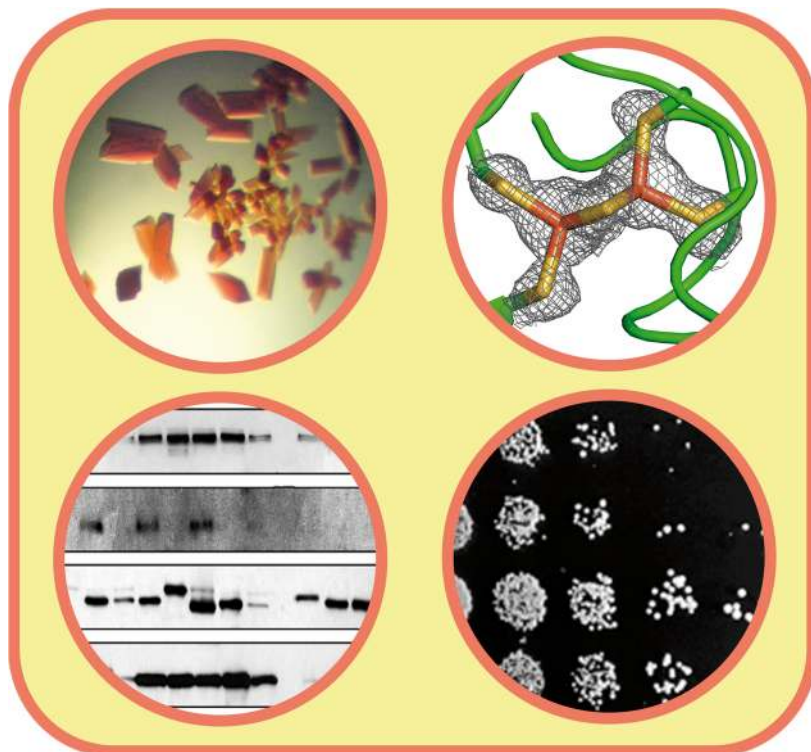


# Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Komponenten der eukaryotischen Eisen-Schwefel-Cluster-Biogenese- Maschinerie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)



April 2011

Holger Webert







**Strukturelle und funktionelle  
Charakterisierung von  
Komponenten der eukaryotischen  
Eisen-Schwefel-Cluster-Biogenese-  
Maschinerie**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Dipl.-Chem. Holger Webert**  
aus Hünfeld

**Marburg/Lahn 2011**



vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am: \_\_\_\_\_

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Roland Lill (Fachbereich Medizin)

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Lars-Oliver Essen (Fachbereich Chemie)

Tag der mündlichen Prüfung am: \_\_\_\_\_





## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Thema:

"Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von  
Komponenten der eukaryotischen Eisen-Schwefel-Cluster-Biogenese-Maschinerie"

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

---

(Ort, Datum)

---

Holger Webert



**Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln publiziert:**

Webert, H., Hobler, A., Sheftel A.D., Maestre-Reyna M., Essen, L.-O., Vornicescu, D., Keusgen, M., Hannemann, F., Bernhardt, R., Lill, R. (2011). **Conversion of the substrate specificity of human mitochondrial ferredoxins Fdx1 and Fdx2.** *Manuskript in Vorbereitung.*

Webert, H., Pierik A.J., Lill, R. (2011). **Determination of the Nar1 binding site on Cia1 in the cytosolic CIA-complex.** *Manuskript in Vorbereitung.*

Srinivasan V., Netz D.J.A., Webert H., Mascarenhas J., Pierik A.J., Michel H., Lill R. (2007). **Structure of the yeast WD40 domain protein Cia1, a component acting late in iron-sulfur protein biogenesis.** *Structure*, **15**, 1246-1257.

**Im Verlauf der Promotion wurden weiterhin Beiträge zu folgenden Artikeln geleistet:**

Sheftel A.D., Stehling O., Pierik A.J., Elsässer H.P., Mühlenhoff U., Webert H., Hobler A., Hannemann F., Bernhardt R., Lill R. (2010). **Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(26),11775-11780.

Gerbeth C., Stehling O., Webert H., Mühlenhoff U., Lill R. (2011). **Functional characterisation of the mammalian cysteine desulfurase Nfs1 in human cell culture.** *Manuskript in Vorbereitung.*

Ozeir M., Mühlenhoff U., Webert H., Lill R., Fontecave M., Pierrel F. (2011) **Coenzyme Q biosynthesis: Coq6 catalyzes the C5-hydroxylation reaction and substrate analogues rescue Coq6 deficiency.** *Manuskript in Vorbereitung.*

## Tagungsbeiträge (Auswahl)

Netz D.J.A., Pierik A.J., Webert H., Mascarenhas J., Lill R.: **The CIA machinery is essential for the assembly of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins.** (Poster), DGZ/ VAAM Meeting „Biology of Yeasts and Filamentous Fungi“, 12.10. - 14.10.2006, Frankfurt.

Webert H., Mascarenhas J., Srinivasan V., Netz D.J.A., Pierik A.J., Michel H., Lill R.: **Structural and functional characterization of Cia1 involved in cytosolic and nuclear Fe/S protein biogenesis.** (Poster), Meeting “Biogenesis of Iron Sulfur proteins: Cluster Assembly and regulation”, 09.07. - 12.07.2007, Villard-de-Lans (France).

Webert H., Mascarenhas J., Srinivasan V., Netz D.J.A., Pierik A.J., Michel H., Lill R.: **Proteins involved in cytosolic and nuclear Fe/S biogenesis – structure of Cia1 and functional characterisation of Cia2.** (Poster), Meeting “Biogenesis of Iron Sulfur proteins: Cluster Assembly and regulation”, 12.03. - 15.03.2008, Marburg.

Meeting Abstract erschienen in:

Webert H., Mascarenhas J., Srinivasan V., Netz D.J.A., Pierik A.J., Michel H., Lill R. (2008) **Proteins involved in cytosolic and nuclear Fe/S biogenesis – structure of Cia1 and functional characterisation of Cia2.** *Eur J Cell Biol.*, **87**, 36.

Webert H., Pierik A.J., Lill R.: **The role of Cia1 as core component of the CIA complex involved in cytosolic and nuclear Fe/S protein biogenesis.** (Poster), Gordon Research Seminar “MITOCHONDRIA & CHLOROPLASTS” and Gordon Research Conference “MITOCHONDRIA & CHLOROPLASTS”, 09.08. - 15.08.2008, University of New England, Biddeford, Maine (USA).

Stehling, O., Gerberth, C., Webert, H., Mühlhoff, U., Lill, R.: **Functional characterization of the mammalian cysteine desulfurase Nfs1 in cell culture.** (Poster), “Fifth International Conference on Iron-Sulfur Cluster Biogenesis and Regulation”, 30.08. - 02.09.2009, Georgia Center for Continuing Education, Athens, Georgia (USA).

## Abkürzungen und Fachbegriffe

<b>Amp<sup>x</sup></b>	Ampicillin (x= Konzentration in µg/ mL)
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>ATP</b>	Adenosin-5'-triphosphat
<b>Cam<sup>x</sup></b>	Chloramphenicol (x= Konzentration in µg/ mL)
<b>CIA</b>	<i>cytosolic iron sulfur cluster assembly</i>
<b>C-Terminus</b>	Carboxyterminus
<b>CYP</b>	Cytochrom P450 Enzym
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	einfach destilliertes Wasser
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	doppelt destilliertes Wasser
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DO</b>	<i>Drop out mix</i>
<b>DTT</b>	1,4-Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>Fe/S</b>	Eisen-Schwefel
<b>FPLC</b>	<i>fast protein liquid chromatography</i>
<b>g</b>	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
<b>Gal</b>	Galaktose
<b>Glu</b>	Glukose
<b>Gly</b>	Glycerol
<b>HA</b>	Hämagglutinin
<b>His<sub>6</sub></b>	Hexahistidinyl
<b>ISC</b>	<i>iron sulfur cluster assembly</i>
<b>kb</b>	Kilobasenpaare
<b>LB</b>	Luria-Bertan
<b>M</b>	molar (mol/L)
<b>MB-Typ Ferredoxine</b>	Mitochondrien-Bakterien-Typ Ferredoxine (= Wirbeltier-Typ Ferredoxine)
<b>NTA</b>	Nitrilotriacetat
<b>N-Terminus</b>	Aminoterminus
<b>ORF</b>	<i>open reading frame</i>
<b>OD<sub>x</sub></b>	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol

<b>PMS</b>	Post-mitochondrialer Überstand
<b>PMSF</b>	Phenylmethylen-sulfonylfluorid
<b>rmsd</b>	Quadratische Mittelwertabweichung ( <i>root mean square deviation</i> )
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>Strep</b>	Strep-tag® der Firma IBA GmbH
<b>TAP</b>	<i>tandem affinity purification</i>
<b>TCA</b>	Trichloressigsäure
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen
<b>w/v</b>	Gewicht pro Volumen
<b>Wt</b>	Wild-Typ

## Proteinogene Aminosäuren: Abkürzungen und molare Masse

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode	M [g/mol]
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamat	Glu	E	147
Glutamin	Gln	Q	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1.    Biologische Bedeutung von Eisen .....	5
1.2.    Eisen-Schwefel Proteine .....	6
1.2.1.    Klassifizierung und Vorkommen .....	6
1.2.2.    Eigenschaften und Funktionen .....	9
1.3.    Eisen-Schwefel-Cluster-Biogenese .....	12
1.3.1.    Entdeckung und Geschichte .....	12
1.3.2.    Grundlegendes Prinzip .....	12
1.3.3.    Prokaryotische Fe/S-Cluster-Biogenese Systeme .....	13
1.3.4.    Fe/S-Cluster-Biogenese in Hefen als eukaryotisches Modell.....	15
1.3.5.    Wichtigkeit der Fe/S-Proteinbiogenese in Eukaryoten .....	19
1.4.    Ferrodoxine.....	21
1.5.    Das WD-Repeat-Protein Cia1.....	26
1.6.    Aufgabenstellung und Zielsetzung .....	28
<b>2 Material</b> .....	<b>31</b>
2.1.    Geräte.....	31
2.2.    Chemikalien, Enzyme und Größenstandards.....	31
2.2.1.    Chemikalien .....	31
2.2.2.    Enzyme .....	31
2.2.3.    Größenstandards .....	32
2.3.    Oligonukleotide.....	32
2.3.1.    Primer zur Konstruktion heterologer Genexpressionsvektoren für <i>E. coli</i> .. ..	32
2.3.1.1.    ..von <i>YAH1</i> ( <i>S. cerevisiae</i> ), <i>FDX1</i> ( <i>H. sapiens</i> ) und <i>FDX2</i> ( <i>H. sapiens</i> ) .....	32
2.3.1.2.    .. <i>ISU1</i> ( <i>S. cerevisiae</i> ).....	32
2.3.2.    Primer zur Konstruktion von Genexpressionsvektoren für <i>S. cerevisiae</i> .. ..	33
2.3.2.1.    ..von <i>FDX1</i> und <i>FDX2</i> (beide <i>H. sapiens</i> ) .....	33
2.3.2.2.    ..von <i>YAH1</i> ( <i>S. cerevisiae</i> ).....	33
2.3.3.    Primer zur Mutagenese von <i>YAH1</i> , <i>CIA1</i> , <i>FDX1</i> und <i>FDX2</i> .....	33
2.4.    Plasmide .....	34
2.4.1.    Ausgangsplasmide .....	34
2.4.2.    Plasmide zur Expression von <i>YAH1</i> , <i>ISU1</i> , <i>FDX1</i> und <i>FDX2</i> in <i>E. coli</i> .....	34
2.4.3.    Vektoren zur Expression von <i>FDX2</i> in <i>S. cerevisiae</i> .....	35

2.4.4.	Vektoren zur Expression von <i>YAH1</i> in <i>S. cerevisiae</i> .....	36
2.4.5.	Vektoren zur Expression von <i>FDX1</i> in <i>S. cerevisiae</i> .....	36
2.4.6.	Vektoren zur Expression von <i>CIA1</i> in <i>S. cerevisiae</i> .....	37
2.5.	Bakterien- und Hefestämme .....	39
2.5.1.	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ( <i>Invitrogen</i> ).....	39
2.5.2.	<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Gold ( <i>Invitrogen</i> ).....	39
2.5.3.	<i>E. coli</i> C41 (DE3).....	39
2.5.4.	<i>S. cerevisiae</i> W303-1A.....	39
2.5.5.	<i>S. cerevisiae</i> Gal-YAH1.....	39
2.5.6.	<i>S. cerevisiae</i> Gal-CIA1.....	40
2.5.7.	<i>S. cerevisiae</i> YAH1TAP.....	40
2.5.8.	<i>S. cerevisiae</i> IBA57TAP .....	40
2.6.	Medien .....	40
2.6.1.	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	40
2.6.2.	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	40
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>43</b>
3.1.	Molekularbiologische Methoden.....	43
3.1.1.	Präparation genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	43
3.1.2.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	43
3.1.3.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	44
3.1.4.	Reinigung von DNA aus PCR-Reaktionen, Agarosegelen oder wässrigen Lösungen.....	44
3.1.5.	Agarosegelelektrophorese .....	44
3.1.6.	Hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	45
3.1.7.	Ligation von DNA-Fragmenten .....	45
3.1.8.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	45
3.1.9.	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	46
3.1.10.	Ortsspezifische Mutagenese von Plasmiden .....	46
3.1.10.1.	Quik-Change-Methode .....	46
3.1.10.2.	Mutagenese-PCR Reaktion .....	47
3.1.11.	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	48
3.1.12.	Herstellung von Lagerungskulturen von <i>S. cerevisiae</i> .....	48
3.2.	Zellbiologische und biochemische Methoden .....	49
3.2.1.	Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> .....	49
3.2.2.	Präparation von Hefegesamtzellextrakt mittels alkalischer Lyse .....	49
3.2.3.	Präparation von Hefegesamtzellextrakt mittels Glasperlen.....	50
3.2.4.	Messung der Enzymaktivitäten von Enzymen aus <i>S. cerevisiae</i> .....	50
3.2.4.1.	Enzymaktivitäten zytosolischer Enzyme .....	51
3.2.4.2.	Enzymaktivitäten mitochondrialer Enzyme .....	52



---

3.2.5.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
3.2.6.	Färben von Proteinen mit Coomassie Brilliant-Blue .....	56
3.2.7.	Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen .....	56
3.2.8.	Western-Blot und Ponceau-Färbung.....	57
3.2.9.	Immundetektion von Proteinen .....	57
3.2.10.	Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung) .....	58
3.2.11.	Kopplung von Antikörpern an Protein A Sepharose.....	58
3.2.12.	(Ko)Immunpräzipitation (KoIP) .....	59
3.2.13.	Messung der <i>de novo</i> Eisen-Schwefel-Cluster Synthese in <i>S. cerevisiae</i> .....	59
3.2.14.	Messung des Elektronentransfers von Ferredoxinoxidoreduktase auf Ferredoxin .....	60
3.2.15.	Messung des Elektronentransfers von Ferredoxin auf CYP11B1 .....	60
3.2.16.	Quervernetzung mittels EDC .....	61
3.2.17.	Glyceroldichtegradientenzentrifugation .....	61
3.2.18.	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR-Spektroskopie).....	62
3.2.19.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	63
3.2.19.1.	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	63
3.2.19.2.	Colorimetrisch nach Bradford .....	64
3.3.	Proteinreinigung .....	64
3.3.1.	Heterologe Genexpression .....	64
3.3.2.	Präparativer Zellaufschluss von <i>E. coli</i> .....	64
3.3.3.	Chromatographische Verfahren .....	65
3.3.3.1.	Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA .....	65
3.3.3.2.	Ionentauscherchromatographie.....	65
3.3.3.3.	Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC).....	66
3.3.3.4.	Größenausschlusschromatographie (SEC) .....	66
3.3.4.	Umpuffern von Proteinen .....	66
3.3.5.	Konzentrierung von Proteinen.....	67
3.4.	Proteinkristallisation und Proteinstrukturbestimmung .....	67
3.4.1.	Probenvorbereitung.....	68
3.4.2.	Proteinkristallisation .....	69
3.4.3.	Crypuffer-Test.....	69
3.4.4.	Datensammlung und Datenreduktion.....	69
3.4.5.	Strukturlösung, Modellbau und Strukturverfeinerung.....	70
3.4.6.	Graphische Darstellung .....	70
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>71</b>
4.1.	Struktur von humanem Fdx2 .....	71
4.1.1.	Reinigung und Kristallisation von Fdx2.....	71
4.1.2.	Datenreduktion, Strukturlösung und -verfeinerung .....	72

---

4.1.3.	Strukturbeschreibung - Fdx2 ist ein typisches MB-Typ Ferredoxin.....	74
4.2.	Analyse der Spezifitäten der Ferredoxine Fdx1, Fdx2 und Yah1 .....	76
4.2.1.	Fdx1, Fdx2 und Yah1 zeigen drei Wachstumsphänotypen bei der Komplementation von Gal-YAH1 Zellen .....	76
4.2.2.	Bioinformatische und strukturelle Analyse der drei MB-Typ Ferredoxin- Untergruppen in Eukaryoten.....	77
4.2.3.	Der Oligomerisierungszustand von Fdx1, Fdx2 und Yah1 kann die funktionellen Unterschiede nicht erklären.....	82
4.2.4.	Analyse der für die Spezifität wichtigen Regionen von humanem Fdx2 .....	89
4.2.5.	Einige der für die Fdx2 Funktion wichtigen Sequenzbereiche sind bedeutend für die Funktion von Yah1 unter respiratorischen Bedingungen.....	94
4.3.	Identifizierung der für die Substratspezifität wichtigen Bereiche in Fdx1 und Fdx2.....	96
4.3.1.	Erzeugung von Fdx2-spezifischer Funktion durch Mutation des Fdx1.....	96
4.3.2.	Erzeugung von Cytochrom P450 Elektronentransferaktivität in Fdx2 .....	100
4.4.	Bestimmung des Interaktionspartners von Yah1 in der ISC-Maschinerie.....	104
4.4.1.	Yah1 interagiert mit Isu1 <i>in vivo</i> .....	104
4.4.2.	Nachweis der Yah1-Isu1 Interaktion <i>in vitro</i> .....	107
4.5.	Kartierung der Interaktionsstelle für Nar1 auf dem WD-Repeat Protein Cia1.....	111
4.5.1.	Konservierte Oberflächenreste kommen gehäuft auf der Oberseite von Cia1 vor .....	111
4.5.2.	Arginin 127 ist wichtig für die Funktion von Cia1 in der CIA-Maschinerie .....	113
4.5.3.	Für die Nar1 Bindung wichtige Reste liegen auf der Oberseite und seitlich an Propellerblatt 3 des Cia1.....	116
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>122</b>
5.1.	Funktionen und Spezifitäten eukaryotischer MB-Typ Ferredoxine .....	122
5.1.1.	Einteilung von eukaryotischen MB-Typ Ferredoxinen in drei Untergruppen.....	122
5.1.2.	Fdx1 und Fdx2 sind trotz struktureller Ähnlichkeit hochspezifische Elektronenüberträger und unterscheiden sich funktionell von Yah1 .....	124
5.1.3.	Der mögliche Einfluss des Dipolmoments der Ferredoxine auf ihre Funktionsspezifitäten.....	129
5.1.4.	Vergleich von eukaryotischen mit bakteriellen Ferredoxinen vom MB-Typ mit Elektronentransferaktivität auf CYP.....	133
5.2.	Mitochondriale Fe/S-Cluster Assemblierung auf dem Gerüstprotein Isu1.....	134
5.2.1.	Das mitochondriale Ferredoxin Yah1 bindet an Isu1 .....	134
5.2.2.	Fe/S-Cluster-Biosynthese auf U-Typ Gerüstproteinen.....	136
5.3.	Die Rolle des WD-Repeat Proteins Cia1 als zentrale Interaktionsplattform der CIA-Maschinerie.....	139

---

5.3.1.	Die Interaktionen des $\beta$ -Propeller Proteins Cia1 mit weiteren CIA-Komponenten.....	139
5.3.2.	Die klammerartige Bindung von Nar1 an Cia1 ist essentiell für die Fe/S-Proteinbiogenese.....	139
5.4.	Ausblick.....	141
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>144</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>165</b>
7.1.	Mutagenese-Primer .....	165
7.1.1.	für Ferredoxin-Mutagenese.....	165
7.1.2.	für Cia1-Mutagenese.....	166
<b>8</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>167</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>168</b>



## Zusammenfassung

Eisen-Schwefel-Cluster (Fe/S-Cluster) sind essentielle und vielseitige Kofaktoren zahlreicher Proteine und kommen in allen bekannten Lebensformen vor. Trotz ihrer vergleichsweise einfachen Struktur erfordert ihre Biosynthese und der Einbau in Apoproteine komplexe Synthesemaschinerien, die evolutionär konserviert sind. Im eukaryotischen Modellorganismus *S. cerevisiae* hängt die Biogenese mitochondrialer Fe/S-Proteine von der mitochondrialen ISC-Maschinerie ab, während die Synthese zytosolischer und nukleärer Fe/S-Proteine zusätzlich noch die mitochondriale ISC-Export- und die zytosolische CIA-Maschinerie erfordert. Sowohl die Biosynthese mitochondrialer Fe/S-Proteine als auch die von zytosolischen oder nukleären Fe/S-Proteinen kann in zwei biochemische Hauptreaktionen eingeteilt werden. Nach der *de novo* Assemblierung eines Fe/S-Clusters auf einem Gerüstprotein wird der so vorgefertigte Cluster auf das eigentliche Zielprotein übertragen und dort inseriert. Während nahezu alle Komponenten der Biogenesemaschinerien mittlerweile bekannt sind, ist der molekulare Mechanismus der *in vivo* Fe/S-Cluster Biosynthese noch in vielen Punkten ungeklärt.

Für die *de novo* Assemblierung von Fe/S-Clustern auf dem Gerüstprotein Isu1 der mitochondrialen ISC-Maschinerie ist die Elektronenübertragung durch ein Ferredoxin essentiell. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich eukaryotische mitochondriale Ferredoxine funktionell und strukturell in drei Untergruppen aufteilen lassen. Während die Mitglieder der ersten Untergruppe wie humanes Ferredoxin Fdx2 spezifisch an der Fe/S-Cluster Biogenese und der Häm A Biosynthese beteiligt sind, liefern die Ferredoxine der zweiten Untergruppe wie das Fdx2-verwandte humane Ferredoxin Fdx1 Elektronen für die Steroidbiogenese durch Cytochrom P450 Enzyme (CYP). Die dritte Untergruppe bilden die noch vielseitigeren Ferredoxine aus Pilzen wie Yah1 aus *S. cerevisiae*, das neben den Funktionen des Fdx2 auch noch eine essentielle Rolle in der Biosynthese von Koenzym Q<sub>6</sub> spielt. In dieser Arbeit wurde die Struktur des humanen Ferredoxins Fdx2 mit einer Auflösung von 1,7 Å durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Im Vergleich zur schon bekannten Struktur von Fdx1 besitzt Fdx2 eine nahezu identische Faltung. Strukturelle Unterschiede wurden nur in der  $\alpha$ -Helix C sowie im Bereich nach  $\alpha$ -Helix C gefunden. Dies warf die Frage nach der strukturellen Basis für die hohe Substratspezifität der beiden humanen Ferredoxine auf. Durch genetische und biochemische Experimente konnte gezeigt werden, dass der hoch konservierte C-Terminus von Fdx2 essentiell für die *in vivo* Funktion des Proteins in der Biogenese von Fe/S-Clustern ist. Ein in der Fe/S-Cluster Biogenese funktionelles Fdx1 konnte durch die Übertragung der 27 C-terminalen Aminosäuren des Fdx2 an den Fdx1 C-Terminus erzeugt werden. Weitere Sequenzaustausche im Bereich der  $\alpha$ -Helix C sowie in der Fe/S-Cluster-bedeckenden Schlaufe erhöhten die Funktionsfähigkeit des Fdx1 in der Fe/S-Proteinbiogenese, was die Rolle dieser Reste bei der Erzeugung der Substratspezifität nachweist. Umgekehrt gelang es, in Fdx2 eine Elektronenübertragungsfunktion auf CYP einzuführen. Die hierfür kritische Mutation wurde als R73E identifiziert. Die Umfunktionalisierung des Fdx2 war

überraschenderweise nicht abhängig von der Sequenz am C-Terminus. Da die Funktionsübertragung durch die R73E Mutation nur partiell erfolgte, scheint diese Schlüsselaminosäure nicht allein verantwortlich für die Spezifität von Fdx1 für CYP zu sein. Der positiv geladene Rest R73 im Fdx2 könnte daher eher verhindern, dass dieses Ferredoxin Elektronen auf CYP übertragen kann. Die theoretische Analyse des Dipolmomentes der Ferredoxine Fdx1 und Fdx2 ergab, dass die Dipolmomentvektoren der beiden Ferredoxine nahezu senkrecht zueinander stehen. Da die Interaktion der hochgeladenen Ferredoxine mit ihren Proteinpartnern auf Ladungswechselwirkungen beruht, deutet dieser Unterschied auf einen elektrostatischen Steuerungseffekt bei der Annäherung der Ferredoxine an den entsprechenden Elektronenakzeptor als mögliche Unterstützung der Funktionsspezifität hin. Ein solcher Steuerungseffekt könnte ein allgemeines Prinzip bei der Annäherung von Proteinen in transienten Elektronentransferkomplexen darstellen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit gelang mit der Identifizierung des Gerüstproteins Isu1 als *in vivo* Interaktionspartner von Yah1 der erste experimentelle Nachweis für die direkte Wechselwirkung der Elektronentransferkette Arh1-Yah1 mit weiteren Komponenten der mitochondrialen ISC-Maschinerie. Dieser Nachweis schließt eine Lücke im Geflecht der Proteininteraktionen der mitochondrialen ISC-Maschinerie und gelang trotz der intrinsischen Kurzlebigkeit von Protein-Protein-Wechselwirkungen während Elektronentransferprozessen. Ursächlich hierfür war, dass das verwendete Yah1 Protein aufgrund einer C-terminalen Modifikation seine Dynamik und damit die Fähigkeit zur Interaktion mit den Elektronenakzeptoren der Koenzym Q<sub>6</sub> oder Häm A Biosynthese partiell eingebüßt hatte. Die Yah1-Isu1 Interaktion deutet an, dass Yah1 Elektronen zur *in vivo* Herstellung der Fe/S-Cluster-assoziierten Sulfidionen aus einem Isu1-gebundenem Cysteinpersulfid liefert. Diese Hypothese muss in weiteren *in vitro* Experimenten getestet werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die stabile Interaktion des WD-Repeat Proteins Cia1 mit drei weiteren Komponenten der eukaryotischen CIA-Maschinerie *in vivo* gezeigt. Durch Mutation des Restes R127 sowie weiterer auf der Proteinoberseite sowie seitlich in Propellerblatt 3 gelegener Aminosäurereste wurde ein völliger Funktionsverlust des Cia1 Proteins erreicht. Dies führte zur Schwächung beziehungsweise zum Verlust der Interaktion von Cia1 mit Nar1, während Cia2 und Met18 weiterhin stabil gebunden blieben. Aus diesen umfangreichen Mutationsanalysen konnte die Bindungsstelle des Nar1 auf Cia1 identifiziert werden. Nar1 bindet demnach klammerartig an Cia1, was als Kontaktbasis für die Interaktion mit anderen CIA-Komponenten genutzt werden könnte.

Zusammenfassend lieferte diese Arbeit einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der strukturellen Basis der hohen Substratspezifitäten von zwei ähnlichen Elektronentransferproteinen, es gelang der erste experimentelle Nachweis einer Wechselwirkung des mitochondrialen Ferredoxins Yah1 mit dem Isu1 Gerüstprotein, und es wurde die Interaktionsstelle des Nar1 auf Cia1 kartiert. Die Untersuchungen verbessern damit das Verständnis der Funktion und Wechselwirkung von ISC- und CIA-Komponenten bei der Biogenese von Fe/S-Proteinen in Eukaryoten.

## Summary

Iron-sulfur clusters (Fe/S-clusters) are essential and versatile cofactors of numerous proteins and are present in virtually all living organism. Despite their relatively simple structure, their biosynthesis and assembly into apoproteins requires complex multi-protein biosynthesis-machineries which are conserved in eukaryotes. In the eukaryotic model organism *S. cerevisiae* the biogenesis of mitochondrial Fe/S-proteins depends on the mitochondrial ISC assembly system, whereas the synthesis of cytosolic and nuclear Fe/S-proteins additionally requires the mitochondrial ISC export machinery and the cytosolic CIA machinery. The biosynthesis of both mitochondrial and cytosolic-nuclear Fe/S-proteins occurs in two major steps. First, an Fe/S-cluster is synthesized *de novo* on a scaffold protein. Second, the preassembled Fe/S-cluster is transferred and inserted in the target apoprotein. Whereas nearly all components of the biosynthesis machineries have been identified, the molecular mechanisms of Fe/S-cluster biosynthesis within the living cell are widely unknown.

The *de novo* synthesis of Fe/S-clusters on the scaffold protein Isu1 of the mitochondrial ISC-assembly machinery requires an electron transfer by the NAD(P)H - ferredoxin reductase - ferredoxin chain. In the first part of this study it was shown that mitochondrial ferredoxins functionally and structurally are comprised of three distinct subclasses. Whereas members of the first subclass like human ferredoxin Fdx2 are specifically required for Fe/S-cluster biogenesis and heme A biosynthesis, ferredoxins of the second subclass such as the Fdx2-related human Fdx1 deliver electrons for steroid biosynthesis by cytochrome P450 enzymes (CYP). The third subclass is formed by the even more versatile ferredoxins from fungi including Yah1 from *S. cerevisiae*, which in addition to the functions of Fdx2, also plays an important role in the biosynthesis of coenzyme Q<sub>6</sub>. In this work, the three-dimensional structure of human ferredoxin Fdx2 was determined at 1,7 Å resolution using X-ray structure analysis. The folding of Fdx2 is virtually identical to that of Fdx1, despite the distinct substrate specificities of the two proteins. Structural differences were only observed in  $\alpha$ -helix C and the region right after  $\alpha$ -helix C. Genetic and biochemical experiments showed that the highly conserved C-terminus of Fdx2 is essential for its specific *in vivo* function in the biogenesis of Fe/S-clusters. An Fdx1 protein, which functions in Fe/S-cluster biogenesis, was successfully generated after exchange of the last 27 amino acids against the respective sequence from Fdx2. Further amino acid exchanges in the region of  $\alpha$ -helix C and the loop covering the Fe/S-cluster increased the functionality showing the importance of these regions for substrate specificity. Vice versa, the generation of electron transfer capacity from Fdx2 to CYP was successful after introduction of the key mutation R73E. In this case, the gain of function was independent of the C-terminus. The efficiency of specificity transfer was not complete; hence the key residue 73 is not solely responsible for the functional specificity. In fact, other global factors within the structure of the protein contribute to the

specificity. It appears that the positively charged residue R73 in Fdx2 may inhibit transfer of electrons to CYP. Theoretical analysis of the dipole moment revealed an almost perpendicular orientation within the ferredoxins Fdx1 and Fdx2, despite their striking structural similarity. As the interaction of the highly charged ferredoxins with protein partners is based on charge-charge interactions, the difference in dipole moment orientation suggests an electrostatically driven steering mechanism during the encounter of the ferredoxins with their respective electron acceptors as a possible reason for their high degree of functional specificity. The steering effect might be a general mechanistic principle during the approach of proteins in electron transfer reactions.

In the second part of this study the scaffold protein Isu1 was identified as an *in vivo* interaction partner of Yah1. This finding provides the first experimental evidence for the direct interaction of the electron transfer chain Arh1-Yah1 with another component of the mitochondrial ISC assembly machinery. In addition, this observation closes an important gap in the network of protein-protein interactions of the mitochondrial ISC-machinery and was detected despite the intrinsic short lifetime of protein interactions during electron transfer reactions. Fittingly, the interaction was only observed with Yah1 protein, which, due to a C-terminal modification, had lost its dynamics and ability to interact with the electron acceptors of heme A or coenzyme Q<sub>6</sub> biosynthesis. The interaction of Yah1 with Isu1 may indicate an *in vivo* involvement of Yah1 in generating the Fe/S cluster sulfide moiety from the Isu1-bound persulfide. This hypothesis can now be tested by *in vitro* experiments.

In a third part of this study the stable and simultaneous interaction of the WD-repeat protein Cia1 with three other components of the CIA machinery, Nar1, Cia1 and Cia2 could be shown *in vivo*. Mutational studies revealed the binding site of Nar1. Exchange of Cia1 residue R127 and further amino acids located on the top or lateral side of propeller blade three led to a complete loss of function, which was accompanied by a decreased or lost interaction between Cia1 and Nar1, whereas Cia2 and Met18 still were stably bound to Cia1. Together, the mutational studies suggest that Nar1 binds to Cia1 in a clamp-like fashion.

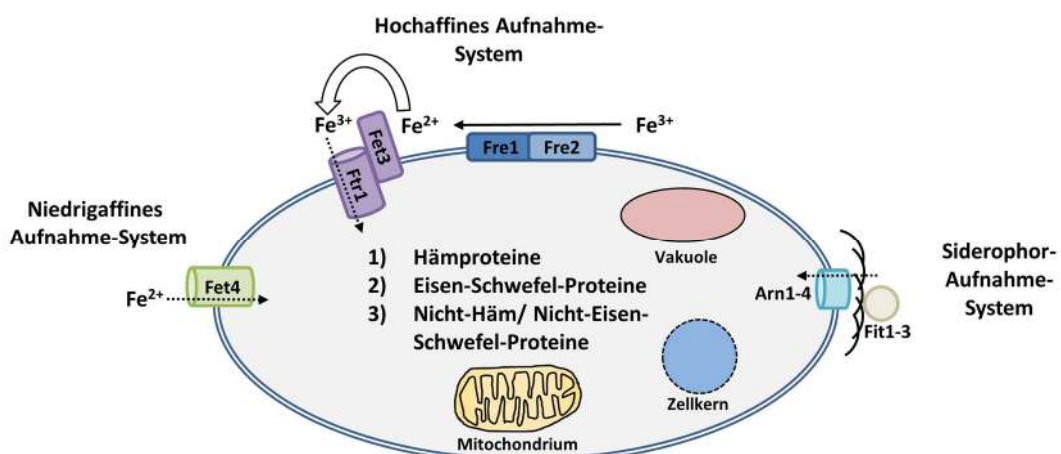
In summary this study i) contributed to the understanding of the structural basis for the substrate specificities of two highly related human electron transfer ferredoxins, ii) showed the direct interaction of the mitochondrial ferredoxin Yah1 with the ISC scaffold protein Isu1, and iii) mapped the interaction site of Nar1 on the WD repeat protein Cia1 of the CIA machinery. These analyses provide an improved understanding of the function and the cooperation of components of the ISC machinery and the CIA machinery in the biogenesis of Fe/S proteins in eukaryotes.



# 1 Einleitung

## 1.1. Biologische Bedeutung von Eisen

Obwohl Eisen das vierthäufigste Element der Erdkruste ist, enthält der menschliche Körper eines Erwachsenen nur etwa 2 bis 4 g Eisen (Nemeth & Ganz, 2006). Dennoch ist Eisen sowohl für Menschen als auch für fast alle anderen lebenden Organismen ein essentieller Nährstoff, da es für eine ganze Reihe wichtiger biochemischer Prozesse benötigt wird, unter anderem den DNA-Stoffwechsel und die zelluläre Respiration. Der essentielle Charakter von Eisen beruht einerseits auf der Eigenschaft, in biologischem Milieu verschiedene Redoxzustände annehmen und zwischen ihnen umschalten zu können sowie andererseits auf der Fähigkeit, an Säure-Base-Reaktionen teilnehmen zu können. Gleichzeitig kann die Redoxaktivität von Eisen in Lösung auch negative Folgen haben, da freies Eisen (II) eine toxische Wirkung hervorrufen kann, die durch die Bildung freier Radikale verursacht wird („Fenton Chemie“) (Chamnongpol et al, 2002). Es ist somit nicht überraschend, dass höhere Eukaryoten wie der Mensch die Eisenaufnahme, -verteilung und -wiederverwertung sowohl auf zellulärer Ebene als auch auf systemischer Ebene streng regulieren (Hentze et al, 2010; Rouault & Tong, 2005). Darüber hinaus gibt es mit der Abwehr von Krankheitserregern einen weiteren Grund, warum in Säugern die extrazelluläre Eisenkonzentration extrem gering ist. Als antimikrobielle Abwehrstrategie besitzen Säuger ein ausgeklügeltes System, um die freie Eisenkonzentration so gering wie möglich zu halten, da dadurch Eisen in vielen Fällen zum Wachstum limitierenden Faktor wird (Sutak et al, 2008). Eisen ist aber nicht nur für Humanpathogene schlecht verfügbar, sondern für viele andere Mikroorganismen auch. Unter anaeroben Bedingungen ist die Löslichkeit von Eisen (II) zwar gut, nach Oxidation zu Eisen (III), z.B. durch Luftsauerstoff unter aeroben Bedingungen, hingegen ist die Bioverfügbarkeit von Eisen recht schlecht. Dies liegt vor allem daran, dass bei physiologischem pH-Wert oxidiertes Eisen (III) zu unlöslichen Eisen(III)-Hydroxid-Komplexen reagiert und dadurch auch für Mikroorganismen wie Hefen wachstumslimitierend wirkt (Kosman, 2003). Um Eisen auch unter aeroben Bedingungen verfügbar zu machen, haben Mikroorganismen eine ganze Reihe von Eisenaufnahmemechanismen entwickelt (**Abb. 1.1**).



**Abbildung 1.1 (Seite 5): Zelluläre Eisenaufnahmewege von *S. cerevisiae* ohne intrazelluläre Verteil- und Wiederverwertungsmechanismen.** Die biologische Aufnahme und intrazelluläre Verwendung von Eisen in drei verschiedenen Klassen von Proteinen ist unabhängig von der subzellulären Verteilung dargestellt. Details siehe Text.

Die Knospungshefe *S. cerevisiae* verfügt neben einem hochaffinen über ein niederaffines System zur Aufnahme von freiem Eisen (Kosman, 2003; Rutherford & Bird, 2004). Ersteres weist einen  $K_M$ -Wert von 200 nM auf, basiert auf der Oxidation von extrazellulärem  $Fe^{2+}$  durch die Ferroxidase Fet3 und den Transport durch die daran gekoppelte Permease Ftr1. Reduziertes  $Fe^{2+}$  wird durch die Membranproteine Fre1 und Fre2, zwei Metalloreduktasen, bereitgestellt. Das niederaffine Eisenaufnahmesystem besteht aus dem Transporter Fet4, der direkt  $Fe^{2+}$  in die Zelle transloziert. Da der  $K_M$  Wert für dieses System allerdings mit 35  $\mu$ M relativ hoch ist, spielt er nur eine untergeordnete Rolle (Rutherford & Bird, 2004). Neben dem System zur Aufnahme von freiem Eisen verfügt *S. cerevisiae* auch über die Möglichkeit Siderophor-gebundenes Eisen aufzunehmen und zu verwerten, wozu die Hefezelle verschiedene Transporter (Arn1-4) und Zellwandproteine (Fit1-3) exprimiert. Da *S. cerevisiae* keine eigene Synthesemaschinerie für Siderophore besitzt, können nur Xenosiderophore, produziert von anderen Mikroorganismen, aufgenommen werden (Sutak et al, 2008). Eine erst kürzlich vorgestellte Arbeit deutet allerdings darauf hin, dass sogar Säugerzellen einen bis dato nicht beschriebenen Weg zur Synthese von Siderophoren besitzen könnten (Devireddy et al, 2010). Ob dieser Syntheseweg auch in *S. cerevisiae* existiert wurde bisher noch nicht endgültig geklärt.

In der Zelle wird Eisen für verschiedene Proteine benötigt, die anhand der Koordinationschemie des Eisens in drei Gruppen unterteilt werden können: 1) Häm-Proteine enthalten in einen Porphyrinring eingebautes Eisen; 2) Eisen-Schwefel-Proteine, die Eisen zusammen mit verbrückendem Sulfid in anorganischen Clustern enthalten; 3) nicht-Häm und nicht-Eisen-Schwefel-Proteine, die alle anderen Arten von Eisen-haltigen Proteinen umfassen, zum Beispiel mononukleäres Eisen oder Eisenspeicherproteine wie Ferritin.

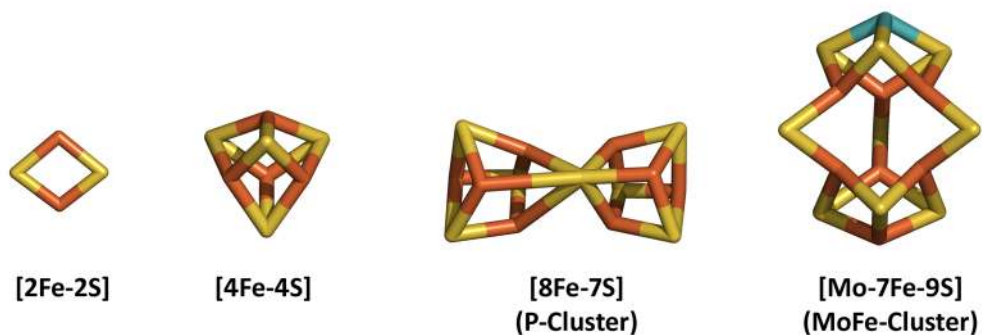
## **1.2. Eisen-Schwefel Proteine**

### **1.2.1. Klassifizierung und Vorkommen**

In allen bekannten Lebensformen findet man Eisen-Schwefel Proteine und die als Kofaktor fungierenden Eisen-Schwefel-Cluster (Fe/S-Cluster). Letztere gehören zu den wohl ersten Katalysatoren, die in der Biomolekülevolution aufgetreten sind. Eisen-Schwefel Proteine sind beteiligt an vielen grundlegenden biologischen Prozessen wie mitochondrialer Respiration, Ribosomen-recycling, Kofaktorbiosynthese (u.a. Liponsäure, Biotin), Aminosäurebiosynthese (u.a. Met, Leu, Ile, Val, Glu, Lys), Regulation der Genexpression, DNA-Reparatur sowie DNA-Synthese und Regulation der Enzymaktivität (Beinert et al, 1997; Lill & Muhlenhoff, 2008; Xu & Moller, 2011). Fe/S-Cluster,

bestehend aus Eisen und verbrückendem Sulfid, treten in verschiedenen Formen auf. Am häufigsten kommen rhombische [2Fe-2S] Cluster und kubische [4Fe-4S] Cluster vor. Darüber hinaus sind andere Stöchiometrien wie [3Fe-4S] in bakteriellem Ferredoxin I oder komplexere Cluster wie [8Fe-7S] im P-Cluster von FeMo-Nitrogenase bekannt (Chan et al, 1993; Schindelin et al, 1997). Außerdem gibt es gemischte Cluster, die neben Eisen ein anderes Metall enthalten, zum Beispiel Molybdän-enthaltende MoFe-Cluster, die ebenfalls in Nitrogenasen vorkommen (**Abb 1.2**). Ein weiterer besonderer Fe/S-Cluster existiert in der Sulfid-Reduktase von *E. coli*, in der ein [4Fe-4S] Cluster über ein koordinierenden Cysteinrest mit Sirohäm verbunden ist.

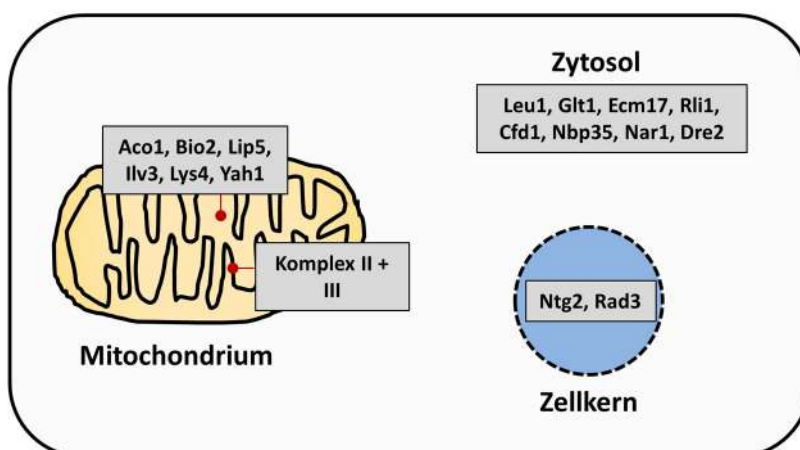
In Fe/S-Clustern können Elektronen sowohl über Eisen als auch über Schwefel delokalisiert werden, was ihre primäre biologische Funktion in der Übertragung von Elektronen erklärt (Johnson et al, 2005). In der Regel wird nur ein Elektron übertragen, lediglich der P-Cluster aus Nitrogenasen besitzt die Fähigkeit, zwei Elektronen zu übertragen. Neben diesen Oxidations-Reduktions-Reaktionen können Fe/S-Cluster aber auch als Schwefeldonatoren oder für strukturelle Zwecke dienen. In Proteinen sind Fe/S-Cluster an das Proteingerüst gebunden, in der Regel über die Koordinierung der Sulfhydrylgruppe von Cysteinresten. Es können aber auch die Seitenketten von Histidin, Serin, Aspartat oder Arginin die Koordination übernehmen. Es ist außerdem möglich, dass ein oder mehrere Koordinationsstellen von Protein-gebundenen Liganden wie  $\text{CN}^-$  oder CO besetzt werden. Insgesamt ergibt sich in der Regel eine tetraedrische Koordination.



**Abbildung 1.2: Klassen von Fe/S-Clustern.** Darstellung des rhombischen [2Fe-2S] Cluster, des kubischen [4Fe-4S] Cluster sowie der spezielleren P-Cluster und MoFe-Cluster aus Nitrogenase (PDB 1N2C).

Fe/S-Cluster kommen in einer Vielzahl von biologisch äußerst wichtigen Proteinen vor und sind in verschiedenen Zellkompartimenten zu finden. Der einfachste Fe/S-Cluster, der rhombische [2Fe-2S] Cluster, wird beispielsweise in mitochondrialen Proteinen vom [2Fe-2S] Ferredoxin-Typ (zum Beispiel Yah1 in Hefe), der Biotin-Synthase oder der Ferrochelatase gefunden. Das Rieske-Protein, eine Untereinheit des Komplex III der Atmungskette, enthält einen [2Fe-2S] Cluster, der von zwei Cystein- und zwei Histidinresten koordiniert wird. Dadurch weist dieser Cluster ein höheres Redoxpotential (290 mV statt -290 bis -400 mV) als „gewöhnliche“ [2Fe-2S] Cluster auf. [4Fe-4S] Cluster kommen in vielen Proteinen vor, wie zum Beispiel in bakteriellen Ferredoxinen oder auch in der Aconitase, einem Enzym des Citratzyklus. In der bakteriellen und der mitochondrialen Atmungskette sind

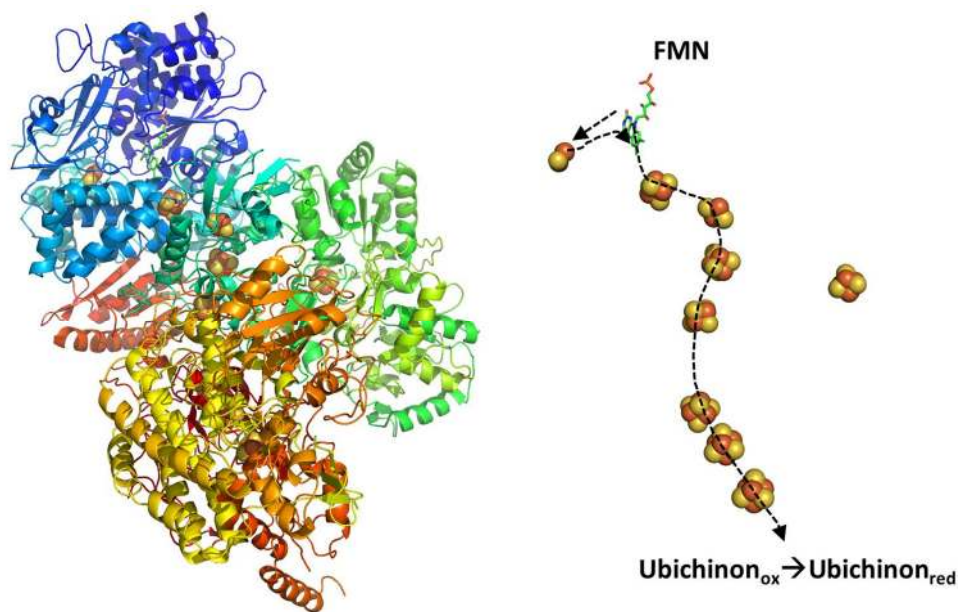
kubische Fe/S-Cluster besonders häufig und es werden allein in Komplex I der Eukaryoten (nicht vorhanden in manchen Hefen wie zum Beispiel *S. cerevisiae*) acht und in Prokaryoten sogar neun solcher Cluster gefunden (Hincliffe & Sazanov, 2005). Im Komplex II sind je ein [2Fe-2S], [3Fe-4S] und [4Fe-4S] Cluster vorhanden (Sun et al, 2005). Weiterhin sind in Hefe zytosolische Fe/S-Proteine bekannt, die an der Aminosäurebiosynthese von Leucin, Glutamat bzw. Methionin beteiligt sind. Hierzu zählen die Enzyme Isopropylmalat-Isomerase (Leu1), Glutamatsynthase (Glt1) oder eine Untereinheit der Sulfitreduktase (Ecm17). Zusätzlich sind in *S. cerevisiae* noch weitere Fe/S-Proteine mit zytosolischer Lokalisation bekannt, die eine Rolle bei der extra-mitochondrialen Fe/S-Cluster-Assemblierung spielen und in Kapitel 1.2 diskutiert werden (Cfd1, Nbp35, Nar1, Dre2). Die [4Fe-4S] Enzyme Ilv3 und Lys4 werden in der mitochondrialen Matrix gefunden, wo sie an der Biosynthese von verzweigt-kettigen Aminosäuren beteiligt sind (Lill et al, 2006). Weitere in der mitochondrialen Matrix lokalisierte Fe/S-Enzyme sind Lip5 und Bio2, die als Radikal-SAM (S-Adenosyl-L-Methionin) Enzyme zwei Fe/S-Cluster enthalten und an der Biosynthese der Kofaktoren Liponsäure und Biotin beteiligt sind (Lill, 2009; Lotierzo et al, 2005). Das essentielle ABC Protein Rli1 (humanes ABCE1) enthält zwei [4Fe-4S] Cluster und ist wichtig für das Recycling von Ribosomen nach der Termination der Translation (Barthelme et al, 2011; Pisarev et al, 2010); lokalisiert ist es hauptsächlich im Zytosol (Kispal et al, 2005). Die N-Glykosylase Ntg2 sowie die ATP-abhängigen DNA-Helikasen Rad3 (in Mensch XPD und FancJ) sind Fe/S-Proteine, die im Zellkern lokalisiert sind und für DNA-Reparaturprozesse wichtig sind (Lill, 2009). Diese Aufzählung ist nicht vollständig, zusammenfassend kann aber festgehalten werden, dass in nicht-photosynthetischen Eukaryoten Fe/S-Proteine in drei Kompartimenten gefunden werden: Mitochondrium, Zytosol und Zellkern (**Abb. 1.3**). In Pflanzen und anderen photosynthetischen Organismen gibt es Fe/S-Proteine zusätzlich noch in Chloroplasten. Es bleibt außerdem anzumerken, dass Fe/S-Cluster-koordinierende Faltungsmotive nur schwer durch ihre Primärstruktur vorausgesagt werden können. Aus diesem Grund werden mit großer Wahrscheinlichkeit in Zukunft weitere Proteine identifiziert werden können, die Fe/S-Cluster als Kofaktoren tragen (Lill et al, 2006; Lill & Muhlenhoff, 2008).



**Abbildung 1.3:** Subzelluläre Lokalisierung von Fe/S-Proteinen in *S. cerevisiae* als eukaryotischem Modellorganismus. Zur Funktion der einzelnen Proteine siehe Text.

### 1.2.2. Eigenschaften und Funktionen

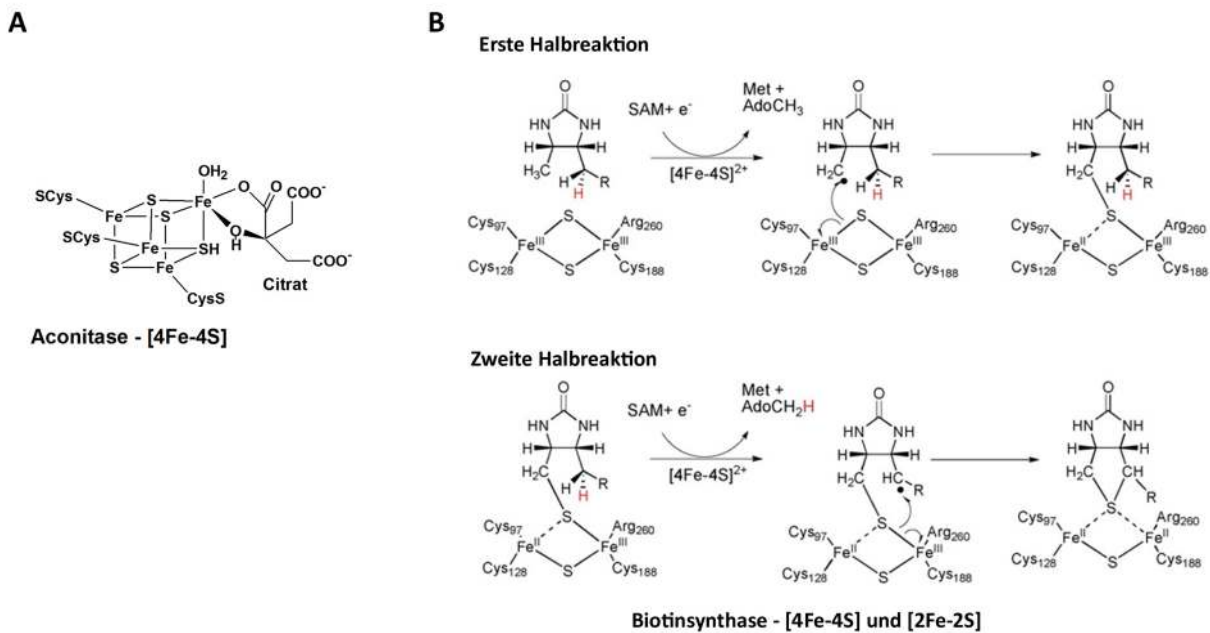
Die häufigste und bekannteste Funktion von Fe/S-Proteinen ist die Übertragung von Elektronen, die dadurch ermöglicht wird, dass das Eisen des Fe/S-Clusters formal zwischen den beiden Redoxzuständen +2 und +3 wechseln kann. Das Redoxpotential kann dabei abhängig von der Protein-Umgebung zwischen den Extremwerten -700 mV und + 400 mV variieren (Meyer, 2008), weshalb Fe/S-Cluster sowohl als Elektronendonatoren als auch als Elektronenakzeptoren fungieren können. Beispiele für eine solche Rolle in Elektronentransferprozessen sind Ferredoxine (siehe Kapitel 1.4), Hydrogenasen und die Komplexe I bis III der bakteriellen und der mitochondrialen Atmungskette. Am beeindruckendsten ist dabei sicherlich die Anordnung der acht bzw. neun Fe/S-Cluster im hydrophilen Arm von Komplex I, wo die Cluster einen Elektronentransportweg von ca. 140 Å bilden (**Abb. 1.4**). Über sieben Fe/S-Cluster fließen Elektronen direkt von NADH zu Membran-gebundenem Ubichinon. Der auch in Eukaryoten vorkommende achte Fe/S-Cluster dient vermutlich dem Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies und speichert temporär das zweite Elektron der NADH-Oxidation. In einigen Prokaryoten wird ein neunter Fe/S-Cluster gefunden, der aber nicht am Elektronentransfer teilnimmt (Hinchliffe & Sazanov, 2005; Sazanov & Hinchliffe, 2006).



**Abbildung 1.4: Beispiel für die Elektronentransferfunktion von Fe/S-Clustern.** Architektur des hydrophilen Arms von Komplex I aus *T. maritima* (links) und Organisation der Fe/S-Cluster (rechts). Der Abstand vom initialen Zweielektronen-akzeptor FMN (grün, rechts oben) zur Bindestelle von Ubichinon (ganz unten) beträgt etwa 140 Å. Der [4Fe-4S] Cluster ganz rechts dient nicht dem Transfer von Elektronen sondern erfüllt wahrscheinlich strukturelle Aufgaben, die meisten Prokaryoten und alle Eukaryoten haben ihn im Verlauf der Evolution verloren (PDB Code 2FUG).

Eine weitere Funktion von Fe/S-Proteinen ist die Katalyse von enzymatischen Reaktionen mit dem klassischen Beispiel Aconitase. Dieses Enzym katalysiert ebenso wie die verwandten Enzyme Lys4 und Leu1 die Dehydratation und sofortige Addition von Wasser, was zu einer Isomerisierung des

Substrates führt. Im Fall der Aconitase wird so Citrat zu Isocitrat umgewandelt, was die zweite Reaktion des Citratzyklus darstellt. Die katalytische Funktion liegt darin begründet, dass der [4Fe-4S] Cluster dieser Aconitase-artigen Enzyme nur von drei Cysteinen koordiniert wird. Das freie Eisenatom des Fe/S-Cluster wird von Wasser koordiniert, und fungiert im katalytischen Prozess als Lewisäure, was sowohl der Substratbindung als auch der Stabilisierung des Übergangszustandes der enzymatischen Reaktion dient (**Abb. 1.5**). Eine weitere Besonderheit der Aconitase ist die Instabilität des katalytisch aktiven Eisenatoms des Fe/S-Clusters, wodurch das Enzym mit der Freisetzung dieses Eisenatoms in einen inaktiven Zustand mit einem [3Fe-4S] Cluster umgewandelt werden kann. Weitere Beispiele für katalytisch aktive Fe/S-Proteine sind die Radikal S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-Enzyme Biotinsynthese und Liponsäuresynthese. Beide binden zwei Fe/S-Cluster und es wird vermutet, dass einer dieser Cluster im Verlauf der katalytischen Reaktion abgebaut wird, wodurch der Schwefel für den Einbau in die Vorstufen Desthiobiotin und Oktansäure geliefert wird (**Abb. 1.5**) (Booker et al, 2007).

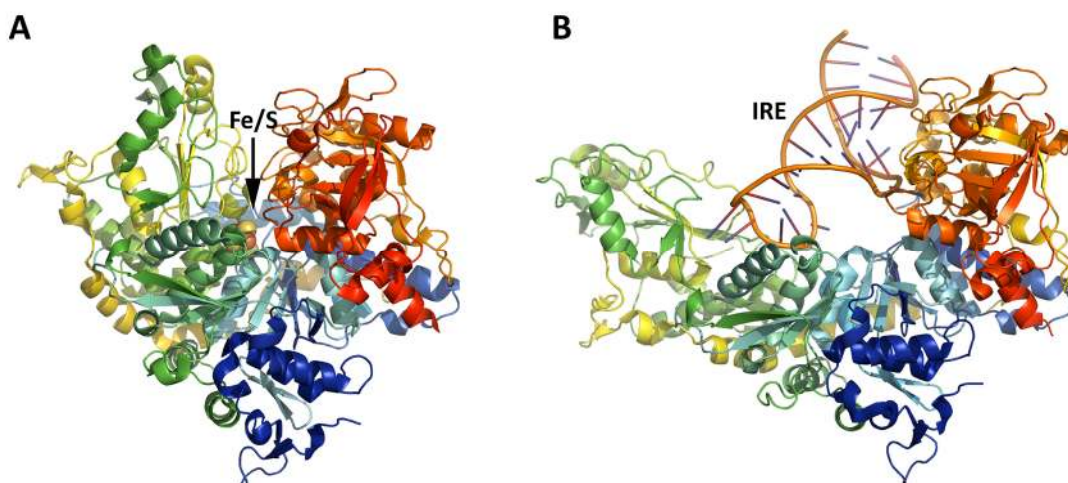


**Abbildung 1.5: Fe/S-Cluster als Katalysatoren. (A)** Citrat gebunden an den [4Fe-4S] Cluster der Aconitase. **(B)** Postulierter Mechanismus der Biotinsynthese (modifiziert nach (Booker et al, 2007)). Der [4Fe-4S] Cluster dient der reduktiven Spaltung von SAM, der [2Fe-2S] Cluster wird abgebaut und der Schwefel zur Synthese von Biotin verwendet.

Es gibt noch viele weitere bakterielle und eukaryotische Fe/S-Cluster-abhängige Enzyme (Meyer, 2008). In vielen Fällen ist dabei die exakte Rolle des Fe/S-Cluster noch nicht genau geklärt, zumindest in einigen Enzymen wird der Fe/S-Cluster aber wohl nur eine strukturelle Rolle spielen und nicht direkt an der chemischen Reaktion teilnehmen. Beispiele hierfür sind die DNA-Helikase Rad3 aus Hefe und die humanen Homologen XPD und FancJ (White, 2009).

Weiterhin können Fe/S-Proteine als Sensoren oder Regulatoren fungieren. Beispiele hierfür sind die bakteriellen Transkriptionsfaktoren IscR, SoxR und FNR, die die Konzentration von Fe/S-Clustern,

Superoxid ( $O_2^-$ )/ Stickstoffmonoxid und Sauerstoff erkennen und in Abhängigkeit davon die Expression bestimmter Gene reprimieren oder aktivieren (Green & Paget, 2004; Spiro, 2006). Das Umschalten zwischen aktiviertem und inaktiviertem Zustand erfolgt bei FNR und IscR durch die Gegenwart oder das Fehlen eines Fe/S-Clusters (Crack et al, 2006; Green & Paget, 2004), in SoxR hingegen bestimmt der Redoxzustand des [2Fe-2S] Clusters die Aktivität des Transkriptionsfaktors (Imlay, 2008). Posttranskriptionelle Regulation durch Fe/S-Proteine wird durch das Säugerprotein IRP1 veranschaulicht (Rouault, 2006). Dieses Protein ist die zytosolische Isoform der Aconitase und zeigt in der Holoform mit gebundenem [4Fe-4S] Cluster Aconitaseaktivität. Ein Fehlen des Fe/S-Clusters unter Eisenmangelbedingungen ist mit einem Verlust der katalytischen Aktivität verknüpft, dafür aber kann das Enzym nun an ganz bestimmte mRNA-Haarnadelstrukturen binden (Klausner et al, 1993). Diese sogenannten IREs (Eisen regulierbare Elemente; *iron responsive elements*) finden sich in nicht-translatierten Bereichen bestimmter mRNAs. Bindet IRP1 an IREs im 5'-nicht-translatierten Bereich einer mRNA, so wird die Translation blockiert, da das Ribosom nicht mehr binden kann. Im Gegensatz dazu führt die Bindung von IRP1 an IREs in 3'-nicht-translatierten mRNA Abschnitten zu einer Stabilisierung der entsprechenden mRNA, da die 3'-Degradation verhindert wird. In Säugern kommen IREs zum Beispiel im 5'-nicht-translatierten Bereich der mRNAs vor, die folgende Proteine kodieren: Ferritin H und Ferritin L, die Eisenspeicherproteine der Zelle;  $\delta$ -Aminolävulinatsynthase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Hämbiosynthese; sowie Ferroportin, der Plasmamembran-Eisenexporter der Zelle (Wang & Pantopoulos, 2011). Umgekehrt gibt es mehrere IREs im 3'-nicht-translatierten Bereich der mRNA des Transferrinrezeptors, der für die Eisenaufnahme in die Zelle sorgt. Auf diese Art und Weise wird gewährleistet, dass Eisen aus den Speicherproteinen mobilisiert, der Eisenexport sowie -verbrauch reduziert und die Eisenaufnahme erhöht wird (Hentze et al, 2010; Wang & Pantopoulos, 2011).



**Abbildung 1.6: Beispiel für die regulatorische Funktion eines Fe/S-Proteins. (A)** Humanes IRP1 in der Holoform mit [4Fe-4S] Cluster: Aconitase (PDB-ID 2B3Y, (Dupuy et al, 2006)). **(B)** IRP1 in der Apoform ohne Fe/S-Cluster gebunden an ein IRE von Ferritin H (PDB-ID 2IPY, (Walden et al, 2006)).

### 1.3. Eisen-Schwefel-Cluster-Biogenese

#### 1.3.1. Entdeckung und Geschichte

Zu Beginn der 1960er Jahre wurden von Beinert und Sands in Präparationen von Rinderherzmitochondrien bis dahin nicht beschriebene EPR-Signale entdeckt (Beinert & Sands, 1960), die einem nicht-Häm Eisenkofaktor zugeordnet wurden (Shethna et al, 1964). Ähnliche EPR-Signale wurden in den darauf folgenden Jahren in verschiedenen biologischen Proben gefunden, unter anderem in Leber- und Pflanzenpräparationen sowie in aeroben und anaeroben Bakterien. In den nächsten Jahren wurde durch Pionierarbeiten von Beinert und Kollegen gezeigt, dass es sich bei diesem Kofaktor um Eisen-Schwefel-Cluster handelt, in denen Eisen und „säurelabiler“ Schwefel vorliegen (Dervarti et al, 1967; Shethna et al, 1968). Heute ist bekannt, dass die ersten entdeckten Fe/S-Proteine die Komplexe I bis III der bakteriellen und mitochondrialen Atmungskette sowie pflanzliche, bakterielle und eukaryotische Ferredoxine waren. In der gleichen Zeit wurde ebenfalls gezeigt, dass sich Fe/S-Cluster durch chemische Rekonstitution *in vitro* in Apoproteine einbauen lassen (Malkin & Rabinowitz, 1966). Dies hat zu der allgemeinen Annahme geführt, dass sich Fe/S-Cluster spontan in Proteine einbauen. Unterstützt wurde diese Ansicht dadurch, dass sich isolierte Fe/S-Cluster auch ohne Proteine durch chemische Synthese herstellen lassen (eine Übersicht hierzu in (Beinert et al, 1997)). Erst in den 1990er Jahren wurde durch genetische, biochemische und zellbiologische Studien gezeigt, dass die *in vivo* Fe/S-Cluster-Biogenese kein spontaner Prozess, sondern ein durch komplexe Proteinmaschinerien katalysierter Vorgang ist. Dies ist verständlich, wenn man bedenkt, dass die für die chemische Rekonstitution nötigen, hohen Konzentration an  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{S}^{2-}$  toxisch für biologische Systeme sind.

#### 1.3.2. Grundlegendes Prinzip

Obwohl es verschiedene Systeme für die *in vivo* Fe/S-Cluster-Biogenese gibt, scheinen alle den gleichen biosynthetischen Prinzipien zu folgen (Lill, 2009). Im Wesentlichen können zwei Hauptschritte unterschieden werden (**Abb. 1.7**). Erstens der *de novo* Zusammenbau eines Fe/S-Clusters auf einem sogenannten Gerüstprotein (Agar et al, 2000a; Agar et al, 2000b) und zweitens der Transfer dieses vorgefertigten Fe/S-Clusters in das eigentliche Zielprotein (Yuvaniyama et al, 2000). Der erste Schritt wird initiiert durch das PLP-abhängige Enzym Cysteindesulfurase, das den Schwefel in Form eines Persulfids durch Umwandlung von Cystein in Alanin bereitstellt. Da der Schwefel in Cystein und auch im Persulfid im Redoxzustand  $\text{S}^0$  und nicht wie erforderlich in  $\text{S}^{2-}$  vorliegt, sind Reduktionsäquivalente für den Einbau in den Fe/S-Cluster erforderlich. Weiterhin wird Eisen benötigt, das wahrscheinlich nicht frei in Lösung vorliegt, sondern an ein Eisenchaperon gebunden. Zusammengefügt werden das Sulfid und das Eisen auf einem Gerüstprotein, und von dort



erfolgt der Transfer in die Zielproteine mit Hilfe von speziellen Proteinfaktoren wie zum Beispiel Chaperonen.

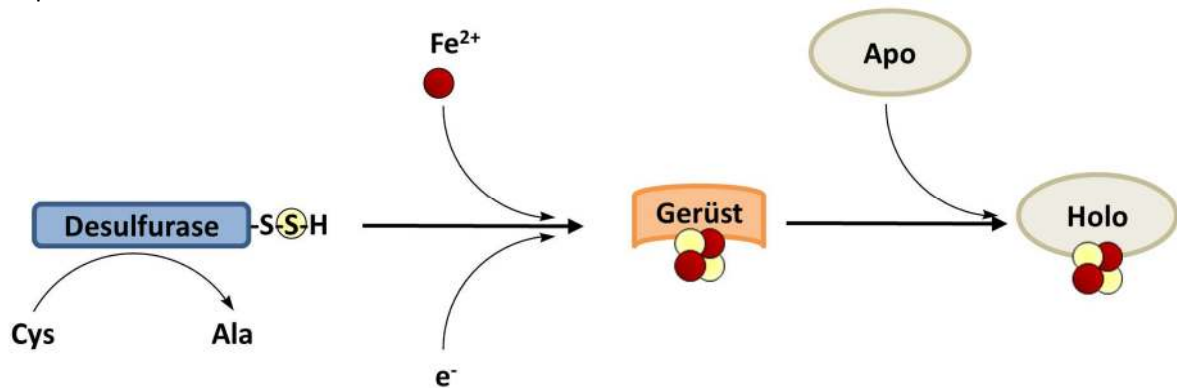


Abbildung 1.7: Allgemeines Prinzip der *in vivo* Fe/S-Cluster-Biogenese.

### 1.3.3. Prokaryotische Fe/S-Cluster-Biogenese Systeme

In Bakterien wurden drei verschiedene Fe/S-Cluster-Biogenese Maschinerien gefunden (Ayala-Castro et al, 2008). Das NIF-System (*nitrogen fixation system*) wurde am ausführlichsten in *Azotobacter vinelandii* charakterisiert. Dieses Bakterium ist in der Lage atmosphärischen Stickstoff zu Ammoniak zu reduzieren, wozu es den Nitrogenaseenzymkomplex benötigt. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben besitzt dieser Komplex verschiedene Fe/S-Cluster als Kofaktoren, neben den kubischen [4Fe-4S] Clustern auch die komplexeren P-Cluster und MoFe-Cluster (siehe **Abb. 1.2**). Die Strukturgene der Nitrogenase liegen in einem Gencluster, das weitere Gene enthält, die für die Funktion der Nitrogenase essentiell sind (Jacobson et al, 1989). Eines dieser Genprodukte war das erste Enzym, das mit der Biosynthese von Fe/S-Clustern direkt in Verbindung gebracht wurde: NifS. Es wurde als homodimere PLP-abhängige Cysteindesulfurase identifiziert, die Cystein in Alanin umwandelt und den Schwefel in Persulfidform überträgt (Zheng & Dean, 1994; Zheng et al, 1994; Zheng et al, 1993). Das Protein NifU aus dem gleichen Gencluster bildet ebenfalls ein Homodimer und ist das Gerüstprotein des NIF Systems (Nishio & Nakai, 2000; Yuvaniyama et al, 2000). NifU besteht aus drei Domänen (Hwang et al, 1996): die mittlere bindet einen permanenten [2Fe-2S] Cluster; die N- und C-terminalen Domänen können transient einen Fe/S-Cluster binden und diesen auf Zielproteine übertragen (Xu & Moller, 2011). Die beiden Gerüst-Domänen von NifU werden anhand ihrer Homologie zu anderen Proteinen unterschieden, die N-terminale ist vom U-Typ, die C-terminale von NFU-Typ.  $IscA^{Nif}$  ist ein weiteres Gerüstprotein, das für das NIF System wichtig ist (Johnson et al, 2005). Es ist vom dritten bekannten Gerüstproteintyp, dem A-Typ (Krebs et al, 2001). Es wird allgemein angenommen, dass das NIF System spezifisch für den Einbau der Fe/S-Cluster in Nitrogenase ist, allerdings sind homologe Proteine auch in einigen nicht-Stickstofffixierenden Bakterien wie *Helicobacter pylori* (Olson et al, 2000) und sogar in dem Protizoon *Entamoeba histolytica* (Ali et al, 2004) identifiziert worden.

Die Deletion der Gene von NifS und NifU war überraschenderweise nicht letal für *A. vinelandii*, sondern führte zu einer starken Verminderung der Nitrogenaseaktivität und des Wachstums. Dies legte die Vermutung nahe, dass es ein allgemeineres System zur Herstellung von Fe/S-Cluster gibt. Die Beschreibung einer weiteren Desulfurase IscS aus *E. coli* (Flint, 1996) führte zur Identifizierung des ISC-Systems (*iron-sulfur cluster assembly system*) in *A. vinelandii* (Zheng et al, 1998), das in Prokaryoten als generelles Fe/S-Cluster Biogenesesystem angesehen werden kann. Sowohl in *E. coli* als auch in *A. vinelandii* liegt das Gen für IscS tatsächlich in einem Gencluster zusammen mit Genen für Gerüstproteine vom A- und U-Typ (IscA, IscU), einem Elektronentransferprotein (Fdx) sowie einem Chaperon/Cochaperonsystem (HscA/HscB) (Takahashi & Nakamura, 1999; Zheng et al, 1998). Außerdem gehört noch der mögliche Eisendonator CyaY (Layer et al, 2006) zum ISC-System, das damit einen kompletten Satz an Proteinen zur *de novo* Synthese und Übertragung von Fe/S-Clustern wie zuvor beschrieben beinhaltet (siehe Kapitel 1.3.2).

Die Beobachtung, dass IscS in *E. coli* nicht essentiell ist, führte zur Entdeckung einer weiteren Desulfurase in *E. coli* und somit eines dritten Fe/S-Cluster Biogenesesystems, dem SUF-System (*sulfur utilization factor system*) (Patzner & Hantke, 1999; Takahashi & Tokumoto, 2002). Das SUF-System ist ebenfalls in einem Gencluster organisiert und die Expression der SUF-Gene wird in *E. coli* aktiviert unter oxidativen Stressbedingungen oder unter Eisenmangelbedingungen (Outten et al, 2004). Ein fehlfunktionierendes ISC-System kann vom SUF-System zumindest partiell komplementiert werden (Takahashi & Tokumoto, 2002). Folglich wird es auch als Sicherheitssystem für das oxidativ empfindlichere ISC-System angesehen (Fontecave & Ollagnier-De-Choudens, 2008). Interessanterweise enthalten Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* oder *Bacillus subtilis* ausschließlich das SUF-System, was bedeutet, dass es wenigstens in diesen Organismen generell für die Fe/S-Cluster Biogenese verantwortlich ist (Albrecht et al, 2010; Albrecht et al, 2011; Huet et al, 2005). Im SUF-System werden eine Desulfurase SufS sowie Gerüstproteine vom U-Typ (SufU) und A-Typ (SufA) gefunden (Fontecave & Ollagnier-De-Choudens, 2008). Es gibt jedoch keine bekannten Chaperone im SUF-System und bislang sind auch noch keine Elektronen- und Eisendonatoren gefunden worden (Lill, 2009). SufS ist eine Gruppe II Cysteindesulfurase und unterscheidet sich leicht von IscS und NifS (Xu & Moller, 2011). Die Aktivität von SufS wird durch SufE stark erhöht, mit dem es einen Komplex bilden kann (Outten et al, 2003). Die drei Proteine SufB, SufC und SufD bilden einen Komplex mit SufS-SufE und stellen das initiale Gerüst für die *de novo* Synthese von Fe/S-Clustern im SUF-System dar, von dem aus die zusammengebauten Fe/S-Cluster dann auf SufA übertragen werden können (Chahal et al, 2009). Das SUF-System ist in vielen, aber nicht allen Bakterien, vorhanden, zum Beispiel besitzt *A. vinelandii* kein SUF-System.

### 1.3.4. Fe/S-Cluster-Biogenese in Hefen als eukaryotisches Modell

Im Verlauf der Evolution wurde im Rahmen der Endosymbiose die SUF- und ISC-Maschinerie in die eukaryotische Zelle aufgenommen (Lill, 2009). Da das SUF-System in photosynthetischen Bakterien vorkommt, werden in Plastiden von Pflanzen und Algen Komponenten der SUF-Maschinerie und in Mitochondrien konsequenterweise Komponenten der ISC-Maschinerie gefunden. Zusätzlich erforderte in Eukaryoten die Kompartimentierung der Zelle eine Erweiterung dieser aus Prokaryoten bekannten Systeme, da sich Fe/S-Proteine auch außerhalb der Mitochondrien/ Plastiden befinden. Weil in dieser Arbeit im Wesentlichen mit dem eukaryotischen Modellorganismus *S. cerevisiae* gearbeitet wurde, soll im Folgenden die Biogenese von Fe/S-Clustern in Hefen genauer erläutert werden. Die spezifischen Einzelheiten der Fe/S-Cluster-Biogenese in photosynthetischen Eukaryoten wird dagegen nicht beschrieben, für eine Übersicht hierzu siehe (Balk & Pilon, 2011).

In *S. cerevisiae* gibt es insgesamt drei Protein-Maschinerien, die für die Fe/S-Proteinbiogenese verantwortlich sind. Die mitochondriale ISC-Maschinerie ist essentiell für die Herstellung aller Fe/S-Proteine in Hefe, zytosolische und Kern-lokalisierte Fe/S-Proteine benötigen zusätzlich dazu noch die ISC-Export- und die CIA-Maschinerie (*cytosolic iron sulfur cluster assembly*) (Lill et al, 2006; Lill & Muhlenhoff, 2008).

#### Biogenese mitochondrialer Fe/S-Proteine

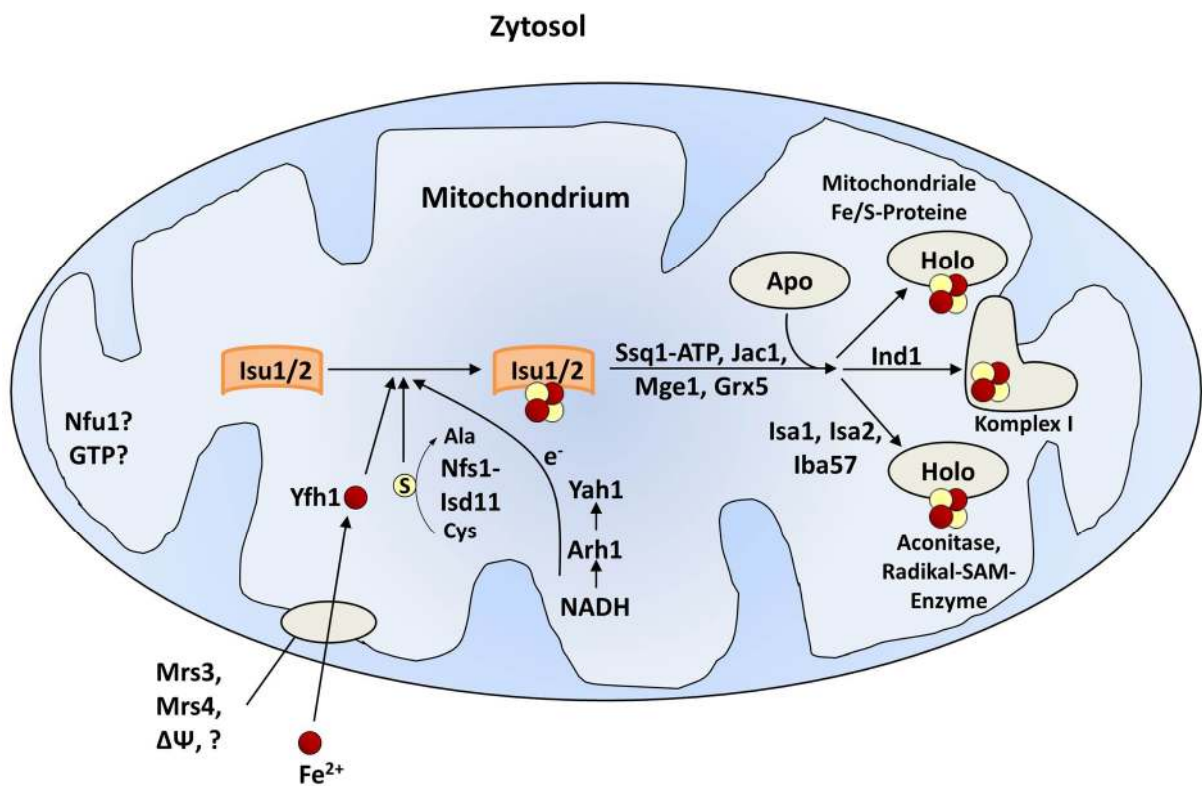
Die ISC-Maschinerie in Hefemitochondrien besteht aus mindestens 15 verschiedenen Proteinen, von denen viele, aber nicht alle, verwandt zu Proteinen der bakteriellen ISC-Maschinerie sind (**Abb. 1.8**) (Lill, 2009; Rawat & Stemmler, 2011). Alle Komponenten der ISC-Maschinerie sind Kern-kodiert und werden durch entsprechende Signalsequenzen in die mitochondriale Matrix importiert. Dort existiert in Hefe ein Desulfurasekomplex, bestehend aus dem homodimeren Nfs1 (Kispal et al, 1999; Muhlenhoff et al, 2004), das ein homologes Protein von IscS/ NifS ist, und dem 11 kDa großen Protein Isd11 (Adam et al, 2006; Wiedemann et al, 2006). Die Stöchiometrie des Komplexes ist nicht genau bekannt, es ist aber gezeigt worden, dass Isd11 für die *in vivo* Funktion von Nfs1 essentiell ist. Eisen wird als  $Fe^{2+}$  membranpotentialabhängig in Mitochondrien importiert (Lange et al, 1999). Die mitochondrialen Transporter Mrs3 und Mrs4 sind am Import beteiligt, da sie aber nicht essentiell sind, wird vermutet, dass es einen weiteren Eisentransporter gibt (Lill et al, 2006).

Die *de novo* Assemblierung der Fe/S-Cluster erfolgt auf den U-Typ Gerüstproteinen Isu1 und Isu2, welche wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden sind, da nur in Hefe zwei ähnliche U-Typ Gerüstproteine vorkommen (Garland et al, 1999; Muhlenhoff et al, 2003). Das eisenbindende Protein Yfh1 (Frataxin) spielt ebenfalls eine essentielle Rolle in der Biogenese mitochondrialer Fe/S-Proteine (Muhlenhoff et al, 2002b; Stehling et al, 2004) und es bekannt, dass Yfh1 mit Nfs1/Isd11 und Isu1 interagiert (Gerber et al, 2003; Wang & Craig, 2008). Die genaue Funktion von Yfh1 ist aber noch

nicht endgültig geklärt und wird kontrovers diskutiert. Zum einen ist vorgeschlagen worden, dass Frataxin als Eisendonator fungiert (Stemmler et al, 2010; Yoon & Cowan, 2003). Andererseits wurde basierend auf *in vitro* Arbeiten mit dem bakteriellen Homologen CyaY eine Rolle als eisenabhängiger Regulator der Fe/S-Cluster-Synthesereaktion angeregt, wobei die Regulation durch Inhibition der Cysteindesulfurase IscS erfolgen soll (Adinolfi et al, 2009). Aktuelle *in vitro* Arbeiten mit humanem Frataxin schließlich deuten auf eine Rolle von Frataxin als allosterischen Aktivator hin (Tsai & Barondeau, 2010): es wurde beobachtet, dass humanes Frataxin an den Proteinkomplex aus Nfs1, Isd11 und Isu2 (das humane U-Typ Gerüstprotein) bindet und dadurch die Cysteindesulfuraseaktivität deutlich erhöht wird. Diese Aktivierung wurde durch Fe<sup>2+</sup> nochmals stimuliert (Tsai & Barondeau, 2010). Der molekulare Mechanismus des Fe/S-Cluster-Synthese auf Isu1 ist noch weitgehend unklar, benötigt aber Reduktionsäquivalente, die von einer Elektronentransferkette bereitgestellt werden. Die FAD abhängige Ferredoxinoxidoreduktase Arh1 reduziert vermutlich unter NADH Verbrauch das mitochondriale Ferredoxin Yah1, welches schließlich die Elektronen für die Fe/S-Cluster-Biogenese liefert. (Muhlenhoff et al, 2003). Es wird vermutet, dass die Elektronen für die Reduktion des Schwefels zu Sulfid benötigt werden, der experimentelle Nachweis hierfür konnte bislang noch nicht erbracht werden (Lill, 2009). Basierend auf Arbeiten mit Proteinen der bakteriellen ISC-Maschinerie wurde außerdem vorgeschlagen, dass die Elektronen für die Fusion von zwei [2Fe-2S] Clustern zu einem [4Fe-4S] Cluster durch reduktive Kopplung benötigt werden könnten (Chandramouli et al, 2007; Unciuleac et al, 2007).

Der Transfer des vorgefertigten Fe/S-Cluster vom Gerüstprotein zu den Zielproteinen stellt den zweiten Schritt der Fe/S-Cluster-Biogenese in Hefemitochondrien dar. Formell erfordert dieser Transfer drei Einzelschritte: die Abgabe des Fe/S-Clusters vom Gerüstprotein, der Transfer zum Zielprotein und den Einbau in das Zielprotein. In *S. cerevisiae* erfordert der Gesamtprozess ein Chaperonsystem, das aus der Hsp70-ATPase Ssq1 und dem DnaJ-artigen Cochaperon Jac1 besteht. Ssq1 interagiert ATP-Hydrolyse-abhängig hochspezifisch mit dem LPPVK Motiv von Isu1 (Dutkiewicz et al, 2004; Hoff et al, 2003; Hoff et al, 2000; Hoff et al, 2002). Es wird vermutet, dass in Zusammenarbeit mit dem Cochaperon Jac1 eine Konformationsänderung im Gerüstprotein Isu1 hervorgerufen und so der Fe/S-Cluster freigesetzt wird (Andrew et al, 2006; Bonomi et al, 2008; Chandramouli & Johnson, 2006). Der Vorgang erfordert außerdem noch den Nukleotidaustauschfaktor Mge1, der den Austausch von ADP gegen ATP in Ssq1 stimuliert (Dutkiewicz et al, 2003). Eine noch nicht klar definierte Hilfsfunktion wird von dem Monothiol-Glutaredoxin Grx5 erfüllt (Muhlenhoff et al, 2003; Rodriguez-Manzanares et al, 2002). Für das humane Homologe Glrx5 konnte gezeigt werden, dass es als Tetramer in der Lage ist [2Fe-2S] Cluster zu binden (Johansson et al, 2010). Die Möglichkeit einer Fe/S-Cluster-Transferfunktion wird noch diskutiert (Bandyopadhyay et al, 2008b; Iwema et al, 2009).

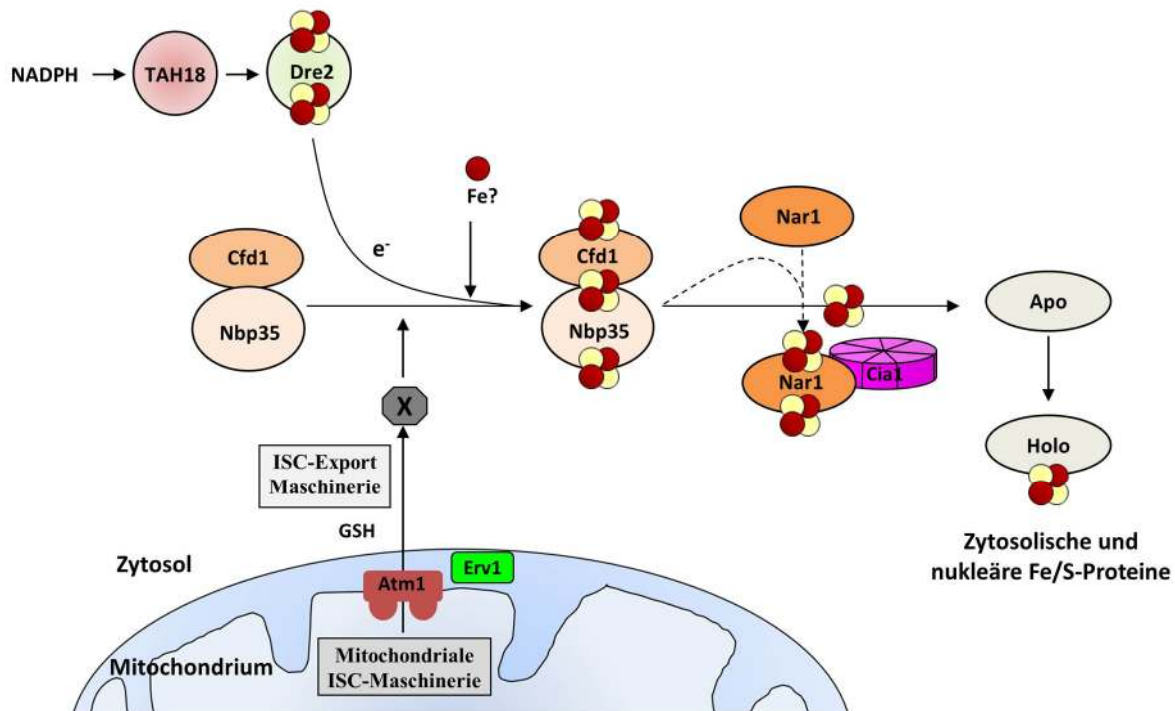
Die bis jetzt genannten ISC-Maschinerie-Proteine werden für die Biosynthese aller mitochondrialen Fe/S-Proteine benötigt, es gibt aber auch speziellere ISC-Komponenten. Die A-typ Gerüstproteine Isa1, Isa2 sowie Iba57 interagieren miteinander und werden spezifisch für den Einbau von Fe/S-Clustern in Aconitase-Typ und Radikal-SAM-Typ Enzyme benötigt, wie Aco1, Lys4 und Bio2 (Gelling et al, 2008; Muhlenhoff et al, 2007). In *S. pombe* ist eine Interaktion von Isa1 und Isa2 mit Grx5 nachgewiesen worden, der funktionelle Zusammenhang konnte jedoch noch nicht geklärt werden (Kim et al, 2010). Die P-Loop NTPase Ind1 wird speziell für die Assemblierung der Fe/S-Cluster in Komplex I der mitochondrialen Atmungskette benötigt (Bych et al, 2008). Die genaue Funktion des U-Typ Gerüstproteins Nfu1 ist nicht geklärt (Lill, 2009), ebenso ist die Rolle von GTP bei der Fe/S-Cluster-Biogenese unklar (Amutha et al, 2008).



**Abbildung 1.8: Modell der mitochondrialen ISC-Maschinerie von Hefe.**  $\text{Fe}^{2+}$  wird Membranpotential-abhängig in die Mitochondrien durch die Transporter Mrs3 und Mrs4 sowie eine unbekannte Komponente importiert. Die *de novo* Fe/S-Cluster-Synthese erfolgt auf den Gerüstproteinen Isu1/Isu2 mit Hilfe des Eisenchaperones Yfh1, der Elektronentransportkette NADH-Arh1-Yah1 und des Desulfurasekomplexes Nfs1-Isd11. In einem zweiten Schritt wird der Fe/S-Cluster auf die Zielproteine ATP abhängig übertragen unter Beteiligung des Chaperons Ssq1, des Cochaperons Jac1 sowie der Proteine Grx5 und Mge1. Der Transfer auf Zielproteine vom Aconitase-Typ (Aco1, Lys4) und vom Radikal-SAM-Typ (Bio2) erfordert zusätzlich noch Isa1, Isa2 und Iba57. Für die Assemblierung der Fe/S-Cluster in Komplex I wird außerdem die P-Loop NTPase Ind1 benötigt.

### Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe/S-Proteine

Die Biogenese extra-mitochondrialer Fe/S-Proteine hängt strikt von der mitochondrialen ISC-Maschinerie ab (Gerber et al, 2004; Kispal et al, 1999). Die Abhängigkeit wird dadurch erklärt, dass die ISC-Maschinerie eine bislang unbekannte Komponente X synthetisiert, die von der ISC-Export-Maschinerie in das Zytosol transloziert wird, woraufhin sie von der zytosolischen CIA-Maschinerie für die Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe/S-Proteine verwendet wird (**Abb. 1.9**).



**Abbildung 1.9: Vereinfachtes Modell der extra-mitochondrialen Fe/S-Proteinbiogenese durch die CIA-Maschinerie in Hefe.** Eine unbekannte Komponente X wird von der ISC-Maschinerie hergestellt und von der ISC-Export-Maschinerie in das Zytosol transloziert. Mit Hilfe dieser wahrscheinlich schwefelhaltigen Komponente X erfolgt die Fe/S-Cluster-Synthese auf dem Gerüstproteinkomplex Cfd1-Nbp35. Die Quelle des Eisens ist noch unbekannt. Die Diflavinreduktase Tah18 bildet mit Dre2 einen Elektronentransferkomplex, der Elektronen für den Zusammenbau der Fe/S-Cluster auf den Gerüstproteinen liefert. Die Übertragung des Fe/S-Clusters in die Zielproteine erfolgt mit Hilfe der Proteine Cia1 und Nar1. Weitere Details siehe Text.

Die ISC-Export-Maschinerie besteht aus insgesamt drei Komponenten. Die erste ist der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte ABC-Transporter Atm1, der die bislang unbekannte Komponente X ins Zytosol transportiert (Kispal et al, 1999). Es wurde beobachtet, dass Nfs1 und Isu1 auch für die Biogenese extra-mitochondrialer Fe/S-Proteine mitochondrial lokalisiert sein müssen (Gerber et al, 2004; Muhlenhoff et al, 2004). Diese Abhängigkeit von der mitochondrial lokalisierten Desulfurasereaktion hat zu der Annahme geführt, dass die Komponente X schwefelhaltig ist. Für die Exportreaktion wird ferner die FAD-abhängige Sulphydryloxidase Erv1 benötigt. Dieses Enzym ist im Intermembranraum lokalisiert und katalysiert die Bildung von Disulfidbrücken während des Mia40 abhängigen Imports in den Intermembranraum (Mesecke et al, 2005). Welche Rolle es in der Biogenese von Fe/S-Proteinen spielt, ist hingegen noch völlig unklar. Interessanterweise führt die Reduzierung der Konzentration an Glutathion (GSH) in Hefe zu dem gleichen Phänotyp wie die

Depletion von *Erv1* und *Atm1*, nämlich dem Verlust der extra-mitochondrialen Fe/S-Biogenese bei intakter mitochondrialer Fe/S-Biogenese (Sipos et al, 2002). Aus diesem Grund wird GSH als dritte Komponente der ISC-Export-Maschinerie angesehen.

Die eigentliche Synthese extra-mitochondrialer Fe/S-Proteine erfolgt durch die CIA-Maschinerie. In Analogie zur ISC-Maschinerie können auch hier zwei Phasen der Fe/S-Cluster-Synthese unterschieden werden. Die beiden P-Loop NTPasen *Cfd1* und *Nbp35* (Hausmann et al, 2005; Roy et al, 2003) bilden einen heterotetrameren Komplex, der als zytosolisches Gerüst für den Zusammenbau von Fe/S-Clustern dient (Netz et al, 2007). Die Diflavinreduktase *Tah18* bildet mit *Dre2* einen Komplex, der Elektronen von NADPH übertragen kann. Diese Elektronentransportkette ist für die Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe/S-Proteine essentiell (Netz et al, 2010). *Dre2* ist ein Fe/S-Protein, dessen Fe/S-Cluster Einbau nicht von der zuvor beschriebenen Elektronentransferkette abhängt. Das Gleiche gilt für den Fe/S-Cluster in *Cfd1*, auch dieser hängt im Gegensatz zu den Fe/S-Clustern in *Nbp35* nicht von *Tah18-Dre2* ab (Netz et al, 2010). Wie der Einbau der Fe/S-Cluster in *Dre2* und *Cfd1* geschieht, ist momentan noch nicht geklärt. Wie alle anderen zellulären eisenabhängigen Prozesse auch, erfordert die Synthese extra-mitochondrialer Fe/S-Proteine die zytosolischen Monothiol-Glutaredoxine *Grx3* und *Grx4*, deren Funktion von einem verbrückendem, Glutathion-haltigem Fe/S-Cluster abhängt (Muhlenhoff et al, 2010). Der genaue Mechanismus der Aktivierung von Eisen für die CIA-Maschinerie ist jedoch noch zu klären. Die Fe/S-Cluster im *Cfd1-Nbp35* Komplex sind labil und können in Zielproteine übertragen werden (Netz et al, 2007). Dieser Prozess erfordert das Hydrogenase-ähnliche Protein *Nar1* (Balk et al, 2004), das selbst erst durch den Einbau von zwei ungewöhnlichen, noch nicht genau beschriebenen Fe/S-Clustern aktiviert werden muss (Urzica et al, 2009). *Nar1* bindet an das WD-Repeat Protein *Cia1*, das ebenfalls essentiell für die Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S-Proteinen ist (Balk et al, 2005). Da WD-Repeat Proteine recht häufig an Protein-Protein Wechselwirkungen beteiligt sind, wird davon ausgegangen, dass dieses Protein mit weiteren CIA-Komponenten interagiert oder die Bindung an die Zielproteine vermittelt (Srinivasan et al, 2007).

### 1.3.5. Wichtigkeit der Fe/S-Proteinbiogenese in Eukaryoten

Auch wenn die meisten zellbiologischen Untersuchungen im Modellorganismus *S. cerevisiae* durchgeführt wurden, so wird mehr und mehr klar, dass der Prozess der Fe/S-Cluster-Biogenese in nahezu allen Eukaryoten konserviert zu sein scheint (Lill, 2009; Tong & Rouault, 2006). Homologe Proteine zu vielen der zuvor beschriebenen Komponenten aus Hefe sind mittlerweile in anderen Modellsystemen wie menschlicher Zellkultur, Maus, Zebrafisch und Fruchtfliege beschrieben worden. Die Untersuchungen umfassen viele Kernkomponenten der ISC- und CIA-Maschinerie wie *Nfs1*, *Isd11*, *Isu1*, *Frataxin*, *Grx5*, *Ind1*, *Atm1*, *Nbp35* und *Nar1* (Biederbick et al, 2006; Lill & Muhlenhoff, 2008; Pongdarre et al, 2006; Sheftel et al, 2009; Shi et al, 2009; Song & Lee, 2011; Song & Lee, 2008; Stehling

et al, 2004; Stehling et al, 2008; Tong & Rouault, 2006; Wingert et al, 2005). Es scheint wahrscheinlich, dass die restlichen, bislang noch nicht charakterisierten, homologen Proteine ebenfalls ähnliche Funktionen wie in Hefe erfüllen. In höheren Eukaryoten sind allerdings Genduplikationen von einigen ISC- und CIA-Komponenten aufgetreten (Balk & Pilon, 2011; Lill, 2009). Dies deutet darauf hin, dass der Prozess der Fe/S-Cluster-Biogenese in höheren Eukaryoten komplizierter ist als in Hefe, auch wenn die Grundelemente die gleichen sein dürften.

Die Biogenese von Fe/S-Clustern ist ein lebenswichtiger Prozess, darum sind viele Biogenesekomponenten essentiell sowohl für Hefen als auch für humane Zellen (Rouault & Tong, 2008; Ye & Rouault, 2010). In Hefe ist es sogar der einzige lebensnotwendige Prozess, der in den Mitochondrien stattfindet (Lill, 2009). So können Hefen ohne funktionierende Atmungskette zwar nicht mehr auf respiratorische Kohlenstoffquellen zurückgreifen, die Verwertung von Glukose durch fermentativen Stoffwechsel ist dagegen nicht beeinträchtigt. Deswegen wachsen Hefen ohne mitochondriale DNA zwar langsamer in Glukose-Medium, aber sie überleben ohne weitere Beeinträchtigung. Da Hefemitochondrien kein essentielles Fe/S-Protein außer Yah1 enthalten, welches aber für die Fe/S-Cluster-Biogenese benötigt wird, muss die Ursache für den grundlegenden Charakter dieses biochemischen Prozesses außerhalb der Mitochondrien liegen. Das zytosolische Fe/S-Protein Rli1 (Kispal et al, 2005; Yarunin et al, 2005), das unabdingbar für das Recycling von Ribosomen und damit für die Proteintranslation ist (Barthelme et al, 2011; Pisarev et al, 2010), sowie die essentiellen nukleären Fe/S-Proteine Rad3 (Rudolf et al, 2006), eine DNA-Helikase, und Pri2 (Klinge et al, 2007), eine RNA-Primase, könnten den Zusammenhang erklären.

Es stellt sich die Frage, wie in Organismen ohne Mitochondrien (beispielsweise Microsporidia, Giardia oder Entamoeba) die Fe/S-Cluster-Biogenese abläuft. Genetische Studien zeigten, dass diese Organismen Homologe zu Komponenten der ISC- und CIA-Maschinerie enthalten, aber Gene von klassischen Funktionen der Mitochondrien wie Hämsynthese, Citratzyklus und Respiration verloren haben. Zellbiologische Studien konnten zeigen, dass diese Organismen kleine Doppelmembranbegrenzte Kompartimente, sogenannte Mitosomen, enthalten (Tovar et al, 1999; Tovar et al, 2003; Williams et al, 2002). Es wird davon ausgegangen, dass sie in Folge der parasitären Lebensweise durch reduktive Evolution aus Mitochondrien entstanden sind (van der Giezen & Tovar, 2005). In diesen Mitosomen wurden tatsächlich Proteine für die Fe/S-Cluster-Biogenese gefunden (Goldberg et al, 2008; Tovar et al, 2003; Williams et al, 2008).

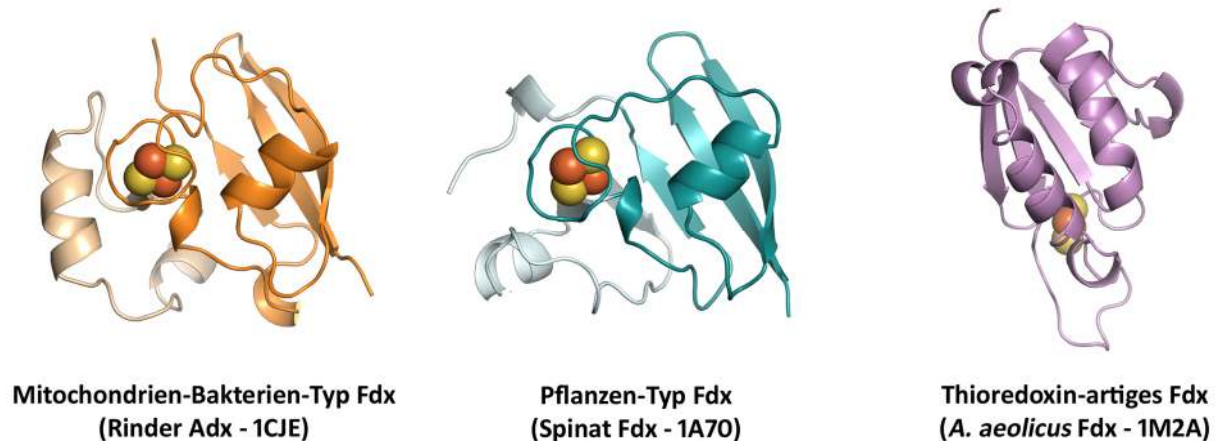
Die Wichtigkeit der Fe/S-Cluster-Biogenese in Säugern wird außerdem durch die zahlreichen Krankheiten veranschaulicht, die mit Defekten in der Fe/S-Biogenese und Fe/S-Proteinen verbunden sind (Lill, 2009; Rouault & Tong, 2008). Erwähnt sei an dieser Stelle nur eine der häufigsten dieser Krankheiten, die neurodegenerative Erkrankung Friedreich Ataxie, die durch verminderte zelluläre Mengen des hypothetischen Eisenchaperons Frataxin verursacht wird.



### 1.4. Ferredoxine

Ferredoxine (Fdx) sind kleine wasserlösliche Fe/S-Proteine die als Ein-Elektronen-Transporter in einer Vielzahl metabolischer Prozesse in nahezu jedem Organismus vorkommen. Das erste Ferredoxin wurde 1962 aus dem anaeroben Bakterium *Clostridium pasteurianum* isoliert (Mortenson et al, 1962), aber ein ähnliches „eisenhaltiges“ Protein mit niedrigem Redoxpotential wurde im gleichen Jahr in Spinatchloroplasten gefunden (Tagawa & Arnon, 1962). Kurze Zeit später wurden Ferredoxine aus vielen weiteren biologischen Proben gewonnen, unter anderem das Ferredoxin aus Säugetier-Nebennierenmitochondrien, das Adrenodoxin (Adx) genannt wurde (Suzuki & Kimura, 1965). Abhängig von der Anzahl der enthaltenen Eisenatome pro Molekül wurden Ferredoxine klassischerweise in vier verschiedene Gruppen eingeteilt. Nach der letzten Nomenklaturempfehlung des NC-IUB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry*) von 1978 zählen bakterielle Rubredoxine nicht mehr zu den Ferredoxinen sondern bilden eine eigene Proteinklasse (NC-IUB, 1979). Tatsächlich enthalten Rubredoxine nur ein Eisenatom, das von vier Cysteinen koordiniert wird, jedoch keinen echten Fe/S-Cluster. Es sind folglich keine richtigen Fe/S-Proteine, obwohl sie mitunter immer noch zu ihnen gezählt werden (Meyer, 2008). Heutzutage werden im Wesentlichen zwei Gruppen von Ferredoxinen unterschieden, die jeweils echte Fe/S-Cluster enthalten. Die „bakteriellen Ferredoxine“ enthalten einen oder zwei Fe/S-Cluster vom [3Fe-4S] und/oder [4Fe-4S] Typ (Degtyarenko & Kulikova, 2001). Sie umfassen auch eine spezielle Gruppe von [4Fe-4S] Cluster enthaltenden Ferredoxinen mit bemerkenswert hohen Redoxpotentialen, welche HiPIP (*high potential iron proteins*) genannt wurden (Jensen, 1974). Die „[2Fe-2S] Ferredoxine“ bilden die zweite Gruppe. Sie enthalten einen [2Fe-2S] Cluster und können wiederum in drei Untergruppen unterteilt werden: Pflanzen-Typ [2Fe-2S] Fdx aus photosynthetischen Organismen, Wirbeltier-Typ [2Fe-2S] Fdx und Thioredoxin-artige [2Fe-2S] Fdx (Ewen et al, 2011). An dieser Stelle sei angemerkt, dass die Bezeichnung Wirbeltier-Typ Fdx irreführend ist, da in diese Gruppe auch viele Ferredoxine aus Bakterien fallen, wie zum Beispiel Putidaredoxin (Pdx) und Terpredoxin (Tdx). Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit abweichend die Bezeichnung MB-Typ Ferredoxine (**M**itochondrien-**B**akterien-Typ Ferredoxine) für diese Proteine verwendet. Die drei Untergruppen unterscheiden sich in ihrer Beteiligung an unterschiedlichen Elektronentransferprozessen: Pflanzen-Typ Fdx nehmen am photosynthetischen Elektronentransfer teil, sie erhalten Elektronen vom Photosystem I und übertragen sie auf verschiedene Akzeptoren im Chloroplastenstroma, zum Beispiel auf Ferredoxinoxidoreduktase (FdxR) zur Produktion von NADPH; MB-Typ Fdx sind schon lange als Elektronenüberträger zwischen FdxR und Cytochrom P450 Enzymen bekannt (Omura et al, 1966); Thioredoxin-artige Fdx, deren Funktion noch nicht endgültig aufgeklärt wurde, sind wahrscheinlich im Stickstofffixierungsstoffwechselweg involviert (Meyer, 2001). Obwohl die Sequenzidentität zwischen den ersten beiden Untergruppen geringer als 23 % ist (Holden et al, 1994), sind sie sich

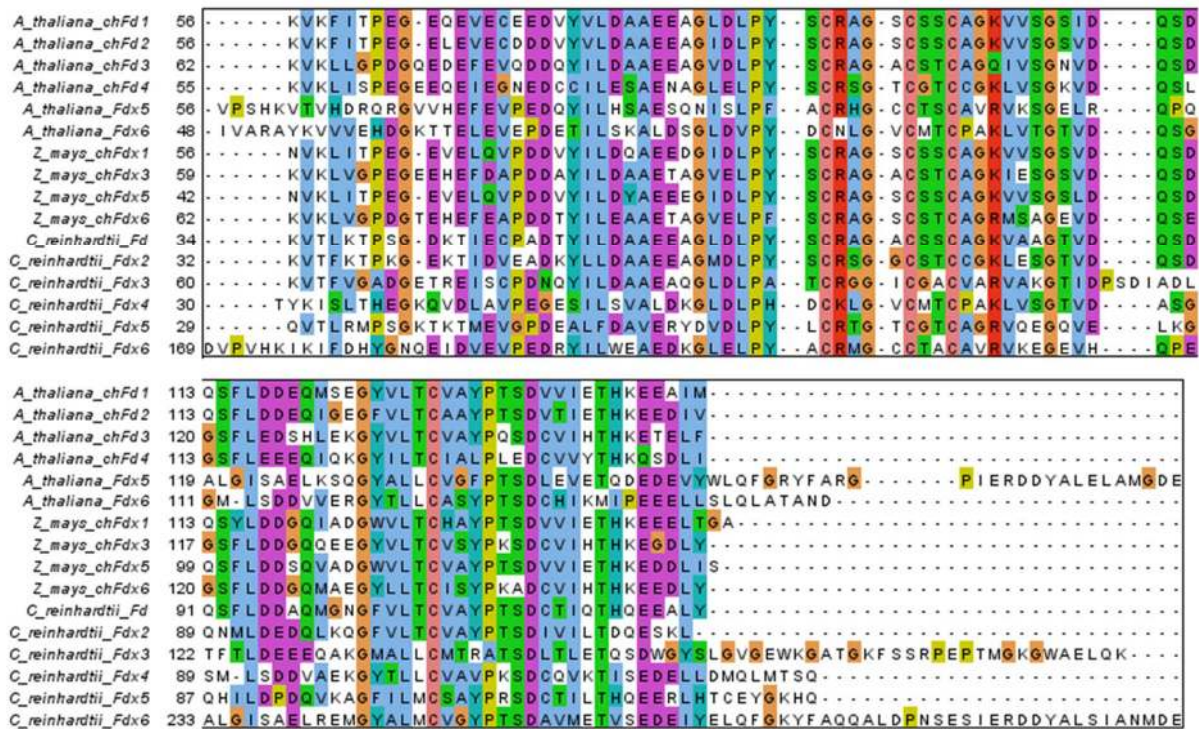
strukturell ähnlich und weisen den gleichen Faltungstyp um den Fe/S-Cluster auf, welcher als  $\beta$ -*grasp* bezeichnet wird (Orengo & Thornton, 2005). Dieses Faltungsmotiv besteht aus einem gemischten  $\beta$ -Faltblatt mit vier  $\beta$ -Strängen sowie einer flankierenden  $\alpha$ -Helix. Es wurde gefunden, dass Pflanzen-Typ Fdx und MB-Typ Fdx neben dieser ähnlichen Kerndomäne noch eine weitere Domäne enthalten, die als Interaktionsdomäne bezeichnet wird und für die funktionellen Unterschiede verantwortlich sein dürfte (Muller et al, 1999). Thioredoxin-artige Fdx unterscheiden sich stark von den anderen beiden Untergruppen und weisen eine Thioredoxinfaltung um den Fe/ S Cluster auf (**Abb. 1.10**).



**Abbildung 1.10: Struktureller Vergleich der drei Untergruppen von [2Fe-2S] Ferredoxinen.** Darstellung der Strukturen von Rinder Adx (Pikuleva et al, 2000), Spinat Fdx (Binda et al, 1998) und Thioredoxin-Fdx aus *A. aeolicus* (Yeh et al, 2002) als repräsentative Vertreter der drei Untergruppen von [2Fe-2S] Cluster Ferredoxinen. Die strukturelle Verwandtschaft der Mitochondrien-Bakterien-Typ (MB-Typ) und Pflanzen-Typ Ferredoxine ist erkennbar an der identischen Kerndomäne ( $\beta$ -*grasp* Faltung), die jeweils im Bild rechts angeordnet ist. Diese Domäne wurde zur besseren Übersicht dunkler eingefärbt als die links angeordnete Interaktionsdomäne. In Klammern ist die PDB-ID angegeben.

Nicht nur zwischen den Untergruppen von [2Fe-2S] Fdx gibt es bemerkenswerte funktionelle Unterschiede, sondern auch innerhalb einer Untergruppe erfüllen die Ferredoxine hochspezifische Funktionen. Bakteriellies Pdx, ein MB-Typ Fdx, überträgt Elektronen auf das Cytochrom P450<sub>cam</sub> (CYP101) im Campher-Hydroxylasesystem des gram-negativen Bakteriums *Pseudomonas putida*. Es kann in seiner Funktion weder durch Adx aus Säugern noch durch bakterielles Tdx ersetzt werden (Kostic et al, 2002; Lipscomb et al, 1976). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Adx in der Lage ist, Elektronen effektiv auf andere bakterielle Cytochrom P450 Enzyme zu übertragen (Ewen et al, 2011). Wie mehrere aktuelle Studien zeigen, scheinen auch Pflanzen-Typ Ferredoxine spezifische Funktionen zu erfüllen - trotz verblüffender Sequenzkonservierung zwischen einzelnen Pflanzen-Typ Ferredoxinen (**Abb. 1.11**). In *Arabidopsis thaliana* gibt es insgesamt sechs Pflanzen-Typ Ferredoxine (Hanke et al, 2004), von denen zwei an der photosynthetischen Elektronenübertragung beteiligt sind und in den Blättern exprimiert werden. Das mengenmäßig deutlich häufigere Chloroplast-Ferredoxin AtFd2 ist involviert im linearen Elektronenfluss, das weniger stark exprimierte AtFd1 hingegen am zyklischen Elektronenfluss (Hanke & Hase, 2008). Das in den Wurzeln lokalisierte

Chloroplast-Ferredoxin AtFd3 scheint für die Nitrat- und Sulfatassimilation wichtig zu sein (Hanke et al, 2008). Erst vor kurzem wurde AtFdC1 (AtFdx6 in **Abb. 1.11**) aus *A. thaliana* charakterisiert, das neun zusätzliche Aminosäuren an seinem C-Terminus im Vergleich zu AtFdx1 und AtFd2 aufweist. Es wurde gezeigt, dass AtFdC1 zwar Elektronen von Photosystem I empfangen kann, sie aber höchst wahrscheinlich nicht auf FdxR überträgt (Voss et al, 2011). Es wird spekuliert, dass AtFdC1 eine wichtige Rolle bei der „Umleitung“ überschüssiger Elektronen spielt. Dies kann zum Beispiel bei hoher Lichtintensität auftreten, wenn die Stroma-ständigen und üblichen Elektronenakzeptoren AtFd1 und AtFd2 bereits reduziert sind.



**Abbildung 1.11: Ähnlichkeit von Pflanzen-Typ Ferredoxinen in der Primärstruktur.** Multi-Sequenzalignment der Pflanzen-Typ Ferredoxine aus *A. thaliana*, *C. reinhardtii* und *Z. mays* erstellt mit ClustalW2 (Chenna et al, 2003) und bearbeitet mit Jalview (Waterhouse et al, 2009). Verwendet wurden die Kernsequenzen ohne Chloroplasten-Signalsequenz gesammelt von der UniProt Datenbank verfügbar im World Wide Web. In den Sequenzen sind die Aminosäuren nach Konservierung farbig markiert. Folgende Ferredoxine wurden verwendet (mit Proteinkennung):

*Arabidopsis thaliana* (Chloroplast-Ferredoxine: chFd1 - O04090; chFd2 - P16972; chFd3 - Q9ZQG8; chFd4 - Q9FIA7; Fdx5 - Q9C7Y4; Fdx6 - Q8LD29), *Zea mays* (Chloroplast-Ferredoxine: chFdx1 - P27787; chFdx3 - P27788; chFdx5 - P27789; chFdx6 - P94044), *Chlamydomonas reinhardtii* (Chloroplast-Ferredoxine: Fd - P07839; Fd2 - Q2HZ25; Fd3 - Q2HZ24; Fd4 - Q2HZ23; Fdx5 - Q2HZ22; Fdx6 - Q2HZ21).

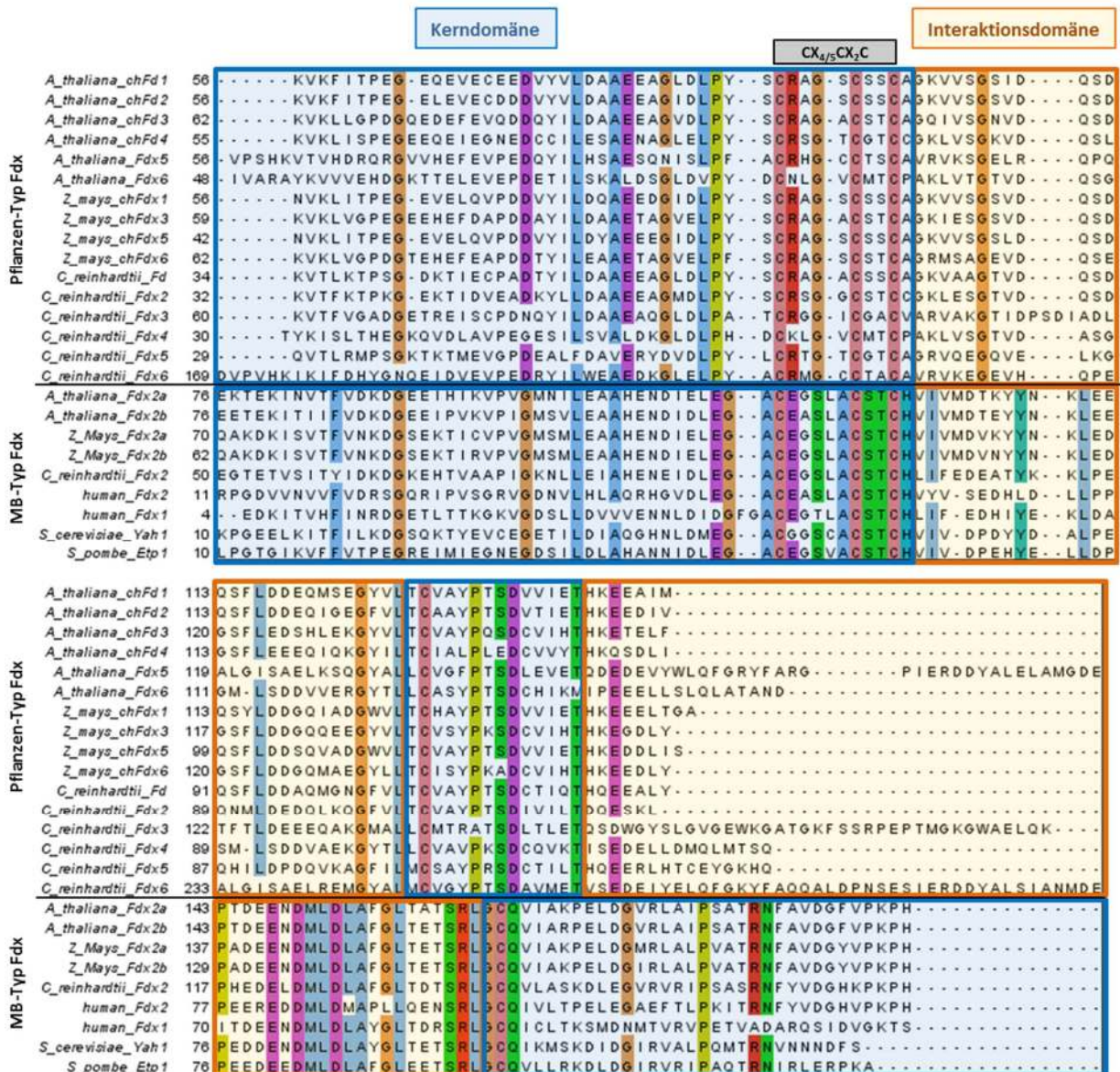
Im Genom der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* sind sechs verwandte Pflanzen-Typ Ferredoxine kodiert (**Abb. 1.11**), deren Expression in Abhängigkeit von verfügbaren Nährstoffen unterschiedlich reguliert wird (Terauchi et al, 2009). Es ist außerdem bekannt, dass eines dieser Ferredoxine CrFd, kodiert durch das PETF Gen, das wichtigste photosynthetische Ferredoxin ist und Elektronen von Photosystem I auf FdxR überträgt. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass CrFdx2

effektiver im Vergleich zu CrFd in der Elektronenübertragung zu Nitritreduktase ist. Deshalb wurde vorgeschlagen, dass jedes Pflanzen-Typ Ferredoxin aus *C. reinhardtii* Substratspezifität aufweist (Terauchi et al, 2009).

In einer vor kurzem veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass auch in menschlichen Zellen zwei Ferredoxine existieren, die sich durch hohe Substratspezifität auszeichnen (Sheftel et al, 2010). Schon länger ist bekannt, dass Fdx1 Elektronen von FdxR zu membrangebundenen Cytochrom P450 Enzymen in der Biogenese von Steroidhormonen überträgt. Das Protein ist also das funktionale Homologe des seit 1965 bekannten Adx. Fdx2 wurde lange Zeit nicht beschrieben, da vermutet wurde, dass Fdx1 die gleichen Funktionen wie das einzige Ferredoxin aus *S. cerevisiae* Yah1 erfüllt, nämlich eine Funktion in der Elektronenübertragung bei der Biogenese von Fe/S-Clustern. Die Beobachtung, dass das *FDX1* Gen die Depletion von Yah1 *in vivo* nicht komplementierte, wurde auf Speziespezifität zurückgeführt. Hefe hingegen enthält nur das Ferredoxin Yah1. Dieses war das erste Ferredoxin, für das die direkte Beteiligung an der Fe/S-Cluster-Biogenese gezeigt wurde (Lange et al, 2000). Bemerkenswerterweise wurde bereits 1974 ein [2Fe-2S] MB-Typ Fdx in *E. coli* identifiziert (Knoell & Knappe, 1974), obwohl der Organismus (wie man heute weiß) überhaupt keine Cytochrom P450 Enzyme enthält (Omura, 2010). Das *FDX* Gen in *E. coli* wurde 1999 als Teil des ISC-Genclusters beschrieben (siehe Kapitel 1.3.3). Aus diesem Grund wurde angenommen, dass *FDX* an der Fe/S-Cluster-Biogenese beteiligt ist, wobei die genaue Funktionsweise sowie der Elektronenakzeptor ebenso wie für Yah1 nicht bekannt sind (Lange et al, 2000; Takahashi & Nakamura, 1999). Auch Pflanzen enthalten neben den in Chloroplasten lokalisierten Pflanzen-Typ Ferredoxinen mitochondrial lokalisierte MB-Typ Ferredoxine, die sich im CX<sub>n</sub>CX<sub>2</sub>C Motiv (n = 4 in Pflanzen-Typ Fdx, n = 5 in MB-Typ Fdx) sowie anderen untergruppenspezifischen Resten klar voneinander unterscheiden (**Abb. 1.12**). Beispielsweise ist der Abstand von den ersten drei koordinierenden Cysteinen zum letzten unterschiedlich zwischen Pflanzen-Typ Fdx und MB-Typ Fdx, ebenso wie die unmittelbar benachbarten Reste der Cysteine. Trotz dieser Unterschiede in der Primärstruktur der Kerndomäne weisen bemerkenswerterweise beide Ferredoxin-Typen dieselbe Faltung um den [2Fe-2S] Cluster auf ( $\beta$ -*grasp*, siehe **Abb. 1.10**).

Mitochondriale Ferredoxine aus Pflanzen sind bislang nur für *A. thaliana* beschrieben worden, in der es zwei ähnliche mitochondriale Ferredoxine (85 % Sequenzidentität ohne die Signalsequenz (ca. 60 Aminosäuren)) gibt (**Abb. 1.12**). Es wurde gezeigt, dass der Elektronentransfer über diese Ferredoxine für die Funktion der Biotin-Synthase essentiell ist (Picciocchi et al, 2003). Außerdem konnte die Elektronentransportkette aus NADH/ NADPH, FdxR und den beiden mitochondrialen Ferredoxinen *in vitro* rekonstituiert werden. Da zum Zeitpunkt der Untersuchung noch kein mitochondriales Cytochrom 450 Enzym in Pflanzen bekannt war, wurde die Elektronenübertragung auf das Cytochrom P450 Enzym CYP11B2 aus Rind getestet und kein Transfer gefunden (Takubo et al,

2003). Daher wurde vermutet, dass beide Ferredoxine eine Rolle bei der Biogenese von Fe/S-Clustern spielen könnten (Picciocchi et al, 2003; Takubo et al, 2003).



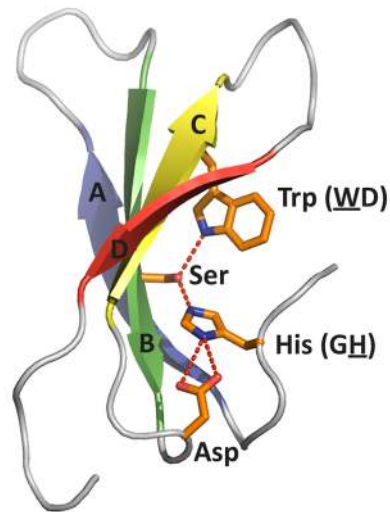
**Abbildung 1.12: Unterscheidung von Pflanzen-Typ und MB-Typ Ferredoxinen.** Multi-Sequenzalignment zum Vergleich von Pflanzen-Typ Ferredoxinen mit MB-Typ Ferredoxinen erstellt mit ClustalW2 (Chenna et al, 2003) und bearbeitet mit Jalview (Waterhouse et al, 2009). Verwendet wurden die Kernsequenzen ohne Mitochondrien-/Chloroplasten-Signalsequenz gesammelt von der UniProt Datenbank verfügbar im World Wide Web. Die Sequenzen sind für Aminosäuren mit Konservierung > 85 % Identität je Untergruppe farbig markiert und zeigen die untergruppenspezifischen Reste an. Die graue Box zeigt die typische Unterscheidungssequenz um die ersten drei koordinierenden Cysteine an. Die Bereiche der Kerndomäne sind mit blauem Schatten unterlegt, die der Interaktionsdomäne mit orangen Schatten (Vgl. auch Abb. 1.10). Verwendet wurden die Pflanzen-Typ Ferredoxine aus Abb. 1.11 sowie folgende MB-Typ Ferredoxine (mit Proteinkennung): *Arabidopsis thaliana* (mitochondriale Ferredoxine: Fdx2a - NP\_001031685.1; Fdx2b - AAL82813.1), *Zea mays* (mitochondriale Ferredoxine: Fdx2a - ACF81722.1; Fdx2b - ACG44621.1), *Chlamydomonas reinhardtii* (Fdx2 - EDO96620.1), *Homo sapiens* (Fdx2 - AAH63460.1), *Homo sapiens* (Fdx1 - NP\_004100.1), *Saccharomyces cerevisiae* (Yah1 - Q12184.1), *Schizosaccharomyces pombe* (Etp1 - NP\_594836.1).

Das mitochondriale Ferredoxin Yah1 aus Hefe ist neben der Biogenese von Fe/S-Clustern auch an anderen metabolischen Prozessen als Elektronentransferprotein beteiligt. Zum einen liefert es Elektronen für die Hydroxylierungsreaktion von Häm O in der Häm A Biosynthese (Barros et al, 2001; Barros et al, 2002), wobei der Elektronenakzeptor noch nicht experimentell verifiziert worden ist. Da allerdings das mitochondriale Ferredoxin in der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* als Fusionsprotein Etp1 mit der mutmaßlichen Monooxygenase Cox15 exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass Cox15 der Elektronenakzeptor in der Biosynthese von Häm A ist. Zum anderen ist erst seit kurzem bekannt, dass Yah1 auch an der Biosynthese von Koenzym Q<sub>6</sub>, dem zentralen Elektronentransporter in der mitochondrialen Atmungskette, beteiligt ist (Pierrel et al, 2010). Der biosynthetische Schritt und der Elektronenakzeptor sind bisher nicht bekannt. Ebenso wenig ist bislang bekannt, ob auch in höheren Eukaryoten mitochondriale Ferredoxine in diesen Biosyntheseprozessen involviert sind.

### **1.5. Das WD-Repeat-Protein Cia1**

Das Protein Cia1 erfüllt in *S. cerevisiae* eine essentielle Funktion in der eukaryotischen CIA-Maschinerie, wo es am zweiten Schritt, dem Transfer des vorgefertigten Fe/S-Clusters in das eigentliche Zielprotein, beteiligt ist (Balk et al, 2005). Cia1 gehört zur großen Gruppe der WD-Repeat Proteine, deren Anzahl in Hefe mit 56 vorhergesagt wird und von denen es in Menschen wohl über 200 gibt (Li & Roberts, 2001; Smith, 2008). Diese Proteine zeichnen sich durch ein sich wiederholendes Motiv mit einem Tryptophan-Glutamat (WD) Dipeptid am Ende aus. Das gesamte Sequenzmotiv umfasst etwa 44 - 60 Aminosäuren und wird als WD-Repeat bezeichnet. Die Anzahl der Wiederholungen kann zwischen vier und sechzehn liegen, am häufigsten treten sieben WD-Repeats auf (Smith et al, 1999). Die Wiederholungseinheit enthält typischerweise das Glycin-Histidin (GH) Dipeptid 11 - 24 Reste nach dem N-Terminus und das Tryptophan-Glutamat (WD) Dipeptid am C-Terminus und ist sonst von der Primärstruktur eher wenig konserviert, wobei sogar weder das GH-Dipeptid noch das WD-Dipeptid streng konserviert sind. Tatsächlich stellt die Wiederholungseinheit eher ein stark konserviertes strukturelles Motiv da: vier antiparallele  $\beta$ -Stränge bilden ein  $\beta$ -Faltblatt, welches durch eine sogenannte strukturelle Tetrade stabilisiert wird (Sondek et al, 1996; Wall et al, 1995). Hierbei handelt es sich um ein Wasserstoffbrückennetzwerk, das von den Seitenketten von vier Aminosäuren gebildet wird (**Abb. 1.13**). Die strukturelle Wiederholungseinheit (ein sogenanntes „blade“ oder Propellerblatt) ist nicht mit einem WD-Repeat identisch, sondern der erste  $\beta$ -Strang des WD-Repeats ( $\beta$ -Strang D) gehört zur vorhergehenden strukturellen Wiederholungseinheit. Mehrere solcher Propellerblätter sind pseudorotations-symmetrisch angeordnet. Die sich ergebene Struktur wird als  $\beta$ -Propeller bezeichnet und durch

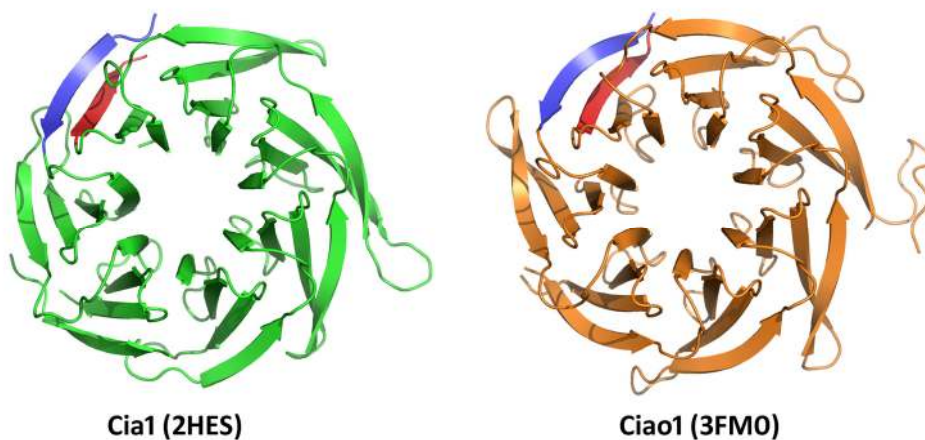
hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den  $\beta$ -Faltblättern stabilisiert. In die Proteinfamilie der  $\beta$ -Propeller Proteine fallen auch andere Proteine, die keine WD-Repeat Proteine sind.



**Abbildung 1.13: Darstellung der strukturellen Wiederholungseinheit (Propellerblatt) eines WD-Repeat Proteins und des sie stabilisierenden Wasserstoffbrückennetzwerkes.** Dargestellt ist Propellerblatt vier der  $\beta$ -Untereinheit des G-Proteins aus Rind (1GOT), des ersten strukturell charakterisierten WD-Repeat Proteins. Die  $\beta$ -Stränge sind aufeinanderfolgend beschriftet von A bis D, wobei A in der Mitte des  $\beta$ -Propellers liegt. Das Wasserstoffbrückennetzwerk wird gebildet aus dem Tryptophan des WD-Dipeptids, dem Histidin des GH-Dipeptids sowie einem Serin (oder Threonin) in  $\beta$ -Strang B sowie einem Aspartat in der BC-Schleufe.

Ein wichtiger Stabilisierungsfaktor bei  $\beta$ -Propeller Proteinen ist die Art der Zyklisierung: das letzte  $\beta$ -Faltblatt wird in den meisten Fällen aus einer Kombination von N- und C-terminalen  $\beta$ -Strängen gebildet. Der entstehende  $\beta$ -Propeller ist vom sogenannten „Velcro-Typ“ (Klettverschluss-Typ) und stabil (Smith, 2008). Nur selten erfolgt der Ringschluss allein durch hydrophobe Wechselwirkungen ohne Beteiligung eines solchen gemischten  $\beta$ -Faltblattes. Entsprechende  $\beta$ -Propeller Proteine sind vom „nicht-Velcro-Typ“ und flexibler.  $\beta$ -Propeller aus WD-Repeats sind oft Domänen von Multidomänen-Proteinen und involviert in vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen. In keinem der bislang untersuchten Fällen war die  $\beta$ -Propeller WD-Repeat Domäne aktiv an einem katalytischen Prozess beteiligt (Smith, 2008). Was alle WD-Repeat Domänen gemeinsam haben, ist nicht die Art und Weise der Substratbindung oder der Stoffwechselweg an dem sie beteiligt sind, sondern vielmehr die Fähigkeit, reversibel mit anderen Proteinen zu interagieren. WD-Repeat Domänen bilden stabile Plattformen, auf denen sich größere Protein-Protein-Komplexe zusammenlagern können (Smith, 2008; Smith et al, 1999), zum Beispiel in Prozessen der Signaltransduktion (G-Protein Untereinheit  $\beta$ ), des Vesikeltransports (Sec13), der Transkriptionskontrolle (Tup1) oder der Zellzykluskontrolle (Cdc4). Das Protein Cia1 erfüllt vermutlich den gleichen Zweck bei der Biogenese von Fe/S-Clustern und ermöglicht die Interaktion von Zielproteinen mit frühen Komponenten der CIA-Maschinerie wie Cfd1-Nbp35 und Nar1. Tatsächlich konnte die direkte Interaktion von Nar1 mit Cia1 in Hefe bereits gezeigt werden (Balk et al, 2005).

Cia1 wurde im Gegensatz zu Cfd1, Nbp35 und Nar1 hauptsächlich im Kern lokalisiert gefunden (Balk et al, 2005). Cia1, das homologe Protein aus menschlichen Zellen, interagiert mit dem Wilms Tumorsuppressorprotein WT1 (Johnstone et al, 1998), einem Zink-abhängigen Transkriptionsfaktor. Es wird daher vermutet, dass Cia1 eine zusätzliche Funktion im Zellkern erfüllt. Die Struktur von Cia1 aus Hefe ist seit 2007 bekannt (Srinivasan et al, 2007) und seit 2009 ist auch die Struktur von Cia1 verfügbar (**Abb. 1.14**). Beide bestehen nur aus einer WD-Repeat Domäne mit sieben WD-Repeats, Interaktionen werden vermutlich durch die Schlaufen zwischen den  $\beta$ -Strängen vermittelt. Von WD-Repeat Domänen ist bekannt, dass die Substratbindung sowohl an der zentralen Tunnelregion (Couture et al, 2006; Dou et al, 2006; Jennings et al, 2006; Ruthenburg et al, 2006; Schuetz et al, 2006) als auch an ein oder zwei Propellerblätter erfolgen kann (Ford et al, 1998; Song et al, 2008).



**Abbildung 1.14: Struktur des WD-Repeat Proteins Cia1.** Vergleich der Strukturen von Cia1 aus Hefe (grün, 2HES) und Cia1 aus Mensch (orange, 3FM0) mit dem N-terminalen  $\beta$ -Strang in blau und dem C-terminalen  $\beta$ -Strang in rot zur besseren Visualisierung der „Velcro-Typ“ (Klettverschluss-Typ) Zyklisierung. Aufsicht auf den  $\beta$ -Propeller, per Festlegung ist dies die Seite mit den DA Schlaufen (Srinivasan et al, 2007). Beide Strukturen sind ähnlich und unterscheiden sich nur in manchen Schlaufen, die unterschiedlich lang und wegen intrinsischer Flexibilität zum Teil in der Struktur nicht definiert sind.

## 1.6. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Fe/S-Proteine spielen eine essentielle Rolle in einer Vielzahl grundlegender metabolischer Prozesse und aus diesem Grund ist das Verständnis ihrer Biogenese und speziell ihrer Kofaktoren, der Fe/S-Cluster, von enormem wissenschaftlichem Interesse. Auch zum Verstehen und möglicherweise zur Behandlung von Krankheiten, die mit einer Fehlfunktion von Fe/S-Proteinen oder Fe/S-Cluster Biogenese-Komponenten verbunden sind, ist eine Klärung der zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen unerlässlich. Der Prozess der Fe/S-Cluster-Biogenese in Eukaryoten ist hinsichtlich der beteiligten Proteine relativ gut verstanden. Im Modellorganismus *S. cerevisiae* sind mittlerweile 15 Proteine der mitochondrialen ISC-Maschinerie, drei Komponenten der ISC-Export-Maschinerie und sechs Komponenten der der zytosolischen CIA-Maschinerie bekannt. Zwei weitere CIA-Komponenten sind kürzlich identifiziert worden (J. Mascarenhas, persönliche Mitteilung). Es ist



deshalb davon auszugehen, dass der Großteil der Biogeneseenzyme bereits beschrieben worden ist. Grundsätzlich scheinen alle bakteriellen und eukaryotischen Biogenese-Systeme dem gleichen biosynthetischen Prinzip mit zwei Hauptreaktionen zu folgen: Erstens die *de novo* Assemblierung eines Fe/S-Clusters auf einem Gerüstprotein und zweitens der Transfer dieses vorgefertigten Fe/S-Clusters in das eigentliche Zielprotein (Lill, 2009). Trotz der Kenntnis der Biogenesekomponenten und vielfältiger Hypothesen bezüglich ihrer individuellen Funktion ist der molekulare Ablauf und Mechanismus sowohl der *de novo* Fe/S-Cluster Biogenese als auch des Transfers von Fe/S-Clustern bislang erst schlecht verstanden (Lill, 2009).

Ein grundsätzliches Problem bei der Klärung der molekularen Mechanismen ist, dass für diese Untersuchungen in der Regel mit gereinigten Proteinen gearbeitet werden muss und die Übertragbarkeit dieser *in vitro* Studien auf die *in vivo* Situation mitunter nur schwer zu überprüfen ist. Als Beispiel hierfür sei genannt, dass trotz der Identifizierung und Charakterisierung der ersten Cysteindesulfurase NifS 1993 durch Zheng und Kollegen (Zheng et al, 1993) bis heute immer noch unklar ist, wie die physiologische Schwefelfreisetzung und der Schwefeltransfer *in vivo* vonstattengehen. *In vitro* erfolgt der Cysteindesulfurase-vermittelte Reaktionsumsatz in Gegenwart chemischer Konzentrationen DTT oder 2-Mercaptoethanol, welche beide keine physiologisch relevanten Komponenten sind. Beide Reduktionsmittel führen zur Umwandlung des Desulfurase-gebundenen Persulfids zu freiem Sulfid ( $S^{2-}$ ). Deshalb entsprechen durch Cysteindesulfurase-vermittelte Rekonstitutionen *in vitro* eher einer chemischen Rekonstitution und nicht der *in vivo* Situation der Enzym-vermittelten Schwefelübertragung. Die Abhängigkeit der *de novo* Fe/S-Cluster Biosynthese von der Elektronentransferkette Arh1-Yah1 ist bekannt (Muhlenhoff et al, 2003), die genaue Rolle und der Mechanismus der *in vivo* Reduktion sind allerdings noch zu identifizieren. In diesem Zusammenhang ist noch nicht genau geklärt, in welcher Form der Schwefel an Isu1 bindet und in den Fe/S-Cluster eingebaut wird. Ebenso wenig ist geklärt, ob die Schwefelübertragung vor, während oder nach der Eisenbindung geschieht. Viele Fragen bestehen hinsichtlich der genauen Rolle weiterer Komponenten der ISC-Maschinerie, der ISC-Export-Maschinerie und der CIA-Maschinerie. An dieser Stelle seien beispielhaft die Frage nach der Funktion des nur in Eukaryoten vorkommenden Proteins Isd11, der Mechanismus der Umwandlung eines [2Fe-2S] Clusters zu einem [4Fe-4S] Cluster, das unbekannte Substrat der Exportreaktion und die Rolle von Erv1, der Fe/S-Cluster Zusammenbau auf dem zytosolischen Gerüst Cfd1-Nbp35 sowie das Zusammenspiel von Nar1 mit Cia1 und weiteren CIA-Komponenten beim Transfer des vorgefertigten Fe/S-Cluster in Zielproteine genannt.

Ziel dieser Arbeit war es, einige offene Fragen zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen bei der Biogenese von Fe/S-Clustern in eukaryotischen Zellen zu klären. Dazu wurden biochemische und strukturelle Untersuchungen durchgeführt, die durch funktionelle Analysen *in vivo*

und *in vitro* ergänzt wurden. Die erste bearbeitete Fragestellung betraf das Verständnis der hochspezifischen MB-Typ Ferredoxine Yah1 (Hefe) sowie Fdx1 und Fdx2 (beide Mensch). Während Yah1 aus Hefe an der Biogenese von Fe/S-Clustern sowie der Biosynthese von Häm A und Koenzym Q<sub>6</sub> beteiligt ist (Barros et al, 2001; Barros et al, 2002; Lange et al, 2000; Pierrel et al, 2010), konnte kürzlich gezeigt werden, dass das humane Ferredoxin Fdx1 spezifisch Elektronen für die Steroidhormonbiosynthese liefert, wohingegen Fdx2 essentiell ist für die Biosynthese von Fe/S-Clustern und Häm A ist (Sheftel et al, 2010). Der großen Ähnlichkeit der humanen Proteine Fdx1 und Fdx2 (41 % Sequenzidentität; 66 % Sequenzähnlichkeit) steht eine verblüffend hohe Funktions- und Substratspezifität gegenüber, deren molekulare Ursachen ermittelt werden sollten. Dazu war es zunächst nötig, die 3D-Struktur des Fdx2 zu bestimmen, um dann einen strukturellen Vergleich mit der bekannten Struktur des Fdx1 durchzuführen. Dies sollte als Ausgangspunkt für die molekulare Analyse der für die hohe Substratspezifität wichtigen strukturellen Parameter dienen. In diesem Zusammenhang sollte schlussendlich versucht werden, die Funktionalität der Proteine Fdx1 und Fdx2 umzukehren, um so die Relevanz der spezifischen Proteinabschnitte für die jeweilige Funktion zu verifizieren. In einem zweiten Projekt sollte das Gerüstprotein Isu1 als möglicher neuer Interaktionspartner des Hefe Ferredoxins Yah1 untersucht werden. Im Gegensatz zu den Elektronenempfängern von Fdx1 in der Steroidhormonbiosynthese ist bislang weder für Yah1 noch Fdx2 der Elektronenakzeptor in der Biogenese von Fe/S-Clustern in der ISC-Maschinerie bekannt. Sowohl das Verstehen der Spezifitäten von Fdx1 und Fdx2 als auch der Nachweis des Elektronenempfängers von Yah1 oder Fdx2 in der Fe/S-Cluster Biogenese sind wichtig für das bessere Verständnis des *de novo* Fe/S-Cluster Zusammenbaus auf dem Gerüstprotein Isu1.

Eine dritte in dieser Arbeit bearbeitete Fragestellung betraf die Funktion des Proteins Cia1 der CIA-Maschinerie. Cia1 ist ein WD-Repeat Protein und aufgrund seiner Zugehörigkeit zu dieser Proteinfamilie wird eine Rolle als Interaktionsplattform für andere CIA-Faktoren angenommen. Cia1 interagiert mit dem CIA-Protein Nar1 (Balk et al, 2005) und durch parallele Arbeiten konnten mittlerweile zwei weitere Interaktionspartner von Cia1 identifiziert werden (J. Mascarenhas, persönliche Mitteilung). Ausgehend von der bekannten Cia1 Struktur (Srinivasan et al, 2007) sollte eine struktur-basierte Analyse zur Auswahl von konservierten Oberflächenresten führen, deren funktionelle Rolle durch eine Mutagenesestudie und zellbiologische Untersuchungen getestet werden sollte. Basierend auf der Hypothese, dass Cia1 als Interaktionsplattform für weitere CIA-Komponenten fungiert, sollte der Einfluss der Mutationen auf die Interaktion mit diesen CIA-Komponenten analysiert und so mögliche Bindestellen für CIA-Partnerproteine identifiziert und kartiert werden.

## 2 Material

### 2.1. Geräte

Gerät	Bezeichnung ( <i>Hersteller</i> )
Autoklav	Systec V-150 ( <i>Systec</i> )
Blotapparatur	Sedec M ( <i>peqlab</i> )
Dokumentationssystem	
für Agarosegele:	GDS ( <i>Intas</i> )
für Chemilumineszenz:	Chemostar professional ( <i>Intas</i> )
Elektrophoresesysteme	
für Agarosegele:	Model B1A ( <i>Owl separations systems</i> )
für SDS-PAGE:	Minigel-Twin ( <i>Biometra</i> )
Emulsifier	EmulsiFlex® C3 ( <i>Avestin</i> )
Fluoreszenzspektrometer	FP-6300 ( <i>Jasco</i> )
FPLC-System	ÄKTA™purifier 10 mit Monitor UV-900 und Fraktionskollektor Frac-950 ( <i>GE Healthcare</i> )
Kristallisationsroboter	Cartesian Microsys™ SQ4000 ( <i>Genomic Solutions</i> )
Mikroskope	SZ-ST mit SZ-60 optischer Aufbau ( <i>Olympus</i> ), MZ 8 ( <i>Leica</i> )
pH-Meter	UB-10 ( <i>Denver Instruments</i> )
Plattenlesegerät	Infinite® M200 ( <i>Tecan</i> )
UV/VIS-Spektralphotometer	U-550 ( <i>Jasco</i> )
Waagen	PT 1500 ( <i>Sartorius</i> ) und SBC22 ( <i>Saltec</i> )
Zentrifugen	Biofuge pico ( <i>Heraeus</i> ), Fresco 21 ( <i>Heraeus</i> ), Avanti J20 XP ( <i>Beckmann</i> )

### 2.2. Chemikalien, Enzyme und Größenstandards

#### 2.2.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden in mindestens 99 % oder der höchsten verfügbaren Qualität verwendet und von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Roth*, *Merck KGaA*, *Serva*, *Difco Laboratories* oder *AppliChem* bezogen.

#### 2.2.2. Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen *Fermentas* oder *New England Biolabs* bezogen. Außerdem wurden folgende weitere Enzyme verwendet:

Phusion® DNA Polymerase (*Finnzymes*), T4 DNA Ligase (*New England Biolabs*) sowie Alkalische Phosphatase (*Fermentas*).

### 2.2.3. Größenstandards

Der Größenstandard für die Agarosegelelektrophorese war „GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder“ (*Fermentas*). Für die SDS-PAGE wurde ebenfalls von der Firma *Fermentas* das Produkt „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ verwendet. Zur Kalibration von Gelfiltrationssäulen wurde das „Kit for Molecular Weights 29000 - 700000“ der Firma *Sigma-Aldrich* sowie Cytochrom c von der gleichen Firma benutzt.

## 2.3. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma *Metabion* hergestellt und sind nachfolgend nach Verwendung sortiert aufgelistet.

### 2.3.1. Primer zur Konstruktion heterologer Genexpressionsvektoren für *E. coli*.

#### 2.3.1.1. ..von *YAH1 (S. cerevisiae)*, *FDX1 (H. sapiens)* und *FDX2 (H. sapiens)*

Name	Sequenz (5'→3')	Zielvektor
h_Fdx1_NheI_for	CAAATGGCTAGCGAAGATAAAATAACAG	pASK-IBA43plus
h_Fdx1_minusC_HindIII_rev	GTAAAAAGCTTTTAAGCCACTGTTTCAGG	pASK-IBA43plus
h_Fdx1_fullC_HindIII_rev	GTAAAAAGCTTTCAGGAGGTCTTGC	pASK-IBA43plus
h_Fdx2_NheI_for	CAAATGGCTAGCGACGTGGTGAACGTG	pASK-IBA43plus
h_Fdx2_minusC_HindIII_rev	GTCGAAAGCTTTCACCTGGTGATCTTGGG	pASK-IBA43plus
h_Fdx2_fullC_HindIII_rev	GTCGAAAGCTTTCAGTGGGGCTTGGG	pASK-IBA43plus
Yah1_NheI_Strep_for	GTTAGCTAGCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAAGCGCTG GCGAAGAAGCTGAAGATAAC	pASK-IBA43plus
Yah1_HindIII_rev	GGTCAAGCTTAACTAAAATCGTTGTTATTAACG	pASK-IBA43plus

Die Primer „h\_Fdx1\_minusC\_HindIII\_rev“ und „h\_Fdx2\_minusC\_HindIII\_rev“ hybridisieren 12 Aminosäuren vor dem Stopp-Codon und führen zu einem C-terminal verkürztem Gen. Der Primer „Yah1\_NheI\_Strep\_for“ führt über den 5'-Überhang einen Strep-tag® ein.

#### 2.3.1.2. ..*ISU1 (S. cerevisiae)*

Name	Sequenz (5'→3')	Zielvektor
Isu1p_NheI_for	GTAAGCTAGCTATCATCCAAGGTCATAG	pASK-IBA43plus
Isu1p_NcoI_rev	CAATCCATGGGATAACATGGTTGGAGTG	pASK-IBA43plus

### 2.3.2. Primer zur Konstruktion von Genexpressionsvektoren für *S. cerevisiae*..

#### 2.3.2.1. ..von *FDX1* und *FDX2* (beide *H. sapiens*)

Name	Sequenz (5'→3')	Zielvektor
h_Fdx1_BamHI_for	CAATGGATCCAGCGAAGATAAAATAAC	p426-TDH3
h_Fdx1_fullC_XhoI_rev	GTAATACTCGAGTCAGGAGGTCTTGCCC	p426-TDH3
h_Fdx1_ex14_XhoI_rev	TGACTCGAGTCAGTGGGGCTTGGGGACATGGCCATCCACGTAGA AGTTCCTGGTTGTTTCAGGCACTCG	p426-TDH3
h_Fdx1_ex27_EcoRI_rev	CAATGAATTCCGCTCCTTCCAGCTCCGGTGTCAAACAGATTTGGC	p426-TDH3
h_Fdx1_ex27_EcoRI_for	CAATGAATTCACCTGCCCAAGATCACCAGGAAGTCTACGTGG	p426-TDH3
426_Bsp1407I_rev	CGTCTGTACAGAAAAAAG	p426-TDH3
h_Fdx2_Bgl II for	ATGGTAAGATCTCCGGCTGGAGAGGAGGACGC	p426-TDH3
h_Fdx2_minN14_Bgl II_for	GTGGTAAGATCTGACGTGGTGAACGTGGTG	p426-TDH3
h_Fdx2_minusC_XhoI_rev	CTGATACTCGAGTCACCTGGTGATCTTGGG	p426-TDH3
h_Fdx2_fullC_XhoI_rev	GTAATACTCGAGTCAGTGGGGCTTGGGGAC	p426-TDH3

C- oder N-terminale Verkürzungen wurden durch Primer erreicht, die an den entsprechenden Stellen in den Genen hybridisieren. Der Austausch des C-Terminus von Fdx1 zur entsprechenden Fdx2-Sequenz wurde durch 5'-Überhänge an die Rückwärtsprimer und im weiteren durch die Einführung von *EcoRI*/*Bsp1407I*-Schnittstellen erreicht.

#### 2.3.2.2. ..von *YAH1* (*S. cerevisiae*)

Name	Sequenz (5'→3')	Zielvektor
Yah1_SacI_for	CTAGGAGCTCAAATAACAACAATATAC	p416-MET25
Yah1_HindIII_rev	GAATAAGCTTTTAACTAAAATCGTTG	p416-MET25
Yah1_minusC_HindIII_rev	GAATAAGCTTTTACATCTGGGGCAGAGC	p416-MET25
TDH3-new	GTAGGTATTGATTGTAATTCTG	p416-MET25

Der Yah1-ORF wurde aus dem Plasmid Yah1-426 (siehe 2.4.1.) mit Hilfe des Vektorprimers „TDH3-new“ und der Rückwärtsprimer amplifiziert und anschließend in das Plasmid p416-MET25 kloniert. Der Primer „Yah1\_SacI\_for“ diente zur Amplifikation des Yah1-ORF mit dem endogenen Promotor (-308 bis -1 Sequenz) aus genomischer DNA.

### 2.3.3. Primer zur Mutagenese von *YAH1*, *CIA1*, *FDX1* und *FDX2*

Die Mutagenese der Plasmid-kodierten Gene erfolgte nach dem „QuikChange® Site-Directed Mutagenesis“ Protokoll der Firma *Stratagene* oder nach dem modifizierten Protokoll von Zheng, Baumann und Raymond (Zheng et al, 2004) und ist in Kapitel 3.1. beschrieben. Die benötigten Primer wurden nach den entsprechenden Protokollangaben entworfen und sind im Anhang aufgelistet. Verwendet wurden die Primer zur Mutagenese sowohl der heterologen Genexpressionsvektoren in *E. coli* als auch der Genexpressionsvektoren für *S. cerevisiae*. Durch sequenzielle Verwendung der Primer in aufeinanderfolgenden Mutagenese-PCR-Reaktionen wurden verschiedene Mutationen miteinander kombiniert.

## 2.4. Plasmide

Durch DNA-Sequenzierung (Firma *Seqlab*) wurden alle Plasmide überprüft und so die Richtigkeit der DNA-Sequenzen sichergestellt.

### 2.4.1. Ausgangsplasmide

Plasmid	Beschreibung	Marker	Referenz
pASK-IBA43plus	ohne Insert	Amp <sup>R</sup>	Firma <i>IBA GmbH</i>
p416-MET25	ohne Insert	Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i>	(Mumberg et al, 1995)
p426-TDH3	ohne Insert	Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i>	(Mumberg et al, 1995)
p426mitocyto-TDH3	ohne Insert; mit F1 $\beta$ -Präsequenz	Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i>	A. Pierik
pETDuet1-HisFdx1	humanes His <sub>6</sub> -tagged Fdx1 in pETDuet1	Amp <sup>R</sup>	(Sheftel et al, 2010)
pETDuet1-HisFdx2	humanes His <sub>6</sub> -tagged Fdx2 in pETDuet1	Amp <sup>R</sup>	(Sheftel et al, 2010)
pET15b-G58-Yah1	<i>S. cerevisiae</i> Yah1 ab As Gly58 in pET15b	Amp <sup>R</sup>	U. Mühlenhoff
p426-Yah1	<i>S. cerevisiae</i> Yah1 ORF in 426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i>	U. Mühlenhoff
pET15b-Y35-Isu1	<i>S. cerevisiae</i> Isu1 ab As Tyr35 in pET15b	Amp <sup>R</sup>	U. Mühlenhoff
pET21d-Isu1His	<i>S. cerevisiae</i> Isu1 ab As Tyr35 C-terminal His <sub>6</sub> -tagged in pET21d	Amp <sup>R</sup>	(Dutkiewicz et al, 2003)
p416-Cia1HA	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i>	(Balk et al, 2005)
p426-Cia1HA	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i>	(Balk et al, 2005)
pFET3-GFP(TRP)	GFP unter der Kontrolle des Fet3-Promotors	Amp <sup>R</sup> , TRP1	(Rutherford et al, 2005)

### 2.4.2. Plasmide zur Expression von *YAH1*, *ISU1*, *FDX1* und *FDX2* in *E. coli*

Die Nummerierung der Aminosäuren bei Fdx1 und Fdx2 folgt der in der Literatur üblichen Zählweise von bovinem Adrenodoxin.

Plasmid	Beschreibung	Marker	Referenz
pIBA43-Fdx1	humanes Fdx1 in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA43-Fdx2	humanes Fdx2 in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA43-Isu1-Strep	<i>S. cerevisiae</i> Isu1 ab As Tyr58 C-terminal Strep-tagged in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA43-Yah1-Strep	<i>S. cerevisiae</i> Yah1 ab As Gly58 C-terminal Strep-tagged in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA43-Fdx1-C12	humanes Fdx1 C-terminal 12As verkürzt in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA43-Fdx2-C12	humanes Fdx2 C-terminal 12As verkürzt in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pETDuet1-HisFdx1-M4	humanes His <sub>6</sub> -tagged Fdx1 mit Mutation L57V-I58Y-F59V in pETDuet1	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pETDuet1-HisFdx1-FGDel	humanes His <sub>6</sub> -tagged Fdx1 mit Deletion As F43-G44 in pETDuet1	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit

pIBA43-Fdx2-M4	humanes Fdx2 mit Mutation V57L-Y58I-V59F in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA43-Fdx2-R70E	humanes Fdx2 mit Mutation R70E in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA43-Fdx2-FGIns	humanes Fdx2 mit Insertion F43-G44 in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA43-Fdx2-C12-FGIns	humanes Fdx2 C-terminal 12As verkürzt plus Insertion F43-G44 in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA43-Fdx2-C12-R70E	humanes Fdx2 C-terminal 12As verkürzt plus Mutation R70E in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA43-Fdx2-M4-R2	humanes Fdx2 mit Mutationen V57L-Y58I-V59F sowie R2 (HLAQRH->DVVVV; As 31-36) in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA43-Fdx2-C12-M4-R2	humanes Fdx2 C-terminal 12As verkürzt mit Mutationen V57L-Y58I-V59F sowie R2 (s.o.) in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA43-Fdx2-M4-R2-FGIns	humanes Fdx2 mit Mutationen V57L-Y58I-V59F sowie R2 (s.o.) und Insertion F43-G44 in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA43-Fdx2-C12-M4-R2-FGIns	humanes Fdx2 C-terminal 12As verkürzt mit Mutationen V57L-Y58I-V59F sowie R2 (s.o.) und Insertion F43-G44 in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA43-Fdx2-C12-FGIns-R70E	humanes Fdx2 C-terminal 12As verkürzt plus Mutation R70E und Insertion F43-G44 in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIBA43-Fdx2-C12-FGIns-R2-R70E	humanes Fdx2 C-terminal 12As verkürzt plus Mutation R70E sowie R2 (s.o.) und Insertion F43-G44 in pASK-IBA43plus	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit

### 2.4.3. Vektoren zur Expression von *FDX2* in *S. cerevisiae*

Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt analog der von bovinem Adrenodoxin.

Plasmid	Beschreibung	Marker	Referenz
p426-Fdx2	Humanes Fdx2 mit F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx2-C12	Humanes Fdx2 C-terminal 12As verkürzt mit F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx2-N1	Humanes Fdx2 N-terminal 13As verkürzt mit F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx2-N13-C12	Humanes Fdx2 N-terminal 13As und C-terminal 12 As verkürzt mit F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx2-P82Y	Humanes Fdx2 mit P82Y Mutation und F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx2-FGIns	Humanes Fdx2 mit Insertion F43-G44 und F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx2-FGIns-C12	Humanes Fdx2 C-terminal 12As verkürzt mit Insertion F43-G44 und F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx2-M1	Humanes Fdx2 mit N28S-Y29L Mutation (M1) und F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx2-M2	Humanes Fdx2 mit L40I-E41D Mutation (M2) und F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit

p426-Fdx2-M3	Humanes Fdx2 mit A48G-S49T Mutation (M3) und F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx2-M4	Humanes Fdx2 mit V57L-Y58I-V59F Mutation (M4) und F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx2-M5	Humanes Fdx2 mit P82Y-L83G Mutation (M5) und F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx2-M6	Humanes Fdx2 mit Q85T-E86D-N87R Mutation (M6) und F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx2-R1	Humanes Fdx2 mit Mutation R1 (QRIPVS→ETLTTK(As17-22)) und F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx2-R2	Humanes Fdx2 mit Mutation R2 (HLAQRH→DVVVEN(As31-36)) und F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx2-R3	Humanes Fdx2 mit Mutation R3 (PPPE→DAIT(As68-71)) und F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit

#### 2.4.4. Vektoren zur Expression von YAH1 in *S. cerevisiae*

Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt analog der von bovinem Adrenodoxin.

Plasmid	Beschreibung	Marker	Referenz
p416-Yah1	<i>S. cerevisiae</i> Yah1-ORF in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Yah1-C10	<i>S. cerevisiae</i> Yah1-ORF C-terminal 10As verkürzt in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-endPYah1	<i>S. cerevisiae</i> -308 bis -1 Sequenz + Yah1-ORF in p416	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-endPYah1-C10	<i>S. cerevisiae</i> -308 bis -1 Sequenz + Yah1-ORF C-terminal 10As verkürzt in p416	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-endPYah1-FG	<i>S. cerevisiae</i> -308 bis -1 Sequenz + Yah1-ORF plus Insertion F43-G44 in p416	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-endPYah1-FG-C10	<i>S. cerevisiae</i> -308 bis -1 Sequenz + Yah1-ORF C-terminal 10As verkürzt plus Insertion F43-G44 in p416	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-endPYah1-M4F1	<i>S. cerevisiae</i> -308 bis -1 Sequenz + Yah1-ORF sowie Mutation V57L-V59F (Fdx1 Sequenz) in p416	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-endPYah1-M4F2	<i>S. cerevisiae</i> -308 bis -1 Sequenz + Yah1-ORF sowie Mutation I58Y (Fdx2 Sequenz) in p416	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit

#### 2.4.5. Vektoren zur Expression von FDX1 in *S. cerevisiae*

Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt analog der von bovinem Adrenodoxin.

Plasmid	Beschreibung	Marker	Referenz
p426-Fdx1	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-ex14	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und Austausch 14 C-terminale As Fdx1→Fdx2 (ex14) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-ex27	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und Austausch 27C-terminale As Fdx1→Fdx2 (ex27) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit



p426-Fdx1-M4	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und Mutation L57V-I58Y-F59V (M4) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-FGDel	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und Deletion F43-G44 (FGDel) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-ex27-FGDel	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und ex27 (s.o.) sowie FGDel (s.o.) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-ex14-M4	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und ex14 (s.o.) sowie M4 (s.o.) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-ex27-M4	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und ex27 (s.o.) sowie M4 (s.o.) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-ex27-FGDel-M4	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und ex27 (s.o.) sowie FGDel (s.o.) und M4 (s.o.) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-ex27-FGDel-R1	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und ex27 (s.o.) sowie FGDel (s.o.) und R1 Mutation (ETLTK $\rightarrow$ QRIPVS(As17-22)) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-ex27-FGDel-R2	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und ex27 (s.o.) sowie FGDel (s.o.) und R2 Mutation (DVVVEN $\rightarrow$ HLAQRH(As31-36)) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-ex27-FGDel-R3	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und ex27 (s.o.) sowie FGDel (s.o.) und R3 Mutation DAIT $\rightarrow$ PPPE(As68-71)) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-ex27-FGDel-M4-R2	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und ex27 (s.o.) sowie FGDel (s.o.), M4 (s.o.) und R2 Mutation (s.o.) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-M4-R2	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und M4 (s.o.) sowie R2 (s.o.) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-M4-M3	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und M4 (s.o.) sowie M3 Mutation (G48A-T49S) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-ex27-M4-M3	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und ex27 (s.o.) sowie M4 (s.o.) und M3 Mutation (s.o.) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-ex27-M4-R2	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und ex27 (s.o.) sowie M4 (s.o.) und R2 Mutation (s.o.) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p426-Fdx1-ex27-M4-R2-M3	Humanes Fdx1 mit F1 $\beta$ -Präsequenz und ex27 (s.o.) sowie M4 (s.o.), R2 (s.o.) und M3 Mutation (s.o.) in p426-TDH3	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit

#### 2.4.6. Vektoren zur Expression von *CIA1* in *S. cerevisiae*

Plasmid	Beschreibung	Marker	Referenz
p416-Cia1HA-K16Q	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged K16Q-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-R34E	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged R34E-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-E54K	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged E54K-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-K59E	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged K59E-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit

p416-Cia1HA-D79R	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged D79R-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-E104R	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged E104R-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-E107R	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged E107R-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-R127E	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged R127E-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-E142K	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged E142K-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-Q154R	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged Q154R-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-Y173A	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged Y173A-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-D184R	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged D184R-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-E197K	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged E197K-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-D234R	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged D234R-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-R251E	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged R251E-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-F260S	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged F260S-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-D270R	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged D270R-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-D280R	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged D280R-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-D79R-R127E	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged R127E- und D79R-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-E104R-R127E	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged R127E- und E104R-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-E107R-R127E	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged R127E- und E107R-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-E142K-R127E	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged R127E- und E142K-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-Q154R-R127E	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged R127E- und Q154R-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-Y173A-R127E	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged R127E- und Y173A-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-D219R-R127E	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged R127E- und D219R-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-D270R-R127E	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged R127E- und D270R-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit
p416-Cia1HA-E297K-R127E	<i>S. cerevisiae</i> Cia1 C-terminal HA <sub>3</sub> -tagged R127E- und E297K-Mutation in p416-MET25	Amp <sup>R</sup> , URA3	diese Arbeit

## 2.5. Bakterien- und Hefestämme

### 2.5.1. *E. coli* DH5 $\alpha$ (Invitrogen)

**Genotyp:**  $F \phi 80 \Delta lacZ \Delta M15 \Delta (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k^- m_k^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 \lambda^-$

Aufgrund der Deletion von EndonucleaseA und dem DNA-Reperaturenzym RecA zeichnet sich dieser Stamm durch seine hohe Transformationseffizienz und Plasmidreplikationsrate aus. Alle Klonierungen, Plasmidvervielfältigungen und Plasmid-Mutagenese-Transformationen wurden mit chemisch kompetenten Zellen dieses Stamms durchgeführt.

### 2.5.2. *E. coli* BL21(DE3)-Gold (Invitrogen)

**Genotyp:**  $F ompT, hsdS_B(r_B^- m_B^-), dcm^+ Tet^r gal\lambda(DE3) endA Hte$

Dieser Stamm ist defizient für die OmpT- und Lon-Protease und aus diesem Grund gut geeignet für die Expression von Genen. Außerdem hat dieser *E. coli*-Stamm über den DE3-Prophagen das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotor ins Genom integriert und kann daher auch für die IPTG induzierbare heterologe Expression von Plasmiden mit T7-Promotor (Rosenberg et al, 1987; Studier & Moffatt, 1986; Studier et al, 1990) verwendet werden.

### 2.5.3. *E. coli* C41 (DE3)

**Genotyp:**  $F ompT, hsdS_B(r_B^- m_B^-), dcm^+ lon \lambda(DE3)$  und eine uncharakterisierte Mutation

Dieser Stamm ist eine Mutante des BL21(DE3) Stammes, der sich zur Expression von für *E. coli* schädlichen Proteinen eignet (Miroux & Walker, 1996).

### 2.5.4. *S. cerevisiae* W303-1A

**Genotyp:**  $MATa, ura3-1, ade2-1, trp1-1, his3-11,15, leu2-3,112, can1-100$

Der haploide Hefestamm W303-1A ist auxotroph für die Aminosäuren L-Leucin, L-Tryptophan und L-Histidin sowie für Adenin und Uracil und wurde als Wild-Typ Stamm verwendet. Er ist erhältlich von der Firma *Open biosystems* unter der Stammnummer YSC1058.

### 2.5.5. *S. cerevisiae* Gal-YAH1

**Genotyp:**  $MATa, ura3-1, ade2-1, trp1-1, his3-11,15, leu2-3,112, can1-100, P_{YAH1}::LEU2-P_{GAL1-10}$

Im Stamm Gal-YAH1 wurde der endogene *YAH1* Promotor durch den Galaktose induzierbaren *GAL1-10* Promotor ersetzt (Lange et al, 2000). Der Promotoraustausch wurde mit dem LEU2-Gen als Marker durchgeführt und umfasste die Nukleotide -412 bis -1 vor Beginn des *YAH1*-ORF.

### 2.5.6. *S. cerevisiae* Gal-CIA1

**Genotyp:** *MATa*, *ura3-1*, *ade2-1*, *trp1-1*, *his3-11,15*, *leu2-3,112*, *can1-100*,  $P_{CIA1}::HIS3-P_{GAL1-10}$

Der Stamm Gal-CIA1 wurde durch Austausch des endogenen *CIA1*-Promotors (Nukleotide -273 bis -1) gegen den Galaktose induzierbaren *GAL1-10* Promotor durch homologe Rekombination hergestellt (Balk et al, 2005). Als Marker diente hierbei das *HIS3* Gen.

### 2.5.7. *S. cerevisiae* YAH1TAP

**Genotyp:** *MATa*, *ade2-1*, *arg4*, *leu2-3, 112*, *trp1-189*, *ura3-52*, *YAH1::YAH1-TAP-URA3*

Der Stamm YAH1TAP (SC0403) zeichnet sich durch einen C-terminalen TAP-tag am *YAH1* Gen aus und stammt von der Firma *Cellzome* (Gavin et al, 2002). Als Marker dient das *URA3* Gen.

### 2.5.8. *S. cerevisiae* IBA57TAP

**Genotyp:** *MATa*, *ade2-1*, *arg4*, *leu2-3, 112*, *trp1-189*, *ura3-52*, *IBA57::TAP-URA3*

Ebenfalls von der Firma *Cellzome* (Gavin et al, 2002) stammt der Stamm IBA57TAP (SC1773), der einen C terminalen TAP-tag am *IBA57* Gen besitzt. Als Marker dient wieder das *URA3* Gen.

## 2.6. Medien

### 2.6.1. Kultivierung von *E. coli*

Es wurde LB-Medium zur Kultivierung von *E. coli* verwendet (Sambrook & Russel, 2001). Je nach Selektionsmarker wurde das LB-Medium mit Antibiotika folgender Endkonzentrationen ergänzt: Ampicillin 100 µg/ mL; Chloramphenicol 34 µg/ µL. Die Standardinkubationstemperatur war 37 °C.

LB-Medium	
3Trypton	10 g/ L
Hefeextrakt	5 g/ L
NaCl	10 g/ L
10 N NaOH-Lösung	0,4 mL/ L

Das Medium wurde nach Lösen in dH<sub>2</sub>O für 20 min bei 121 °C und 1,5 bar autoklaviert. Für die Herstellung von Agarplatten wurden 15 g/ L Agar zum LB-Medium hinzugegeben und die Antibiotika nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60 °C zugemischt.

### 2.6.2. Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte bei 30 °C in Vollmedium (YP), Synthetischem Minimalmedium oder Synthetischem Komplettmedium (SC). Zugemischt wurden noch eine Kohlenstoffquelle und je nach Bedarf verschiedene Aminosäuren und andere Zusätze. Agarplatten enthielten zudem noch 20 g/ L Agar.

YP-Medium	
Hefeextrakt	10 g/ L
Casein Pepton	20 g/ L
Adeninsulfat	80 mg/ L

Durch Zusatz verschiedener Kohlenstoffquellen zum YP-Medium ergaben sich folgende Vollmedien:

<b>YPD-Medium</b>	20 g/ L Glukose
<b>YPGal-Medium</b>	20 g/ L Galaktose
<b>YPGly-Medium</b>	30 g/ L Glycerol
<b>YPDGly-Medium</b>	30 g/ L Glycerol + 0,5 g/ L Glukose

Synthetisches Minimalmedium basiert auf folgender Zusammensetzung, ergänzt um die Markersubstanzen und eine Kohlenstoffquelle:

Synthetisches Minimalmedium	
Yeast Nitrogen Base without Amino Acids & Ammonium Sulphate (Firma <i>Formedium LTD</i> )	1,9 g/ L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g/ L

Da die verwendeten Hefen verschiedene Auxotrophien für Adenin, Uracil, Leucin, Tryptophan und Histidin besaßen, wurden diese Markersubstanzen nach Bedarf zusätzlich zugegeben.

Markersubstanzen	
Adeninsulfat	80 mg/ L
L-Histidin	20 mg/ L
L-Leucin	60 mg/ L
L-Tryptophan	40 mg/ L
Uracil	20 mg/ L

Synthetisches Kompletmedium (SC) basiert auf Synthetischem Minimalmedium ergänzt durch den Zusatz des Additivmixes (Drop out mix).

Drop out mix (DO)	
L-Arginin	20 mg/ L
L-Aspartat	100 mg/ L
L-Glutamat	100 mg/ L
<i>myo</i> -Inositol	20 mg/ L
L-Isoleucin	80 mg/ L
L-Lysin	60 mg/ L
L-Methionin	20 mg/ L
L-Phenylalanin	50 mg/ L
L-Serin	375 mg/ L
L-Threonin	200 mg/ L
L-Valin	150 mg/ L

Durch Zusatz verschiedener Kohlenstoffquellen zum Synthetischen Minimalmedium oder SC-Medium ergaben sich folgende Synthetische Medien:

Kohlenstoffquelle	Synthetisches Minimalmedium	Synthetisches Komplettmedium
20 g/ L Glukose	<b>SD-w/o-DO-Medium</b>	<b>SD-Medium</b>
20 g/ L Galaktose	<b>SGal-w/o-DO-Medium</b>	<b>SGal-Medium</b>
30 g/ L Glycerol	<b>SGly-w/o-DO-Medium</b>	<b>SGly-Medium</b>
22 mL/ L Milchsäure + 7,5 g/ L NaOH + 0,5 g/ L Glukose	<b>SLac-w/o-DO-Medium</b>	<b>SLac-Medium</b>

In dieser Arbeit wurde Standardmäßig synthetisches Komplettmedium verwendet. Falls in Experimenten synthetisches Minimalmedium verwendet wurde, so ist dies explizit angegeben.

Zur Analyse der *de novo* Fe/S-Cluster-Reifung *in vivo* wurde „Eisen-freies“ Minimalmedium verwendet. Dazu wurde zur Herstellung des Synthetischen Minimalmediums “Yeast Nitrogen Base without Amino Acids & Ammonium Sulphate & Iron” der Firma *Formedium LTD* verwendet.

## 3 Methoden

Alle im Rahmen dieser Arbeit mit gentechnisch veränderten Organismen durchgeführten Experimente wurden gemäß aktuellem Gentechnikgesetz (GenTG) durchgeführt und fielen unter die Sicherheitsstufe S1. Mit biologischem Material kontaminierte Lösungen und Gefäße wurden 20 min bei 121 °C und einem Druck von 1,5 bar inaktiviert.

### 3.1. Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1. Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen wurden 10 mL Vollmedium-Übernachtskultur durch Zentrifugation (3000 rpm, 5 min) pelletiert. Das Pellet wurde in 0,9 mL Lösung 1 resuspendiert und 100 µL Zymolyase (2 mg/ mL) sowie 1 µL 2-Mercaptoethanol hinzugefügt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C erfolgte Zentrifugation für 1 min bei 4000 rpm. Das Pellet wurde in 0,4 mL TE-Puffer resuspendiert und 30 µL TES-Puffer hinzugegeben. Anschließend wurde 30 min bei 60 °C inkubiert. Nach Zugabe von 80 µL 5 M Kaliumacetat und Inkubation für 60 min auf Eis wurde erneut zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, 4 °C) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte mit 1 mL Ethanol für 1 Stunde auf Eis. Es folgten erneute Zentrifugation, Waschen mit 70 % Ethanol, Trocknen und Lösen der DNA in 300 µL TE-Puffer.

Lösung 1	TE-Puffer	TES-Puffer
10 mM K-Phosphat pH 7,4	10 mM Tris-HCl pH 8,0	0,2 M Tris-HCl pH 8,0
0,9 M Sorbitol	1 mM EDTA	0,3 M EDTA
0,1 M EDTA		2 % (w/v) SDS

#### 3.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979): Wegen ihrer superhelikalen Struktur ist vektorielle DNA auch unter alkalischen Bedingungen stabil. Chromosomale DNA fällt hingegen aufgrund ihrer Größe, Struktur und Verankerung beim so genannten „alkalischen Sturz“ aus und kann durch Zentrifugation, ebenso wie Proteine, RNA und Membranen, von der Plasmid-DNA getrennt werden. Nach der Neutralisation verbleibt die Plasmid-DNA im löslichen Überstand und kann beispielsweise mittels Isopropanolfällung oder Anionenaustauschersäulen weiter aufgereinigt werden.

Durchgeführt wurde die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* nach Herstellerangaben mit dem NucleoSpin® Plasmid-Kit der Firma *Macherey & Nagel*, bei dem die Aufreinigung der Plasmid-DNA durch Bindung an Silikat-Membranen erfolgt.

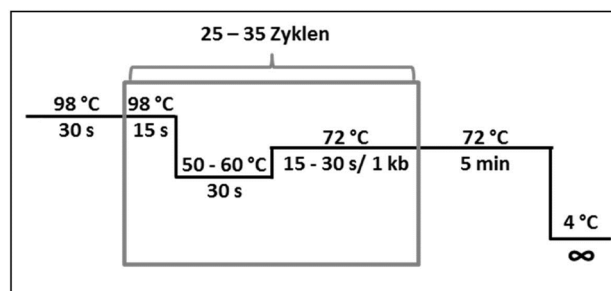
### 3.1.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der *in vitro* Amplifikation beliebiger DNA-Fragmente (Mullis & Faloona, 1987). Für die PCR werden eine thermostabile DNA-Polymerase, etwas Ausgangs-DNA, zwei passende Oligonukleotidprimer sowie Mononukleotidtriphosphate in entsprechendem Puffer benötigt. Eine PCR basiert auf drei sich wiederholenden Schritten: Erstens Denaturierung der Ausgangs-DNA (95 - 98 °C), zweitens Anlagerung (*annealing*) der Primer an die Ausgangs-DNA (50 - 60 °C, je nach Schmelztemperatur der Primer) und drittens Verlängerung (*elongation*) durch die DNA-Polymerase zum gewünschten Produkt (Temperatur abhängig vom Wirkungsoptimum der DNA-Polymerase).

Verwendet wurde die Phusion® DNA Polymerase der Firma *Finnzymes*, welche aufgrund ihrer 3'→5'-Exonukleaseaktivität „Korrekturlesen“ (*proof reading*) kann und damit wesentlich genauer ist als DNA-Polymerasen ohne 3'→5'-Exonukleaseaktivität.

Die Zusammensetzung des Standard 50 µL-PCR Ansatzes und eines Standard-PCR-Programmes sind im Folgenden angegeben. Optimierungen (Zyklenzahl, Elongationszeit, Annealingtemperatur, Reaktionspuffer, DMSO-Zugabe) wurden nach Herstellerangaben vorgenommen.

Standard-PCR Reaktion (50 µL)	
Ausgangs-DNA (1 - 500 ng)	1 µL
5x HF-Puffer	5 µL
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µL
Primer1 (10 µM)	2,5 µL
Primer2 (10 µM)	2,5 µL
Phusion-Polymerase (2 U / µL)	0,5 µL
ddH <sub>2</sub> O	37,5 µL



### 3.1.4. Reinigung von DNA aus PCR-Reaktionen, Agarosegelen oder wässrigen Lösungen

Zur Trennung von DNA von Kontaminationen (zum Beispiel Agarose, Enzyme, Primer oder Nukleotide) wurde das NucleoSpin® Extract II Kit der Firma *Macherey & Nagel* nach Herstellerangaben verwendet. Die Reinigung basiert wiederum auf der Bindung von DNA an Silikat-Membranen in Gegenwart chaotroper Reagenzien (Vogelstein & Gillespie, 1979). Eluiert wurde je nach Bedarf mit 15 – 50 µL 10 mM Tris-HCl pH 8,5.

### 3.1.5. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten gemäß ihrer Größe wurden 1 - 2 % (w/v) Agarosegele benutzt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,01 % (v/v) Essigsäure) verwendet. Der Ladepuffer war BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10x bestehend aus: 65 % (w/v) Saccharose; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,3 % (w/v) Bromphenolblau). Gefärbt wurde die



DNA durch Zugabe von 1  $\mu\text{L}$  100x GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain der Firma *Biotium* zu jeder DNA-Probe. Die Visualisierung erfolgte im Anschluss an die Elektrophorese mit Hilfe des GDS Systems der Firma *Intas* oder eines UV-Schirms. Durch Vergleich mit dem Größenstandard GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (*Fermentas*) konnte so auch die DNA-Konzentration einer Probe abgeschätzt werden.

### 3.1.6. Hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für den allgemein als „DNA-Verdau“ bezeichneten Vorgang der hydrolytischen Spaltung der Phosphodiesterbindung von DNA wurden Typ II Restriktionsendonukleasen der Firmen *Fermentas* und *New England Biolabs* verwendet. Die Auswahl der Reaktionsbedingungen (Puffer, Inkubationszeit und -temperatur) erfolgte nach Angaben der Hersteller. Analytische Restriktionsverdaue wurden in der Regel in 10  $\mu\text{L}$ , präparative in 50  $\mu\text{L}$  Reaktionsvolumen mit 1 - 3 U Enzym pro 1  $\mu\text{g}$  DNA durchgeführt.

### 3.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase (*New England Biolabs*) wurde für die Ligation von Insert- und Vektor-DNA eingesetzt. Das Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Knüpfung von Phosphodiesterbindungen in doppelsträngiger DNA, in dem es den nukleophilen Angriff einer 3'-OH Gruppe auf eine benachbarte freie 5'-Phosphatgruppe beschleunigt.

Ein typischer Ligationsansatz hatte 10  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen (davon 1  $\mu\text{L}$  10x Ligase-Puffer, 0,5  $\mu\text{L}$  T4-Ligase) und wurde 16 h bei 16 °C inkubiert. Es wurden 25 - 50 ng Vektor-DNA und die fünffache Stoffmenge Insert-DNA für Standardligationen eingesetzt.

### 3.1.8. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Dagert & Ehrlich, 1979; Maniatis et al, 1989). 100 mL LB-Medium wurden 1:200 von einer Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,5 bei 37 °C inkubiert. Nach zehnmütiger Abkühlphase auf Eis wurden die Zellen pelletiert (5 min, 400 rpm, 4 °C), in 10 mL TFBII-Puffer resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut wie zuvor pelletiert und anschließend in 4 mL TFBII-Puffer resuspendiert. 100  $\mu\text{L}$  Aliquots der Zellen wurden in vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße gegeben, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

TFBI-Puffer	TFBII-Puffer
30 mM Kaliumacetat	10 mM Na-MOPS pH 7,0
10 mM Calciumchlorid	75 mM Calciumchlorid
100 mM Kaliumchlorid	10 mM Kaliumchlorid
50 mM Manganchlorid	15 % (w/v) Glycerol
15 % (w/v) Glycerol	

### 3.1.9. Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

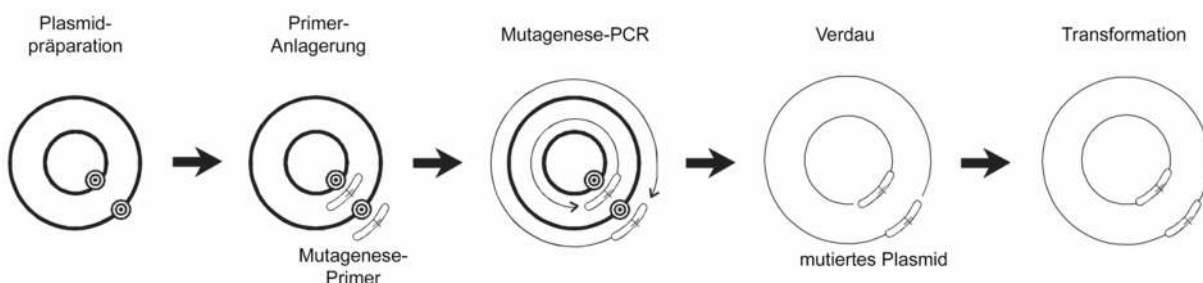
Zu 100  $\mu\text{L}$  kompetenten Zellen wurden 0,25  $\mu\text{L}$  Plasmid-DNA (25 - 250 ng) oder 5  $\mu\text{L}$  Ligationsansatz gegeben, 30 min auf Eis und dann 90 Sekunden bei 42 °C inkubiert („Hitzeschock“). Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden 900  $\mu\text{L}$  LB-Medium zugegeben und die Zellen eine Stunde bei 37 °C und 350 rpm inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (30 s, 11000 rpm), 900  $\mu\text{L}$  des Überstands verworfen, im verbleibenden Überstand resuspendiert und auf einer mit entsprechendem Selektionsmarker versetzten LB-Agarplatte ausgestrichen. Inkubiert wurde über Nacht bei 37 °C.

### 3.1.10. Ortsspezifische Mutagenese von Plasmiden

Zwei verschiedene Methoden wurden zur Einführung von Mutationen in die Plasmid-kodierten Gene von *CIA1*, *YAH1*, *FDX1* und *FDX2* verwendet.

#### 3.1.10.1. Quik-Change-Methode

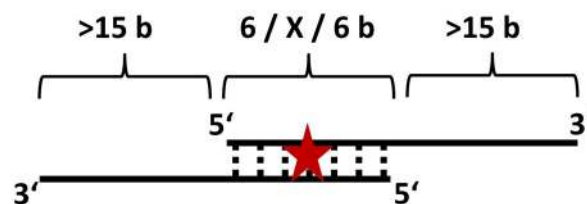
Zu Beginn dieser Arbeit wurde unter leichten Änderungen das QuikChange<sup>®</sup>-Protokoll der Firma *Stratagene* angewendet (**Abb. 3.1**). Hierbei wird die komplette, das Zielgen enthaltene Plasmid-DNA in Gegenwart zweier zueinander vollständig komplementärer Oligonukleotide, die die gewünschte Mutation beinhalten, durch die *High-Fidelity Phusion*<sup>™</sup> DNA-Polymerase (*Finnzymes*) vervielfältigt. Da die neu synthetisierten DNA-Einzelstränge nicht als Vorlage dienen können, erfolgt die Einführung der Mutation nur durch lineare Vervielfältigung. Nach Abschluss der DNA-Polymerase Reaktion lagern sich die neu synthetisierten Einzelstränge zu Plasmiden zusammen, die jeweils zwei Lücken (sogenannte „nicks“) haben. Aus dem Reaktionsmix wird die unmutierte, methylierte Ausgangs-DNA selektiv durch die Restriktionsendonuklease *DpnI* (Erkennungssequenz: 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3') entfernt. Nach Reinigung der mutierten DNA nach Kapitel 3.1.4. erfolgt Transformation in DH5 $\alpha$  Zellen, welche *in vivo* die *nicks* schließen und aus denen schließlich das mutierte Plasmid isoliert werden kann.



**Abbildung 3.1:** Schematische Übersicht der Teilschritte der Quik-Change-Methode (Abb. Entnommen aus dem Handbuch der Firma *Stratagene*).

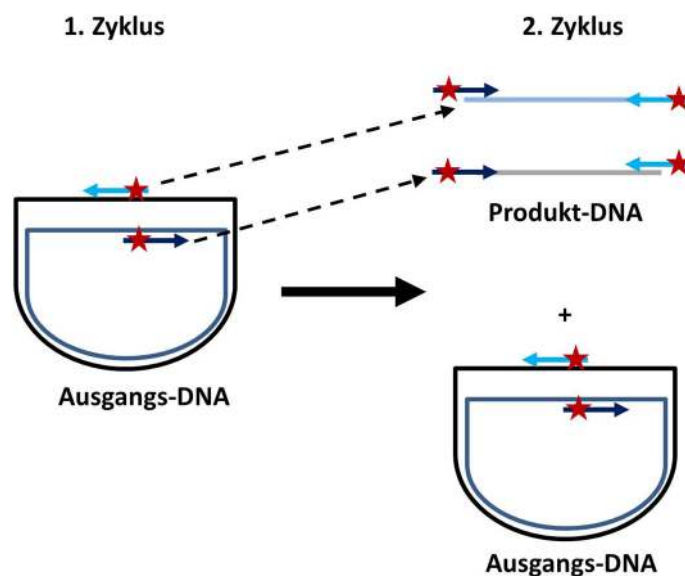
### 3.1.10.2. Mutagenese-PCR Reaktion

Die von Zheng und Kollegen beschriebene Mutagenese-Methode (Zheng et al, 2004) stellt eine Abwandlung der Quik-Change-Methode dar. Im Wesentlichen werden dabei nur die Primer anders konzipiert (**Abb. 3.2**). Der größte Vorteil der Methode besteht darin, dass eine echte PCR-Reaktion stattfindet und so exponentielle statt lineare Vervielfältigung erfolgt. Der Erfolg der Mutagenese-PCR Reaktion kann daher leicht durch analytische Agarosegelelektrophorese überprüft werden. Die Methode zeichnet sich außerdem durch hohe Flexibilität aus, durch die in dieser Arbeit die gleichzeitige Mutation von bis zu sechs benachbarten Codons in einer Reaktion erreicht werden konnte. Insgesamt konnte mit dieser Methode eine deutlich bessere Erfolgsrate erzielt werden und daher wurde sie im Verlauf dieser Arbeit vermehrt angewendet.



**Abbildung 3.2:** Übersicht über die Primer-Konzeption der Mutagenese-PCR-Reaktion (b= Nukleotidbase)

Es werden nur teilkomplementäre Oligonukleotidprimer verwendet, die sechs Basen vor ihrem 5'-Ende die gewünschte Mutation (X Basen) enthalten (**Abb. 3.2**). Die Primer zeichnen sich außerdem durch einen mindestens 15 Basen langen 3'-Überhang aus. Durch diesen wird erreicht, dass das Selbstzusammenlagern der Primer nicht länger energetisch günstiger ist als die Anlagerung an die Ausgangs-DNA: Die 3'-Überhänge hybridisieren nur mit der Ausgangs-DNA, nicht aber mit dem zweiten Primer. Außerdem kann das Produkt der DNA-Polymerasereaktion als Vorlage fungieren, da sich die Primer mit eben jenem 3'-Überhang an die Produkt-DNA anlagern können (**Abb. 3.3**).



**Abbildung 3.3:** Schema zur Veranschaulichung der Vervielfältigung der mutierten DNA bei der Mutagenese-PCR-Reaktion. Das Produkt der ersten DNA-Polymerase-Reaktion kann im zweiten Zyklus als Vorlage fungieren, da die Primer mit ihrem 3'-Überhang an die Produkt-DNA hybridisieren.

Die sonstige Durchführung der Mutagenese erfolgt analog der Quik-Change-Methode mit der *High-Fidelity* Phusion™ DNA-Polymerase wie zuvor beschrieben, vorbehaltlich der Erfolgsüberprüfung der PCR-Reaktion mittels analytischer Agarosegelelektrophorese vor dem *DpnI*-Schritt.

### 3.1.11. Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* Zellen wurde nach der Lithiumacetat-Methode (Gietz & Woods, 2002; Ito et al, 1983) durchgeführt und diente zur Einführung von Plasmid-DNA oder linearer DNA-Fragmente für homologe Rekombination.

50 mL Vollmedium wurden mit einer entsprechenden Vorkultur zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,2 verdünnt und dann bis zu einer  $OD_{600nm}$  von ca. 1 bei 30 °C inkubiert. Die pelletierten Zellen (5 min, 3000 rpm) wurden in 10 mL dH<sub>2</sub>O gewaschen, erneut wie zuvor pelletiert, in 1 mL LiOAc-Lösung resuspendiert und in ein 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (2 min, 7000 rpm) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut in 1 mL LiOAc-Lösung resuspendiert. Je Transformationsansatz wurden 100 µL der resuspendierten Zellen mit 2,5 µL denaturierter Lachssperma-DNA (*Invitrogen*) sowie 1 - 5 µg zu transformierender DNA versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 30 °C wurden 700 µL PEG-Lösung zugegeben und nach kräftigem Schütteln wurde für 15 - 45 min bei 42 °C inkubiert. Je länger die Inkubationszeit, desto größer war in der Regel die Transformationseffizienz. Die Hefezellen wurden pelletiert (3 min, 7000 rpm), in 1 mL Vollmedium resuspendiert und eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Diese Erholungsphase entfiel bei Plasmid-DNA-Transformationen. Nach erneutem Pelletieren (3 min, 7000 rpm) wurden die Zellen in 500 µL dH<sub>2</sub>O gewaschen, pelletiert wie zuvor und 400 µL des Überstandes verworfen. Schließlich wurden die Zellen im verbliebenen Überstand resuspendiert und auf Minimalmedium-Agarplatten mit entsprechenden Markern ausgestrichen.

LiOAc-Lösung	PEG-Lösung
100 mM Lithiumacetat	100 mM Lithiumacetat
10 mM Tris-HCl pH 7,5	10 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA	1 mM EDTA
	40 % (w/v) PEG 4000

### 3.1.12. Herstellung von Lagerungskulturen von *S. cerevisiae*

Zur Aufbewahrung der verschiedenen Hefe-Stämme wurden Glycerol-Lagerkulturen hergestellt. Dazu wurden 1200 µL einer Vollmediumübernachtskultur mit 280 µL Glycerol gemischt und bei -80 °C gelagert.

### 3.2. Zellbiologische und biochemische Methoden

#### 3.2.1. Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Zur Isolierung von Mitochondrien aus Hefe wurde zunächst die enzymatische Degradation der Zellwand mit Zymolyase durchgeführt. Die entstandenen Sphäroplasten wurden mechanisch lysiert, und die Mitochondrien durch differentielle Zentrifugation isoliert (Daum et al, 1982; Diekert et al, 2001).

Hefezellen wurden bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 1 - 1,5 inkubiert und durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 3000 rpm). Die Zellen wurden mit  $dH_2O$  gewaschen, pelletiert und gewogen. Folgendes Protokoll wurde für 10 g Hefezellen (Feuchtgewicht) angewendet, bei abweichendem Gewicht wurden die Volumina der Puffer entsprechend angepasst.

Zunächst wurden die Zellen in 30 mL Tris- $SO_4$ -Puffer resuspendiert und 5 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Sorbitol-Puffer gewaschen und dann in 40 mL des gleichen Puffers resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 0,7 mg Zymolyase T100 (*Seikagu*) je 1 g Zellen versetzt und 25 bis 30 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis und mit gekühlten Puffern. Die Sphäroplasten wurden pelletiert (5 min, 3000 rpm, 4 °C) und zweimal mit 40 mL Sorbitol-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Sphäroplasten in 30 mL 2x BB-Puffer resuspendiert und mit  $dH_2O$  wurde auf 60 mL aufgefüllt. Mit Hilfe eines Glas-Homogenisators wurden die Sphäroplasten aufgeschlossen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation sedimentiert (JA-20 Rotor, 5 min, 4000 rpm, 4 °C). Die im Überstand enthaltenen Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (10 min, 12000 rpm, 4 °C) pelletiert, der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes enthielt die löslichen Proteine des Zytoplasmas und anderer Organellen und wurde als post-mitochondrialer Überstand (PMS) aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Mitochondrien wurden mit 25 mL 1x BB-Puffer gewaschen, dann erneut pelletiert wie zuvor und vorsichtig in ca. 250  $\mu$ L 1x BB-Puffer resuspendiert. Schließlich wurden die Mitochondrien aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ebenso wie der PMS bei -80 °C gelagert.

Tris- $SO_4$ -Puffer	Sorbitol-Puffer	1x BB-Puffer	2x BB-Puffer
100 mM Tris- $SO_4$ pH 9,4	1,2 M Sorbitol	0,6 M Sorbitol	1,2 M Sorbitol
10 mM DTT (frisch)	20 mM K-Phosphat pH 7,4	20 mM HEPES-KOH pH 7.4	40 mM HEPES-KOH pH 7.4
			1 mM PMSF

#### 3.2.2. Präparation von Hefegesamtzellextrakt mittels alkalischer Lyse

Für die Untersuchung von Hefeproteinen aus dem Gesamtzellextrakt mittels SDS-PAGE wurde 1 mL Hefekultur mit einer  $OD_{600nm}$  von 2,0 in einem Eppendorfreaktionsgefäß pelletiert (2 min, 7000 rpm). Die Zellen wurden mit 500  $\mu$ L Puffer gewaschen (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA), erneut

pelletiert und anschließend in 500  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$  resuspendiert. Es wurde 75  $\mu\text{L}$  Lyse-Puffer zugegeben, auf dem Vortexer geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 575  $\mu\text{L}$  kalter 50 % (w/v) TCA wurde erneut auf dem Vortexer geschüttelt, 10 min auf Eis inkubiert und danach die Proteine pelletiert (5 min, 14000 rpm, 4 °C). Nach zweimaligem Waschen mit 1 mL eiskaltem Aceton wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in 100  $\mu\text{L}$  1x Laemml-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 % (w/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 0,05 mg/ mL Bromphenolblau, 2,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) aufgenommen.

Lyse-Puffer
1,85 M NaOH
7,4 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
10 mM PMSF

### 3.2.3. Präparation von Hefegesamtzellextrakt mittels Glasperlen

Wenn größere Mengen Hefegesamtzellextrakt benötigt wurden, zum Beispiel für Koimmunpräzipitationsexperimente oder für die Messung von Enzymaktivitäten, wurden die Hefezellen mechanisch durch kräftiges Schütteln mit Glasperlen lysiert. Dazu wurden 0,5 g Hefezellen nach Waschen mit 10 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  in 0,5 mL TNETG-Puffer resuspendiert, 10  $\mu\text{L}$  200 mM PMSF und ein halbes Volumen Glasperlen (0,75 - 1 mm Durchmesser) zugegeben und dreimal für eine Minute bei höchster Geschwindigkeit kopfüber auf dem Vortexer geschüttelt. In den Pausen zwischen den drei Vortexschritten wurde die Probe auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 4000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und erneut zentrifugiert (5 min, 14000 rpm, 4 °C). Der Überstand dieser Zentrifugation stellte den Hefegesamtzellextrakt dar.

TNETG-Puffer
20 mM Tris-HCl pH 7,4
150 mM NaCl
2,5 mM EDTA
10 % (v/v) Glycerol
0,5 % (v/v) Triton X-100

### 3.2.4. Messung der Enzymaktivitäten von Enzymen aus *S. cerevisiae*

Die Messung der Enzymaktivität benötigt die Verfolgung des Umsatzes eines Enzyms. In dieser Arbeit wurden unter optimierten Pufferbedingungen in einem UV/VIS-Spektralphotometer die für das zu untersuchende Enzym benötigten Substrate und Kosubstrate in großem Überschuss (Substrat- und Kosubstratsättigung) zur Probe zugegeben und kontinuierlich die Absorptionsänderung bei einer definierten Wellenlänge verfolgt. Die Wellenlänge wurde so gewählt, dass nur eine der beteiligten Spezies (Substrat, Kosubstrat oder Produkt) bei dieser Wellenlänge absorbiert. Um Nebenreaktionen auszuschließen, die unter Umständen ebenfalls zum verfolgten Umsatz beitragen können, wurden je nach Enzymtest Referenzmessungen durchgeführt. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes

konnte schließlich aus der Absorptionsänderung pro Zeit ( $\Delta E / \Delta t$ ) die Enzymaktivität  $E_{Akt}$  berechnet werden. Es wurde in der Regel die spezifische Aktivität  $E_{spAkt}$  berechnet, welche die eingesetzte Proteinmenge  $m$  berücksichtigt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$E_{spAkt} = \frac{E_{Akt}}{m} = \frac{\Delta c}{\Delta t * m} = \frac{\Delta E}{\Delta t * d * \epsilon * m}$$

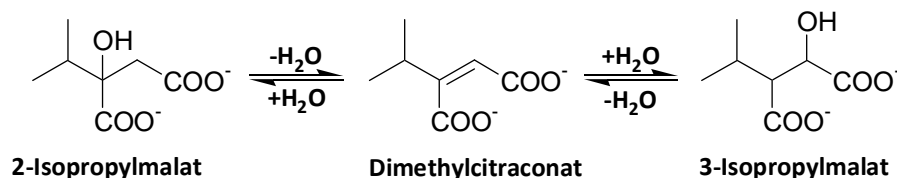
Die Schichtdicke  $d$  betrug 1 cm, der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  war abhängig von der beobachteten Spezies.

### 3.2.4.1. Enzymaktivitäten zytosolischer Enzyme

Die Messung zytosolischer Enzyme erfolgte entweder aus der PMS Fraktion (siehe 3.2.1) oder aus Gesamtzellextrakten (Pierik et al, 2009).

#### Isopropylmalat-Isomerase Leu1

Das zytosolische Enzym Leu1 hat einen [4Fe-4S] Cluster als Kofaktor und katalysiert den zweiten stoffwechselspezifischen Schritt der Leucin-Biosynthese, die Umwandlung von 2-Isopropylmalat zu 3-Isopropylmalat (Kohlhaw, 1988). Die reversible Reaktion verläuft über die Zwischenstufe Dimethylcitraconat und liegt im Gleichgewicht auf der Seite von 2-Isopropylmalat. Es wurde 3-Isopropylmalat als Substrat eingesetzt und die spezifische Bildung (keine Referenzmessung erforderlich) von Dimethylcitraconat über die Absorption der Doppelbindung bei 235 nm ( $\epsilon_{235nm} = 4530 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) gemessen.



Puffer	Substrat	Probe	Messung
20 mM Tris-HCl pH 7,4	10 mM 3-Isopropylmalat (IPM)	Gesamtzellextrakt	970 $\mu\text{L}$ Puffer
50 mM NaCl			20 $\mu\text{L}$ IPM
			40 - 80 $\mu\text{g}$ Probe

#### Alkoholdehydrogenase ADH

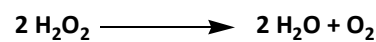
Hefe besitzt fünf ADH-Isoenzyme, welche im fermentativen Stoffwechsel involviert sind, Zinkionen als prosthetische Gruppen haben und die reversible Umwandlung von Ethanol zu Ethanal katalysieren. Basierend auf der Absorption des Kosubstrates NADH bei 340 nm ( $\epsilon_{340nm} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) wurde die Alkoholdehydrogenaseaktivität als zytosolisches Referenzenzym gemessen.



Puffer	Substrat/ Kosubstrat	Probe	Messung
50 mM Tris-HCl pH 8,0	100 % Ethanol	Gesamtzellextrakt	930 $\mu$ L Puffer
50 mM NaCl	50 mM NAD <sup>+</sup>		30 $\mu$ L Ethanol
			30 $\mu$ L NAD <sup>+</sup>
			0,5 - 1 $\mu$ g Probe

### Katalase CAT

*S. cerevisiae* besitzt zwei Katalase-Isoenzyme Katalase A und Katalase T mit peroxisomaler plus mitochondrialer bzw. zytosolischer Lokalisation. Beide enthalten einen Häm-Kofaktor und katalysieren die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid, welches bei der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren oder beim Abbau reaktiver Sauerstoffspezies entsteht, zu Wasser und Sauerstoff. Der enzymatische Umsatz konnte an Hand der Absorption von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 240 nm ( $\epsilon_{240\text{nm}} = 3890 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) gemessen werden.



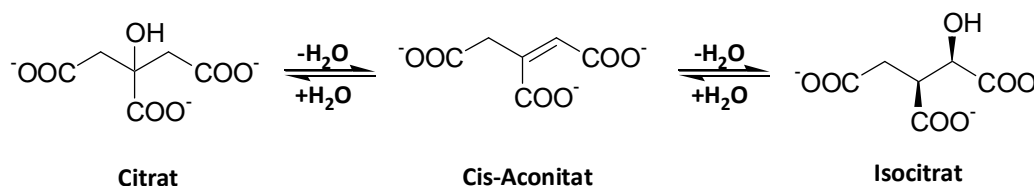
Puffer	Substrat	Probe	Messung
50 mM MES pH 6,5	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Gesamtzellextrakt	970 $\mu$ L Puffer
50 mM NaCl		(oder PMS)	25 $\mu$ L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
			50 - 100 $\mu$ g Probe

### 3.2.4.2. Enzymaktivitäten mitochondrialer Enzyme

Zur Messung mitochondrialer Enzyme wurden Gesamtzellextrakte oder isolierte Mitochondrien verwendet (Pierik et al, 2009).

#### Aconitase Aco1

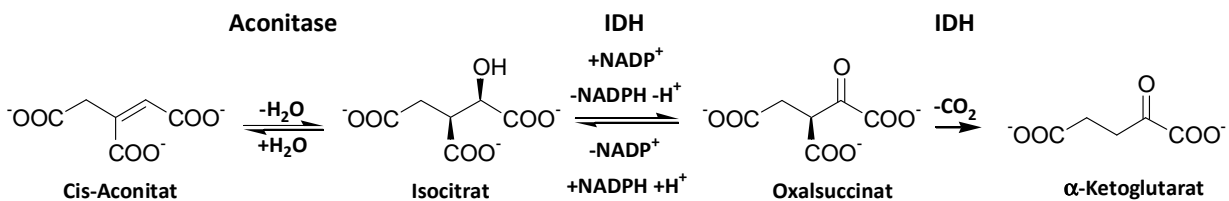
Das Enzym Aco1 hat einen [4Fe-4S] Kofaktor und katalysiert als Teil des Citratzyklus die reversible Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat über die Zwischenstufe Cis-Aconitat (Fansler & Lowenstein, 1969). Das Gleichgewicht liegt weitgehend auf der Seite von Citrat. Es kamen zwei verschiedene Tests zum Einsatz. Bei ersterem wurde Isocitrat als Substrat eingesetzt und der Umsatz mittels der Absorption der Doppelbindung von Cis-Aconitat bei 235 nm ( $\epsilon_{235\text{nm}} = 4950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) verfolgt. Es wurden gereinigte Mitochondrien eingesetzt, welche unmittelbar vor der Messung durch Inkubation mit Dodecylmaltosid (DDM) lysiert wurden.



Puffer	Substrat	Probe	Messung
50 mM Tris-HCl pH 8,0	200 mM Isocitrat in Puffer (IC)	lysierte Mitochondrien: 0,4 $\mu$ g/ $\mu$ L in Puffer mit 0,0024 % DDM	850 $\mu$ L Puffer
50 mM NaCl			100 $\mu$ L IC
			50 $\mu$ L Probe



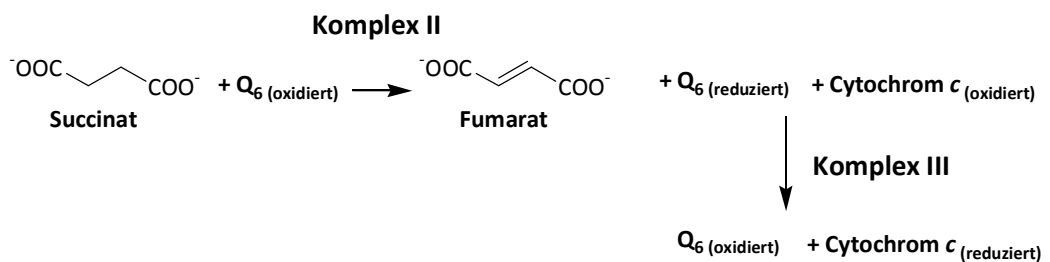
Die zweite Messmethode war ein gekoppelter Enzymtest, der zur Messung der Aconitaseaktivität in Gesamtzellextrakten eingesetzt wurde. Bei diesem Test war das Substrat Cis-Aconitat und das Gleichgewicht wurde durch die Kopplung an die Folgereaktion des Citratzyklus, die irreversible Umwandlung von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat über Oxalsuccinat durch die Isocitratdehydrogenase (IDH), in Richtung Isocitrat verschoben. Unter den Reaktionsbedingungen war die Aconitasereaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, so dass aus dem Umsatz des IDH Kosubstrates  $\text{NADP}^+$  ( $\epsilon_{340\text{nm}} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) die Aktivität der Aconitase berechnet werden konnte. Unspezifische  $\text{NADP}^+$  Reduktion wurde durch Messung gegen eine Referenzprobe subtrahiert (Gelling et al, 2008).



Puffer	Substrat/ Kosubstrat	Probe	Messung	Referenz
50 mM Triethanolamin pH 8,0	20 mM Cis-Aconitat	Gesamtzellextrakt	950 $\mu\text{L}$ Puffer	950 $\mu\text{L}$ Puffer
50 mM NaCl	Isocitratdehydrogenase (IDH) 40 mU/ $\mu\text{L}$		12 $\mu\text{L}$ Cis-Aconitat	
1,5 mM $\text{MgCl}_2$	100 mM $\text{NADP}^+$		10 $\mu\text{L}$ IDH	
			12 $\mu\text{L}$ $\text{NADP}^+$	12 $\mu\text{L}$ $\text{NADP}^+$
			50 - 100 $\mu\text{g}$ Probe	50 - 100 $\mu\text{g}$ Probe

### Succinat-Dehydrogenase (Komplex II)

Komplex II in *S. cerevisiae* enthält drei Fe/S-Cluster sowie FAD und Häm als prosthetische Gruppen. Die Aktivität wurde mittels zweier verschiedener Methoden bestimmt. Bei intakten Mitochondrien mit intrinsischem Ubichinon  $\text{Q}_6$  und intaktem Cytochrom  $bc_1$  Komplex (Komplex III) erfolgte aus der Reduktion von Cytochrom  $c$  ( $\Delta\epsilon_{550\text{nm}} = 20000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) mit Succinat als Substrat die Bestimmung der SDH-Aktivität (Robinson & Lemire, 1995). Als Referenz wurde eine Messung mit dem SDH-Inhibitor Malonat durchgeführt.



Puffer	Substrat/ Kosubstrat/ Inhibitor	Probe	Messung	Referenz
50 mM Tris-HCl pH 8,0	20 % (w/v) Succinat	intakte Mitochondrien	920 µL Puffer	920 µL Puffer
50 mM NaCl	20 % (w/v) Malonat		12 µL Succinat	12 µL Succinat
	20 mg/ mL Cytochrom <i>c</i> ox.			12 µL Malonat
			50 µL Cytochrom <i>c</i>	50 µL Cytochrom <i>c</i>
			25 µg Probe	25 µg Probe

Alternativ wurde die SDH-Aktivität detergentlysierter Mitochondrien aus dem Elektronentransfer von Succinat auf den artifiziellen Elektronenakzeptor Dichlorophenolindophenol (DCPIP) bei 600 nm ( $\epsilon_{600\text{nm}} = 21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) mit Phenazinmethosulfat (PMS) als Elektronentransporter bestimmt.

Puffer	Substrat/ Kosubstrat/ Inhibitor	Probe	Messung	Referenz
50 mM Tris-HCl pH 8,0	20 % (w/v) Succinat	intakte Mitochondrien	950 µL Puffer	950 µL Puffer
50 mM NaCl	20 % (w/v) Malonat		12 µL Succinat	12 µL Succinat
1 mM KCN	10 mM Dichlorophenol- indophenol (DCPIP)			12 µL Malonat
0,1 % Triton-X-100	20 mg/ mL Phenazin- methosulfat (PMS)		12 µL DCPIP	12 µL DCPIP
			12 µL PMS	12 µL PMS
			25 µg Probe	25 µg Probe

### Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV)

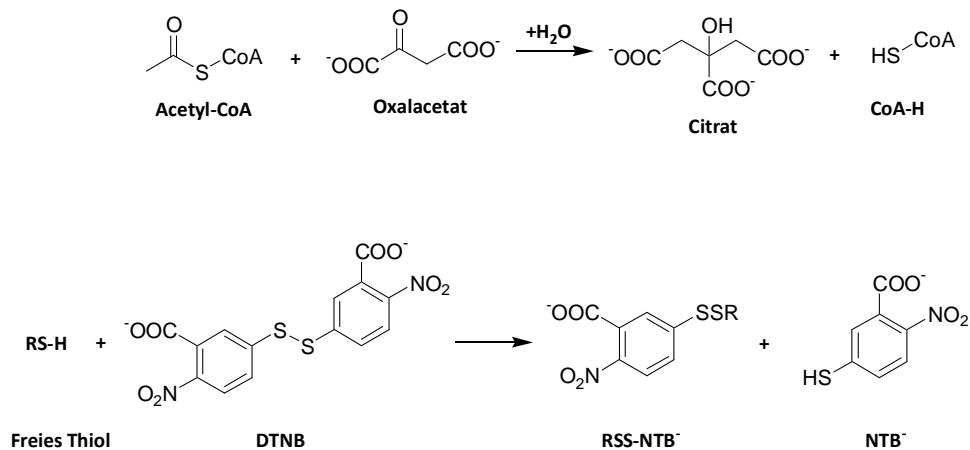
Komplex IV enthält keine Fe/S-Cluster, aber zwei Kupferzentren sowie ein Cytochrom *a* und ein Cytochrom *a*<sub>3</sub>. Die COX-Aktivität wurde mittels der Oxidation von Dithionit-reduziertem Cytochrom *c* ( $\Delta\epsilon_{550\text{nm}} = 20000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bestimmt (Poyton et al, 1995; Trounce et al, 1996). Als Referenz wurde eine Messung in Gegenwart des Komplex IV Inhibitors KCN durchgeführt. Zwei leicht verschiedene Tests wurden verwendet, einer für intakte Mitochondrien, der andere für Gesamtzellextrakte.

Puffer	Substrat/ Inhibitor	Probe	Messung	Referenz
50 mM MES pH 6,5	80 mg/ mL red. Cytochrom <i>c</i>	intakte Mitochondrien	975 µL Puffer	975 µL Puffer
50 mM NaCl	100 mM KCN			10 µL KCN
			25 µL Cytochrom <i>c</i>	25 µL Cytochrom <i>c</i>
			5 µg Probe	5 µg Probe

Puffer	Substrat/ Inhibitor	Probe	Messung	Referenz
15 mM K- Phosphat pH 7,2	80 mg/ mL red. Cytochrom <i>c</i>	Gesamtzellextrakt	970 µL Puffer	970 µL Puffer
0,1 % BSA	100 mM KCN			10 µL KCN
0,5 mM Dodecylmaltosid			25 µL Cytochrom <i>c</i>	25 µL Cytochrom <i>c</i>
			5 - 10 µg Probe	5 - 10 µg Probe

### Citrat-Synthase CS

Die Citrat-Synthase enthält keine Fe/S-Cluster und auch kein Häm und katalysiert die irreversible Kondensation von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat. Das Enzym diente als Referenzenzym für andere Messungen. Es wurden zwei verschiedene Protokolle für intakte Mitochondrien und Gesamtzellextrakte verwendet, die beide auf der Reaktion der entstehenden freien Thiolgruppe des CoA-H mit Ellmans Reagenz (Dithionitrobenzoat, DTNB) basieren (Parvin, 1969). Das bei der Reaktion entstehende 2-Nitro-5-Thiobenzoat (NTB<sup>-</sup>) absorbiert nach Deprotonierung bei 412 nm ( $\epsilon_{412\text{nm}} = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).



Puffer	Substrat/ Kosubstrat	Probe	Messung
50 mM Tris-HCl pH 8,0	100 mM Oxalacetat	intakte Mitochondrien	980 µL Puffer
50 mM NaCl	10 mg/ mL Acetyl-CoA		10 µL Acetyl-CoA
0,6 M Sorbitol			20 µg Probe
0,5 % Triton-X-100			20 µL Oxalacetat
0,5 mM DTNB			

Puffer	Substrat/ Kosubstrat	Probe	Messung
50 mM Tris-HCl pH 8,0	100 mM Oxalacetat	Gesamtzellextrakt	980 µL Puffer
50 mM NaCl	10 mg/ mL Acetyl-CoA		10 µL Acetyl-CoA
0,5 mM DTNB			20 µL Oxalacetat
			20 - 40 µg Probe

### 3.2.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Moleküle in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit aufgetrennt. Da Proteine individuelle Ladungseigenschaften besitzen, müssen sie mit dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS), das die hydrophoben Interaktionen stört, und des Disulfidbrücken reduzierenden 2-Mercaptoethanols vollständig denaturiert werden, um eine Korrelation zwischen Ladung und Masse zu erreichen. SDS bindet in einem festem Verhältnis je Aminosäure an Proteine und maskiert aufgrund seiner Eigenladung die Ladung der Proteine. Daher ist die relative

Wanderungsgeschwindigkeit von SDS beladenen Proteinen linear vom Logarithmus ihrer molekularen Massen abhängig. Über den Gehalt an Acrylamid kann man die Trennleistung beeinflussen. Hochprozentige Gele eignen sich zum Trennen kleiner Proteine, niedrigprozentige Gele zur Trennung großer Proteine.

Die SDS-PAGE wurde in einer vertikalen Apparatur in einem diskontinuierlichen System nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Es wurden 5 % Sammelgele sowie Trenngele mit 10 - 15 % Acrylamid verwendet. Die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 0,001 % (v/v) TEMED und 0,05% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS). SDS-PAGE-Proben wurden vor dem Auftragen 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Stromstärke betrug pro Gel (7 cm x 10 cm) etwa 35 mA. Nachfolgende Tabelle enthält eine Übersicht über die Zusammensetzungen der verwendeten SDS-PAGE-Gele und des Elektrodenpuffers.

Sammelgel	Trenngel	Elektrodenpuffer
125 mM Tris-HCl pH 6,8	375 mM Tris-HCl pH 8,8	25 mM Tris pH
0,1 % (v/w) SDS	0,1 % (v/w) SDS	0,1 % (v/w) SDS
5 % (w/v) Acrylamid (Acrylamid: Bisacrylamid = 37,5:1)	10 - 15 % (w/v) Acrylamid (Acrylamid: Bisacrylamid = 37,5:1)	192 mM Glycin

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Coomassie Brilliant-Blue oder Silber gefärbt oder auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Es wurde jeweils ein Proteingrößenstandard aufgetragen.

### 3.2.6. Färben von Proteinen mit Coomassie Brilliant-Blue

Die Methode der Coomassie-Färbung von SDS-PAGE Gelen erlaubt die Anfärbung der Proteine im Gel entsprechend ihrer Konzentration (Bennett & Scott, 1971). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die SDS-Gele 30 - 60 min in Färbelösung geschwenkt. Das Gel wurde aus der Färbelösung entnommen und für 25 min in heißer Entfärbelösung entfärbt. Die Hintergrundfärbung wurde durch Schwenken in Wasser (>2 h) entfernt. Zur Dokumentation wurde das GDS System von *Intas* verwendet.

Färbelösung	Entfärbelösung
5 % (v/v) Essigsäure	5 % (v/v) Essigsäure
50 % (v/v) Ethanol	30 % (v/v) Ethanol
0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250	

### 3.2.7. Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen

Die Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen basiert auf der Komplexbildung von Ag<sup>+</sup> Ionen durch die negativen Seitenketten von Proteinen (Asp, Glu und unter Umständen auch Cys). Nach Waschen wird

das  $\text{Ag}^+$  durch Formaldehyd zu Ag reduziert und die Proteine sichtbar gemacht. Es wurde folgendes Protokoll angewendet (Shevchenko et al, 1996):

Das SDS-PAGE-Gel wurde für 30 min fixiert (5 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Methanol). Nach zweimal 5 min Waschen mit 50 % (v/v) Methanol und zweimal 5 min Waschen mit ddH<sub>2</sub>O wurde das Gel 1 min in 0,02 % (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung inkubiert. Im Anschluss an zweimal 1 min Waschen mit ddH<sub>2</sub>O wurde das Gel 20 min in Färbelösung (0,2 % (w/v) AgNO<sub>3</sub>, 0,075 % (v/v) Formaldehyd (37 %)) geschwenkt. Es wurde erneut zweimal 1 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dann für 3 - 5 min entwickelt (2 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,05 % (v/v) Formaldehyd (37 %), 0,004 % (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Zum Stoppen wurde das Gel mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dann in 5 % (v/v) Essigsäure geschwenkt.

### 3.2.8. Western-Blot und Ponceau-Färbung

Beim Western-Blot werden die Proteine eines SDS-PAGE-Gels oder eines nativen Gels auf eine Membran übertragen (Towbin et al, 1979). Die Membranen können aus Nitrocellulose, Polyvinylidendifluorid (PVDF) oder positiv geladenem Nylon bestehen. Die Bindung erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen (Nitrocellulose) oder ionische Wechselwirkungen (Nylon). In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine von SDS-PAGE-Gelen auf Nitrocellulosemembranen im sogenannten "semi-dry" Verfahren überführt. Auf zwei in Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 200 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,02 % (w/v) SDS) getränkte Whatman-Filterpapiere wurde die mit Blotpuffer angefeuchtete Nitrocellulosemembran gelegt. Darauf aufgelegt wurden das SDS-PAGE-Gel und darauf nochmals zwei mit Blotpuffer angefeuchtete Filterpapiere. Der Transfer erfolgte bei 2 mA je cm<sup>2</sup> SDS-PAGE-Gel für 60 - 80 min.

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran mit Ponceau S Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) TCA) für 2 min gefärbt. Nach Waschen mit dH<sub>2</sub>O wurde die Membran auf die Vollständigkeit des Transfers überprüft und der Größenstandard sowie die Spuren markiert.

### 3.2.9. Immundetektion von Proteinen

Der Nachweis von bestimmten Proteinen aus Proteingemischen erfolgte nach SDS-PAGE und Western-Blot mittels Immundetektion („Immunfärbung“). Das Prinzip dabei ist die Kombination von zwei hochspezifischen Antikörpern. Der Erstantikörper bindet an ein Epitop, eine kurze Aminosäuresequenz eines Proteins. Zum Nachweis des Erstantikörpers wird ein Zweitantikörper zugegeben, der spezifisch an Immunglobuline der Spezies bindet, aus der der Erstantikörper stammt. Der Zweitantikörper ist mit einem Enzym konjugiert, das in einer spezifischen Reaktion detektiert werden kann. In dieser Arbeit wurden Zweitantikörper-Fusionen mit Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet. Die HRP katalysiert mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Oxidationsmittel die Oxidation von Luminol und löst so Chemilumineszenz aus, welche detektiert werden kann.

Zunächst wurden die freien Bindungsstellen einer Membran durch Inkubation mit 5 % (w/v) Milchpulver (fettfrei) in TBST-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20) blockiert. Das Erstantikörperserum wurde 1:500 - 1:2000 in TBST-Puffer mit 5 % (w/v) Milchpulver verdünnt und die Membran damit 1 h inkubiert. Nach dreimal 3 min Waschen mit TBST wurde die Membran 1 h mit dem Zweitantikörperkonjugat (1:10000 in 5 % (w/v) Milchpulver in TBST) inkubiert. Nach dreimal 3 min Waschen mit TBST wurde das an die Membran gebundene HRP-Konjugat mit Hilfe der ECL-Detektionslösung (*GE Healthcare*) und dem Chemostar professional System (*Intas*) visualisiert.

### 3.2.10. Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung)

Zur Konzentrierung einer Proteinprobe oder zur Entfernung von Kontaminationen (zum Beispiel Lipide) wurden Proteine oder Proteingemische wie Zellextrakte mit TCA präzipitiert. Dazu wurden 200 µg Probe in 200 µL Puffer mit 133 µL kalter 50 % (w/v) TCA versetzt, kräftig geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proteine pelletiert (5 min, 14000 rpm, 4 °C), zweimal mit 1 mL eiskaltem Aceton gewaschen und das Pellet nach Trocknen in 100 µL 1x Laemmli-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 % (w/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 0,05 mg/ mL Bromphenolblau, 2,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) aufgenommen.

### 3.2.11. Kopplung von Antikörpern an Protein A Sepharose

Das ursprünglich aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus* isolierte Protein A bindet spezifisch an die F<sub>C</sub>-Region von Antikörpern. Durch Inkubation von Antiseren mit an Mikropartikel gebundenem Protein A kann man Antikörper an die Mikropartikel koppeln und mit diesen gezielt Proteine aus heterogenen Mischungen wie zum Beispiel Gesamtzellextrakten isolieren.

Sofern nicht anders angegeben wurde als Standardpuffer für die Kopplung TNETG-Puffer verwendet. 50 mg Protein A Sepharose® (*GE Healthcare*) wurde in 500 µL Puffer 30 min auf Eis inkubiert. Nach Pelletieren (1 min, 3000 rpm, 4 °C) wurde 500µL des gewünschten Antikörperserums zugegeben und 1 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Nach Pelletieren wie zuvor und fünfmaligem Waschen mit 500 µL Puffer wurden die gekoppelten Mikropartikel („Immunobeads“) in 500 µL Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

TNETG-Puffer
20 mM Tris-HCl pH 7,4
150 mM NaCl
2,5 mM EDTA
10 % (v/v) Glycerol
0,5 % (v/v) Triton X-100

### 3.2.12. (Ko)Immunpräzipitation (KoIP)

Mit Hilfe von an Mikropartikel gekoppelter Antikörper ist es möglich, aus Gesamtzellextrakten oder anderen heterogenen Mischungen spezifisch ein Protein zu isolieren. Da die Mikropartikel durch Zentrifugation pelletiert werden, nennt man diese Methode Immunpräzipitation. Trägt man eine immunpräzipitierte Probe auf ein SDS-PAGE-Gel auf, so kann man zum Beispiel mittels Immundekoration untersuchen, ob mit dem das Antigen tragende Protein noch andere Proteine kopräzipitiert wurden. Die Methode der Koimmunpräzipitation dient dem Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* und wird oft zur Verifizierung von Ergebnissen verwendet, die durch andere Techniken erhalten wurden (Berggard et al, 2007).

Für die KoIP wurden Gesamtzellextrakte oder Mitochondrienlysate verwendet. Letztere wurden durch Inkubation von Mitochondrien in detergenshaltigem Puffer und anschließende Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 4 °C) hergestellt. Sofern nicht anders angegeben wurde als Standardpuffer TNETG-Puffer verwendet. 250 µL Probe wurden mit 15 -30 µL resuspendierten Immunobeads (siehe 3.2.11) für eine Stunde bei 4 °C rotierend inkubiert. Nach Pelletieren (1 min, 3000 rpm, 4 °C) und ein- bis dreimaligem Waschen mit 500 µL Puffer wurden die pelletierten Immunobeads in 50 µL 1x Laemmli-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 % (w/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 0,05 mg/ mL Bromphenolblau, 2,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert.

### 3.2.13. Messung der *de novo* Eisen-Schwefel-Cluster Synthese in *S. cerevisiae*

Zur Messung der Fähigkeit von *S. cerevisiae* Eisen-Schwefel-Cluster *de novo* zu synthetisieren wurden unter Eisenmangel gewachsene Hefezellen für 2 h mit <sup>55</sup>Fe inkubiert und der Einbau des radioaktiven Eisenisotops (Elektroneneinfang, 5,9 keV,  $t_{1/2}$  1005 d) in die Zielproteine mittels Immunpräzipitation überprüft (Kispal et al, 1999).

Die Zellen wurden in 50 mL Synthetischem Minimalmedium mit entsprechender Kohlenstoffquelle kultiviert, durch Zentrifugation (5 min, 4000 rpm) pelletiert und mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Mit den Zellen wurde 100 mL „Eisen-freies“ Minimalmedium (siehe 2.6.2) mit einer OD<sub>600nm</sub> von 0,2 inokuliert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 4000 rpm), mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und 0,5 g Zellen wurden in 10 mL „Eisen-freies“ Minimalmedium überführt. Nach 10 min Inkubation bei 30 °C wurden 10 µCi <sup>55</sup>FeCl<sub>3</sub> (*Perkin Elmer*) in 100 mM Natriumascorbat zugegeben und für 2 h inkubiert. Die radioaktiv markierten Zellen wurden in ein 15 mL Falcon-Reaktionsgefäß überführt, pelletiert (5 min, 4000 rpm) und mit 10 mL Citrat-Puffer (50 mM Na-Citrat, 1 mM EDTA, pH 7,0) und anschließend mit 3 mL Hepes-KOH (20 mM, pH 7,0) gewaschen. Von den so erhaltenen Zellen wurde ein Gesamtzellextrakt hergestellt (siehe 3.2.2) und aus diesem das gewünschte Protein immunpräzipitiert (siehe 3.2.12). Die kopräzipitierte <sup>55</sup>Fe-Radioaktivität wurde durch

Szintillationszählung quantifiziert und als direktes Maß für Einbau in die Eisen-Schwefel-Cluster der präzipitierten Proteine verwendet.

### 3.2.14. Messung des Elektronentransfers von Ferredoxinoxidoreduktase auf Ferredoxin

In einem *in vitro* Test wurde der Elektronentransfer von NADPH über Ferredoxinoxidoreduktase (FdR) und Ferredoxin (Fdx) auf den artifiziellen Elektronenakzeptor Cytochrom *c* gemessen. Der Elektronentransfer erfolgt dabei über den Proteinkomplex aus FdR und Fdx und nicht über die dissoziierten Proteine (Lambeth et al, 1976). Unter geeigneten Reaktionsbedingungen (niedrige Ionenstärke) kann dann aus der kinetischen Analyse der Cytochrom *c* Reduktion auf die Dissoziationskonstante des FdR/ Fdx Komplexes zurückgeschlossen werden (Lambeth et al, 1979).

Für den Test wurde humane Ferredoxinoxidoreduktase FdxR (NP 004101.2, M = 51721 g/ mol, pI = 7,37) verwendet, die als His<sub>6</sub>-getaggttes Protein in Zusammenarbeit mit Alex Sheftel heterolog in *E. coli* exprimiert und mittels IMAC-Chromatographie (IMAC -*immobilized metal affinity chromatography*; siehe 3.3.3.1) und Größenausschlusschromatographie (SEC - *size exclusion chromatography*; siehe 3.3.3.2) gereinigt wurde. Unter Substratüberschuss wurde bei konstanter FdxR-Konzentration die Konzentration an Fdx variiert und die Cytochrom *c* Reduktion durch Absorptionsmessung bei 550 nm ( $\Delta\epsilon_{550\text{nm}} = 20000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) verfolgt. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden gegen die Konzentration aufgetragen und nach Michaelis-Menten die kinetischen Parameter bestimmt.

Puffer	Substrat/ Kosubstrat	Probe	Messung
50 mM HEPES pH 7,4	1 mM Cytochrom <i>c</i> ox.	gereinigtes Protein Fdx	915 µL Puffer
0,05 % Tween 20	14 mM NADPH		65 µL Cytochrom <i>c</i>
	5 µM FdxR		10 µL NADPH
			10 µM FdxR
			5 - 1500 nM Fdx

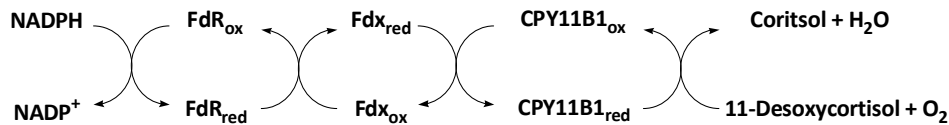
### 3.2.15. Messung des Elektronentransfers von Ferredoxin auf CYP11B1

In Zusammenarbeit mit Dr. Frank Hannemann und Anna Hobler (beide: Universität des Saarlandes, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Rita Bernhardt) wurde der *in vitro* Elektronentransfer auf humane 11 $\beta$ -Hydroxylase CYP11B1 gemessen. Dieses Cytochrom P450 abhängige Enzym katalysiert in Mitochondrien die Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol zu dem Haupt-Glucocorticoid von Säugern, Cortisol. Die enzymatische Reaktion erfolgte mit Hilfe eines NADPH regenerierenden Systems für 10 min und wurde durch Chloroformextraktion gestoppt. Die Trennung und Quantifizierung der Reaktionsteilnehmer erfolgte mittels *reversed phase* HPLC (Sugano et al, 1989). Die Reaktionsbedingungen waren folgendermaßen:

250 µL Reaktionsvolumen bestehend aus 0,5 µM CYP11B1, 0,5 µM FdxR (humane Ferredoxinoxidoreduktase), 20 µM Fdx, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Glukose-6-Phosphat, 1 U Glukose-6-



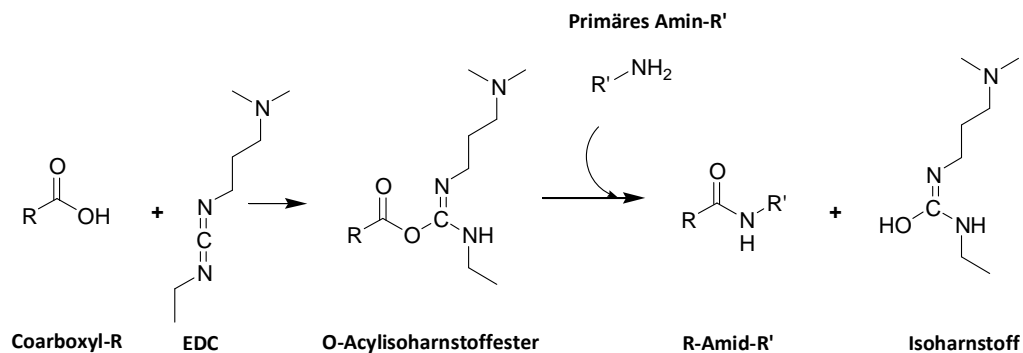
Phosphat-Dehydrogenase und 400  $\mu\text{M}$  11-Desoxycortisol (Stammlösung in Ethanol) wurden in Reaktionspuffer (50 mM Hepes pH 7,4, 0,05 % Tween 20) gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM NADPH gestartet, 10 min bei 37 °C und 800 rpm inkubiert und dann durch Chloroformextraktion gestoppt.



### 3.2.16. Quervernetzung mittels EDC

Transiente Interaktionen können mitunter durch chemische Quervernetzung nachgewiesen werden (Berggard et al, 2007). Zur Quervernetzung wurde das Reagenz EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl)carbodiimid) verwendet, das Hydroxygruppen aktiviert und sie mit freien Aminogruppen zur Reaktion bringt. Bei räumlicher Nähe entsprechender Gruppen in Proteinkomplexen (C- und N-Terminus, Seitenketten von Asp, Glu und Lys) können so interagierende Proteine irreversibel verknüpft werden.

Es wurden Puffer ohne freie Aminogruppen wie MES oder MOPS mit pH 7,4 oder geringer sowie Reaktionstemperaturen von 4 °C oder 25 °C verwendet. Bei Proteinkonzentrationen von 20 bis 400  $\mu\text{M}$  wurde EDC von 1 bis 8 mM eingesetzt und die Reaktion durch Zugabe von Ammoniumacetat gestoppt.



### 3.2.17. Glyceroldichtegradientenzentrifugation

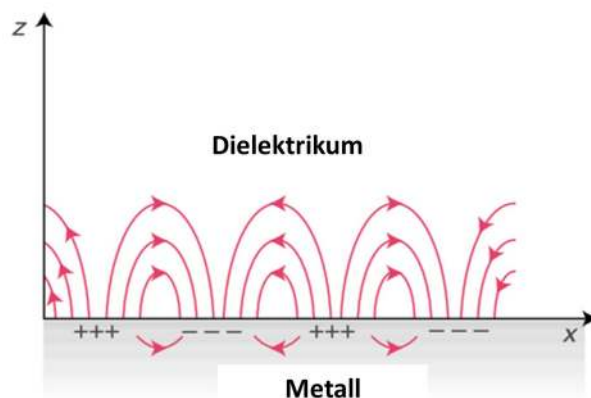
Bei genügend starker Interaktion sedimentieren Proteine in einem Glycerolgradienten gemeinsam in anderen Fraktionen als die isolierten Proteine alleine. Es ist daher möglich Protein-Protein Wechselwirkungen auf diese Art nachzuweisen (Dutkiewicz et al, 2003; Liberek et al, 1992).

Die gereinigten Proteine wurden allein oder gemeinsam bei 4  $\mu\text{M}$  in 80  $\mu\text{L}$  Reaktionsvolumen mit 10 % (v/v) Glycerol gemischt und 10 min bei 25 °C inkubiert. 70  $\mu\text{L}$  wurden dann vorsichtig auf einen 15 - 35 % (v/v) Glycerolstufengradienten (5 % Stufen) von insgesamt 3 mL gegeben und 28 h bei 46000 rpm und 4 °C in einem SW60 Rotor von *Beckmann* zentrifugiert. Es wurden von oben 130  $\mu\text{L}$  Fraktionen abgenommen, die mittels SDS-PAGE-Gel und Silberfärbung analysiert wurden.

### 3.2.18. Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR-Spektroskopie)

Die Methode der SPR-Spektroskopie dient dem Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* und erfordert gereinigte Proteine (Berggard et al, 2007). Oberflächenplasmonen sind kohärente Schwankungen des Elektronenplasmas eines Metalls an der Grenzfläche zu einem Dielektrikum. Die Anregung dieser Schwankungen ist mit Elektronen und unter bestimmten Bedingungen (Wellenlänge, Einstrahlwinkel, Wahl des Dielektrikums) auch mit Licht möglich. Die angeregten Oberflächenplasmonen breiten sich als elektromagnetische Welle in der xy-Grenzebene kohärent aus (Salamona et al, 1997; Van Duyne, 2004) (**Abb. 3.4**). Die Ausbreitung findet auch in z-Richtung im Dielektrikum und im Metall statt, ist aber viel schwächer und nimmt exponentiell mit der Distanz von der Grenzfläche ab (evaneszentes Feld). Die evaneszente Welle fällt dabei im Metall schneller ab als im Dielektrikum, wo sie etwa 200 nm weit reicht.

Bei der SPR-Spektroskopie regt man die Oberflächenplasmonen mit einem Laser an und ermittelt die Resonanzbedingung. In den meisten Fällen verfolgt man dazu bei einem geeigneten Aufbau den Resonanzwinkel. Da die Resonanzbedingung vom Brechungsindex im Bereich der evaneszenten Welle abhängt, führt jede Veränderung in dem etwa 200 nm großen Bereich zu einer Änderung des Resonanzwinkels. Für Interaktionsstudien bindet man den einen Interaktionspartner an die Grenzfläche und beobachtet bei Zugabe eines möglichen Interaktionspartners den Resonanzwinkel, welcher sich bei einer Bindung ändert.



**Abbildung 3.4: Oberflächenplasmonausbreitung an der Grenzfläche Metall-Dielektrikum** (modifiziert nach (Van Duyne, 2004))

Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Doru Vornicescu (Fachbereich Pharmazie, Universität Marburg, AG Prof. Dr. Michael Keusgen) an einem Plasmonic® SPR device (*Plasmonic HSS Systeme*) durchgeführt. Das Gerät arbeitet im statischen Aufbau mit goldbeschichteten Glasprismen („Chips“), auf die Messküvetten aufgebracht werden. Die Funktionalisierung der Prismen erfolgte von Dr. Doru Vornicescu nach etabliertem Protokoll (Vornholt et al, 2007) mit leichten Modifikationen:

Zunächst wurde die Goldoberfläche mit 3-Aminopropyltriethoxysilan Amino-funktionalisiert. Die Aminogruppe wurde mit Succinylsäureanhydrid als Abstandshalter verestert. Anschließend erfolgte die Amidierung mittels N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) an N<sub>ω</sub>N<sub>α</sub>-Bis(carboxymethyl)-L-Lysin, welches als Chelator für Me<sup>2+</sup> fungierte. Nach *in situ* Behandlung von in dieser Art funktionalisierten Prismen mit Co<sup>2+</sup> konnten His<sub>6</sub>-getaggte Proteine an die Chips gebunden und Interaktionsstudien durchgeführt werden.

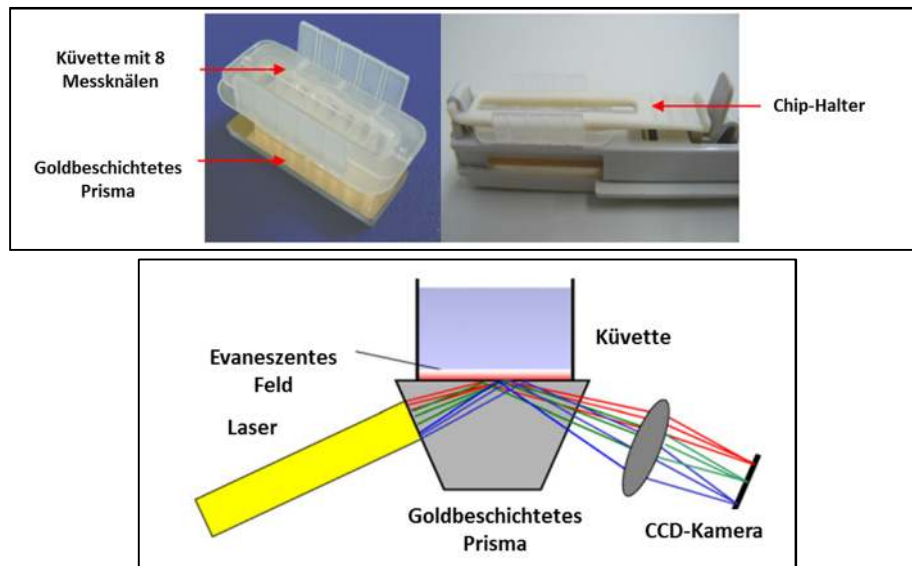


Abbildung 3.5: Prinzipielle Messanordnung des Plasmonic® SPR device (modifiziert nach ((Vornholt et al, 2007)).

### 3.2.19. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde auf zwei verschiedene Arten bestimmt, wobei die photometrische Konzentrationsbestimmung nur für gereinigte Proteine angewendet wurde.

#### 3.2.19.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Proteine besitzen von der Primärstruktur abhängige Extinktionskoeffizienten, mit deren Hilfe man die Konzentration berechnen kann (Gill & von Hippel, 1989). Der wesentliche Beitrag zur Absorption bei 280 nm kommt dabei von den Aminosäuren Tyr und Trp sowie in geringem Maß auch von Disulfidbrücken. Mit Hilfe des Online-Tools *ProtParam* ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) kann man aus der Aminosäuresequenz den Extinktionskoeffizienten berechnen und damit aus der Messung der Absorption bei 280 nm nach dem Lambert-Beerschen-Gesetzes die Konzentration des Proteins bestimmen. Da [2Fe-2S] Cluster sichtbares Licht absorbieren und aus der Literatur Extinktionskoeffizienten für diese Absorptionen bekannt sind, konnten auch diese Chromophore zur photometrischen Konzentrationsbestimmung benutzt werden.

### 3.2.19.2. *Colorimetrisch nach Bradford*

Bei der Konzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) wird der Farbstoff Coomassie-Brilliant Blue G-250 verwendet. Dieser Farbstoff bindet an die basischen Seitenketten von Proteinen. Die dadurch bedingte Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm kann zur Konzentrationsbestimmung benutzt werden. Es wurde eine Eichkurve mit Proben bekannten BSA-Gehaltes erstellt und aus gemessenen Absorptionswerten bei 595 nm die Proteinkonzentration von Proben unbekanntem Proteingehaltes berechnet. Verwendet wurde Bradfordlösungskonzentrat (*Biorad*), welches vor Verwendung im Verhältnis 1:5 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt und über einen Faltenfilter filtriert wurde.

## 3.3. *Proteinreinigung*

### 3.3.1. *Heterologe Genexpression*

Die Überexpression von rekombinantem Protein erfolgte in Zellen der *E. coli* Stämme BL21(DE3)-Gold oder C41(DE3). Als Nährmedium wurde LB-Medium verwendet. In einem 5 L Erlenmeyerkolben wurden 2 L mit entsprechendem Marker versetztes Medium 1:100 von einer Vorkultur inokuliert und bei 37 ° C inkubiert. Bei der Expression von *YAH1* sowie den *FDX1* und *FDX2* Konstrukten wurde noch 50 µM Eisenammoniumcitrat zugesetzt. Bei Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 wurde mit 1 mM Isopropylthiogalaktosid (IPTG) oder 200 µg/ L Anhydrotetracyclin induziert. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Probe „vor Induktion“ entnommen. Die Induktion erfolgte bei 37 °C oder einer niedrigeren Temperatur wie im Ergebnisteil angegeben für 4 h oder über Nacht. Es wurde eine Probe „nach Induktion“ entnommen und die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 5000 rpm) pelletiert, in einem für die spätere Reinigung geeigneten Puffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.3.2. *Präparativer Zellaufschluss von E. coli*

Die *E. coli* Zellsuspension wurde mit Protease-Inhibitor-Mix (50x, Firma *Roche*) sowie 0,5 mM EDTA versetzt und anschließend in drei Durchläufen in dem Gerät EmulsiFlex® C3 (*Avestin*) aufgeschlossen. Zur Degradation von DNA wurde eine Spatelspitze DNaseI zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossenen Zellen wurden durch Zentrifugation (zweimal 15 min, 20000 rpm, 4 °C) entfernt und das Lysat vor der weiteren Verwendung durch einen 0,45 µm Filter (*Millipore*) filtriert.

### 3.3.3. Chromatographische Verfahren

Für alle chromatographischen Verfahren wurde ein ÄKTA™purifier 10 System (*GE Healthcare*) verwendet. Alle Puffer wurden vor Verwendung mittels einer Vakuumpumpe durch einen 0,45 µm Filter steril-filtriert und dabei entgast.

#### 3.3.3.1. Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA

Bei der Ni-NTA-Chromatographie handelt es sich um ein IMAC-Chromatographie-Verfahren (IMAC - *immobilized metal affinity chromatography*). Man nutzt kovalent an eine Matrix (z. B. Agarose) gebundene Nitrilotriessigsäure (NTA) als metallchelatisierende Gruppe, welche mit zweiwertigen Metallkationen chemisch recht stabile, vierzählige Chelatkomplexe bildet (Hochuli et al, 1987). Als Kation wird meistens  $\text{Ni}^{2+}$  verwendet, welches über seine zwei freien Koordinationsstellen chelatisierende Seitengruppen von Proteinen binden kann.

Eine hohe Affinität besitzt Ni-NTA zu Polyhistidinsequenzen, welche deshalb als His-Tag an rekombinante Proteine fusioniert werden. Die Elution des an die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Matrix gebundenen Proteins kann zum einen durch Reduzierung des pH-Werts auf ca. fünf (Protonierung der Histidinseitenketten) oder durch kompetitives Verdrängen mit Imidazol herbeigeführt werden. Unspezifisch gebundene Proteine können zuvor durch Waschen mit geringen Imidazolkonzentrationen entfernt werden.

Es wurden 1 mL oder 5 mL HisTrap® HP Säulen von *GE Healthcare* nach Herstellerangaben verwendet (Standardpuffer 50 mM Na-Phosphat pH 8,0, 300 mM NaCl, 15 mM/ 500 mM Imidazol).

#### 3.3.3.2. Ionentauscherchromatographie

Proteine tragen abhängig von ihrem pI-Wert und dem pH-Wert des sie umgebenden Milieus eine bestimmte Ladung. Ist der pH-Wert kleiner als der pI-Wert, so ist die resultierende Ladung positiv (mehr protonierte Seitenketten), im umgekehrten Fall ist die Ladung negativ (mehr deprotonierte Seitenketten). Bei geeigneter Wahl der Bedingungen kann ein geladenes Protein bei geringer Ionenstärke an Ionentauschermaterialien gebunden und unter Hochsalzbedingungen eluiert werden. Dies wird bei der Ionentauscherchromatographie zur Proteinreinigung genutzt.

Yah1, Fdx1 und Fdx2 haben pI-Werte von unter fünf und lassen sich deshalb gut bei neutralem pH-Wert an eine quartäre Ammoniumverbindungen tragende Matrix binden und wieder eluieren (Anionentauscherchromatographie). Es wurden zwei verschiedenen Säulenmaterialien der Firma *GE Healthcare* nach Herstellerangaben verwendet: 1) Q Sepharose® fast flow und 2) Source™ 15 Q. Die verwendeten Puffer waren dabei: 1) 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 0/ 500 mM NaCl und 2) 50 mM HEPES pH 7,5, 0/ 1 M NaCl).

### 3.3.3.3. *Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC)*

Die HIC macht sich den Aussalzeffekt bei Proteinen zu nutze. Bei hoher Ionenstärke wird einem Protein seine Hydrathülle entzogen und es kann über hydrophobe Wechselwirkungen seiner aliphatischen Seitenketten an andere hydrophobe Materialien binden.

Yah1, Fdx1 und Fdx2 haben auch bei 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration eine hinreichend hohe Löslichkeit und lassen sich somit mittels des Säulenmaterials Phenyl Sepharose® der Firma *GE Healthcare* reinigen. Die Probe wurde in 50 mM Na-Phosphat-Puffer 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gebunden und mit einem Gradienten von 2,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nach 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in Puffer eluiert.

### 3.3.3.4. *Größenausschlusschromatographie (SEC)*

Die Größenausschlusschromatographie (SEC von *size exclusion chromatography*), auch Gelfiltrationschromatographie genannt, basiert darauf, dass Proteine durch eine Gelmatrix mit Poren definierter Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit diffundieren, da ihnen je nach ihrer räumlichen Ausdehnung mehr oder weniger Raum in der Matrix zur Verfügung steht. Proteine, die in keine Poren eindringen können, werden im so genannten Ausschlussvolumen eluiert. Die Diffusionsgeschwindigkeit der Proteine durch die Gelmatrix ist in erster Näherung proportional zu dem Logarithmus der molekularen Masse. Eine Abschätzung des Molekulargewichts in Lösung ist demnach mit dieser Methode möglich.

Die Gelfiltration wurde sowohl präparativ zur Proteinreinigung als auch analytisch - nach Kalibration der Säule mit Standardproteinen - zur Bestimmung des Molekulargewichts eingesetzt. Verwendet wurden vorgefertigte Säulen der Firma *GE Healthcare*, die jeweils unter Beachtung der vom Hersteller angegebenen Spezifikationen verwendet wurden. Im Einzelnen waren dies folgende Säulen:

Superdex 200 10/ 300 GL; High Load Superdex 200 16/ 60 pg; High Load Superdex 75 16/ 60 sowie Superose® 6 HR 10/30.

### 3.3.4. **Umpuffern von Proteinen**

Entsalzungssäulen bestehen aus Gelfiltrationsmaterial und erlauben die Trennung hochmolekularer Spezies (>5000 Da), wie Proteine, von niedermolekularen Substanzen (<1000 Da), wie z. B. Tris oder Salzen. Somit können mit ihnen Proteine in Puffer gewünschter Zusammensetzung überführt werden. Es wurden PD-10 Entsalzungssäulen (*GE Healthcare*) und DextraSEC PRO2 (*AppliChem*) für Probenvolumen von 1,5 mL bzw. 200  $\mu\text{L}$  nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.3.5. Konzentrierung von Proteinen

Für die Konzentrierung von Proteinlösungen wurden Amicon Ultra-Konzentratoren (*Millipore*) mit einem Fassungsvermögen von 5 bzw. 15 mL verwendet. Das Ausschlussvolumen betrug im Normalfall 10 kDa. Konzentriert wurde bei maximal 4000 rpm in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C. Die Zentrifugation wurde nach kurzen Zeitintervallen unterbrochen und die Lösung mit einer Pipette durchmischt, um einer Ausfällung des Proteins an der Membran vorzubeugen.

## 3.4. Proteinkristallisation und Proteinstrukturbestimmung

Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen und Proteinkomplexen trägt wesentlich zum Verständnis biochemischer und biologischer Vorgänge bei. Das Gebiet der Strukturbiologie umfasst dabei die einzelnen Teilbereiche Elektronenmikroskopie, Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) und Röntgenkristallographie. Während die Elektronenmikroskopie für große Proteinkomplexe bei geringerer Auflösung verwendet wird, eignet sich die NMR-Spektroskopie nur für die Strukturbestimmung kleiner bis mittlerer Proteine (maximal 50 - 70 kDa). Die Röntgenkristallographie ist hinsichtlich der Größe des zu untersuchenden Proteins nicht limitiert, erfordert dafür allerdings einen Einkristall des Proteins.

Bei der Kristallstrukturanalyse mittels Röntgenstrahlung wird die Verteilung der Elektronen in der Elementarzelle eines Kristalles bestimmt. Da die Wellenlänge von Röntgenstrahlen (1 pm bis 10 nm) in der Größenordnung von Atomabständen in Kristallen liegt, wirken Kristalle wie ein dreidimensionales Beugungsgitter auf Röntgenstrahlung. Die Wechselwirkung erfolgt dabei mit den Elektronen der Atome des Kristalls. Konstruktive Interferenz tritt nur unter bestimmten Winkeln von Gitterebene zu Röntgenstrahlung auf, wobei die Gitterebene alle Gitterpunkte eines Kristalls beschreibt. Der Gangunterschied  $2\delta$  muss ein Vielfaches der Wellenlänge ( $n\lambda$ ) sein. Die Größen  $\delta$  und  $\lambda$  stehen über den Beugungswinkel  $\theta$  in folgendem Zusammenhang:

$$\sin \theta = \frac{\delta}{d}$$

Berücksichtigt man die Interferenzbedingung so ergibt sich das in **Abb. 3.6** veranschaulichte Bragg'sche Gesetz:

$$2 * d * \sin \theta = n * \lambda$$

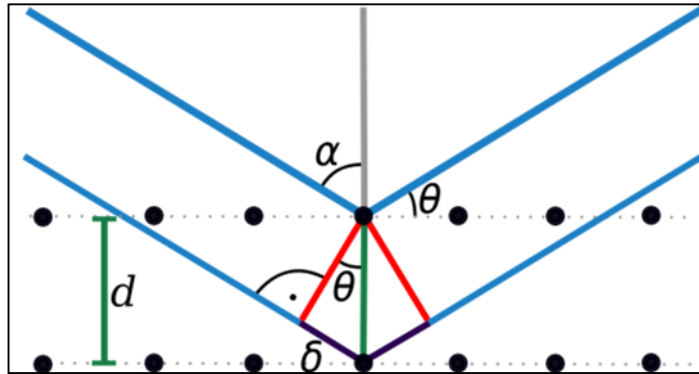


Abbildung 3.6: Veranschaulichung des Bragg'schen Gesetzes

Durch Messung der konstruktiven Interferenzen eines Kristalles, der sogenannten Reflexe, ist es möglich die Elektronendichteverteilung innerhalb der Einheitszelle eines Kristalls und damit die Struktur eines Proteins zu berechnen.

Zur Kristallstrukturbestimmung von Proteinen benötigt man gut streuende Kristalle. Geeignete Bedingungen für die Kristallisation eines Proteins lassen sich nur empirisch ermitteln. Man variiert zahlreiche Faktoren, die für die Proteinlöslichkeit und -kristallisation von Bedeutung sein können: Temperatur, pH-Wert, Pufferart, Konzentration und Art des Fällungsmittels (Präzipitans), Ionenstärke sowie die Konzentration und Reinheit des Proteins.

Es gibt zwei gängige Methoden für die Kristallisation von Proteinen: die „hanging drop“ (Davies, 1971) und die „sitting drop“ Methode (McPherson, 1990). Beide beruhen auf dem Prinzip der Dampfphasendiffusion. In einem abgeschlossenen System befinden sich ein Reservoir an vorgelegter Kristallisationslösung sowie ein Tropfen, der durch Mischen von einem Teil Kristallisationslösung und einem Teil Proteinlösung, hergestellt wurde. Je nach Methode „hängt“ ein Tropfen an dem Deckel, mit dem das System verschlossen wurde, oder der Tropfen „sitzt“ in einer Vertiefung („well“). Da der Tropfen nun durch das Vermischen mit der Proteinlösung geringere Salz- und Fällungsmittelkonzentrationen als die Kristallisationslösung enthält, erfolgt durch Dampfdiffusion Wassertransport vom Tropfen ins Reservoir. Auf diese Weise werden schonend Protein-, Salz- und Fällungsmittelkonzentration erhöht, was im Idealfall zur Bildung eines Kristallisationskeimes und zu geordnetem Kristallwachstum führt.

#### 3.4.1. Probenvorbereitung

Die für die Kristallisation vorgesehenen Proteinlösungen wurden nach der Reinigung auf eine geeignete Konzentration konzentriert und direkt vor der Kristallisation mittels 0,22  $\mu\text{m}$  Ultrafree-MC Sterilfitereinheit (Millipore) partikelfrei filtriert. Ebenso wurden alle für die Kristallisation verwendeten Lösungen durch geeignete Filter (0,22  $\mu\text{m}$  oder 0,45  $\mu\text{m}$ ) steril filtriert und waren vom höchsten verfügbaren Reinheitsgrad.



### 3.4.2. Proteinkristallisation

Zunächst wurde ein Vorscreening durchgeführt, in dem kommerziell erhältliche Kristallisationsscreens verwendet wurden. Diese Screens sind so genannte „sparse matrix screens“ (Jancarik & Kim, 1991), denen die Variation oben genannter Parameter prinzipiell zu Grunde liegt. Es wurden die folgenden Screens der Firma *Qiagen* verwendet: Classics Suite, PACT Suite, MBCI Suite, MBCII Suite, AmSO4 Suite, Anions Suite. Die weiterhin benötigten Verbrauchsmaterialien wie VIEWseal™-Klebefolien, 96 well CrystalQuick™-Platten, VDX-Platten, Cryoschleifen und Zubehör stammten von den Firmen *GreinerBioOne* und *Hampton Research*.

Die *sitting-drop*-Variante der Dampfphasendiffusion wurde mit Hilfe eines Pipettierroboters (*Genomic Solutions*) im 96-well-Maßstab durchgeführt mit 80 µL Reservoirlösung und einer Tropfengröße von 300 nL Proteinlösung plus 300 nL Präzipitanlösung. Die Inkubation der Kristallisationsansätze erfolgte bei 4 °C oder bei 18 °C. Die Platten wurden ein bis zwei Tage nach Pipettieren und anschließend in Wochen- bis Monatsabständen begutachtet. Dazu wurden Stereomikroskope (*Olympus* und *Leica*) verwendet.

Waren Bedingungen zu erkennen, bei denen es zu Kristallwachstum kam, wurden diese durch Variation einzelner Parameter der Kristallisationsbedingung optimiert. Die Durchführung der Optimierungsscreens erfolgte manuell nach der „*hanging drop*“-Methode oder wie zuvor unter Zuhilfenahme des Pipettierroboters. Für die manuelle Optimierung wurden Platten der Firma *Nextal* (Crystallization Tool, 24er wellplate) verwendet. 1 - 1,5 µL steril filtrierte Proteinprobe wurde mit der jeweiligen Präzipitanlösung gemischt und auf den Schraubdeckel eines einzelnen Wells pipettiert. Im Reservoir des Wells befanden sich zwischen 0,75 - 1,0 mL der entsprechenden Präzipitanlösung. Nach Verschluss der Deckel wurden die Platten wie zuvor inkubiert und inspiziert.

### 3.4.3. Cryopuffer-Test

Da Proteinkristalle in der Regel empfindlich sind erfolgt die Messung normalerweise bei 100 K. Vor der Messung müssen die Kristalle aus diesem Grund in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Um zu verhindern, dass sich beim Schockfrieren Eiskristalle bilden, verwendet man sogenannte Cryoprotektantien wie Glycerol oder PEG 400. Potentielle Cryopuffer wurden vor Verwendung an der *Inhouse*-Kupferdrehanode durch zweiminütige Belichtung mit Röntgenstrahlung und Aufnahme eines Beugungsbildes auf Diffraktion und typische Eisringe (1,9 Å, 2,5 Å, 3,66 Å) getestet.

### 3.4.4. Datensammlung und Datenreduktion

Die Datensammlung der erhaltenen Kristalle wurde am *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) in Grenoble an der Beamline ID14-4 durchgeführt. Der für die Strukturlösung verwendete

Kristall HOW54 wurde mit einer Belichtungszeit von 0,4 s für jede Aufnahme vermessen. Der Kristall oszillierte während der Aufnahme um 0,5 ° und wurde für die Aufnahme von 720 Bildern vollständig um 360 ° gedreht. Die Integration der Daten erfolgte mit dem Programm XDS, die Datenreduktion wurde mit dem Programm XSCALE durchgeführt (Kabsch, 2010).

### 3.4.5. Strukturlösung, Modellbau und Strukturverfeinerung

Das Phasenproblem (Taylor, 2003) wurde im vorliegenden Fall der Fdx2-Struktur durch *single wavelength anomalous dispersion* (SAD) mittels der Programme SHELXC, SHELXD und SHELXE gelöst (Sheldrick, 2008). Das Initiale Modell wurde mit dem Programm ARP/wARP (Perrakis et al, 1999) ohne Vorgaben automatisch generiert und dabei 202 von 214 Aminosäuren in der Elektronendichte platziert. Die weitere Verfeinerung erfolgte mit Hilfe der Programme COOT (Emsley & Cowtan, 2004) und REFMAC (Murshudov et al, 1997).

Eine qualitative Beurteilung der verfeinerten Struktur liefert der kristallographische R-Faktor  $R_{\text{cryst}}$  (auch  $R_{\text{work}}$  genannt). Dieser beschreibt die relative Diskrepanz zwischen den experimentell bestimmten Strukturfaktoramplituden ( $F_{\text{obs}}$ ) und den berechneten Strukturfaktoramplituden aus der Modellstruktur ( $F_{\text{calc}}$ ).

$$R_{\text{work}} = \frac{\sum_{hkl}(F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})}{\sum_{hkl}(F_{\text{obs}})}$$

Um eine Überinterpretation der gemessenen Daten bei niedrigem Daten-Parameter-Verhältnis zu verhindern wird ein Teil der Daten (in der Regel 5 %) nicht in die Verfeinerung mit einbezogen und ausschließlich zur Berechnung des freien R-Faktors  $R_{\text{free}}$  verwendet (Brunger, 1992), der analog dem  $R_{\text{cryst}}$  mit den 5 % der Daten berechnet wird.

### 3.4.6. Graphische Darstellung

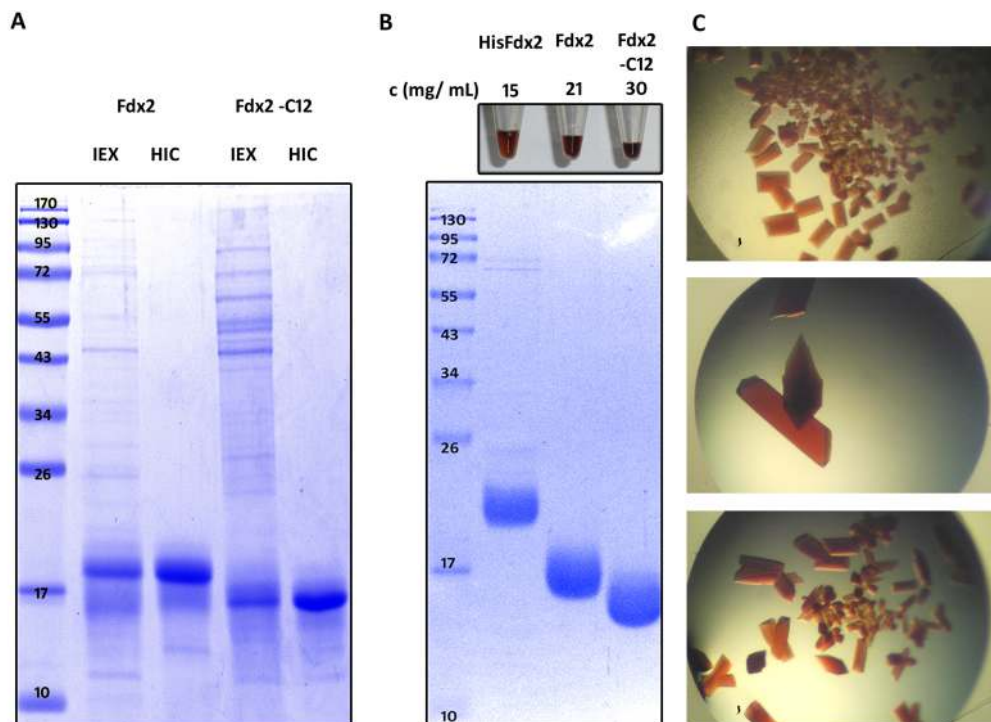
Sämtliche Abbildungen von Proteinstrukturen und Proteinoberflächen wurden mit dem Programm PyMOL (Delano, 2002) und dem APBS-Plugin (Baker et al, 2001) erstellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1. Struktur von humanem Fdx2

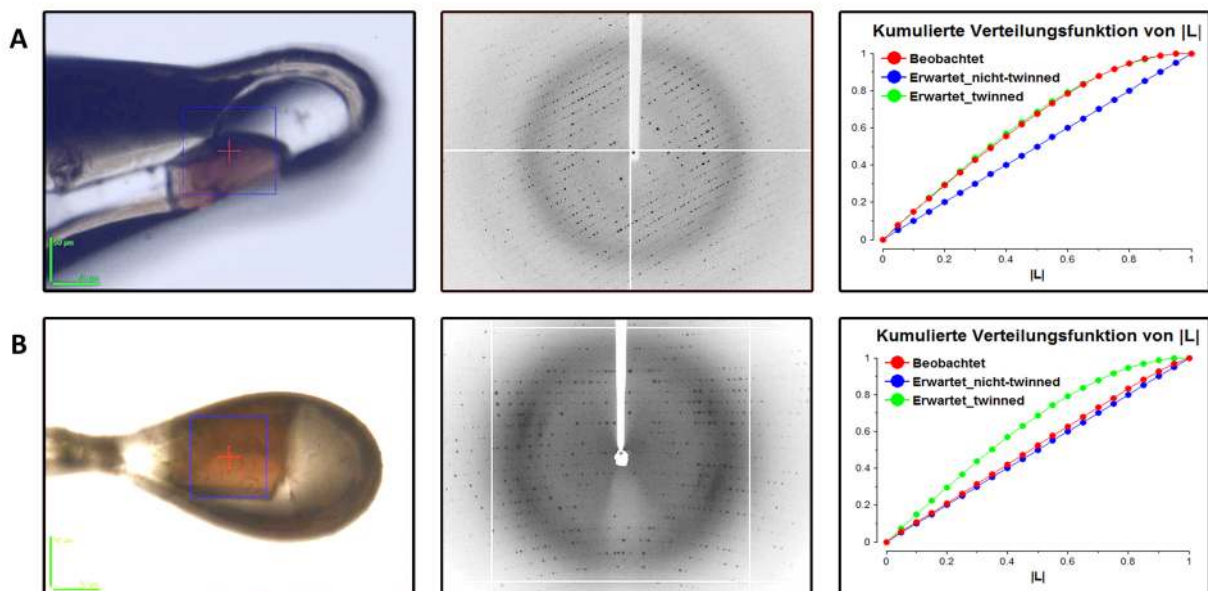
#### 4.1.1. Reinigung und Kristallisation von Fdx2

Die für die Strukturbestimmung notwendige Kristallisation wurde mit verschiedenen Fdx2 Varianten durchgeführt. Getestet wurde zunächst das N-terminal His<sub>6</sub>-getaggte Volllängenprotein (HisFdx2), welches über Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie (SEC) gereinigt wurde. Dieses Protein lieferte in keiner der getesteten Bedingungen Kristalle. Da im homologen Protein Adx aus Rind der C-Terminus in der Kristallstruktur des Volllängenproteins ungeordnet war (Pikuleva et al, 2000), erfolgte eine C-terminale Verkürzung des Proteins um 12 Aminosäuren. Gleichzeitig wurde der His<sub>6</sub>-Tag molekularbiologisch entfernt und das Protein mittels Anionenaustauschchromatographie (IEX) und Hydrophober-Interaktions-Chromatographie (HIC) ohne Affinitätstag gereinigt. Auch hier zeigte sich, dass das Volllängenprotein ohne His<sub>6</sub>-Tag (Fdx2) nicht kristallisierte, wohingegen C-terminal verkürztes Fdx2 (Fdx2 -C12) mit Natriumcitrat oder Ammoniumsulfat als Präzipitans bei 4 °C und 18 °C innerhalb von einem bis wenigen Tagen dunkelrote Kristalle lieferte (**Abb. 4.1**).



**Abbildung 4.1: Kristallisation von humanem Fdx2.** (A) SDS-PAGE der Reinigung von Fdx2 und Fdx2 -C12 - jeweils 5 µg der Eluate der IEX und HIC Schritte. (B) Vergleich von jeweils 5 µg gereinigtem HisFdx2, Fdx2 und Fdx2 -C12 auf SDS-PAGE, bzw. Fotografie der Holo proteinpräparationen. (C) Kristalle von Fdx2 -C12 erhalten aus folgenden Bedingungen (30 mg/ mL Protein, 4 °C): oben - 100 mM MES pH 7,0, 3,1 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Mitte - 0,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; unten - 1,6 M Na-Citrat.

Das kristallisierte Protein umfasste die Reste 66 - 171 des ORF von *FDX2* (Uniprot-id. Q6P4F2) und entsprach den Resten 5 - 112 von bovinem Adx, dessen Nummerierung zum besseren Vergleich mit den Literaturdaten in dieser Arbeit verwendet wurde. Die erhaltenen Kristalle waren empfindlich hinsichtlich mechanischer Beanspruchung und besonders solche aus Bedingungen mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  als Präzipitans zeigten einen schichtartigen Aufbau und zerfielen bei Kontakt leicht spontan. Außerdem wurde festgestellt, dass Kristalle aus diesen Bedingungen zwar gut streuten und einen Datensatz bis  $1,55 \text{ \AA}$  lieferten, dafür aber fast perfekt „vertwinnt“ waren (**Abb. 4.2**). Mit Na-Citrat erhaltene Kristalle streuten nicht ganz so gut, zeigten dafür aber kein Twinning. Die optimierten Kristallisationsbedingungen waren: 30 mg/ mL Protein, 1,6 M Na-Citrat und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  Inkubationstemperatur. 20 % Glycerol wurde als Cryoprotektant verwendet, die Kristalle schockgefroren und am ESRF in Grenoble vermessen.

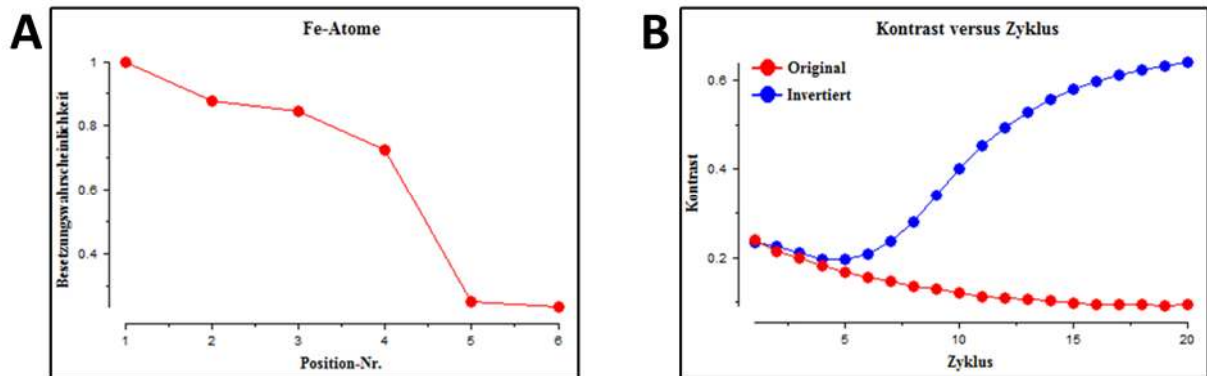


**Abbildung 4.2: Diffraction und Datensammlung von Fdx2-Kristallen erhalten mit zwei unterschiedlichen Präzipitantien. (A)** Kristall HOW44 kristallisiert aus Bedingung: 100 mM MES pH 7,0, 3,2  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . **(B)** Kristall HOW54 kristallisiert aus Bedingung: 1,6 M Na-Citrat. **(A, B)** Links: Bild von im Synchrotronstrahlengang montiertem Kristall; Mitte: beispielhaftes Diffraktionsbild; Rechts: Ergebnis des L-Test auf Twinning aus der Skalierungsroutine des Programms SCALA (CCP4, 1994).

#### 4.1.2. Datenreduktion, Strukturlösung und -verfeinerung

Von Kristall HOW54 konnte an der Beamline ID14-4 am ESRF in Grenoble bei 100 K ein Datensatz bis  $1,7 \text{ \AA}$  gesammelt werden. Die Datenprozessierung erfolgte mit Hilfe von XDS und dem CCP4 Programmpaket (CCP4, 1994; Kabsch, 2010). Der Kristall gehörte zur monoklinen Raumgruppe  $P2_1$  und enthielt zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheitszelle. Der Matthews Koeffizient  $V_m$  betrug  $2,79 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  und der Lösemittelgehalt lag bei 55,9 % (Matthews, 1968). Um eine mögliche Beeinflussung der Strukturlösung durch das initiale Suchmodell (Taylor, 2010) zu vermeiden, erfolgte die Phasierung nicht durch molekularen Ersatz, sondern durch die SAD-Methode (*single-wavelength*

*anomalous dispersion, SAD*) (Dauter et al, 2002; Dodson, 2003). Es wurde die anomale Streuung des Eisen aus dem Fe/S-Cluster verwendet und das Softwarepaket SHELXCDE benutzt (Sheldrick, 2008; Sheldrick, 2010). SHELXD konnte vier Eisenatome in der Einheitszelle lokalisieren, was genau der Erwartung von zwei Monomeren mit [2Fe-2S] Cluster je Einheitszelle entsprach und die durch SHELXE vorgenommene Phasierung und Dichtemodifikation ergab eindeutig die richtige der beiden möglichen Lösungen der Phasen (**Abb. 4.3**).



**Abbildung 4.3: Lösung des Phasenproblems durch die SAD-Methode. (A)** Besetzungswahrscheinlichkeit von anomalen Streupositionen wie von SHELXD bestimmt. **(B)** Bestimmung der richtigen Phasenlösung (invertierte Phasen) mit SHELXE.

Der Modellbau erfolgte zunächst automatisiert mit dem Programm ARP/wARP (Perrakis et al, 1999), welches 202 von 216 Aminosäuren der beiden Moleküle einbauen konnte. Fehlende Reste wurden manuell mit Hilfe des Programms COOT (Emsley & Cowtan, 2004) eingebaut und das Modell mit dem Programm REFMAC (Murshudov et al, 1997) verfeinert.

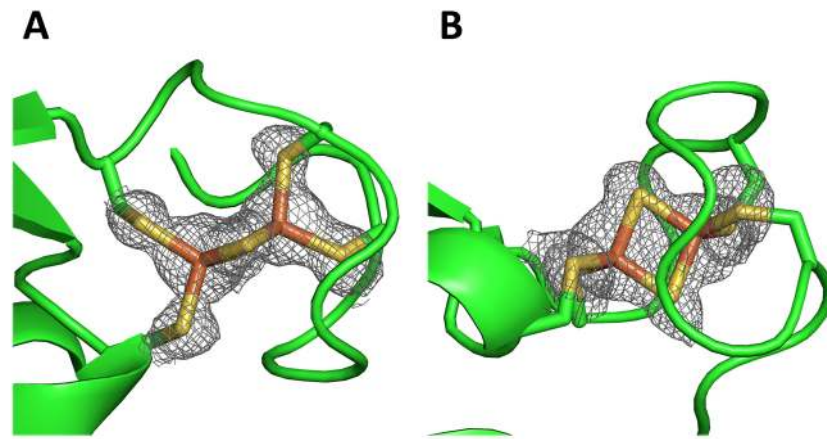
Verschiedene Runden iterativen Modellbaus und Verfeinerung mit den genannten Programmen lieferte das endgültige Strukturmodell, welches neben den Resten 3 bis 109 von beiden Molekülen (von insgesamt je 109 Resten) jeweils ein [2Fe-2S] Cluster und ein Sulfat-Ion je Molekül sowie insgesamt 220 Wassermoleküle umfasste. In dem Modell sind die Reste E40 aus Kette A und Q16 aus Kette B in zwei alternativen Konformationen modelliert und aufgrund von Flexibilität wurden die Seitenketten der geladenen Reste E58, D62, E83, K106 und R109 nur teilweise gefunden. Die Qualität des Strukturmodells wurde mit PROCHECK (Laskowski et al, 1993) und PROMOTIF (Hutchinson & Thornton, 1996) überprüft und ist in **Tabelle 4.1** gemeinsam mit den Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken zusammengefasst. Die Struktur wurde in der PDB-Datenbank ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) hinterlegt und trägt die PDB-ID 2Y5C.

<b>Datensammlung</b>	
Wellenlänge, Å	1,319
Raumgruppe	P 1 2 1
Zelldimensionen	
a; b; c, Å	51,38; 35,45; 75,51
$\beta$ , °	105,13
Auflösungsbereich, Å	49,6 – 1,70 (1,79 – 1,70)
R <sub>merge</sub> %	5,7 (45,7)
I/ $\sigma$ (I)	22,0 (5,2)
Vollständigkeit, %	97,9 (96,5)
Multiplizität	7,1 (7,2)
Gemessene Reflexe	
insgesamt	202987 (29635)
einzigartige	28713 (4094)
B Faktor <sup>a</sup> , Å <sup>2</sup>	18,0
Anormale Vollständigkeit, %	96,9 (95,6)
Anormale Multiplizität	3,7 (3,7)
<b>Phasierungsstatistik</b>	
Anzahl Fe-Positionen	4
CC für Lösungen <sup>b</sup>	>20
<b>Verfeinerungsstatistik</b>	
R <sub>cryst</sub> / R <sub>free</sub> (%)	17,28/ 20,05
Anzahl Nichtwasserstoffatome	
Protein <sup>c</sup>	1662
Wasser	220
B Faktoren, Å <sup>2</sup>	
Protein <sup>c</sup>	14,52
Wasser	26,67
rmsd Bindungslängen (Å)	0,012
rmsd Bindungswinkel (°)	1,53
Ramachandran-Plot	
erlaubte Regionen (%)	91,8
zusätzlich erlaubte Regionen (%)	8,2
großzügig erlaubte Regionen (%)	0
verbotene Regionen (%)	0
Werte in Klammern gelten für die höchste Auflösungsschale.	
<sup>a</sup> B Faktor aus Wilson-Plot.	
<sup>b</sup> Korrelationskoeffizient CC nach SHELXD.	
<sup>c</sup> einschließlich zwei [2Fe-2S]-Cluster und zwei SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> Ionen.	

Tabelle 4.1: Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistik

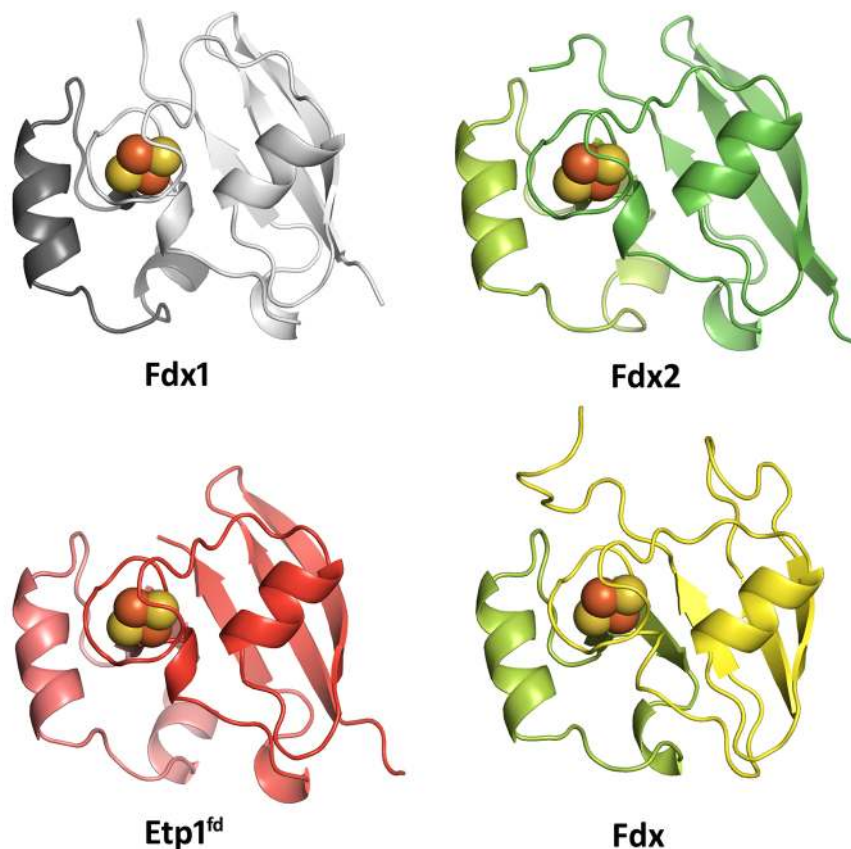
#### 4.1.3. Strukturbeschreibung - Fdx2 ist ein typisches MB-Typ Ferredoxin

Fdx2 zeigte eine kompakte ( $\alpha+\beta$ ) Faltung typisch für [2Fe-2S] Ferredoxine, welche unter der Bezeichnung  $\beta$ -*grasp* bekannt ist und auch in anderen Proteinen wie zum Beispiel Ubiquitin gefunden wird (Murzin et al, 1995). Das  $\beta$ -*grasp* Motiv ist ein gemischtes  $\beta$ -Faltblatt mit vier  $\beta$ -Strängen, welches von einer  $\alpha$ -Helix flankiert wird. In Fdx2 besteht das  $\beta$ -Faltblatt aus fünf  $\beta$ -Strängen und außerdem gibt es insgesamt drei längere  $\alpha$ -Helices und zwei kurze Helices vom  $3_{10}$ -Typ. Ähnlich zur Struktur von Adx (Muller et al, 1998) wurden in Fdx2 zwei Domänen gefunden: eine größere hydrophobe Kerndomäne (Reste 5 - 55 und 91 - 112), die die Cluster-koordinierenden Cysteine enthält, sowie eine kleinere sogenannte „Interaktionsdomäne“ (Reste 56 - 90). Wie erwartet war Fdx2 in der Holoform und es wurde eindeutig die Elektronendichte des [2Fe-2S] Clusters gefunden (Abb. 4.4).



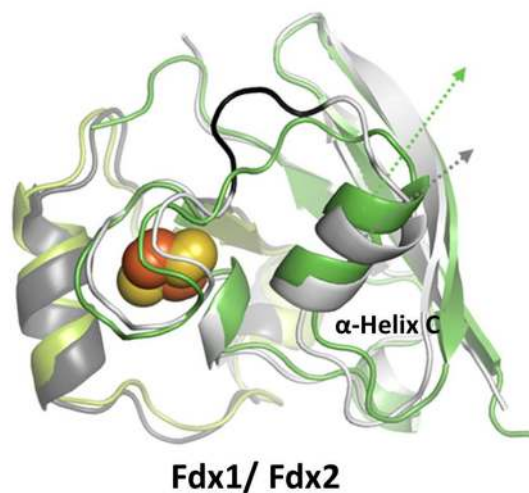
**Abbildung 4.4:** Fdx2 enthält einen [2Fe-2S] Cluster.  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  Elektronendichte ( $1 \sigma$ ,  $1,6 \text{ \AA}$ , grau) des [2Fe-2S] Clusters sowie der koordinierenden Sulfhydrylgruppen. **(A)** Seitenansicht, **(B)** Aufsicht.

Ein Vergleich der Fdx2 Struktur mit den Strukturen anderer MB-Typ-Ferredoxine zeigte auf den ersten Blick keine gravierenden Unterschiede (**Abb. 4.5**). Ein strukturbasiertes Alignment mit Hilfe von "Protein structure comparison service SSM at European Bioinformatics Institute" (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm>) (Krissinel & Henrick, 2004) lieferte folgende rmsd Werte für den Unterschied zwischen den Gerüstatomen von Fdx2 und den angegebenen Strukturen: Adx 1AYF -  $1,12 \text{ \AA}$ , Adx 1CJE -  $1,13 \text{ \AA}$ , Fdx1 3P1M -  $1,14 \text{ \AA}$ , Etp1<sup>fd</sup> 2WLB Kette A -  $0,79 \text{ \AA}$ / Kette B -  $1,05 \text{ \AA}$ , Fdx 1I7H -  $1,46 \text{ \AA}$ .



**Abbildung 4.5:** Fdx2 zeigt große strukturelle Ähnlichkeit zu anderen MB-Typ Ferredoxinen. Vergleich der Strukturen von humanem Fdx1 (Modell erstellt mit SWISS-MODEL (Arnold et al, 2006) basierend auf Adx (1CJE - Kette B)), humanem Fdx2 (2Y5C), *S. pombe* Etp1<sup>fd</sup> (2WLB) und *E. coli* Fdx (1I7H). Die Kerndomäne ist jeweils rechts dargestellt, die Interaktionsdomäne links. Beide Domänen unterscheiden sich durch leicht verschiedene Farben.

Die direkte Überlagerung der Struktur von Fdx2 mit der von Fdx1 (Modell basierend auf der Struktur von Adx aus Rind, welches 87 % identisch zu Fdx1 ist) zeigte, dass nur zwei Bereiche der C<sub>α</sub>-Positionen eine deutliche Abweichung aufwiesen (**Abb. 4.6**). Diese Unterschiede zu Fdx1 umfassen zum einen die Verkürzung der Schleife nach  $\alpha$ -Helix C sowie zum anderen die dadurch bedingte andere Orientierung von  $\alpha$ -Helix C, welche im Vergleich zu Fdx1 um 15 ° anders gekippt ist. Beides zusammen führt zu einer etwas kompakteren Struktur von Fdx2 im Vergleich zu Fdx1 und zu einer anderen Oberflächengestalt im Bereich von  $\alpha$ -Helix C. Die beschriebenen strukturellen Unterschiede zwischen Fdx2 und Fdx1 lassen sich auf die beiden zusätzlichen Fdx1-Reste F43 und G44 unmittelbar nach  $\alpha$ -Helix C und vor dem ersten Fe/S-Cluster-koordinierenden Cystein C46 zurückführen. F43 und G44 sind in Fdx2 nicht vorhanden (Siehe auch Kapitel 4.2).



**Abbildung 4.6:** Fdx2 unterscheidet sich in zwei Punkten strukturell von Fdx1. Direkte Überlagerung der Strukturen von humanem Fdx1 (grau; siehe Abb. 4.5) und humanem Fdx2 (grün; 2Y5C). Die Schleife mit den Resten F43 und G44 nach  $\alpha$ -Helix C in Fdx1 ist schwarz markiert, die Orientierungen von  $\alpha$ -Helix C sind mit Pfeilen angegeben.

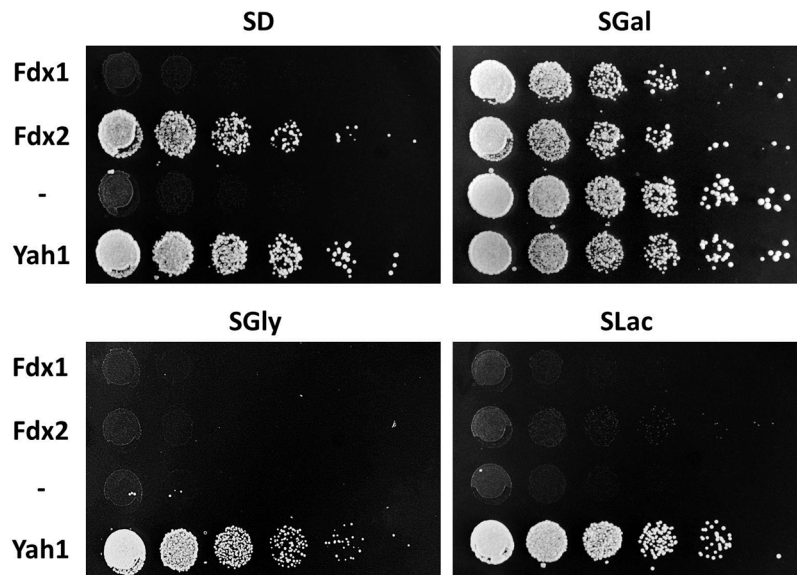
## 4.2. Analyse der Spezifitäten der Ferredoxine Fdx1, Fdx2 und Yah1

### 4.2.1. Fdx1, Fdx2 und Yah1 zeigen drei Wachstumsphänotypen bei der Komplementation von Gal-YAH1 Zellen

Zur Überprüfung der Funktionsspezifität wurden die beiden human Ferredoxingene *FDX1* und *FDX2* ohne kodierende Information für die mitochondriale Lokalisierungssequenz in einen p426-Vektor hinter die kodierende Information der Signalsequenz der F<sub>1</sub>β-ATPase-Untereinheit aus *Neurospora crassa* kloniert. Außerdem wurde das *YAH1* Gen aus *S. cerevisiae* mit endogenem Promotor (-308 bis -1) in ein p416-Plasmid kloniert. Diese Konstrukte und entsprechende Plasmide ohne Gen wurden in Gal-YAH1 Zellen transformiert. In diesen Zellen ist der Promotor des *YAH1* Gens durch den *GAL1-10* Promotor ersetzt worden, wodurch die Expression des *YAH1* Gens Galaktose erfordert. Auf anderen Zuckerquellen wird der Promotor abgeschaltet und wegen des essentiellen Charakters von



*YAH1* wird ein starker Wachstumsdefekt beobachtet (Lange et al, 2000). Einzelne Kolonien wurden auf SGal Platten bei 30 °C vermehrt, anschließend wurden die Zellen in 800 µL Wasser resuspendiert und auf eine  $OD_{600nm}$  0,5 verdünnt. Hiervon wurde eine Verdünnungsreihe mit jeweils 1:5 Verdünnung hergestellt und mit dieser Verdünnungsreihe wurde das Wachstum unter fermentativen Depletionsbedingungen (SD) sowie respiratorischen Depletionsbedingungen (SLac, SGly) getestet. Als Kontrolle diente das Wachstum auf SGal Medium (**Abb. 4.7**).



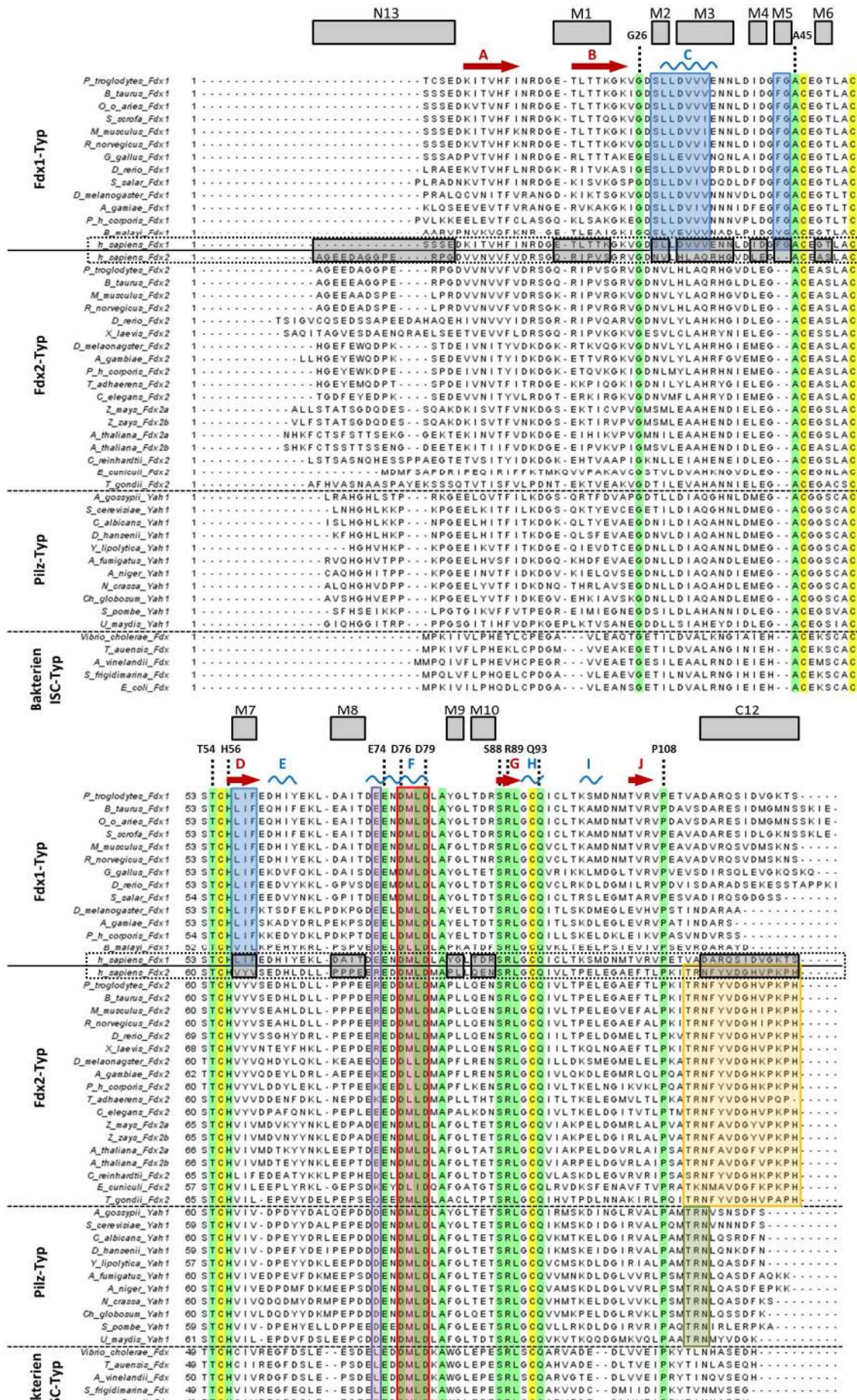
**Abbildung 4.7: Unterschiedliche Phänotypen bei der Komplementation von Gal-YAH1 Zellen mit den Ferredoxinen Fdx1, Fdx2 und Yah1.** Gal-YAH1 Zellen wurden mit den Plasmiden p426-Fdx1 (Fdx1), p426-Fdx2 (Fdx2), p416-Yah1 (Yah1) sowie p426-TDH3 ohne Insert (-) transformiert. Eine serielle Verdünnung von jeweils 1:5 mit einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 als Anfangswert wurde von links nach rechts auf Agarplatten mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (SD - Glukose; SGal - Galaktose; SGly - Glycerol; SLac - Laktat) aufgebracht und die Platten für drei Tage bei 30 °C inkubiert.

Aufgrund des essentiellen Charakters des *YAH1* Gens war ohne Expression eines Ferredoxins (-) unter allen Depletionsbedingungen kein Wachstum möglich. Es wurde festgestellt, dass Fdx2 im Gegensatz zu Fdx1 den Wachstumsdefekt von Gal-YAH1 Zellen auf SD-Medium komplementierte. Andererseits komplementierte die Expression von Fdx2 nicht den Wachstumsdefekt von Gal-YAH1 Zellen unter Wachstumsbedingungen, unter denen die Hefezelle gezwungen ist zu respirieren (SLac, SGly). Das Ferredoxin Yah1 komplementierte wie erwartet unter allen getesteten Bedingungen. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich die drei getesteten Ferredoxine hinsichtlich ihrer Funktion voneinander unterscheiden und damit drei funktionelle Gruppen definieren.

#### 4.2.2. Bioinformatische und strukturelle Analyse der drei MB-Typ Ferredoxin-Untergruppen in Eukaryoten

Es wurde eine bioinformatische Suche nach Proteinsequenzen mit Homologie zu den MB-Typ Ferredoxinen Fdx1, Fdx2 und Yah1 mit Hilfe der NCBI-BLAST-Funktion (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) durchgeführt. Gefundene Sequenzen wurden analysiert und durch Multi-Sequenz-

alignment miteinander verglichen, wobei die mitochondriale Lokalisierungssequenz in Analogie zu Fdx1, Fdx2 und Yah1 weggelassen wurde (Abb. 4.8).



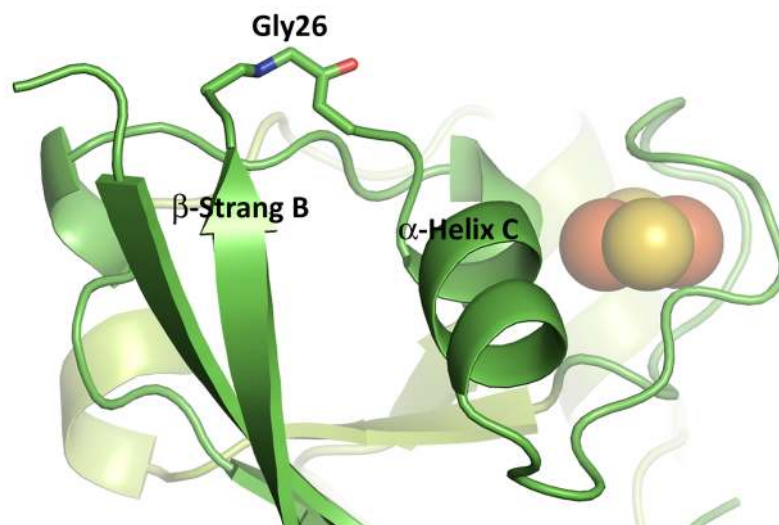
**Abbildung 4.8 (Seite 78): Multi-Sequenzalignment von MB-Typ Ferredoxinen und Einteilung in verschiedene Untergruppen.** Verwendet wurden Ferredoxine ohne mitochondriale Signalsequenz (falls vorhanden). Das Multi-Sequenzalignment wurde erstellt mit ClustalW2 (Chenna et al, 2003) und bearbeitet mit Jalview (Waterhouse et al, 2009). Die Sekundärstrukturmodule (Hutchinson & Thornton, 1996) der Fdx2 Struktur (siehe Kapitel 4.1) sind oberhalb des Alignments als rote Pfeile für  $\beta$ -Stränge und blaue Spiralen für  $\alpha$ -Helices und  $3_{10}$ -Helices angegeben. Ausgewählte Reste sind oberhalb des Alignment angegeben, die Nummerierung folgt der für bovines Adrenodoxin (Fdx1 aus *Bos taurus*). Unterteilt sind die Ferredoxine nach ihrer Ähnlichkeit zu Fdx1, Fdx2 und Yah1 in Fdx1-Typ, Fdx2-Typ und Pilz-Typ Ferredoxine, davon abgegrenzt wiederum sind die bakteriellen ISC-Typ Ferredoxine. Die Fe/S-Cluster-koordinierenden Cysteine sind gelb, alle anderen 100 % identischen Reste sind grün unterlegt. Die Hauptinteraktionsstelle von MB-Typ Fdx mit der zugehörigen FdxR zwischen D76 und D79 ist rot eingerahmt, Rest 73 (siehe Kapitel 4.3.2) ist violett markiert. Spezielle Regionen der Untergruppen sind ebenfalls farblich markiert mit blau für die Fdx1-Typ, orange für die Fdx2-Typ und grün für die Pilz-Typ Untergruppe. Die im Laufe der Arbeit mutierten Reste und Regionen sind mit grauen Kästen auf den Sequenzen von humanem Fdx1 und Fdx2 abgebildet und zur besseren Übersicht auch oberhalb des Alignments markiert. Weitere Details siehe Text.

Folgende Ferredoxine wurden verwendet (mit Proteinkennung):

*Pan troglodytes* (Fdx1 - XP\_508877.2), *Bos taurus* (Fdx1 - NP\_851354.1), *Ovis orientalis aries* (Fdx1 - P29330.2), *Sus scrofa domestica* (Fdx1 - P00258.2), *Mus musculus* (Fdx1 - NP\_032022.1), *Rattus norvegicus* (Fdx1 - NP\_032022.1), *Gallus gallus* (Fdx1 - XP\_420169.1), *Danio rerio* (Fdx1 - XP\_001922722.1), *Salmo salar* (Fdx1 - ACN11145.1), *Drosophila melanogaster* (Fdx1 - NP\_647889.1), *Anopheles gambiae str. PEST* (Fdx1 - XP\_312921.3), *Pediculus humanus corporis* (Fdx1 - XP\_002423697.1), *Brugia malayi* (Fdx1 - EDP28536.1), *Homo sapiens* (Fdx1 - NP\_004100.1), *Homo sapiens* (Fdx2 - AAH63460.1), *Pan troglodytes* (Fdx2 - XP\_512366.2), *Bos taurus* (Fdx2 - NP\_001073695.1), *Mus musculus* (Fdx2 - NP\_001034913.1), *Rattus norvegicus* (Fdx2 - NP\_001101472.1), *Danio rerio* (Fdx2 - NP\_001070132.1), *Xenopus laevis* (Fdx2 - Q5FWQ0.1), *Drosophila melanogaster* (Fdx2 - NP\_523993.1), *Anopheles gambiae str. PEST* (Fdx2 - XP\_308947.3), *Pediculus humanus corporis* (Fdx2 - EEB19696.1), *Trichoplax adhaerens* (Fdx2 - EDV22350.1), *Caenorhabditis elegans* (Fdx2 - NP\_502861.1), *Zea mays* (Fdx2a - ACF81722.1; Fdx2b - ACG44621.1), *Arabidopsis thaliana* (Fdx2a - NP\_001031685.1; Fdx2b - AAL82813.1), *Chlamydomonas reinhardtii* (Fdx2 - EDO96620.1), *Encephalitozoon cuniculi GB-M1* (Fdx2 - NP\_585988.1), *Toxoplasma gondii ME49* (Fdx2 - EEA99545.1), *Ashbya gossypii ATCC 10895* (Yah1 - NP\_985381.1), *Saccharomyces cerevisiae* (Yah1 - Q12184.1), *Candida albicans SC5314* (Yah1 - XP\_720164.1), *Debaryomyces hansenii CBS767* (Yah1 - XP\_458973.1), *Yarrowia lipolytica* (Yah1 - CAG82635.1), *Aspergillus fumigatus Af293* (Yah1 - XP\_747954.1), *Aspergillus niger* (Yah1 - XP\_001393944.1), *Neurospora crassa OR74A* (Yah1 - EAA28849.1), *Chaetomium globosum CBS 148.51* (Yah1 - XP\_001225251.1), *Schizosaccharomyces pombe* (Yah1 = Etp1<sup>fd</sup> - NP\_594836.1), *Ustilago maydis 521* (Yah1 - EAK81928.1), *Vibrio cholerae* (Fdx - NP\_230402.1), *Tolomonas auensis DSM 9187* (Fdx - YP\_002893199.1), *Azotobacter vinelandii DJ* (Fdx - YP\_002801146.1), *Saccharomyces cerevisiae* (Fdx - Q12184.1), *Escherichia coli CFT073* (Fdx - NP\_754932.1).

In höheren Eukaryoten wie zum Beispiel Zebrafisch, Ratte oder Fruchtfliege wurden jeweils zwei Ferredoxine vom MB-Typ gefunden, in Pilzen hingegen nur je eines. Im Multi-Sequenzalignment (**Abb. 4.8**) sind neben eukaryotischen MB-Typ Ferredoxinen noch einige Ferredoxine aus Bakterien gezeigt, die durch Homologiesuche zu IscFdx, dem Ferredoxin aus dem ISC-Gencluster von *E. coli* (Takahashi & Nakamura, 1999), gefunden worden sind. Es konnten Reste identifiziert werden, die in allen Ferredoxinen von Bakterien bis zum Menschen streng konserviert sind. Diese Reste sind deutlich verschieden von anderen [2Fe-2S] Ferredoxinen, wie zum Beispiel Pflanzen-Typ-Fdx (siehe **Abb. 1.12**), und zeigen somit die Zugehörigkeit aller betrachteten Ferredoxine zur Gruppe der

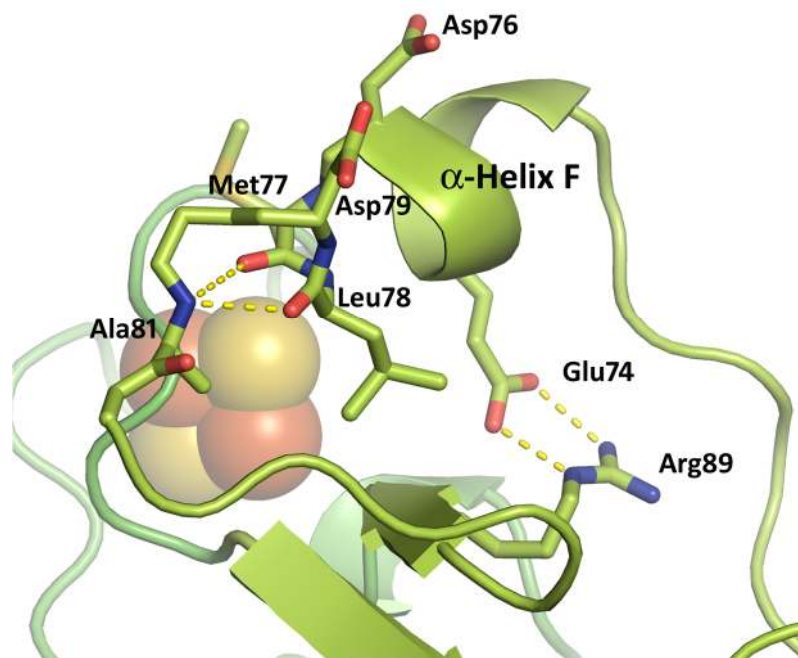
MB-Typ Ferredoxine an. Logischerweise können diese Reste nicht zur Spezifität eines Ferredoxins *in vivo* beitragen, sondern sie erfüllen vielmehr einen allgemeineren Zweck oder eine Funktion, die alle Ferredoxine gemeinsam haben. An erster Stelle sind hierbei die vier koordinierenden Cysteine zu nennen, die in allen Ferredoxinen vorkommen. Andere konservierte Reste erfüllen wichtige strukturelle Aufgaben und sind zum Teil bereits als funktionell wichtig beschrieben worden. Dies betrifft die essentiellen Wasserstoffbrücken zwischen E74 und R89 (Grinberg & Bernhardt, 2001), H56 und S88 (Kostic et al, 2003), T54 und C52 (Uhlmann & Bernhardt, 1995) sowie C92 und Q93. Der Rest P108 wurde als wichtig für die Proteinfaltung sowie Fe/S-Cluster Stabilität gefunden (Grinberg & Bernhardt, 1998) und ist aus diesem Grund in allen Ferredoxinen vorhanden. Weitere streng konservierte Reste gibt es in der unmittelbaren Umgebung des Fe/S-Clusters, z.B. A45. Die Erklärung hierfür dürfte in den speziellen Anforderungen an die Umgebung eines Fe/S-Clusters liegen, welche keine Änderungen ohne Destabilisierung oder starke Eigenschaftsänderung des Fe/S-Clusters erlauben. Die starke Konservierung des bislang noch nicht beschriebenen Restes G26 geht möglicherweise auf die spezielle, konformationelle Freiheit von Glycin im Vergleich zu allen anderen Aminosäuren zurück. In der Tat liegt G26 an der Spitze des Turns, welcher  $\beta$ -Strang B mit der  $\alpha$ -Helix C verbindet und kann an dieser Stelle vermutlich durch keine andere Aminosäure ersetzt werden (**Abb. 4.9**).



**Abbildung 4.9: Die strukturelle Lage von Gly26 als mögliche Ursache für die Konservierung.** Gly26 liegt in MB-Typ Fdx im Turn zwischen  $\beta$ -Strang B und  $\alpha$ -Helix C und ist vermutlich aufgrund dieser besonderen Lage durch keine andere Aminosäure ersetzbar und daher streng konserviert.

Ein weiterer, absolut konservierter Bereich liegt in  $\alpha$ -Helix F, der primären Interaktionsstelle von Adx (Ewen et al, 2011). Wie zuvor beschrieben ist E74 dabei aus strukturellen Gründen wegen der Wasserstoffbrücke zu R89 wichtig. Die beiden Reste D76 und D79 sind als direkte Bindungsstellen der Ferredoxinoxidoreduktase für humanes Fdx1 und auch für Adx beschrieben (Ewen et al, 2011; Vickery, 1997). Auch die Reste M(L)77 und L78 zwischen den Bindungsstellen D76 und D79 sind stark

konserviert, ebenso wie A81 in unmittelbarer Nähe davon. Alle drei Reste sind über Rückgratwasserstoffbrücken miteinander verbunden: Das Amidproton von A81 bildet sowohl eine Wasserstoffbrücke mit dem Carbonylsauerstoff von L78 als auch mit dem Carbonylsauerstoff von M77 (**Abb. 4.10**). Ersteres entspricht der Wasserstoffbrücke in einer  $3_{10}$ -Helix, letzteres der Wasserstoffbrücke in einer  $\alpha$ -Helix. Diese doppelte Stabilisierung trägt wesentlich zur Orientierung von  $\alpha$ -Helix F bei.



**Abbildung 4.10:** Die konservierte Interaktionsstelle von eukaryotischen MB-Typ Ferredoxinen mit FdxR. Die primäre Interaktionsstelle aller MB-Typ Fdx liegt in  $\alpha$ -Helix F und enthält die beiden negativ geladenen Reste Asp76 und Asp79, die direkt mit der entsprechenden FdxR interagieren. Für die Orientierung von  $\alpha$ -Helix F essentiell sind die streng konservierten Reste Glu74 und Arg89, welche die einzigen geladenen Reste im Proteininneren sind und eine Salzbrücke bilden. Auch die Reste Met77, Leu78 und Ala81 sind stark konserviert und bilden über ihre Peptidbindungen Wasserstoffbrücken, die essentiell für die Ausbildung von  $\alpha$ -Helix F sein dürften.

In dem chemisch quervernetzten Komplex von AdxR und Adx wurden außerdem D39 und D41 als Interaktionsstellen von Adx mit AdxR vorgeschlagen (Muller et al, 2001a). Im Alignment (**Abb. 4.8**) ist zu erkennen, dass die negative Ladung an Position 39 in den meisten, aber nicht allen, betrachteten Ferredoxinen konserviert ist. Im Gegensatz dazu ist der negative Charakter von Rest 41 streng konserviert, wobei interessanterweise ein Aspartatrest an dieser Stelle immer mit zwei zusätzlichen Aminosäuren vor dem ersten koordinierenden Cystein korreliert. Die starke Konservierung dieser Aminosäuren zeigt, dass alle Reste spezielle Positionen in der Struktur einnehmen, welche nicht geändert werden können. Außerdem unterstreicht dieses Ergebnis, dass die Bindungsstelle mit der entsprechenden FdxR in den verschiedenen Klassen von MB-Typ Ferredoxinen gleich zu sein scheint, was zu der Beobachtung passt, dass höhere Eukaryoten wie der Mensch nur eine FdxR besitzen (Ziegler et al, 1999), die sowohl Fdx1 als auch Fdx2 reduzieren kann (Sheftel et al, 2010). Streng

konservierte Reste in allen MB-Typ Fdx spiegeln somit einerseits strukturelle Erfordernisse des Proteins wider und kennzeichnen andererseits auch deutlich die primäre Interaktionsstelle mit der Ferredoxinoxidoreduktase.

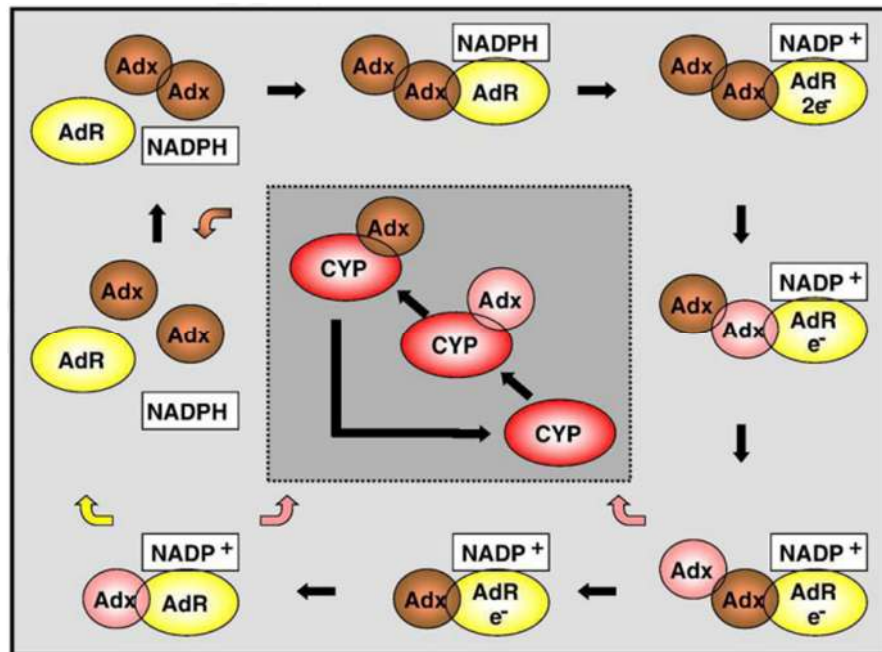
Die Zuordnung zu den Ferredoxin-Untergruppen in **Abb. 4.8** wurde vorgenommen aufgrund von Gemeinsamkeiten in Bereichen, die nicht in allen Fdx konserviert waren. Die Gruppe vom Fdx1-Typ hat zum einen die beiden zusätzlichen Reste F43-G44 gemeinsam. Zum anderen weist bei ihnen  $\alpha$ -Helix C (Reste 28 - 34) ein konserviertes Muster bestehend aus aliphatischen Aminosäuren (Leucin, Isoleucin, Valin) auf, die einen negativen Rest an Position 31 umrahmen. Außerdem charakteristisch ist  $\beta$ -Strang D, der immer aus dem Tripeptid LIF besteht. Die Untergruppe von Fdx2-Typ Ferredoxinen unterscheidet sich von allen anderen vor allem durch den hochkonservierten C-Terminus, was bereits 2002 von Seeber beschrieben worden ist (Seeber, 2002). Im Unterschied zur Fdx1-Typ Gruppe hat  $\alpha$ -Helix C in der Fdx2-Gruppe einen hydrophileren Charakter mit einem Histidin an Stelle des negativen Restes. Außerdem fehlen in der Fdx2-Typ Gruppe die beiden Reste F43-G44. Bemerkenswerterweise sind sowohl die Insertion von F43-G44 als auch Orientierung von  $\alpha$ -Helix C die beiden Punkte, in denen sich Fdx1 und Fdx2 strukturell unterscheiden. In einigen höheren Eukaryoten, hauptsächlich Pflanzen, gibt es kein Fdx1-Typ Fdx, sondern nur ein oder mehrere Fdx2-Typ Ferredoxine. In Pilzen wiederum wurde nur jeweils ein einziges Ferredoxin gefunden. Diese Pilz-Typ Ferredoxine weisen keine der Charakteristika der anderen beiden Untergruppen auf, ihnen fehlen sowohl der charakteristische C-Terminus von Fdx2-Typ Ferredoxinen als auch das Dipeptid vor  $\alpha$ -Helix C von Fdx1-Typ Ferredoxinen. Aufgrund dieser strukturellen Unterschiede wurden Pilz-Typ Ferredoxine als weitere, dritte Untergruppe betrachtet. Charakteristisch für Pilz-Typ Fdx ist das Tripeptid TRN in Position 111 bis 113, welches auch in Fdx2-Typ Fdx vorkommt.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass MB-Typ Ferredoxine aus Eukaryoten trotz Ähnlichkeit in vielen Sequenzbereichen sich bei genauer Betrachtung der 3D-Strukturen und des Multi-Sequenzalignments in drei strukturelle Untergruppen einteilen lassen. Dieses Resultat passt gut zu den drei funktionellen Gruppen, die in Kapitel 4.2.1 durch die Phänotypen von Yah1, Fdx1 und Fdx2 definiert wurden.

#### **4.2.3. Der Oligomerisierungszustand von Fdx1, Fdx2 und Yah1 kann die funktionellen Unterschiede nicht erklären**

Die Veröffentlichung der Struktur des Volllängen Rinder-Adx hat zur Vermutung geführt, dass Adx und demzufolge auch das Homologe Fdx1 aus Mensch (87 % identisch, 94 % ähnlich) als funktionales Dimer operiert (Pikuleva et al, 2000). Strukturelle Änderungen in Adx nach Reduktion wurden hauptsächlich im C-Terminus beschrieben (Beilke et al, 2002), während in humanem Fdx1 zusätzlich deutliche Änderungen in  $\alpha$ -Helix C beobachtet wurden (Xia et al, 1998). Beilke und Kollegen haben basierend auf diesen Ergebnissen einen neuen Elektronentransfermechanismus von NADPH über

AdxR und Adx zu Cytochrom P450 Enzymen vorgeschlagen, der die Dissoziation von dimerem Adx in Folge von Reduktion beinhaltet (Beilke et al, 2002). In **Abb. 4.11** ist dieser Mechanismus beschrieben:



**Abbildung 4.11: Schematische Beschreibung des modifizierten „Pendelmechanismus“ nach Beilke und Kollegen.** Beginn oben links: Dimeres Adx bindet an Adrenodoxinoxidoreduktase (AdR); NADPH bindet an AdR; Reduktion von AdR; Übertragung eines Elektrons auf das erste Adx-Protomer; interner Transfer des Elektrons auf das zweite Adx-Protomer; Dissoziation des Adx-Dimers in Folge einer Konformationsänderung; Übertragung des zweiten Elektrons auf das verbliebene Adx-Protomer; beide reduzierte, monomere Adx-Moleküle übertragen ein Elektron auf das Cytochrom P450 Enzym (CYP); oxidiertes Adx bildet wieder Dimere und der Zyklus kann von vorne beginnen. Entnommen aus (Ewen et al, 2011).

Der diskutierte Mechanismus erfordert die Ausbildung von Ferredoxindimeren im oxidierten Zustand, den internen Elektronentransfer im Ferredoxindimer sowie die, womöglich vom C-Terminus abhängige, Dissoziation in monomeres Ferredoxin nach Reduktion. Um zu überprüfen, ob sich die Funktionsspezifität von Fdx1 und Fdx2 auf einen dieser Punkte zurückführen lässt, wurde eine Analyse der verfügbaren Strukturen mitochondrialer Ferredoxine vorgenommen. Verwendet wurden die Strukturen von humanem Fdx1 (3PWE), Rinder Adx (1AYF und 1CJE), humanem Fdx2 (2Y5C) sowie von der Ferredoxindomäne Etp1<sup>fd</sup> (1WLB) aus *S. pombe* als repräsentative Vertreter der drei Gruppen von eukaryotischen MB-Typ Ferredoxinen.

Als erstes wurden die Strukturen hinsichtlich möglicher Dimerisierung untersucht. Dazu wurde der „Protein interfaces, surfaces and assemblies service PISA at European Bioinformatics Institute“ ([http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)) verwendet (Krissinel & Henrick, 2007). Das Programm berechnet die Oberfläche jedes Monomers in der Struktur, indem es eine virtuelle, sphärische Sonde über die Oberfläche bewegt. Mögliche Oligomere in der Struktur werden mit Hilfe der asymmetrischen Einheitszelle sowie den Symmetrioperationen berechnet und deren Oberfläche

wie zuvor bestimmt. Der Unterschied zwischen der Summe der Oberflächen der Monomere und der Oberfläche des Oligomers stellt die Interaktionsfläche dar. Gleichzeitig untersucht das Programm die Oligomere auf Wasserstoff-, Salz- und Disulfidbrücken und berechnet die Größe  $\Delta^iG$ , welche den Gewinn an freier Enthalpie in Folge des Kontakts darstellt. PISA entscheidet aufgrund des Wertes von  $\Delta^iG$ , ob ein Oligomer stabil ist oder nicht. Die Analyse von Proteinstrukturen bekannter Proteinkomplexe hat ergeben, dass zwei Proteine typischerweise eine Mindestfläche von 1200 bis 1400 Å<sup>2</sup> und bis zu 4660 Å<sup>2</sup> bedeckt (Lo Conte et al, 1999). Während die Minimalfläche zwischen Dimeren in dem gleichen Bereich gefunden wurde, beträgt die Gesamtfläche in Folge eines Kristallkontakts ungefähr 600 Å<sup>2</sup> (Janin, 1995). Es wird angenommen, dass die Interaktionsfläche in Elektronentransferkomplexen wegen ihrer Kurzlebigkeit kleiner als 1200 Å<sup>2</sup> sein kann (Gray & Winkler, 2010). Zum Beispiel bedeckt der Komplex von Cytochrom *c* und Cytochrom *c* Peroxidase (Pelletier & Kraut, 1992) laut PISA eine Oberfläche von 1080 Å<sup>2</sup>. Andererseits beträgt die Interaktionsfläche im Komplex von Adx und AdxR (Muller et al, 2001b) 2200 Å<sup>2</sup>, wobei allerdings bedacht werden muss, dass dieser Komplex durch eine kovalente Bindung stabilisiert wird.

Da der von Beilke und Kollegen vorgeschlagene Mechanismus den internen Elektronentransfer innerhalb des Ferredoxindimers erfordert, wurde als zweites der Abstand von Fe/S-Cluster zu Fe/S-Cluster ausgemessen (Abstand Ecke zu Ecke). Die Untersuchung von Redoxzentren kristallisierter Elektronentransferproteine ergab, dass das Tunneln von Elektronen durch Proteine auf Abstände kleiner 14 Å beschränkt zu sein scheint (Page et al, 1999). Eine theoretische Arbeit hingegen betrachtete den Elektronentransfer zwischen Cytochrom *c*<sub>2</sub> und dem Reaktionszentrum photosynthetischer Bakterien in dem sogenannten „*encounter complex*“. Dies ist ein kurzlebiger, hypothetischer Komplex, von dem angenommen wird, dass er der eigentliche Elektronentransfer-Komplex sein könnte. Es konnte gezeigt werden, dass die Elektronentransferrate zwischen den beiden Proteinen im „*encounter complex*“ bei einem Abstand von 21 Å nur um den Faktor 100 kleiner ist als in der Kokristallstruktur, wo der Abstand der Redoxzentren geringer als 14 Å war (Miyashita et al, 2005). Es wird in Folge dessen angenommen, dass der maximale Abstand zweier Redoxzentren für physiologisch relevante Einschrittelektronentunnelprozesse in biologischen Systemen nicht größer als 20 Å sein kann (Gray & Winkler, 2010).

Als drittes wurde getestet, ob ein Andocken des Dimers an AdxR umsetzbar ist. Hierzu wurde von der Adx-AdxR Komplexstruktur ausgegangen und jedes Dimer mit dem Adx der Komplexstruktur übereinandergelegt. Ein Andocken war möglich, falls diese Überlagerung ohne sterische Kollision des Dimers mit AdxR erreicht werden konnte. Trat ein sterischer Konflikt auf, war kein Andocken des Dimers an AdxR realisierbar.

Eine Übersicht der erhaltenen Ergebnisse der drei Analysen findet sich in **Tabelle 4.2**:

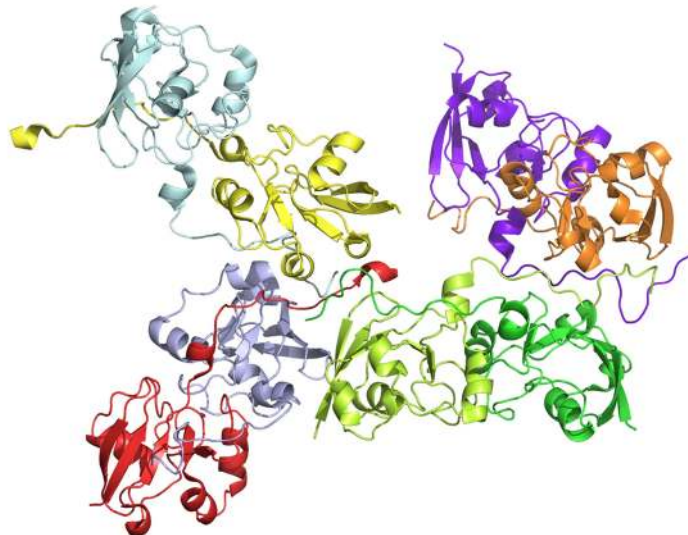


	Monomer			Kontakt / Dimerisierung										
	Pdb code	Kette	Reste	Oberfläche (Å <sup>2</sup> )	Nr.	Struktur (Symmetriep.)	Kontaktfläche pro Monomer (Å <sup>2</sup> )	Δ <sup>i</sup> G (kcal/ mol)	N <sub>H<sub>B</sub></sub>	N <sub>S<sub>B</sub></sub>	Distanz Fe/S-Fe/S (Å)	Andocken an AdxR möglich	Symmetrisch (C <sub>2</sub> )	Stabil (nach PISA)
Rinder Adx	A	103	5679,6	1	B, B (-x-1,-y,z)	375,4	-0,3	2	0	32,4	ja	ja	nein	
	B	104	5764,1	2	B, A (x,y,z)	361,7	-7,5	2	0	10,4	nein	ja	nein	
	1AYF	FeS	4	233,7	3	B, A (x-1/2,-y-1/2,-z)	302,5	1,2	7	0	29,7	ja	nein	nein
					4	A, B (x,y,z-1)	252,0	2,3	4	1	47,6	ja	ja	nein
	5	FeS, A (B)	120,8	-16,2	1	0	-	-	-	-	-	ja		
1CJE	A	106	5895,4	1	A, B (x,y,z)	515,8	-0,2	9	7	37,1	ja	ja	nein	
	B	107	5916,0	2	C, D (x,y,z)	492,7	0,7	7	5	37,9	ja	ja	nein	
	C	106	5874,8	3	C, A (x-1,y,z)	351,9	-8,1	3	0	10,6	nein	ja	nein	
	D	107	6003,4	4	B, C (-x,y-1/2,-z+1)	221,7	-1,3	4	1	24,8	ja	nein	nein	
	FeS	4	237,2	5	FeS, A (B,C,D)	123,7	-16,7	1	0	-	-	-	ja	
humanes Fdx1	A	126	8285,8	1	H, B (x,y,z)	1275,4	-15,6	17	0	10,3	nein	ja	ja	
	B	126	8103,1	2	E, D (x,y,z)	1265,5	-18,3	18	0	10,2	nein	ja	ja	
	C	127	8296,3	3	G, A (x,y,z)	1146,4	-16,2	13	0	10,2	nein	ja	ja	
	D	127	8259,3	4	F, C (x,y,z)	1139,9	-16,2	13	0	10,3	nein	ja	ja	
	3P1M	FeS	4	234,6	5	FeS, A (B,C,D,E,F,G,H)	119,8	-16,6	1	0	-	-	-	ja
					1	A, B (-x,y-1/2,-z+2)	290,4	-3,8	2	0	28,1	nein	ja	nein
					2	B, B (-x+1,y-1/2,-z+2) / A, A (-x,y-1/2,-z+1)	285,3	-3,2	3	4	39,8	ja	nein	nein
					3	B, A (x,y,z)	287,8	0,9	7	3	30,2	nein	nein	nein
4	FeS, A (B)	124,6	-16,7	1	0	-	-	-	ja					
S. pombe Etp1 <sup>fd</sup>	A	95	5817,1	1	B, A (x,y,z)	598,5	-7,1	7	1	24,7	nein	nein	nein	
	B	94	5807,8	2	A, A (x-y,-y,-z+1/3)	392,0	-0,7	6	0	35,8	ja	ja	nein	
	2WLB	FeS	4	235,1	3	B, A (-x-1,-x+y-1,-z+2/3)	387,7	-3,7	6	1	36,3	ja	nein	nein
					4	A, B (-y-1,x-y,z-1/3)	259,6	-2,3	7	2	36,4	nein	nein	nein
	5	FeS, A (B)	124,8	-16,9	1	0	-	-	-	-	ja			

**Tabelle 4.2: Die Untersuchung der Kristallstrukturen von Adx, Fdx1, Fdx2 und Etp1<sup>fd</sup> hinsichtlich möglicher funktioneller Oligomerisierung zeigt keine auffälligen Unterschiede.** Nach PISA ([http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)) aufgelistet sind die Monomere jeder Struktur mit den [2Fe-2S] Clustern gemittelt als „FeS“ sowie mögliche Dimere sortiert nach der Größe der Interaktionsfläche pro Monomer. Für die Dimerisierung unberücksichtigt bleibt der Einbau der Fe/S-Cluster, da diese vollständig im Proteininneren liegen und nicht zur Oligomerisierung beitragen - die Kontaktfläche je Monomer entspricht daher bei FeS, X immer 50 % der FeS Oberfläche. Δ<sup>i</sup>G: Gewinn an freier Enthalpie in Folge des Kontakts. N<sub>H<sub>B</sub></sub>: Anzahl Wasserstoffbrücken des Kontakts. N<sub>S<sub>B</sub></sub>: Anzahl Salzbrücken des Kontakts. Die Distanz Fe/S-Fe/S ist der Ecke zu Ecke Abstand der beiden Fe/S-Cluster eines Dimers. Außerdem ist angegeben, ob ein Andocken des Dimers an AdxR möglich ist, wozu das Dimer mit der bekannten Adx-AdxR Komplexstruktur überlagert wurde. Weiterhin ist angegeben, ob das Dimer C<sub>2</sub> symmetrisch ist und ob es als stabil von PISA vorausgesagt wird.

In der Struktur von C-terminal verkürztem Rinder Adx (1AYF) werden nur zwei Dimere gefunden, deren Gesamtkontaktfläche über dem Wert eines typischen Kristallkontaktes (600 Å<sup>2</sup>) liegt. Das eine Dimer ist nicht kompatibel mit internem Elektronentransfer, das zweite kann nicht an die AdxR

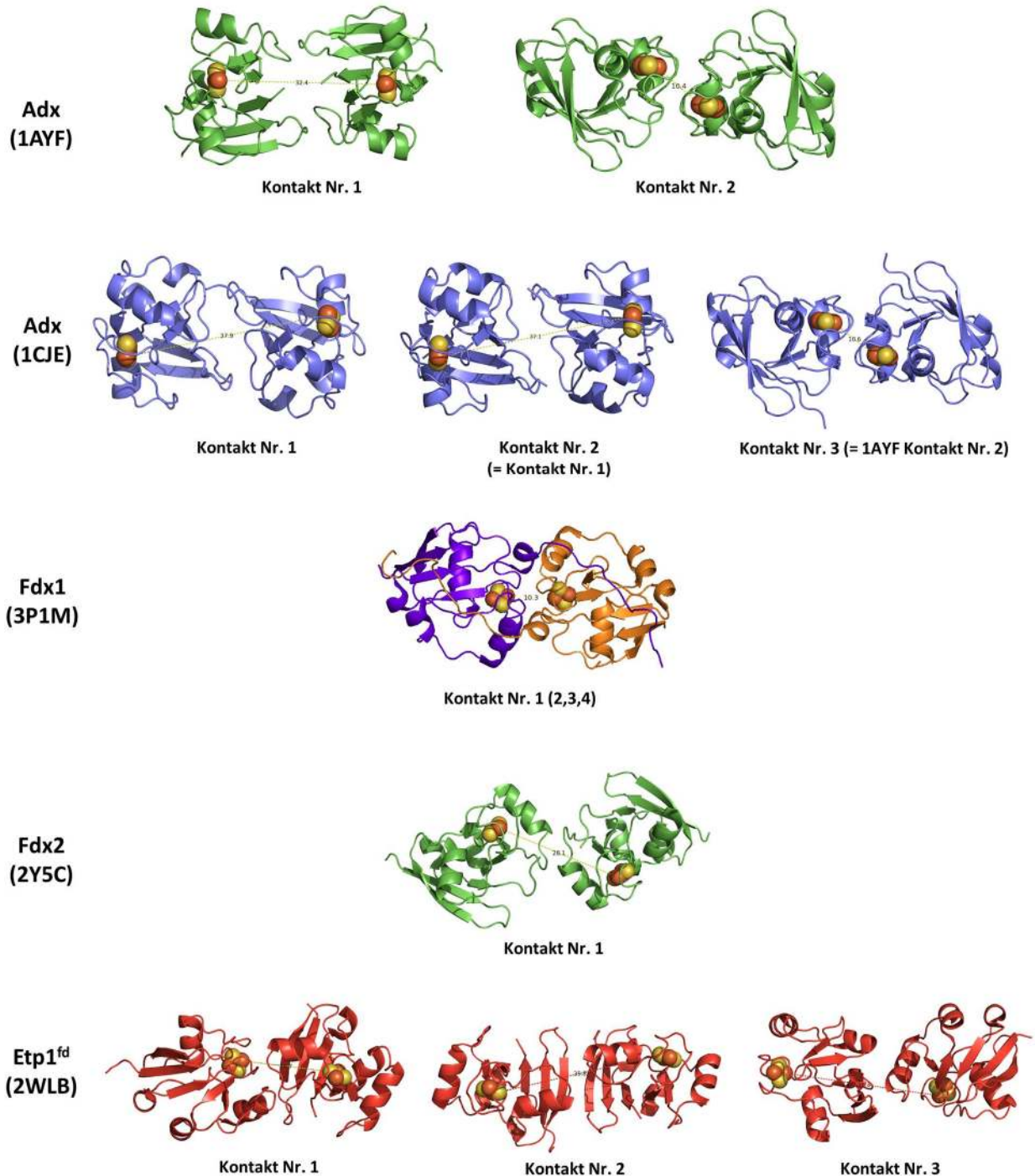
andocken. Die Analyse der Volllänge Adx Struktur (1CJE) lieferte die von Pikuleva und Kollegen (Pikuleva et al, 2000) beschriebenen Adx-Dimere zwischen den Molekülen A und B sowie C und D. Beide Dimere weisen eine Kontaktfläche von insgesamt  $\sim 1000 \text{ \AA}^2$  auf, sind kompatibel mit einem Andocken an AdxR und haben einen großen Abstand der Fe/S-Cluster von  $37 \text{ \AA}$ . Aus letzterem Grund scheint die Annahme, dass diese Dimere eine physiologisch relevante Spezies darstellen unwahrscheinlich: Der Transfer eines Elektrons innerhalb des Dimers von einem Adx-Molekül zum anderen würde ein Zwei-Schritt-Elektronentunnelprozess über ein weiteres Redoxzentrum, zum Beispiel eine aromatische Aminosäure, erfordern. Ein solches zweites Redoxzentrum ist noch für kein [2Fe-2S] Ferredoxin beschrieben worden. Das dritte Dimer, das bei der Analyse von 1CJE mit PISA gefunden wurde, entspricht interessanterweise einem auch bei der 1AYF Struktur identifizierten Dimer, das allerdings nicht mit einem Andocken an die AdxR kompatibel ist. Die vor kurzem in der PDB-Datenbank hinterlegte Struktur von humanem Fdx1 (3P1M) mit komplettem C-Terminus sowie sieben zusätzlichen Aminosäuren eines Expressions-Tags zeigt eine recht ungewöhnliche Anordnung der Fdx1 Monomere, die vermutlich ohne physiologische Relevanz ist (**Abb. 4.12**).



**Abbildung 4.12: Ungewöhnliche Anordnung von humanem Fdx1 in der Struktur 3P1M.** Dargestellt sind die acht Moleküle in der asymmetrischen Einheitszelle in der Struktur von humanem Fdx1 (3P1M). Alle Moleküle sind in verschiedenen Farben dargestellt.

Die 20 Aminosäuren lange C-terminale Verlängerung zeigt vom Kernprotein weg und interagiert mit bis zu 5 weiteren Fdx1 Monomeren. Aus diesem Grund wird angenommen, dass die Anordnung auf ein Kristallisationsartefakt zurückzuführen ist und nicht von physiologischer Relevanz ist, obwohl PISA die Anordnung als stabil voraussagt und sich Interaktionsflächen von über  $2300 \text{ \AA}^2$  ergeben. In der Struktur von Fdx2 (2Y5C) wurden nur Interaktionsflächen in der Größenordnung von Kristallkontakten gefunden. Folglich beobachtet man keine Dimerisierung im Kristall. Die Kristallstruktur der C-terminal verkürzten Ferredoxindomäne Etp1<sup>fd</sup> aus *S. pombe* (1WLB) beinhaltet ein asymmetrisches Dimer mit  $1200 \text{ \AA}^2$  Kontaktfläche. Dieses hypothetische Dimer könnte also stabil

sein, ist aber weder mit einem Andocken an die Ferredoxinoxidoreduktase noch mit einem internen Elektronentransfer kompatibel (Abstand der Fe/S-Cluster 24 Å). Weitere mögliche Etp1<sup>fd</sup> Dimere weisen einen noch größeren Abstand der Redoxzentren auf. Die wichtigsten hypothetischen Dimere der analysierten Strukturen sind in **Abb. 4.13** dargestellt.

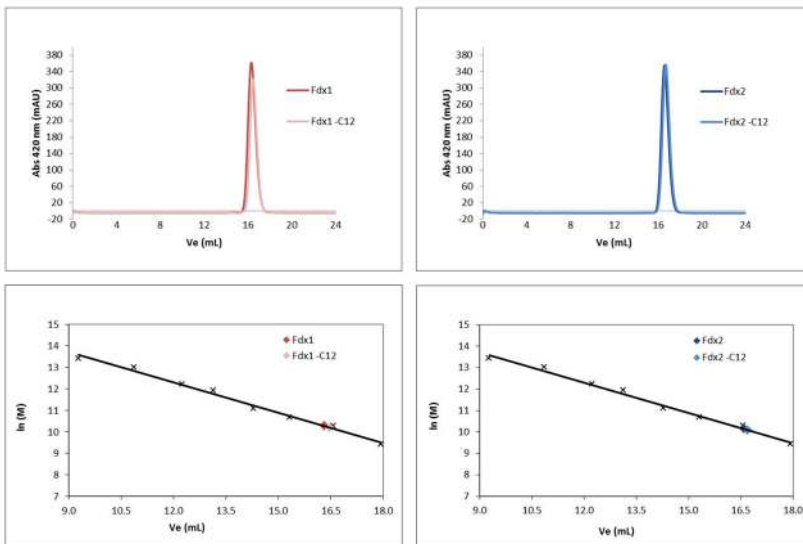


**Abbildung 4.13: Hypothetische Dimere der Strukturen von Adx (1AYF, 1CJE), Fdx1 (3P1M), Fdx2 (2Y5C) und Etp1<sup>fd</sup> (3WLB).** Dargestellt sind die Dimere berechnet mit PISA entsprechend der Nummerierung in Tabelle 4.2, der Abstand zwischen den Fe/S-Clustern der beiden Protomere ist eingezeichnet. Keines der Dimere lässt sich gleichzeitig mit allen drei Kriterien Stabilität (Kontaktfläche >1200 Å<sup>2</sup>), interner Elektronentransfer (Abstand der Fe/S-Cluster < 20 Å) und Andocken an die Ferredoxinoxidoreduktase vereinbaren.

Aus der Analyse der Kristallstrukturen konnte weder das vorgeschlagene Modell bekräftigt noch ein überzeugender Unterschied zwischen Fdx1 (Adx), Fdx2 und dem Hefe Ferredoxin Etp1<sup>fd</sup> festgestellt werden.

Zur experimentellen Überprüfung wurde der Oligomerisierungszustand der gereinigten Proteine Fdx1, Fdx2 und Yah1 in Lösung mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) überprüft (**Abb. 4.14**). Alle drei Proteine sind Dimere in Lösung im oxidierten Zustand. Auch die C-terminal verkürzten Proteine Fdx1 -C12 und Fdx2 -C12 sind Dimere, der C-Terminus von Fdx1 und Fdx2 hat also keinen Einfluss auf die Oligomerisierung (**Abb. 4.14A**). Ebenso verhalten sich die His<sub>6</sub>-getaggtten Proteine HisFdx1 und HisFdx2 sowie nicht-getaggttes Yah1 als Dimere sowohl unter oxidierenden Bedingungen als auch unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von 10 mM Natriumdithionit (**Abb. 4.14B,C**).

A



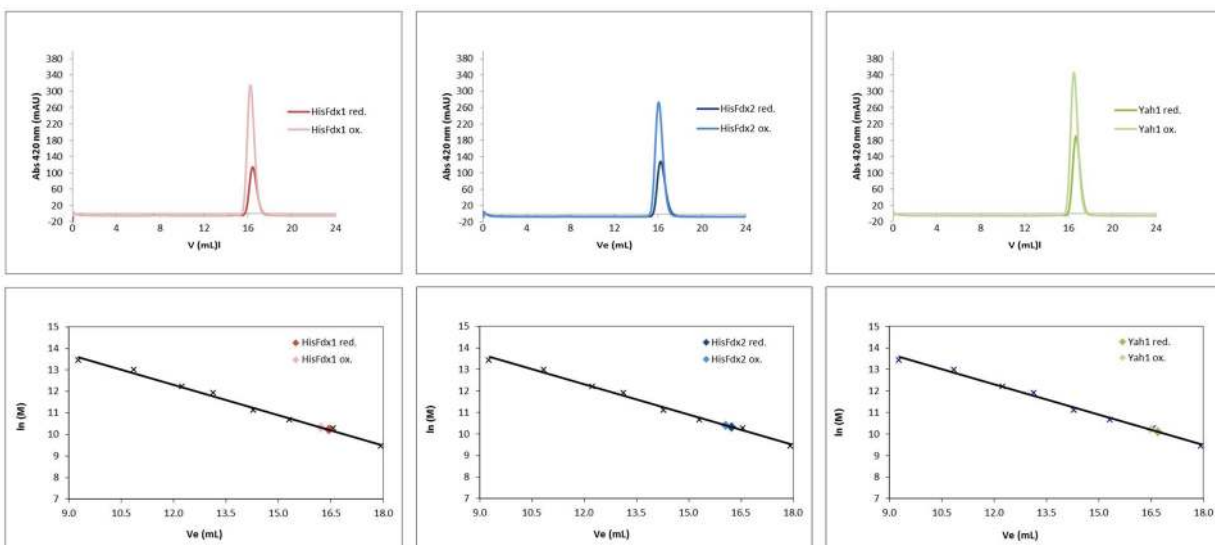
C

Protein	M (Da)	V <sub>e</sub> (mL)	ln (M)
Cytochrom c	12400	17,93	9,425
Carboanhydrase	29000	16,57	10,275
Ovalbumin	43000	15,32	10,669
Albumin	66000	14,29	11,097
Alkoholdehydrogenase	150000	13,14	11,918
Amylase	200000	12,25	12,206
Apoferritin	440000	10,86	12,995
Thyroglobulin	669000	9,28	13,414

Protein	M <sub>theo</sub> (kDa)	M <sub>exp</sub> (kDa)
Fdx2	13,3	25,5
Fdx2 -C12	11,9	24,1
Fdx1	13,6	28,8
Fdx1 -C12	12,3	26,7
HisFdx2 red.	16,0	30,1
HisFdx2 ox.	16,0	32,6
HisFdx1 red.	15,2	27,1
HisFdx1 ox.	15,2	30,1
Yah1 red.	12,8	24,1
Yah1 ox.	12,8	26,6

B



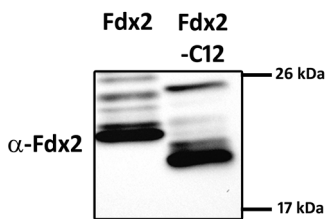
**Abbildung 4.14 (Seite 88): Die Größenausschlusschromatographie (SEC) liefert keine Unterschiede im Oligomerisierungszustand von Fdx1, Fdx2 und Yah1.** Größenausschlusschromatographie (SEC) mit jeweils 100  $\mu$ L Protein mit 400  $\mu$ M Konzentration und der SEC-Säule Superdex 200 10/ 300 GL. **(A)** SEC der Volllängenproteine Fdx1 und Fdx2 sowie der C-terminal um 12 Aminosäuren verkürzten Varianten Fdx1 -C12 und Fdx2 -C12 in Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 1,5 mM  $MgCl_2$ ). Oben jeweils die Chromatogramme der Elution bei 420 nm und unten Auftragung von  $\ln(M)$  gegen  $V_e$  der Kalibrationswerte mit eingezeichneten Elutionsvolumen der getesteten Proteine. **(B)** Analog zu (A) SEC der N-terminal His<sub>6</sub>-getaggten Volllängenproteine von Fdx1 (HisFdx1) und Fdx2 (HisFdx2) sowie nicht-getaggtes Yah1 unter reduzierenden (red.) und oxidierenden (ox.) Bedingungen. Oxidierende Bedingungen sind gleich denen in (A), reduzierende Bedingungen wurden erreicht durch 10 mM Natriumdithionit. Der Natriumdithionit-haltige Puffer wurde in einer Anaerobenkammer entgast und unter anaeroben Bedingungen vor jedem Lauf frisch angesetzt. Unmittelbar vor Beginn eines Laufes wurde der Puffer in einem hohen, schmalen Standzylinder aus der Anaerobenkammer ausgeschleust und für einen Lauf verwendet. Die reduzierenden Bedingungen wurden überprüft, indem die Eluatfraktionen auf ihre Fähigkeit zur Reduktion von Paraquat getestet wurden. Die Reduktion der Ferredoxine ist ebenfalls an der typischen Abnahme der Absorption bei 420 nm zu erkennen. **(C)** Werte der Kalibration der SEC-Säule sowie Übersicht der experimentell bestimmten Molekulargewichte ( $M_{exp}$ ) der getesteten Proteine im Vergleich zu den erwarteten Molekulargewichten ( $M_{theo}$ ) von monomeren Proteinen.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die funktionalen Differenzen zwischen den drei MB-Typ Ferredoxin Untergruppen weder durch erkennbare Unterschiede der entsprechenden Kristallstrukturen noch durch Änderungen des Oligomerisierungszustandes in Lösung zu erklären sind. Ferner ist festzustellen, dass das von Beilke und Kollegen vorgeschlagene Modell der Dissoziation in monomeres Ferredoxin nach Reduktion und internem Elektronentransfer nicht erhärtet werden konnte.

#### 4.2.4. Analyse der für die Spezifität wichtigen Regionen von humanem Fdx2

Die Unterschiede in der Funktionsspezifität zwischen Fdx1 und Fdx2 müssen in der zu 41 % identischen Primärstruktur kodiert sein. Da wie in Kapitel 4.2.2. beschrieben die Interaktion zu FdxR zwischen Fdx1 und Fdx2 gleich ist, rührt der funktionelle Unterschied wahrscheinlich von der Spezifität für ganz bestimmte Interaktionspartner her. Zunächst sollten durch Mutation des *FDX2* Bereiche identifiziert werden, die für die Funktion des kodierten Proteins von Bedeutung sind. Dazu wurden in eine Plasmidversion des *FDX2* Gens Mutationen eingeführt und diese mit dem aus Kapitel 4.2.1. bekannten Gal-YAH1 Komplementationsexperiment auf Funktionalität getestet. Die Expression von *FDX2* ohne Mutation erlaubte Wachstum auf SD-Platten, wohingegen Gal-YAH1 Zellen, die mit einem Plasmid ohne Gen transformiert sind, nicht auf SD-Medium wachsen können (**Abb. 4.16**). Die prozessierte, mitochondriale Form von Fdx2 weist neun zusätzliche Aminosäuren im Vergleich zu Fdx1 auf (Claros & Vincens, 1996; Pagliarini et al, 2008). Um zu testen, ob dieser Bereich kritisch für die Fdx2-Funktion ist, wurden die ersten 13 Aminosäuren von Fdx2 molekularbiologisch entfernt, so dass das reife Protein mit dem Rest D5 begann. Diese Verkürzung des N-Terminus (Fdx2 -N13) hatte keinen Einfluss auf die Funktion, der Unterschied zu Fdx1 liegt also nicht in diesen

zusätzlichen Aminosäuren begründet. Im Gegensatz dazu führte die C-terminale Verkürzung von Fdx2 um 12 Aminosäuren (Fdx2 -C12), wie für die Kristallisationsstudie durchgeführt, zu einem kompletten Verlust der Fdx2-Funktion. Dieses Resultat passt gut zum hoch konservierten C-Terminus in der Untergruppe von Fdx2-Typ Ferredoxinen (**Abb. 4.8**). Fdx2 -C12 Protein wurde in den Mitochondrien der Hefezellen durch Immunfärbung nachgewiesen, so dass der Funktionsverlust *in vivo* nicht durch Degradation des Proteins erklärt werden kann (**Abb. 4.15**).



**Abbildung 4.15: Nachweis von C-terminal verkürztem Fdx2 (Fdx2 -C12) in Hefemitochondrien.** Mitochondrien wurden aus Hefezellen isoliert, die nicht mutiertes Fdx2 (Fdx2) oder C-terminal um 12 Aminosäuren verkürztes Fdx2 (Fdx2 -C12) exprimierten. Die Proteine in 30 µg Mitochondrien wurden durch SDS-PAGE voneinander getrennt und nach Western-Blot wurde Fdx2-Protein mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

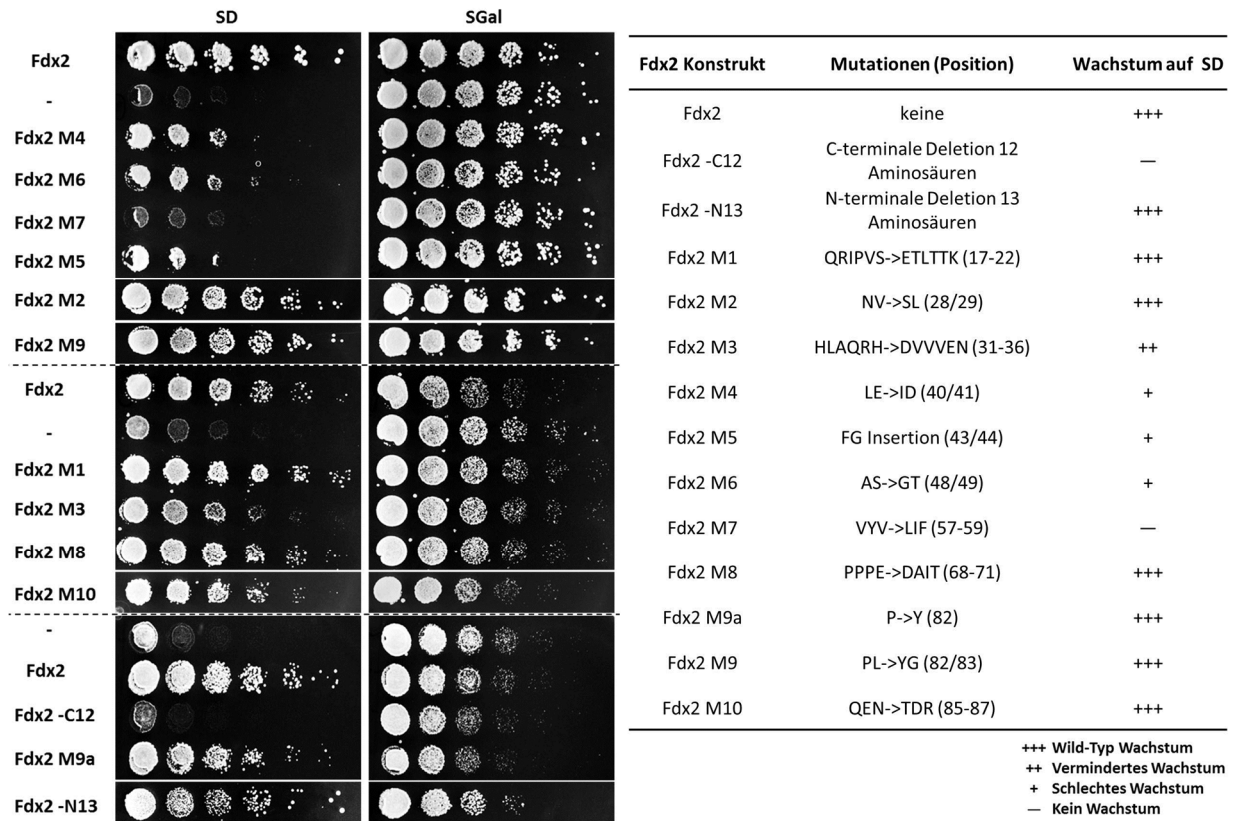
Als nächstes wurden systematisch interne Fdx2-Sequenzbereiche gegen entsprechende Fdx1-Sequenzen ausgetauscht. Es wurde von der Annahme ausgegangen, dass ein solcher Austausch zu einem Funktionsverlust führt, wenn die entsprechende Fdx2-Sequenz wichtig für die spezifische Funktion ist. Hingegen sollten Sequenzbereiche, die für allgemeinere Funktionen wie zum Beispiel strukturelle Integrität des Proteins oder Stabilisierung des Fe/S-Clusters wichtig sind, zwischen beiden Ferredoxinen austauschbar sein, ohne zu Funktionsverlust zu führen. Dieser Ansatz sollte im Gegensatz zur Einführung „willkürlicher“ Mutationen (zum Beispiel zu Alanin) nur Bereiche anzeigen, die für die spezifische Funktion wichtig sind. Eine Übersicht über die mutierten Sequenzbereiche (bezeichnet als M1 bis M10) liefert **Tabelle 4.3**. Zum Vergleich sind diese Segmente auch im Multi-Sequenzalignment von MB-Typ Ferredoxinen dargestellt (**Abb. 4.8**).

Mutation-Name	Geänderte Reste <sup>a</sup>	Sequenz Fdx1	Sequenz Fdx2
M1	17 - 22	ETLTTK	QRIPVS
M2	28 / 29	SL	NV
M3	31 - 36	DVVVEN	HLAQRH
M4	40 / 41	ID	LE
M5	43 / 44	FG	-
M6	48 / 49	GT	AS
M7	57 - 59	LIF	VYV
M8	68 - 71	DAIT	PPPE
M9	82 / 83	YG	PL
M10	85 - 87	TDR	QEN

<sup>a</sup>Nummerierung nach Rinder Adx

**Tabelle 4.3: Übersicht der mutierten Sequenzbereiche.** Die Bezeichnung der Mutationen, die Position der geänderten Reste sowie die nativen Sequenzen von Fdx1 beziehungsweise Fdx2 sind abgebildet. Eine Mutation wurde eingeführt indem die Fdx2-Sequenz durch die entsprechende Fdx1-Sequenz ersetzt wurde.

Die zehn Mutationen decken insgesamt 33 nicht-identische Aminosäuren der 120 Fdx1 Reste ab, von denen wiederum 43 identisch und 69 ähnlich zur Fdx2-Sequenz sind. Der Austausch von  $\beta$ -Strang B (Fdx1 M1) zeigte ebenso wenig einen Effekt auf das Wachstum der Gal-YAH1 Zellen auf SD Medien wie der Austausch mehrerer weiterer Regionen von Fdx2 (**Abb. 4.16**).

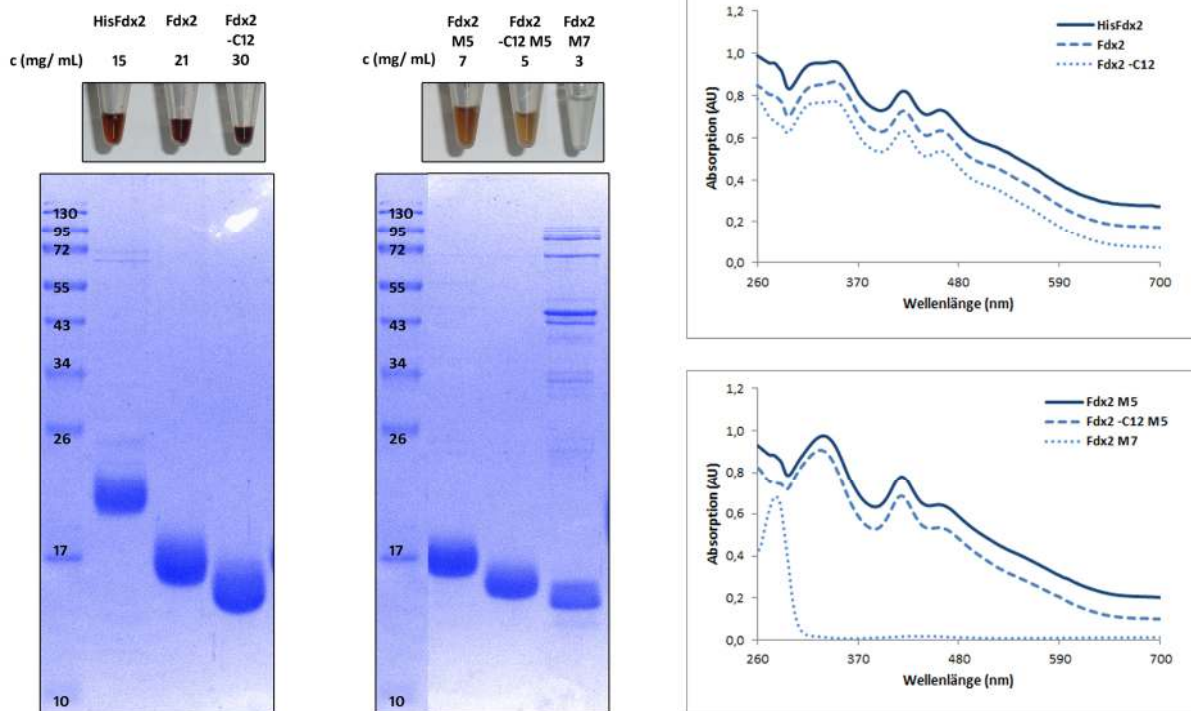


**Abbildung 4.16: Bestimmung von für die Funktion von Fdx2 wichtigen Resten.** Gal-YAH1 Zellen wurden mit entsprechendem Fdx2-Plasmid oder dem Plasmid p426-TDH3 ohne Insert (-) transformiert. Eine serielle Verdünnung von jeweils 1:5 mit einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 als Anfangswert wurde von links nach rechts auf Agarplatten mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (SD - Glukose; SGal - Galaktose) aufgebracht und die Platten für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Da Gal-YAH1 Zellen unter Yah1 Depletionsbedingungen (SD) funktionales humanes Fdx2 für das Wachstum benötigen, zeigt ein Wachstumsdefekt auf SD-Medium wichtige Bereiche von Fdx2 an. Die Komplementation erfolgte mit verschiedenen Fdx2 Varianten, wie in der Tabelle rechts beschrieben. Der Wachstumsphänotyp ist ebenfalls in der Tabelle rechts angegeben. Gestrichelte Linien trennen unabhängige Experimente.

Zumindest einige dieser ausgetauschten Regionen wiesen eine gewisse Konservierung innerhalb der Fdx1-Typ-beziehungsweise Fdx2-Typ-Untergruppe auf, zum Beispiel die Mutanten Fdx2 M9 und Fdx2 M10. Die Region 80 - 84 um den in Fdx1-Typ Ferredoxinen konservierten aromatischen Rest 82 (Y oder F) zeigte eine strukturelle Änderung bei der Reduktion von Adx (Beilke et al, 2002). Aus diesem Grund wurde vorgeschlagen, dass dieser Bereich an der Interaktion mit Redoxpartnern beteiligt ist (Beilke et al, 2002). Außerdem wurde beobachtet, dass die Mutationen Y82F, Y82L oder Y82S in Adx die Bindung zu den Zielproteinen CYP11A1 und CYP11B1 *in vitro* beeinflussen ohne die AdxR-Bindung zu beeinflussen (Beckert et al, 1994). Für die Funktion von Fdx2 hingegen scheint diese

Region hingegen nicht relevant zu sein, da die Mutation ohne Effekte auf das Zellwachstum auf SD Medium ist. Dies passt zu der Beobachtung, dass in humanem Fdx1 keine offensichtlichen strukturellen Änderungen nach Reduktion im entsprechenden Bereich auftreten (Xia et al, 1998). Rest 82 scheint daher auch in humanem Fdx1 nicht direkt involviert zu sein in der Vermittlung von strukturellen Änderungen in Folge der Reduktion des Fe/S-Clusters.

Der stärkste Wachstumsdefekt wurde bei der Einführung der streng konservierten Fdx1 Sequenz L57-I58-F59 (Fdx2 M7) beobachtet, was zu einem kompletten Funktionsverlust führte. Um den Einfluss dieser Mutation auf den Fe/S-Cluster zu analysieren, wurde Fdx2 M7 heterolog in *E. coli* hergestellt. Die anschließende Reinigung des Proteins lieferte nur die Apoform, was zeigte, dass die vorgenommene Mutation M7 den Fe/S-Cluster destabilisiert (**Abb. 4.17**). Das  $\beta$ -Strang D bildende Tripeptid V57-Y58-V59 in Fdx2 ist also kritisch für die korrekte Faltung des Proteins und die richtige Insertion des Fe/S-Clusters. Andere wichtige Stellen in Fdx2 befinden sich in der Region, wo Fdx1 zwei zusätzliche Aminosäuren (F43-G44) in der Primärstruktur aufweist. Der Einschub dieser zwei Aminosäuren in Fdx2 (Fdx2 M5) führte zu reduziertem Wachstum und indizierte damit die Beeinträchtigung der Fdx2 Funktion. Im UV/VIS-Spektrum des in *E. coli* hergestellten und gereinigten Fdx2 M5 Proteins waren drastische Veränderungen im Bereich zwischen 310 nm und 360 nm zu beobachten (**Abb. 4.17**). Trotzdem war der Fe/S-Cluster stabil in das Protein integriert und eine Restfunktion blieb bestehen, die das beobachtete Wachstum erklärt.





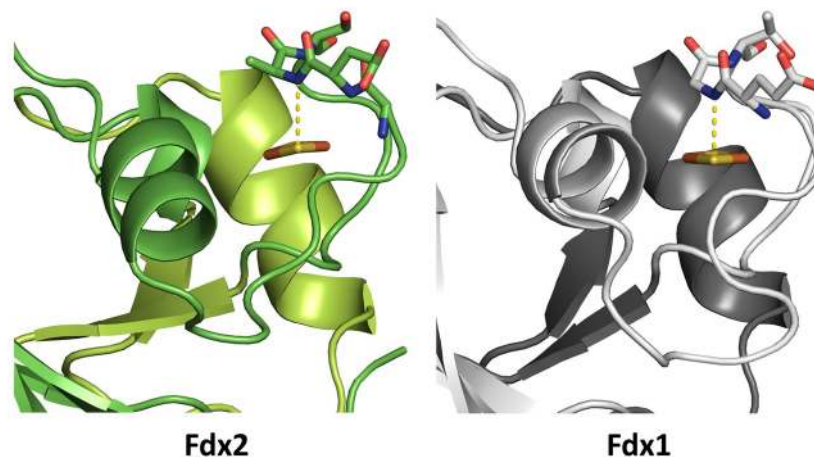
**Abbildung 4.17 (Seite 92): Charakterisierung gereinigter Fdx2 Proteine.** Mittels Proteinbestimmung nach Bradford wurde der molare Extinktionskoeffizient bei 414 nm für das nicht-getaggte Fdx2 Protein bestimmt. Der erhaltene Wert  $\epsilon_{414\text{nm}} = 9700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  passt gut zu dem aus der Literatur bekannten Wert für Adrenodoxin ( $\epsilon_{414\text{nm}} = 9800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; (Kimura & Suzuki, 1967)). Die UV/VIS-Spektren von jeweils 62  $\mu\text{M}$  Protein wurden im Bereich 260 nm - 700 nm aufgenommen und der besseren Übersicht wegen entlang der Absorptionsachse um 0,1 verschoben. Photographien der gereinigten Proteine mit den angegebenen Konzentrationen sind abgebildet. Jeweils 5  $\mu\text{g}$  Protein wurden auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. HisFdx2: His<sub>6</sub>-getaggttes Fdx2; Fdx2: nicht-getaggttes Fdx2; Fdx2 -C12: Fdx2 ohne die 12 C-terminalen Aminosäuren; die restlichen Proteine waren nicht-getaggt mit den Mutationen M5 und M7 wie in Abb. 4.16 beschrieben.

Ein ähnliches Ergebnis wurde erhalten, wenn die vermutete, sekundäre Interaktionsstelle mit der FdxR in Fdx2 (siehe Kapitel 4.2.2) mutiert wurde. Wie zuvor beschrieben ist der negative Charakter von Aminosäure 41 streng konserviert. Es wurde daher erwartet, dass der Austausch eines Restes, der für eine gemeinsame Funktion wie die Interaktion mit der FdxR wichtig ist, zu keinem Wachstumsdefekt führt. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der Austausch L40I/E41D (Fdx2 M4) zu einer starken Beeinträchtigung der Fdx2 Funktion führte. Wie bereits aus dem Multi-Sequenzalignment (**Abb. 4.8**) vermutet, erfordert Fdx2 ein Glutamat an Position 41. Ein Aspartat an dieser Stelle kommt nur in Ferredoxinen vom Fdx1-Typ mit dem zusätzlichen FG Dipeptid vor.

Die Fdx2 Mutante Fdx2 M6 ist in der Schlaufe mutiert, der den Fe/S-Cluster bedeckt. Diese Schlaufe ist in MB-Typ Ferredoxinen eine Aminosäure länger als in Pflanzen-Typ Ferredoxinen und es wurde gezeigt, dass eine Verkürzung der Schlaufe um eine Aminosäure in Adx das Redoxpotential um 100 mV erniedrigt. Gleichzeitig wird die Stabilität des Proteins beeinträchtigt sowie die Affinität zur Ferredoxinoxidoreduktase und dem Cytochrom P450 Enzym CYP11A1 stark vermindert (Hannemann et al, 2001). Eine Punktmutation im Adx Rest T49 hingegen hatte keinen Effekt auf das Redoxpotential und beeinflusste die katalytische Aktivität *in vitro* nur leicht. Der auf den ersten Blick unscheinbare Austausch von A48-S49 gegen die Fdx1 Sequenz G48-T49 (Fdx2 M6) in der beschriebenen Schlaufe hatte einen starken Wachstumsdefekt im Komplementationstest zur Folge (**Abb. 4.16**). Diese überraschend starke Beeinflussung der *in vivo* Funktion von Fdx2 kann wegen der großen Ähnlichkeit der mutierten Reste nur schwer auf die Änderung einer Interaktions-Bindungsstelle zurückgeführt werden. Interessanterweise bilden A48 in Fdx2 und G48 in Fdx1 eine Wasserstoffbrücke zum S2 Atom des Fe/S-Clusters (**Abb. 4.18**). Da das Redoxpotential wahrscheinlich nicht verändert ist, wird spekuliert, dass die Mutation möglicherweise einen Einfluss auf den Elektronentransferweg in Fdx2 haben könnte.

Schließlich wurde auch für den Austausch der gekippten  $\alpha$ -Helix C (siehe **Abb. 4.6**) ein vermindertes Wachstum beobachtet. Diese Helix ist in Fdx2 positiv geladen (ein Arginin, zwei Histidin), während sie in Fdx1 zwei negative Ladungen (Aspartat und Glutamat) trägt. Der Wachstumseffekt ist milder als für die zuvor beschriebenen Fdx2 Mutanten (**Abb. 4.16**). Daher wird vermutet, dass diese Mutation möglicherweise eine Wechselwirkung mit dem Zielprotein von Fdx2 beeinflusst, da kein solch

drastischer Effekt beobachtet wurde wie bei der Änderung der unmittelbaren Fe/S-Cluster Umgebung.



**Abbildung 4.18: Rest 48 bildet eine Wasserstoffbrücke zum Fe/S-Cluster.** Blick auf den Fe/S-Cluster von humanem Fdx2 (grün, links) und humanem Fdx1 (grau, rechts) mit der Wasserstoffbrücke zwischen Atom S2 des Fe/S-Clusters und dem Amidstickstoffatom von A48 (Fdx2)/ G48 (Fdx1) als gestrichelte Linie. Die Reste 47 bis 49 sind in der „sticks“ Darstellung abgebildet.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass alle für die Fdx2 Funktion wichtigen Regionen in der Kerndomäne lokalisiert sind. Der kritischste Bereich von Fdx2 ist der hochkonservierte C-Terminus, der absolut essentiell für die *in vivo* Funktion des Proteins ist. Einige wichtige Regionen spiegeln die strukturellen Unterschiede zwischen Fdx1 und Fdx2 wieder (FG Dipeptid,  $\alpha$ -Helix C), während andere nicht aus der Analyse der Primärstruktur vorhergesagt worden wären (Fdx2 M4, Fdx2 M6).

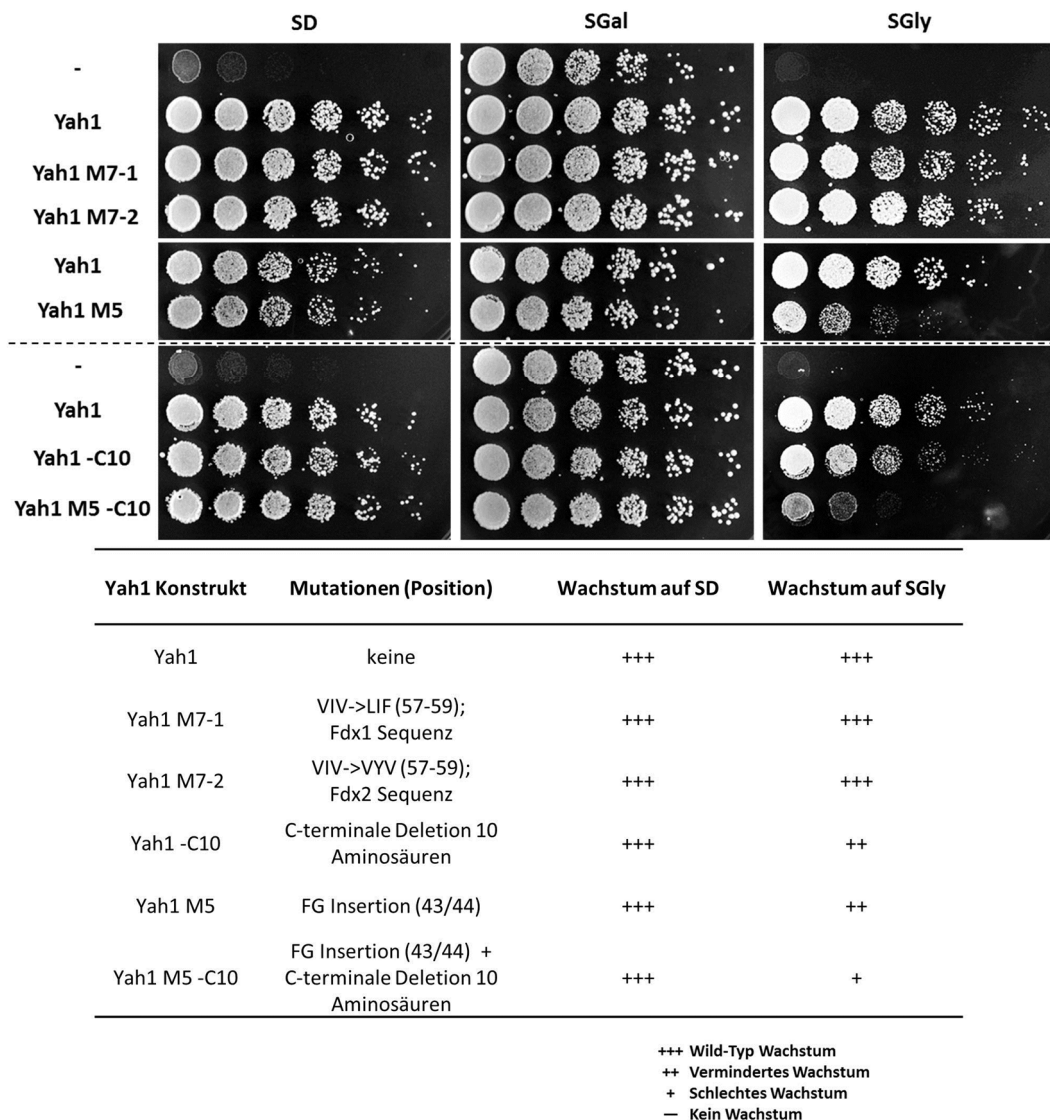
#### 4.2.5. Einige der für die Fdx2 Funktion wichtigen Sequenzbereiche sind bedeutend für die Funktion von Yah1 unter respiratorischen Bedingungen

Fdx2 konnte die Depletion von Yah1 in Gal-YAH1 Zellen unter fermentativen Bedingungen komplementieren (Kapitel 4.2.2). Um herauszufinden, ob die für die Fdx2 Funktion kritischen Bereiche auch für die Funktion von Yah1 *in vivo* wichtig sind, wurden die Mutationen mit dem stärksten Effekt auf die Fdx2 Funktion auch in Yah1 eingeführt. Mit Hilfe des zuvor beschriebenen Komplementationstests wurde der Einfluss auf die Yah1 Funktion unter fermentativen (SD) und respiratorischen Bedingungen (SGly) geprüft (**Abb. 4.19**).

Der Austausch des  $\beta$ -Strang D bildenden Tripeptids V57-I58-V59 in Yah1 sowohl gegen die entsprechende Fdx1-Sequenz (Yah1 M7-1) als auch die Fdx2-Sequenz (Yah1 M7-2) hatte keinen Einfluss auf die Yah1 Funktion. Die Verkürzung des C-Terminus um zehn Aminosäuren bis zu Rest M110 (Yah1 -C10) und damit die Deletion des konservierten TRN-Motivs in Yah1 hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Komplementation unter fermentativen Bedingungen, führte aber zu einem vermindertem Wachstum unter respiratorischen Bedingungen. Das gleiche Phänomen wurde

beobachtet bei der Insertion des Dipeptids F43-G44 in Yah1 (Yah1 M5). Die Kombination beider Mutationen führte zu stark vermindertem Wachstum unter respiratorischen Bedingungen, hatte aber keinen Einfluss auf das Wachstum unter fermentativen Bedingungen.

Insgesamt wurde festgestellt, dass sich die funktionalen Determinanten zwischen Fdx2 und Yah1 trotz hoher Homologie der Proteine (46 % Identität, 67 % Ähnlichkeit) deutlich voneinander unterscheiden. Die Verkürzung des C-Terminus und der Einschub der des F43-G44 Dipeptids führte zu schlechterem Wachstum unter respiratorischen Bedingungen, während das fermentative Wachstum unbeeinflusst blieb.



**Abbildung 4.19: Bestimmung von für die respiratorische Funktion von Yah1 wichtigen Resten.** Gal-YAH1 Zellen wurden mit entsprechendem Yah1-Plasmid wie in der Tabelle unten beschrieben oder dem Plasmid p426-TDH3 ohne Insert (-) transformiert. Die Durchführung erfolgte analog Abb. 4.7, die gestrichelte Linie trennt zwei unabhängige Experimente. Getestet wurde das Wachstum unter fermentativen Bedingungen (SD) und respiratorischen Bedingungen (SGly).

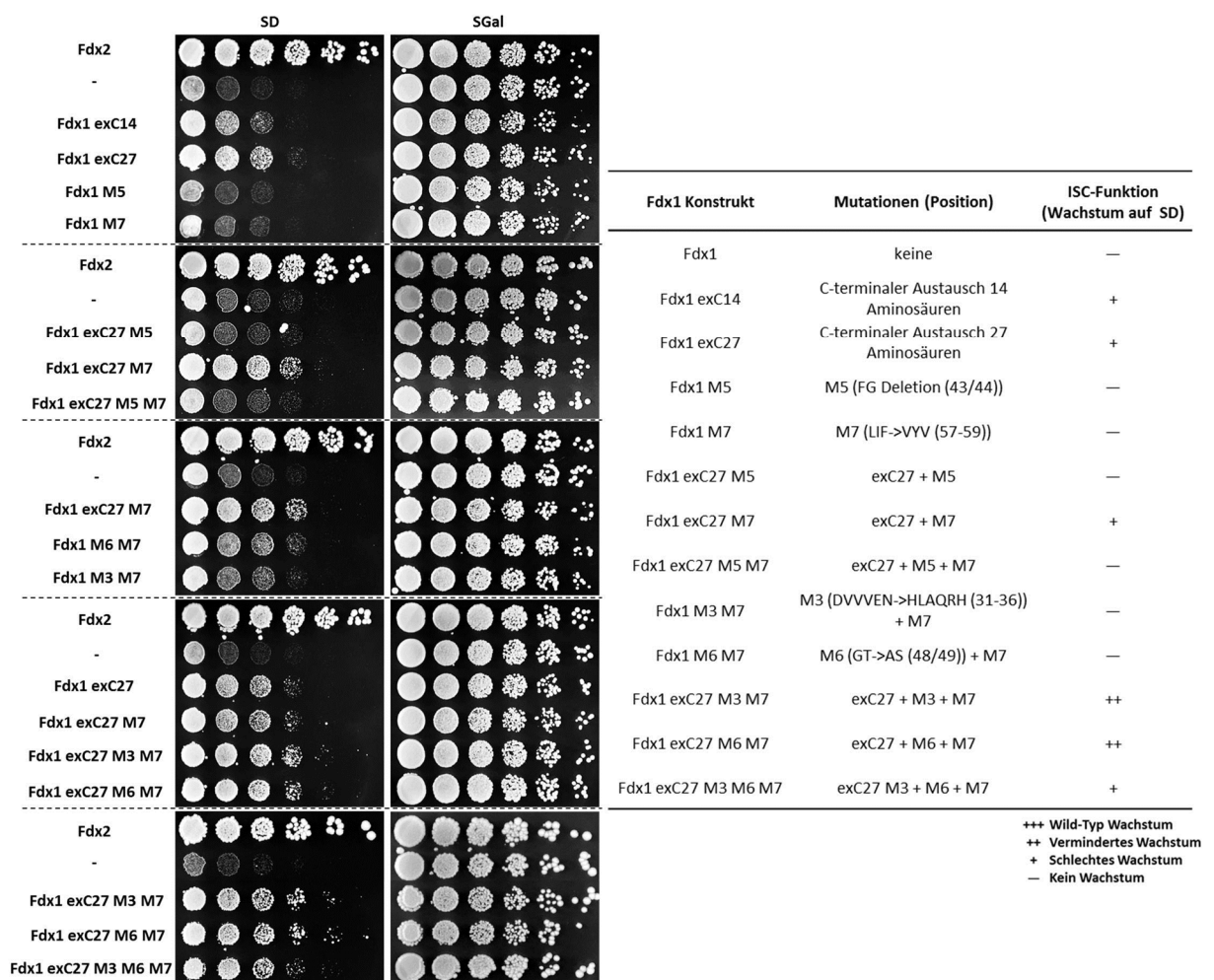
### **4.3. Identifizierung der für die Substratspezifität wichtigen Bereiche in Fdx1 und Fdx2**

#### **4.3.1. Erzeugung von Fdx2-spezifischer Funktion durch Mutation des Fdx1**

Die beiden humanen Ferredoxine Fdx1 und Fdx2 sind hochspezifisch hinsichtlich ihrer jeweiligen Funktion. Fdx2 ist an der Fe/S-Cluster-Biogenese in humanen Zellen beteiligt und stellt in dieser Hinsicht das funktionelle Orthologe von Yah1 dar (Lange et al, 2000; Sheftel et al, 2010). Fdx1 hingegen überträgt ebenso wie das verwandte Adx Protein aus Rind Elektronen auf mitochondriale Cytochrom P450 Enzyme. Durch die Einführung gezielter Mutationen sollte versucht werden, die Spezifität vom Ferredoxin Fdx1 umzuwandeln und es zu einem funktionalen Fdx2-artigen Ferredoxin zu machen. Dadurch sollte eine Funktionalität des Fdx1 in der Fe/S-Cluster-Biogenese (ISC-Funktion) erzeugt werden.

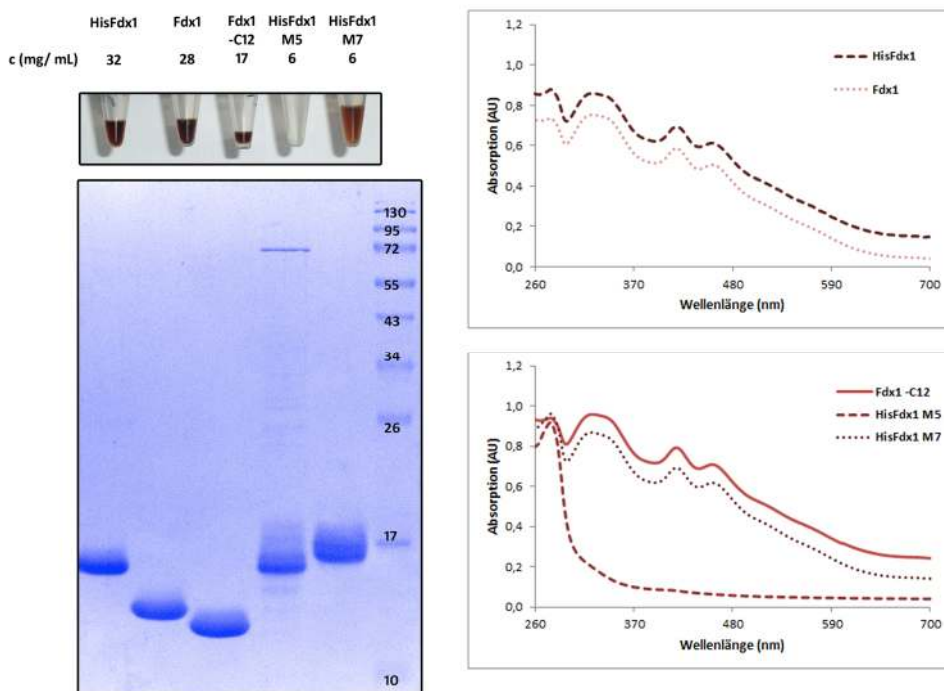
In Anbetracht der komplexen Ergebnisse hinsichtlich der funktionell wichtigen Regionen von Fdx2 (Kapitel 4.2.4) erschien es unwahrscheinlich, diese Umfunktionalisierung mit Hilfe von zufälliger Mutagenese und anschließendem Screening zu erreichen. Daher wurden zielgerichtet Sequenzbereiche in Fdx1 durch die entsprechenden Fdx2-Sequenzen ersetzt. Die veränderten Proteine wurden auf ihre Fähigkeit getestet, die Depletion von Yah1 in Gal-YAH1 Zellen unter fermentativen Bedingungen zu komplementieren. Da der hochkonservierte C-Terminus von Fdx2 funktionell absolut essentiell war (siehe **Abb. 4.16**), wurden zunächst die letzten 14 Aminosäuren von Fdx1 gegen die Fdx2 Reste ausgetauscht (Fdx1 exC14). Die Expression von Fdx1 exC14 in Gal-YAH1 Zellen unterstützte noch, wenn auch stark reduziertes, Wachstum auf SD-Medium (**Abb. 4.20**). Dieses unerwartete Ergebnis zeigte, dass der funktionale Unterschied zwischen Fdx2 und Fdx1 nicht allein im hochkonservierten C-Terminus von Fdx2 begründet ist. Außerdem bestätigte dieses Resultat die Skepsis gegenüber einem genetischen Ansatz für die ISC-Funktionsgenerierung in Fdx1: wenn der Austausch des 14 Aminosäuren großen, funktionell wichtigsten Bereiches nicht ausreicht, um ISC-Funktion in Fdx1 zu erzeugen, scheint es nahezu ausgeschlossen, dies durch zufällig eingeführte Mutationen zu erreichen. Um die ISC-Funktion von Fdx1 zu verbessern, wurde das Protein Fdx1 exC27 erzeugt, in dem die 27 C-terminalen Aminosäuren von Fdx1 durch die entsprechenden Reste aus Fdx2 ersetzt wurden. Es wurde ein etwas besseres Wachstum auf SD-Medium beobachtet, allerdings war es viel schlechter als das für Fdx2. Folglich funktionierte auch dieses Protein nur schlecht in der Fe/S-Cluster-Biogenese. Schließlich wurde der Austausch von Regionen in Fdx1 gegen Fdx2-Sequenzen getestet, für die zuvor funktionelle Relevanz gezeigt worden ist (Kapitel 4.2.4). Die Deletion des F43-G44 Dipeptids allein (Fdx1 M5) führte ebenso wenig zur Generierung von ISC-Funktion in Fdx1 wie auch der Austausch des  $\beta$ -Stranges D (Fdx1 M7). Die Kombination von Mutation M5 mit dem Austausch der C-terminalen 27 Aminosäuren zeigte, dass

keine Komplementation mehr zu beobachten war (Fdx1 ex27 M5). Um diesen überraschenden Verlust der zuvor erzeugten ISC-Funktion zu erklären, wurde das His<sub>6</sub>-getaggte Protein HisFdx1 M5 heterolog exprimiert und gereinigt. Das Protein konnte nur in seiner Apoform ohne Fe/S-Cluster isoliert werden (**Abb. 4.21**). Das Dipeptid F43-G44 ist also in Fdx1 im Gegensatz zu Fdx2 wichtig für die Stabilität und/oder die korrekte Koordination des Fe/S-Clusters. Umgekehrt zeigte das analog erzeugte Protein HisFdx1 M7 hingegen ein UV/VIS Spektrum, das sich nicht vom Fdx1 Protein unterscheiden ließ. Dies stand im Gegensatz zu Fdx2, in dem der Austausch des  $\beta$ -Stranges D (Mutation M7) zu einer Destabilisierung des Fe/S-Clusters führte. Diese Beobachtungen von völlig verschiedenen Effekten beim Austausch von analogen Regionen in Fdx1 und Fdx2 veranschaulichen abermals die komplizierte Struktur-Funktions-Beziehung von humanem Fdx1 und Fdx2.



**Abbildung 4.20: Erzeugung von ISC-Funktion in Fdx1.** Gal-YAH1 Zellen wurden mit entsprechendem Fdx1-Plasmid wie in der Tabelle rechts beschrieben transformiert. Eine serielle Verdünnung von jeweils 1:5 mit einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 als Anfangswert wurde von links nach rechts auf Agarplatten mit verschiedenen Kohlenstoffquellen aufgebracht und die Platten für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Gal-YAH1 Zellen benötigen unter fermentativen Depletionsbedingungen (SD) ein mitochondriales Ferredoxin, das Elektronen für die Fe/S-Cluster-Biogenese liefern kann. Wachstum auf SD-Medium zeigt damit eine ISC-Assemblierungsfunktion an. Gestrichelte Linien trennen unabhängige Experimente. Als Kontrollen wurden Gal-YAH1 Zellen verwendet, die transformiert waren mit einem Plasmid, das Fdx2 kodiert oder mit einem Plasmid ohne Insert (-).

Die Kombination von Mutation M7 mit dem Austausch der letzten 27 Aminosäuren führte zu einem etwas besseren Wachstum als der Austausch des C-Terminus allein. Um die ISC-Funktion in Fdx1 weiter zu verbessern, wurden letztendlich noch die M3 Mutation (Austausch von Helix C) oder M6 Mutation (Austausch in der den Fe/S-Cluster-bedeckenden Schlaufe) in das Protein Fdx1 exC27 M7 eingeführt. Die einzelnen Mutationen verbesserten die Komplementation des Wachstumsdefekts noch weiter. Jedoch führte die gemeinsame Einführung der beiden Mutationen zu verschlechtertem Wachstum. Dies deutete auf eine gegenseitige negative Beeinflussung des Austausches der Regionen M3 und M6 hin, obwohl beide Regionen individuell eine funktionelle Verbesserung der ISC-Funktion des Fdx1 erreichen können.

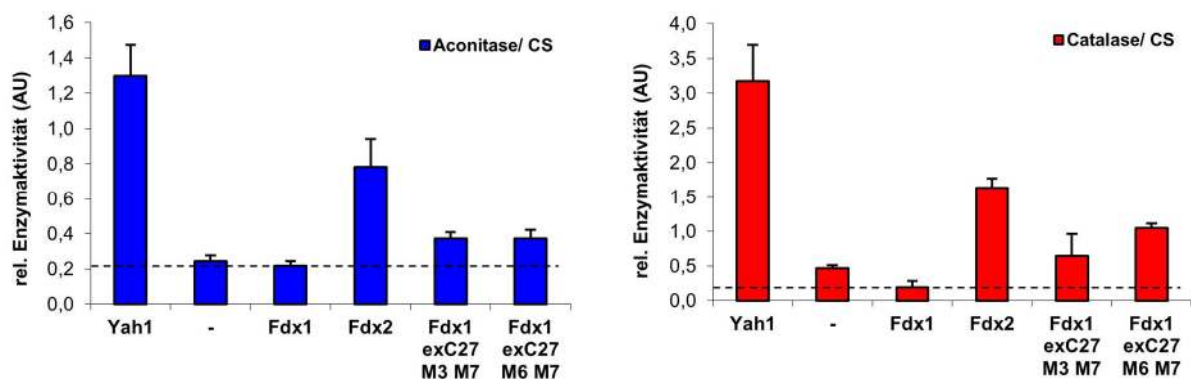


**Abbildung 4.21: Charakterisierung gereinigter Fdx1 Proteine.** UV/VIS-Spektren von jeweils 62  $\mu\text{M}$  Protein wurden im Bereich 260 nm - 700 nm aufgenommen und der besseren Übersicht wegen entlang der Absorptionsachse um 0,1 verschoben. Die Photographien der gereinigten Proteine sind bei den angegebenen Konzentrationen gemacht worden. Jeweils 5  $\mu\text{g}$  Protein wurden auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. HisFdx1: His<sub>6</sub>-getaggttes Fdx1; Fdx1: nicht-getaggttes Fdx1; Fdx1 -C12: Fdx1 ohne die 12 C-terminalen Aminosäuren; die beiden Proteine HisFdx1 M5 und HisFdx1 M7 waren His<sub>6</sub>-getaggt und enthielten die Mutationen M5 und M7 wie in Abb. 4.20 beschrieben.

Mit den beschriebenen Mutationen wurde eine deutliche Komplementation des Wachstumsdefektes von Gal-YAH1 Zellen auf SD-Medium erreicht, auch wenn das Wachstum noch immer schlechter als das von Fdx2 komplementierten Zellen war (**Abb. 4.20**). Um biochemisch zu zeigen, dass die mutierten Fdx1 Proteine *in vivo* tatsächlich Elektronen für die Fe/S-Cluster-Biogenese liefern können, wurden Mitochondrien von GalYAH1 Zellen isoliert, die die am besten wachsenden Fdx1 Proteine "Fdx1 exC27 M3 M7" oder "Fdx1 exC27 M6 M7" unter fermentativen Depletionsbedingungen synthetisierten. Zum Vergleich wurden analog Mitochondrien aus Gal-YAH1 Zellen isoliert, die Plasmide kodierend für *YAH1*, *FDX2* oder *FDX1* beziehungsweise ein leeres Plasmid trugen. Die

Enzymaktivitäten des [4Fe-4S] Cluster enthaltenden Enzyms Aconitase, des Häm-abhängigen Enzyms Katalase sowie des Kontrollenzym Citrat-Synthase wurden bestimmt. Es wurde wie zuvor beschrieben (Sheftel et al, 2010) gefunden, dass Fdx2 den Verlust der Aconitaseaktivität und der Katalaseaktivität in GalYAH1 komplementiert, wenn auch die vollständige, Yah1-vergleichbare Komplementation nicht erreicht wird (**Abb. 4.22**). Fdx1 hingegen kann keine Elektronen für die Fe/S-Cluster-Biogenese liefern, erkennbar am Verlust der Aconitaseaktivität und der Katalaseaktivität, auf die die Expression von *FDX1* sogar einen zusätzlichen negativen Effekt zu haben schien. Das Häm-abhängige Enzym Katalase verliert seine Aktivität, da eine nicht-funktionelle mitochondriale ISC-Maschinerie Auswirkungen auf die Eisenhomöostase und die Hämsynthese hat. Nimmt man die Enzymaktivitäten bei Expression von *FDX1* als Startwert, so wurde eine signifikante Komplementation der Aconitase- und Katalaseaktivität beobachtet. Die Komplementation erfolgte, wie aus den Wachstumsphänotypen erwartet, nur partiell und lag deutlich unter den Werten von Fdx2.

Zusammengenommen zeigten diese Ergebnisse, dass die Erzeugung von ISC-Funktion in Fdx1 tatsächlich erfolgreich war. Der Grad der Umfunktionalisierung war nicht vollständig, obwohl eine ganze Reihe funktionell wichtiger Bereiche ausgetauscht wurden. Dies passt zu den zuvor beschriebenen Beobachtungen, dass die funktionellen Unterschiede zwischen Fdx1 und Fdx2 kompliziert zu sein scheinen und sich nicht auf einige, wenige Aminosäureunterschiede zurückführen lassen. Dennoch konnten durch diese Analyse wichtige Bereiche für die ISC-spezifische Funktion von Ferredoxinen entdeckt werden.

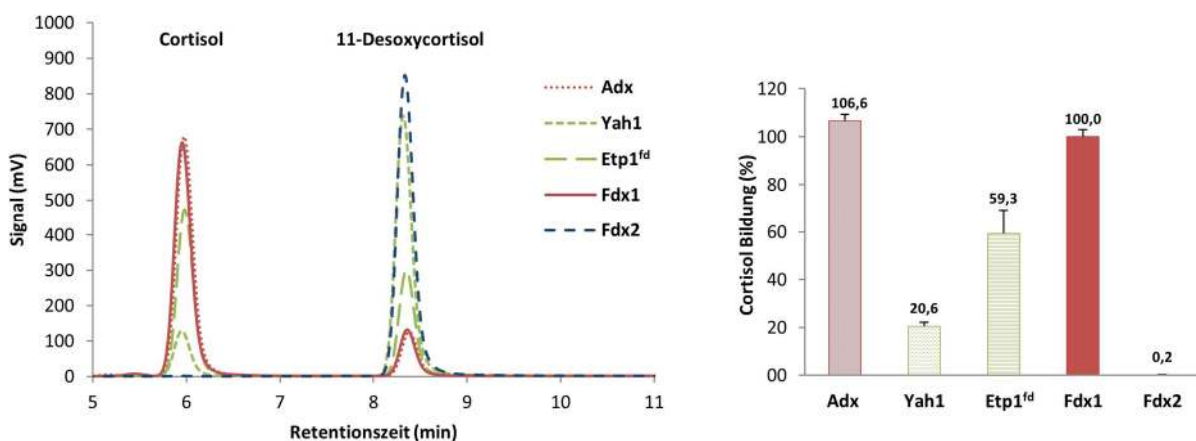


**Abbildung 4.22: Biochemischer Nachweis der Erzeugung von ISC-Funktion in Fdx1.** Gal-YAH1 Zellen wurden mit einem Plasmid kodierend für Yah1, Fdx2, Fdx1 oder die beiden Fdx1 Mutanten „Fdx1 exC27 M3 M7“ oder „Fdx1 exC27 M6 M7“ beziehungsweise mit einem Plasmid ohne Gen (-) transformiert und auf SD-Medium kultiviert (40 h). Mitochondrien wurden isoliert und die Enzymaktivitäten des [4Fe-4S] Cluster abhängigen Enzyms Aconitase und des Häm-abhängigen Enzyms Katalase gemessen. Es wurde jeweils normiert auf die Enzymaktivität des Kontrollenzym Citrat-Synthase (CS). Die Hintergrundaktivität (gestrichelte Linie) bezieht sich auf die Expression von *FDX1*, die einen zusätzlichen negativen Effekt auf die Katalaseaktivität hatte. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten an.

### 4.3.2. Erzeugung von Cytochrom P450 Elektronentransferaktivität in Fdx2

In Eukaryoten gibt es eine Vielzahl an Cytochrom P450 Enzymen (CYP), die für die Oxidation organischer Verbindungen verantwortlich sind. Sie sind biotechnologisch interessant, da sie Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen selektiv aktivieren. In der Regel fungieren CYP als Monooxygenasen, d.h. unter Verwendung von O<sub>2</sub> wird ein organisches Substrat hydroxyliert. Dabei wird nur ein Sauerstoffatom für die Hydroxylierung verwendet, das andere Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert. Die Elektronen hierfür stammen von NADPH, welches das direkte Substrat von CYP sein kann. Alternativ kann NADPH auch von einem Flavoprotein oxidiert werden, von dem aus dann die Elektronen entweder direkt oder indirekt, zum Beispiel über Cytochrom b<sub>5</sub>, zum CYP fließen. Die meisten CYP sind im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, einige finden sich aber auch in den Mitochondrien. In menschlichen Zellen gibt es insgesamt sieben mitochondriale CYP, die zu den drei CYP Familien 11, 24 und 27 gehören (Annalora et al, 2010). CYP11 (3 Enzyme) sind beteiligt an der Steroidbiosynthese, CYP24 inaktiviert Vitamin D<sub>3</sub> und CYP27 (3 Enzyme) aktivieren Vitamin D<sub>3</sub> beziehungsweise sind an der Biosynthese von Gallensäuren beteiligt. Im Gegensatz zu den mikrosomalen CYP ist der Elektronenüberträger auf mitochondriale CYP ein [2Fe-2S] Ferredoxin, das von einer Ferredoxinoxidoreduktase reduziert wird.

Die Spezifität der Elektronenübertragung von humanem Fdx1 auf mitochondriale Cytochrom P450 Enzyme im Vergleich zu Fdx2 ist verblüffend hoch. In einem *in vitro* System (Zollner et al, 2008) bestehend aus NADPH, humaner Ferredoxinoxidoreduktase FdxR und humanen CYP11B1 kann der Umsatz des CYP11B1 Substrates 11-Desoxycortisol zu Cortisol durch Umkehrphasen-HPLC verfolgt werden. Die Reaktion erfordert die Gegenwart eines kompetenten Ferredoxins (**Abb. 4.23**). Unter den getesteten Bedingungen erfolgte mit humanem Fdx1 ein fast vollständiger Umsatz zu Cortisol. Im Gegensatz dazu setzt Fdx2 unter den gleichen Bedingungen 500-mal weniger Substrat um. Der Unterschied dürfte tatsächlich sogar noch größer sein, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Fdx1 Reaktion durch Substratverarmung bereits verlangsamt worden ist.

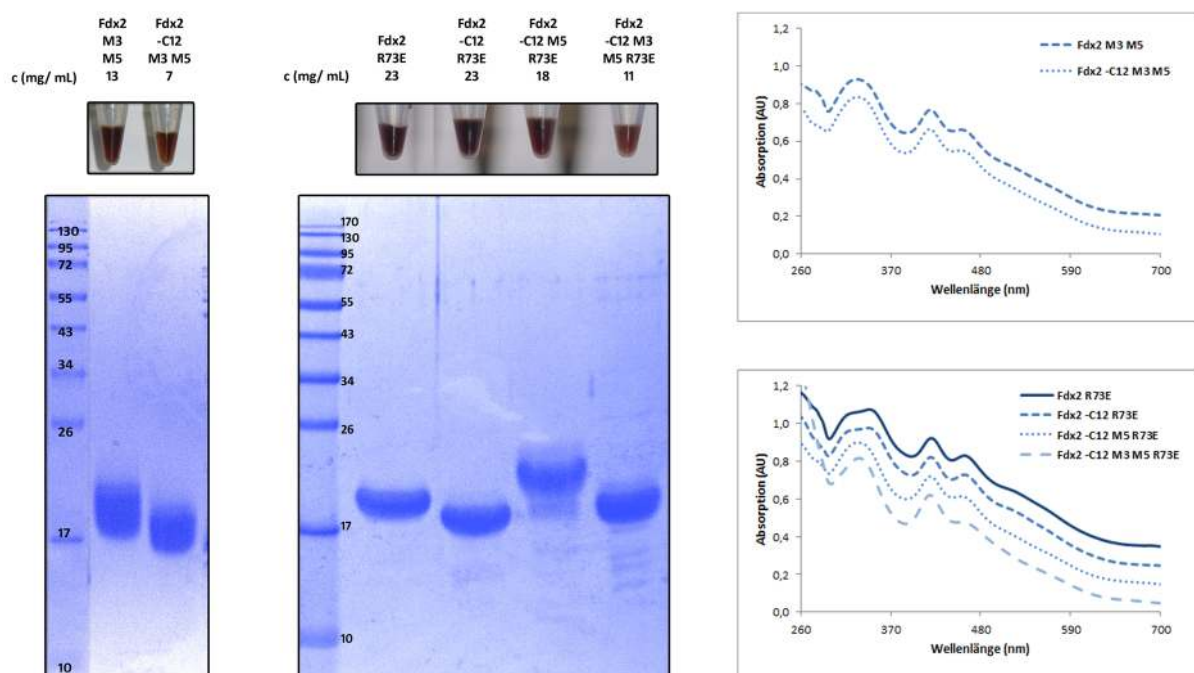




**Abbildung 4.23 (Seite 100): Der Elektronentransfer auf Cytochrom P450 Enzyme erfolgt hochspezifisch durch Fdx1 und nicht durch Fdx2.** Der *in vitro* Elektronentransfer auf CYP11B1 wurde durch Messung des Umsatzes von 11-Desoxycortisol zu Cortisol nach organischer Extraktion des Reaktionsgemisches und Trennung von Edukt und Produkt über Umkehrphasen-HPLC bestimmt. 20  $\mu$ M folgender Ferredoxine wurden verwendet: Adx (*B. taurus*), Yah1 (*S. cerevisiae*), Etp1<sup>fd</sup> (*S. pombe*), Fdx1 (human), Fdx2 (human). Das Reaktionsgemisch enthielt außerdem 0,5  $\mu$ M FdxR, 0,5  $\mu$ M CYP11B1, 400  $\mu$ M 11-Desoxycortisol sowie ein NADPH regenerierendes System (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Glukose-6-phosphat, 1 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM NADPH gestartet und 10 min bei 37 °C inkubiert. Links: Chromatogramme der Umkehrphasen-HPLC Läufe. Rechts: Quantifizierung der Cortisol-Bildung. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von zwei bis vier unabhängigen Messungen an.

Adrenodoxin (Adx), das Homologe von Fdx1 aus Rind, setzte auch im heterologen System etwa genauso viel um wie humanes Fdx1. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem *S. cerevisiae* Yah1 sowie die *S. pombe* Etp1<sup>fd</sup> Ferredoxindomäne eingesetzt (Schiffler et al, 2004). Beide Proteine waren in der Lage *in vitro* Elektronen auf CYP11B1 zu übertragen. Mit Etp1<sup>fd</sup> wurde 59 % des Umsatzes von Fdx1 erreicht, der Transfer ist also weniger effizient. Interessanterweise war der Cortisol-Umsatz mit Yah1 noch weniger effizient und lag bei 21 %. Beide Resultate sind insofern bemerkenswert, als dass weder in *S. pombe* noch in *S. cerevisiae* mitochondriale Cytochrom P450 Enzyme bekannt sind. Obwohl der beobachtete Elektronentransfer *in vivo* normalerweise nicht vor kommt, sind beide Hefen bereits erfolgreich zur biotechnologischen Herstellung von Steroiden genutzt worden (Ewen et al, 2011), was zeigt, dass der Elektronentransfer also auch in der Hefezelle stattfindet.

Nach der erfolgreichen Erzeugung von ISC-Funktion in Fdx1 (Kapitel 4.3.1) sollte versucht werden, die für den Elektronentransfer auf CYPs wichtigen Bereiche des Fdx2 zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden Mutationen in Fdx2 eingeführt und die entsprechenden Proteine wurden heterolog exprimiert, gereinigt (**Abb. 4.17 und 4.24**) und in dem *in vitro* System auf Elektronentransfer getestet (**Abb. 4.25**).

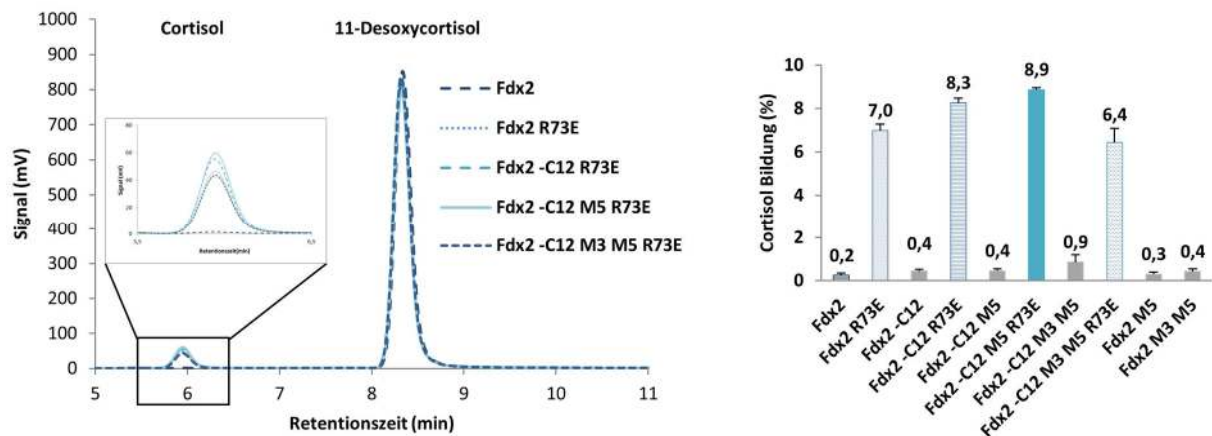


**Abbildung 4.24 (Seite 101): Charakterisierung gereinigter Fdx2 Proteine (2).** UV/VIS-Spektren und SDS-PAGE gereinigter Fdx2 Proteine analog zu Abb. 4.17. Jeweils nicht-getaggetes Fdx2 mit verschiedenen Mutationen einzeln oder in Kombination: -C12 (Deletion der 12 C-terminalen Aminosäuren), R73E (Punktmutation Arg73Glu), M3 (Austausch von  $\alpha$ -Helix C) und M5 (Insertion von F43-G44). Für weitere Details siehe Tabelle 4.3 und Text.

Die Entfernung der letzten 12 Aminosäuren von Fdx2 hatte keinen Einfluss auf die Elektronentransferreaktion. Dies zeigte, dass der hochkonservierte und für die ISC-Funktion von Fdx2 essentielle C-Terminus den Elektronentransfer auf CYP nicht behinderte. Es ist bekannt, dass der C-Terminus von Adx nicht wichtig ist für den Elektronentransfer auf die Cytochrom P450 Enzyme CYP11A1 und CYP11B1. Es wurde sogar gezeigt, dass die C-terminale Verkürzung von Adx zu einer leichten Erhöhung der Elektronentransferaktivität *in vitro* führt (Cupp & Vickery, 1989). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die kritischen Unterschiede bezüglich der Elektronentransferaktivität auf CYP zwischen Fdx1 und Fdx2 im „Kern“ der (verkürzten) Proteine zu finden sind.

Als nächstes wurde getestet, ob für die ISC-Funktion kritische Regionen von Fdx2 (Kapitel 4.2.4) hinderlich sind für den Elektronentransfer auf CYP. Dazu wurden die entsprechenden Regionen in Fdx2 gegen die Fdx1-Sequenzen ausgetauscht. Weder die M3 Mutation (Austausch von  $\alpha$ -Helix C) noch die M5 Mutation (Einschub des Dipeptids F43-G44) führten zu einem überzeugendem Effekt, auch dann nicht, wenn die Mutationen in C-terminal verkürztes Fdx2 oder miteinander kombiniert eingeführt wurden (**Abb. 4.25**). Die primäre Interaktionsregion von Adx (und Fdx1) für CYP ist durch Mutagenese-Studien und chemische Modifikationsstudien identifiziert und analysiert worden (für eine Übersicht hierzu siehe (Ewen et al, 2011)). Es ist bekannt, dass die Bindestelle von Adx (Fdx1) für die Ferredoxinoxidoreduktase mit der Bindestelle für die CYP überlappt (Vickery, 1997). Die wichtigsten Interaktionen finden dabei immer mit negativ geladenen Resten der sauren  $\alpha$ -Helix F statt. Die Schlüsselreste für die Interaktion mit der Ferredoxinoxidoreduktase sind D76 und D79, welche konsequenterweise streng konserviert sind in allen MB-Typ Ferredoxinen. Die Mutation der beiden Reste in humanem Fdx1 führte zu einer dramatischen Abnahme der Affinität für FdxR und auch zu einer deutlichen Verringerung der Affinität für CYP11A1 (Coghlan & Vickery, 1991) resultierend in einem fast vollständigem Verlust des Substratumsatzes durch CYP11A1. Es wurde außerdem gefunden, dass die Mutation von D72 die Bindung an FdxR weniger als zweifach verringert, während die Interaktion mit CYP11A1 um den Faktor drei vermindert wird. Die gesamte Enzymreaktion der Cholesterolseitenkettenspaltung katalysiert durch CYP11A1 wurde verringert auf 41 %. Die Mutation von E73 zu Alanin oder Glutamin hatte keine Auswirkung auf die FdxR-Bindung, wohingegen die Bindung zu CYP11A1 um den Faktor drei bis vier verringert wurde, resultierend in einer Halbierung der Gesamtaktivität der enzymatischen Reaktion (Coghlan & Vickery, 1991). In der gleichen Studie wurde außerdem gezeigt, dass D68 keine Rolle spielt für die Bindung von FdxR und CYP11A1 und die Mutation D68A daher auch keinen Einfluss auf die Enzymreaktion hatte.

Beim Vergleich der primären Interaktionsregion von Fdx1 und Fdx2 fiel auf, dass neben den Resten D76 und D79 auch die negative Ladung von Rest 72 konserviert ist (**Abb. 4.8**). Überraschenderweise wurde allerdings in Fdx2 und vielen weiteren Fdx2-Typ Ferredoxinen an Position 73 die positiv geladene Aminosäure Arginin gefunden, während in Fdx1-Typ Ferredoxinen Rest 73 negativ geladen ist. Auch in den Hefe-Ferredoxinen Yah1 und Etp1<sup>fd</sup>, die Elektronen auf CYP übertragen konnten (**Abb. 4.23**), ist Rest 73 negativ geladen. Aus diesem Grund wurde Rest 73 in Fdx2 zu einem Glutamat umgewandelt und das mutierte Protein (Fdx2 R73E) auf seine Fähigkeit Elektronen an CYP11B1 zu übertragen getestet (**Abb. 4.25**).



**Abbildung 4.25: Erzeugung von Cytochrom P450 Elektronentransferaktivität in Fdx2 durch Mutation von R73.** Der *in vitro* Elektronentransfer auf CYP11B1 wurde wie in Abb. 4.23 getestet. Verwendet wurden je 20  $\mu$ M folgender Ferredoxine: nicht mutiertes Fdx2 sowie einzeln oder kombiniert mutiertes Fdx2 mit den Mutationen C-terminale Verkürzung um 12 Aminosäuren (-C12), Punktmutation Arg73Glu (R73E), M3 (Austausch von  $\alpha$  Helix C; Reste 31 - 36) und M5 (Insertion von F43-G44). Für eine genauere Beschreibung der Mutationen siehe Tabelle 4.3. Links: Chromatogramme der Umkehrphasen-HPLC Läufe, der Einschub zeigt eine Vergrößerung des Cortisolpeaks. Rechts: Quantifizierung der Cortisol-Bildung. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von zwei bis vier unabhängigen Messungen an.

Es wurde festgestellt, dass der Austausch von Rest 73 gegen eine negativ geladene Aminosäure tatsächlich Fdx2 erlaubt, Elektronen auf CYP11B1 zu übertragen. Auch wenn der Umsatz an Cortisol nur 7,0 % des mit Fdx1 erreichbaren Umsatzes entspricht (**Abb. 4.25**), so bedeutet dies doch eine Steigerung um den Faktor 35 im Vergleich zu Fdx2. Die Kombination der Mutation R73E mit der Verkürzung des C-Terminus erhöhte den Enzymumsatz minimal auf 8,3 %, die zusätzliche Einführung der M5 Mutation (F43-G44 Insertion) führte zu 8,9 % Umsatz. Im Gegensatz dazu resultierte das weitere Hinzufügen der M3 Mutation (Austausch von  $\alpha$ -Helix C) wieder in einer Verringerung des Umsatzes auf 6,4 %.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass der Transfer von Elektronen zu CYP11B1 hochspezifisch ist. Mit Fdx1 ebenso wie mit Adx wird der volle Umsatz erzielt, wohingegen Fdx2 quasi zu keinem physiologisch bedeutsamen Umsatz führt (Faktor 500 weniger). In humanem Fdx2 konnte durch die Mutation R73E Elektronentransferaktivität zu P450 Enzymen generiert werden. Die negative Ladung

an Position 73 in Fdx2 scheint daher eine entscheidende Grundvoraussetzung für diese katalytische Aktivität zu sein. Der durch Austausch weiterer Reste erreichte maximale Wert von 8,9 % des Fdx2 Umsatzes zeigt erneut an, dass nicht nur einige Aminosäuren, sondern vielmehr weitere hochkomplizierte strukturelle Parameter für die Funktions- und Substratspezifität der humanen Ferredoxine Fdx1 und Fdx2 verantwortlich sind.

#### **4.4. Bestimmung des Interaktionspartners von Yah1 in der ISC-Maschinerie**

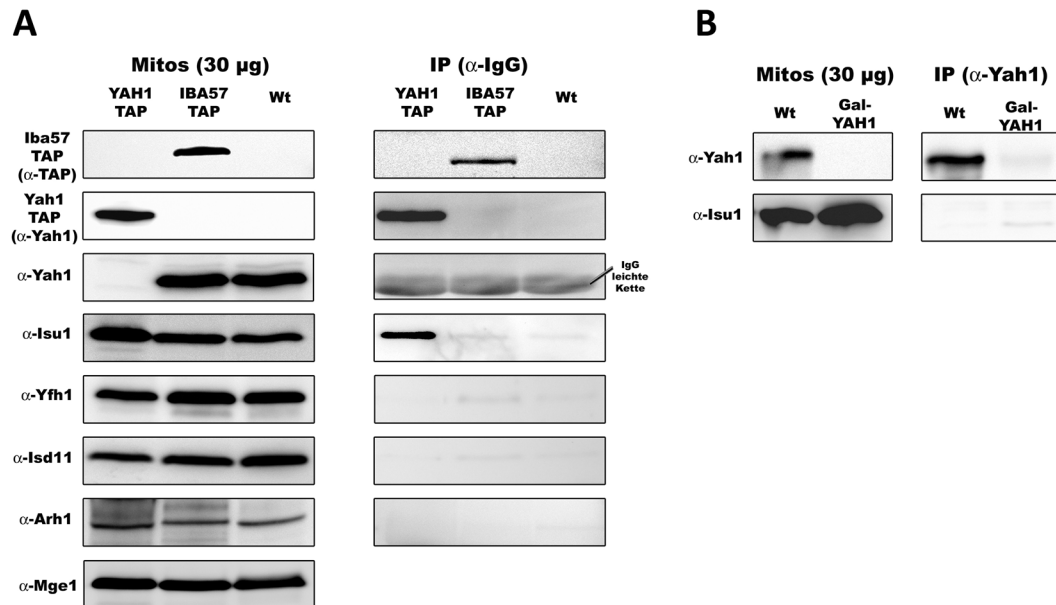
##### **4.4.1. Yah1 interagiert mit Isu1 *in vivo***

Im Hydroxylierungssystem von Nebennierenmitochondrien bestehend aus Adx, AdxR und Cytochrom P450 Enzymen (CYP) ist die Funktion des Ferredoxins Adx und des homologen Fdx1 bereits lange bekannt: die Elektronen fließen von NADPH über AdxR auf Adx und von dort auf CYP (Omura et al, 1966). Anders verhält es sich bei den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe*, die beide keine mitochondrialen P450 Enzyme besitzen (Nelson, 2009). Folglich gibt es kein physiologisches P450 Enzym als „Substrat“ für das mitochondriale Ferredoxin. Wie zuvor bereits erwähnt spielt Yah1 aus *S. cerevisiae* eine wichtige Rolle bei mindestens drei metabolischen Prozessen: in der Fe/S-Cluster-Biogenese (Lange et al, 2000), in der Hydroxylierung von Häm O zu Häm A (Barros et al, 2001; Barros et al, 2002) und in der Biosynthese von Koenzym Q<sub>6</sub> (Pierrel et al, 2010). Für keinen dieser Prozesse gibt es bislang den experimentellen Nachweis, wohin genau die Elektronen fließen. Für die Häm A Biosynthese ist das Substrat wahrscheinlich die mutmaßliche Monooxygenase Cox15, die in *S. pombe* das Fusionsprotein Ept1 mit dem Ferredoxin bildet. Die Rolle von Yah1 in der Biosynthese von Q<sub>6</sub> und in der Fe/S-Cluster-Biogenese ist hingegen momentan noch nicht genau geklärt.

Für die Funktion in der ISC-Maschinerie wurde vorgeschlagen, dass die von Yah1 gelieferten Elektronen für die Reduktion von Schwefel S<sup>0</sup> in Cystein zu Sulfid S<sup>2-</sup> in Fe/S-Clustern verwendet werden (Lill, 2009; Muhlenhoff et al, 2003). Basierend auf *in vitro* Studien im bakteriellen ISC-System von *A. vinelandii* wurde außerdem angeregt, dass bakterielles ISC-Ferredoxin Elektronen für die reduktive Kopplung zweier [2Fe-2S] Cluster zu einem [4Fe-4S] Cluster liefert (Chandramouli et al, 2007; Unciuleac et al, 2007). Das größte Problem bei der Klärung dieser Fragestellungen ist, dass bislang noch kein Interaktionspartner von Yah1 nachgewiesen werden konnte. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass Elektronentransferkomplexe normalerweise kurzlebig und instabil sind (Sevrioukova & Poulos, 2011), da der Prozess des Elektronentransfers sich im Zeitbereich von Milli- bis Mikrosekunden abspielt (Gray & Winkler, 2010).

Basierend auf den aktuellen Modellvorstellungen der eukaryotischen Fe/S-Cluster-Biogenese kommen hauptsächlich zwei Proteine als „Substrat“ in Frage: die Cysteindesulfurase Nfs1 (beziehungsweise der Desulfurasekomplex bestehend aus Nfs1 und Isd11) oder die Gerüstproteine

Isu1/Isu2. Um das mögliche Zielprotein für den Elektronentransfer zu bestimmen, wurde mittels Koimmunpräzipitation gezielt nach möglichen Interaktionspartnern von Yah1 gesucht. Es wurden Mitochondrien aus Hefezellen isoliert, die genomisch TAP-getaggtes Yah1 exprimierten (YAH1TAP Zellen). Die Mitochondrien wurden lysiert und das geklärte Lysat wurde mit  $\alpha$ -IgG Immunobeads immunpräzipitiert. Gebundene Proteine wurden durch Western-Blot und Immunfärbung nachgewiesen (**Abb. 4.26**).

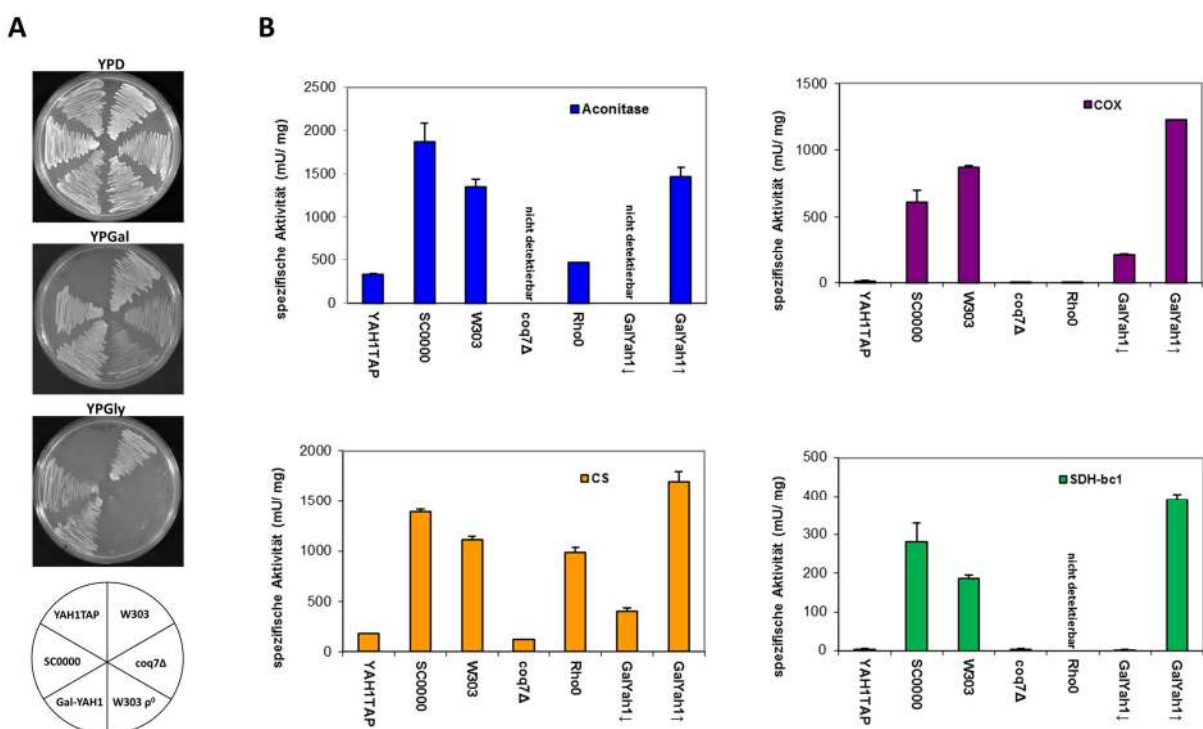


**Abbildung 4.26: Nachweis der Interaktion von Yah1 mit Isu1 *in vivo* durch Koimmunpräzipitation.** Mitochondrien wurden präpariert von den auf YPD gewachsenen (40 h) Hefestämmen YAH1TAP, IBA57TAP, GalYAH1 sowie dem Wild-Typ Stamm (Wt). Nach Lyse der Mitochondrien mit Detergens wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. An Immunobeads gebundene Proteine wurden durch SDS-PAGE voneinander getrennt und nach Western-Blot durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle für das eingesetzte Material wurden jeweils 30 µg TCA-präzipitierte Mitochondrien (Mitos) verwendet. **(A)** Koimmunpräzipitation mit  $\alpha$ -IgG Immunobeads. Links - Input, rechts - präzipitierte Proteine; gefärbt auf die Proteine Iba57, Yah1, Isu1, Yfh1, Isd11, Arh1 und Mge1 (Ladekontrolle). Der monoklonale Zweitantikörper ( $\alpha$ -Kaninchen, aus Maus) zeigt eine Kreuzreaktion mit den humanen Immunglobulinen der  $\alpha$ -IgG Immunobeads, deren leichte Kette auf Höhe des Yah1-Proteins in der SDS-PAGE wandert. Nfs1 wandert fast exakt auf Höhe von Yah1TAP und wurde daher indirekt über Isd11 nachgewiesen. **(B)** Koimmunpräzipitation mit  $\alpha$ -Yah1 Immunobeads. Links - Input, rechts - präzipitierte Proteine; gefärbt auf die Proteine Yah1 und Isu1.

Es wurde das präzipitierte Protein Yah1TAP gefunden und anschließend nach koimmunpräzipitierten Proteinen gesucht. Nfs1 wanderte fast identisch wie Yah1TAP und da der zur Verfügung stehende polyklonale Nfs1-Antikörper (aus Kaninchen) auch an den TAP-tag von Yah1TAP bindet, wurde Nfs1 indirekt über Isd11 nachgewiesen. Isd11 bindet stabil an Nfs1 und bildet mit der Desulfurase gemeinsam den eukaryotischen Desulfurasekomplex (Adam et al, 2006; Wiedemann et al, 2006). Da kein Isd11 präzipitiert wurde, bedeutete dies konsequenterweise, dass auch kein Nfs1 an Yah1TAP gebunden war. Es wurde ebenso kein Yfh1 gefunden, eine andere Kernkomponente der mitochondrialen ISC-Maschinerie (Gerber et al, 2003; Wang & Craig, 2008). Die

Ferredoxinoxidoreduktase Arh1 kopräzipitierte ebenfalls nicht mit Yah1. Der  $K_d$ -Wert für die *in vitro* Interaktion zwischen Adx und AdxR im homologen System aus Rind wurde abgeschätzt auf  $0,77 \mu\text{M}$  (Zollner et al, 2002). Trotzdem ist dieses Resultat nicht unerwartet, da Protein-Protein-Wechselwirkungen während Elektronentransferprozessen bekanntermaßen durch hohe Umsatzgeschwindigkeiten und kurze Lebensdauern gekennzeichnet sind (Ewen et al, 2011). Zum Beispiel musste für die Kokristallisation von Adx und AdxR der Komplex durch Quervernetzung kovalent miteinander verknüpft werden (Muller et al, 2001a). Interessanterweise wurde eine signifikante Koimmunpräzipitation des Gerüstproteins Isu1 beobachtet. Die Präzipitation war spezifisch, da das Signal weder in Kontrollreaktionen mit Mitochondrienlysaten von Wild-Typ Zellen noch in Zellen, die ein anderes TAP-getaggttes Protein (Iba57) exprimierten, gefunden wurde. Iba57 ist auch ein Teil der ISC-Maschinerie, spielt aber erst bei der Übertragung des Fe/S-Clusters von den Gerüstproteinen in spezielle [4Fe-4S] Cluster-tragende Zielproteine eine entscheidende Rolle und sollte daher nicht mit Yah1, Isu1 oder Nfs1 interagieren. Da zuvor keine Interaktion von Isu1 mit Yah1 gefunden wurde (Gerber et al, 2003), wurde eine Koimmunpräzipitation mit  $\alpha$ -Yah1 Immunobeads und Mitochondrienlysaten von Wild-Typ Zellen sowie Yah1 depletierten Gal-YAH1 Zellen durchgeführt (**Abb. 4.26B**). In Übereinstimmung mit dem Ergebnis von Gerber und Kollegen wurde keine Koimmunpräzipitation von nicht-getaggttem Yah1 und Isu1 gefunden.

Der TAP-Tag in YAH1TAP Zellen befindet sich am C-Terminus des Yah1 Proteins. Bereits zuvor wurde beobachtet, dass Manipulationen am C-Terminus, wie zum Beispiel die Entfernung der letzten zehn Aminosäuren, zu einem Wachstumsdefekt unter respiratorischen Bedingungen führten (**Abb. 4.19**). Aus diesem Grund wurde das Wachstumsverhalten der YAH1TAP Zellen auf verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht (**Abb. 4.27A**).



**Abbildung 4.27 (Seite 106): Der C-terminale TAP-tag stört die Funktion von Yah1 unter respiratorischen Bedingungen. (A)**

Das Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glukose - YPD, Galaktose - YPGal, Glycerol - YPGly) wurde für zwei Tage bei 30 °C getestet. Verwendet wurden folgende Hefestämme: YAH1TAP, SCOOOO (Hintergrundstamm von YAH1TAP), Gal-YAH1, W303  $\rho^0$ , *coq7Δ* und W303. **(B)** Mitochondrien wurden aus den Hefestämmen von (A) nach Wachstum in YPD Medium (40 h) isoliert. Da dies für den Gal-YAH1 Stamm Depletionsbedingungen waren (GalYah1↓), wurden aus diesen Zellen außerdem Mitochondrien von Expressionsbedingungen hergestellt (YPGal Medium, 40 h, GalYah1↑). Die Enzymaktivitäten folgender Enzyme wurden in den Mitochondrien gemessen: Aconitase, Cytochrom c Oxidase (COX), Succinat-Dehydrogenase gekoppelt mit Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplex (SDH-*bc<sub>1</sub>*) und Citrat-Synthase (CS).

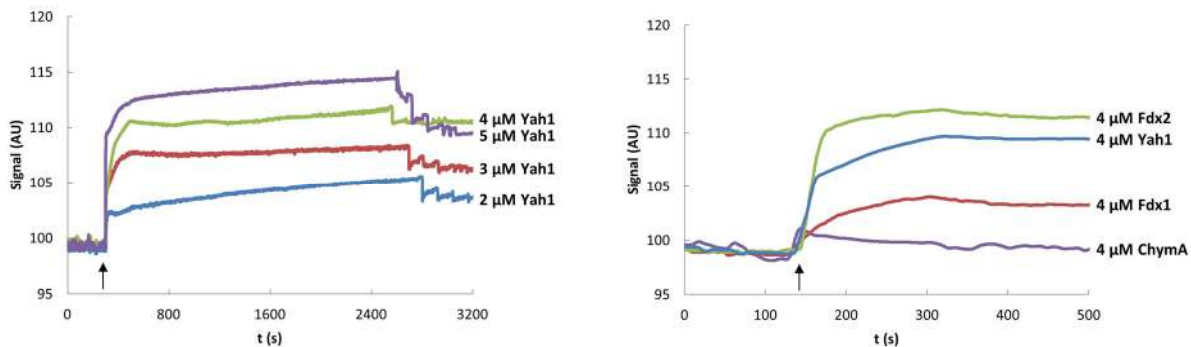
Erstaunlicherweise wuchsen die Zellen tatsächlich nur unter fermentativen Bedingungen auf YPD. Hingegen war auf den respiratorischen Kohlenstoffquellen Galaktose (YPGal) und Glycerol (YPGly) kein Wachstum zu beobachten. Der Effekt war sogar stärker als für Hefezellen ohne mitochondriale DNA (W303  $\rho^0$ / *rho0*) oder als für Hefezellen, die kein Koenzym Q<sub>6</sub> mehr herstellen können (*coq7Δ*). Diese beiden Hefestämme zeigten ein deutlich schlechteres Wachstum auf YPGal und auf YPGly überhaupt kein Wachstum mehr. Der Phänotyp der YAH1TAP Zellen ähnelt damit stark dem von Fdx2 komplementierten Gal-YAH1 Zellen (siehe **Abb. 4.7**). Bei der Analyse der Enzymaktivitäten von aus YAH1TAP Zellen präparierten Mitochondrien wurde festgestellt, dass die Aktivität des Fe/S-Proteins Aconitase in ähnlicher Weise reduziert ist wie in W303  $\rho^0$  Mitochondrien. Die Aktivitäten des Atmungskettenkomplexes IV (Cytochrom c Oxidase, COX) und die Aktivität der gekoppelten Atmungskettenkomplexe II und III (Succinat-Dehydrogenase - Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplex, SDH-*bc<sub>1</sub>*) war nahezu komplett verschwunden. Der Verlust der Atmungskettenkomplexe trat auch in den *coq7Δ* Mitochondrien sowie den W303  $\rho^0$  Mitochondrien auf. Außerdem war die Aktivität der Citrat-Synthase (CS) in den Mitochondrien der YAH1TAP und *coq7Δ* Zellen deutlich reduziert. Die gleiche Beobachtung wurde auch gemacht für Gal-YAH1 Zellen, die für 40 h depletiert wurden.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der C-terminale TAP-tag die Funktion von Yah1 unter respiratorischen Bedingungen klar beeinträchtigte. Ob dies auf nicht mehr funktionierende Koenzym Q<sub>6</sub> Biosynthese, eine Fehlfunktion der Häm A Biogenese oder etwa auf beides zusammen zurückzuführen ist, lässt sich aus den Ergebnissen nicht feststellen. Die Fe/S-Proteinbiogenese scheint von getagtem Yah1 jedenfalls noch unterstützt werden zu können.

**4.4.2. Nachweis der Yah1-Isu1 Interaktion *in vitro***

Die zuvor beschriebene *in vivo* Interaktion zwischen Yah1 und Isu1 sollte durch *in vitro* Experimente verifiziert werden. Zunächst wurde die Technik der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) angewendet und His<sub>6</sub>-getagtes Isu1 an einen *in situ* aktivierten Biosensor-Chip gebunden. Es konnte eine konzentrationsabhängige Bindung und Dissoziation von Yah1 an das gebundene Isu1 beobachtet werden (**Abb. 4.28**). Zum Vergleich wurde die Bindung von humanem Fdx1 und Fdx2 an Isu1 aus Hefe getestet. Isu1 ist 71 % identisch und 81 % ähnlich zum humanem

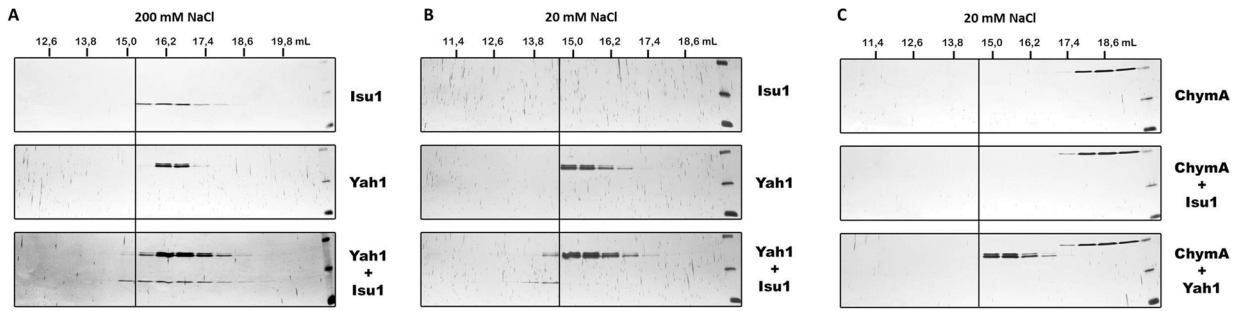
Homologen IscU. Fdx2 bindet an das Hefeprotein Isu1, sogar etwas stärker als Yah1 aus Hefe. Interessanterweise bindet auch Fdx1 an Isu1, zwar erheblich schlechter als Yah1 aber auch deutlich besser als die Negativkontrolle Chymotrypsinogen A (ChymA).



**Abbildung 4.28: Nachweis der Isu1-Yah1 Interaktion *in vitro* durch SPR. (A)** Die Bindung und Dissoziation von Yah1 an immobilisiertes Isu1 *in vitro* ist konzentrationsabhängig. Gereinigtes His<sub>6</sub>-getaggttes Isu1 Protein wurde an die Co<sup>2+</sup>-aktivierte Oberfläche eines goldbeschichteten Glasprismas gebunden (~100 AU). Zu dem mit dem Pfeil markiertem Zeitpunkt erfolgte Zugabe von Yah1 Protein mit der angegebenen Endkonzentration. Die Dissoziation wurde erreicht durch schrittweises Verdünnen der Proteinlösung. **(B)** Unter den gleichen Bedingungen wie in (A) wurde die Bindung von je 4 µM Fdx1, Fdx2, Yah1 oder Chymotrypsinogen A (Chym A) an Isu1 getestet. Alle Proteine befanden sich im gleichen Puffer bestehend aus 25mM Tris-HCl pH 7,5 und 50 mM NaCl. Durchgeführt wurden die Messungen an einem Plasmonic® SPR device .

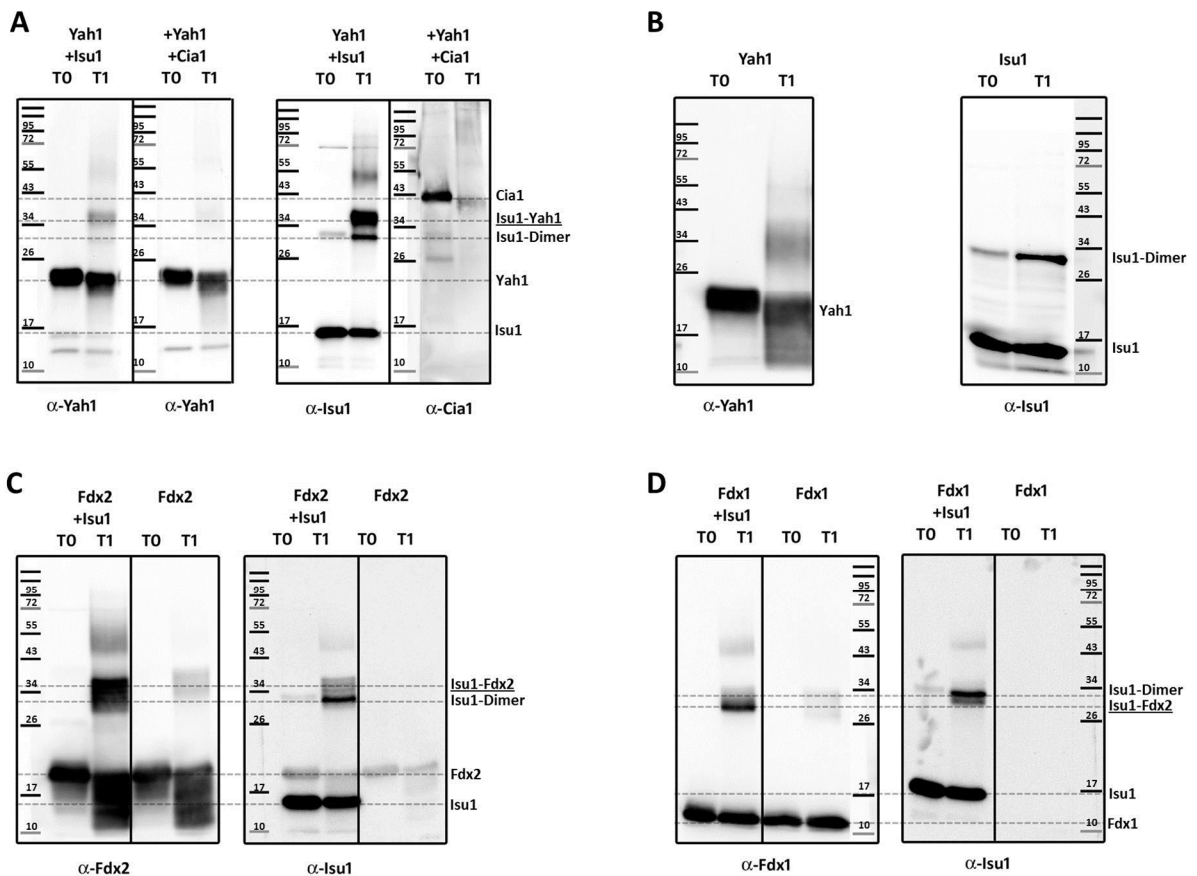
Als weiterer Nachweis der Yah1-Isu1 Interaktion wurde die Größenausschlusschromatographie (SEC) bei verschiedenen Ionenstärken angewendet. Das Elutionsverhalten der einzelnen, gereinigten Proteine Isu1 (His<sub>6</sub>-getaggt), Yah1 und der Mischung beider Proteine wurde verglichen. Bei der physiologischen Natriumchloridkonzentration von 200 mM wurde festgestellt, dass die beiden Proteine in der Mischung bei kleineren Elutionsvolumina von der SEC-Säule eluieren als die einzelnen Proteine (**Abb. 4.29A**). Die SPR-Messungen waren bei geringerer Ionenstärke (50 mM NaCl) durchgeführt worden, da ionische Wechselwirkungen wie bei Adx-AdxR (Ewen et al, 2011) erwartet wurden und diese bei geringer Ionenstärke verstärkt sein sollten. Daher wurde das Chromatographie-Experiment bei 20 mM NaCl Konzentration wiederholt. Dabei wurde beobachtet, dass Isu1 bei dieser geringen Ionenstärke mit der Gelfiltrationsmatrix interagiert und auf der SEC-Säule ausfällt. Eluiert werden konnte Isu1 unter diesen Bedingungen denaturierend mit 0,5 M Natriumhydroxid. Das gleiche Phänomen trat selbst noch bei 100 mM NaCl Konzentration auf. Bei der gemeinsamen SEC von Yah1 und Isu1 bei 20 mM NaCl zeigte sich allerdings, dass ein Teil des Isu1 Proteins löslich war. Es scheint daher von Yah1 solubilisiert zu werden. In Folge der Komplexbildung von Yah1-Isu1 entsteht offensichtlich als Subpopulation ein Komplex, der bei größerer molarer Masse als das dimere Yah1 eluiert (**Abb. 4.29B**). Der Solubilisierungseffekt war spezifisch für Yah1 und wurde nicht mit dem Kontrollprotein Chymotrypsinogen A (ChymA) beobachtet, das auch das Elutionsverhalten von Yah1 nicht beeinflusste.





**Abbildung 4.29: Nachweis der Isu1-Yah1 Interaktion *in vitro* durch Größenausschlusschromatographie.** Das Experiment wurde mit der SEC-Säule Superdex 200 10/300 GL (*GE Healthcare*) in Puffer bestehend aus 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 200 mM NaCl (A) beziehungsweise 20 mM NaCl (B, C) durchgeführt. Eingesetzt wurden jeweils 100 µL Protein (25 µM), entweder allein oder gemischt wie angegeben. Fraktionen von 0,6 mL Volumen wurden gesammelt und auf Proteingehalt mittels SDS-PAGE sowie anschließende Silberfärbung überprüft. Das Elutionsvolumen ist oberhalb der SDS-PAGE Gele angegeben.

Schließlich wurden für den Nachweis der Isu1-Yah1 Interaktion Quervernetzungsexperimente mit dem Nulllängenquervernetzer EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl)carbodiimid) durchgeführt (**Abb. 4.30**). Gereinigte Proteine wurden gemeinsam oder allein in Puffer mit EDC versetzt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion mit Ammoniumacetat wurde die Proteinprobe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Verglichen wurde die Reaktion mit nicht EDC-behandelten Referenzproben.



**Abbildung 4.30 (Seite 109): Nachweis der Isu1-Yah1 Interaktion *in vitro* durch Quervernetzung mit EDC.** Jeweils 50  $\mu$ M gereinigtes Protein wurden allein oder gemischt miteinander in Puffer mit 10 mM MES pH 6,5 und 100 mM NaCl inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte vor der Quervernetzung (T0), und nach Zugabe von 8 mM EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl)carbodiimid) und Inkubation für eine Stunde auf Eis (T1). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM Ammoniumacetat gestoppt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE voneinander getrennt und mit Hilfe spezifischer Antikörper nach Western-Blot nachgewiesen. **(A)** Mischung von Isu1 mit Yah1 sowie Isu1 mit Cia1 als Negativkontrolle. Die Proben wurden mit den Antikörpern gegen Yah1 ( $\alpha$ -Yah1), Isu1 ( $\alpha$ -Isu1) und Cia1 ( $\alpha$ -Cia1) gefärbt. **(B)** Kontrollreaktionen der Quervernetzung von Yah1 und Isu1 jeweils separat. **(C), (D)** Quervernetzungsexperiment von Isu1 mit humanem Fdx2 (C), beziehungsweise humanem Fdx1 (D); gefärbt mit den Antikörpern gegen Isu1 ( $\alpha$ -Isu1), Fdx2 ( $\alpha$ -Fdx2) und Fdx1 ( $\alpha$ -Fdx1).

In der Mischung von Yah1 und Isu1 wurde eine deutliche Quervernetzung beobachtet. Diese Quervernetzung trat nicht auf bei der Mischung von Yah1 mit Cia1, einem Protein der CIA-Maschinerie, mit dem Yah1 nicht interagieren sollte und das daher als Negativkontrolle diente. Neben der Quervernetzung von Yah1-Isu1 wurde außerdem dimeres Isu1 gefunden, welches auch bei der Reaktion von Isu1 allein mit EDC auftrat. Die Bildung eines Dimeren ist für bakterielles IscU bekannt (Agar et al, 2000b). Schließlich wurde getestet, ob die Quervernetzung auch mit den humanen Ferredoxinen Fdx1 und Fdx2 auftrat und es wurde in der Tat mit beiden Ferredoxinen eine Quervernetzung mit Isu1 gefunden. Eine Unterscheidung hinsichtlich Spezifität zwischen Fdx1 und Fdx2 konnte somit mit diesem Experiment überraschenderweise nicht gefunden werden.

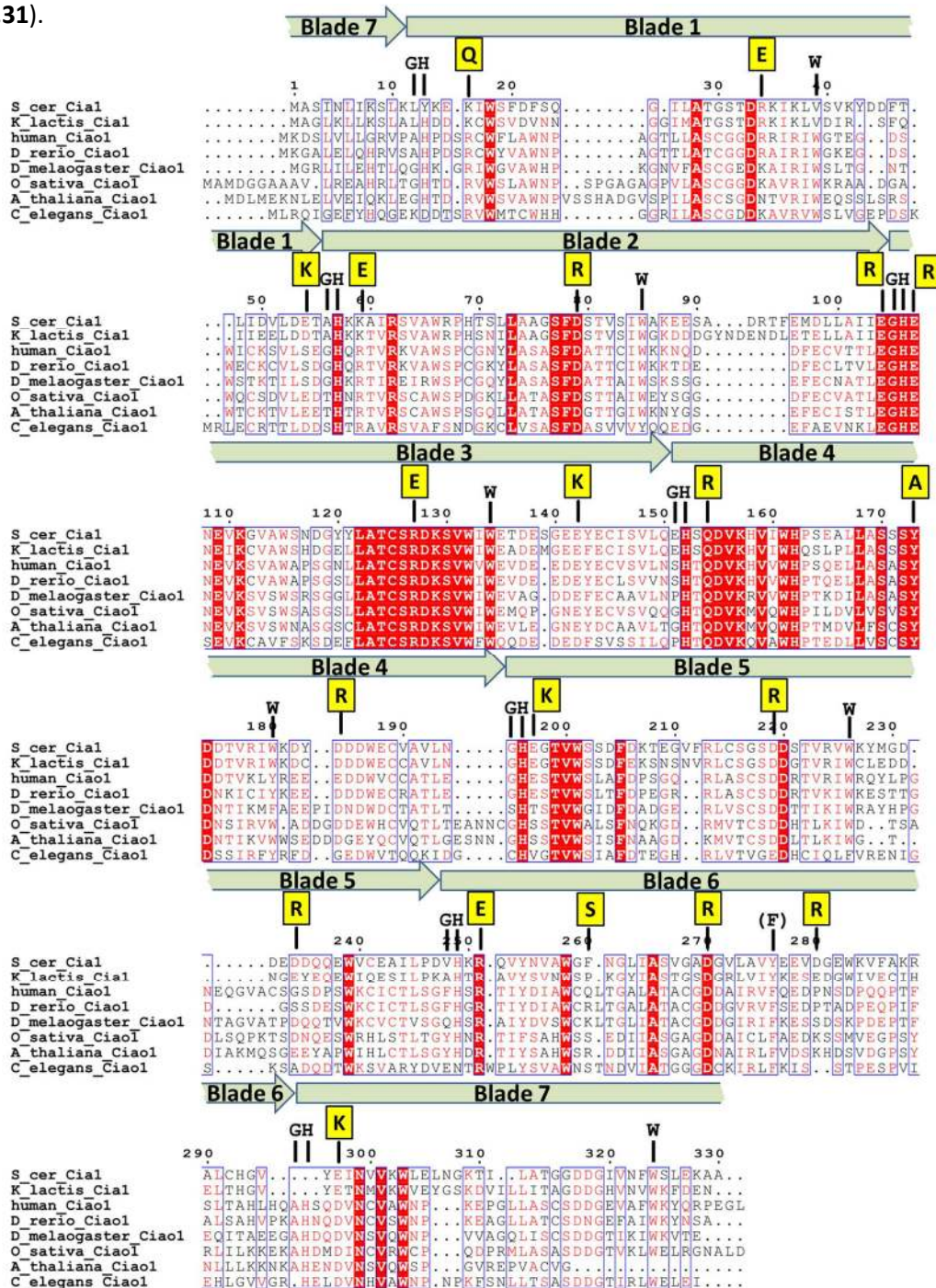
Zusammenfassend konnte mit diesen drei verschiedenen experimentellen Ansätzen auch *in vitro* die Interaktion von Isu1 und Yah1 überzeugend nachgewiesen werden.

### 4.5. Kartierung der Interaktionsstelle für Nar1 auf dem WD-Repeat Protein

#### Cia1

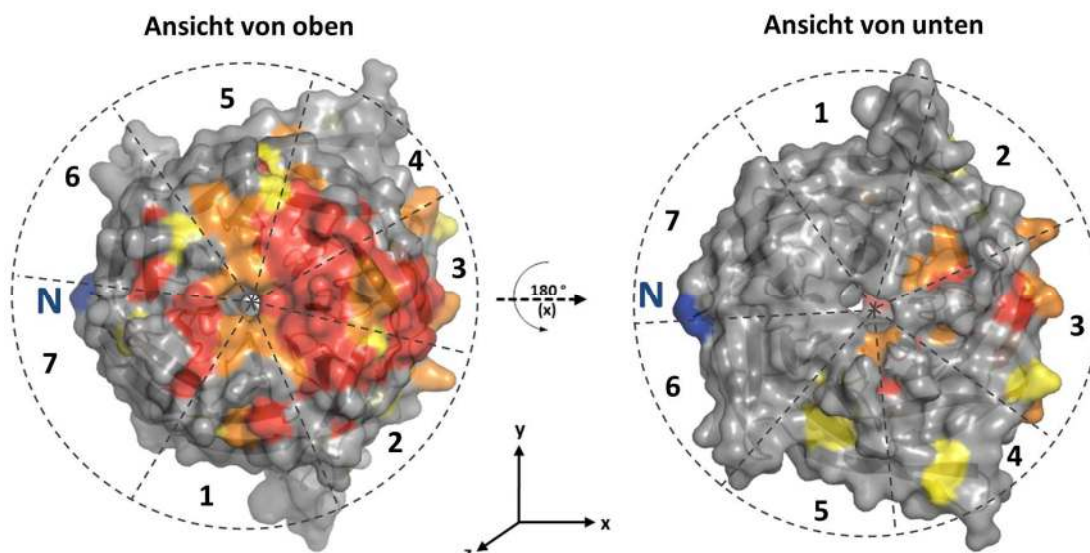
##### 4.5.1. Konservierte Oberflächenreste kommen gehäuft auf der Oberseite von Cia1 vor

Das Protein Cia1 ist ein essentieller Teil der zytosolischen CIA-Maschinerie und beteiligt am Transfer eines assemblierten Fe/S-Clusters in Zielproteine (Balk et al, 2005). Es gehört zur Proteinfamilie der WD-Repeat Proteine und enthält sieben sogenannte WD-Repeats (Smith et al, 1999). Diese Wiederholungseinheiten enthalten typischerweise das GH-Dipeptid 11 - 24 Reste nach dem N-Terminus und das WD-Dipeptid am C-Terminus, wobei beide Charakteristika nicht streng konserviert sind. Im Fall von Cia1 wird die stärkste Konservierung in den WD-Repeats drei und vier gefunden (Abb. 4.31).



**Abbildung 4.31 (Seite 111): Cia1 Proteine sind in den Propellerblättern (Blade) 2 und 3 am stärksten konserviert.** Multi-Sequenzalignment von Cia1 Proteinen aus *S. cerevisiae* (Q05583), *K. lactis* (Q6CMA2), *Homo sapiens* (O76071), *Danio rerio* (Q6P0D9), *Drosophila melanogaster* (Q7K1Y4), *Oryza sativa* (Q6YVM7), *Arabidopsis thaliana* (Q2V422) und *C. elegans* (Q9XW12). Die nicht streng konservierten Charakteristika GH-Dipeptid und W des WD-Dipeptids sind markiert. Identische Reste sind mit roten Kästen unterlegt, konservierte Reste sind mit roten Buchstaben und Lücken durch Punkte dargestellt. Mit gelben Kästen sind die im Verlauf dieser Arbeit mutierten Reste markiert (siehe Kapitel 4.5.2 und 4.5.3). Die sieben strukturellen Wiederholungseinheiten (Propellerblätter/ Blades) sind mit Pfeilen angegeben. Das Alignment wurde erstellt mit MultAlign (Corpet, 1988) und bearbeitet EPrint (Gouet et al, 1999). In Klammern stehen die Protein-IDs laut UniProt-Datenbank.

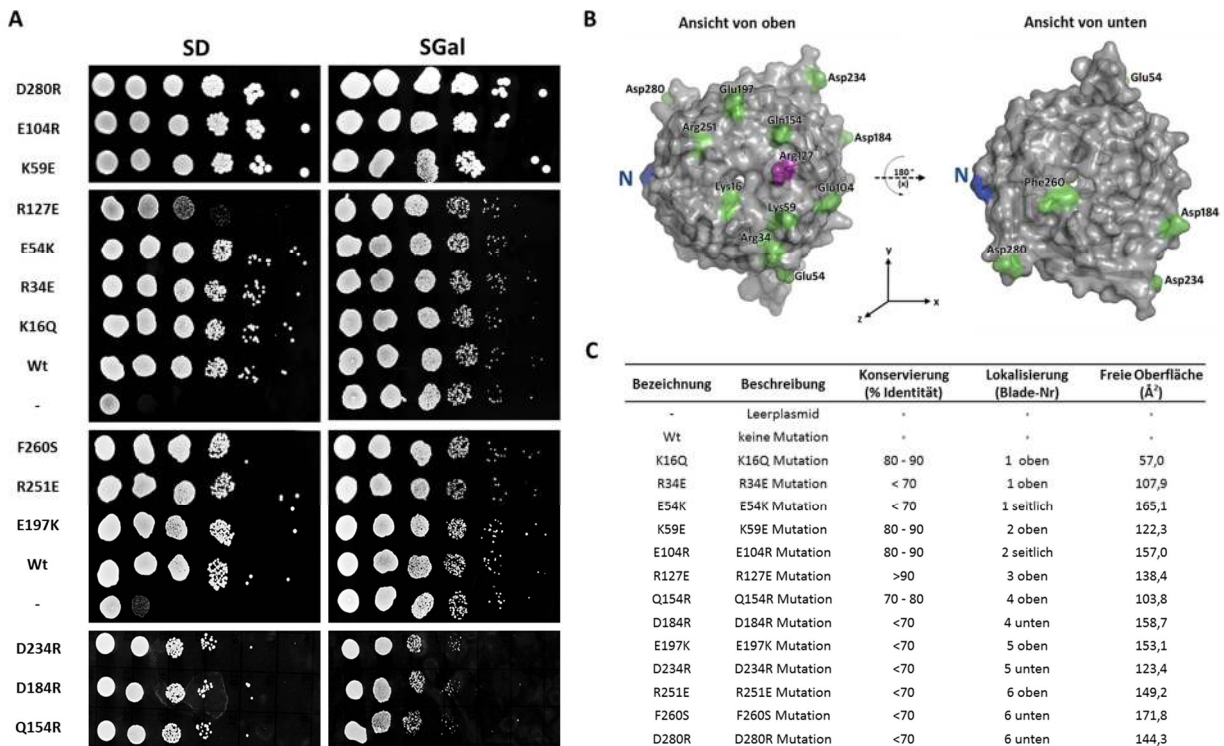
Auch wenn die Wiederholungseinheiten in der Primärstruktur nicht streng konserviert sind, so zeigt Cia1 doch die erwartete, typische  $\beta$ -Propeller Struktur mit sieben strukturellen Wiederholungseinheiten (Srinivasan et al, 2007). Diese Propellerblätter sind nicht identisch mit den WD-Repeats, sondern setzen sich aus drei  $\beta$ -Strängen eines WD-Repeats und einem  $\beta$ -Strang des darauffolgenden WD-Repeats zusammen. Daher beginnen sie unmittelbar mit dem GH-Dipeptid in der DA-Schleife. Diese Gliederung führt zum „Velcro-Typ“ (Klettverschluss-Typ) Ringschluss des  $\beta$ -Propellers. Die Funktion von Cia1 in der CIA-Maschinerie besteht in der Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, die typische Funktion von WD-Repeat Proteinen: Cia1 interagiert mit Nar1 (Balk et al, 2005), weitere Interaktionen sind in Hochdurchsatzstudien gefunden worden (Gavin et al, 2006; Krogan et al, 2006) und auch schon gezielt nachgewiesen worden. So interagiert Cia1 auch mit den beiden Proteinen Met18 und Cia2 (J. Mascarenhas, persönliche Mitteilung). Da Cia1 nur aus einer WD-Repeat-Domäne besteht, müssen die Interaktionsstellen unmittelbar auf dem  $\beta$ -Propeller oder in den Schleifen zwischen den  $\beta$ -Strängen des Proteins liegen. Aufgrund der Ähnlichkeit des Prozesses der Fe/S-Cluster-Biogenese in Eukaryoten wurde eine Konservierung funktionell wichtiger Reste erwartet. Die Bestimmung der Kristallstruktur von Cia1 aus *S. cerevisiae* (Srinivasan et al, 2007) erlaubte die strukturbasierte Analyse von konservierten Resten mittels des Webservers ConSurf (Landau et al, 2005). Diese Analyse zeigte deutlich eine Häufung von konservierten Resten auf der Oberseite des Cia1 Proteins sowie seitlich an den Propellerblättern zwei und drei (**Abb. 4.32**).



**Abbildung 4.32 (Seite 112): Oberflächenkonservierung von Cia1 kommt hauptsächlich auf der Proteinoberseite vor.** Darstellung der Konservierung von Aminosäuren in Cia1 Protein in der Ansicht von oben (links) und von unten (rechts). Insgesamt 68 Cia1 Sequenzen aus der Uniprot-Datenbank wurden mit ClustalW2 (Chenna et al, 2003) verglichen und anschließend wurde mit dem Programm ConSurf der Grad der Konservierung berechnet (Landau et al, 2005). Rot, orange und gelb markiert sind Aminosäuren mit einem Konservierungswert von 9, 8 und 7 nach ConSurf, wobei die Skala von 1 (variabel) bis 9 (streng konserviert) reicht. Zur besseren Übersicht sind der N-Terminus in blau sowie die Propellerblätter als Kreissektoren dargestellt. Die Ansicht von oben ist von der Seite der DA-Schlaufen und BC-Schlaufen, die Ansicht von unten von der Seite der AB-Schlaufen sowie der CD-Schlaufen.

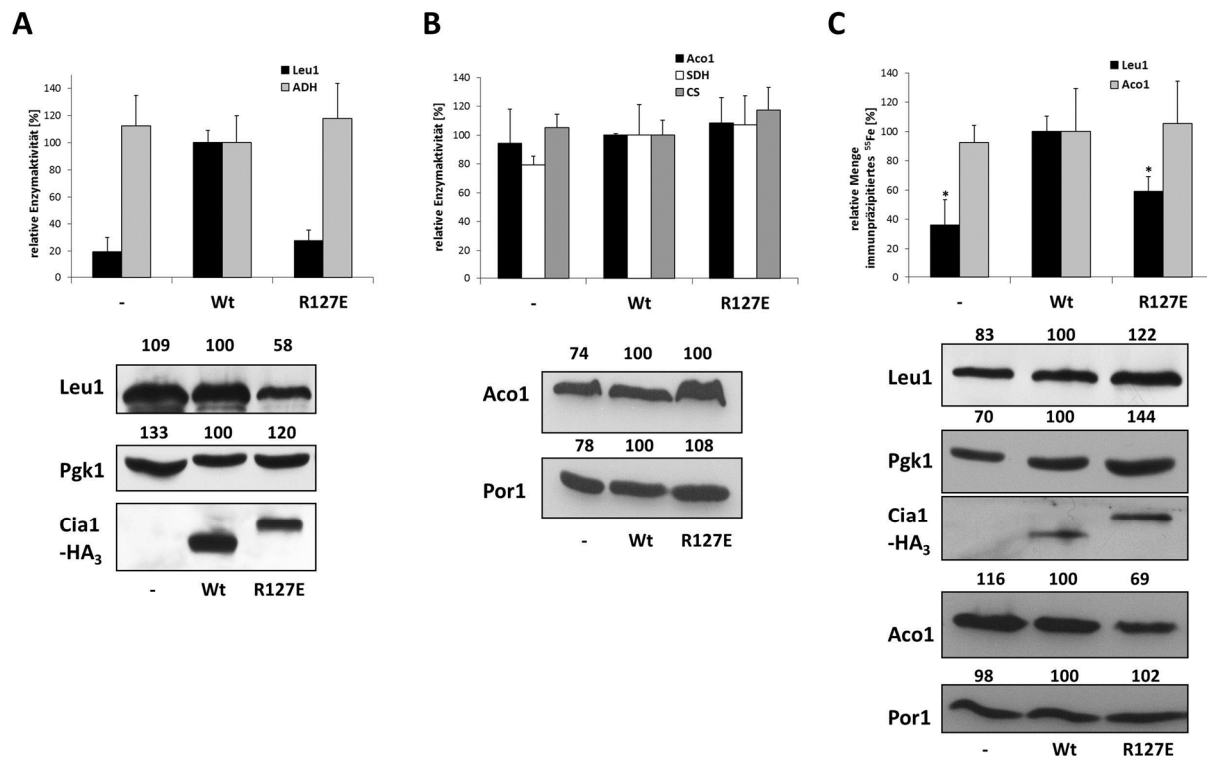
#### 4.5.2. Arginin 127 ist wichtig für die Funktion von Cia1 in der CIA-Maschinerie

Zur funktionellen Analyse von Cia1 wurde eine Mutagenese des Cia1 durchgeführt. Dabei sollten Aminosäuren identifiziert werden, die für die Wechselwirkung von Cia1 mit den verschiedenen Interaktionspartnern verantwortlich sind. Zunächst wurde berücksichtigt, dass Aminosäuren an der Oberfläche liegen müssen, um mit Partnerproteinen interagieren zu können. Ein Maß hierfür ist die sogenannte „freie Oberfläche“ eines Restes, die mit Hilfe des CCP4-Programmpaketes berechnet wurde (CCP4, 1994). Weiterhin wurde auf die zuvor beschriebene strukturbasierte Analyse der Konservierung von Resten an der Oberfläche des Cia1 Proteins zurückgegriffen. Reste, die für die strukturelle Integrität des Cia1 Proteins verantwortlich sind, spielen indirekt natürlich auch eine wichtige Rolle für die Funktion des Proteins, sind aber nicht notwendigerweise für die direkte Wechselwirkungen mit Partnern verantwortlich. Aus diesem Grund wurden für die Mutagenese konservierte Aminosäuren mit großer freier Oberfläche aus den Schlaufenbereichen ausgewählt, die nicht für die stabile Faltung des  $\beta$ -Propellers verantwortlich sein sollten. Wenn möglich wurde die Ladung der Aminosäuren umgekehrt, um eine möglichst große chemische Änderung an der Proteinoberfläche zu erreichen, ohne dabei die Löslichkeit des Proteins zu verringern. Der Effekt der jeweiligen Aminosäureaustausche wurde durch Komplementation von Cia1-depletierten Gal-CIA1 Zellen mit Plasmid-Versionen von mutiertem *CIA1* getestet. Gal-CIA1 Zellen enthalten das *CIA1* Gen unter der Kontrolle des Galaktose-induzierbaren und Glukose-reprimierbaren *GAL1-10* Promotors. Aufgrund des essentiellen Charakters des *CIA1* Gens zeigen Gal-CIA1 Zellen einen Wachstumsdefekt bei Kultivierung auf Glukose-haltigem Medium, wie zum Beispiel SD-Medium (Balk et al, 2005). Dieser Defekt ist vollständig komplementierbar durch Expression einer Plasmid-Version von *CIA1*. Die meisten der getesteten Punktmutationen zeigten keinen Effekt auf die Komplementation der Gal-CIA1 Zellen (**Abb. 4. 33**). Die entsprechenden Reste spielten demnach keine kritische Rolle für die Funktion des Cia1 Proteins. Im Gegensatz dazu komplementiert Cia1 mit der Mutation R127E nur noch partiell den Wachstumsdefekt. Dieses Ergebnis legt nahe, dass der mitten im konservierten Bereich auf der Oberseite von Propellerblatt 3 gelegene Rest Arginin 127 eine wichtige Rolle für die Funktion von Cia1 spielt.



**Abbildung 4.33: Arg 127 ist wichtig für die *in vivo* Funktion von Cia1.** (A) Gal-CIA1 Zellen mit regulierbarer Expression des endogenen CIA1 Gens wurden mit dem Plasmid p416 mit entweder keinem Gen (-), dem nicht-mutierten HA<sub>3</sub>-getagtem CIA1 Gen (Wt) oder den entsprechenden Punktmutanten des CIA1 Gens transformiert. Die Zellen wurden insgesamt sieben Tage auf SD-Agarplatten kultiviert. Die Cia1-depletierten Zellen wurden mit Wasser gewaschen. Eine serielle Verdünnung von jeweils 1:10 mit einer OD<sub>600nm</sub> von 1,5 als Anfangswert wurde von links nach rechts auf frische Agarplatten mit Galaktose (SGal) oder Glukose (SD) als Kohlenstoffquelle aufgebracht und die Platten für drei Tage bei 30 °C inkubiert. (B) Die mutierten Reste sind in der Struktur von Cia1 grün dargestellt. Die Anordnung des Cia1-Proteins ist wie in Abb. 4.32. Arginin 127 ist in magenta und der N-Terminus in blau dargestellt. (C) Übersicht über die getesteten Punktmutationen. Die Konservierung der Reste ist in Prozentbereiche gegliedert. Außerdem sind die Lokalisierung in der Struktur sowie die aus der Struktur berechnete freie Oberfläche angegeben.

Um die biochemischen Konsequenzen der Mutation von Arginin 127 zu überprüfen, wurden die Enzymaktivitäten einiger Reporterenzyme gemessen. Die Aktivität des zytosolischen Fe/S-Proteins Isopropylmalat-Isomerase (Leu1) war in Cia1 depletierten Gal-CIA1 Zellen nach Wachstum auf glukosehaltigem Medium für 36 h auf 28 % verringert, wohingegen die Aktivität der mitochondrialen Fe/S-Proteine Aconitase (Aco1) und Succinat-Dehydrogenase (SDH) auf Wild-Typ Niveau blieben (**Abb. 4.34A**). Die Aktivität der beiden Kontrollenzyme ohne Fe/S-Cluster, Alkoholdehydrogenase (ADH, zytosolisch) und Citrat-Synthase (CS, mitochondrial), blieb ebenfalls unverändert. Quantitative Immunfärbung zeigte, dass der Gehalt an Leu1-Protein in der Mutante R127E leicht verringert war, aber viel weniger als die Enzymaktivität. Der Gehalt der anderen getesteten Enzyme war nicht signifikant verändert (**Abb. 4.34B**).



**Abbildung 4.34: Arg 127 in Cia1 ist wichtig für die zytosolische Fe/S-Cluster-Biogenese.** (A) Gal-CIA1 Zellen wurden mit dem Plasmid p416 mit entweder keinem Gen (-), dem nicht-mutierten CIA1-HA<sub>3</sub> Gen (Wt) oder dem mutierten R127E CIA1-HA<sub>3</sub> Gen (R127E) transformiert. Die Zellen wurden in Minimalmedium mit Glukose als Kohlenstoffquelle für 36 h kultiviert. Es wurde ein Hefegesamtzellextrakt mittels Glasperlen präpariert und dieser zur Messung der Enzymaktivitäten der zytosolischen Enzyme Isopropylmalat-Isomerase (Leu1) und Alkoholdehydrogenase (ADH) verwendet. Dargestellt sind die relativen Enzymaktivitäten normiert auf Wt. Der untere Teil zeigt Immunfärbungen der Proteinmengen von Leu1, Phosphoglyceratkinase (Pgc1, zytosolische Ladekontrolle) sowie Cia1 (gefärbt über den HA<sub>3</sub>-Tag). Die relativen Proteinmengen wurden densitometrisch bestimmt und sind oberhalb der Western-Blots angegeben. Das mutierte Cia1-R127E Protein wandert langsamer in der SDS-PAGE, vermutlich ein Effekt der Ladungsumkehr. (B) Mitochondrien wurden aus den unter (A) beschriebenen Zellen isoliert. In diesen Mitochondrien wurden die relativen Enzymaktivitäten der mitochondrialen Enzyme Aconitase (Aco1), Succinat-Dehydrogenase (SDH) und Citrat-Synthase (CS) bestimmt. Außerdem erfolgte Immunfärbung und densitometrische Quantifizierung der Proteinmengen von Aco1 und Porin (Por1) als Ladekontrolle. (C) Die *de novo* Assemblierung der Fe/S-Cluster in die Enzyme Aco1 und Leu1 wurde mit Hilfe der Markierung mit radioaktiven <sup>55</sup>Fe überprüft. Gal-CIA1 Zellen wie unter (A) beschrieben wurden in Glukose-haltigem Minimalmedium für 24 h kultiviert. Die Kultivierung wurde für 12 h in Eisen-freiem Minimalmedium mit Glukose fortgesetzt. Danach erfolgte die Markierung der Zellen mit radioaktivem <sup>55</sup>Fe für 2 h. Hefegesamtzellextrakte wurden hergestellt und Leu1 und Aco1 mit entsprechenden, spezifischen Immunobeads präzipitiert. Durch Szintillationszählung wurde die präzipitierte Radioaktivität bestimmt und Immunfärbung sowie densitometrische Analyse wurden zur Bestimmung der Proteingehalte wie zuvor verwendet. (A) bis (C) Alle Experimente wurden zwischen drei- und achtmal wiederholt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, \* bedeutet p>95%.

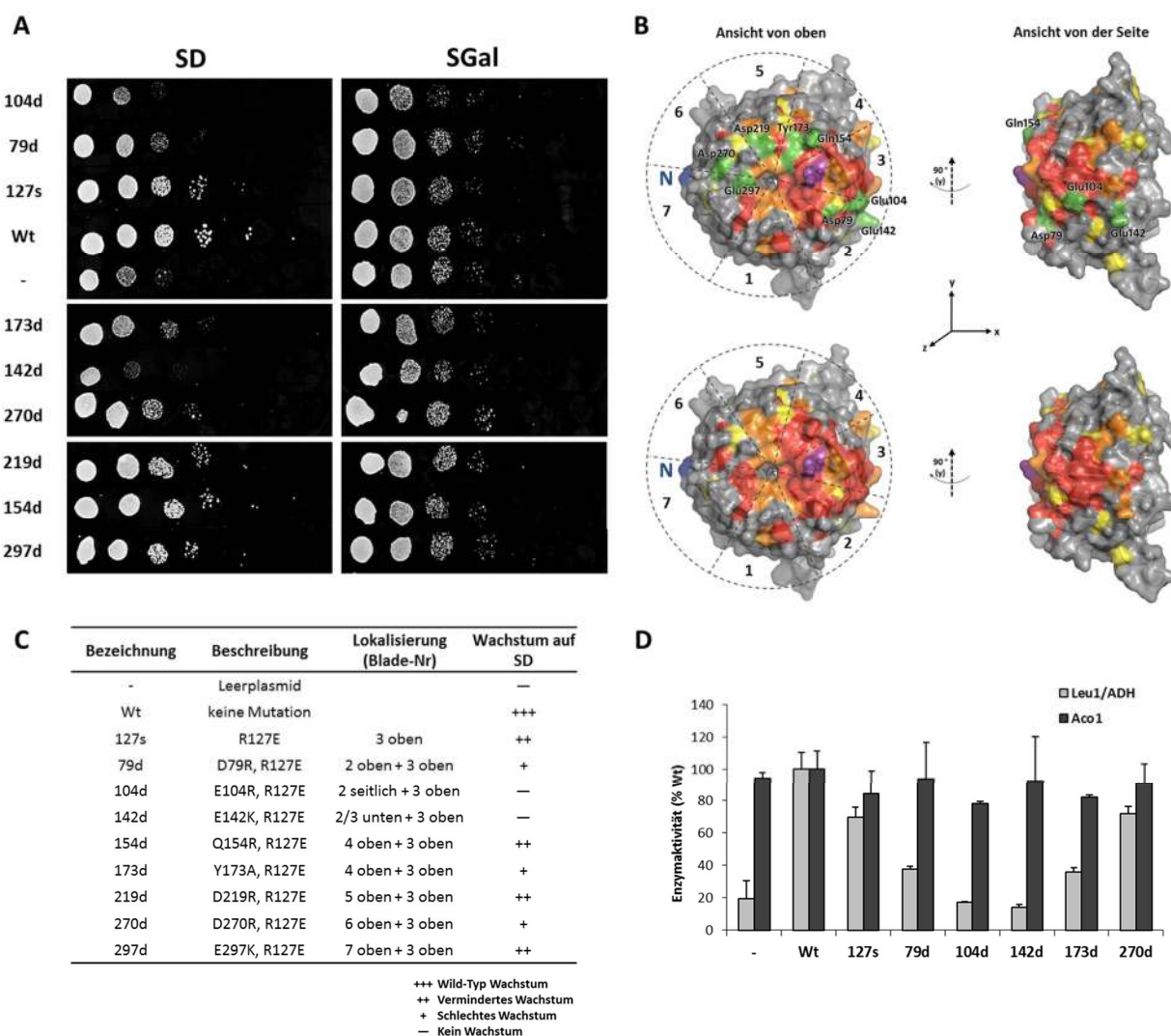
Zur weiteren Analyse der R127E Mutation wurden radioaktive Markierungsexperimente durchgeführt, um die *de novo* Fe/S-Cluster-Assemblierung in Leu1 und Aco1 zu analysieren (Kispal et al, 1999). In diesen Experimenten werden Hefezellen unter niedrigen Eisenkonzentrationen kultiviert und dann mit radioaktivem <sup>55</sup>Fe markiert. Nach Präparation eines Gesamtzellextraktes wurde die

spezifische Immunpräzipitation von Leu1 und Aco1 durchgeführt und die präzipitierte Radioaktivität durch Szintillationszählung quantifiziert (**Abb. 4.34C**). Der Einbau von  $^{55}\text{Fe}$  in Leu1 war signifikant (um ca. 40 %) verringert in der Mutante R127E im Vergleich zum Wild-Typ-Protein. Im Gegensatz dazu war der Einbau des radioaktiven Eisens in das mitochondriale Fe/S-Protein Aco1 nicht verändert. Beide Resultate unterstützen die Messungen der Enzymaktivitäten von Leu1 und Aco1.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass die Mutation von Arginin 127 einen spezifischen funktionellen Defekt des CIA-Proteins Cia1 bewirkte. Der spezifische Effekt auf die zytosolische Fe/S-Cluster-Biogenese ist jedoch nur partiell, und das mutierte Protein behält eine deutliche Restaktivität. Daher scheint Arginin 127 zwar wichtig, aber nicht essentiell für die Funktion von Cia1 zu sein.

#### 4.5.3. Für die Nar1 Bindung wichtige Reste liegen auf der Oberseite und seitlich an Propellerblatt 3 des Cia1

Da die Mutation von Arginin 127 allein nur einen partiellen Effekt auf die Fe/S-Cluster Biogenese hatte, wurde versucht durch Kombination der Mutation R127E mit weiteren Aminosäureaustauschen einen stärkeren Phänotyp zu erzeugen. Verwendet wurden hierzu konservierte Oberflächenreste, vorzugsweise auf der Oberseite und seitlich an Propellerblatt zwei und drei des Cia1 (**Abb. 4.35**).



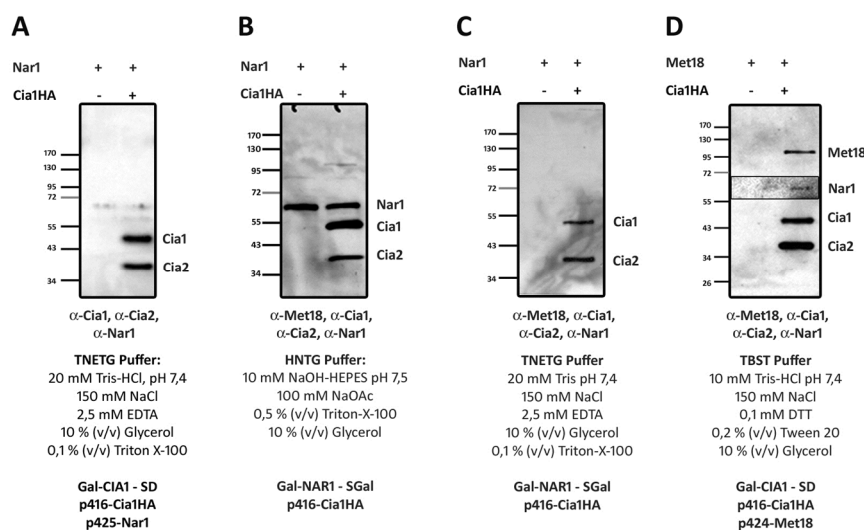


**Abbildung 4.35 (Seite 116): Doppelmutationen von R127 und weiteren Resten führen zu einem völligen Funktionsverlust von Cia1. (A)** Gal-CIA1 Zellen mit regulierbarer Expression des endogenen *CIA1* Gens wurden mit dem Plasmid p416 mit entweder keinem Gen (-), dem nicht-mutierten HA<sub>3</sub>-getaggttem *CIA1* Gen (Wt) oder den entsprechenden Punktmutanten des *CIA1* Gens transformiert. Die Zellen wurden zweimal 24 h in SD-Flüssigmedium kultiviert. Eine serielle Verdünnung von jeweils 1:10 mit einer OD<sub>600nm</sub> von 1,2 als Anfangswert wurde von links nach rechts auf frische Agarplatten mit Galaktose (SGal) oder Glukose (SD) als Kohlenstoffquelle aufgebracht und die Platten für drei Tage bei 30 °C inkubiert. **(B)** Oben: Darstellung der in Kombination mit R127 (magenta) mutierten Reste in grün. Die Konservierung der Oberflächenreste ist nach ConSurf analog zu Abb. 4.32 abgebildet. Unten: Darstellung der Konservierung wie zuvor und von R127 (magenta) ohne die zusätzlichen Mutationen zur besseren Veranschaulichung der Konservierung der zusätzlich mutierten Aminosäuren. Der N-Terminus ist oben und unten blau markiert. **(C)** Tabellarische Übersicht über die getesteten Cia1-Mutanten mit Lage der Mutationen sowie dem beobachteten Wachstumsphänotyp. **(D)** Zellen, die bei (A) einen Wachstumseffekt zeigten wurden, dreimal 24 h in SD-Flüssigmedium kultiviert. Gesamtzellextrakte wurden hergestellt und für die Messung der Aktivitäten der Enzyme Isopropylmalat-Isomerase (Leu1), Aconitase (Aco1) und Alkoholdehydrogenase (ADH) verwendet. Dargestellt sind die relativen Enzymaktivitäten normiert auf Wt; für die zytosolischen Enzyme Leu1 und ADH ist der Quotient angegeben. Alle Experimente wurden dreimal wiederholt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Der Austausch der Glutamatreste 104 und 142 zusätzlich zur Mutation R127E führte zu einem stark verzögerten Wachstum, das vergleichbar war zu dem ohne Plasmid-kodiertes Cia1. Dies indiziert den vollständigen Funktionsverlust der mutierten Proteine. Die Doppelmutation von R127E in Kombination mit dem Austausch von Aspartat 79, Tyrosin 173 oder Aspartat 270 führte zu schlechtem Wachstum. Hingegen wurde für die Doppelmutanten 154d (Q154R, R127E), 219d (D219R, R127E) und 297d (E297K, R127E) der gleiche, schwache Wachstumsdefekt wie für die Mutation R127E allein beobachtet, was zeigt, dass diese Reste keine wichtige Funktion erfüllen. Die Funktionalität der mitochondrialen ISC-Maschinerie und der zytosolischen CIA-Maschinerie wurde durch Messung der Enzymaktivitäten der Fe/S-Proteine Aconitase (Aco1, mitochondrial) und Isopropylmalat-Isomerase (Leu1, zytosolisch) überprüft. Es wurde festgestellt, dass der beobachtete Wachstumsphänotyp mit einem Verlust der Leu1-Aktivität einherging, ohne dass dabei die Biogenese des mitochondrialen Reporterenzym Aco1 beeinträchtigt war. Insgesamt ließ sich folgern, dass der starke Wachstums- und Enzymdefekt bei den Doppelmutanten 104d (E104R, R127E) und 142d (E142K, R127E) durch einen völligen Verlust der Funktion von Cia1 hervorgerufen wird, während bei den übrigen Mutationen das Cia1 Protein zumindest partiell funktionsfähig blieb.

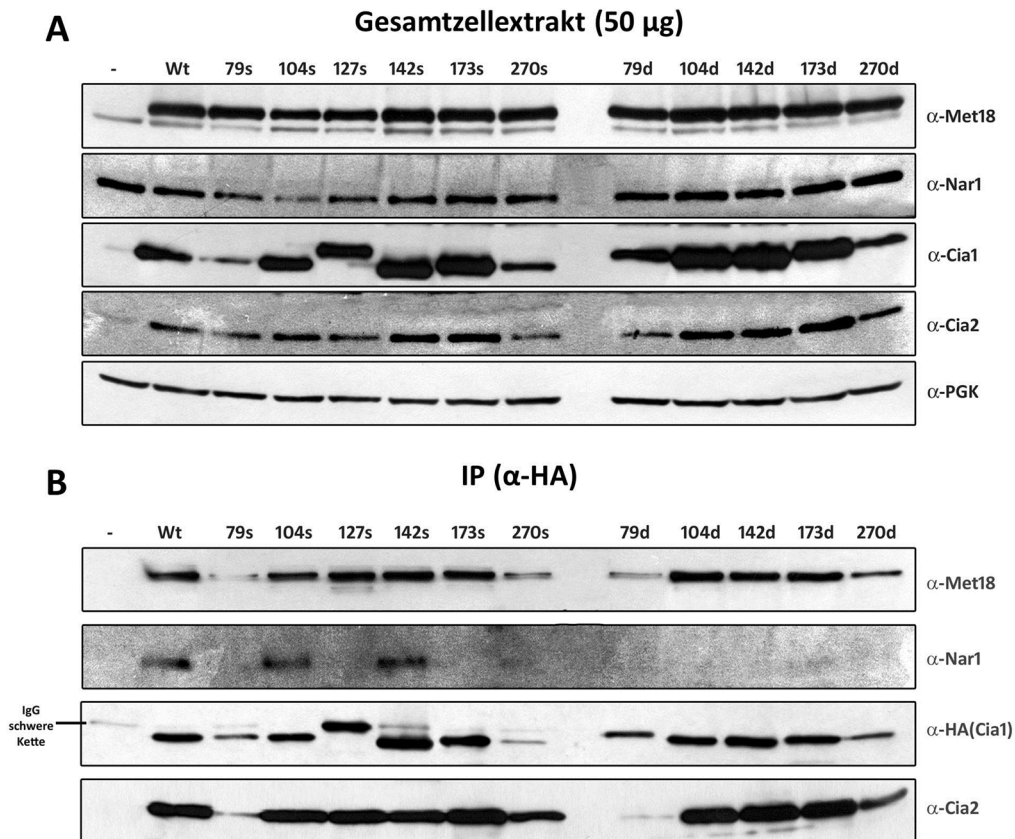
Um den Effekt der Mutationen auf die Interaktion von Cia1 mit anderen Proteinen zu untersuchen wurden Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt und zunächst geeignete Reaktionsbedingungen etabliert. Die bekannte Nar1-Cia1 Interaktion (Balk et al, 2005) wurde unter Überexpressionsbedingungen beider Proteine untersucht. Daher wurde versucht, die Interaktionen von Cia1 in Gal-CIA1-Zellen, die *CIA1* und *NAR1* von Plasmiden (p415-Nar1, p416-Cia1HA) exprimierten, nachzuweisen. Für die Koimmunpräzipitation wurden HA-Immunobeads verwendet und das HA-getaggte Cia1 Protein immunpräzipitiert. Es konnte keine Nar1-Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden, dafür wurde eine spezifische Koimmunpräzipitation von Cia2

gefunden (**Abb. 4.36A**). Alternativ wurden Gal-NAR1-Zellen mit dem Plasmid p416-Cia1HA transformiert. In diesen Zellen ist der endogene *NAR1*-Promotor durch den regulierbaren *GAL1-10* Promotor ersetzt worden, so dass durch Kultivierung in Gegenwart von Galaktose die Überexpression von *NAR1* induziert wird (Balk et al, 2004). Bei den zuvor beschriebenen Pufferbedingungen (Balk et al, 2005) wurde eine spezifische Koimmunpräzipitation für Cia2 mit Cia1 gefunden. Nar1 hingegen präzipitierte auch in der Kontrollreaktion ohne Cia1HA Protein (**Abb. 4.36B**). Bei Wiederholung des Experiments unter Verwendung von TNETG-Puffer für die Koimmunpräzipitation wurde keine Präzipitation von Nar1 beobachtet (**Abb. 4.36C**). Dies legte die Vermutung nahe, dass Nar1 unter den zuvor getesteten Pufferbedingungen nicht stabil gebunden war. Die Variation der Pufferbedingungen erlaubt damit, verschiedene Protein-Interaktionen des Cia1 zu verfolgen. Um die Interaktion von Cia1 mit Met18 nachzuweisen, wurden Gal-CIA1 Zellen mit den Plasmiden p416-Cia1HA und p424-Met18 transformiert und Met18 und HA-getaggtetes Cia1 gleichzeitig überexprimiert. Gemeinsam mit dem präzipitierten Cia1HA konnten sowohl Cia2 als auch Met18 und sogar Nar1 koimmunpräzipitiert werden (**Abb. 4.36D**). Das Signal für Nar1 war allerdings schwach, konnte aber reproduzierbar nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.36: Nachweis der *in vivo* Interaktionen von Cia1 mit Cia2, Nar1 und Met18.** (A) Gal-CIA1 Zellen wurden mit den Plasmiden p415-Nar1 und p416-Cia1HA beziehungsweise als Kontrolle mit p415-Nar1 und einem p416-Plasmid ohne Gen transformiert. Die Zellen wurden 16 h in SD-Medium kultiviert. Von den Zellen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und diese für Koimmunpräzipitationsexperimente (1h, 4 °C) mit 10  $\mu$ L HA-Immuno-beads (HA probe (F-7) *sc-7392*, *Santa Cruz Biotechnology*) verwendet. (B) Gal-NAR1 Zellen wurden mit p416-Cia1HA beziehungsweise als Kontrolle mit einem p416-Plasmid ohne Gen transformiert und 16 h in SGal-Medium kultiviert. Die Durchführung der Koimmunpräzipitation erfolgte analog zu (A). (C) Die gleichen Zellen wie bei (B) wurden für eine Koimmunpräzipitation mit TNETG-Puffer verwendet. (D) Gal-CIA1-Zellen wurden mit den Plasmiden p424-Met18 und p416-Cia1HA beziehungsweise als Kontrolle mit p424-Met18 und einem p416-Plasmid ohne Gen transformiert. Die Zellen wurden 16 h in SD-Medium kultiviert, und daraus hergestellte Gesamtzellextrakte wurden für Koimmunpräzipitationsexperimente (1h, 4 °C) mit 10  $\mu$ L HA-Immuno-beads verwendet. (A - D) Die erfolgte (+) oder nicht erfolgte (-) Expression der entsprechenden Proteine ist oberhalb der Blots angegeben. Der Nachweis der immunpräzipitierten Proteine erfolgte mittels Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern nach SDS-PAGE und Western-Blot. Die verwendeten Antikörper sind unterhalb der Blots angegeben, ebenso wie die für die Koimmunpräzipitation verwendeten Pufferbedingungen.

Die etablierten Koimmunpräzitationsbedingungen wurden verwendet, um den Effekt der Mutation von Cia1 auf die Interaktionen mit Nar1, Cia2 und Met18 zu überprüfen. Verglichen wurden die Auswirkungen des Aminosäureaustausches der Reste D79, E104, E142, Y173 und D270 allein sowie in Kombination mit der Mutation R127E. Gal-CIA1 Zellen wurden mit dem Plasmid p424-Met18 und den entsprechenden Wild-Typ- oder Mutanten-Versionen von p416-Cia1HA transformiert und die Zellen für ein Koimmunpräzitationsexperiment verwendet. Um die Mengen der zu untersuchenden Proteine zu überprüfen, wurden 50 µg des jeweiligen, TCA-gefällten Gesamtzellextraktes mittels Western-Blot und Immunfärbung analysiert (**Abb. 4.37A**). Cia1-depletierte Gal-CIA1-Zellen können offensichtlich kein Met18 Protein überexprimieren. Die Beobachtung, dass ohne Cia1 auch die Menge an Cia2 Protein deutlich reduziert war, deutet darauf hin, dass der Proteinkomplex aus Cia1, Cia2 und Met18 bei Fehlen des Cia1 Proteins destabilisiert ist und vermutlich abgebaut wird.

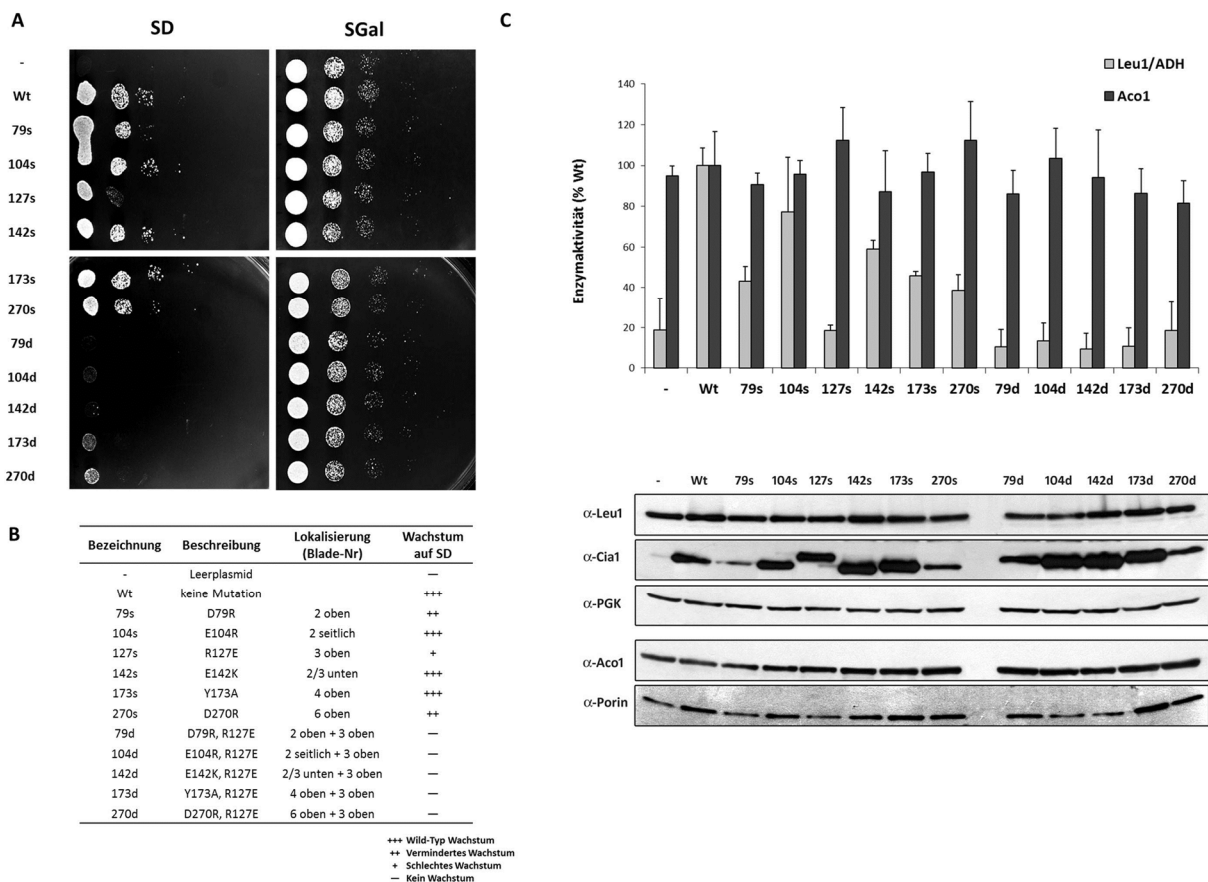


**Abbildung 4.37: Schwächung der Nar1-Cia1 Interaktion durch Mutation von Cia1.** Gal-CIA1 Zellen wurden mit dem Plasmid p424-Met18 und den entsprechenden Wild-Typ- oder Mutanten-Versionen von p416-Cia1HA sowie als Kontrolle mit p424-Met18 und einem p416-Plasmid ohne Gen transformiert. Die Zellen wurden 16 h in SD-Medium kultiviert und es wurde ein Gesamtzellextrakt hergestellt. **(A)** 50 µg des Gesamtzellextraktes wurden mit TCA gefällt und danach mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immunfärbung auf den Proteingehalt von Met18, Nar1, Cia1 und Cia2 sowie Phosphoglyceratkinase (Pgk1) als Ladekontrolle untersucht. **(B)** Gesamtzellextrakte wurden für Koimmunpräzitationsexperimente nach Abb. 4.36D verwendet. Der Nachweis der immunpräzipitierten Proteine erfolgte mittels Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern. Zum Nachweis von Cia1HA wurde HA-Antikörper verwendet, der eine schwache Kreuzreaktion mit den Immunglobulinen der HA-Immuno beads zeigte. **(A, B)** Die zur Immunfärbung verwendeten Antikörper stehen rechts neben den Blots. Zur Beschreibung der mutierten Cia1-Proteine siehe Abb. 4.38B.

In den Cia1 Einzelmutanten E104R (104s) und E142K (142s) wurde eine vergleichbare Koimmunpräzipitation mit Nar1, Cia2 und Met18 wie beim nicht-mutierten Cia1 Protein beobachtet. Die Mutation R127E hingegen führte zu einem Verlust der Cia1-Nar1 Koimmunpräzipitation, ohne die von Met18 oder Cia2 zu beeinträchtigen (**Abb. 4.37B**). Das gleiche Resultat wurde für die Kombination der Mutationen R127E mit E104R (104d) oder E142K (142d) erhalten. Die Mutation von D79 oder D270 in Cia1 destabilisierte offenbar den  $\beta$ -Propeller, wodurch die Cia1 Proteinmenge sowohl der Einzelmutanten (79s, 270s) als auch der Doppelmutanten (79d, 270d) stark reduziert wurde (**Abb. 4.37A**). In Folge dessen wurde viel weniger Cia1 Protein immunpräzipitiert. Die Menge an koimmunpräzipitiertem Cia2 und Met18 nahm ebenfalls ab, Nar1 konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Der Austausch von Tyrosin 173 allein genügte ebenfalls bereits, um einen Verlust der Cia1-Nar1 Koimmunpräzipitation zu bewirken. Zusammenfassend legt dies nahe, dass die Mutation von D79, R127, Y173 oder D270 in Cia1 allein zu einem Verlust der Cia1-Nar1 Koimmunpräzipitation führte.

Dieses etwas überraschende Ergebnis gab den Anlass zu einer weiteren Überprüfung der Funktionalität der mutierten Proteine. Zunächst wurde die Komplementation des Wachstumsdefektes der für die Koimmunpräzipitation verwendeten Zellen überprüft (**Abb. 4.38A**). Unter den getesteten Bedingungen zeigte die R127E Einzelmutante (127s) eine schwache Komplementation. Die beiden Einzelmutanten D79R (79s) und D270R (270s) komplementierten den Wachstumsphänotyp beinahe vollständig, alle weiteren Einzelmutanten komplementierten wie das nicht-mutierte Cia1 Protein. Die Kombination der Mutation R127E mit einem weiteren Aminosäureaustausch von D79 (79d), E104 (104d), E142 (142d), Y173 (173d) oder D270 (270d) führte zu einem völligen Verlust der Komplementation. Die biochemische Analyse der Funktionalität der mutierten Cia1 Proteine erfolgte durch Messung der Enzymaktivitäten der Fe/S-Reporterenzyme Aconitase (Aco1, mitochondrial) und Isopropylmalat-Isomerase (Leu1, zytosolisch) in den für die Koimmunpräzipitation verwendeten Gesamtzellextrakten. Es wurde gefunden, dass eine schlechte Komplementation des Wachstumsphänotyps mit dem spezifischen Verlust der Leu1-Aktivität korrelierte: alle Doppelmutanten und die Einzelmutante R127E (127s) wiesen nur noch die Enzymaktivität von Cia1 depletierten Gal-CIA1 Zellen auf (**Abb. 4.38C**). Die Mutation der Reste E104 und E142 allein verringerte die Leu1-Aktivität nur schwach, was auf einen milden Effekt auf die Funktionalität des Cia1 Proteins hindeutete. Etwas stärker wurde die Leu1-Aktivität bei Austausch der Aminosäuren D79, Y173 und D270 erniedrigt, gleichbedeutend mit einer stärkeren Beeinträchtigung der Funktion des Cia1. In allen Fällen blieb die Leu1-Proteinmenge gleich. Der Verlust der Enzymaktivität ist damit auf einen Verlust des Fe/S-Clusters zurückzuführen. Der Effekt war spezifisch für zytosolische Fe/S-Enzyme, da die Aktivität des mitochondrialen Fe/S-Enzyms Aco1 in allen Fällen unbeeinflusst blieb. Es lässt sich festhalten, dass die Komplementation des

Wachstumsdefektes mit der spezifischen Leu1-Aktivität korrelierte. Der Wachstumseffekt ist deutlich stärker unter Bedingungen, in denen neben Cia1 mit Met18 eine weitere Komponente der CIA-Maschinerie überexprimiert wird. Wachstumsdefekt und Verlust der Leu1-Aktivität sind eine direkte Konsequenz der Funktionalität der mutierten Cia1 Proteine. Die Nar1-Cia1 Interaktion wird durch die eingeführten Mutationen unmittelbar geschwächt, so dass keine Koimmunpräzipitation mehr beobachtbar ist. In den Fällen der Mutation von D79 und D270 handelt es sich vermutlich um einen indirekten Effekt, der durch Destabilisierung des Cia1  $\beta$ -Propellers verursacht wird. Der für die Interaktion wichtigste Rest ist R127, gefolgt von E104 sowie E142. Doppelmutation von R127 mit einem der beiden Reste führt zu einem völligen Verlust der Cia1 Funktion.



**Abbildung 4.38: Die Schwächung der Interaktion von Nar1-Cia1 beeinträchtigt direkt die Funktion von Cia1. (A)** Gal-CIA1 Zellen wurden mit dem Plasmid p424-Met18 und den entsprechenden Wild-Typ- oder Mutanten-Versionen von p416-Cia1HA sowie als Kontrolle mit p424-Met18 und einem p416-Plasmid ohne Gen transformiert. Die Zellen wurden 16 h in SD-Flüssigmedium kultiviert. Eine serielle Verdünnung von jeweils 1:10 mit einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 als Anfangswert wurde von links nach rechts auf frische Agarplatten mit Galaktose (SGal) oder Glukose (SD) als Kohlenstoffquelle aufgebracht und die Platten für drei Tage bei 30 °C inkubiert. **(B)** Übersicht über die getesteten Cia1-Mutanten mit Lage der Mutationen sowie dem beobachteten Wachstumsphänotyp. **(C)** In den für die Koimmunpräzipitation verwendeten Gesamtzellextrakten (siehe Abb. 4.37) wurden die Enzymaktivität der Enzyme Isopropylmalat-Isomerase (Leu1), Aconitase (Aco1) und Alkoholdehydrogenase (ADH) gemessen. Dargestellt sind die relativen Enzymaktivitäten normiert auf Wt; für die zytosolischen Enzyme Leu1 und ADH ist der Quotient angegeben. Alle Experimente wurden dreimal wiederholt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Unten sind die Proteingehalte von Leu1, Cia1 und Phosphoglyceratkinase (Pgc1) als zytosolische Ladekontrolle sowie Aco1 und Porin als mitochondriale Ladekontrolle in 50  $\mu$ g Gesamtzellextrakt nach Immunfärbung dargestellt.

## 5 Diskussion

### 5.1. Funktionen und Spezifitäten eukaryotischer MB-Typ Ferredoxine

#### 5.1.1. Einteilung von eukaryotischen MB-Typ Ferredoxinen in drei Untergruppen

Das einzige Ferredoxin Yah1 aus *S. cerevisiae* ist beteiligt an mindestens drei metabolischen Prozessen: der Fe/S-Cluster-Biogenese (Lange et al, 2000), der Hydroxylierung von Häm O zu Häm A (Barros et al, 2001; Barros et al, 2002) und der Biosynthese von Koenzym Q<sub>6</sub> (Pierrel et al, 2010). Der Prozess der Fe/S-Cluster Biogenese ist im Unterschied zur Häm A Biosynthese und der Koenzym Q<sub>6</sub> Biosynthese auch unter fermentativen Bedingungen essentiell. Die Funktion der humanen Ferredoxine Fdx1 und Fdx2 wurde *in vivo* durch Komplementation von Hefezellen getestet, in denen das Hefe-Ferredoxin Yah1 depletiert war. Es wurde festgestellt, dass Fdx2 im Gegensatz zu Fdx1 den Wachstumsdefekt der Hefezellen unter fermentativen Depletionsbedingungen komplementierte. Unter respiratorischen Depletionsbedingungen konnte hingegen keine Komplementation beobachtet werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass humanes Fdx2 die „ISC-Funktion“ von Yah1 erfüllen und es in der Biogenese von Fe/S-Clustern funktionell ersetzen kann. Konsequenterweise bedeutet die fehlende Komplementation unter respiratorischen Depletionsbedingungen, dass Fdx2 die „Respirations-Funktion(en)“ von Yah1 nicht erfüllen kann. Die Unterscheidung der beiden in Frage kommenden Biosyntheseprozesse wird dadurch erschwert, dass eine fehlfunktionierende Koenzym Q<sub>6</sub> Biosynthese einen Effekt auf die Aktivität der Atmungskettenkomplexe haben kann. Zum Beispiel beträgt in den Hefezellen *coq3Δ*, die kein Koenzym Q<sub>6</sub> synthetisieren können, die Aktivität der Cytochrom *c* Oxidase (COX) nur noch etwa 5 % des Wertes von Wild-Typ Zellen (Do et al, 2001). Die Aktivität der COX liegt damit im gleichen Bereich wie in Zellen, die keinen funktionellen Cytochrom *bc*<sub>1</sub> Komplex (*cor1Δ*) oder keine funktionelle F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase (*atp2Δ*) mehr besitzen (Do et al, 2001). Trotzdem konnte in einer noch nicht veröffentlichten Studie gezeigt werden, dass Fdx2 unter respiratorischen Depletionsbedingungen bei Zugabe von Vanillinsäure Yah1 funktionell ersetzen kann (F. Pierrel, persönliche Mitteilung). Dieses Resultat wird dadurch erklärt, dass Yah1 für die 5'-Hydroxylierung durch die Monooxygenase Coq6 in der Biosynthese von Koenzym Q<sub>6</sub> benötigt wird. Vanillinsäure ist ein Intermediat der Koenzym Q<sub>6</sub> Synthese, welches keine 5'-Hydroxylierung mehr benötigt und daher unabhängig von mitochondrialem Ferredoxin Yah1 in Koenzym Q<sub>6</sub> umgewandelt werden kann (F. Pierrel, persönliche Mitteilung). Folglich kann Fdx2 die Funktion von Yah1 in der Biosynthese von Koenzym Q<sub>6</sub> nicht erfüllen. Gleichzeitig bedeutet das Wachstum von Fdx2 komplementierten Gal-YAH1 Zellen unter respiratorischen Bedingungen bei Zugabe von Vanillinsäure, dass Fdx2 Elektronen für die Hydroxylierung von Häm O zu Häm A liefern kann. Fdx2

erfüllt demnach die ISC-Funktion und die Häm A Biosynthese-Funktion von Yah1, nicht aber die Koenzym Q<sub>6</sub> Biosynthese-Funktion (F. Pierrel, persönliche Mitteilung) (Sheftel et al, 2010).

Fdx1 hingegen kann nicht die ISC-Funktion von Yah1 erfüllen und daher wachsen Fdx1 komplementierte Gal-YAH1 Zellen nicht unter fermentativen Depletionsbedingungen. Die Funktion von Fdx1 in der Koenzym Q<sub>6</sub> Biosynthese scheint ebenfalls unwahrscheinlich, da Fdx1 komplementierte Gal-YAH1 Zellen den gleichen Verlust an Koenzym Q<sub>6</sub> zeigen wie Fdx2 komplementierte Gal-YAH1 Zellen (F. Pierrel, persönliche Mitteilung). Ob Fdx1 in der Lage ist Elektronen für die Häm A Biosynthese zu liefern ist schwierig zu sagen, da eine funktionierende Fe/S-Cluster Biogenese essentiell für die Hefezelle ist. Eine definitive Antwort auf die Frage, ob Fdx1 Elektronen für die Biosynthese von Häm A und Koenzym Q<sub>6</sub> liefern kann, dürfte erst durch weitere *in vitro* Experimente erhalten werden. Der physiologische Prozess für den die Elektronenübertragung durch Fdx1 (Adx in Rind) benötigt wird, wurde bereits 1966 beschrieben und rekonstituiert (Omura et al, 1966). NADPH, FdxR und Fdx1 bilden eine Elektronentransferkette für das Hydroxylierungssystem von Nebennierenmitochondrien, das Reduktionsäquivalente auf Cytochrom P450 Enzyme (CYP) überträgt. CYP sind für die Oxidation organischer Verbindungen verantwortlich, in der Regel in Form einer Hydroxylierung. In menschlichen Zellen gibt es insgesamt sieben mitochondriale CYP, die an der Steroidbiosynthese, Vitamin D<sub>3</sub> Stoffwechsel oder der Biosynthese von Gallensäuren beteiligt sind (Annalora et al, 2010).

Hefen produzieren weder Steroidhormone oder Gallensäuren noch besitzen sie einen Vitamin D<sub>3</sub> Stoffwechsel. In *S. cerevisiae* sind lediglich drei mikrosomale CYP bekannt: DIT2 (CYP56), ERG5 (CYP61), und ERG11 (CYP51) (Nelson, 2009). Die Situation in *S. pombe* ist ähnlich, hier findet man allerdings nur die beiden Homologen von ERG5 und ERG11, die an der Ergosterolbiosynthese beteiligt sind. Folglich gibt es zumindest in den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* kein physiologisches P450 Enzym als „Substrat“ für das mitochondriale Ferredoxin.

Die funktionale Unterscheidung zwischen den MB-Typ Ferredoxinen konnte durch bioinformatische Analysen bestätigt werden. Pilze enthalten nur ein einzelnes mitochondriales Ferredoxin, während in höheren, tierischen Eukaryoten zwei Ferredoxine gefunden wurden. Aufgrund spezifischer Sequenzmotive lassen sich drei Untergruppen formulieren: Fdx1-Typ Ferredoxine weisen zwei zusätzliche Aminosäuren nach  $\alpha$ -Helix C auf und zeichnen sich durch das LIF-Tripeptid in  $\beta$ -Strang D aus; Fdx2-Typ Ferredoxine weisen einen hoch konservierten C-Terminus auf; Pilz-Typ Ferredoxinen fehlen die zuvor genannten Charakteristika der beiden anderen Untergruppen. In allen drei Untergruppen konservierte Reste sind zum einen wichtig für die strukturelle Integrität des Proteins, zum anderen spiegeln sie die Interaktionsstelle mit der Ferredoxinoxidoreduktase wieder. Die primäre Interaktionsstelle liegt in  $\alpha$ -Helix F und umfasst die Reste D(E)72, D76 und D79. Die

funktionellen Unterschiede zwischen den Untergruppen sind in den nicht in allen Ferredoxinen konservierten Bereichen kodiert.

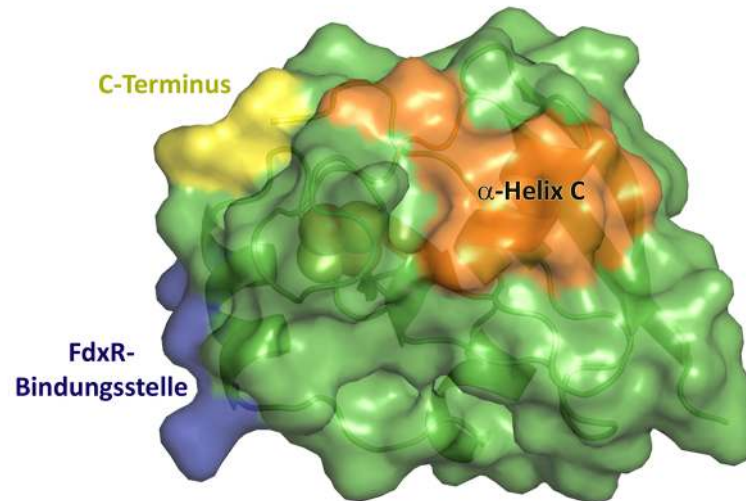
### **5.1.2. Fdx1 und Fdx2 sind trotz struktureller Ähnlichkeit hochspezifische Elektronenüberträger und unterscheiden sich funktionell von Yah1**

Die beiden humanen Ferredoxine Fdx1 und Fdx2 weisen eine verblüffend hohe Funktionsspezifität auf (Sheftel et al, 2010). Um dies besser zu verstehen, wurde in dieser Arbeit die Struktur des humanen Ferredoxins Fdx2 bestimmt und mit der bekannten Struktur des zweiten humanen Ferredoxins Fdx1 verglichen. Beide Proteine sind [2Fe-2S] Ferredoxine vom MB-Typ, weisen die für diese Proteine typische  $\beta$ -*grasp* Faltung auf und sind ähnlich gefaltet wie andere MB-Typ Ferredoxine. Ein struktureller Unterschied zwischen Fdx1 und Fdx2 besteht in der Orientierung von  $\alpha$ -Helix C, bedingt durch das Fehlen einer Schlaufe unmittelbar nach  $\alpha$ -Helix C in Fdx2. Da die strukturelle Ähnlichkeit zwischen monomeren Fdx1 und Fdx2 groß ist, wurde untersucht, ob Unterschiede im Oligomerisierungszustand eine Erklärung für die Funktionsspezifitäten liefern könnten. Für den Mechanismus des Elektronentransfers von Fdx1 auf CYP wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem das Ferredoxin im oxidierten Zustand als Dimer vorliegt und nach Reduktion in Monomere zerfällt, die dann für die Elektronenübertragung auf CYP sorgen (Beilke et al, 2002). Es wurde beobachtet, dass Fdx1 und Fdx2 sowohl im reduzierten als auch im oxidierten Zustand als Dimer vorliegen. Die Dimerisierung war nicht abhängig vom C-Terminus der Proteine. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch Yah1 aus Hefe immer als Dimer vorliegt. Es folgt, dass Unterschiede im Oligomerisierungszustand nicht für die funktionellen Unterschiede verantwortlich sein können. In diesem Zusammenhang wurde der von Beilke und Kollegen vorgeschlagene Mechanismus der Elektronenübertragung von Fdx1 (Adx) auf CYP (Beilke et al, 2002) untersucht und festgestellt, dass er durch keine der bislang bekannten Strukturen von MB-Typ Ferredoxinen unterstützt wird.

Die für die ISC-Funktion von Fdx2 relevanten Reste wurden zunächst durch Aminosäureaustausche in Fdx2 analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die ISC-Funktion von Fdx2 strikt abhängig ist vom C-Terminus des Proteins, was die hohe Konservierung dieses Bereiches im Fdx2 erklärt. Eine Deletion der letzten 12 Aminosäuren führt zum völligen Verlust der ISC-Funktion von Fdx2. Im Gegensatz dazu ist der C-Terminus von Fdx1 nicht wichtig für dessen Funktion. Für Adx, das Fdx1-Typ Ferredoxin aus Rind, ist schon lange bekannt, dass eine C-terminale Verkürzung zu einer leichten Erhöhung der Elektronentransferaktivität *in vitro* führt (Cupp & Vickery, 1989). Wichtig für die Funktion von Fdx2 sind außerdem Bereiche, die für die strukturelle Integrität bedeutsam sind und deren Mutation zu einer Destabilisierung des [2Fe-2S] Clusters führt ( $\beta$ -Strang D). Ebenfalls von funktioneller Bedeutung ist der Rest A48, der eine Wasserstoffbrücke zum Fe/S-Cluster ausbildet und einen Einfluss auf den Elektronentransfer haben könnte. Letztlich konnte gezeigt werden, dass auch die Proteinregionen,



die strukturelle Unterschiede zu Fdx1 aufwiesen, für die ISC-Funktion bedeutend sind. Dies betrifft die  $\alpha$ -Helix C sowie die Reste in der Schlaufe unmittelbar danach, welche in der Interaktion mit dem Zielprotein involviert sein könnten. In **Abb. 5.1** sind die wichtigen Oberflächenreste von Fdx2 gezeigt, wobei der C-Terminus fehlt, da nur das verkürzte Protein aufgrund der Flexibilität des C-Terminus kristallisierte.



**Abbildung 5.1: Darstellung der für die Funktion von Fdx2 wichtigen Oberflächenreste.** Die Struktur von Fdx2 (2Y5C) ist in leicht transparenter Oberflächendarstellung abgebildet. Die primäre FdxR-Bindungsstelle ist blau und das C-terminale Arg109 gelb markiert. Die letzten 12 Aminosäuren fehlen in der Struktur, über ihre Orientierung ist nichts bekannt. Orange gefärbt sind die für die Funktion von Fdx2 wichtigen Bereiche in und um  $\alpha$ -Helix C.

In einem zweiten Schritt wurden Reste im Fdx1 Protein ausgetauscht, um zu klären welche Bereiche des Fdx2 für die Spezifität der ISC-Funktionalität verantwortlich sind. Dies gelang durch Austausch der 27 C-terminalen Reste von Fdx1 gegen die entsprechenden Aminosäuren aus Fdx2 in Kombination mit weiteren Mutationen. Einen positiven Effekt hatten der Austausch von  $\beta$ -Strang D sowie der Austausch von  $\alpha$ -Helix C und der Reste 48/ 49. Der  $\beta$ -Strang D liegt im Proteininneren, ist etwa 10 Å vom Fe/S-Cluster entfernt und hat keine direkten Kontakte zu ihm. Es scheint daher zunächst unwahrscheinlich, dass der Austausch einen direkten Effekt haben kann. Andererseits ist in einer aktuellen Studie mit einem Ferredoxin aus einem thermophilen Cyanobakterium gezeigt worden, dass der Austausch einer Schlaufe in 20 Å Entfernung vom Fe/S-Cluster das Redoxpotential um 57 mV veränderte, ohne dabei strukturelle Änderungen hervorzurufen (Nechushtai et al, 2011). Ein Einfluss auf den Fe/S-Cluster kann aus diesem Grund nicht ausgeschlossen werden. Der Rest A48 bildet in Fdx2 eine Wasserstoffbrücke zum Fe/S-Cluster, analog dazu bildet G48 in Fdx1 eine ähnliche Wasserstoffbrücke. Beide Reste könnten daher ein Teil des Elektronentransferweges sein oder diesen direkt beeinflussen. Der Austausch der geladenen  $\alpha$ -Helix C wiederum könnte unmittelbar eine Protein-Protein-Interaktion beeinflussen. Die genaue Funktion des C-Terminus von Fdx2 bleibt unklar. Es kann allerdings spekuliert werden, dass er aufgrund seiner hohen Konservierung für die Bindung eines Proteinpartners wichtig ist.

Die erfolgreiche Einführung einer ISC-Funktion in Fdx1 konnte neben der Komplementation von Gal-YAH1 Zellen unter fermentativen Depletionsbedingungen auch biochemisch verifiziert werden. Die Enzymaktivitäten des Fe/S-Enzyms Aconitase sowie des Häm-abhängigen Enzyms Katalase werden durch die mutierten Fdx1 Proteine wie der Wachstumsphänotyp partiell komplementiert.

Die gezeigte Funktionseinführung war umso bemerkenswerter, als dass die funktionellen Unterschiede zwischen Fdx1 und Fdx2 generell kompliziert in der Aminosäuresequenz kodiert sind. Veranschaulicht wird dieses Phänomen dadurch, dass der Austausch von  $\beta$ -Strang D in Fdx1 ohne Einfluss auf den Fe/S-Cluster ist, wohingegen ein solcher Austausch in Fdx2 den Fe/S-Cluster destabilisiert. Mit den Resten F43-G44 verhält es sich genau umgekehrt: die Deletion dieser Reste in Fdx1 destabilisiert den Fe/S-Cluster, Einführung der Reste in Fdx2 beeinflusst zwar die Eigenschaften des Fe/S-Cluster, wirkt aber nicht destabilisierend. Außerdem werden die hoch komplizierten Unterschiede auch dadurch verdeutlicht, dass in Yah1 weder der C-Terminus noch  $\beta$ -Strang D oder F43-G44 eine kritische Rolle für die ISC-Funktion erfüllen. Verblüffenderweise haben diese Regionen aber einen Einfluss auf die Funktion von Yah1 unter respiratorischen Depletionsbedingungen und sind daher wahrscheinlich wichtig für die Koenzym  $Q_6$  Biosynthese.

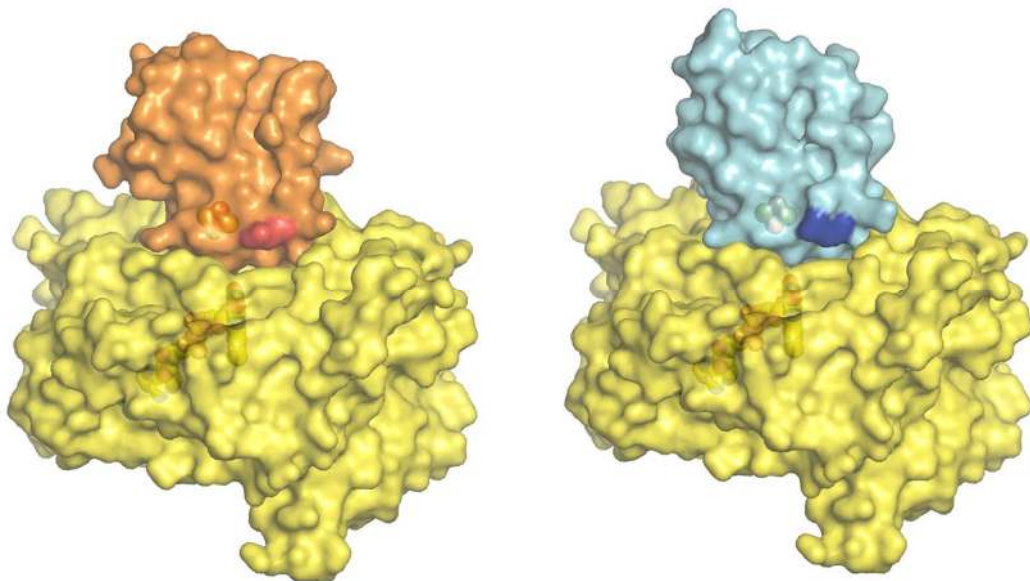
Die Spezifität der Elektronenübertragung von humanem Fdx1 auf mitochondriale Cytochrom P450 Enzyme (CYP) im Vergleich zu Fdx2 ist ebenfalls erstaunlich hoch. Der Unterschied beträgt mindestens den Faktor 500. Pilz-Typ Ferredoxine wie Yah1 aus *S. cerevisiae* oder Etp1<sup>fd</sup> aus *S. pombe* (Schiffler et al, 2004) scheinen in diesem Zusammenhang eine Zwischenstellung einzunehmen, ihr Umsatz liegt zwischen dem von Fdx1 und Fdx2. Da beide Hefen jedoch keine mitochondrialen Cytochrom P450 Enzyme besitzen (Nelson, 2009) handelt es sich bei diesen Elektronentransferreaktionen um physiologisch nicht relevante Aktivitäten. Die Erzeugung einer Elektronentransferaktivität auf CYP gelang für Fdx2 nach Einführung der Schlüsselmutation R73E. Mit einem Glutamat an Position 73 in Fdx2 konnte ca. 7 % des Fdx1 Umsatzes erzielt werden. Dieser Umsatz entspricht einer Aktivitätssteigerung um den Faktor 35 im Vergleich zu Fdx2 ohne Mutation. Die für den Elektronentransfer auf CYP wichtigen Reste konnten durch Mutagenese-Studien und chemische Modifikationsstudien identifiziert und analysiert werden (Ewen et al, 2011). Die primäre Interaktionsregion von Fdx1 (Adx) für CYP liegt auf  $\alpha$ -Helix F und überlappt mit der FdxR-Bindestelle (Vickery, 1997). Die wichtigsten Reste sowohl für FdxR-Bindung als auch für CYP-Bindung sind D76 und D79 (Coghlan & Vickery, 1991). Die Mutation von D72 in Fdx1 zeigte erheblich schwächere Effekte hinsichtlich FdxR-Bindung und CYP-Bindung und die Punktmutanten E73A sowie E73Q zeigten nur einen Effekt auf die Bindung von CYP und nicht auf die Bindung von FdxR (Coghlan & Vickery, 1991). In **Abb. 5.2** ist die primäre Interaktionsstelle der humanen Ferredoxine Fdx1 und Fdx2 mit jener der Pilz-Typ Ferredoxine Yah1 und Etp1<sup>fd</sup> verglichen.

Protein	Rest-Nr.																
	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
Fdx1	D	A	I	T	D	E	E	N	D	M	L	D	L	A	Y	G	L
Etp1 <sup>fd</sup>	D	P	P	E	E	D	E	E	D	M	L	D	L	A	F	G	L
Yah1	P	E	P	E	E	D	E	N	D	M	L	D	L	A	Y	G	L
Fdx2	P	P	P	E	E	R	E	D	D	M	L	D	M	A	P	L	L

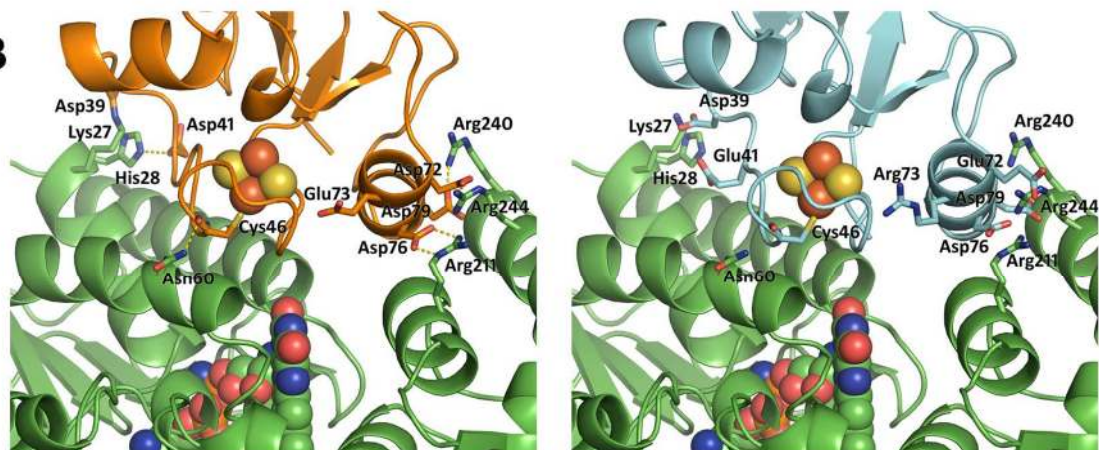
**Abbildung 5.2: Vergleich der primären Interaktionsstelle von Fdx1, Fdx2, Yah1 und Etp1<sup>fd</sup>.** Die Aminosäuresequenzen der Reste 68 bis 84 von Fdx1, Fdx2, Yah1 und Etp1<sup>fd</sup> sind abgebildet. Identische Reste sind hellgrau und ähnliche Reste dunkelgrau unterlegt. R73 in Fdx2 ist schwarz hervorgehoben.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die für die Interaktion mit FdxR wichtigen Reste D(E)72, D76 und D79 in allen Ferredoxinen gleich sind. Aminosäure 73 ist in Fdx2 im Gegensatz zu allen anderen Ferredoxinen positiv geladen und eine Ladungsumkehr befähigt das entsprechend mutierte Fdx2 Protein zum Elektronentransfer auf CYP. Diese Beobachtungen lassen sich an Hand der Kristallstruktur des quervernetzten Adx-AdxR-Komplexes (Muller et al, 2001b) veranschaulichen (**Abb. 5.3**).

**A**



**B**



AdxR  
Adx

AdxR  
Fdx2

**Abbildung 5.3 (Seite 127): Die Interaktionen von Adx (Fdx1) oder Fdx2 mit der Ferredoxinoxidoreduktase sind identisch und unabhängig von Rest73.** Jeweils links findet sich die Darstellung der experimentell bestimmten Kristallstruktur des Adx-AdxR Komplexes (1E6E, (Muller et al, 2001b)) und rechts das Modell des Komplexes von AdxR mit Fdx2. Das Modell wurde generiert durch Ersatz von Adx durch Fdx2 (2Y5C). **(A)** Oberflächendarstellung des Komplexes von AdxR (gelb) mit Adx (orange) oder mit Fdx2 (hellblau). Zur Visualisierung des FAD-Kofaktors und des Fe/S-Cluster wurde eine Oberflächentransparenz von 75 % gewählt. Der entscheidende Rest 73 ist rot in Adx (E73) und blau in Fdx2 (R73) dargestellt. **(B)** Detailansicht der Interaktionen zwischen AdxR und Adx bzw. Fdx2. In der experimentell bestimmten Struktur sind die Interaktionen durch gestrichelte Linien dargestellt. Die wichtigsten Reste sind beschriftet.

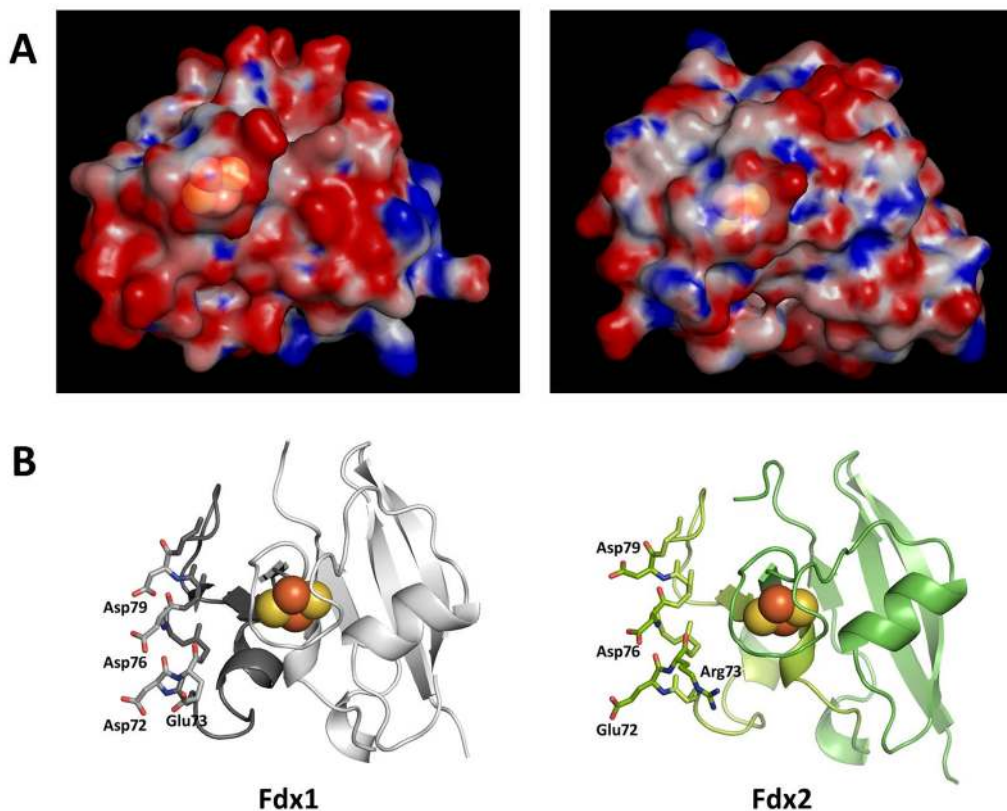
Die Interaktion von Adx aus Rind (87 % identisch zu humanem Fdx1) mit der Ferredoxinoxidoreduktase AdxR werden primär durch Salzbrücken der sauren Reste D72, D76 und D79 mit den basischen Resten R211, R240 und R244 von AdxR ausgemacht. Die drei Argininreste sind konserviert und werden auch in der Ferredoxinoxidoreduktase aus Mensch oder Hefe gefunden. Tatsächlich sind die beiden den Resten 240 und 244 entsprechenden Arginine von humaner FdxR (R239 und R243) bereits vor der Veröffentlichung der Struktur des Adx-AdxR-Komplexes als wichtig für die Interaktion beschrieben worden (Brandt & Vickery, 1993). Die sekundäre Interaktionsstelle liegt um die kovalent verknüpften Reste K27 aus AdxR und D39 aus Adx und beinhaltet eine Wasserstoffbrücke zwischen H28 und D41. Außerdem existiert noch eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen N60 aus AdxR und dem Carbonylsauerstoff von C46 aus Adx. Sowohl der basische Charakter der Reste 27 und 28 als auch N60 sind konserviert in den Ferredoxinoxidoreduktasen aus Mensch, Rind und Hefe. Ebenso sind die für die Interaktion wichtigen Reste in allen eukaryotischen MB-Typ Ferredoxinen konserviert. In Übereinstimmung damit zeigt das Modell des Komplexes aus Fdx2 und AdxR, dass alle für die Interaktionen wichtigen Reste auch in Fdx2 existieren und absolut kompatibel mit identischen Bindungswechselwirkungen sind. Rest 73 zeigt in beiden Fällen von der Interaktionsfläche weg und ist nicht an der Bindung beteiligt.

Die positive Ladung an Position 73 in Fdx2 blockiert offensichtlich den Elektronentransfer auf CYP. Interessanterweise ist der entsprechende Rest in Adx aus Rind (E73) bereits gegen ein Alanin oder ein Glutamin ausgetauscht worden (Coghlan & Vickery, 1991). Dies führte zu einer Verringerung der Cholesteroleitenkettenspaltungsaktivität durch CYP11A1 um etwa 50 %. Dies veranschaulicht, dass Rest 73 nicht allein entscheidend ist für die Spezifität von Fdx1 (Adx) für CYP. Allerdings verhindert die positive Ladung an Position 73 den Elektronentransfer von Fdx2 auf CYP und eine negative Ladung an dieser Stelle scheint Grundvoraussetzung für den Elektronentransfer auf CYP zu sein. In gleicher Weise kann die Analyse der primären Interaktionsstelle (**Abb. 5.2**) nicht erklären, warum Etp1<sup>fd</sup> und Yah1 sich in ihrer Spezifität für CYP deutlich voneinander unterscheiden. Etp1<sup>fd</sup> ähnelt eher Fdx1, während Yah1 eher Fdx2 mit der Mutation R73E ähnelt. Der einzige mit dieser Unterscheidung konsistente Rest D68 (P68 in Fdx2 und Yah1) wurde bereits als nicht wichtig für den Elektronentransfer auf CYP11A1 beschrieben (Coghlan & Vickery, 1991). Umgekehrt wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die entsprechende Region nicht wichtig für die ISC-Funktion von Fdx2 ist.

### 5.1.3. Der mögliche Einfluss des Dipolmoments der Ferredoxine auf ihre Funktionsspezifitäten

Die erfolgreiche Einführung einer ISC-Funktion in Fdx1 gelang durch Austausch der 27 C-terminalen Reste von Fdx1 gegen die entsprechenden Aminosäuren aus Fdx2 in Kombination mit weiteren Mutationen. Die erzeugte ISC-Funktionalität war partiell im Vergleich zu Fdx2. Ebenfalls erfolgreich war die Erzeugung von Elektronentransferaktivität auf CYP durch Einführung der Schlüsselmutation R73E in Fdx2. Gleichzeitig störte der C-Terminus von Fdx2 den Elektronentransfer auf CYP nicht und der Unterschied im Cortisolumsatz von Fdx2 Proteinen mit der Mutation R73E mit und ohne den C-Terminus des Proteins war fast ununterscheidbar. Im Vergleich zu Fdx1 war der Umsatz um den Faktor 12 geringer, die erzeugte Elektronenübertragungsfunktionalität also wieder partiell. Es scheint daher wahrscheinlich, dass neben den in dieser Arbeit bestimmten, bedeutsamen Aminosäureresten und Bereichen der humanen Ferredoxine, auch globale Eigenschaften der Proteine einen Beitrag zur hohen Substratspezifität leisten.

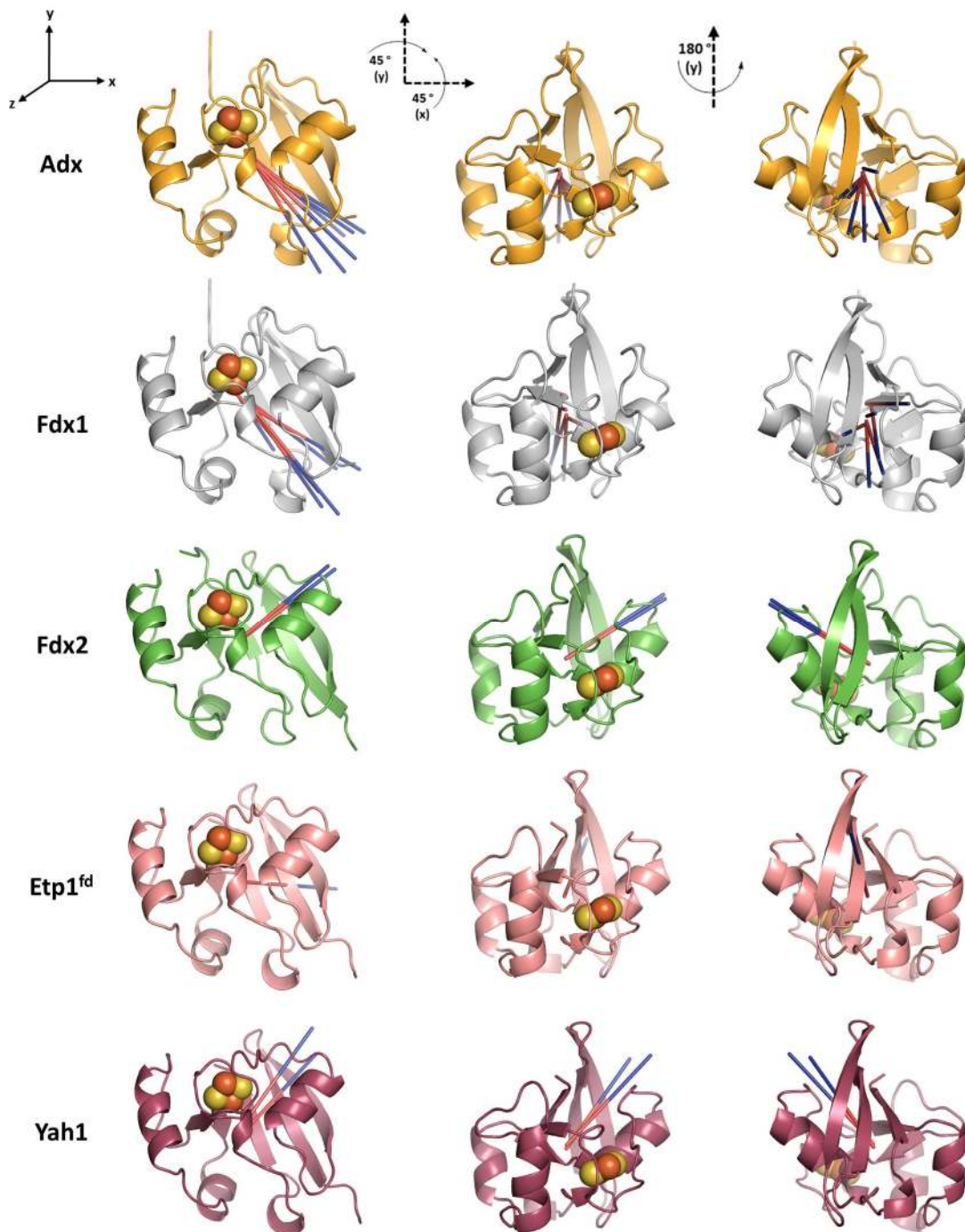
Die Ähnlichkeit der Elektronentransferaktivität auf CYP von Fdx2 mit der Mutation R73E mit und ohne den C-Terminus zeigt, dass die Unterschiede zwischen den Proteinen Fdx1 und Fdx2 auch in den Kernbereichen ohne den C-Terminus liegen. Ein Vergleich der Strukturen der C-terminal verkürzten Proteine im Hinblick auf biophysikalische Eigenschaften sollte daher hilfreich für das Verständnis der funktionellen Unterschiede sein. Die elektrostatischen Oberflächenpotentiale von Fdx1 und Fdx2 unterscheiden sich deutlich voneinander (**Abb. 5.4**), obwohl der pI-Wert der Proteine ähnlich ist (4,57 für Fdx1; 4,70 für Fdx2). Geladene Aminosäuren scheinen in Fdx2 eher gleichmäßig über die Proteinoberfläche verteilt zu sein, während in Fdx1 eine deutliche Ladungsseparation zu beobachten ist.



**Abbildung 5.4 (Seite 129): Fdx1 und Fdx2 zeigen eine unterschiedliche Verteilung der Oberflächenladungen.** (A) Elektrostatische Oberflächenpotentiale von humanem Fdx1 (links, Modell wie in Abb. 4.5) und Fdx2 (rechts, 2Y5C) wurden mit dem „Adaptive Poisson-Boltzmann Solver plugin“ für Pymol berechnet (Baker et al, 2001). Rot, negative geladene Aminosäuren; blau, positiv geladene Aminosäuren. (B) Darstellung von Fdx1 und Fdx2 in der gleichen Orientierung wie in (A). Die wichtigsten Reste der primären Interaktionsstelle in  $\alpha$ -Helix F sind dargestellt: die Reste 72, 76 und 79 sind wichtig für die FdxR-Bindung und Rest 73 ist kritisch für den Elektronentransfer zu CYP.

Protein-Protein-Wechselwirkungen bei Elektronentransferreaktionen existieren für eine Lebensdauer von Millisekunden und sind durch  $K_d$ -Werte im millimolarem bis mikromolarem Bereich gekennzeichnet (Bendall, 1996; Gray & Winkler, 2010; Hannemann et al, 2009). Prinzipiell können drei Phasen der Reaktion unterschieden werden: 1. Ausbildung eines aktiven Donator-Akzeptor-Komplexes, 2. Transfer eines Elektrons durch Elektronentunneln und 3. Dissoziation der beiden Komponenten (Gray & Winkler, 2005). Die Kurzlebigkeit der Elektronentransferkomplexe erschwert die Untersuchung des Prozesses der Elektronenübertragung zwischen Proteinen, da die Übergangszustände nur schwer vorhergesagt werden können (Gray & Winkler, 2010). Es wird aber angenommen, dass sich die Proteine vor allem durch elektrostatische Wechselwirkungen einander nähern, was durch das Proteindipolmoment und das externe elektrische Feld beeinflusst werden sollte (Hannemann et al, 2009). Diese elektrostatische Steuerung der Proteininteraktion führt vermutlich zur Ausbildung eines spezifischen „*encounter complex*“ (Selzer & Schreiber, 2001), der letztlich zur Ausbildung des aktiven Elektronentransferkomplexes führt (Hannemann et al, 2009). Um zu untersuchen, ob das Dipolmoment der humanen Ferredoxine Fdx1 und Fdx2 eine Erklärung für die Funktionsspezifitäten liefern kann, wurden die Dipolmomente mit Hilfe des „Protein Dipole Moments Server“ (<http://bioinfo.weizmann.ac.il/dipol/>) (Felder et al, 2007) bestimmt und miteinander verglichen (**Abb. 5.5**). Der Betrag des Dipolmomentes in Adx und Fdx1 ist je nach verwendetem Monomer gewissen Schwankungen unterworfen. Ebenso variiert die Orientierung etwas, dennoch scheint sie im Mittel nahezu identisch zu sein. Dies passt gut zur beobachteten homologen Funktion der beiden Proteine und zeigt an, dass die Berechnungen im Rahmen gewisser Schwankungen sinnvolle Ergebnisse lieferten. Interessanterweise weist sogar das Dipolmoment des Volllängen Fdx1-Proteins (3P1M) trotz der ungewöhnlichen Anordnung des C-Terminus (siehe **Abb. 4.12**) in eine ähnliche Richtung wie bei C-terminal verkürztem Fdx1. Der C-Terminus scheint daher für die Orientierung des Dipolmoments in Fdx1 nicht ausschlaggebend zu sein. Die Beobachtung, dass C-terminal verkürztes Adx immer noch genauso gut Elektronen an CYP liefern kann wie das Volllängenprotein (Cupp & Vickery, 1989), unterstützt in diesem Zusammenhang die Betrachtung der Ferredoxine ohne C-Terminus. Bemerkenswerterweise ist der Dipolmomentvektor von Fdx2 nahezu senkrecht zu dem von Fdx1 orientiert. Derjenige von Etp1<sup>fd</sup> liegt zwischen dem von Fdx1 und Fdx2 und das Dipolmoment von Yah1 ähnelt mehr dem von Fdx2. Dies passt gut zur Beobachtung, dass Fdx1 und Adx nahezu gleichen Cortisolumsatz katalysieren, während mit Fdx2 keine

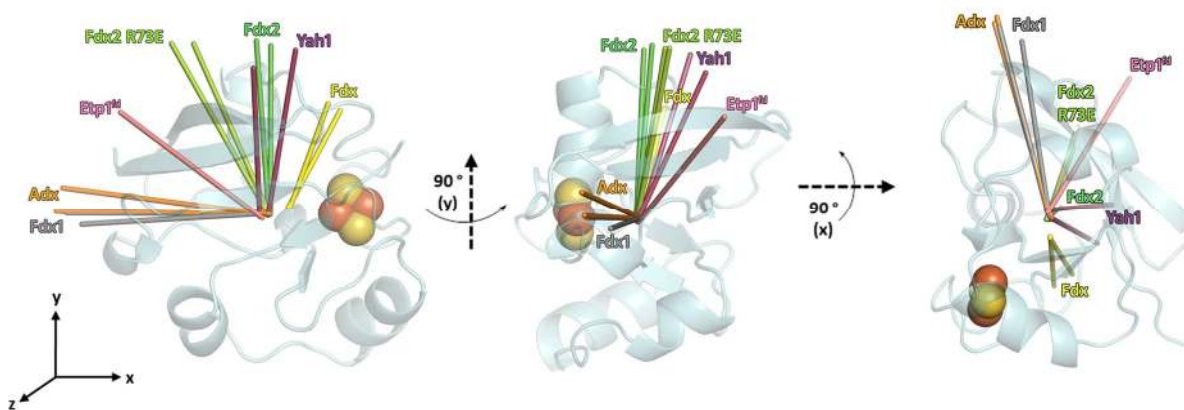
Elektronenübertragung möglich ist. Etp1<sup>fd</sup> liegt zwischen den beiden Extremwerten und Yah1 erlaubt nur mäßigen Elektronentransfer auf CYP.



**Abbildung 5.5: Unterschiede im Dipolmoment als mögliche Erklärung für die Funktionsspezifitäten von Fdx1 und Fdx2.**

Mittels des "Protein Dipole Moments Server" (Felder et al, 2007) wurden die Dipolmomente der bekannten Strukturen von bovinem Adx (1AYF; 1CJE; 1E6E), humanem Fdx1 (3P1M), humanem Fdx2 (2Y5C) und *S. pombe* Ferredoxin Etp1<sup>fd</sup> (2WLB) sowie der Strukturmodelle von humanem Fdx1 (basierend auf Adx 1AYF; Adx 1CJE; Adx 1E6E; Fdx2 2Y5C) und *S. cerevisiae* Yah1 (basierend auf Etp1<sup>fd</sup> 2WLB; Fdx2 2Y5C) berechnet. Alle Strukturmodelle wurden mit SWISS-MODEL (Arnold et al, 2006) berechnet. Das Dipolmoment wurde für monomeres Ferredoxin in der asymmetrischen Einheitszelle berechnet. Dargestellt ist das Dipolmoment durch eine rot-blaue Linie mit dem negativen Ende des Dipolmomentvektors in rot und dem positiven Ende in blau. Per Definition zeigt der Dipolmomentvektor vom Ladungsschwerpunkt der negativen Ladungen zum Schwerpunkt der positiven Ladungen. Jedes Ferredoxin ist in der Cartoon-Darstellung mit allen berechneten Dipolmomenten in drei unterschiedlichen Orientierungen gezeigt: Adx - orange, Fdx1 - grau, Fdx2 - grün, Etp1<sup>fd</sup> - lachsfarben, Yah1 - weinrot.

Zum Vergleich wurden das Dipolmoment der Fdx2 Punktmutation R73E und des IscFdx aus dem ISC-Gencluster von *E. coli* (Takahashi & Nakamura, 1999) berechnet (**Abb. 5.6**). Es zeigte sich, dass der Austausch von Arginin 73 gegen Glutamat das Dipolmoment von Fdx2 leicht veränderte, interessanterweise bewegt es sich auf den Dipolmomentvektor von Fdx1 zu. Das Dipolmoment von IscFdx ist völlig verschieden von dem von Fdx1 und ähnelt von der Orientierung her eher dem von Fdx2. Folglich sollte mit es auch nicht zum Elektronentransfer auf CYP fähig sein. Dies passt dazu, dass keine Notwendigkeit für eine solche Funktion besteht, da *E. coli* keine Cytochrom P450 abhängigen Enzyme besitzt (Omura, 2010).



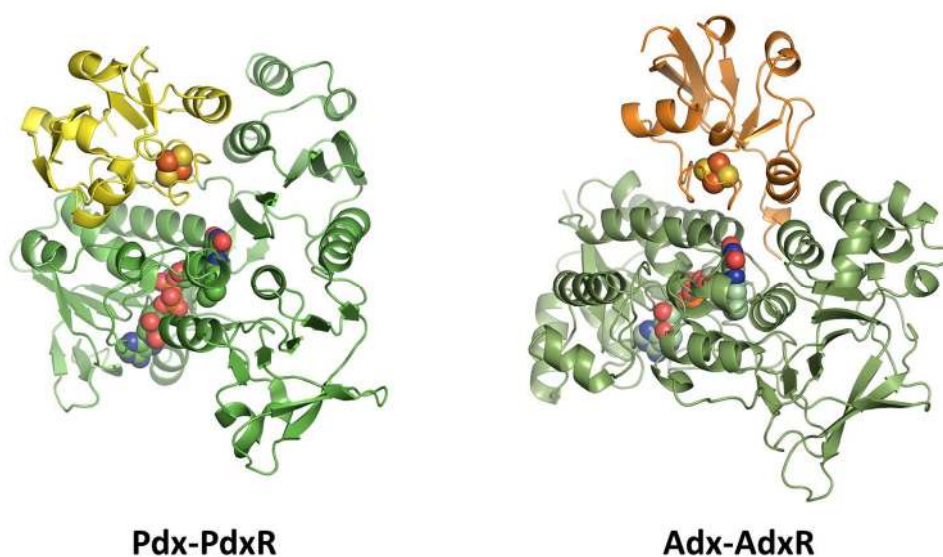
**Abbildung 5.6:** Änderung des Dipolmomentes durch den Austausch von R73 in Fdx2 und Vergleich mit dem ISC Ferredoxin aus *E. coli*. Die Berechnung des Dipolmomentes erfolgte wie bei Abb. 5.5. Dargestellt sind die Dipolmomente verschiedener Ferredoxine in der Struktur von Adx. Der Dipolmomentvektor beginnt jeweils im Protein und ist nach außen orientiert. Es wurden repräsentative Dipolmomente ausgewählt, die am ehesten dem Mittelwert des Ensembles der Dipolmomente aus Abb. 5.5 entsprachen: Adx - orange, Fdx1 - grau, Fdx2 - grün, Fdx2 R73E - hellgrün, Etp1<sup>fd</sup> - lachsfarben, Yah1 - violett, Fdx - gelb (IscFdx aus *E. coli*, 117H (Kakuta et al, 2001)).

Welche Bedeutung spielen nun die verschiedenen Parameter für den Elektronentransport der Ferredoxine? Eine Grundvoraussetzung für die Übertragung von eukaryotischen MB-Typ Ferredoxinen auf CYP scheint eine negative Ladung an Position 73 zu sein. Das Dipolmoment könnte eine Rolle bei der Ausbildung eines aktiven Elektronentransferkomplexes spielen. Je ungünstiger die Orientierung des Dipolmomentes, desto ineffizienter die Ausbildung des aktiven Elektronentransferkomplexes. Dabei scheint nicht unbedingt die Größe des Dipolmomentes eine wichtige Rolle zu spielen, sondern seine Orientierung. Es konnte gezeigt werden, dass Adx mit verringertem Dipolmoment immer noch genauso gut Elektronen übertragen kann wie Wild-Typ Adx (Hannemann et al, 2009). In der durchgeführten Studie wies das Dipolmoment immer in eine ähnliche Richtung, der Steuerungseffekt könnte daher auch für die Adx-Proteine mit geringerem Dipolmoment gleich sein.



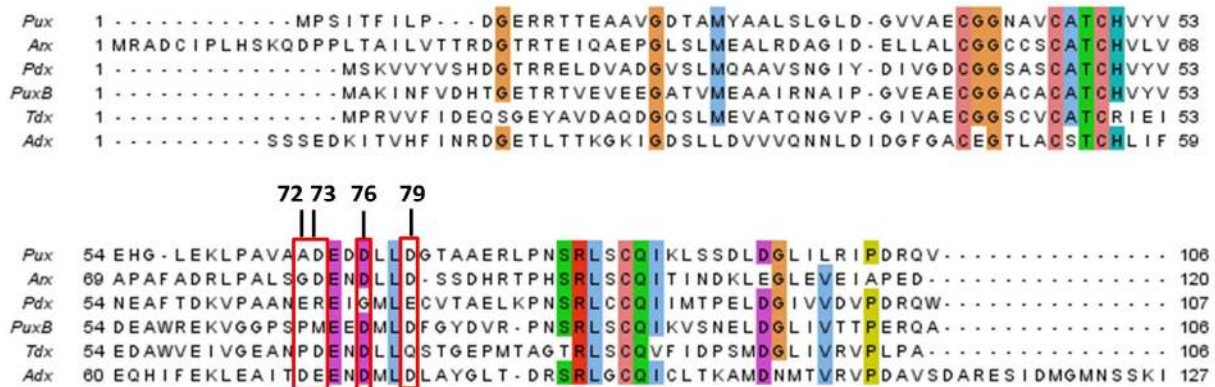
#### 5.1.4. Vergleich von eukaryotischen mit bakteriellen Ferredoxinen vom MB-Typ mit Elektronentransferaktivität auf CYP

In Bakterien wurden ebenfalls [2Fe-2S] Ferredoxine gefunden, die strukturell ähnlich zum eukaryotischen Adrenodoxin sind. Daher wurden diese Proteine der gleichen Proteinfamilie, genannt Wirbeltier-Typ Ferredoxine, zugeordnet (Ewen et al, 2011). In dieser Arbeit wird für diese Proteinfamilie die Bezeichnung MB-Typ Ferredoxine (**M**itochondrien-**B**akterien-Typ Ferredoxine) verwendet, da die Benutzung „Wirbeltier-Typ“ Ferredoxine für pilzliche und bakterielle Proteine verwirrend ist. Während die bakteriellen IscFdx Proteine, Mitglieder der MB-Typ Ferredoxinfamilie, für die Biogenese von Fe/S-Clustern bedeutsam sind (Bandyopadhyay et al, 2008a; Sainz et al, 2006), existieren in einigen Prokaryoten auch CYP, für deren Funktion MB-Typ Ferredoxine benötigt werden. Daneben existieren eine ganze Reihe weiterer CYP, die ihre Elektronen von „echten“ bakteriellen Ferredoxinen erhalten (Hannemann et al, 2007). Diese enthalten Fe/S-Cluster vom [3Fe-4S] oder [4Fe-4S] Typ oder Kombinationen von ihnen. Von den bakteriellen Ferredoxinen vom MB-Typ mit einer Funktion in der Elektronenübertragung auf CYP am besten charakterisiert ist das [2Fe-2S] Ferredoxin Putidaredoxin (Pdx) aus *Pseudomonas putida* (Sevrioukova & Poulos, 2011). Obwohl Pdx und das eukaryotische Adx (Fdx1) Elektronen auf CYP übertragen, kann Pdx funktionell nicht durch Adx ersetzt werden (Lipscomb et al, 1976). In Übereinstimmung hiermit unterscheidet sich bereits die Bindung von bakteriellem Pdx von der von eukaryotischen Adx an die jeweilige Oxidoreduktase. Dokumentiert wird dies einerseits durch die Strukturen der Komplexe von chemisch quervernetztem Adx und AdxR sowie Pdx und PdxR (Putidaredoxinoxidoreduktase) (**Abb. 5.7**) und andererseits durch die Beobachtung, dass beide Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> Oxidoreduktasen (EC 1.18.1.2) phylogenetisch und strukturell nicht verwandten Proteinfamilien angehören (Aliverti et al, 2008).



**Abbildung 5.7: Strukturelle Unterschiede zwischen den Komplexen Pdx-PdxR und Adx-AdxR.** Links: Darstellung des Komplexes aus Pdx (gelb) und PdxR (hellgrün) 3LB8 (Sevrioukova et al, 2010). Rechts: Darstellung des Komplexes von Adx (orange) und AdxR (dunkelgrün) 1E6E (Muller et al, 2001b). Der FAD-Kofaktor und der [2Fe-2S] Cluster sind jeweils in der Kugeldarstellung abgebildet.

Auch der Vergleich von Fdx1 (Adx) mit anderen bakteriellen [2Fe-2S] Ferredoxinen mit Elektronentransferaktivität auf CYP zeigt deutliche Unterschiede. Die für die Interaktion von Adx (Fdx1) wichtigsten Reste 72, 73, 76 und 79 sind nicht konserviert (**Abb. 5.8**). Dies deutet bereits auf verschiedene Bindungswechselwirkungen der unterschiedlichen Ferredoxine hin, auch wenn sie an ähnlichen physiologischen Prozessen beteiligt sind. Dieser Befund stellt somit ein weiteres Beispiel für die komplizierten Unterschiede zwischen den auf den ersten Blick recht einfach organisierten MB-Typ Ferredoxinen dar.



**Abbildung 5.8: Vergleich von MB-Typ Ferredoxinen mit Elektronentransferaktivität zu CYP, bakteriellen Ferredoxinen und eukaryotischem Adx.** Multi-Sequenzalignment von bakteriellen CYP Ferredoxinen mit dem eukaryotischen Ferredoxin Adx erstellt mit ClustalW2 (Chenna et al, 2003) und bearbeitet mit Jalview (Waterhouse et al, 2009). In mindestens 5 von 6 Ferredoxinen identische Reste sind farbig unterlegt. Die für die CYP Bindung von Adx kritischen Reste sind mit roten Rahmen markiert. Palustrisredoxin aus *Rhodopseudomonas palustris* (Pux (Bell et al, 2006)), Ferredoxin aus *Novosphingobium aromaticivorans* (Arx, (Yang et al, 2010)), Putidaredoxin aus *Pseudomonas putida* (Pdx, (Sevrioukova & Poulos, 2011)), Palustrisredoxin B aus *Rhodopseudomonas palustris* (PuxB (Bell et al, 2010)), Terpredoxin aus *Pseudomonas sp.* (Tdx, (Peterson et al, 1992)).

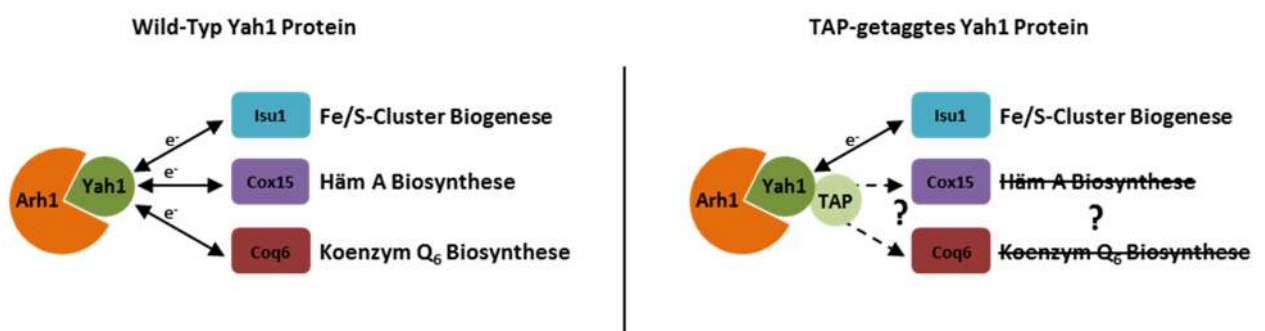
## 5.2. Mitochondriale Fe/S-Cluster Assemblierung auf dem Gerüstprotein Isu1

### 5.2.1. Das mitochondriale Ferredoxin Yah1 bindet an Isu1

Die genaue molekulare Funktion des einzigen mitochondrialen Ferredoxins Yah1 aus *S. cerevisiae* in der Biogenese von Fe/S-Clustern ist nicht geklärt. Vorstellbar ist, dass die gelieferten Elektronen für die Reduktion von Schwefel  $S^0$  in Cystein zu Sulfid  $S^{2-}$  in Fe/S-Clustern verwendet werden (Lill, 2009; Muhlenhoff et al, 2003). Durch *in vitro* Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass im bakteriellen ISC-System von *A. vinelandii* bakterielles ISC-Ferredoxin Elektronen für die reduktive Kopplung zweier [2Fe-2S] Cluster zu einem [4Fe-4S] Cluster liefert (Chandramouli et al, 2007; Unciuleac et al, 2007). Ob dieser Prozess auch in der eukaryotischen ISC-Maschinerie wichtig ist, wurde noch nicht geklärt. Allerdings scheint klar, dass dies höchstens eine zusätzliche Funktion von Yah1 in Hefe sein kann: Die Depletion von Yah1 führte zur einer deutlichen Verringerung der Fe/S-

Cluster Assemblierung in Isu1, während die Depletion des späten ISC-Faktors Ssq1 zur einer Akkumulation von Fe/S-Clustern in Isu1 führte (Muhlenhoff et al, 2003). Folglich wird Yah1 direkt für die Fe/S-Cluster Assemblierung in Isu1 benötigt und nicht nur für den Transfer der vorgefertigten Fe/S-Cluster in Zielproteine. Grundsätzlich kommen im Wesentlichen zwei ISC-Komponenten als Interaktionspartner von Yah1 in Frage: der Desulfurasekomplex Nfs1-Isd11 oder die Gerüstproteine Isu1/Isu2. Trotzdem gab es bis jetzt keine experimentellen Belege für einen *in vivo* Interaktionspartner von Yah1 in der Fe/S-Cluster-Biogenese, was vor allem auf den transienten Charakter und die kurze Lebensdauer von Elektronentransferkomplexes zurückzuführen ist (Bendall, 1996; Gray & Winkler, 2010). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Yah1 unter bestimmten Umständen mit Isu1 *in vivo* interagiert. Diese Interaktion konnte durch *in vitro* Experimente verifiziert werden, wobei die Kurzlebigkeit der Interaktion hochempfindliche Methoden (SPR) oder extreme Bedingungen wie geringe Ionenstärke erforderte.

Die gezeigte *in vivo* Interaktion erfolgte mit TAP-getaggttem Yah1 Protein. In Übereinstimmung mit vorhergehenden Studien (Gerber et al, 2003), konnte die Interaktion mit dem Wild-Typ Yah1 Protein nicht gezeigt werden. Interessanterweise zeigte der Hefestamm YAH1TAP, der ausschließlich TAP-getaggttes Yah1 synthetisieren kann, den gleichen Wachstumsphänotyp wie Fdx2-komplementierte, Yah1-depletierte Gal-YAH1 Zellen. In beiden Fällen wird Wachstum unter fermentativen Bedingungen beobachtet, während kein Wachstum möglich ist auf respiratorischen Kohlenstoffquellen wie Glycerol. Der TAP-tag am C-Terminus interferiert demnach mit wenigstens einer der zwei bekannten respiratorischen Funktionen von Yah1 - der Häm A Biosynthese oder der Biosynthese von Koenzym Q<sub>6</sub> (**Abb. 5.9**).



**Abbildung 5.9:** Der C-terminale TAP-Tag stört mindestens eine der beiden respiratorischen Funktionen von Yah1. Schema zur Veranschaulichung der mindestens drei Funktionen der mitochondrialen Elektronentransferrichtung bestehend aus der Ferredoxinoxidoreduktase Arh1 und dem Ferredoxin Yah1. Die Elektronen werden für die Biogenese von Fe/S-Clustern sowie zur Biosynthese von Häm A (Barros et al, 2001; Barros et al, 2002) und Koenzym Q<sub>6</sub> benötigt (Pierrel et al, 2010)(F. Pierrel, persönliche Mitteilung). Yah1 interagiert dazu vermutlich mit Isu1, Cox15 und Coq6. Der TAP-Tag am C-Terminus von Yah1 verhindert den effektiven Transfer von Elektronen zu Coq6 und/oder Cox15 und führt so zu einem Verlust der Koenzym Q<sub>6</sub> Biosynthese oder der Häm A Biosynthese oder von beidem.

In den Mitochondrien von YAH1TAP Zellen konnte keine Aktivität der Häm A abhängigen Cytochrom *c* Oxidase (COX) oder der Koenzym Q<sub>6</sub> abhängigen Reaktion von Succinatdehydrogenase gekoppelt mit Cytochrom *bc*<sub>1</sub> Komplex (SDH-*bc*<sub>1</sub>) gemessen werden. Dies könnte dahingehend interpretiert werden, dass beide Biosynthese-Prozesse nicht mehr funktionell sind. Da allerdings fehlendes Koenzym Q<sub>6</sub> auch eine drastische Verringerung der COX-Aktivität zur Folge hat (Do et al, 2001), ist nicht zu entscheiden, ob die Häm A Biosynthese direkt oder indirekt betroffen ist. Da Yah1 an verschiedene Substrate binden muss, erfordern die Wechselwirkungen eine hohe Dynamik. Es wird vermutet, dass der C-terminale TAP-Tag diese Dynamik stört, indem er die Bindung von Yah1 an Isu1 verstärkt und die produktive Bindung von Yah1 an Coq6 und/oder Cox15 verhindert. Daher können die Elektronen von Yah1 nur noch effektiv zur Synthese von Fe/S-Clustern, nicht aber für die Häm A und/oder Koenzym Q<sub>6</sub> Biosynthese genutzt werden. Diese Hypothese erklärt den Verlust des Wachstums unter respiratorischen Bedingungen und den Nachweis der Yah1-Isu1 Interaktion im Hefestamm YAH1TAP. Die Wichtigkeit des C-Terminus von Yah1 ausschließlich für die respiratorischen Funktionen wird außerdem dadurch erhärtet, dass C-terminal verkürztes Yah1 funktionell war unter fermentativen Bedingungen, nicht aber unter respiratorischen Bedingungen.

### 5.2.2. Fe/S-Cluster-Biosynthese auf U-Typ Gerüstproteinen

Die zentralen Gerüstproteine der mitochondrialen ISC-Maschinerie sind U-Typ Gerüstproteine (Isu1/Isu2 in Hefe (Gerber et al, 2004; Muhlenhoff et al, 2003) und IscU in Mensch (Tong & Rouault, 2006)). Der biochemische Mechanismus der *de novo* Fe/S-Cluster Assemblierung auf diesen Proteinen ist noch nicht endgültig verstanden. Arbeiten mit dem homologen Protein der ISC-Maschinerie aus *A. vinelandii* haben einen heterotetrameren Komplex des IscU mit der bakteriellen Cysteindesulfurase IscS nachgewiesen (Agar et al, 2000b). Unter anaeroben Bedingungen kann IscS-vermittelt in Gegenwart von Cystein, Fe<sup>2+</sup> und 5 mM 2-Mercaptoethanol ein [2Fe-2S] Cluster auf einem IscU-Dimer assembliert werden (Agar et al, 2000b). Die Rekonstitution eines Fe/S-Clusters gelang auf analoge Weise auch in NifU mit Hilfe von NifS aus dem NIF-System von *A. vinelandii* (Yuvaniyama et al, 2000). Bei weiterer Inkubation von IscU in Gegenwart von Cystein, Fe<sup>2+</sup> und 2-Mercaptoethanol bildeten sich zwei [2Fe-2S] und schließlich ein [4Fe-4S] Cluster je IscU-Dimer (Agar et al, 2000a). Schließlich wurde gezeigt, dass sich der letzte Schritt, die Kopplung der zwei [2Fe-2S] zu einem [4Fe-4S] Cluster durch Dithionit und partiell durch reduziertes IscFdx stimulieren lassen (Chandramouli et al, 2007). Da außerdem der Transfer des [4Fe-4S] Clusters auf die Apoform der Aconitase gezeigt werden konnte, wurde postuliert, dass dies der allgemeine Mechanismus zur Bildung von [4Fe-4S] Clustern sein könnte (Unciuleac et al, 2007). Inzwischen wurde in einer *in vivo* Studie gezeigt, dass IscU aus *A. vinelandii* bei Überproduktion von ISC-Maschineriekomponenten in der Apoform sowie in der Holoform mit [2Fe-2S] Cluster Form

akkumuliert. Des Weiteren wurde in der gleichen Studie auch der Komplex IscU-IscS *in vivo* gefunden (Raulfs et al, 2008). Daher wird davon ausgegangen, dass die vorherigen *in vitro* Studien auch von Relevanz für das Verständnis der *in vivo* Fe/S-Cluster Biogenese sind. Die Bedeutung der Untersuchungen für die Bildung von [4Fe-4S] Clustern ist allerdings noch fraglich.

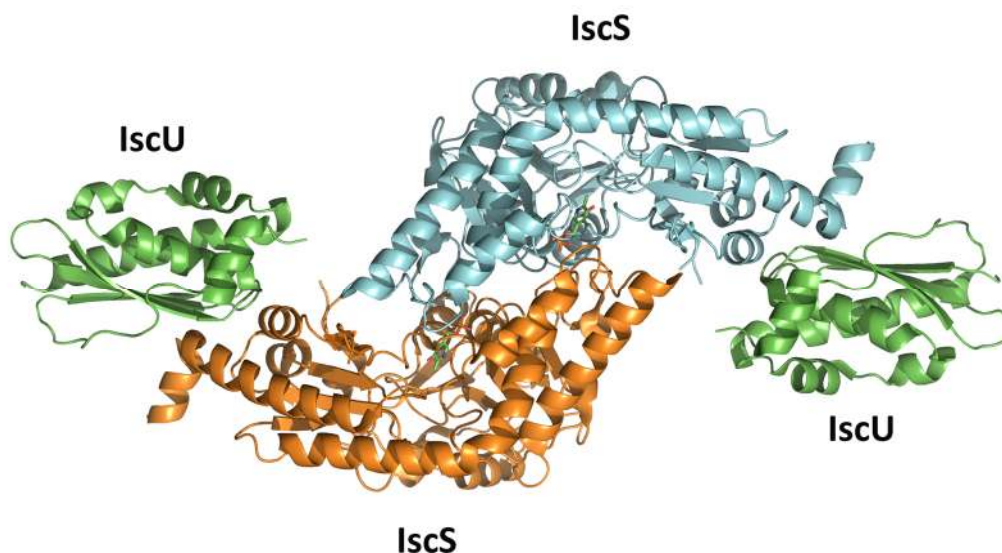
Arbeiten mit Mitochondrienlysaten und isolierter Cysteindesulfurase Nfs1 aus *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass für die unterstützende Funktion der Fe/S-Cluster Biosynthese eine Dithiol-haltige Komponente nötig ist (Muhlenhoff et al, 2002a). *In vitro* handelt es sich dabei in den meisten Fällen um DTT. Es setzt den als Persulfid-gebundenen Schwefel der Cysteindesulfurase frei (Urbina et al, 2001) und es ist bislang nicht klar, wie diese Freisetzung *in vivo* geschieht, da DTT kein Metabolit der Zelle ist.

Weitere *in vitro* Arbeiten mit den Proteinen der bakteriellen ISC-Maschinerie aus *E. coli* und *A. vinelandii* in Abwesenheit Thiol-haltiger Substanzen ergaben eine direkte Interaktion zwischen IscS und IscU (Smith et al, 2001), höchstwahrscheinlich über ein Persulfid zwischen zwei Cysteinseitenketten (Smith et al, 2005; Urbina et al, 2001). Da diese Reaktion in Abwesenheit von Eisen geschah, wurde vorgeschlagen, dass zuerst Schwefel und dann Eisen an das U-Typ Gerüstprotein binden. Auf der anderen Seite kann IscU auch in Abwesenheit von Schwefel Eisen binden, was zu der Annahme geführt hat, dass zuerst Eisen und danach Schwefel binden (Nuth et al, 2002).

Die Interaktion der zentralen Komponenten der ISC-Maschinerie Nfs1 und Isu1 wurde auch für *S. cerevisiae* beschrieben. Tatsächlich wurde sogar gefunden, dass auch Yfh1 (Frataxin) mit dem Komplex aus Nfs1 und Isu1 interagiert (Gerber et al, 2003). Die Funktion von Yfh1 ist hierbei noch nicht endgültig geklärt. Es wird angenommen, dass Yfh1 als Eisendonator fungiert, wobei davon ausgegangen wird, dass zuerst Fe(II) an Isu1 übertragen wird und danach die Übertragung des Schwefel stattfindet (Yoon & Cowan, 2003). Die Eisenbindung von Yfh1 (Frataxin) konnte in mehreren Studien gezeigt werden (Cook et al, 2006; Kondapalli et al, 2008; Li et al, 2009; Yoon & Cowan, 2003) und auch die Interaktion mit Isu1 wurde bereits beschrieben (Cook et al, 2010; Wang & Craig, 2008). Eine vor kurzem publizierte *in vitro* Arbeit mit humanem Frataxin deutet auf eine Rolle von Frataxin als allosterischen Aktivator der Cysteindesulfuraseaktivität hin (Tsai & Barondeau, 2010). Durch Frataxin wurde eine Erhöhung der Cysteindesulfuraseaktivität von humanem Nfs1 beobachtet, wobei dieser Effekt durch Zugabe von Fe<sup>2+</sup> nochmals stimuliert wurde (Tsai & Barondeau, 2010). Mechanistisch wurde vorgeschlagen, dass die Bindung von Frataxin die katalytisch aktive Schlaufe von Nfs1 in einer aktiveren Konformation stabilisiert. Trotz vieler offener Fragen besteht mittlerweile Einigkeit darüber, dass die Fe/S-Cluster Biogenese in der ISC-Maschinerie durch einen zentralen Proteinkomplex katalysiert wird. Dieser enthält im Unterschied zum bakteriellen System noch das Protein Isd11, dessen genaue Funktion in der Fe/S-Cluster Biogenese nicht bekannt

ist (Adam et al, 2006; Wiedemann et al, 2006). Der Fe/S-Cluster-Biosynthese-Kernkomplex besteht daher aus den vier Komponenten Nfs1, Isd11, Yfh1 sowie Isu1 und wurde auch im humanen System gefunden (Schmucker et al, 2011; Tsai & Barondeau, 2010). Interessanterweise wurde bis jetzt in keiner Studie eine Interaktion mit dem mitochondrialen Ferredoxin nachgewiesen. Selbst in einer aktuellen Studie in der FLAG-getaggtetes Frataxin präzipitiert und die kopräzipitierten Proteine massenspektroskopisch analysiert wurden, konnte kein Ferredoxin nachgewiesen werden (Schmucker et al, 2011). Dies zeigt, dass die beobachtete *in vivo* Interaktion von Yah1 und Isu1 auf den Einfluss des C-terminalen TAP-Tags zurückzuführen ist.

Auch in der bakteriellen ISC-Maschinerie interagiert die Desulfurase IscS mit dem Gerüstprotein IscU sowie dem bakteriellen Homologen von Frataxin CyaY (Prischi et al, 2010). Vor kurzem gelang durch die Bestimmung der 3D-Struktur des Komplexes von IscS und IscU aus *E. coli* ein wichtiger Fortschritt im Hinblick auf das Verständnis der Fe/S-Cluster Biosynthese (Shi et al, 2010) (**Abb. 5.10**).



**Abbildung 5.10: Struktur des IscS-IscU Komplexes, der zentralen Komponente des Fe/S-Cluster-Biosynthese-Kernkomplexes.** Darstellung des heterotetrameren IscS-IscU Komplexes mit IscU in grün und IscS in orange und cyan (3LVL (Shi et al, 2010)).

Dieser Komplex kann als Ausgangspunkt für weitere Studien angesehen werden und dazu dienen, den Prozess der Fe/S-Cluster Biogenese strukturell und mechanistisch besser zu verstehen. Durch Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) konnte mittlerweile sogar der bakterielle Komplex aus IscS, IscU und CyaY in Lösung charakterisiert werden (Prischi et al, 2010). Gleichmaßen wurden basierend auf der IscS-IscU Struktur ein Modell des eukaryotischen Nfs1-Isu1 Komplexes generiert und dieses durch die Kenntnis der für die Isu1-Yfh1 Interaktion wichtigen Reste um Yfh1 erweitert (Cook et al, 2010). Das erhaltene Modell passt gut zu den SAXS-Messungen des bakteriellen Komplexes und verdeutlicht, wie möglicherweise in Zukunft die komplexe Fe/S-Cluster Biosynthesemaschinerie Schritt für Schritt rekonstruiert werden könnte.

### **5.3. Die Rolle des WD-Repeat Proteins Cia1 als zentrale Interaktionsplattform der CIA-Maschinerie**

#### **5.3.1. Die Interaktionen des $\beta$ -Propeller Proteins Cia1 mit weiteren CIA-Komponenten**

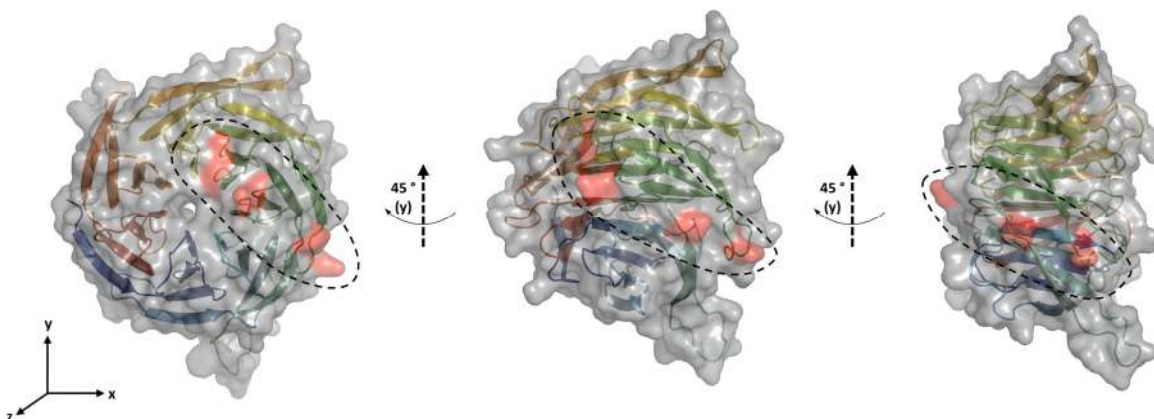
Das WD-Repeat Protein Cia1 ist essentiell für die Übertragung von Fe/S-Clustern vom zytosolischen Gerüstproteinkomplex Cfd1-Nbp35 (Netz et al, 2007) zu den Zielproteinen im Zytosol oder Nukleus der Hefezelle (Balk et al, 2005). Cia1 ist monomer und besteht nur aus einer einzigen WD-Repeat Domäne (Srinivasan et al, 2007), die für ihre Funktion als stabile Plattform für größere Proteinkomplexe bekannt sind (Smith, 2008). Die Interaktion von Cia1 mit Nar1 ist bekannt und die Beobachtung, dass Cia1 in *S. pombe* in einem Fusionsgen mit Cfd1 vorkommt, deutet auf eine mögliche, schwache oder transiente Interaktion mit dem Gerüstproteinkomplex hin (Balk et al, 2005). Die Interaktion von Cia1 mit den weiteren CIA-Komponenten Cia2 und Met18 (J. Mascarenhas, persönliche Mitteilung) konnte in dieser Arbeit ebenso wie Interaktion mit Nar1 verifiziert werden. Tatsächlich konnten alle vier Proteine gemeinsam immunpräzipitiert werden, was auf die Existenz eines zytosolischen Fe/S-Cluster Biosynthesekomplexes hindeutet. Inzwischen gibt es erste Hinweise, dass Cia2 (*YHR122W*) tatsächlich an der zytosolischen Fe/S-Cluster Biogenese beteiligt ist (Weerapana et al, 2010). Met18 bzw. das humane Homologe Mmm19 sind als Hilfsproteine der Nukleotid-Exzisionsreparatur Maschinerie TFIIH von Eukaryoten bekannt sowie wichtig für die Transkription durch die RNA Polymerase II (Lauder et al, 1996; Lombaerts et al, 1997). Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass Mms19 mit der DNA-Helikase XPD (Rad3 in Hefe) interagiert (Seroz et al, 2000) und dieses Enzym einen Fe/S-Cluster enthält (Rudolf et al, 2006). Mms19 könnte daher für die Übertragung des Fe/S-Cluster auf das Zielprotein XPD wichtig sein und so eine Verbindung zwischen der zytosolischen Fe/S-Cluster Biosynthesemaschinerie und dem Zielprotein XPD darstellen. In Übereinstimmung damit wurde bei Deletion von Met18 in Hefe eine spezifische Verringerung des Rad3 Proteingehaltes gefunden (Kou et al, 2008). Mittlerweile konnte auch aus menschlichen Zellen ein Komplex aus Mms19, Cia1 (humanes Cia1) sowie Fam96B (humanes Cia2) isoliert werden, der nur etwas XPD und sonst keine weitere Untereinheiten des TFIIH Komplexes enthielt (Ito et al, 2010). Der Nachweis dieser vermuteten Zusammenhänge steht noch aus.

#### **5.3.2. Die klammerartige Bindung von Nar1 an Cia1 ist essentiell für die Fe/S-Proteinbiogenese**

Zum besseren Verständnis der Interaktionen von Cia1 wurde der Einfluss von Aminosäureaustauschen an der Proteinoberfläche auf die Funktion des Proteins untersucht. Von 13 mutierten Oberflächenresten zeigte lediglich der Austausch von Arginin 127 einen Effekt auf die Funktion von Cia1. Arginin 127 liegt auf der Proteinoberseite inmitten eines stark konservierten Bereichs des Proteins. Der Austausch dieser Aminosäure gegen Glutamat hatte einen partiellen Verlust der

spezifischen Proteinfunktion in der zytosolischen Fe/S-Cluster Biogenese zur Folge, ohne die Reifung mitochondrialer Fe/S-Proteine zu beeinflussen. Es konnte keine Koimmunpräzipitation mit Nar1 mehr beobachtet werden, während Met18 und Cia2 weiterhin stabil an Cia1 R127E gebunden waren. Die Kombination des Austausches von Arginin 127 mit der Mutation der Reste E104 oder E142 führte zu einem völligen Verlust der Proteinfunktion. Auch die gleichzeitige Mutation der Reste D79 oder Y173 mit R127E beeinträchtigte die Funktion von Cia1, jedoch behielt das mutierte Protein eine geringe Funktionalität. Die Interaktion Cia1-Nar1 war in allen diesen Fällen ebenfalls nicht mehr zu beobachten. Die koimmunpräzipitierte Menge an Nar1 war bereits gering bei nicht-mutiertem Cia1 Protein und schon bei der Mutation R127E konnte keine Koimmunpräzipitation von Nar1 mehr beobachtet werden, obwohl das mutierte Protein noch deutlich das Wachstum von Cia1-depletierten Hefezellen unterstützte. Durch den Austausch von Arginin 127 wird die Interaktion mit Nar1 so stark geschwächt, dass sie mit den verwendeten Koimmunpräzipitationsbedingungen nicht mehr nachweisbar war. Offensichtlich geht sie aber nicht völlig verloren, da die Funktion des Cia1 partiell erhalten blieb. Erst bei der zusätzlichen Mutation von E104 oder E142 geht die Interaktion mit Nar1 und damit die Funktion gänzlich verloren. Ganz ähnlich verhielt es sich mit dem zusätzlichen Austausch von Y173. Der Austausch der beiden hoch konservierten Reste D79 oder D270 hingegen beeinträchtigte die Funktion von Cia1 durch Destabilisierung des  $\beta$ -Propellers, so dass deutlich weniger Cia1 Protein gefunden wurde.

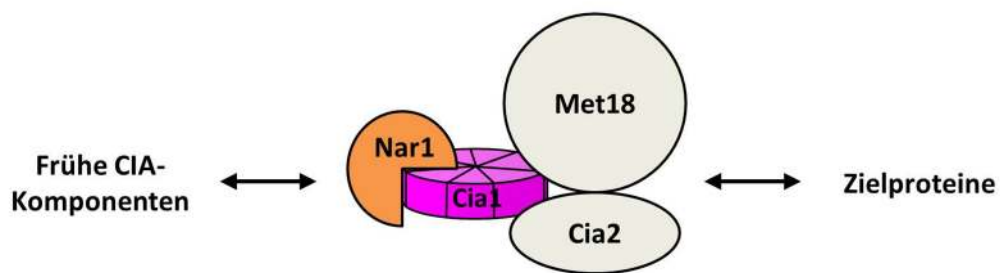
Zusammenfassend spielen daher die Reste E104, R127 und E142 sowie Y173 in Cia1 eine wichtige Rolle als direkte Bindungsstellen für Nar1. Da die Seitenkette von Y173 im Proteininneren liegt, kann Y173 nur über Rückgratwechselwirkungen an der Interaktion beteiligt sein. Alternativ könnte der Effekt der Mutation von Y173 auch indirekt über konformationelle Änderungen in Folge des Aminosäureaustausches erklärt werden. Aus der Lage der für die Nar1-Cia1 Interaktion wichtigen Reste (**Abb. 5.11**) wird ersichtlich, dass Nar1 von oben und seitlich an das Propellerblatt 3 des Cia1 bindet und sich so eine klammerartige Bindung ergibt.



**Abbildung 5.11: Darstellung der Bindestelle von Nar1 an Cia1.** Darstellung von Cia1 in drei unterschiedlichen Orientierungen mit den für die Interaktion mit Nar1 wichtigen Resten E104, R127, E142 und Y173 (rot markiert).



Die Aufrechterhaltung der Interaktion von Cia1 mit Cia2 und Met18 auch in Abwesenheit von Nar1 zeigt, dass die Bindung zu Cia2 und Met18 weitgehend unabhängig von Nar1 erfolgt. Dies bedeutet, dass zumindest ein weiterer Bindungsplatz auf Cia1 existieren sollte (**Abb. 5.12**). Dieser sollte in einem anderen Bereich als die Bindestelle von Nar1 liegen, da auch die gleichzeitige Bindung aller drei Proteine möglich ist. Bisher gibt es hinsichtlich der CIA-Maschinerie nur zu Cia1 strukturelle Informationen. Weitere strukturelle Studien werden nötig sein, um ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge bei der zytosolischen Fe/S-Cluster Biogenese zu erhalten.



**Abbildung 5.12: Modell des zytosolischen Fe/S-Protein Assemblierungskomplexes mit Cia1 als Kernkomponente.** Das Hydrogenase-ähnliche Protein Nar1 bindet klammerartig an die Oberfläche und Seite des Cia1 und interagiert wahrscheinlich mit frühen CIA-Komponenten wie dem Gerüstproteinkomplex Cfd1/Nbp35. Weitgehend unabhängig von Nar1 binden die beiden CIA-Komponenten Cia2 und Met18 an Cia1, wobei in weiteren Studien geklärt werden muss, ob beide Proteine unabhängig voneinander binden oder gekoppelt. Met18 wiederum interagiert mit dem Zielprotein Rad3 und vermittelt so vermutlich die Übertragung von Fe/S-Clustern zur Apoform von Rad3. Möglicherweise erfüllt Cia2 eine ähnliche Funktion für andere Zielproteine.

#### 5.4. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch detaillierte zellbiologische, biochemische, strukturelle und theoretische Untersuchungen neue Beiträge zum grundlegenden Verständnis der Spezifitäten von MB-Typ Ferredoxinen erarbeitet. Die Bestimmung der Struktur des humanen Ferredoxins Fdx2 erlaubte den Vergleich mit der bekannten Struktur des humanen Ferredoxins Fdx1. Die genetische und biochemische Analyse der beiden hoch verwandten humanen Proteine Fdx1 und Fdx2 erlaubte die Identifizierung von für die Substratspezifitäten dieser Proteine wichtigen Aminosäureresten. Es wurde außerdem festgestellt, dass auch globale Eigenschaften der beiden Proteine einen Beitrag zu den Spezifitäten in verschiedenen Elektronentransferprozessen liefern. Ein Teil der zusätzlichen Unterschiede könnte in der Ausrichtung des Dipolmoments der beiden humanen Ferredoxine begründet sein. Dies kann nun in weiteren Mutagenesestudien untersucht werden. Ein elektrostatischer Steuerungseffekt bei der Annäherung von Proteinen in Elektronentransferkomplexen wird schon lange vermutet, doch bis jetzt gibt es nur wenige

experimentelle Ergebnisse zur Überprüfung dieser Annahme (Depascalis et al, 1993; Hannemann et al, 2009). Insofern stellen die durchgeführten Studien einen wesentlichen Fortschritt zur Beantwortung dieser Fragestellung dar. Es wird interessant sein, ob in weiteren Untersuchungen mit MB-Typ Ferredoxinen aus Bakterien oder anderen Elektronentransferproteinen ähnliche Steuerungseffekte zu beobachten sein werden und der Steuerungseffekt tatsächlich als allgemeines Prinzip bei transienten Protein-Protein-Wechselwirkungen anzusehen ist.

Das Verständnis der Parameter, die während der Evolution die Spezifität eines Proteins erzeugten und optimierten, ist eine wichtige Basis für das zielgerichtete Design von Proteinen mit gewünschten Eigenschaften. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Spezifität der humanen Ferredoxine Fdx1 und Fdx2 sowie die Umfunktionalisierung der beiden Proteine sind daher auch biotechnologisch von Interesse. Besonders die durch Cytochrom P450 Enzyme katalysierten Aktivierungen von C-H-Bindungen, beispielsweise bei der Biosynthese von Steroidhormonen, könnten dabei das Ziel weiterer Untersuchungen zur Funktionsoptimierung und -generierung sein.

In Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* befinden sich sechs hoch verwandte Ferredoxine mit vermutlich unterschiedlichen Funktionen (Hanke et al, 2008; Hanke & Hase, 2008; Hanke et al, 2004; Voss et al, 2011). Sie unterscheiden sich charakteristisch von MB-Typ Ferredoxinen (siehe **Abb. 1.12**). Bislang gibt es noch keine Studien zur Erklärung der Funktionsspezifitäten dieser plastidären Proteine. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten in analoger Art auch mit den Pflanzen-Typ Ferredoxinen aus Chloroplasten durchgeführt werden, um Aussagen über die Substratspezifitäten dieser Proteine machen zu können. In diesem Zusammenhang wird es auch interessant sein zu sehen, ob neben einzelnen Aminosäureresten auch das Dipolmoment eine wichtige Rolle für die Substratspezifität spielt.

Der Nachweis der *in vivo* Interaktion des Hefe Ferredoxins Yah1 mit dem Gerüstprotein Isu1 stellt den ersten experimentellen Nachweis für eine direkte Wechselwirkung der Elektronentransferkette Arh1-Yah1 mit anderen Komponenten der mitochondrialen ISC-Maschinerie dar. Um den Prozess der *de novo* Fe/S-Cluster Assemblierung auf U-Typ Gerüstproteinen besser zu verstehen, bedarf es nun weiterer biochemischer und struktureller Studien, die die mechanistische Bedeutung dieser Interaktion für den Elektronenfluss aufklären. Die besondere Schwierigkeit dieser Arbeiten besteht dabei vor allem darin, die Relevanz der durch *in vitro* Experimente gefundenen Vorstellungen auch unter physiologischen Bedingungen *in vivo* nachzuweisen. Speziell der bis jetzt noch nicht geklärte physiologische Mechanismus des Schwefeltransfers und der Schwefelfreisetzung im Fe/S-Cluster-Biosynthese-Kernkomplex stellt eine Lücke im Verständnis des molekularen Mechanismus der Fe/S-Cluster Biosynthese dar. In diesem Zusammenhang wird es besonders hilfreich sein, nicht nur ISC-Einzelkomponenten, sondern ganze ISC-Komplexe strukturell zu charakterisieren, damit so die

genauen Wechselwirkungen und damit die möglichen Mechanismen zu klären sind. Die Röntgenstrukturuntersuchungen von Proteinkomplexen der bakteriellen ISC-Maschinerie durch Cygler und Mitarbeiter (Shi et al, 2010) sowie die strukturellen NMR Arbeiten von Pastore und Mitarbeitern (Prischi et al, 2010) stellen erste erfolgreiche Beispiele für solche Untersuchungen dar. Es wird außerdem von Interesse sein, welche biochemische Funktion das nur in Eukaryoten vorkommende Protein Isd11 erfüllt, und wieso sich die eukaryotische ISC-Maschinerie in diesem Punkt vom bakteriellen Pendant unterscheidet. Einen wertvollen Beitrag würde die Charakterisierung von Intermediaten der Fe/S-Cluster Biosynthese sowohl auf biochemischer als auch auf struktureller Ebene darstellen, was mit Sicherheit eine der herausforderndsten der zukünftigen Aufgaben ist.

Auch das Verständnis der Fe/S-Cluster Biosynthese im Zytosol von eukaryotischen Zellen erfordert die Beantwortung vieler offener Fragen. Die mechanistische Abhängigkeit der Assemblierung von Fe/S-Clustern auf dem Gerüstproteinkomplex Cfd1-Nbp35 mit der ISC-Export-Maschinerie stellt eines der Hauptprobleme der Fe/S-Proteinbiogenese dar. Dabei ist die Identität der aus den Mitochondrien exportierten Schwefelkomponente von herausragendem Interesse. Von den CIA-Komponenten ist bisher einzig die Struktur von Cia1 bekannt. Unter Nutzung dieser strukturellen Information konnte in dieser Arbeit die Interaktionsstelle von Cia1 mit Nar1 bestimmt werden, was ein erster Schritt zum mechanistischen Verständnis der molekularen Abläufe in der CIA-Maschinerie ist. Die strukturelle Charakterisierung weiterer CIA-Komponenten wird erforderlich sein, um die Details des Zusammenspiels der mittlerweile acht bekannten CIA-Komponenten bei der Synthese und Übertragung von Fe/S-Clustern in zytosolische Fe/S-Proteine zu verstehen. Es ist deshalb mit Sicherheit zu erwarten, dass auch die kommenden Jahre weitere wesentliche Erkenntnisse zum molekularen Mechanismus der Fe/S-Proteinbiogenese liefern werden.

## 6 Literatur

Adam AC, Bornhord C, Prokisch H, Neupert W, Hell K (2006) The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *Embo Journal* **25**: 174-183

Adinolfi S, Iannuzzi C, Prischi F, Pastore C, Iametti S, Martin SR, Bonomi F, Pastore A (2009) Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nature Structural & Molecular Biology* **16**: 390-396

Agar JN, Krebs C, Frazzon J, Huynh BH, Dean DR, Johnson MK (2000a) IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: Sequential assembly of 2Fe-2S and 4Fe-4S clusters in IscU. *Biochemistry* **39**: 7856-7862

Agar JN, Zheng LM, Cash VL, Dean DR, Johnson MK (2000b) Role of the IscU protein in iron-sulfur cluster biosynthesis: IscS-mediated assembly of a Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> cluster in IscU. *Journal of the American Chemical Society* **122**: 2136-2137

Albrecht AG, Netz DJA, Miethke M, Pierik AJ, Burghaus O, Peuckert F, Lill R, Marahiel MA (2010) SufU Is an Essential Iron-Sulfur Cluster Scaffold Protein in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **192**: 1643-1651

Albrecht AG, Peuckert F, Landmann H, Miethke M, Seubert A, Marahiel MA (2011) Mechanistic characterization of sulfur transfer from cysteine desulfurase SufS to the iron-sulfur scaffold SufU in *Bacillus subtilis*. *FEBS Letters* **585**: 465-470

Ali V, Shigeta Y, Tokumoto U, Takahashi Y, Nozaki T (2004) An intestinal parasitic protist, *Entamoeba histolytica*, possesses a non-redundant nitrogen fixation-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 16863-16874

Aliverti A, Pandini V, Pennati A, de Rosa M, Zanetti G (2008) Structural and functional diversity of ferredoxin-NADP(+) reductases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **474**: 283-291

Amutha B, Gordon DM, Gu YJ, Lyver ER, Dancis A, Pain D (2008) GTP is required for iron-sulfur cluster biogenesis in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 1362-1371

Andrew AJ, Dutkiewicz R, Knieszner H, Craig EA, Marszalek J (2006) Characterization of the interaction between the J-protein Jac1p and the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu1p. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 14580-14587

Annalora AJ, Goodin DB, Hong WX, Zhang QH, Johnson EF, Stout CD (2010) Crystal Structure of CYP24A1, a Mitochondrial Cytochrome P450 Involved in Vitamin D Metabolism. *Journal of Molecular Biology* **396**: 441-451

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**: 195-201

Ayala-Castro C, Saini A, Outten FW (2008) Fe-s cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**: 110-125

Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10037-10041

- Balk J, Aguilar Netz DJ, Tepper K, Pierik AJ, Lill R (2005) The Essential WD40 Protein Cia1 Is Involved in a Late Step of Cytosolic and Nuclear Iron-Sulfur Protein Assembly. *Mol Cell Biol* **25**: 10833-10841
- Balk J, Pierik AJ, Netz DJ, Muhlenhoff U, Lill R (2004) The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *Embo Journal* **23**: 2105-2115
- Balk J, Pilon M (2011) Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends Plant Sci* **in press**: DOI: 10.1016/j.tplants.2010.1012.1006
- Bandyopadhyay S, Chandramouli K, Johnson MK (2008a) Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biochemical Society Transactions* **36**: 1112-1119
- Bandyopadhyay S, Gama F, Molina-Navarro MM, Gualberto JM, Claxton R, Naik SG, Huynh BH, Herrero E, Jacquot JP, Johnson MK, Rouhier N (2008b) Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of 2Fe-2S clusters. *Embo Journal* **27**: 1122-1133
- Barros MH, Carlson CG, Glerum DM, Tzagoloff A (2001) Involvement of mitochondrial ferredoxin and Cox15p in hydroxylation of heme O. *Febs Letters* **492**: 133-138
- Barros MH, Nobrega FG, Tzagoloff A (2002) Mitochondrial ferredoxin is required for heme A synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 9997-10002
- Barthelme D, Dinkelaker S, Albers SV, Londei P, Ermler U, Tampe R (2011) Ribosome recycling depends on a mechanistic link between the FeS cluster domain and a conformational switch of the twin-ATPase ABCE1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 3228-3233
- Beckert V, Dettmer R, Bernhardt R (1994) Mutations of Tyrosine 82 in Bovine Adrenodoxin That Affect Binding to Cytochromes P45011A1 and P45011B1 but Not Electron-Transfer. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 2568-2573
- Beilke D, Weiss R, Lohr F, Pristovsek P, Hannemann F, Bernhardt R, Ruterjans H (2002) A new electron transport mechanism in mitochondrial steroid hydroxylase systems based on structural changes upon the reduction of adrenodoxin. *Biochemistry* **41**: 7969-7978
- Beinert H, Holm RH, Münck E (1997) Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular, Multipurpose Structures. *Science* **277**: 653-659
- Beinert H, Sands RH (1960) Studies on Succinic and DPNH Dehydrogenase preparations by Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **3**: 41-46
- Bell SG, Hoskins N, Xu F, Caprotti D, Rao ZH, Wong LL (2006) Cytochrome P450 enzymes from the metabolically diverse bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **342**: 191-196
- Bell SG, Xu F, Johnson EOD, Forward IM, Bartlam M, Rao ZH, Wong LL (2010) Protein recognition in ferredoxin-P450 electron transfer in the class I CYP199A2 system from *Rhodospseudomonas palustris*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **15**: 315-328
- Bendall D (1996) In *Protein Electron Transfer*, Bendall D (ed), pp 43-68. Oxford, UK: Garland Science

- Bennett J, Scott KJ (1971) Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Analytical Biochemistry* **43**: 173-182
- Berggard T, Linse S, James P (2007) Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* **7**: 2833-2842
- Biederbick A, Stehling O, Rosser R, Niggemeyer B, Nakai Y, Elsasser HP, Lill R (2006) Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Molecular and Cellular Biology* **26**: 5675-5687
- Binda C, Coda A, Aliverti A, Zanetti G, Mattevi A (1998) Structure of the mutant E92K of 2Fe-2S ferredoxin I from *Spinacia oleracea* at 1.7 angstrom resolution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **54**: 1353-1358
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523
- Bonomi F, Iametti S, Morleo A, Ta D, Vickery LE (2008) Studies on the Mechanism of Catalysis of Iron-Sulfur Cluster Transfer from IscU 2Fe2S by HscA/HscB Chaperones. *Biochemistry* **47**: 12795-12801
- Booker SJ, Cicchillo RM, Grove TL (2007) Self-sacrifice in radical S-adenosylmethionine proteins. *Current Opinion in Chemical Biology* **11**: 543-552
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brandt ME, Vickery LE (1993) Charge Pair Interactions Stabilizing Ferredoxin-Ferredoxin Reductase Complexes - Identification by Complementary Site-Specific Mutations. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 17126-17130
- Brunger AT (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**: 472-475
- Bych K, Kerscher S, Netz DJA, Pierik AJ, Zwicker K, Huynen MA, Lill R, Brandt U, Balk J (2008) The iron-sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. *Embo Journal* **27**: 1736-1746
- CCP4 (1994) The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D* **50**: 760-763
- Chahal HK, Dai YY, Saini A, Ayala-Castro C, Outten FW (2009) The SufBCD Fe-S Scaffold Complex Interacts with SufA for Fe-S Cluster Transfer. *Biochemistry* **48**: 10644-10653
- Chamngpol S, Dodson W, Cromie MJ, Harris ZL, Groisman EA (2002) Fe(III)-mediated cellular toxicity. *Mol Microbiol* **45**: 711-719
- Chan MK, Kim J, Rees DC (1993) The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair: 2.2 Å resolution structures. *Science* **260**: 792-794
- Chandramouli K, Johnson MK (2006) HscA and HscB stimulate 2Fe-2S cluster transfer from IscU to apoferredoxin in an ATP-dependent reaction. *Biochemistry* **45**: 11087-11095
- Chandramouli K, Unciuleac MC, Naik S, Dean DR, Huynh BH, Johnson MK (2007) Formation and properties of 4Fe-4S clusters on the IscU scaffold protein. *Biochemistry* **46**: 6804-6811

- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* **31**: 3497-3500
- Claros MG, Vincens P (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**: 779-786
- Coghlan VM, Vickery LE (1991) Site-specific Mutations in Human Ferredoxin That Affect Binding to Ferredoxin Reductase and Cytochrome P450<sub>osc</sub>. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 18606-18612
- Cook JD, Bencze KZ, Jankovic AD, Crater AK, Busch CN, Bradley PB, Stemmler AJ, Spaller MR, Stemmler TL (2006) Monomeric yeast frataxin is an iron-binding protein. *Biochemistry* **45**: 7767-7777
- Cook JD, Kondapalli KC, Rawat S, Childs WC, Murugesan Y, Dancis A, Stemmler TL (2010) Molecular Details of the Yeast Frataxin-Isul Interaction during Mitochondrial Fe-S Cluster Assembly. *Biochemistry* **49**: 8756-8765
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**: 10881-10890
- Couture JF, Collazo E, Trievel RC (2006) Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5. *Nature Structural & Molecular Biology* **13**: 698-703
- Crack JC, Green J, Le Brun NE, Thomson AJ (2006) Detection of sulfide release from the oxygen-sensing 4Fe-4S cluster of FNR. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 18909-18913
- Cupp JR, Vickery LE (1989) Adrenodoxin with a COOH-terminal Deletion (des 116-128) Exhibits Enhanced Activity. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 1602-1607
- Dagert M, Ehrlich SD (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Gene* **6**: 23-28
- Daum G, Bohni PC, Schatz G (1982) Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem* **257**: 13028-13033
- Dauter Z, Dauter M, Dodson E (2002) Jolly SAD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 494-506
- Davies DR, Segal, D. M. (1971) Protein crystallization: Micro techniques involving vapor diffusion. *Methods Enzymol* **22**: 266-269
- Degtyarenko KN, Kulikova TA (2001) Evolution of bioinorganic motifs in P450-containing systems. *Biochemical Society Transactions* **29**: 139-147
- Delano WD. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. <http://www.pymol.org>. DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA.
- Depascalis AR, Jelesarov I, Ackermann F, Koppenol WH, Hirasawa M, Knaff DB, Bosshard HR (1993) Binding of ferredoxin to ferredoxin: NADP<sup>+</sup> oxidoreductase: The role of carboxyl groups, electrostatic surface potential, and molecular dipole moment. *Protein Science* **2**: 1126-1135

- Dervarti DV, Ormejohn WH, Hansen RE, Beinert H, Tsai RL, Tsibris JCM, Bartholo.Rc, Gunsalus IC (1967) Identification of sulfur as component of the EPR signal at g equals 1.94 by isotopic substitution. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **26**: 569-576
- Devireddy LR, Hart DO, Goetz D, Green MR (2010) A Mammalian Siderophore Synthesized by an Enzyme with a Bacterial Homologue Involved in Enterobactin Production. *Cell* **141**: 1006-1017
- Diekert K, de Kroon AI, Kispal G, Lill R (2001) Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol* **65**: 37-51
- Do TQ, Hsu AY, Jonassen T, Lee PT, Clarke CF (2001) A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* abc1 mutants. *J Biol Chem* **276**: 18161-18168
- Dodson E (2003) Is it jolly SAD? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**: 1958-1965
- Dou YL, Milne TA, Ruthenburg AJ, Lee S, Lee JW, Verdine GL, Allis CD, Roeder RG (2006) Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nature Structural & Molecular Biology* **13**: 713-719
- Dupuy J, Volbeda A, Carpentier P, Darnault C, Moulis JM, Fontecilla-Camps JC (2006) Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase. *Structure* **14**: 129-139
- Dutkiewicz R, Schilke B, Cheng S, Knieszner H, Craig EA, Marszalek J (2004) Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their in vivo function. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 29167-29174
- Dutkiewicz R, Schilke B, Knieszner H, Walter W, Craig EA, Marszalek J (2003) Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis. Similarities to and differences from its bacterial counterpart. *J Biol Chem* **278**: 29719-29727
- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D* **60**: 2126-2132
- Ewen KM, Kleser M, Bernhardt R (2011) Adrenodoxin: The archetype of vertebrate-type 2Fe-2S cluster ferredoxins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **1814**: 111-125
- Fansler B, Lowenstein JM (1969) Aconitase from pig heart. *Methods in Enzymology* **13**: 26-30
- Felder CE, Prilusky J, Silman I, Sussman JL (2007) A server and database for dipole moments of proteins. *Nucleic Acids Research* **35**: W512-W521
- Flint DH (1996) *Escherichia coli* contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the nifS gene of *Azotobacter vinelandii* and that can participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 16068-16074
- Fontecave M, Ollagnier-De-Choudens S (2008) Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **474**: 226-237
- Ford CE, Skiba NP, Bae HS, Daaka YH, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng GZ, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE (1998) Molecular basis for interactions of G protein beta gamma subunits with effectors. *Science* **280**: 1271-1274



Garland SA, Hoff K, Vickery LE, Culotta VC (1999) Saccharomyces cerevisiae ISU1 and ISU2: Members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *Journal of Molecular Biology* **294**: 897-907

Gavin A-C, Aloy P, Grandi P, Krause R, Boesche M, Marzioch M, Rau C, Jensen LJ, Bastuck S, Dumpelfeld B, Edlmann A, Heurtier M-A, Hoffman V, Hoefert C, Klein K, Hudak M, Michon A-M, Schelder M, Schirle M, Remor M, Rudi T, Hooper S, Bauer A, Bouwmeester T, Casari G, Drewes G, Neubauer G, Rick JM, Kuster B, Bork P, Russell RB, Superti-Furga G (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**: 631-636

Gavin A-C, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon A-M, Cruciat C-M, Remor M, Hofert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier M-A, Copley RR, Edlmann A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G, Superti-Furga G (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**: 141-147

Gelling C, Dawes IW, Richhardt N, Lill R, Mühlenhoff U (2008) Mitochondrial Iba57p Is Required for Fe/S Cluster Formation on Aconitase and Activation of Radical SAM Enzymes<sup>†</sup>. *Mol Cell Biol* **28**: 1851-1861

Gerber J, Mühlenhoff U, Lill R (2003) An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *Embo Reports* **4**: 906-911

Gerber J, Neumann K, Prohl C, Mühlenhoff U, Lill R (2004) The yeast scaffold proteins Isu1p and Isu2p are required inside mitochondria for maturation of cytosolic Fe/S proteins. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 4848-4857

Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**: 87-96

Gill SC, von Hippel PH (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**: 319-326

Goldberg AV, Molik S, Tsaousis AD, Neumann K, Kuhnke G, Delbac F, Vivares CP, Hirt RP, Lill R, Embley TM (2008) Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature* **452**: 624-629

Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metz F (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**: 305-308

Gray HB, Winkler JR (2005) Long-range electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3534-3539

Gray HB, Winkler JR (2010) Electron flow through metalloproteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1797**: 1563-1572

Green J, Paget MS (2004) Bacterial redox sensors. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 954-966

Grinberg AV, Bernhardt R (1998) Effect of replacing a conserved proline residue on the function and stability of bovine adrenodoxin. *Protein Engineering* **11**: 1057-1064

Grinberg AV, Bernhardt R (2001) Contribution of a salt bridge to the thermostability of adrenodoxin determined by site-directed mutagenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **396**: 25-34

Hanke GT, Endo T, Satoh F, Hase T (2008) Altered photosynthetic electron channelling into cyclic electron flow and nitrite assimilation in a mutant of ferredoxin : NADP(H) reductase. *Plant Cell and Environment* **31**: 1017-1028

Hanke GT, Hase T (2008) Variable Photosynthetic Roles of Two Leaf-type Ferredoxins in Arabidopsis, as Revealed by RNA Interference. *Photochemistry and Photobiology* **84**: 1302-1309

Hanke GT, Kimata-Arigo Y, Taniguchi I, Hase T (2004) A post genomic characterization of arabidopsis ferredoxins. *Plant Physiology* **134**: 255-264

Hannemann F, Bichet A, Ewen KM, Bernhardt R (2007) Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1770**: 330-344

Hannemann F, Guyot A, Zollner A, Muller JJ, Heinemann U, Bernhardt R (2009) The dipole moment of the electron carrier adrenodoxin is not critical for redox partner interaction and electron transfer. *J Inorg Biochem* **103**: 997-1004

Hannemann F, Rottmann M, Schiffler B, Zapp J, Bernhardt R (2001) The loop region covering the iron-sulfur cluster in bovine adrenodoxin comprises a new interaction site for redox partners. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 1369-1375

Hausmann A, Netz DJA, Balk J, Pierik AJ, Muhlenhoff U, Lill R (2005) The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: An essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3266-3271

Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C (2010) Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism. *Cell* **142**: 24-38

Hinchliffe P, Sazanov LA (2005) Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* **309**: 771-774

Hochuli E, Dobeli H, Schacher A (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* **411**: 177-184

Hoff KG, Cupp-Vickery JR, Vickery LE (2003) Contributions of the LPPVK motif of the iron-sulfur template protein IscU to interactions with the Hsc66-Hsc20 chaperone system. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 37582-37589

Hoff KG, Silberg JJ, Vickery LE (2000) Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 7790-7795

Hoff KG, Ta DT, Tapley TL, Silberg JJ, Vickery LE (2002) Hsc66 substrate specificity is directed toward a discrete region of the iron-sulfur cluster template protein IscU. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 27353-27359

Holden HM, Jacobson BL, Hurley JK, Tollin G, Oh BH, Skjeldal L, Chae YK, Cheng H, Xia B, Markley JL (1994) Structure-function studies of [2Fe-2S] ferredoxins. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **26**: 67-88

- Huet G, Daffe M, Saves I (2005) Identification of the Mycobacterium tuberculosis SUF machinery as the exclusive mycobacterial system of Fe-S cluster assembly: Evidence for its implication in the pathogen's survival. *Journal of Bacteriology* **187**: 6137-6146
- Hutchinson EG, Thornton JM (1996) PROMOTIF -a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Sci* **5**: 212-220
- Hwang DM, Dempsey A, Tan KT, Liew CC (1996) A modular domain of NifU, a nitrogen fixation cluster protein, is highly conserved in evolution. *Journal of Molecular Evolution* **43**: 536-540
- Imlay JA (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry* **77**: 755-776
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-168
- Ito S, Tan LJ, Andoh D, Narita T, Seki M, Hirano Y, Narita K, Kuraoka I, Hiraoka Y, Tanaka K (2010) MMXD, a TFIID-independent XPD-MMS19 protein complex involved in chromosome segregation. *Mol Cell* **39**: 632-640
- Iwema T, Picciocchi A, Traore DAK, Ferrer JL, Chauvat F, Jacquamet L (2009) Structural Basis for Delivery of the Intact Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> Cluster by Monothiol Glutaredoxin. *Biochemistry* **48**: 6041-6043
- Jacobson MR, Cash VL, Weiss MC, Laird NF, Newton WE, Dean DR (1989) Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Molecular & General Genetics* **219**: 49-57
- Jancarik J, Kim SH (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography* **24**: 409-411
- Janin J (1995) Principles of protein-protein recognition from structure to thermodynamics. *Biochimie* **77**: 497-505
- Jennings BH, Pickles LM, Wainwright SM, Roe SM, Pearl LH, Ish-Horowicz D (2006) Molecular recognition of transcriptional repressor motifs by the WD domain of the Groucho/TLE corepressor. *Molecular Cell* **22**: 645-655
- Jensen LH (1974) X-Ray Structural Studies of Ferredoxin and Related Electron Carriers. *Annual Review of Biochemistry* **43**: 461-474
- Johansson C, Roos AK, Montano SJ, Sengupta R, Filippakopoulos P, Guo K, von Delft F, Holmgren A, Oppermann U, Kavanagh KL (2010) The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster coordination, tetrameric assembly and monomer activity. *Biochem J* **433**: 303-311
- Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* **74**: 247-281
- Johnstone RW, Wang J, Tommerup N, Vissing H, Roberts T, Shi Y (1998) Ciao 1 is a novel WD40 protein that interacts with the tumor suppressor protein WT1. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 10880-10887
- Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 125-132

Kakuta Y, Horio T, Takahashi Y, Fukuyama K (2001) Crystal structure of Escherichia coli Fdx, an adrenodoxin-type ferredoxin involved in the assembly of iron-sulfur clusters. *Biochemistry* **40**: 11007-11012

Kim KD, Chung WH, Kim HJ, Lee KC, Roe JH (2010) Monothiol glutaredoxin Grx5 interacts with Fe-S scaffold proteins Isa1 and Isa2 and supports Fe-S assembly and DNA integrity in mitochondria of fission yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **392**: 467-472

Kimura T, Suzuki K (1967) Components of the electron transport system in adrenal steroid hydroxylase. Isolation and properties of non-heme iron protein (adrenodoxin). *J Biol Chem* **242**: 485-491

Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* **18**: 3981-3989

Kispal G, Sipos K, Lange H, Fekete Z, Bedekovics T, Janaky T, Bassler J, Netz DJA, Balk J, Rotte C, Lill R (2005) Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *Embo Journal* **24**: 589-598

Klausner RD, Rouault TA, Harford JB (1993) Regulating the Fate of Messenger-RNA - The Control of Cellular Iron-Metabolism. *Cell* **72**: 19-28

Klinge S, Hirst J, Maman JD, Krude T, Pellegrini L (2007) An iron-sulfur domain of the eukaryotic primase is essential for RNA primer synthesis. *Nature Structural & Molecular Biology* **14**: 875-877

Knoell HE, Knappe J (1974) Escherichia coli ferredoxin, an iron-sulfur protein of the adrenodoxin type. *European Journal of Biochemistry* **50**: 245-252

Kohlhaw GB (1988) Isopropylmalate dehydratase from yeast. *Methods Enzymol* **166**: 423-429

Kondapalli KC, Kok NM, Dancis A, Stemmler TL (2008) Drosophila frataxin: An iron chaperone during cellular Fe-S cluster bioassembly. *Biochemistry* **47**: 6917-6927

Kosman DJ (2003) Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol Microbiol* **47**: 1185-1197

Kostic M, Bernhardt R, Pochapsky TC (2003) A conserved histidine in vertebrate-type ferredoxins is critical for redox-dependent dynamics. *Biochemistry* **42**: 8171-8182

Kostic M, Pochapsky SS, Obenauer J, Mo HP, Pagani GM, Pejchal R, Pochapsky TC (2002) Comparison of functional domains in vertebrate-type Ferredoxins. *Biochemistry* **41**: 5978-5989

Kou HP, Zhou Y, Gorospe RMC, Wang ZG (2008) Mms19 protein functions in nucleotide excision repair by sustaining an adequate cellular concentration of the TFIIH component Rad3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 15714-15719

Krebs C, Agar JN, Smith AD, Frazzon J, Dean DR, Huynh BH, Johnson MK (2001) IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry* **40**: 14069-14080

Krissinel E, Henrick K (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **60**: 2256-2268

Krissinel E, Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology* **372**: 774-797

Krogan NJ, Cagney G, Yu HY, Zhong GQ, Guo XH, Ignatchenko A, Li J, Pu SY, Datta N, Tikuisis AP, Punna T, Peregrin-Alvarez JM, Shales M, Zhang X, Davey M, Robinson MD, Paccanaro A, Bray JE, Sheung A, Beattie B, Richards DP, Canadien V, Lalev A, Mena F, Wong P, Starostine A, Canete MM, Vlasblom J, Wu S, Orsi C, Collins SR, Chandran S, Haw R, Rilstone JJ, Gandi K, Thompson NJ, Musso G, St Onge P, Ghanny S, Lam MHY, Butland G, Altaf-Ui AM, Kanaya S, Shilatifard A, O'Shea E, Weissman JS, Ingles CJ, Hughes TR, Parkinson J, Gerstein M, Wodak SJ, Emili A, Greenblatt JF (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**: 637-643

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lambeth JD, McCaslin DR, Kamin H (1976) Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex. *J Biol Chem* **251**: 7545-7550

Lambeth JD, Seybert DW, Kamin H (1979) Ionic effects on adrenal steroidogenic electron transport. The role of adrenodoxin as an electron shuttle. *J Biol Chem* **254**: 7255-7264

Landau M, Mayrose I, Rosenberg Y, Glaser F, Martz E, Pupko T, Ben-Tal N (2005) ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. *Nucleic Acids Research* **33**: W299-W302

Lange H, Kaut A, Kispal G, Lill R (2000) A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1050-1055

Lange H, Kispal G, Lill R (1999) Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 18989-18996

Laskowski RA, Macarthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **26**: 283-291

Lauder S, Bankmann M, Guzder SN, Sung P, Prakash L, Prakash S (1996) Dual requirement for the yeast MMS19 gene in DNA repair and RNA polymerase II transcription. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 6783-6793

Layer G, Ollagnier-de Choudens S, Sanakis Y, Fontecave M (2006) Iron-sulfur cluster biosynthesis - Characterization of *Escherichia coli* CyaY as an iron donor for the assembly of 2Fe-2S clusters in the scaffold IscU. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 16256-16263

Li D, Roberts R (2001) WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 2085-2097

Li HQ, Gakh O, Smith DY, Isaya G (2009) Oligomeric Yeast Frataxin Drives Assembly of Core Machinery for Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 21971-21980

Liberek K, Galitski TP, Zyllicz M, Georgopoulos C (1992) The DnaK chaperone modulates the heat shock response of *Escherichia coli* by binding to the sigma 32 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3516-3520

Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**: 831-838

- Lill R, Dutkiewicz R, Elsasser HP, Hausmann A, Netz DJ, Pierik AJ, Stehling O, Urzica E, Muhlenhoff U (2006) Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 652-667
- Lill R, Muhlenhoff U (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem* **77**: 669-700
- Lipscomb JD, Sligar SG, Namtvedt MJ, Gunsalus IC (1976) Autooxidation and hydroxylation reactions of oxygenated cytochrome P-450cam. *Journal of Biological Chemistry* **251**: 1116-1124
- Lo Conte L, Chothia C, Janin J (1999) The atomic structure of protein-protein recognition sites. *Journal of Molecular Biology* **285**: 2177-2198
- Lombaerts M, Tijsterman M, Verhage RA, Brouwer J (1997) *Saccharomyces cerevisiae* mms19 mutants are deficient in transcription-coupled and global nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Research* **25**: 3974-3979
- Lotierzo M, Tse Sum Bui B, Florentin D, Escalettes F, Marquet A (2005) Biotin synthase mechanism: an overview. *Biochem Soc Trans* **33**: 820-823
- Malkin R, Rabinowitz J (1966) Reconstitution of Clostridial Ferredoxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **23**: 822-827
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3 Volume Set)*, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Matthews BW (1968) Solvent Content of Protein Crystals. *Journal of Molecular Biology* **33**: 491-497
- McPherson A (1990) Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur J Biochem* **189**: 1-23
- Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K, Herrmann JM (2005) A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* **121**: 1059-1069
- Meyer J (2001) Ferredoxins of the third kind. *Febs Letters* **509**: 1-5
- Meyer J (2008) Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *J Biol Inorg Chem* **13**: 157-170
- Miroux B, Walker JE (1996) Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. *Journal of Molecular Biology* **260**: 289-298
- Miyashita O, Okamura MY, Onuchic JN (2005) Interprotein electron transfer from cytochrome c(2) to photosynthetic reaction center: Tunneling across an aqueous interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3558-3563
- Mortenson LE, Carnahan JE, Valentine RC (1962) An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **7**: 448-452
- Muhlenhoff U, Balk J, Richhardt N, Kaiser JT, Sipos K, Kispal G, Lill R (2004) Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 36906-36915

- Muhlenhoff U, Gerber J, Richhardt N, Lill R (2003) Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *Embo Journal* **22**: 4815-4825
- Muhlenhoff U, Gerl MJ, Flaiger B, Pirner HM, Balsler S, Richhardt N, Lill R, Stolz J (2007) The ISC proteins Isa1 and Isa2 are required for the function but not for the de novo synthesis of the Fe/S clusters of biotin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **6**: 753-753
- Muhlenhoff U, Molik S, Godoy JR, Uzarska MA, Richter N, Seubert A, Zhang Y, Stubbe J, Pierrel F, Herrero E, Lillig CH, Lill R (2010) Cytosolic Monothiol Glutaredoxins Function in Intracellular Iron Sensing and Trafficking via Their Bound Iron-Sulfur Cluster. *Cell Metabolism* **12**: 373-385
- Muhlenhoff U, Richhardt N, Gerber J, Lill R (2002a) Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria - A requirement for ATP, NADH, and reduced iron. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 29810-29816
- Muhlenhoff U, Richhardt N, Ristow M, Kispal G, Lill R (2002b) The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Human Molecular Genetics* **11**: 2025-2036
- Muller A, Muller JJ, Muller YA, Uhlmann H, Bernhardt R, Heinemann U (1998) New aspects of electron transfer revealed by the crystal structure of a truncated bovine adrenodoxin, Adx(4-108). *Structure* **6**: 269-280
- Muller EC, Lapko A, Otto A, Muller JJ, Ruckpaul K, Heinemann U (2001a) Covalently crosslinked complexes of bovine adrenodoxin with adrenodoxin reductase and cytochrome P450<sub>scc</sub> - Mass spectrometry and Edman degradation of complexes of the steroidogenic hydroxylase system. *European Journal of Biochemistry* **268**: 1837-1843
- Muller JJ, Lapko A, Bourenkov G, Ruckpaul K, Heinemann U (2001b) Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis. *J Biol Chem* **276**: 2786-2789
- Muller JJ, Muller A, Rottmann M, Bernhardt R, Heinemann U (1999) Vertebrate-type and plant-type ferredoxins: Crystal structure comparison and electron transfer pathway modelling. *Journal of Molecular Biology* **294**: 501-513
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350
- Mumberg D, Muller R, Funk M (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**: 119-122
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D* **53**: 240-255
- Murzin AG, Brenner SE, Hubbard T, Chothia C (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of Molecular Biology* **247**: 536-540
- NC-IUB (1979) Nomenclature of iron-sulfur proteins. Recommendations, 1978: Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). *Biochim Biophys Acta* **549**: 101-105

- Nechushtai R, Lammert H, Michaeli D, Eisenberg-Domovich Y, Zuris J, Luca M, Capraro D, Fish A, Shimshon O, Roy M, Schug A, Whitford P, Livnah O, Onuchic J, Jennings P (2011) Allostery in the ferredoxin protein motif does not involve a conformational switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 2240-2245
- Nelson DR (2009) The Cytochrome P450 Homepage. *Human Genomics* **4**: 59-65
- Nemeth E, Ganz T (2006) Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr* **26**: 323-342
- Netz DJA, Pierik AJ, Stuempfig M, Muhlenhoff U, Lill R (2007) The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nature Chemical Biology* **3**: 278-286
- Netz DJA, Stumpfig M, Dore C, Muhlenhoff U, Pierik AJ, Lill R (2010) Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nature Chemical Biology* **6**: 758-765
- Nishio K, Nakai M (2000) Transfer of iron-sulfur cluster from NifU to apoferredoxin. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 22615-22618
- Nuth M, Yoon T, Cowan JA (2002) Iron-sulfur cluster biosynthesis: Characterization of iron nucleation sites for assembly of the 2Fe-2S (2+) cluster core in IscU proteins. *Journal of the American Chemical Society* **124**: 8774-8775
- Olson JW, Agar JN, Johnson MK, Maier RJ (2000) Characterization of the NifU and NifS Fe-S cluster formation proteins essential for viability in *Helicobacter pylori*. *Biochemistry* **39**: 16213-16219
- Omura T (2010) Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *Journal of Biochemistry* **147**: 297-306
- Omura T, Sanders E, Estabrook RW, Cooper DY, Rosenthal O (1966) Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and a flavoprotein functional as a reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome P-450 reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **117**: 660-673
- Orengo CA, Thornton JM (2005) Protein families and their evolution - A structural perspective. *Annual Review of Biochemistry* **74**: 867-900
- Outten FW, Djaman O, Storz G (2004) A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **52**: 861-872
- Outten FW, Wood MJ, Munoz FM, Storz G (2003) The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 45713-45719
- Page CC, Moser CC, Chen XX, Dutton PL (1999) Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* **402**: 47-52
- Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA, Mootha VK (2008) A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* **134**: 112-123
- Parvin R (1969) Citrate synthase from yeast. *Methods in Enzymology* **13**: 16-19
- Patzer SI, Hantke K (1999) SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the 2Fe-2S FhuF protein in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **181**: 3307-3309



- Pelletier H, Kraut J (1992) *Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome c peroxidase and cytochrome c. Science* **258**: 1748-1755
- Perrakis A, Morris R, Lamzin VS (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat Struct Mol Biol* **6**: 458-463
- Peterson JA, Lu JY, Geisselsoder J, Graham-Lorence S, Carmona C, Witney F, Lorence MC (1992) Cytochrome-P450Terp - Isolation and Purification of the Protein and Cloning and Sequencing of Its Operon. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 14193-14203
- Piccicocchi A, Douce R, Alban C (2003) The plant biotin synthase reaction. Identification and characterization of essential mitochondrial accessory protein components. *J Biol Chem* **278**: 24966-24975
- Pierik AJ, Netz DJA, Lill R (2009) Analysis of iron-sulfur protein maturation in eukaryotes. *Nat Protocols* **4**: 753-766
- Pierrel F, Hamelin O, Douki T, Kieffer-Jaquinod S, Muhlenhoff U, Ozeir M, Lill R, Fontecave M (2010) Involvement of Mitochondrial Ferredoxin and Para-Aminobenzoic Acid in Yeast Coenzyme Q Biosynthesis. *Chemistry & Biology* **17**: 449-459
- Pikuleva IA, Tesh K, Waterman MR, Kim YC (2000) The tertiary structure of full-length bovine adrenodoxin suggests functional dimers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **373**: 44-55
- Pisarev AV, Skabkin MA, Pisareva VP, Skabkina OV, Rakotondrafara AM, Hentze MW, Hellen CUT, Pestova TV (2010) The Role of ABCE1 in Eukaryotic Posttermination Ribosomal Recycling. *Molecular Cell* **37**: 196-210
- Pondarre C, Antiochos BB, Campagna DR, Greer EL, Deck KM, McDonald A, Han AP, Medlock A, Kutok JL, Anderson SA, Eisenstein RS, Fleming MD (2006) The mitochondrial ATP-binding cassette transporter Abcb7 is essential in mice and participates in cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis. *Human Molecular Genetics* **15**: 953-964
- Poyton RO, Goehring B, Droste M, Sevarino KA, Allen L, Zhao XJ (1995) Cytochrome-c oxidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology* **260**: 97-116
- Prischi F, Konarev PV, Iannuzzi C, Pastore C, Adinolfi S, Martin SR, Svergun DI, Pastore A (2010) Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nature Communications* **1**: 95
- Raulfs EC, O'Carroll IP, Dos Santos PC, Unciuleac MC, Dean DR (2008) In vivo iron-sulfur cluster formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 8591-8596
- Rawat S, Stemmler TL (2011) Key players and their role during mitochondrial iron-sulfur cluster biosynthesis. *Chemistry* **17**: 746-753
- Robinson K, Lemire B (1995) [3] Flavinylation of succinate: Ubiquinone oxidoreductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology* **260**: 34-51

- Rodriguez-Manzanique MT, Tamarit J, Belli G, Ros J, Herrero E (2002) Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Molecular Biology of the Cell* **13**: 1109-1121
- Rosenberg AH, Lade BN, Chui DS, Lin SW, Dunn JJ, Studier FW (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**: 125-135
- Rouault TA (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nature Chemical Biology* **2**: 406-414
- Rouault TA, Tong WH (2005) Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 345-351
- Rouault TA, Tong WH (2008) Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease. *Trends in Genetics* **24**: 398-407
- Roy A, Solodovnikova N, Nicholson T, Antholine W, Walden WE (2003) A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. *Embo Journal* **22**: 4826-4835
- Rudolf J, Makrantonis V, Ingledew WJ, Stark MJR, White MF (2006) The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Molecular Cell* **23**: 801-808
- Ruthenburg AJ, Wang WK, Graybosch DM, Li HT, Allis CD, Patel DJ, Verdine GL (2006) Histone H3 recognition and presentation by the WDR5 module of the MLL1 complex. *Nature Structural & Molecular Biology* **13**: 704-712
- Rutherford JC, Bird AJ (2004) Metal-Responsive Transcription Factors That Regulate Iron, Zinc, and Copper Homeostasis in Eukaryotic Cells. *Eukaryot Cell* **3**: 1-13
- Rutherford JC, Ojeda L, Balk J, Mühlenhoff U, Lill R, Winge DR (2005) Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem* **280**: 10135-10140
- Sainz G, Jakoncic J, Sieker LC, Stojanoff V, Sanishvili N, Asso M, Bertrand P, Armengaud J, Jouanneau Y (2006) Structure of a 2Fe-2S ferredoxin from *Rhodobacter capsulatus* likely involved in Fe-S cluster biogenesis and conformational changes observed upon reduction. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **11**: 235-246
- Salamona Z, Macleod AH, Tollina G (1997) Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. I: Theoretical principles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1331**: 117-129
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning - A laboratory manual, 3rd edition.*, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sazanov LA, Hinchliffe P (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* **311**: 1430-1436
- Schiffler B, Bureik M, Reinle W, Muller EC, Hannemann F, Bernhardt R (2004) The adrenodoxin-like ferredoxin of *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria. *Journal of Inorganic Biochemistry* **98**: 1229-1237

- Schindelin H, Kisker C, Schlessman JL, Howard JB, Rees DC (1997) Structure of ADP x AIF4(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. *Nature* **387**: 370-376
- Schmucker S, Martelli A, Colin F, Page A, Wattenhofer-Donze M, Reutenauer L, Puccio H (2011) Mammalian Frataxin: An Essential Function for Cellular Viability through an Interaction with a Preformed ISCU/NFS1/ISD11 Iron-Sulfur Assembly Complex. *Plos One* **6**: e16199
- Schuetz A, Allali-Hassani A, Martin F, Loppnau P, Vedadi M, Bochkarev A, Plotnikov AN, Arrowsmith CH, Min JR (2006) Structural basis for molecular recognition and presentation of histone H3 By WDR5. *Embo Journal* **25**: 4245-4252
- Seeber F (2002) Eukaryotic genomes contain a 2Fe-2S ferredoxin isoform with a conserved C-terminal sequence motif. *Trends in Biochemical Sciences* **27**: 545-547
- Selzer T, Schreiber G (2001) New insights into the mechanism of protein-protein association. *Proteins-Structure Function and Genetics* **45**: 190-198
- Seroz T, Winkler GS, Auriol J, Verhage RA, Vermeulen W, Smit B, Brouwer J, Eker APM, Weeda G, Egly JM, Hoeijmakers JHJ (2000) Cloning of a human homolog of the yeast nucleotide excision repair gene MMS19 and interaction with transcription repair factor TFIIH via the XPB and XPD helicases. *Nucleic Acids Research* **28**: 4506-4513
- Sevrioukova IF, Poulos TL (2011) Structural biology of redox partner interactions in P450cam monooxygenase: A fresh look at an old system. *Arch Biochem Biophys* **507**: 66-74
- Sevrioukova IF, Poulos TL, Churbanova IY (2010) Crystal Structure of the Putidaredoxin Reductase-Putidaredoxin Electron Transfer Complex. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 13616-13620
- Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Elsasser HP, Muhlenhoff U, Webert H, Hobler A, Hannemann F, Bernhardt R, Lill R (2010) Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 11775-11780
- Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Netz DJA, Kerscher S, Elsasser HP, Wittig I, Balk J, Brandt U, Lill R (2009) Human Ind1, an Iron-Sulfur Cluster Assembly Factor for Respiratory Complex I. *Molecular and Cellular Biology* **29**: 6059-6073
- Sheldrick GM (2008) A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A* **64**: 112-122
- Sheldrick GM (2010) Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **66**: 479-485
- Shethna YI, Beinert H, Hansen RE, Wilson PW (1964) Identification by Isotopic Substitution of EPR Signal at G equals 1.94 in Non-Heme Iron Protein from Azotobacter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **52**: 1263-1271
- Shethna YI, Dervarta Dv, Beinert H (1968) Non Heme (Iron-Sulfur) Proteins of Azotobacter Vinelandii. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **31**: 862-868
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* **68**: 850-858

- Shi R, Proteau A, Villarroya M, Moukadiri I, Zhang LH, Trempe JF, Matte A, Armengod ME, Cygler M (2010) Structural Basis for Fe-S Cluster Assembly and tRNA Thiolation Mediated by IscS Protein-Protein Interactions. *Plos Biology* **8**: e1000354
- Shi YB, Ghosh MC, Tong WH, Rouault TA (2009) Human ISD11 is essential for both iron-sulfur cluster assembly and maintenance of normal cellular iron homeostasis. *Human Molecular Genetics* **18**: 3014-3025
- Sipos K, Lange H, Fekete Z, Ullmann P, Lill R, Kispal G (2002) Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 26944-26949
- Smith AD, Agar JN, Johnson KA, Frazzon J, Amster IJ, Dean DR, Johnson MK (2001) Sulfur transfer from IscS to IscU: the first step in iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Am Chem Soc* **123**: 11103-11104
- Smith AD, Frazzon J, Dean DR, Johnson MK (2005) Role of conserved cysteines in mediating sulfur transfer from IscS to IscU. *FEBS Lett* **579**: 5236-5240
- Smith TF (2008) Diversity of WD-Repeat Proteins. *Subcellular Biochemistry* **48**: 20-30
- Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences* **24**: 181-185
- Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, Sigler PB (1996) Crystal structure of a G(A) protein beta gamma dimer at 2.1 angstrom resolution. *Nature* **379**: 369-374
- Song D, Lee FS (2011) Mouse knockout of Iop1 reveals its essential role in mammalian cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem in press*: 10.1074/jbc.M1110.201731
- Song DS, Lee FS (2008) A role for IOP1 in mammalian cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 9231-9238
- Song JJ, Garlick JD, Kingston RE (2008) Structural basis of histone H4 recognition by p53. *Genes & Development* **22**: 1313-1318
- Spiro S (2006) Nitric oxide-sensing mechanisms in Escherichia coli. *Biochemical Society Transactions* **34**: 200-202
- Srinivasan V, Netz DJA, Weibert H, Mascarenhas J, Pierik AJ, Michel H, Lill R (2007) Structure of the yeast WD40 domain protein Cia1, a component acting late in iron-sulfur protein biogenesis. *Structure* **15**: 1246-1257
- Stehling O, Elsasser HP, Bruckel B, Muhlenhoff U, Lill R (2004) Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Human Molecular Genetics* **13**: 3007-3015
- Stehling O, Netz DJA, Niggemeyer B, Rosser R, Eisenstein RS, Puccio H, Pierik AJ, Lill R (2008) Human Nbp35 is essential for both cytosolic iron-sulfur protein assembly and iron homeostasis. *Molecular and Cellular Biology* **28**: 5517-5528
- Stemmler TL, Lesuisse E, Pain D, Dancis A (2010) Frataxin and Mitochondrial FeS Cluster Biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 26737-26743
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130

- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60-89
- Sugano S, Morishima N, Ikeda H, Horie S (1989) Sensitive assay of cytochrome P450scc activity by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **182**: 327-333
- Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, Bartlam M, Rao Z (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* **121**: 1043-1057
- Sutak R, Lesuisse E, Tachezy J, Richardson DR (2008) Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends Microbiol* **16**: 261-268
- Suzuki K, Kimura T (1965) An Iron Protein as a Component of Steroid 11beta-Hydroxylase Complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **19**: 340-345
- Tagawa K, Arnon DI (1962) Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in the biological production and consumption of hydrogen gas. *Nature* **195**: 537-543
- Takahashi Y, Nakamura M (1999) Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in Escherichia coli. *Journal of Biochemistry* **126**: 917-926
- Takahashi Y, Tokumoto U (2002) A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 28380-28383
- Takubo K, Morikawa T, Nonaka Y, Mizutani M, Takenaka S, Takabe K, Takahashi MA, Ohta D (2003) Identification and molecular characterization of mitochondrial ferredoxins and ferredoxin reductase from Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **52**: 817-830
- Taylor GL (2003) The phase problem. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**: 1881-1890
- Taylor GL (2010) Introduction to phasing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 325-338
- Terauchi AM, Lu SF, Zaffagnini M, Tappa S, Hirasawa M, Tripathy JN, Knaff DB, Farmer PJ, Lemaire SD, Hase T, Merchant SS (2009) Pattern of Expression and Substrate Specificity of Chloroplast Ferredoxins from Chlamydomonas reinhardtii. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 25867-25878
- Tong WH, Rouault TA (2006) Functions of mitochondrial ISCU and cytosolic ISCU in mammalian iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Cell Metabolism* **3**: 199-210
- Tovar J, Fischer A, Clark CG (1999) The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite Entamoeba histolytica. *Molecular Microbiology* **32**: 1013-1021
- Tovar J, Leon-Avila G, Sanchez LB, Sutak R, Tachezy J, van der Giezen M, Hernandez M, Muller M, Lucocq JM (2003) Mitochondrial remnant organelles of Giardia function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* **426**: 172-176
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354

Trounce IA, Kim YL, Jun AS, Wallace DC (1996) Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines. *Methods in Enzymology* **264**: 484-509

Tsai CL, Barondeau DP (2010) Human Frataxin Is an Allosteric Switch That Activates the Fe-S Cluster Biosynthetic Complex. *Biochemistry* **49**: 9132-9139

Uhlmann H, Bernhardt R (1995) Role of Threonine 54 in Adrenodoxin for the Properties of Its Iron-Sulfur Cluster and Its Electron Transfer Function. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 29959-29966

Unciuleac MC, Chandramouli K, Naik S, Mayer S, Huynh BH, Johnson MK, Dean DR (2007) In vitro activation of apo-aconitase using a 4Fe-4S cluster-loaded form of the IscU Fe-S cluster scaffolding protein. *Biochemistry* **46**: 6812-6821

Urbina HD, Silberg JJ, Hoff KG, Vickery LE (2001) Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly. *J Biol Chem* **276**: 44521-44526

Urzica E, Pierik AJ, Muhlenhoff U, Lill R (2009) Crucial Role of Conserved Cysteine Residues in the Assembly of Two Iron-Sulfur Clusters on the CIA Protein Nar1. *Biochemistry* **48**: 4946-4958

van der Giezen M, Tovar J (2005) Degenerate mitochondria. *Embo Reports* **6**: 525-530

Van Duyne RP (2004) Molecular Plasmonics. *Science* **306**: 985-986

Vickery LE (1997) Molecular recognition and electron transfer in mitochondrial steroid hydroxylase systems. *Steroids* **62**: 124-127

Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 615-619

Vornholt W, Hartmann M, Keusgen M (2007) SPR studies of carbohydrate-lectin interactions as useful tool for screening on lectin sources. *Biosensors and Bioelectronics* **22**: 2983-2988

Voss I, Goss T, Murozuka E, Altmann B, McLean KJ, Rigby SE, Munro AW, Scheibe R, Hase T, Hanke GT (2011) FdC1, a novel ferredoxin protein capable of alternative electron partitioning, increases in conditions of acceptor limitation at photosystem I. *J Biol Chem* **286**: 50-59

Walden WE, Selezneva AI, Dupuy J, Volbeda A, Fontecilla-Camps JC, Theil EC, Volz K (2006) Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science* **314**: 1903-1908

Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iniguezlluhi JA, Posner BA, Gilman AG, Sprang SR (1995) The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* **83**: 1047-1058

Wang J, Pantopoulos K (2011) Regulation of cellular iron metabolism. *Biochemical Journal* **434**: 365-381

Wang T, Craig EA (2008) Binding of yeast frataxin to the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 12674-12679

Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview Version 2 -a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**: 1189-1191

- Weerapana E, Wang C, Simon GM, Richter F, Khare S, Dillon MBD, Bachovchin DA, Mowen K, Baker D, Cravatt BF (2010) Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* **468**: 790-795
- White M (2009) Structure, function and evolution of the XPD family of iron-sulfur-containing 5' → 3' DNA helicases. *Biochemical Society Transactions* **37**: 547-551
- Wiedemann N, Urzica E, Guiard B, Muller H, Lohaus C, Meyer HE, Ryan MT, Meisinger C, Muhlenhoff U, Lill R, Pfanner N (2006) Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *Embo Journal* **25**: 184-195
- Williams BAP, Cali A, Takvorian PM, Keeling PJ (2008) Distinct localization patterns of two putative mitochondrial proteins in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **55**: 131-133
- Williams BAP, Hirt RP, Lucocq JM, Embley TM (2002) A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* **418**: 865-869
- Wingert RA, Galloway JL, Barut B, Foott H, Fraenkel P, Axe JL, Weber GJ, Dooley K, Davidson AJ, Schmidt B, Paw BH, Shaw GC, Kingsley P, Palis J, Schubert H, Chen O, Kaplan J, Zon LI, Tubingen Screen C (2005) Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* **436**: 1035-1039
- Xia B, Volkman BF, Markley JL (1998) Evidence for oxidation-state-dependent conformational changes in human ferredoxin from multinuclear, multidimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* **37**: 3965-3973
- Xu XM, Moller SG (2011) Iron-Sulfur Clusters: Biogenesis, Molecular Mechanisms, and Their Functional Significance. *Antioxid Redox Signal in press*: DOI: 10.1089/ars.2010.3259
- Yang W, Bell SG, Wang H, Zhou WH, Hoskins N, Dale A, Bartlam M, Wong LL, Rao ZH (2010) Molecular Characterization of a Class I P450 Electron Transfer System from *Novosphingobium aromaticivorans* DSM12444. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 27372-27384
- Yarunin A, Panse VG, Petfalski E, Dez C, Tollervey D, Hurt EC (2005) Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *Embo Journal* **24**: 580-588
- Ye H, Rouault TA (2010) Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry* **49**: 4945-4956
- Yeh AP, Ambroggio XI, Andrade SLA, Einsle O, Chatelet C, Meyer J, Rees DC (2002) High resolution crystal structures of the wild type and Cys-55 → Ser and Cys-59 → Ser variants of the thioredoxin-like 2Fe-2S ferredoxin from *Aquifex aeolicus*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 34499-34507
- Yoon T, Cowan JA (2003) Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of 2Fe-2S clusters in ISU-type proteins. *Journal of the American Chemical Society* **125**: 6078-6084
- Yuvaniyama P, Agar JN, Cash VL, Johnson MK, Dean DR (2000) NifS-directed assembly of a transient 2Fe-2S cluster within the NifU protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 599-604

Zheng L, Baumann U, Reymond JL (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res* **32**: e115

Zheng LM, Cash VL, Flint DH, Dean DR (1998) Assembly of iron-sulfur clusters - Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 13264-13272

Zheng LM, Dean DR (1994) Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 18723-18726

Zheng LM, White RH, Cash VL, Dean DR (1994) Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product. *Biochemistry* **33**: 4714-4720

Zheng LM, White RH, Cash VL, Jack RF, Dean DR (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 2754-2758

Ziegler GA, Vonrhein C, Hanukoglu I, Schulz GE (1999) The structure of adrenodoxin reductase of mitochondrial P450 systems: Electron transfer for steroid biosynthesis. *Journal of Molecular Biology* **289**: 981-990

Zollner A, Hannemann F, Lisurek M, Bernhardt R (2002) Deletions in the loop surrounding the iron-sulfur cluster of adrenodoxin severely affect the interactions with its native redox partners adrenodoxin reductase and cytochrome P450(scc) (CYP11A1). *Journal of Inorganic Biochemistry* **91**: 644-654

Zollner A, Kagawa N, Waterman MR, Nonaka Y, Takio K, Shiro Y, Hannemann F, Bernhardt R (2008) Purification and functional characterization of human 11beta hydroxylase expressed in *Escherichia coli*. *FEBS J* **275**: 799-810



## 7 Anhang

### 7.1. Mutagenese-Primer

#### 7.1.1. für Ferredoxin-Mutagenese

Name	Sequenz (5' → 3')
Yah1_M4A_for	CTGTCACCTCATCTTTGATCCAGACTACTACG
Yah1_M4A_rev	GATCAAAGATGAGGTGACAGGTGGAGCAGGC
Yah1_M4B_for	CACGTCTACGTTGATCCAGACTACTACGATGCC
Yah1_M4B_rev	ATCAACGTAGACGTGACAGGTGGAGCAGGCAC
Yah1 FG Insertion for	GAGGGCTTTGGTGCATGCGGCGGTTCTTG TG
Yah1 FG Insertion rev	CATGCACCAAAGCCCTCCATGTCCAGGTTGTG
Fdx1 M3 for	GAGGCCTCCCTGGCTTGTCAACCTGTAC
Fdx1 M3 rev	CAGGGAGGCCTCACATGCACCAAAGCCATC
Fdx1_M4_for	CACGTCTACGTTGAAGATCACATATATGAGAAG
Fdx1_M4_rev	CTTCAACGTAGACGTGACAGGTTGAACAAGCCAGG
Fdx1 R1 for	GTGAAAGAATACCAGTCTCAGGAAAAGTTGGTGATTCTCTG
Fdx1 R1 rev	TTTCTGAGACTGGTATTCTTTCACCATCACGGTTTATAAAG
Fdx1 R2 for	CTGCTACATCTTGCGCAGAGACATGGTCTAGATATTGATGGCGCATG
Fdx1 R2 rev	TCTAGACCATGTCTCTGCGCAAGATGTAGCAGAGAATCACCAAC
Fdx1 R3 for	ATGAGCTGTTACCTCCACCCGAGGATGAGGAGAATGACATGC
Fdx1 R3 rev	CTCATCCTCGGGTGGAGGTAACAGCTCATATATGTGATCTTC
Fdx1 R2new for	CATCTTGCGCAGAGACATAATCTAGATATTGATGGC
Fdx1 R2new rev	ATGTCTCTGCGCAAGATGTAGCAGAGAATCACCAAC
Fdx1 FG Deletion for	GATGGCGCATGTGAGGGAACCCTG
Fdx1 FG Deletion rev	CACATGCGCCATCAATATCTAGATTATTTTC
Fdx1_R4+3_for	TCAGAACAGCATTAGATCTGTTACCTCCACCCGAG
Fdx1_R4+3_rev	ATCTAAATGCTGTTCTGAAAAGATGAGGTGACAGGTTG
Fdx1_R5+3_for	CGAGGAAAGGGAGGATGACATGCTCGATCTGG
Fdx1_R5+3_rev	TGTCATCTCCCTTCTCGGGTGGAGGTAAC
Fdx2_R1_for	CGAGACGCTCACAACGAAGGGCAGAGTCGGGGACAATG
Fdx2_R1_rev	CCTTCGTTGTGAGCGTCTCGCCTGAGCGGTCTACGAAC
Fdx2_FG_R2_for	GACGTGGTCTGGAGAACGGGGTGGACCTGGAAGGG
Fdx2_FG_R2_rev	GTTCTCCACGACCACGTCAAGAACATTGTCCCCGACTC
Fdx2_R3_for	CTGGATGCTATCACGGAGAGGGAAGACGACATG
Fdx2_R3_rev	CTCCGTGATAGCATCCAGGAGATCCAGGTGGTC
Fdx2 R70E for	GAGGAGGAGGAAGACGACATGCTAGACATG
Fdx2 R70E rev	GTCTTCTCCTCCTCGGGAGGAGGCAGGAG
Fdx2_M1_for	GGGACAGTCTTCTTACCTGGCCCCAGCGCCAC
Fdx2_M1_rev	GAAGAAGACTGTCCCCGACTCTGCCACTCACTG
Fdx2_M2_for	GTGGACATCGATGGGGCCTGTGAAGCCTCCCTGGC
Fdx2_M2_rev	GGCCCCATCGATGTCCACCCCGTGGCGCTGGGCCAG
Fdx2_M3_for	GTGAAGGCACCCTGGCCTGCTCCACCTGCCATG
Fdx2_M3_rev	CCAGGGTGCCTTACAGGCCCTTCCAGGTCC
Fdx2_M4_for	TGCCATCTGATTTTTCAGTGAAGACCACCTGGATCTCCTG
Fdx2_M4_rev	TTCACTGAAAATCAGATGGCAGGTGGAGCAGGCCAGGG
Fdx2_M5_for	ATGGCCTACGGCCTCCAGGAGAACTCGCGGCTGGG
Fdx2_M5_rev	TGGAGGCCGTAGGCCATGTCTAGCATGTCGTCTTC

Fdx2_M6_for	CTCCTCACGGATCGCTCGCGGCTGGGCTGCCAGATTG
Fdx2_M6_rev	CGCGAGCGATCCGTGAGGAGGGGGCCATGTCTAGCATG
Fdx2 P82Y for	CATGGCCTACCTCCTCCAGGAGAACTCGCG
Fdx2 P82Y rev	GAGGTAGGCCATGTCTAGCATGTCTGCTTCCC
Fdx2 FG Insertion for	GAAGGGTTTGGTGCCTGTGAAGCCTCCCTGGC
Fdx2 FG Insertion rev	CAGGCACCAAACCCTCCAGGTCCACCCCGTG

### 7.1.2. für Cia1-Mutagenese

Name	Sequenz (5'→3')
R34E-up	CAGGTTCAACTGATGAAAAAATTAAGCTAG
R34E-down	CTAGCTTAATTTTTTCATCAGTTGAACCTG
E54K-up	GATGTGCTAGATAAGACTGCGCATAAAAAGGCG
E54K-down	CGCCTTTTTATGCGCAGTCTTATCTAGCACATC
K59E-up	GAGACTGCTCATAAAGAGGGCATTGATCTGTG
K59E-down	CACAGATCGAATCGCCTTTTATGAGCAGTCTC
E104R-up	CTGCTAGCTATTATCCGCGTCCACGAAAATG
E104R-down	CATTTTCGTGACCGCGGATAATAGCTAGCAG
Q154K-up	GTTTTGCAAGAACATTCTCGAGACGTTAAACATG
Q154K-down	CATGTTTAACGTCTCGAGAATGTTCTTGCAAAC
D184R-up	GATATGGAAAGACTATCGCGATGACTGGGAATG
D184R-down	CATCCCAGTCATCGCGATAGCTTTCCATATC
D234R-up	CATGGGTGACGACGAGCGTGATCAACAAGAATG
D234R-down	CATTCTTGTTGATCAGCTCGTCGTACCCATG
F260S-up	CAATGTTGCATGGGGATCCAATGGCCTCATTGC
F260-S-down	GCAATGAGGCCATTGGATCCCCATGCAACATTG
D280R-up	GTCTATGAAGAAGTCCGCGGAGAATGGAAAG
D280R-down	CTTCCATTCTCCGCGGACTTCTTCATAGAC
D79R-up	GTTAGCGGCTGGCTCTTTTAGATCTACTGTATCTATCTGGGC
D79R-down	GCCCAGATAGATACAGTAGATCTAAAAGAGCCAGCCGCTAAC
E104R-up2	GACCTGCTAGCTATTATCCGCGTCCACGAAAATAAGTAAAAGG
E104R-down2	CCTTTTACTTATTTTCGTGACCGCGGATAATAGCTAGCAGGTC
E107R-up	GCTATTATCGAAGGTCACCGGAATGAAGTAAAAGGTGTAG
E107R-down	CTACACCTTTTACTTCATTCCGGTGACCTTCGATAATAGC
E138R-up	GTGGATATGGGAAACAGATAGATCTGGCGAGGAATATGAGTG
E138R-down	CACTCATATTCTCGCCAGATCTATCTGTTCCCATATCCAC
E142K-up	CAGATGAAAGTGCGGAGAAATATGAGTGTATTAGTG
E142K-down	CACTAATACACTCATATTTCTCGCCACTTTTCATCTG
Q154R-up2	GTGTTTTGCAAGAACATTCTCGAGACGTTAAACATGTTATATGG
Q154R-down2	CCATATAACATGTTTAACTCTCGAGAATGTTCTTGCAAACAC
Y173A-up	GCATTACTGGCTTCAAGTTCAGCTGATGACACCGTCAGGATATG
Y173A-down	CATATCCTGACGGTGTATCAGCTGAACCTGAAGCCAGTAATGC
D219R-up	GTTTAGACTGTGCAAGTGAAGCCGGGATTCCACTGTACGGGTATG
D219R-down	CATACCGTACAGTGAATCCCGGCTTCCACTGCACAGTCTAAAC
D270R-up	CATTGCTAGTGTAGGAGCCCGGGGAGTACTAGCGGTCTATG
D270R-down	CATAGACCGTACTACTCCCGGGCTCCTACACTAGCAATG
E297K-up	CATTATGTCATGGAGTTTATAAAATCAACGTTGTGAAGTG
E297K-down	CACTTACAACGTTGATTTTATAAACTCCATGACATAATG

## **8 Lebenslauf**

Seite 167 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung

## 9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Roland Lill danke ich für die interessante und herausfordernde Aufgabenstellung, das entgegengebrachte Vertrauen sowie die vielen wissenschaftlichen Diskussionen nicht nur über diese Arbeit sondern auch darüber hinaus. Besonders dankbar bin ich für die Möglichkeit, dass ich mir ein breites Methodenspektrum aneignen konnte.

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen danke ich für die Unterstützung meiner strukturbioologischen Arbeiten mit Rat und Tat sowie für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Den ganzen Mitarbeitern des Instituts für Zytobiologie danke für die tolle Atmosphäre im Haus und viele schöne gemeinsame Stunden bei diversen Grillfeiern, Betriebsausflügen und Weihnachtsfeiern.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Essen danke ich für die freundliche Kooperation im Rahmen der Benutzung von MarXTAL. Insbesondere gilt mein Dank Manuel Maestre-Reyna für die Zusammenarbeit bei der Fdx2 Struktur und die Messungen am ESRF in Grenoble.

PD Dr. Antonio Pierik danke ich für die Unterstützung bei der Bearbeitung des Cia1 Projektes, insbesondere für die hilfreichen Tipps bei bioinformatischen Analysen.

Dr. Doru Vornicescu danke ich für die Zusammenarbeit im Bereich der SPR-Messungen. Auch wenn manches nicht wie geplant ablief, so habe ich doch viel gelernt und gemeinsam sind wir schließlich doch zu einem guten Ergebnis gekommen.

Für die gute Zusammenarbeit bei den Messungen zum Elektronentransfer auf Cytochrom P450 Enzyme danke ich Anna Hobler und Dr. Frank Hannemann.

Meinen mehrjährigen Arbeitskreiskollegen sage ich danke für die Hilfen und Ratschläge im zellbiologischen und biochemischen Laboralltag. Vielen Dank euch allen!

Für die Durchsicht dieser Arbeit bedanke ich mich bei meinen Korrekturlesern Simon Reitz und Sabine Molik.

Besonders bedanken möchte ich bei Sabine auch für eine tolle Zeit im Labor. Wir haben viel gelacht und mindestens ebenso viel über unsere Arbeit diskutiert. Dabei sind viele nützliche Tipps und Ideen entstanden, die mich immer wieder ein Stück weiter gebracht haben.

Christoph und Tobias danke ich für die schöne gemeinsame Zeit im Institut und auch besonders außerhalb davon - damit meine ich nicht nur den Balkon und das Kaffeetriumvirat. Allen Mensagängern sei an dieser Stelle gedankt für viele unterhaltsame Stunden, neben den üblichen Verdächtigen seien besonders Bastian und Dominik erwähnt.

Meinen Freunden danke ich für die moralische Unterstützung und Erinnerung daran, dass auch ein Leben neben dem Laboralltag existiert. Insbesondere danke ich Simon für eine außergewöhnliche Freundschaft und Unterstützung in wirklich allen denkbaren Lebenslagen.

Nicht zuletzt gebührt mein Dank meiner Familie, die mich immer nach Kräften unterstützt hat. Ohne sie wäre das alles nicht möglich. Vielen herzlichen Dank! Ein ganz spezielles Dankeschön möchte ich meinem Schatz Corina sagen, einfach für alles!



