L A E D A I R Q A I D D Y K R K R G S K I Q V S K S S

GiiscU Acc65I

AnGiiscU

(144 AK; 15,4 kDa; pI = 6,6)

AnGiiscU NdeI

ATGCTGCATAAAGAAAGCCAGTTCCAGCGAGGTTTATTCTGAGCTAGCCATGCAGCATTTACCGCACCCCGTTTAACATAGGGAACCCCTTGATGACGATGACG 100
M L T K K T S S D E V Y S E L A M Q H Y R T P V N I G T L D D D D
AACATGTCCGCTCCGGTCTAGTCGGGCGCCCTGCTGTGATGTTATGCGCTTCAGATCAAGTCCGGGACGATGTAAGATTTCCGAAGCCCAAGTT 200
E H V G S G L V G A P A C G D V M R L Q I K V G D D G K I S E A K F
CAAGACATTTGGATGTGGCGGAGCTATCCGCTTCAGAGCTAAGCCACCTCTTCTCCAAAGCAAGATTTGGAAGAGGCGCTCAGATCAAGAATACC 300
K T F G C G A A I A S S S Y A T S L L Q G K S L E E A S Q I K N T
GATATAGTATAGCTCCGCTCTCCCTCCTGTCACAGCTACACTGCAGCGCTTCTGGGGAGGACGCCATCAGACAAGCTATAGACGACTACAGAGAAAGC 400
D I S D K L G L P P V K L H C S V L A E D A I R Q A I D D Y K R K
GGGGAAGCAAGATCAAGTATCAAAAGTCTTCT 432
R G S K I Q V S K S S

GiiscU Acc65I

Gifdx

(133 AK; 14,6 kDa; pI =9)

Gifdx NdeI

ATGTCCTACTATCGTCAATTAAGCGCCCTTCATTAACGTTCCGAGTGGTCCAAAGGGCGTGGAAACAACAAGTTTCAGGTGCTGTGGCCAGACTTACTAG 100
M S L L S S I R R F I T F R V V Q Q G V E H T V S G A V G Q S L L
ATGCCATCAAGGCTGGGCATATCCCATTCAGGACGGCGTGGGAAGGACACCTTSGCTGTGGTACCTGCGGTGTTTATTTGGACAAAAAGACGTACCAAGCG 200
D A I K A A H I P I Q D A C E G H L X C G T C G V Y L D K K T Y K R
TATTCGGCGAGCAAAAGGAAGGGTTCCTCCTAGATCAGGTACCACCCCAAGCCACATCGCGGCTTTCGTGTCAGTAAAACTCAGTTAGCATG 300
I P R A T K E E A V L L D Q V P N P K P T S R L S C A V K L S S M
CTGGAGGAGCGACAGTACCGATACCCCTCCTTTAAGAAGCGTCTTAGGAAAGTGAATTCTTGCAAAGCGAAGAAAGAAAGGCAAGGGTAAAGTAC 399
L E G A T V R I P S F N K N V L S E S D I L A S E E K K R H G Q H
Gifdx Bsp140 IIIR

ΔnGifdx

(115 AK; 12,5 kDa; pI =8,2)

ΔnGifdx NdeI

ATGGTGGAAACAACAAGTTTCAGGTGCTGTGGCCAGACTTACTTAGATGCCATCAAGGCTGGCCATATCCCATTCAGGACGGCGTGGAAAGACACTTS 100
M V E H T V S G A V G Q S L L D A I K A A H I P I Q D A C E G H L
GCTGTGGTACCTCGCGGTGTTTATTTGGACAAAAAGCGTACCAAGCGTATTCGCGAGCGACAAAGGAAGCGGTTCTCCTAGATCAGTTACCCCAACCC 200
X C G T C G V Y L D K K T Y K R I P R A T K E E A V L L D Q V P N P
CAAGCCACATCGCGGCTTTCGTGTCAGTAAAACTCAGTAGCATGCTGGAAGGAGCGGACAGTACGATACCCCTTTAACAAGAACGTCCTTAGCGAA 300
K P T S R L S C A V K L S S M L E G A T V R I P S F N K N V L S E
AGTGACATTCTTGCAAAGCGAAGAAAGAAAGGCAAGGGTAAAGTAC 345
S D I L A S E E K K R H G Q H
Gifdx Bsp140 IIIR

Tviscs

(411 AK; 44.8 kDa; pl = 8,2)

Tviscs Ndc1

ATGTTAGGATCGAGTCTCCAGATCTTAACTTCCAAAGGGCCATTACCTCGATACACAAGTGTCTTAGACCCCAAGATTTTCGATACTATGATTCCTT 100
M L G S V S R S Y F K G H Y L D T Q A T S V L D P R V F D T M I P
ACGAACATAGGTTCAOGGAATGCACATTCCAAGAACACGCGCTTCGGCCAAAGGCCATGGCAGCTGTTGAGAAAGCCAGAAGTCCGTTGCAGATCT 200
Y E T Y V H G N A H S K Q H G F G Q E A M A A V E K A R K S V A D L
TATCAACGCAAAAGCCAAACGAAATCATCTTTACATCCGGTGCCTACAGAGTGAATAACATTTGCATCAAAAGCGCCATGGGATATTTGAAGAACAGTGGC 300
I N A K P N E I I F T S G A T E C N N I A I K G A M G Y L K N S G
AAGAAGCATGTCTTGTCTCTAATTGAACATAAATGTGCATTGAGTCAGCTGCGCCCTCCAAAAGGAAGATTTGAYGCAACTTTCCTCCAGGTTG 400
K K H V I V S S I E H K C V I E S A R A L Q K E G F X A T F L Q V
GCAAGATGGCCCGGTAGATCCAAAGGAAGTCCGAAAAGAACATCCGCCGATACAGGCCCTCGTTTCTTGCAATGCTTGTCAACAAGAAATTTGGTTCCAT 500
G K D G R V D P K E V A K N I R P D T G L V S C M L V N N E I G S I
CAACCCAGTTCAAGAAATTTCCAAAGATCTGCAAGTCTAAGGGTGTCTGTCCACACAGATGCCGCCAAGGCTTCGGCAAGATCCCAATCGATGTCAAG 600
N P V Q E I S K I C K S K G V W F H T D A A Q G F G K I P I D V K
AAGATCGGAGCCAAATTTCAATGTCATTTCCGGGCCCAAGATCCCATGGTCCAAAGGGCATTGGTGCCTTATATGTCTCCAGCCGCCACGTTACAGGTGTTG 700
K I G A N F M S I S G H K I H G P K G I G A L Y V S S R P R S R V
AGCCAAATCATCAACGGCGGTGCCAGAAAGAACATCAGATCAGGCACACTTGTCTTATTGCTTAGGCAAGGACAGAGATTGCCAA 800
E P I I N G G G Q E R N I R S G T L A V P L I V G L G K A A E I A K
CGGTAGATGAAGTACGATTCATATCCATTCGAAATCCCTGGCAAGCATTGATGGAAGAATTACAAAGCCGATTCATACGCAACAGTCAACGGTCT 900
R E M K Y D S P Y I E S L G K H L I E E V T K R I P Y A T V N G S
CTTGAACACCGCTGTCCGATGCGTCAACATTTGCATTCGAAGCAGTCGAAGGTGAGTCACTTAATGGCCCAATTTCCAAACTTCCGTTTTCATCAGGTT 1000
L E H R W F G C V N I S F E A V E G E S L M A T I P N F G V S S G
CTGCTTGGACAATCTGTCTTCTGGAACCATCATATGTTCTCAAGGGCATGGTGTGGTATGAACTCGCACATACTTCCCTTGGTATCGTACTCTRA 1100
S A C T S A S L E P S Y V L K G I G V G D E L A H T S L R I G I S K
GTTTACAACAAGAAAGTGTGATCAGTGTGTTGTAACCTTGAACAGCCTGTGAACAGCCTTGTGACCTTCTCCACTTGGAAATGAAGATGAGC 1200
F T T R E E V D Q F V E L L E H A V K H L R D L S P L W E M K M S

GGAATGATCTTTCTGAGTTCCGAATGGATCCAG 1233
G I D L S Q V E W I Q

Tviscs Acc651

ΔnTviscs

(403 AK; 43,4 kDa; pI = 8)

ΔnTviscs NdeI

ATGTACTTCAAGGGCCATTACCTCGATATACACAGCTACTCAAGTGTCTTAGACCCCAAGATTTTCGATATGATTCCTTAGCGMAACATACGGTTCACGGAA 100
M Y F K G H Y L D T Q A T S V L D P R V F D T M I P Y E T Y V H G
ATGCACATTCCAAGCAACACGGGTTGGCCCAAGAGGCCATGGCAGCTGTTGGAAGGCCAGAAGTCCGTTGCAGATCTTATCAACGCAAAAGCCAAACGA 200
N A H S K Q H G F G Q E A M A A V E K A R K S V A D L I N A K P N E
AATCATCTTTACATCCGGTGTACACAGGTGTAATAACATTTGGCAATCAAAAGGCCCATGGATATTTGGAAGAACAAGCATGTCATTTGTTCTCA 300
I I F T S G A T E C N N I A I K G A M G Y L K N S G K K H V I V S
TCTATTGACATAAATGTGTCAATTGATTCAGCTCGGCCCTCCAAAAGAAAGATTTGAYGCACTTTCCTCAGGTTGGCAAGATGGCCGCGTAGATC 400
S I E H K C V I E S A R A L Q K E G F X A T F L Q V G K D G R V D
CAAGGAAGTCCGAAAGACATCCGCCAGATACAGGCGCTTCTTGCATGCTTGTCAAACAAGAAATTTGGTTCATCAACCCAGTTCAGAAATTTTC 500
P K E V A K N I R P D T G L V S C M L V N N E I G S I N P V Q E I S
CAAGATCGCAAGTCTAAGGTTGTCTGGTTCACACAGATGCCCAAGGCTTCGCAAGATCCCAATCGATGTGCAAGAAGATGGAGCCAAATTTTCATG 600
K I C K S K G V W F H T D A A Q G F G K I P I D V K K I G A N F M
TCAATTTCCGGCCAAAGATCCATGGTCCAAAAGGGCAITGGTGCCTTATATGTCTCCAGCCGCCACGTTGACGTTGAGCCCAATCATCAACGGCGGTG 700
S I S G H K I H G P K G I G A L Y V S S R P R S R V E P I I N G G
GCCAGAAAGAAACATCAGATCAGGACACACTTGCTGTTCTTATTGTTGGCTTAGCAAGGACAGAGATTTGCCAAAGGCTGAGATGAAGTACGATTC 800
G Q E R N I R S G T L A V P L I V G L G K A A E I A K R E M K Y D S
TCCATACATTCGAATCCCTCGGCAAGCAITTTGATCGAAGAAGTTACAAAAGCGCATTCCCATACGCAACAGTCAACCGGTTCTTGAACACCCGCTGGTTCCGA 900
P Y I E S L G K H L I E E V T K R I P Y A T V N G S L E H R W F G
TGGCTCAACATTTCAATTCGAGCAGTCCGAAGGTGAGTCACTTATGGCCACAATTCAAACTTCGGTTCATCAGGTTCTGCTTGACACACTGCTTCTC 1000
C V N I S F E A V E G E S L M A T I P N F G V S S G S A C T S A S
TCGAACCATCATATGTTCTCAAGGGCATTGGTGTGATGACACTCCGCAATACTTCCCTTGGATTCGGTATCTTAAGTTTACACAAGAAGAAGT 1100
L E P S Y V L K G I G V G D E L A H T S L R I G I S K F T T R E E V
TGATCAGTTTGTGAACCTCCTTGAACACGCTGTCAACACCTTCCGATCCCTTCCACTTTGGGAATGAAGATGGAGATTTGATCTTCTCAGGTC 1200
D Q F V E L L E H A V K H L R D L S P L W E M K M S G I D L S Q V

GAATGGATCCAG 1212

E W I Q

Tviscs Acc651

Gia-tubulin (454 AK; 50.6 kDa; pI = 4,9)

Giatubulin NdeI

ATGGCTGATGTCATCTGGTTCACATGGCCAGGCCGGAGTCCAGATCCGCAACCGCTGCTGGAACTTACTGCTCGAGCAGCGGATCCAGCAGCG 100
M R E C I S V H I G Q A G V Q I G N A C W E L Y C L E H G I Q H D
GCCAGATGCCGTCGACAAAGCATCGGGGGGGCGAGCAGCGCTTCAACAGCTTCTTCGAGAGAGCGGGCCGGCAAGCAGCTCCCGCGGATCTT 200
G Q M P S D K T I G G G D D A F N T F F S E T G A G K H V P R A V F
CGTTGACCTCGAGCCCGAGTGTCCAGGAGTCCGGGGGCTCGTACCGCCAGCTTACCAACCCCGAGCACTGATCTCCGGCAAGGAGCGCCGCC 300
V D L E P T V V D E V R A G S Y R Q L Y H P E Q L I S G K E D A A
AACAACTACGCCCGGGCAGCTACAGCATCGGCAAGAGATCGTCCAGCTGCTCGAGCCGCGCAAGCTCGCAGAGCAACTGCTCCGGCTCCAGG 400
N N Y A R G H Y T I G K E I V D L V L D R V R K L A D N C S G L Q
GCTTCCGATCTTCCACTCTCCGAGGAGGACGGGGCCGGCTTCGGGTCCTTCTTCGAGGCCCTGAGCGCTGACTAAGCGCCGCAAGTCCAAGCT 500
G F L I F H S F G G T G A G F G S L F L E R L S V D Y G R K S K L
CGAGTTCGTCGTACCCCTCCGCCAGATCGGCGCCGCTCGTGGAGCCGTACAACAGCATCTCGCCGCGCACTCGATGCTTGAAGCACTCCGACTGC 600
E F V V Y P S P Q I A T A V V E P Y N T I L A A H S M L E H S D C
GCCTTCATGTTGACAACGAGGCCATGTACGACATCTGCCCGCCGCAACTGACATCGAGGCCCGCACTACCGAACTCAACCCGCTGATTTGCCAGT 700
A F M V D N E A M Y D I C R R N L D I E R P T Y T N L N R L I A Q
GCATTCCTCGATCCACAGCCCTCGCTCCGCTTCGACGGCGCCCTCAACGTCGACCTGACGGAATTCCAGAGCAACCTCGTCCCGTAACCCCGCATCCACTT 800
C I S S I T A S L R F D G A L N V D L T E F Q T N L V P Y P R I H F
CCCGCTTGTCTGTACGGCCCATCATCTCTCCGAGAAAGGGTACCAGGAAGCTCTCCGCGGAGGCTCACCAACTCCGTTTCGAGCCGGGGAAC 900
P L C S Y A P I I S S E K A Y H E K L S V A E L T N S V F E P A N
ATGATGTCAGTCCGACCCCGCCACAGGCAAGTACATGGCGGTCTGCATGATGTAACCGCGGACGTCGTCCCGAAGGACGTCAACCGCGCATCGCGG 1000
M M V K C D P R H G K Y M A C C M M Y R G D V V P K D V N A A I A
TCATCAAGACGAAGCGCAGATCCAGTTCGTCGACTGTGCCCGACAGGCTTCAAGTGGCATCAACTACCAAGCCCGCCGACCGTCACTCCCGGGCGGA 1100
V I K T K R T I Q F V D W C P T G F K V G I N Y Q P P T V I P G G D
CCTTGGCAAGTCCAGCGCTCTGCTCATGATCTCAACAACAGCGGCCATCCGAGTTTGTTCGCCGATGACCAACAAGTTCCGACCTGATGTACGCC 1200
L A K V Q R S C L M I S N T T A I A E V W S R M D H K F D L M Y A
AAGCGCGCTTGCCTGCACTGTAACGTGGTGAAGGCAATGGAGGAGGGCGAGTTTCCGAGGGCCCGGAGGACCTCGCCGCTCCGAGAAGACTACGAGG 1300
K R A F V H W Y V G E G M E E G E F S E A R E D L A A L E K D Y E
AGATCGGGCGCCGACCTTGGCGAGCGCGGAGGCGGAGACATGGAGAGAGCAGCGCTTAC 1362
E I G A E T L G D G E G E D M E E D D A Y

Giatubulin Acc65I

Giiscs

(433 AK; 47,7 kDa; pI = 6,4)

Giiscs NdeI

ATGATTTACCTGGACAAACCGCCCTACGGCTATCGACCCCGCGTGTAGCTAAGATGGTCCCGTACATGACCAACAATTGCTAATGTTCACTCTA
M I Y L D N Q A T T A I D P R V L A K M V P Y M T T N F A N V H S
CGCACCGTCTGGGGCCTCTCTCCGAAGGTTGTGAAAGGCCCGGAGCAGCGAGTTGCCGGGATAGGTGCCGCCGGGAGATCATATTCCTAG 200
T H R L G R S L R K V V E K A R E Q V A G A I G A A P G E I I F T S
CGGTGCACAGAGTCTAATAATATTGCGCTCAAGGGGTTTGTCACTTCTACGGTGTACCAAGCCGCACTTAAGCAATTTCCCGATCGACCAAGTGT 300
G A T E S N N I A L K G V C H F Y G D D K P H L A I S R I E H K C
GTCCCTTGAGTCCCGGGAAGCTGGAGTCAAGGGATTTAAGCTTCACTGGATGATGTAGACGACGAGGACTTGTCAAGTTGGACCAGCTCCAGACC 400
V L E S A R K L E S E G F K L H W I D V D D E G L V K L D Q L Q D
TCCTGAAGACCTACTACGACCCCGGAGGAGGAGTGAAGGTGGCCATTTGTGACATGCTGGCGAACAATGAGATTGGACCATTCCAGGATTTGGG 500
L L K T Y Y D P E E E S K V A I V S I M A A N N E I G T I Q D D L G
GGCCATTTGTAAGTCTCGACCAATACGACACCCTGTTTCAACCGGATGCAGCGCAGGCCCTCGCAAGATACCTCTGGATGTGTCAAGACAAGATT 600
A I G K V C E Q Y E T L F H T D A A Q A L G K I P L D V V R D K I
GATCTGATGAGTCTCTCGGGCACAAAGATTTATGGGCCCAAGGGCGTGGCTTGTACATAAAGAGAACCATGAAAAGAGAGTCCACCCTGGACC 700
D L M S L S G H K I Y G P K G V G A L Y I K R T D E K R V H L D P
TGTTAGCGGGGGCGCCAAAGGTGGATCCGTAACCGAATCTCCAGTTTTCCGTGGTGTATGGTGAGCGCGCAGAGCTTGGACAGAAGGA 800
V F S G G G Q E G G I R S G T L P V F L V V G M G E A A E L A Q K E
GATGAAGAAGGACGCCCTCCACTACAAGAGCCTCTTTGAGATTGCGAGGAGAAAGCTCTCCCTTCTCTGTGAGGCTTAATGGCCGTTTCCAGAG 900
M K K D A L H Y K S L F E I A R E K L L S L P S V R L N G P F P E
GAAGGATTTAGCAGACAAAGACAAGGAGGGCTCAAAAGTCTCAGAAGAAGGAGCCCTTCAGTAAGAAAGCGCATTTTAACAACATGAAATCAGCCTTTT 1000
D A I L A D K T K G A Q K S Q K K E P F S K K R I L N N M N I S F
TCGGGGTAGAAGGGGAGTCTGTGATGCTTGGATTGGATGATGCCATTTGGATGTCAGCGGGAAGCGCCCTGCACGCTCTCACTCCCGCAGCCCATGT 1100
F G V E G E S L M L G L D D A I C M S S G S A C T S Q S L E P S H V
TCTGTTGCGCTAGGGCTGACCCAGAGTTTGTTCATACGGCTGTGGCACTGGGACATCACGATTTACTACGGAGGAGAGTTCCCGCGGCGATGCGAT 1200
L F A L G L D P E F A H T A V R L G T S R F T T E A E F R R A C D
CTCAATAGCGAAGMRGGTCCCATCTCAGGGATCTTTCCGCTCTCTGGAGATGACTCAAGAAAGGAGATACAAAGACATAGAGTGGAAAGCATGAC 1299
L I A K X V A H L R D L S P L W E M T Q K G I D T K S I E W K H D

Giiscs Acc651

Agiscs

(401 AK; 44 kDa; pI = 6,7)

Giiscs NdeI

ATGATTTACTTGGACACCAGGCCACTACGGCTATCGACCCCCCGGTGTTAGCTAAAGATGGTCCCGTACATGACCAAACTTTGGCTAATGTTCACTCTA 100
M I Y L D N Q A T T A I D P R V L A K M V P Y M T T N F A N V H S
CGCACCGTCTGGGGCGCTCTCCGAAAGGTTGTTGGAAGGCCAGGGAGCGAGTTGCCGGGCCGATPAGTGCCCGCCGGGGGAGATCATATTTCACCTAG 200
T H R L G R S L R K V V E K A R E Q V A G A I G A A P G E I I F T S
CGGTGCAACAGAGTCTAATAATATTGGCGCTCAAGGGGTTGTCACTTCTACCGTGTATGACAAAGCCGATCTAGCAATTTCCCGGATCGACACAAAGTGT 300
G A T E S N N I A L K G V C H F Y G D D K P H L A I S R I E H K C
GTCCTTGAGTCCGGCGGAAGCTGGAGTCAAGGGATTTAAGCTTCACTGATAGATGTAGACGACGAGGACTTGTCAAAGTTTGGACCAAGCTCCAGGACC 400
V L E S A R K L E S E G F K L H W I D V D D E G L V K L D Q L Q D

Giiscs F1

TCCTGAAGTGGAAAGTGGTTGGATTTGGAGTATCATGGCTGCGAACAATGAGATTGGACCATCCAGGATTTGGGGCCATTGGTAAAGGTCTGGCGACATA 500
L L K S K V A I V S I M A A N N E I G T I Q D L G A I G K V C E Q Y

Giiscs R1

CGAGCCGCTGTTTCACACCGATGACGCGAGGCCCTCGCAAGATACCTTGGATGTGTCAGAGACAAGATTGATCTGATGAGTCTCTCGGGCACAAAG 600
E T L F H T D A A Q A L G K I P L D V V R D K I D L M S L S G H K
ATTTATGGGCCCAAGGCGTGGTGCCTTGTACATAAAGAACCCGATGAAAGAAGTCCACCTTGACCCCGTTCAGCGGGGGCCCAAGAAGTGT 700
I Y G P K G V G A L Y I K R T D E K R V H L D P V F S G G Q E G

GGATCCCGTAGCGGAACCTCCAGTTTTCCTGCTGTTGATGGGTGAGGGCGCAGAGCTTGACACAGAAGGATGAAGAAGAGCCCTCCACTACAA 800
G I R S G T L P V F L V V G M G E A A E L A Q K E M K K D A L H Y K

Giiscs F2

GAGCCTCTTTGAGATTGCCAGGAGAAAGCTGCTCCCTCCCTTCTGTGTGAGGCTTAAATGGCCGTTTCCAAAGGGGATTTTAAACAATTAACATCAGC 900
S L F E I A R E K L L S L P S V R L N G P F P K R I L N N M N I S

Giiscs R2

TTTTTGGGGTAGAAGGGGAGTCTTGATGCTTGGATTGATGATGCCATTTGCATGTCCAGCGGGAAGCCGCTGCAAGTCCAGTCCAGTCCAGCCAGCC 1000
F F G V E G E S L M L G L D D A I C M S S G S A C T S Q S L E P S
ATGTTCTGTTTGGGCTAGGGCTGAGCCAGAGTTTGGCTCATACGGCTGTGGACTGGGGAGATCAGCATTTACTACGGAAGGACAGAGTTCCGCCGGGCATG 1100
H V L F A L G L D P E F A H T A V R L G T S R F T T E A E F R R A C

CGATCTCATAGCGGAAGMRGGTCCCGCATCTTCAGGGATCTTTCGCTCTCTGGGAGATGACTCAGAAAGGGGATCGATPACAAAGAGCATPAGAGTGGAAAGCAT 1200
D L I A K X V A H L R D L S P L W E M T Q K G I D T K S I E W K H

GAT 1203

D

Giiscs Acc65I

ANGiiscs

(424 AK; 46.5 kDa; pI = 7)

Giiscs Ndel

ATGATTTAAGCTGGACCAACCGAGGCCACTAAGGCTATGCAACCCCGCGTGTAGCTAAGATGGTCCCGTACATGACCAAACTTTGCTAATGTTCACACTCTA
M I Y L D N Q A T T A I D P R V L A K M V P Y M T T N F A N V H S
CGCACCGTGTGGGGCGCTCTCCGAAAGGTTGGTGAAGAGCCAGGAGCAGGTTGCCGGGGCGGATAGTGCCCGCCCGGGAGATCATATTACACTAG
T H R L G R S L R K V V E K A R E Q V A G A I G A A P G E I I F T S
CGGTGCAACAGAGTCTAATAATATTGGCGCTCAAGGGGTTTGTCACTTCTTACGGTGAITGACAAAGCCGCATCTAGCAATTTCCCGGATCGAGCACAAGTGT
G A T E S N N I A L K G V C H F Y G D D K P H L A I S R I E H K C
GTCCTTGAGTCCCGGGAAGCTGGAGTCAAGAGGATTTAAGCTTCACTGATAGATGATAGACGACGAGGGACTTGTCAAGTTGGACCAGCTC
V L E S A R K L E S E G F K L H W I D V D D E G L V K L D Q L Q D
400

Giiscs F1

ATTTATGGCCCAAGGCGTGGTGCCTTGTACATAAAGAGAACCAGTGAATAAGAGAGTCCACCTGGACCCCGTGTTCAGCGGGGGCCCAAGAAAGTGTG
L L K S K V A I V S I M A A N N E I G T I Q D L G A I G K V C E Q Y
500
CGAGACCGCTGTTTCAACCCGATCGCCGAGCCGCCCTCGSCAAGATACCTCTTGATGTGGTCAAGAGACAAGATTGATGATGATCTCTCGGGGCACAAG
E T L F H T D A A Q A L G K I P L D V V R D K I D L M S L S G H K
ATTTATGGCCCAAGGCGTGGTGCCTTGTACATAAAGAGAACCAGTGAATAAGAGAGTCCACCTGGACCCCGTGTTCAGCGGGGGCCCAAGAAAGTGTG
I Y G P K G V G A L Y I K R T D E K R V H L D P V F S G G Q E G
700

Giiscs R1

GGATCCGTAAGCGACTCTCCCAAGTTCCTGCTGTTGGTATGGTGAAGGGCCAGAGCTTGGCACAAGAGATGAAGAGGACGCCCTCCACTACAA
G I R S G T L P V F L V V G M G E A A E L A Q K E M K K D A L H Y K
800
GAGCCTCTTTGAGATTGCCAGGAGAAAGCTGCTCCCTTCCCTTCTGTGAGGCTTAATGGCCGTTTCCAGAGAGCGGATTTAGCAGACAAAGACAAA
S L F E I A R E K L L S L P S V R L N G P F P E D A I L A D K T K
900

C-1S

GGCGCTCAAAAGTCTCAGAAGAAAGGAGCCCTTCAAGTAAAGAGGCGATTTTAACAACATGAACATCAGCTTTTTCGGGGTAGAAGGGGAGTCTCTGATGC
G A Q K S Q K K E P F S K K R I L N N M N I S F F G V E G E S L M
1000
TTGGATTGGATGATGCCATTTGGATGTCACGGGAAGGCGCTGCACCGTCTCAGTCCCTCGAGCCCAAGCCATTTCTTTTGGCTAGGGCTGGACCCAGA
L G L D D A I C M S S G S A C T S Q S L E P S H V L F A L G L D P E
1100
GTTTGCATACGGGCTGTCCGACTGGGGACATCAGATTTACTACGGAGGACAGATTCAGCCGGGACATCGATCTCATAGCGAAMRGGTCCGCCATCTC
F A H T A V R L G T S R F T T E A E F R R A C D L I A K X V A H L
1200

AGGATCTTTGGCCTCTGTGGAGATGACTCAGAAGGGGATCGATACAAAGACATDAAAGTGAAGGATGAC 1272

R D L S P L W E M T Q K G I D T K S I E W K H D

Giiscs Acc651

ANGiiscs 1/2

(193 AK; 21,2 kDa; pI = 6,2)

Giiscs NdeI

ATGATTTACTTGGAGACCAAGCCACTACGGCTATCGACCCCGCGTGTAGCTAAGATGGTCCCGTACATGACCAAACTTTGGCTAATGTTCACTCTA 100
M I Y L D N Q A T T A I D P R V L A K M V P Y M T T N F A N V H S
CGCACCGTCTGGGGCGCTCTCCGAAAGGTTGTTGAGAAGGCCAGGAGCAAGTTGCCGGGCGATAGGTGCCCGCCCGGGGAGATCATATTCACCTAG 200
T H R L G R S L R K V V E K A R E Q V A G A I G A A P G E I I F T S
CGTGCACAGAGTCTAATAATATTTGCCCTCAAGGGGGTTTGTCACTTCTACGGTATGACAAAGCCGATCTAGCAAATTTCCCGGATCGAGCAAAAGTGT 300
G A T E S N N I A L K G V C H F Y G D D K P H L A I S R I E H K C
GTCCTTAGTCCCGCGGAAGCTGGAGTCAGAGGATTTAAGCTTCACTGATAGATGTAGACGACGAGGACTTGTCAAGTTGGACCAAGCTCCAGGACC 400
V L E S A R K L E S E G F K L H W I D V D D E G L V K L D Q L Q D

Giiscs Fl

TTCGTAAAGTGGAAAGTGGCCVTTTGTGAGGATCATGGCTGCCGAACAATGAGATTGGACCAATCCAGGATTTGGGGGCCATTTGGTAAAGGTCTCGGAGCAATA 500

Liiscs R1

CGAGACGCTGTTTCACACCGATGAGCGCGAGGCCCTCGGCAAGATACTCTTGATGTGGTCCAGACAAAGATTGATCTG 579
E T L F H T D A A Q A L G K I P L D V V R D K I D L

ANGiiscs 1/2 Acc65I

ΔCGIscs

(410 kDa; 45.2 kDa; pI = 6.2)

Giiscs NdeI

ATGATTTACTCTGGACAAACCAGGCCACTACGGCTATGCAACCCCGCGTGTAGTAAAGATGTCGCCGTACATGACCACAACCTTGTCTAATGTTCACTCTA 100
M I Y L D N Q A T T A I D P R V L A K M V P Y M T T N F A N V H S
CGCACCGCTTGGGGCCGCTCTCCGAAAGTTGTGAGAAAGCCACGAGGAGGAGTTGCCGGCCGATAGGTCGCCCGGGGAGATCATATTCCACTAG 200
T H R L G R S L R K V V E K A R E Q V A G A I G A A P G E I I F T S
CGGTGCACAGAGTCTAATAATATTGGCTGCAAGGGGTTTGTCACTTCTAOCGTTGATGCAAGCCGCATCTAGGATTTCCCGGATCCGACACAAGTGT 300
G A T E S N N I A L K G V C H F Y G D D K P H L A I S R I E H K C
GTCTTGGATCCGGCCGAAAGCTGAGTCAAGGAGGATTTAAGCTTCACTGGATAGTGAACGACGAGGACTTGTCAAGTTGGACCAGCTCCAGGACC 400
V L E S A R K L E S E G F K L H W I D V D D E G L V K L D Q L Q D
TCTTGAAGACCTACTACGACCCCGAGGAGGAGTCCGAAGGTGGCCATTGTGAGCATCATGGCTGGCGAACAATGAGATTGGACCATCCAGGATTTGGG 500
L L K T Y Y D P E E E E S K V A I V S I M A A N N E I G T I Q D L G

N-IS

GGCCATTGGTAAAGTCTGCCAACAATACGAGACCGCTGTTTGCACCCGATGACGCGAGGCCCTCCGCAAGATACCCTTGATGTGTCAGAGACAAGATT 600
A I G K V C E Q Y E T L F H T D A A Q A L G K I P L D V V R D K I
GATCTGATGATCTCTGGGGGACAAAGATTTATGGGCCCAAAAGCGGTGGTCCCTTGTACATTAAGAAACCGATGAAAAAGAGATCCACCTTGACCCCG 700
D L M S L S G H K I Y G P K G V G A L Y I K R T D E K R V H L D P
TGTTCAGCGGGGGCCCAAGAGTGGATCCGTAGCCGGAACCTCCCAAGTTTTCCCTGTTGATGGTGAAGCGGACAGAGCTTGCACACAAGGA 800
V F S G G G Q E G G I R S G T L P V F L V V G M G E A A E L A Q K E

Giiscs F2

GATGAAGAAGGACGCCCTCCACTACAGAGCCCTTTGAGATTTGCCAGGAGAAAGCTCTCCCTTCTGTGAGGCTTAATGGCCCGTTCCAAA 900
M K K D A L H Y K S L F E I A R E K L L S L P S V R L

Giiscs R2

TCGATTTTAAVAAATGAAATGAAATCAGCTTTTTCGGGGTAGAAGGGAGTCTGTGATGTGGATTGGATGATGCCATTTGCATGTCACAGGGGAGCGCCT 1000
R I L N N M N I S F F G V E G E S L M L G L D D A I C M S S G S A
GCACGTCACAGTCCCTCGAGCCACGCCATGTTCTGTGGCCGCTAGGGCTGGAACCCAGAGTTTGCCTCATAGGGCTGTCCGACTGGGGACATCAGCATTTAC 1100
C T S Q S L E P S H V L F A L G L D P E F A H T A V R L G T S R F T
TAGCGAGGCAGAGTCCCGCGGATGCGATCTCATAGCGAAGMRGTCCGCATCTCAGGGATTTTCGCTCTGTGGAGATGACTCAGAAGGGGATC 1200
T E A E F R R A C D L I A K X V A H L R D L S P L W E M T Q K G I

GATCAAAAGAGCATAGAGTGGAAAGCATGAC 1230

D T K S I E W K H D

Giiscs Acc65I

ACGiiscS 1/2

(208 AK; 22,9 kDa; pI = 7,4)

ACGiiscS 1/2

ATTAAATCTCTCTGGGGGCAAGAGATTTATAGGGCCCAAGAGCGGTGGGTGCTTGTACATPAAGAGAACCAGATGAATAAGAGAGTCCACCCTGGACCCCGTGTTCATCA
M S L S G H K I Y G P K G V G A L Y I K R T D E K R V H L D P V F

GCGGGGGCCCAAGAAAGTGGATCCGTAGCCGAACTCTCCAGTTTTCCTGTGGTGTATGGGTGAGCGGCGAGAGCTTGCACAGAAGAGATGAA 200
S G G G Q E G G I R S G T L P V F L V V G M G E A A E L A Q K E M K

GAAAGACCCCTCCACTACAAGAGCCCTCTTTGAGATTGCCAAGAGAGCTGCTCCCTTCTGTGAGGCTTAATATGAGGGCGGTTTCCAAAGTGCATT 300
K D A L H Y K K S L F E I A R E K L L S L P S V R L N G P F P K R I

GiiscS R2

CTTAAACAATTAACAATGACCTTTTTCGGGGGTAGAGAAGGGAGTCTTGATGCTTGGATTGGATGATGCCAATTTGCATGTCCAGCGGAAGCGCCCTGCACCGT 400
L N N M N I S F F G V E G E S L M L G L D D A I C M S S G S A C T

CTCAGTCCCTCGAGCCCGACCATGTGTTGTTGGCTAGAGGCTGGACCAGAGATTGCTCATACGGGCTGTGGACTGGGGACATCAAGATTTACTAACGGA 500
S Q S L E P S H V L F A L G L D P E F A H T A V R L G T S R F T T E

GGCAGAGTTCCCGCGGCGATGCGATTCATAGCGAAGMRGGTCCGCCCATCTTAGGGGATCTTTCCCTCTGTGGAGATGACTCAGAAGGGGATCGATACA 600
A E F R R A C D L I A K X V A H L R D L S P L W E M T Q K G I D T

AAGAGCATAGAGTGGAAAGCATGAC 624

K S I E W K H D

GiiscS Acc65

Přístupové kódy k jednotlivým proteinům.					
Tv	PFO 1	AAA85494	Tv	Hmp31	AF216971
Tv	PFO 2	AAA85494	Nf	Jablečný enzym	AAC49572
Tv	β-sukcinyl-Coa syntetáza	Q03184	Nf	β-sukcinyl-Coa syntetáza	X84222
Tv	α- sukcinyl-Coa syntetáza 1	P53399	Pl	Ferredoxin	P34806
Tv	α- sukcinyl-Coa syntetáza 2	P53400	Gi	Hsp70	BAB69031
Tv	α- sukcinyl-Coa syntetáza 3	P53401	Gi	Glutaredoxin	Databáze GiardiaDB orf: 2013
Tv	Adenylát kináza	P49983	Gi	Ferredoxin	AAL95709
Tv	Jablečný enzym A	AAA92714	Gi	IscU	AAM14634
Tv	Jablečný enzym B	AAA92715	Gi	IscS	AAK39427
Tv	Jablečný enzym C	AAA92716	Gi	IscA	Databáze GiardiaDB orf: 14821
Tv	Jablečný enzym D	AAA92717	Gi	β-MPP	EAA39560
Tv	Hsp60	Q95058	Gi	IscS	AF311744
Tv	Ferredoxin 2	P21149	Cp	Hsp70	AY235430
Tv	Ferredoxin 1	AY466518	Cp	IscS	AY029212
Tv	IscS-2	AF321006	Cp	IscU	AY078500
Tv	IscU	Databáze TIGR 95287.m00238	Cp	Ferredoxin	AY113180
Tv	NuoE	Databáze TIGR 90175	Eh	Hsp60	AAC38819
Tv	NuoF	Databáze TIGR 84692			

Vysvětlivky: Tv, *Trichomonas vaginalis*; Nf, *Nyctotherus frontalis*; Pl, *Psalterinomonas lanterna*; Gi, *Giardia intestinalis*; Cp, *Cryptosporidium parvum*; Eh, *Entamoeba histolytica*.

Giardia mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting

Pavel Dolezal*, Ondrej Smid*, Petr Rada*, Zuzana Zubáčová*, Dejan Bursać†, Robert Suták*, Jana Nebesárová‡, Trevor Lithgow†, and Jan Tachezy*[§]

*Department of Parasitology, Charles University, Vinicna 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic; †Laboratory of Electron Microscopy, Institute of Parasitology of the Academy of Science of the Czech Republic, Branisovska 31, 37005 Ceske Budejovice, Czech Republic; and ‡Department of Biochemistry and Molecular Biology and Bio21 Molecular Science and Biotechnology Institute, University of Melbourne, Parkville 3010, Australia

Edited by Jeffrey D. Palmer, Indiana University, Bloomington, IN, and approved June 13, 2005 (received for review January 14, 2005)

Mitochondria are archetypal organelles of endosymbiotic origin in eukaryotic cells. Some unicellular eukaryotes (protists) were considered to be primarily amitochondrial organisms that diverged from the eukaryotic lineage before the acquisition of the premitchondrial endosymbiont, but their amitochondrial status was recently challenged by the discovery of mitochondria-like double membrane-bound organelles called mitosomes. Here, we report that proteins targeted into mitosomes of *Giardia intestinalis* have targeting signals necessary and sufficient to be recognized by the mitochondrial protein import machinery. Expression of these mitochondrial proteins in *Trichomonas vaginalis* results in targeting to hydrogenosomes, a hydrogen-producing form of mitochondria. We identify, in *Giardia* and *Trichomonas*, proteins related to the component of the translocase in the inner membrane from mitochondria and the processing peptidase. A shared mode of protein targeting supports the hypothesis that mitosomes, hydrogenosomes, and mitochondria represent different forms of the same fundamental organelle having evolved under distinct selection pressures.

biogenesis | FeS cluster assembly | Pam18 | matrix-located processing peptidase | ferredoxin

Mitosomes are double-membrane bound organelles found in some unicellular eukaryotes, including *Entamoeba histolytica* (1, 2) and microsporidians such as *Trachipleistophora hominis* (3). The name “mitosome” (synonym: crypton) was proposed to indicate that the organelles are highly reduced (cryptic) mitochondria (1). More recently, mitosomes were identified in the human intestinal parasite *Giardia intestinalis* (4), which has often been considered to be among the earliest branching eukaryotes (5, 6). The apparent lack of mitochondria in *Giardia* had led to the hypothesis that *Giardia* separated from other eukaryotes before the acquisition of mitochondria (7). The presence of mitosomes in *Giardia* provides evidence that even if *Giardia* really is an early branching eukaryote, it nevertheless split from other eukaryotes after the mitochondrial endosymbiosis event (4). This view is further supported by identification of several genes of putative mitochondrial origin on the *Giardia* genome (8, 9).

A key piece of evidence for identifying the mitosomes in *Giardia* was the discovery that they contain components of the protein machinery responsible for iron sulfur cluster assembly (10). Cysteine desulfurase (IscS) and a scaffold protein (IscU) carry out the crucial steps in biosynthesis of Fe-S centers. In eukaryotes, this process takes place exclusively in double membrane-bound organelles including mitochondria (11), hydrogenosomes (12), and chloroplasts (13). Phylogenetic analyses placed the *Giardia* IscS (GiiscS) within the mitochondrion/hydrogenosome clade (10, 14). In addition, GiiscS and *Giardia* scaffold protein (GiiscU) colocalized inside vesicles surrounded by a double membrane and high-speed cellular fractions of *Giardia* catalyzed reconstitution of FeS clusters in an apoprotein lacking FeS moieties (4). Based on these data, it has been

proposed that the GiiscS- and GiiscU-containing vesicles are highly reduced mitochondrial homologues or mitosomes.

The presence of a common type of FeS assembly machinery in *Giardia* mitosomes, trichomonad hydrogenosomes, and mitochondria argues for a common evolutionary history of these organelles (4); however, it does not refute contentions that these organelles each arose independently from related species of bacterial endosymbionts (15). One problem is the absence of knowledge concerning the biogenesis of the mitosomes, the evidence that provided strong arguments for a common progenitor of hydrogenosomes and mitochondria (16, 17). Proteins targeted into the mitochondria are synthesized in cytosol with an N-terminal extension for protein targeting; however, many have internal targeting signals. Both sorts of targeting information are recognized by the outer (TOM) and inner (TIM) membrane translocases (18, 19). The mitochondrial matrix proteins are further translocated through the TIM23 complex, with energy supplied by a PAM complex. The PAM complex includes an integral membrane protein with a J domain referred to either as Pam18 (20) or Tim14 (21). After translocation, N-terminal presequences are then cleaved by a matrix-located processing peptidase (MPP) (22). Proteins targeted to hydrogenosomes have N-terminal extensions that carry targeting information (23). Interestingly, initial work on the proteins assembling Fe-S centers in *Giardia* showed that two mitochondrial proteins, GiiscU (4) and [2Fe2S] ferredoxin (24), have also predicted N-terminal extensions, whereas such an extension was absent in GiiscS (4).

To provide insight into the biogenesis of *Giardia* mitosomes, we investigated and compared targeting of GiiscS, GiiscU, and [2Fe2S] ferredoxin to *Giardia* mitosomes and to hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*. We show that mitosomes and hydrogenosomes share a common mode of protein targeting that, like protein import into mitochondria, can make use of N-terminal or internal targeting signals. Initial sequence analysis and cell localization studies suggests that *Giardia* and *Trichomonas* have protein import machinery that shares common components with the protein import machinery of mitochondria and mitochondria-like processing peptidases.

Materials and Methods

Cell Cultivation. *G. intestinalis* strain WB (American Type Culture Collection) was grown in TYI-S-33 medium supplemented with antibiotics (25). *T. vaginalis* strain T1 (kindly provided by P. J. Johnson, University of California, Los Angeles) was maintained in TYM medium (26). *Saccharomyces cerevisiae* strain YPH499 was grown in a rich medium as described in ref. 12.

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: GiiscS, *Giardia* cysteine desulfurase; GiiscU, *Giardia* scaffold protein; MPP, matrix-located processing peptidase.

[§]To whom correspondence should be addressed. E-mail: tachezy@natur.cuni.cz.

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA

Selectable Transformation of *G. intestinalis* and *T. vaginalis*. The plasmid pONDRA-HA was constructed by modifying pRAN-neoGDHluc (27). The luc gene was replaced with the HA tag cassette from TagVag vector (28), and the 5' UTR of GDH was modified for further cloning. The *giiscu*, *gifdx*, Δ *giiscu*, Δ *gifdx*, and *gi α -tub* genes were amplified by PCR from genomic DNA and introduced into plasmids for transformation as described in ref. 27. All primers used in this study are described in supporting information, which is published as supporting information on the PNAS web site. For *T. vaginalis* transformation, *Giardia* genes were subcloned into the plasmid TagVag (28). Cells were transformed and selected as described in ref. 12. Iterative BLAST searches were used to identify the Pam18 orthologous sequences from *G. intestinalis* (protein accession no. EAA37663) and *T. vaginalis* (orf 95394.m00357) (29). BLAST searches of GIARDIADB for members of the M16 protease family revealed Gi β MPP (EAA39560). The *tpam18*, *gipam18*, and *tv β mpp* genes were amplified, cloned, and expressed in *Giardia* and *Trichomonas* as above.

Immunofluorescent Microscopy. Mitosomal proteins were stained in fixed *G. intestinalis* and *T. vaginalis* cells with mouse α -HA mAb (12). In double-labeling experiments, *G. intestinalis* clathrin heavy chain, disulfide isomerase, and GiiscU were detected with rabbit polyclonal Abs (A. Hehl, University of Zürich, Zürich; ref. 4). Hydrogenosomal malic enzyme was detected by rabbit polyclonal Ab (30). Details are given in supporting information.

Preparation of Subcellular Fractions. *Giardia* subcellular fractions were obtained by differential and sucrose gradient centrifugation of the cell homogenate as detailed in supporting information. Percoll-purified hydrogenosomes and cytosol of *T. vaginalis* were prepared as described in ref. 12. Mitochondria were isolated from the *S. cerevisiae* strain YPH499 as described in ref. 31. To remove proteins not imported into the organelles, hydrogenosomes were incubated 60 min with 200 μ g/ml trypsin in ST buffer (250 mM sucrose/0.5 mM KCl/10 mM Tris-HCl, pH 7.2) at 37°C and washed twice with 5 mg/ml soybean trypsin inhibitor in ST buffer.

Mitosome-rich fractions were processed for electron microscopy with a modified method of Tokuyasu (32). Ultrathin frozen sections were labeled with mouse α -HA mAb and 10 nm gold-labeled goat α -mouse Ab and observed in a Jeol 1010 electron microscope, as detailed in supporting information.

Protein Processing Assay. GiiscU and Δ GiiscU were cloned into pSP64T (Promega). The constructs were incubated with TNT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) according to the manufacturer's protocol. Synthesized proteins were precipitated by 60% ammonium sulfate (wt/vol in water), and the resulting precipitate dissolved in buffer (20 mM Tris/1 mM KCl/10 mM MgCl₂/0.5% Triton). Organelles (100 μ g of protein) were mixed with ³⁵S-labeled protein in the same buffer. Mitochondrial and hydrogenosomal samples were incubated for various times at 30°C and 37°C, and samples were analyzed by SDS/PAGE and autoradiography.

GiiscU Expression and Determination of Processing Site. GiiscU was expressed in *E. coli* by using pQE30 vector (Qiagen) and was affinity purified under native conditions (Qiagen). Protein (\approx 150 μ g) was incubated for 60 min in 10 mM Hepes (pH 7.5)/0.1 mM MnCl₂/0.5 mM DTT with 4 μ g of recombinant rat MPP (kindly provided by J. Adamec, Academy of Sciences, Prague, Czech Republic) (33). The reaction was inhibited by addition of 10 mM EDTA, and samples were separated on SDS/PAGE gels, blotted to poly(vinylidene difluoride) membrane and stained with Coomassie brilliant blue. Selected pro-

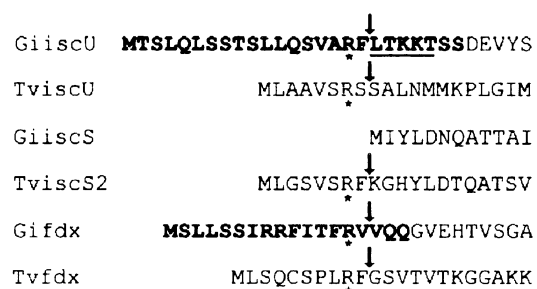


Fig. 1. N-terminal regions of *Giardia* and *Trichomonas* IscU, IscS, and [2Fe-2S] ferredoxins. MITOPROT (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) predicted targeting sequences are highlighted in bold. PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp>) cleavage sites (arrows) are shown, and arginines (at position -2 relative to the cleavage site) highlighted by asterisks. N-terminal amino acid sequences determined in GiiscU, retrieved from *Giardia*, or processed *in vitro* by recombinant rat MPP are underlined.

tein bands were subjected to N-terminal protein sequencing by Edman degradation.

The HA-tagged GiiscU was immunoprecipitated from *G. intestinalis* transformants by using proteinA Sepharose (Sigma), coupled with α -HA mAb adopting the method from ref. 34. Details are given in supporting information.

Results

Targeting of GiiscU, GiiscS, and Gifdx into Mitosomes. *GiiscU*, *Gifdx*, *GiiscS*, and the truncated forms (Δ *giiscU* and Δ *gifdx*) lacking 26 and 18 aa of predicted N-terminal extensions (Fig. 1), respectively, were overexpressed in *Giardia* and *Trichomonas* with a C-terminal HA tag (27, 28). The products of *giiscS*, *giiscU*, and *gifdx* were found in a number of vesicles (30 ± 6 per cell) with a distribution characteristic of mitosomes (4): between the two *Giardia* nuclei in close proximity to the basal bodies and in the lateral and posterior parts of the cell (Fig. 2A). Tagged GiiscU colocalized with native GiiscU in double-labeling experiments (data not shown). These vesicles were clearly distinct from the endoplasmic reticulum and peripheral vesicles beneath the plasma membrane (Fig. 2B). Subsequently, the mitosome containing fraction from *giiscU* transformants were purified from the homogenate by differential and gradient centrifugation. Immunoelectron microscopy revealed the presence of tagged GiiscU within organelles of $\approx 184 \times 140$ nm in diameter, and surrounded by two membranes (Fig. 2D). These features indicate that all three proteins were translocated into *Giardia* mitosomes (4).

The N-terminal extensions predicted for *Gifdx* and *GiiscU* are necessary for targeting the proteins to mitosomes: weak labeling of mitosomes was observed in cells expressing Δ *giiscU* that lacks the 26-residue N-terminal sequence, and no organellar labeling was observed in the cells expressing Δ *Gifdx* lacking its 18-residue extension (Fig. 2A). The targeting function of these N-terminal leader sequences was confirmed by Western blot analysis of the cellular fractions (Fig. 2C), with *GiiscU* and *Gifdx* present exclusively in the mitosome-rich fraction. By contrast, the majority of Δ GiiscU was found in the cytosol, and no organellar signal was detected for Δ Gifdx, although it did not accumulate within the cytosol either. To be certain that Δ Gifdx was expressed, we compared mRNA levels of *gifdx* and Δ *gifdx* in corresponding transformants. No difference in *gifdx* and Δ *gifdx* transcription was found (supporting information). Thus, failure of Δ Gifdx to be targeted to mitosomes likely results in degradation of the apoprotein by proteolysis, as previously reported for the apoprotein of Leu1p in yeast (35).

N-Terminal Targeting Sequence-Independent Import of GiiscS. No N-terminal targeting sequence was predicted for *GiiscS*. To

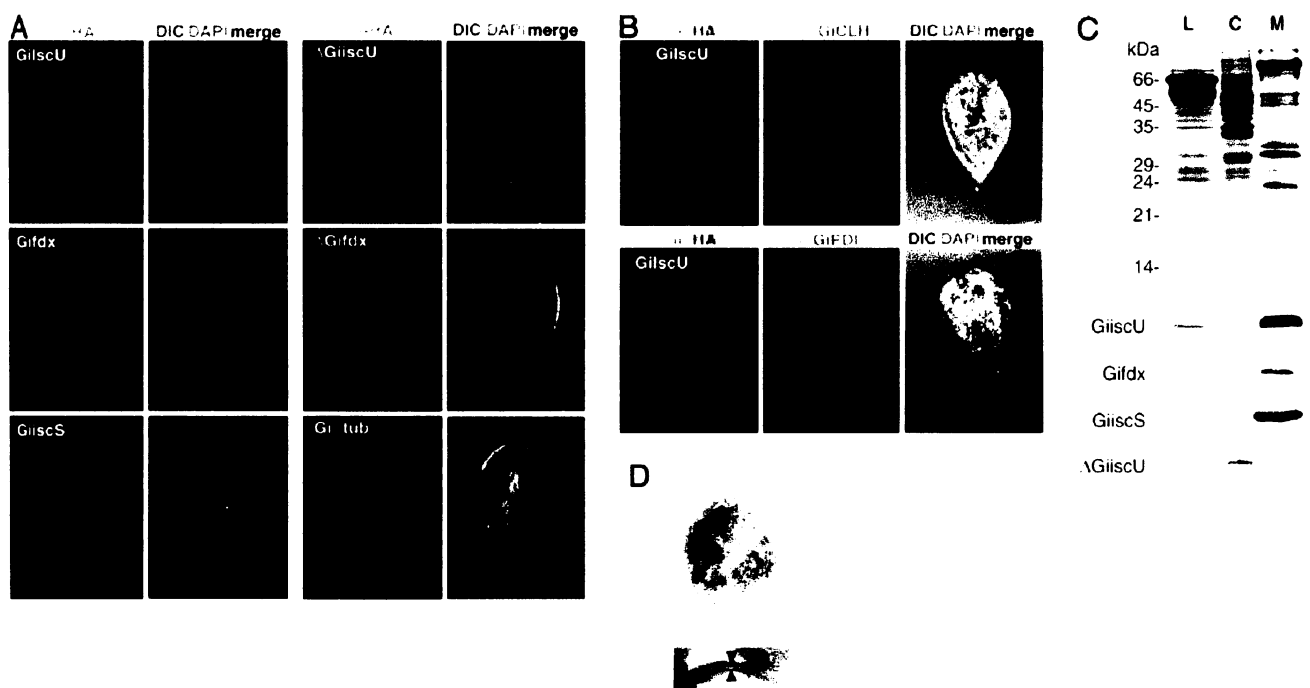


Fig. 2. Cellular localization of tagged GiiscU, GiiscS, and Gifdx in *G. intestinalis* transformants. (A) Transformed *Giardia* cell lines were stained for immunofluorescence microscopy with mouse α -HA tag Ab (green). GiiscU and Gifdx, the complete preproteins possessing N-terminal presequences; Δ GiiscU and Δ Gifdx, truncated forms lacking the N-terminal presequences. GiiscS does not possess recognizable N-terminal presequence. *Giardia* α -tubulin (Gi α tub) was used as a control. Merged images are given for immunofluorescent staining, the nuclei (blue) stained with DAPI, and differential interference contrast (DIC). (B) Mitosomes stained for GiiscU (red); peripheral vesicles and structures of endoplasmic reticulum stained for clathrin light chain (α -GiCLH Ab) and protein disulfide isomerase (α -GiPDI Ab), respectively, (green). (C) Total cell lysate (L), cytosolic (C), and mitosomal (M) fractions were prepared from transformed cells and analyzed by SDS/PAGE (Top) and Western blots (bottom four blots). (D) Immunoelectron microscopy of the mitosomes purified from *giiscU* transformants. Tagged GiiscU was detected in the organelles by the mouse α -HA Ab and 10 nm gold-labeled goat α -mouse Ab. Arrowheads indicate the double (outer and inner) membranes of the mitosome.

examine which part of the 434-aa protein is required for targeting to mitosomes, the protein was truncated and the N-terminal 202 residues (GiiscSN1/2) or C-terminal 232 residues (GiiscSC1/2) expressed in *T. vaginalis*. Both fragments of the protein were delivered into the hydrogenosomes (Fig. 3C). These results indicate that IscS contains multiple targeting signals within the protein.

Conservation of Protein Targeting in Mitosomes and Hydrogenosomes. To determine whether the mitochondrial targeting sequences on GiiscU and Gifdx can function to target proteins to hydrogenosomes, the giardial genes were overexpressed in *T. vaginalis*. Immunofluorescence labeling of trichomonad cells expressing tagged GiiscU, Gifdx, and GiiscS localized these proteins to discrete structures surrounding trichomonad nuclei and cytoskeletal structures, the cell distribution typical for hydrogenosomes (Fig. 3A). The labeling of tagged proteins also colocalized with malic enzyme, a marker protein for hydrogenosomes. Stronger malic enzyme signal corresponds to its abundance in hydrogenosomes (30). In contrast, the absence of N-terminal leader sequences on Δ GiiscU and Δ Gifdx abrogated the delivery of the proteins into the target organelle with the majority of each protein accumulating in the cytosol (Fig. 3B).

The N-terminal extension of GiiscU is not only necessary, but sufficient, for targeting of this protein into the hydrogenosomes. Attaching the extension of GiiscU to the N terminus of α -tubulin delivers a significant proportion of this passenger protein into the hydrogenosomes, whereas no giardial α -tubulin was found in the organelles when expressed without the GiiscU targeting sequence (Fig. 3B).

Processing of a Mitosomal Targeting Sequence. The detection of GiiscU expressed in *T. vaginalis* hydrogenosomes revealed the presence of two bands of 20 and 17 kDa corresponding to the predicted molecular mass of the GiiscU precursor and its mature form, respectively. In *Giardia*, the size of tagged GiiscU detected in mitosomes of the cells expressing the complete *giiscU* was identical to its truncated form expressed in Δ *giiscU* transformants. These observations indicated processing of N-terminal targeting sequence within the target organelles (Fig. 4A). To test whether specific metalloproteases, which are known to mediate cleavage of targeting sequences in mitochondria (33) and possibly in hydrogenosomes (23), can process the giardial targeting sequences, we incubated *in vitro* translated GiiscU preprotein with lysates of yeast mitochondria or trichomonad hydrogenosomes. The mitochondrial lysate efficiently catalyzed the cleavage of GiiscU in a time-dependent manner (Fig. 4B), as did the hydrogenosomal extract (Fig. 4C). The cleavage was inhibited by the addition of EDTA, indicating that a metalloprotease is involved. Pretreatment of the hydrogenosomal lysate with hexokinase to remove ATP did not affect the cleavage, which excludes a possibility that the observed processing was catalyzed by ATP-dependent proteases. To determine the protein cleavage site, GiiscU preprotein was incubated with recombinant rat MPP (Fig. 4D). The N-terminal sequence of the major cleavage product (inhibitable by EDTA) revealed that the MPP cleaved the GiiscU precursor between Phe-18 and Leu-19 with arginine at -2 position (Fig. 1). Finally, overexpressed GiiscU was immunoprecipitated from a giardial high-speed pellet to verify whether native cleavage site in *Giardia* corresponds to that catalyzed by recombinant MPP (supporting information). Indeed, the N-terminal sequence of the GiiscU retrieved from

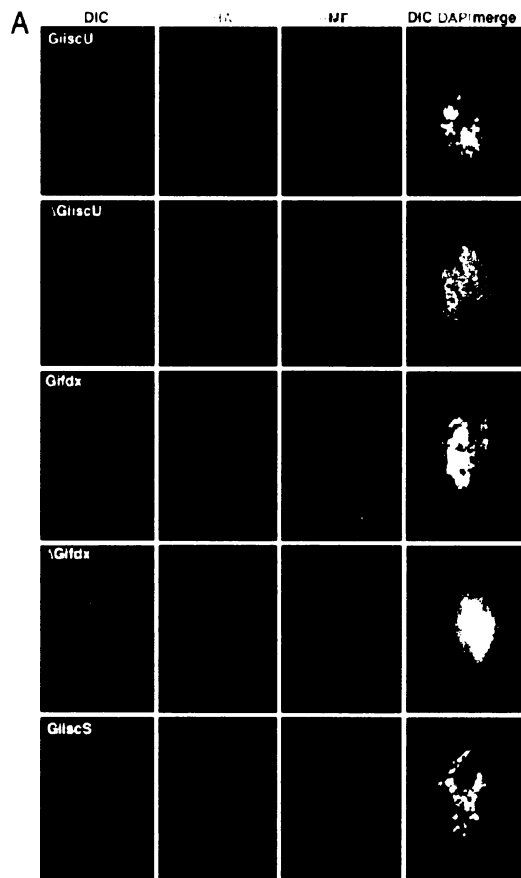


Fig. 3. Targeting of the mitochondrial proteins GiiscU, Gifdx, and GiiscS into *T. vaginalis* hydrogenosomes. (A) The *Giardia* proteins were each expressed in trichomonads with a C-terminal HA tag (green). A rabbit polyclonal Ab recognizing the hydrogenosomal malic enzyme (*ir*-ME) was used as a marker for hydrogenosomes (red). The nuclei were stained with DAPI (blue). DIC, differential interference contrast. (B) Total cell lysate (L), cytosol (C), and hydrogenosomal (H) fractions were prepared from transformed *Trichomonas* cells and analyzed by SDS/PAGE and Western blots.

Giardia started with Leu-19 (Fig. 1). Although it is not yet clear how generally applicable PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp>) will be for predicting cleavage sites in mitochondrial proteins, in the case of GiiscU, the prediction was successful.

Homologs of the β -subunit of MPP are encoded in the genomes of *G. intestinalis* and *T. vaginalis*. Both of these β -MPP-like sequences possess characteristic His-X-X-Glu-His zinc-binding motifs and PSORT-predicted presequences (supporting information). Overexpression of β -MPP in *G. intestinalis* showed its colocalization with GiiscU in mitochondria (Fig. 5).

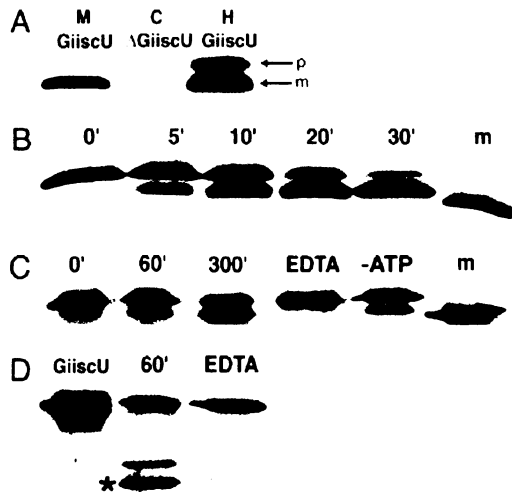


Fig. 4. Processing of GiiscU. (A) M, GiiscU detected in mitochondria of *Giardia*; C, N-terminal truncated form of GiiscU retained in the cytosol of Δ giiscU transformants; H, two forms of GiiscU in the hydrogenosomes represent the precursor (p) and the processed (m) protein. (B) Time-dependent processing of *in vitro* translated, 35 S-labeled GiiscU precursor in the presence of yeast mitochondrial lysate. The mature-sized form of GiiscU (m). (C) GiiscU precursor was 35 S-labeled and incubated with lysate prepared from *T. vaginalis* hydrogenosomes with or without 10 mM EDTA. ATP-depleted lysate (-ATP) by using hexokinase (34). (D) GiiscU precursor incubated for 60 min with rat MPP (33). The N terminus of major cleavage product (asterisk) was determined by microsequencing.

A Subunit of the Mitochondrial PAM Complex in Mitosomes and Hydrogenosomes.

Although only partial information is available on the genome sequence from *G. intestinalis* and *T. vaginalis*, we have initiated iterative BLAST analyses (29) to search for homologs of the components of the mitochondrial protein import machinery. The Pam18-related sequences in Fig. 5C all predict to have a transmembrane segment, followed by a conserved charged region and a J domain characterized by the absence of a predicted "helix IV" (37). To determine their subcellular location, GiPam18 and TvPam18 were expressed as HA-tagged proteins in *G. intestinalis* and *T. vaginalis*. The proteins of both origins were delivered into both hydrogenosomes and mitochondria and colocalized with the marker proteins, GiiscU and malic enzyme, respectively (Fig. 5A and B).

Discussion

Our study provides evidence that mitosomes of *G. intestinalis*, hydrogenosomes, and mitochondria share a similar mode of protein targeting and translocation. This finding supports the hypothesis that mitosomes, hydrogenosomes, and mitochondria represent different forms of the same fundamental organelle that have evolved under distinct selection pressures (38).

Three giardial proteins were selected to compare their targeting and translocation into mitosomes and hydrogenosomes: GiiscS, GiiscU, and [2Fe2S] ferredoxin (Gifdx). These proteins are homologues of the key components of the FeS cluster assembly machinery operating in mitochondria and hydrogenosomes (11, 12). Association of GiiscS and GiiscU with giardial mitosomes has been reported in ref. 4, whereas the intracellular localization of Gifdx has not been studied. When GiiscS, GiiscU, and Gifdx were overexpressed in *G. intestinalis* or *T. vaginalis*, all three proteins were specifically delivered into the mitosomes or into the hydrogenosomes, respectively. The delivery of the proteins was mediated by two different mechanisms requiring either N-terminal targeting sequences (Gifdx, GiiscU) or internal targeting sequences (GiiscS). The N-terminal extensions

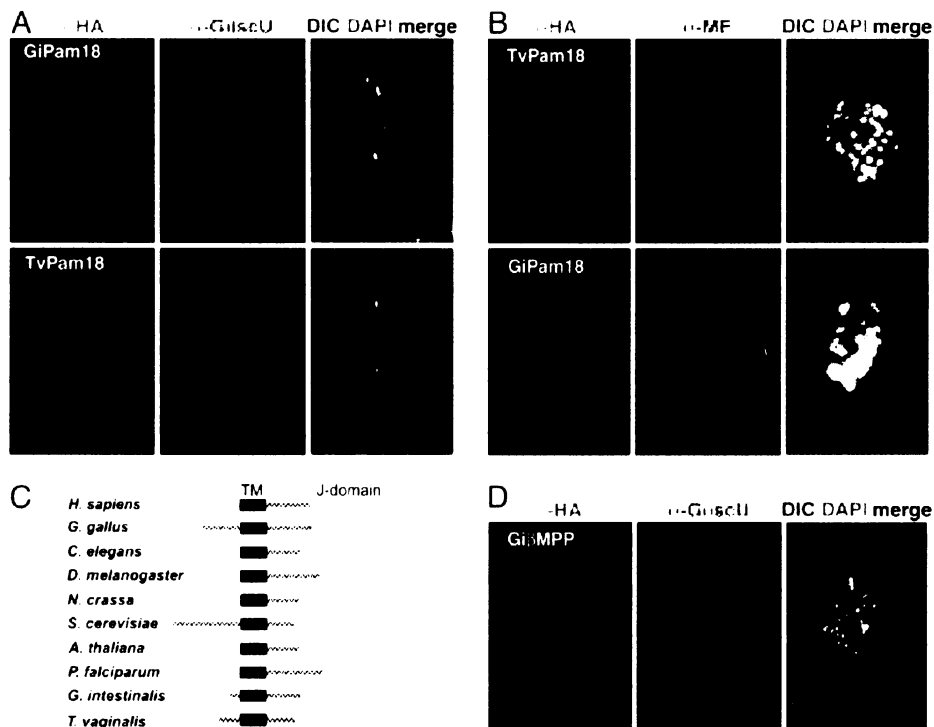


Fig. 5. Cellular localization of tagged GiPam18, TvPam18, and GiMPP. Transformed cell lines of *G. intestinalis* (A and D) and *T. vaginalis* (B) were stained for immunofluorescence microscopy with mouse α -Ha Ab (green). GiiscU was detected by polyclonal rabbit α -GiiscU Ab (red). The merged images are given for immunofluorescent staining, the nuclei (blue) stained with DAPI. (C) Domain structure of GiPam18 and TvPam18 compared with other members of the Pam18/Tim14 family. Ten of the most diverse sequences were aligned with CLUSTALW (supporting information). The N-terminal extension segments were located in the intermembrane space (20), transmembrane segments (TM) were predicted with DAS (36), and the J domain (blue) was characterized as described in ref. 37.

predicted in GiiscU and Gifdx are both necessary and sufficient for targeting to mitosomes and resemble the targeting sequences found in mitochondrial and hydrogenosomal proteins in that they (i) are rich in serine and arginine residues, (ii) are predicted to form amphipathic helices, and (iii) possess cleavage site motifs recognized by mitochondrial-type processing peptidases.

In mitochondria, MPP is an EDTA-sensitive metalloprotease that consists of two subunits. Genes coding for α and β subunits of MPP can be found widely in eukaryotes, including animals, fungi, and plants (22). Although the hydrogenosomal processing peptidase has not been biochemically characterized, protein processing in hydrogenosomes was observed (23), and sequences for each subunit of MPP are annotated in the *T. vaginalis* genome. We found a putative β -MPP subunit in the *Giardia* genome and showed that the protein is delivered into mitosomes. EDTA-sensitive cleavage of the GiiscU N-terminal targeting sequence was observed with purified rat MPP and with hydrogenosomal extracts, and analysis of GiiscU isolated from *Giardia* indicated that protein processing also occurred *in situ*.

Protein targeting sequences and their processing peptidase are common in mitosomes, hydrogenosome and mitochondria. Are the fundamental components of the TOM and TIM complexes also to be found in *Trichomonas* and *Giardia*? It is clear now that although some components of the mitochondrial protein import machinery might have evolved after the radiation of the main eukaryotic lineages (39), several components of the TOM (29) and TIM (40) complexes were likely present at the earliest stage in the conversion of the endosymbiont that gave rise to mitochondria. Our data predicts that these primitive components of the TOM and TIM complexes will be present in hydrogenosomes and mitosomes. In at least one case, Tim14/Pam18, this prediction has been fulfilled. Although there are 26 different proteins

containing J domains in yeast, only Pam18/Tim14 (and its paralog Mdj2) contain a transmembrane segment, a charged linker domain, and a J domain without the characteristic “helix IV” (37). The function of Tim14/Pam18 is to dock to the TIM23 complex, assist Tim44 to bind the mitochondrial Hsp70, and to directly stimulate ATP hydrolysis catalysed by Hsp70 to promote protein translocation across the mitochondrial membranes (20, 21). We do not currently have an assay system capable of dissecting the function of the Pam18-related proteins of *Giardia* and *Trichomonas*, but the presence of GiPam18 in mitosomes and TvPam18 in hydrogenosomes provides an indication that the protein translocation machinery of these organelles and mitochondria might be built around commonly derived components. More sensitive means of sequence analysis may be required to identify further subunits of the TOM and TIM complexes, and we have initiated studies to build hidden Markov models for this purpose.

The endosymbiotic event of an α -proteobacterium that gave rise to mitochondria and related organelles is of great interest because this event might represent the moment of the origin of the eukaryotic cell itself (41). Studying the fate of the ancestral endosymbiont in different eukaryotes promises to uncover the nature and primary role of the organelle for eukaryotes. The fact that hydrogenosomes and mitochondria recognize the targeting signals of mitochondrial proteins indicates that these organelles possess a common protein import mechanism and suggests that all these organelles share, through common descent, what must have been among the earliest features of the first “mitochondriate” organisms.

We thank M. Marcincikova for the excellent technical support; M. Embley, M. Müller, and S. Ralph for the comments on the manuscript; and Z. Voburka from the Czech Academy of Science for protein

microsequencing. This work was supported by Grant Agency of the Czech Republic Grant 204/04/0435 (to J.T.), a Fogarty International Research Collaboration Award (to J.T. and Miklos Müller), and a grant

from the Australian Research Council (to T.L.). The use of sequencing information from *G. lamblia* (www.mbl.edu/Giardia) and *T. vaginalis* (www.tigr.org/tdb/e2k1/tvg) genome databases is acknowledged.

1. Tovar, J., Fischer, A. & Clark, C. G. (1999) *Mol. Microbiol.* **32**, 1013–1021.
2. Mai, Z., Ghosh, S., Frisardi, M., Rosenthal, B., Rogers, R. & Samuelson, J. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2198–2205.
3. Williams, B. A., Hirt, R. P., Lucocq, J. M. & Embley, T. M. (2002) *Nature* **418**, 865–869.
4. Tovar, J., Leon-Avila, G., Sánchez, L. B., Satak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernandez, M., Müller, M. & Lucocq, J. M. (2003) *Nature* **426**, 172–176.
5. Adam, R. D. (2001) *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 447–475.
6. Best, A. A., Morrison, H. G., McArthur, A. G., Sogin, M. L. & Olsen, G. J. (2004) *Genome Res.* **14**, 1537–1547.
7. Cavalier-Smith, T. (1987) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**, 805–824.
8. Hashimoto, T., Sanchez, L. B., Shirakura, T., Müller, M. & Hasegawa, M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6860–6865.
9. Roger, A. J., Svard, S. G., Tovar, J., Clark, C. G., Smith, M. W., Gillin, F. D. & Sogin, M. L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 229–234.
10. Tachezy, J., Sanchez, L. B. & Müller, M. (2001) *Mol. Biol. Evol.* **18**, 1919–1928.
11. Lill, R. & Kispal, G. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 352–356.
12. Satak, R., Dolezal, P., Fiumera, H. L., Hrdy, I., Dancis, A., Delgado-Correa, M., Johnson, P. J., Müller, M. & Tachezy, J. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 10368–10373.
13. Pilon-Smits, E. A., Garifullina, G. F., Abdel-Ghany, S., Kato, S., Mihara, H., Hale, K. L., Burkhead, J. L., Esaki, N., Kurihara, T. & Pilon, M. (2002) *Plant Physiol.* **130**, 1309–1318.
14. Emelyanov, V. V. (2003) *FEMS Microbiol. Lett.* **226**, 257–266.
15. Dyall, S. D., Brown, M. T. & Johnson, P. J. (2004) *Science* **304**, 253–257.
16. van der Giezen, M., Slotboom, D. J., Horner, D. S., Dyal, P. L., Harding, M., Xue, G. P., Embley, T. M. & Kunji, E. R. (2002) *EMBO J.* **21**, 572–579.
17. Emelyanov, V. V. (2001) *FEBS Lett.* **501**, 11–18.
18. Neupert, W. (1997) *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 863–917.
19. Rehling, P., Wiedemann, N., Pfanner, N. & Truscott, K. N. (2001) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 291–336.
20. Truscott, K. N., Voos, W., Frazier, A. E., Lind, M., Li, Y., Geissler, A., Dudek, J., Muller, H., Sickmann, A., Meyer, H. E., et al. (2003) *J. Cell Biol.* **163**, 707–713.
21. Mokranjac, D., Sighting, M., Neupert, W. & Hell, K. (2003) *EMBO J.* **22**, 4945–4956.
22. Gakh, O., Cavadini, P. & Isaya, G. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 63–77.
23. Bradley, P. J., Lahti, C. J., Plümper, E. & Johnson, P. J. (1997) *EMBO J.* **16**, 3484–3493.
24. Nixon, J. E., Wang, A., Field, J., Morrison, H. G., McArthur, A. G., Sogin, M. L., Loftus, B. J. & Samuelson, J. (2002) *Eukaryotic Cell* **1**, 181–190.
25. Keister, D. B. (1983) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**, 487–488.
26. Diamond, L. S. (1957) *J. Parasitol.* **43**, 488–490.
27. Sun, C. H., Chou, C. F. & Tai, J. H. (1998) *Mol. Biochem. Parasitol.* **92**, 123–132.
28. Hrdy, I., Hirt, R. P., Dolezal, P., Bardanova, L., Foster, P. G., Tachezy, J. & Embley, T. M. (2004) *Nature* **432**, 618–622.
29. Macasev, D., Whelan, J., Newbiggin, E., Silva-Filho, M. C., Mulhern, T. D. & Lithgow, T. (2004) *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1557–1564.
30. Drmota, T., Proost, P., Van Ranst, M., Weyda, F., Kulda, J. & Tachezy, J. (1996) *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**, 221–234.
31. Murakami, H., Pain, D. & Blobel, G. (1988) *J. Cell Biol.* **107**, 2051–2057.
32. Tokuyasu, K. T. (1981) *J. Electron Microsc.* **30**, 93–94.
33. Adamec, J., Gakh, O., Spizek, J. & Kalousek, F. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **370**, 77–85.
34. Mühlhoff, U., Richhardt, N., Gerber, J. & Lill, R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 29810–29816.
35. Mühlhoff, U., Balk, J., Richhardt, N., Kaiser, J. T., Sipos, K., Kispal, G. & Lill, R. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 36906–36915.
36. Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G. & Elofsson, A. (1997) *Protein Eng.* **10**, 673–676.
37. Walsh, P., Bursac, D., Law, Y. C., Cyr, D. & Lithgow, T. (2004) *EMBO Rep.* **5**, 567–571.
38. Embley, T. M., van der Giezen, M., Horner, D. S., Dyal, P. L., Bell, S. & Foster, P. G. (2003) *IUBMB Life* **55**, 387–395.
39. Likic, V. A., Perry, A., Hulett, J., Derby, M., Traven, A., Waller, R. F., Keeling, P. J., Koehler, C. M., Curran, S. P., Gooley, P. R., et al. (2005) *J. Mol. Biol.* **347**, 81–93.
40. Herrmann, J. M. (2003) *Trends Microbiol.* **11**, 74–79.
41. Martin, W. & Russell, M. J. (2003) *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **358**, 59–83.