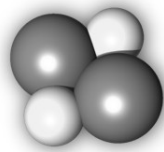


Aus dem Institut für Zytobiologie und Zytopathologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. Roland Lill

**DER FRÜHE TEIL DER MITOCHONDRIALEN
EISEN-SCHWEFEL-CLUSTER ASSEMBLIERUNGSMASCHINERIE:
STRUKTURELLE UND MECHANISTISCHE EINBLICKE**



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

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sven-Andreas Gallus Kurt Uwe Freibert
aus Freiburg im Breisgau

Marburg/Lahn, 2015

Angenommen
vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer
Referent: Prof. Dr. Roland Lill (FB 20)
1. Korreferent:
2. Korreferent: Dr. Vasundara Srinivasan (SYNMIKRO)

Gebrauchshinweise

Diese Arbeit beinhaltet sowohl 3D-Abbildungen als auch Videomaterial.

Abbildungen, welche ein entsprechende Zeichen aufweisen (🌀), sind auch als 3D-Abbildung vorhanden. Sie sind in einem Einlegeheftchen abgedruckt, welches herausgenommen und parallel betrachtet werden kann. Zusätzlich befinden sie sich auf dem beiliegenden USB-Stick im Unterordner "3D_Abbildungen". Die benötigte 3D-Brille (rot/cyan) liegt bei.

Zu Abbildungen, welche das entsprechende Zeichen aufweisen (♣️), sind Videos vorhanden. Sie befinden sich auf dem beiliegenden USB-Stick im Unterordner "Videomaterial". Die entsprechenden Beschreibungen sind unter „8. Videobeschreibungen“ zu finden.

Diese Dissertationsschrift ist auch digital im pdf-Format auf dem beiliegenden Stick hinterlegt. Sie befindet sich im Unterordner "Dissertation".

Abkürzungen und Fachbegriffe

Amp	-----	Ampicillin
APS	-----	Ammoniumperoxodisulfat
CIA	-----	cytosolic iron sulfur cluster assembly
C-Terminus	-----	Carboxyterminus
CYP	-----	Zytochrom P450 Enzym
dH ₂ O	-----	einfach destilliertes Wasser
ddH ₂ O	-----	doppelt destilliertes Wasser
DNS	-----	Desoxyribonukleinsäure
DTT	-----	1,4-Dithiothreitol
EtOH	-----	Ethanol
Fe/S	-----	Eisen-Schwefel
FPLC	-----	fast protein liquid chromatography
g	-----	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
His6	-----	Hexahistidinyl
His-Markierung	-----	Histidinylmarkierung von Proteinen
ISC	-----	iron sulfur cluster assembly
Kb	-----	Kilobasenpaare
LB	-----	Luria-Bertan
M	-----	(molar mol/L)
MB-Typ Ferredoxine	-----	Mitochondrien-Bakterien-Typ Ferredoxine
NTA	-----	Nitrilotriacetat
N-Terminus	-----	Aminoterminus
OD _x	-----	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
PAGE	-----	Polyacrylamidgelelektrophorese
RMSD	-----	quadratische Mittelwertabweichung (root mean square deviation)
rpm	-----	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute) rpm
RT	-----	Raumtemperatur
SDS	-----	Natriumdodecylsulfat
Strep	-----	Strep-tag® der Firma IBA GmbH
Tris	-----	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	-----	Volumen pro Volumen
w/v	-----	Gewicht pro Volumen

Zusammenfassung	8
Summary	10
1. Einleitung	12
1.1. DIE EUKARYOTISCHE ZELLE	12
1.1.1. <i>Proteine und Kofaktoren– Die kleinsten funktionellen Einheiten des Lebens</i>	13
1.1.1.1. Organische Kofaktoren	13
1.1.1.2. Anorganische Kofaktoren	14
1.2. EISEN-SCHWEFEL-CLUSTER	15
1.2.1. <i>Struktur</i>	15
1.2.2. <i>Funktionen</i>	17
1.2.3. <i>Biogenese von FeS/ Proteinen</i>	19
1.2.4. <i>Mitochondrielle Fe/S-Cluster Biogenese: Die ISC Maschinerie</i>	20
1.2.5. <i>Die frühe ISC Maschinerie in Hefe</i>	22
1.2.5.1. Das Gerüstprotein Isu1	22
1.2.5.2. Der Desulfurasekomplex Nfs1/Isd11	24
1.2.5.3. Das Hefe Frataxin-Homolog Yfh1	26
1.2.5.4. Das Ferredoxin Yah1	27
1.3. AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	29
2. Materialien	31
2.1. GERÄTE	31
2.2. CHEMIKALIEN, ENZYME, GRÖßENSTANDARDS	32
2.3. SYNTHESE DER GENE VON <i>C. THERMOPHILUM</i>	32
2.4. PLASMIDE	33
2.5. BAKTERIENSTÄMME	33
2.5.1. <i>E. coli DH5α (Invitrogen)</i>	33
2.5.2. <i>E. coli BL21(DE3)-Gold (Invitrogen)</i>	34
2.6. MEDIEN ZUR KULTIVIERUNG VON <i>E. COLI</i>	34
2.6.1. <i>Kultivierung von E. coli in Vollmedium</i>	34
2.6.2. <i>Kultivierung von E. coli in Minimalmedium</i>	35
3. Methoden	36
3.1. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	36
3.1.1. <i>Isolation von Plasmid-DNA aus E. coli</i>	36
3.1.2. <i>Aufreinigung von der synthetisierten Gene</i>	36
3.1.3. <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	36
3.1.4. <i>DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen</i>	37
3.1.5. <i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	37
3.1.6. <i>Herstellung und Transformation chemisch kompetenter E. coli Zellen</i>	37
3.2. BIOCHEMISCHE METHODEN	38
3.2.1. <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	38
3.2.2. <i>Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Gelen</i>	39
3.2.3. <i>Bestimmung von Proteinkonzentrationen</i>	39
3.2.4. <i>Proteinaufreinigung</i>	39
3.2.4.1. Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	39
3.2.4.2. Zellaufschluss von <i>E. coli</i> (präparativ)	40
3.2.4.3. Chromatographische Methoden	40
3.2.4.3.1. Affinitätschromatographische Methoden	41
3.2.4.3.2. Ionenaustauschchromatographie (IEC)	41
3.2.4.3.3. Größenaustauschchromatographie (Gelfiltration; SEC)	42
3.2.4.4. Ändern des Puffersystems einer Proteinprobe	42
3.2.4.5. Konzentration von Proteinen und Komplexen	43
3.3. BIOPHYSIKALISCHE METHODEN	43
3.3.1. <i>MicroScale Thermophorese (MST)</i>	43
3.3.2. <i>Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS)</i>	44

3.4.	SPEKTROSKOPISCHE METHODEN.....	44
3.4.1.	<i>Circulardichroistische Spektroskopie (CD-Spektroskopie)</i>	44
3.4.2.	<i>Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)</i>	46
3.4.2.1.	Strukturlösung und Verfeinerung von Yah1 und Isu1.....	46
3.4.2.2.	Datensammlung zur Bestimmung des Komplexes aus Yah1 und Isu1.....	47
3.5.	BIOINFORMATISCHE METHODEN	48
3.5.1.	<i>Molekulare Proteinmodellierung</i>	48
3.5.2.	<i>Protein-Protein-Docking</i>	48
3.5.3.	<i>Graphische Darstellung von strukturellen Daten</i>	49
4.	Ergebnisse	50
4.1.	DIE FUNKTION DER ISC-MASCHINERIE AUF MOLEKULARER EBENE	50
4.1.1.	<i>Reduziertes und oxidiertes Yah1 sind monomere, gefaltete Proteine</i>	50
4.1.1.1.	NMR Datensammlung und Auswertung	50
4.1.1.2.	Strukturbeschreibung	52
4.1.1.3.	Unterschiede der Redoxzustände erleichtern den Elektronentransfer	55
4.1.2.	<i>Das Gerüstprotein Isu1 ist ein monomeres, gefaltetes Protein</i>	60
4.1.2.1.	NMR Datensammlung und Auswertung	60
4.1.2.2.	Strukturbeschreibung	62
4.1.2.3.	Isu1 aus <i>C. thermophilum</i> ist strukturell konserviert.....	63
4.1.3.	<i>Yah1 und Isu1 bilden einen heterodimeren Komplex</i>	65
4.1.3.1.	Die Interaktionsstelle auf Yah1	65
4.1.3.2.	Die Interaktionsstelle auf Isu1	67
4.1.3.3.	Beschreibung des Yah1-Isu1 Komplexes	69
4.1.4.	<i>Der Komplex aus Yah1 und Isu1 ist Teil der frühen ISC-Maschinerie</i>	71
4.1.4.1.	Isu1 interagiert mit Yah1, Yfh1 und Nfs1 in vitro	72
4.1.4.2.	Frataxin interagiert mit Isu1, Yah1 und Nfs1 und bindet Fe(II) in vitro	74
4.1.4.3.	Die Desulfurase Nfs1 als zentraler Synthesepunkt der Fe/S-Cluster Biogenese	76
4.1.5.	<i>Die frühe ISC-Maschinerie ist ein multimerer Komplex</i>	81
4.1.5.1.	Nfs1 und Isd11 bilden einen hexameren Komplex.....	81
4.1.5.2.	Isu1, Yah1 und Yfh1 binden an ein Nfs1-Homodimer in einer 1:1 Stöchiometrie.....	84
4.1.5.3.	Die frühe ISC-Maschinerie ist in ihrer aktiven Form ein Multi-Protein-Komplex.....	87
4.2.	DIE ROLLE DES KOMPLEXES AUS YAH1 UND ISU1 IST HOCHKONSERVIERT	90
5.	Diskussion	93
5.1.	DER KOMPLEX AUS YAH1 UND ISU1 BILDET SICH REDOXSPECIFISCH	93
5.1.1.	<i>Ferredoxine: So ähnlich und doch verschieden</i>	93
5.1.2.	<i>Isu1: Ein hochkonserviertes Gerüstprotein der Fe/S-Cluster Biogenese</i>	96
5.1.3.	<i>Der 3D-Struktur des Yah1-Isu1-Komplexes</i>	97
5.2.	DIE ISC-MASCHINERIE BEINHALTET EIN KOMPLEXES INTERAKTIONSNETZWERK	100
5.2.1.	<i>Frataxin: Ein Protein mit zwei Funktionen?</i>	100
5.2.2.	<i>Nfs1/Isd11: Der zentrale Dreh- und Angelpunkt der Fe/S-Cluster Biogenese</i>	101
5.3.	DIE STRUKTUR UND FUNKTION DER FRÜHEN ISC-MASCHINERIE.....	102
5.3.1.	<i>In Gegenwart von Cystein dissoziiert Isd11 transient von der Desulfurase Nfs1</i>	104
5.3.2.	<i>Die 3D-Struktur der frühen ISC-Maschinerie</i>	105
5.4.	DIE FRÜHE ISC-MASCHINERIE IST EIN HOCHKONSERVIERTER KOMPLEX.....	109
5.5.	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	110
6.	Quellen	112
7.	Anhang	128
8.	Videobeschreibungen	135
9.	Abbildungsverzeichnis	136
10.	Lebenslauf	137
11.	Danksagung	139

Zusammenfassung

Eisen-Schwefel (Fe/S) Cluster sind die ältesten anorganischen Protein-Kofaktoren und ubiquitär in allen Reichen des Lebens vorhanden. Fe/S-Proteine koordinieren häufig essentielle Aufgaben in der Zelle wie z.B. Teile der Zellatmung, der DNA Synthese und der Proteintranslation. Trotz der vergleichsweise einfachen chemischen Struktur und Zusammensetzung von Fe/S-Clustern benötigt die Zelle ein komplexes System für deren Synthese und Einbau in *apo*-Proteine. Defekte in der Fe/S-Proteinbiogenese sind mit schwerwiegenden Krankheiten, wie z.B. der Friedreich-Ataxie oder der sideroblastischen Anämie verknüpft. Ein besseres Verständnis der Biogenese von Fe/S-Proteinen eröffnet neben dem grundlegenden Verständnis dieses lebenswichtigen Prozesses auch eine eventuelle Behandlung solcher oft lebensbedrohlichen Erkrankungen.

In Eukaryoten beginnt die Synthese von Fe/S-Clustern in den Mitochondrien, bzw. in den verwandten Mitosomen. Diese Organellen beherbergen die sog. „iron-sulfur cluster“ (ISC) Assemblierungsmaschinerie. Der frühe Teil der **ISC-Maschinerie** dient zur Synthese eines [2Fe-2S]-Clusters auf dem Gerüstprotein **Isu1**, wozu fünf weitere ISC Komponenten benötigt werden. Der Desulfurasekomplex aus **Nfs1** und **Isd11** liefert dabei den Schwefel, während das Frataxin **Yfh1** als Eisendonator und/oder Schwefelüberträger wirkt. Eisen und Schwefel werden schließlich auf Isu1 unter Elektronenzufuhr durch das Ferredoxin **Yah1** und seiner Reduktase **Arh1** zu einem Fe/S-Cluster zusammengesetzt. In dieser Arbeit konnten mechanistische und strukturelle Einblicke in die Funktion dieser frühen ISC Maschinerie auf molekularer Ebene gewonnen werden. Erstens konnte auf Basis der durch NMR Spektroskopie **atomar aufgelösten Strukturen** des Ferredoxins Yah1, des Gerüstproteins Isu1 und des Yah1-Isu1 Komplexes gezeigt werden, wie die beiden Proteine interagieren. Daraus konnte ein Vorschlag abgeleitet werden, wie die Elektronenübertragung vom reduzierten Fe/S-Cluster des Ferredoxins zum Isu1 bewerkstelligt wird. Hierbei spielen vor allem **strukturelle Veränderungen** innerhalb des Yah1 bei der Reduktion eine große Rolle, wobei das essentielle Histidin 51 als „**Elektronenbrücke**“ fungieren könnte. Zweitens konnten biochemische Untersuchungen der Interaktionen aller frühen ISC-Faktoren mittels Thermophorese zu einem zeitlich aufgelösten **Modell des Mechanismus** der initialen Fe/S-Cluster Biogenese beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass alle primären ISC-Faktoren **miteinander interagieren** und den biosynthetischen Komplex bilden. Dieser ist vom Redoxzustand der Komponenten und der Anwesenheit von Fe(II) und Cystein abhängig. Schließlich konnte auf Basis von SAXS-Daten (SAXS: small angle X-ray scattering) die **Gesamtstruktur** der frühen ISC-Maschinerie ermittelt werden. Dadurch konnte der frühe ISC-Komplex als **Dodekamer** mit folgender Stöchiometrie definiert werden: 2(Nfs1+2Isd11+Yfh1+Isu1+Yah1). Diese strukturellen Daten erlaubten trotz der relativ niedrigen Auflösung erstmals weitreichende Rückschlüsse auf den molekularen

Mechanismus der Fe/S-Cluster Biogenese. Der Komplex aus Yah1 und Isu1 ist in räumlicher Nähe zum essentiellen Persulfid-tragenden Cysteinrest des Nfs1 lokalisiert, und ermöglicht damit räumlich eine Persulfidübertragung von Nfs1 auf Isu1. Anschließend kann das Persulfid durch Yah1 reduziert werden. Die bereits vorgeschlagene Funktion des Frataxins Yfh1 als Eisendonator konnte aufgrund seiner Lage im ISC-Komplex und im Speziellen der Position seines konservierten Histidins 23 weiter untermauert werden. Auch die Lage von Isd11 auf Nfs1 konnte erstmals gezeigt werden. Isd11 bindet weit vom aktiven Zentrum des Komplexes entfernt, befindet sich aber in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum des Nfs1 und der Cysteinbindestelle. Dies lässt den Schluss zu, dass Isd11 die Aktivität von Nfs1 reguliert. Somit konnte auf molekularer Ebene ein Vorschlag für die **Herkunft** und die **Übertragung** sowohl des **Schwefels** als auch des **Eisens** gemacht und Einblicke in die Lokalisation von Isd11 auf Nfs1 gewonnen werden. Zusammen genommen bilden diese Ergebnisse einen wichtigen Schritt in Richtung des molekularen Verständnisses der Fe/S-Cluster Biogenese und damit auch die Basis für weitere Untersuchungen.

Summary

Iron-sulfur (Fe/S) clusters are ancient protein cofactors and ubiquitously present in all kingdoms of life. Fe/S-proteins coordinate essential functions within the cell, e.g. cellular respiration, DNA-synthesis and protein translation. Despite the relatively simple chemical structure and composition of Fe/S-clusters, the cell requires a complex system for their synthesis and incorporation into apo-proteins. Deficiencies in Fe/S-protein biogenesis are often linked with severe metabolic defects and serious diseases such as Friedreich's ataxia or sideroplastic anemia. A better understanding of the biogenesis of Fe/S-proteins may help to find new therapies for such life-threatening diseases.

In eukaryotes, the synthesis of Fe/S-clusters starts inside mitochondria (or related organelles such as mitosomes). These organelles contain the so-called „iron-sulfur-cluster“ (ISC) assembly machinery. The early part of the **ISC-machinery** accomplishes the synthesis of a [2Fe-2S]-cluster on the scaffold protein **Isu1** which requires five additional factors. The desulfurase complex **Nfs1/Isd11** delivers the sulfur while the frataxin **Yfh1** serves as an iron-donor and/or sulfur-carrier. The so provided iron and sulfur will finally be assembled to an Fe/S-cluster. The assembly process depends on an electron supply by the ferredoxin **Yah1** and its reductase **Arh1**. In this study, additional mechanistic and structural insights into the early ISC-machinery were gained at a **molecular level**. First, it was shown how the two proteins interact, based on the atomic structures of Yah1, Isu1 and the Yah1-Isu1 complex solved by NMR-spectroscopy. This revealed a possible mechanism for the electron transfer from the reduced Fe/S-cluster of Yah1 to Isu1. Therefore, the **structural changes** of Yah1 upon reduction play a major role while the essential His51 may have an **electron-bridging** function. Second, biochemical studies of the interactions of all early ISC factors by Thermophoresis contributed to a time-resolved **model of the mechanism** of the initial Fe/S-cluster biogenesis. All primary ISC factors interact with each other and form a biologically competent complex, which is dependent on both the redox-state of the components and the presence of Fe(II) and cysteine. Finally, the **overall structure** of the early ISC-machinery was determined by SAXS (small angle X-ray scattering). This allowed the early ISC complex to be defined as a **dodecamer** having the following stoichiometry: 2(Nfs1+2Isd11+Yfh1+Isu1+Yah1). These structural data, despite the relatively low resolution, allowed new insightful conclusions about the molecular mechanism of Fe/S-cluster biogenesis. The Yah1-Isu1 complex is located in close proximity to the essential persulfide-bearing cysteine residue of Nfs1, and thus enables a persulfide-transfer from Nfs1 to Isu1. Then the persulfide can be reduced by Yah1. The previously proposed function of the frataxin Yfh1 as an iron-donor was further substantiated due to its localization within the ISC-complex and in particular the position of its conserved histidine 23. For the first time the location of Isd11 on Nfs1 could be shown. Isd11 binds far away from the active site of the

ISC-complex, but is located in close proximity to the active site of Nfs1 and its cysteine binding pocket. This leads to the conclusion that Isd11 may regulate the activity of Nfs1. Thus, these data offer an explanation for the **origin** and the **transfer mechanism** of both the **iron** and the **sulfur** on a molecular basis and suggest a possible location of Isd11 on Nfs1. Taken together, these results constitute an important step in the direction of the molecular understanding of the Fe/S cluster biogenesis and therefore also form the basis for further investigations.

1. Einleitung

1.1. Die eukaryotische Zelle

Innerhalb der eukaryotischen Welt lässt sich eine reiche Vielfalt an verschiedensten Kombinationen an Organellen finden (Douglas et al., 2001), welche, zusammen mit anderen Merkmalen, nach neueren Erkenntnissen zu einer Klassifizierung in fünf untergeordnete Reiche führt: Animalia, Fungi, Plantae, Chromista und Protozoa (Nakamura et al., 2010). Chromista und Protozoa können entweder Mitochondrien, Plastiden oder beides besitzen, wohingegen Plantae immer beides, nämlich eine spezialisierte Form der Plastide (Chloroplasten) und Mitochondrien besitzen. Fungi wie auch Animalia besitzen dagegen ausschließlich Mitochondrien (Abb. 1.1.). Da in dieser Arbeit ausschließlich mit eukaryotischen Organismen der beiden Reiche der Fungi und der Animalia gearbeitet wurde, wird hierauf der Hauptfokus liegen und der Begriff der „eukaryotischen Zelle“ auf diese

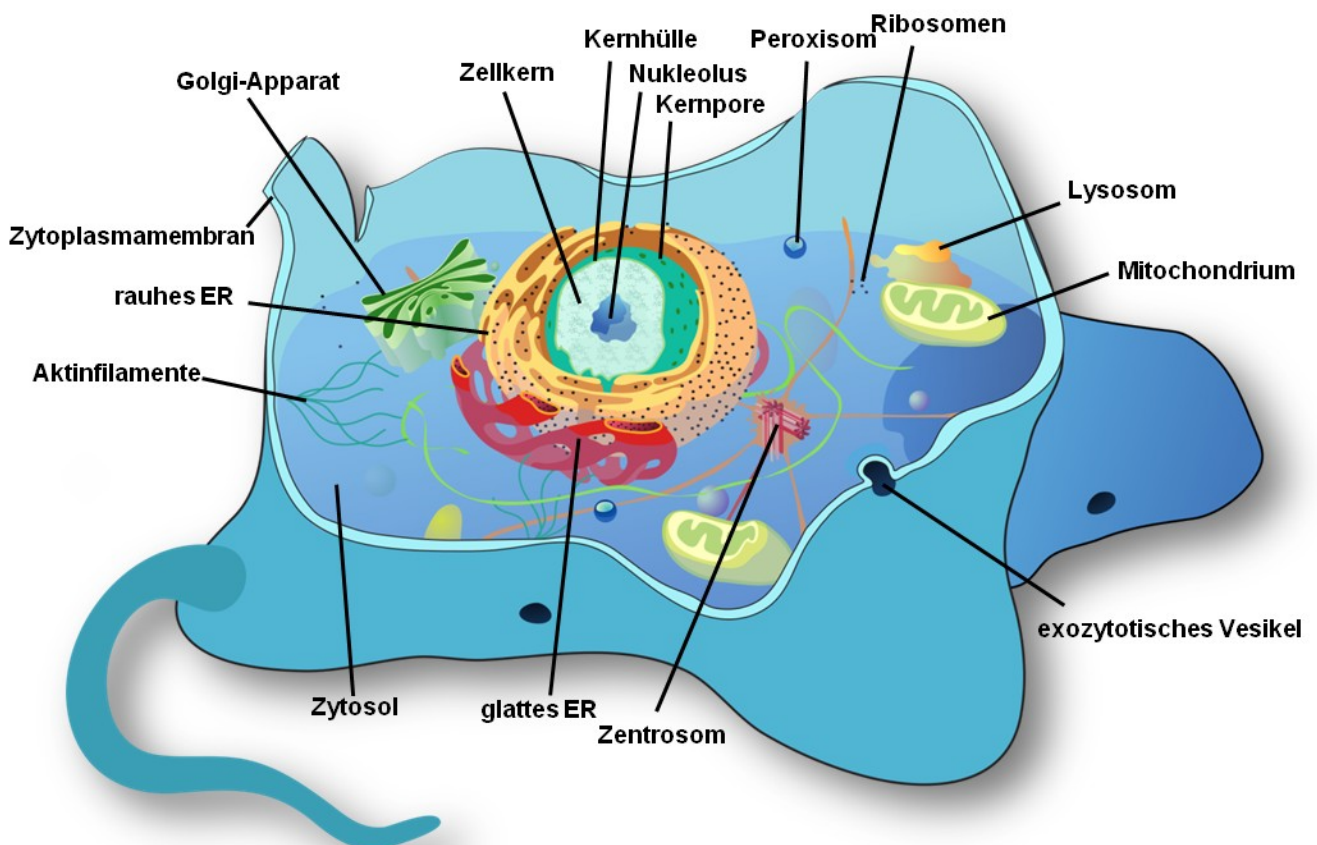


Abb. 1.1.: Die eukaryotische Zelle (nicht pflanzlich). Eukaryotische Zellen enthalten neben dem Zellkern, dem Golgi-Apparat, dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und anderen Kompartimenten wie dem Lysosom oder dem Peroxisom auch Mitochondrien. Die Kompartimente und Organellen sind in eine Matrix (Zytosol) eingebettet und von einer Zytoplasmamembran umgeben
Angepasst nach: Mariana Ruiz Villarreal, Hamburg

Reiche reduziert werden. Während der Zellkern mit seiner DNS für die Reproduktion und den Unterhalt, das endoplasmatische Retikulum für die Verteilung und Reifung wichtiger Proteine und der Golgi-Apparat für den Transport der Proteine an die vorgesehene Stelle zuständig

sind, ist die Funktion der Mitochondrien hauptsächlich für den Energiestoffwechsel und für die Reifung Metall-abhängiger Proteine zuständig. Innerhalb der eukaryotischen Welt, im speziellen innerhalb des Reiches der Fungi, gibt es jedoch Organismen, welche kein klassisches Mitochondrium besitzen. Teilweise bewältigen diese Organismen den Energiestoffwechsel auf andere Weise. Dennoch verfügen alle bisher bekannten Organismen dieser Gruppe über ein Analogon zu den Mitochondrien (MRO = mitochondria related organelle), welches nach wie vor solche lebenswichtigen Aufgaben inne hat, die die Zelle nicht völlig ins eigene Zytosol verlegen konnte. Innerhalb dieser Gruppe findet man Organismen mit Mitosomen (Tovar et al., 1999; Williams et al., 2002) (degeneriertes Mitochondrium, keine oxidative Phosphorylierung) oder Hydrogenosomen (Boxma et al., 2005; Lindmark and Müller, 1973) (stammt vom Mitochondrium ab, anaerobe Substratstufenphosphorylierung). Diese MRO's haben jedoch immer mindestens eines mit dem Mitochondrium gemeinsam: Die Aufgabe der Reifung von Metall-abhängigen Proteinen, insbesondere von solchen mit Eisen-Schwefel-Zentren (Fe/S). Alle bisher bekannten Varianten der Mitochondrien übernehmen diese Aufgabe in gleichem oder zumindest ähnlichem Maße.

1.1.1. Proteine und Kofaktoren– Die kleinsten funktionellen Einheiten des Lebens

Proteine sind Moleküle, welche aus Aminosäuren, verknüpft durch eine Peptidbindung, aufgebaut sind. Die Größe dieser Moleküle reicht von einigen wenigen Aminosäuren bis hin zu mehreren tausend dieser Untereinheiten.

Viele essentielle Proteine sind auf Kofaktoren angewiesen. Diese spielen bei nahezu allen biologischen Prozessen innerhalb der Zelle eine wichtige Rolle. So ist es kaum verwunderlich, dass die Diversität von Kofaktoren außerordentlich groß ist. Es gibt organische als auch anorganische Kofaktoren.

1.1.1.1. Organische Kofaktoren

Es existiert eine Fülle an organischen Kofaktoren. Zwei der wichtigsten Vertreter dieser Gruppe, welche auch für diese Arbeit eine bedeutende Rolle spielen, sind Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Pyridoxalphosphat (PLP) (Abb. 1.2.). FAD spielt bei der Übertragung von Elektronen in vielen Stoffwechselwegen eine bedeutende Rolle. Es ist auch der Kofaktor der für diese Arbeit wichtigen Ferredoxin-Reduktase. Es wirkt als Elektronenüberträger und transferiert Elektronen von NADPH auf Ferredoxin. PLP spielt bei vielen enzymatischen Reaktionen eine Rolle; etwa 4% aller enzymatischen Aktivitäten sind PLP-abhängig (Percudani and Peracchi, 2003). Es beinhaltet neben der bei physiologischem pH doppelt negativ geladenen Phosphatgruppe, einen Pyridinring mit einem Hydroxylrest und einer Formylgruppe, wobei der Stickstoff des Pyridinrings und die Formylgruppe die

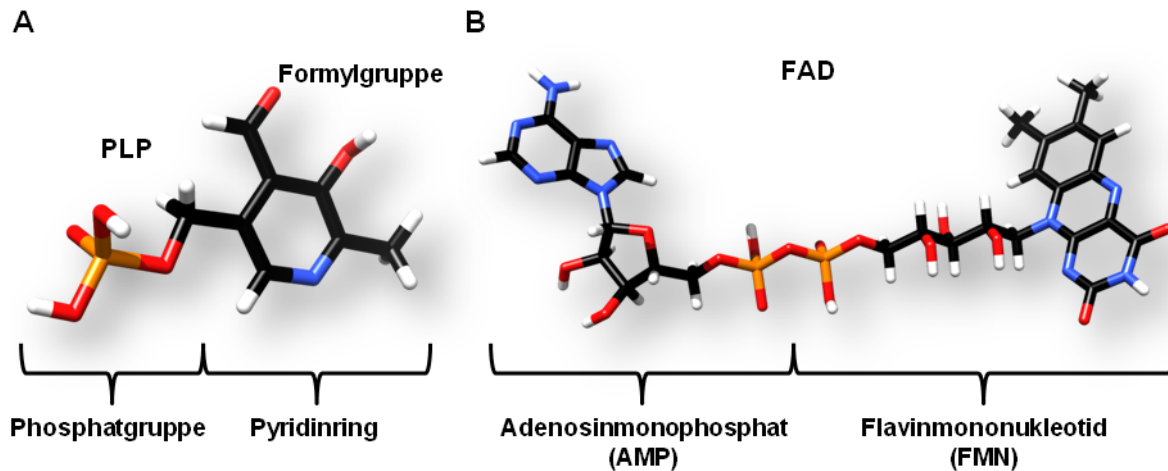


Abb. 1.2.: Zwei der wichtigsten organischen Kofaktoren. Rot: O, orange: P, blau: N, weiß: H, schwarz: C. **A:** PLP besitzt einen Pyridinring und eine Phosphatgruppe. Die Formylgruppe des Pyridinrings bildet die Schiff'sche Base aus. **B:** FAD besteht aus einem Adenosinmonophosphat und einem Flavinmononucleotid (alternativ Adenosindiphosphat und Riboflavin). Das Flavinmononucleotid kann zweifach protoniert werden und nimmt dabei 2 Elektronen auf. Diese Elektronen können im Anschluss weitergegeben und transferiert werden.

funktionell wichtigsten Teile darstellen. PLP bildet in seiner „inaktiven“ Form immer eine Schiff'sche Base mit einem Lysin-Rest im aktiven Zentrum eines Enzyms (Enzym-Aldimin). Diese Bindung wird schließlich bei Aktivierung durch eine neue Schiff'sche Base mit dem Aminosäuresubstrat ersetzt. Somit kann PLP das Substrat kovalent als „externes“ Aldimin binden. Im Falle der Eliminierung von Cystein, welche für diese Arbeit von größter Wichtigkeit ist, wird Cystein als „externes“ Aldimin an Stelle des Lysins gebunden. Durch interne Ladungsverschiebung, wobei der Stickstoff des Pyridinrings eine essentielle Rolle übernimmt, kommt es zur Eliminierung von Sulfid. In diesem speziellen Fall wird zum Einen Schwefel in Form von Sulfid für die Biogenese des anorganischen Fe/S-Clusters bereitgestellt, zum Anderen wird Alanin (oder in anderen Fällen auch Brenztraubensäure) freigesetzt. Dieser Mechanismus erlaubt es PLP, an vielen verschiedenen Reaktionen teilzunehmen, in denen Aminosäuren involviert sind.

1.1.1.2. Anorganische Kofaktoren

Neben den organischen spielen auch anorganische Kofaktoren eine essentielle Rolle im Leben einer Zelle. Die Gruppe der anorganischen Kofaktoren beinhaltet alle proteingebundenen, metallhaltigen Zentren, welche unterschiedlichste Funktionen innehaben können. Die gängigsten Metallionen sind Fe, Zn, Cu, Co, Mo, Mn, Mg, Ca, wobei die Erdalkalimetalle wie Calcium und Magnesium oft keine katalytische sondern eher eine strukturelle Aufgabe erfüllen. Dies gilt partiell auch für Zink, wobei hier die Faltung an sich („Zinkfinger“) eine regulatorische und funktionelle Aufgabe erfüllt. Katalytisch sind jedoch die Übergangsmetalle von größerem Interesse und von enormer Wichtigkeit für einen Großteil

der Stoffwechselwege einer Zelle. Ihre Fähigkeit, verschiedene Oxidationszustände einzunehmen und somit Redoxprozesse zu leiten und Elektronentransfers zu koordinieren, machen sie in ihrer Enzym-gebundenen Form in allen Reichen des Lebens unersetzlich. Der in dieser Arbeit bearbeitete Kofaktor ist der anorganische Fe/S-Cluster.

1.2. Eisen-Schwefel-Cluster

Fe/S-Cluster kommen in verschiedensten Zusammensetzungen vor und übernehmen eine Fülle von essentiellen Aufgaben in jedem lebenden Organismus. Obwohl Fe/S-Cluster die ältesten bekannten Kofaktoren der lebendigen Welt darstellen, wurde ihre Existenz erst zu Beginn der 1960er Jahre nachgewiesen (Beinert et al., 1997; DerVartanian et al., 1967; Shethna et al., 1968). So erkannte man relativ gleichzeitig bei der Erforschung photosynthetischer Bakterien (Rao et al., 1972), stickstofffixierender Bakterien (Eady et al., 1972; Orme-Johnson et al., 1972) und Mitochondrien (Kaplan et al., 1973), dass Proteine mit unbekanntem Kofaktoren eine essentielle Rolle spielen. Es wurde im Laufe der Jahrzehnte immer klarer, dass es sich hierbei um Fe/S-Proteine handelte (Beinert et al., 1997). Doch nicht nur in bereits bestehendem Leben sind die Elemente Eisen und Schwefel in Form von Fe/S-Cluster essentiell. Nach einer Hypothese von Günter Wächtershäuser könnte das Leben auf unserem Planeten auf der Oberfläche von Eisen-Schwefel-Mineralien entstanden sein, da diese Strukturen exzellente katalytische Fähigkeiten aufweisen. Die Hypothese der „Eisen-Schwefel-Welt“ hat gegenüber allen anderen Hypothesen zur Entstehung von Leben den entscheidenden Vorteil, dass die Reduktionsstärke für die Kohlenstofffixierung aus der Bildung von Pyrit (FeS_2) gewonnen werden kann. Sie bedarf also keiner weiteren Energiequelle, als der oxidativen Bildung von Pyrit aus Eisen(II)-Sulfid und Schwefelwasserstoff ($\text{FeS} + \text{H}_2\text{S} \rightleftharpoons \text{FeS}_2 + \text{H}_2$) (Wächtershäuser, 1990).

1.2.1. Struktur

In der Natur existiert eine Fülle verschiedenster Fe/S-Cluster unterschiedlichster Zusammensetzung und Struktur (Abb. 1.3.). Die gängigsten und ubiquitär auffindbaren Fe/S-Cluster sind das [2Fe-2S]- und das [4Fe-4S]-Cluster. Diese findet man in allen Reichen des Lebens. Das [2Fe-2S]-Cluster besitzt im Normalfall eine rhombische Koordination, wohingegen das [4Fe-4S]-Cluster eine kubane Struktur aufweist. Die meisten dieser Fe/S-Cluster werden von vier Cysteinyl-Resten koordiniert. Ausnahmen umfassen z.B. die Rieske-Typ [2Fe-2S]-Cluster, bei denen zwei der vier Cysteinyl-Reste durch zwei Histidine ausgetauscht werden, oder die so genannten „Radical-SAM-Enzyme“, welche einen [4Fe-4S]-Cluster durch drei Cysteinyl-Reste und ein S-Adenosylmethionin (SAM) koordinieren. Neben diesen beiden häufigsten Formen existieren je nach Lebewesen noch mehrere andere Fe/S-Cluster, welche alle eine spezielle Aufgabe erfüllen. So zum Beispiel

koordinieren bestimmte Enzyme der Hydrogenase-Familie einen „H-Cluster“, welcher aus einem kubanen [4Fe-4S]-Cluster und zwei zusätzliche Eisenatomen besteht, welche über einen Cysteinyl-Rest miteinander verbrückt sind und zusätzlich CO und CN⁻ als Liganden tragen, (Adams, 1990; George et al., 1989; Rusnak et al., 1987). Neben diesen reinen Fe/S-Clustern, welche keine anderen Metalle in sich tragen, gibt es Mischformen wie etwa den „C-Cluster“ der CO Dehydrogenase, welcher eine wichtige Rolle in Kohlenmonoxid-verwertenden Bakterien spielt. Innerhalb des C-Clusters wurde ein Eisen durch ein Nickel ersetzt, während das fehlende Eisen außerhalb der kubanen Struktur separat durch zwei Schwefel-Reste koordiniert wird (Anderson and Lindahl, 1994; Dobbek et al., 2001). Eine weitere Mischform stellt das Nitrogenase FeMo-Zentrum dar, welches innerhalb eines komplexen Fe/S-Clusters noch ein Molybdän trägt (Dos Santos et al., 2004; Pienkos et al., 1977). Weiter existieren noch komplexere Formen, auch polymetallischer Zusammensetzung wie das 8Fe-Zentrum ungewöhnlicher Hydrogenasen oder Degradationsprodukte der oben aufgeführten Zentren wie z.B. [3Fe-4S]-Cluster oder sogar [4Fe-3S]-Cluster, welche üblicherweise zur Inaktivierung des Enzyms führen, was jedoch eine regulatorische Funktion haben kann (siehe Aconitase 1.2.2.).

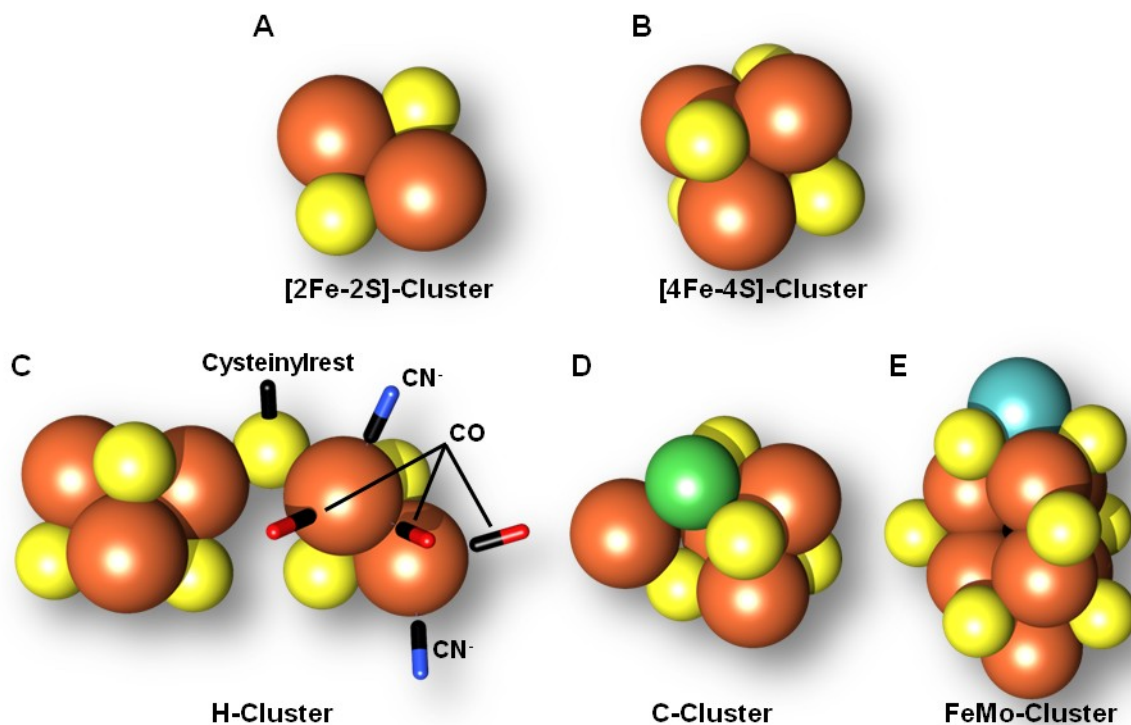


Abb. 1.3.: Die wichtigsten Fe/S-Cluster Arten. Eisen: braun, Schwefel gelb. **A:** Der meist rhombisch angeordnete [2Fe-2S]-Cluster ist der am weitesten verbreitete. **B:** Der kubane [4Fe-4S]-Cluster ist z.B. aus Komplex I der Atmungskette als Elektronenüberträger bekannt. **C:** Der H-Cluster der FeFe-Hydrogenasen besteht aus einem [4Fe-4S]-Cluster, welcher über ein Cysteinylrest mit einem [2Fe-2S]-Cluster verbrückt ist. Zusätzliche Liganden sind CO und CN⁻. **D:** Der C-Cluster der CO-Dehydrogenasen beinhaltet neben jeweils 4 Eisen- und Schwefelatomen auch ein Nickelatom (grün), welches eines der Eisenatome in einem [4Fe-4S]-Cluster ersetzt. **E:** Der sog. FeMo-Cluster besteht aus 7 Eisenatomen, 9 Schwefelatomen und einem Molybdänatom (türkies), welche sich um ein Kohlenstoff (schwarz) anlagern.

1.2.2. Funktionen

Fe/S-Cluster übernehmen eine Fülle unterschiedlicher Aufgaben in der Zelle. Ihre vier Hauptaufgaben bestehen jedoch in a) der Erhaltung der **strukturellen** Integrität, b) dem **Elektronentransfer**, c) der **Katalyse** von enzymatischen Reaktionen und d) der **sensorischen bzw. regulatorischen** Funktion. Dabei besteht ihre einfachste Aufgabe in der Aufrechterhaltung struktureller Gegebenheiten innerhalb eines Proteins. Hier erfüllt das Fe/S-Cluster keine biochemische, enzymatische oder redoxchemische Aufgabe, sondern sorgt, wie eine einfache Disulfidbrücke, ausschließlich für korrekte Faltung und damit auch für eine korrekte Funktion des jeweiligen Proteins. Als Beispiel hierfür dient die DNA-Helikase Rad3 aus Hefe oder die humanen Homologe XPD und FancJ (White, 2009) (Abb. 1.4.). Die häufigste Aufgabe von Fe/S-Clustern ist jedoch der Elektronentransfer. Die Möglichkeit eines Fe/S-Clusters einen Elektronenfluss zu generieren, besteht in der Tatsache, dass ein Fe/S-Cluster zwischen den Redoxzuständen +2 und +3 wechseln kann. Sie können dabei nicht nur als Elektronenakzeptoren, also als Lewis-Säuren, sondern auch als Elektronendonatoren und somit als Lewis-Basen wirken. Diese Fähigkeit basiert auf den ungewöhnlich hohen Variationen ihrer Redoxpotentiale, welche von der Umgebung des Fe/S-Clusters abhängen (-700mV bis +400mV) (Meyer, 2008). Als klassische Beispiele für diese Funktion dienen sowohl die Gruppe der Ferredoxine, als auch die mitochondrielle und bakterielle Atmungskette. Am besten lässt sich der Elektronentransportprozess am Beispiel der NADH-Dehydrogenase (Komplex I der Atmungskette) darstellen. Hier wird ein Elektron von NADH über FMN und sieben [4Fe-4S]-Cluster bis auf das membranständige Ubichinon übertragen. Der Übertragungsweg beträgt hierbei über 100 Å, wobei der Abstand zwischen den sieben Fe/S-Clustern grundsätzlich nicht größer als 14 Å ist, was einen effizienten Elektronentransfer möglich macht (Page et al., 1999; Zickermann et al., 2015) (Abb. 1.4.). Neben diesen sieben Elektronen-transferierenden Fe/S-Clustern besitzt Komplex I noch einen bzw. zwei [2Fe-S], welche vermutlich nur der strukturellen Integrität des Komplexes dienen und nicht zum Elektronentransport beitragen.

Eine weitere Funktion von Fe/S-Clustern basiert auf ihrer Fähigkeit der Katalyse von enzymatischen Reaktionen. So wird zum Beispiel von der Aconitase, welche einen [4Fe-4S]-Cluster koordiniert, Citrat zu Isocitrat umgewandelt, was durch eine Dehydratation und sofortige Addition von Wasser bewerkstelligt wird. Ähnliche Mechanismen sind bei den Enzymen Lys4 und Leu1 zu finden. Hierbei wirkt der [4Fe-4S]-Cluster als Lewis-Säure. Er wird bei Aconitase-ähnlichen Proteinen nur von drei Cysteinyln-Resten koordiniert, wodurch das vierte Eisen in der Lage ist, das Substrat bzw. das Produkt zu koordinieren (Abb. 1.4.). Somit dient das Fe/S-Cluster in Aconitase-ähnlichen Enzymen sowohl der Substratbindung als auch der Stabilisierung des Übergangszustandes und somit als Katalysator der Isomerisierung des Substrats. Die Aconitase ist weiter ein Beispiel für die funktionelle Relevanz degenerierter Fe/S-Cluster. So kann die Aconitase durch Freisetzung des Wasser-

koordinierten, instabilen Fe Atoms in einen inaktiven Zustand versetzt werden, in welchem es einen [3Fe-4S] koordiniert.

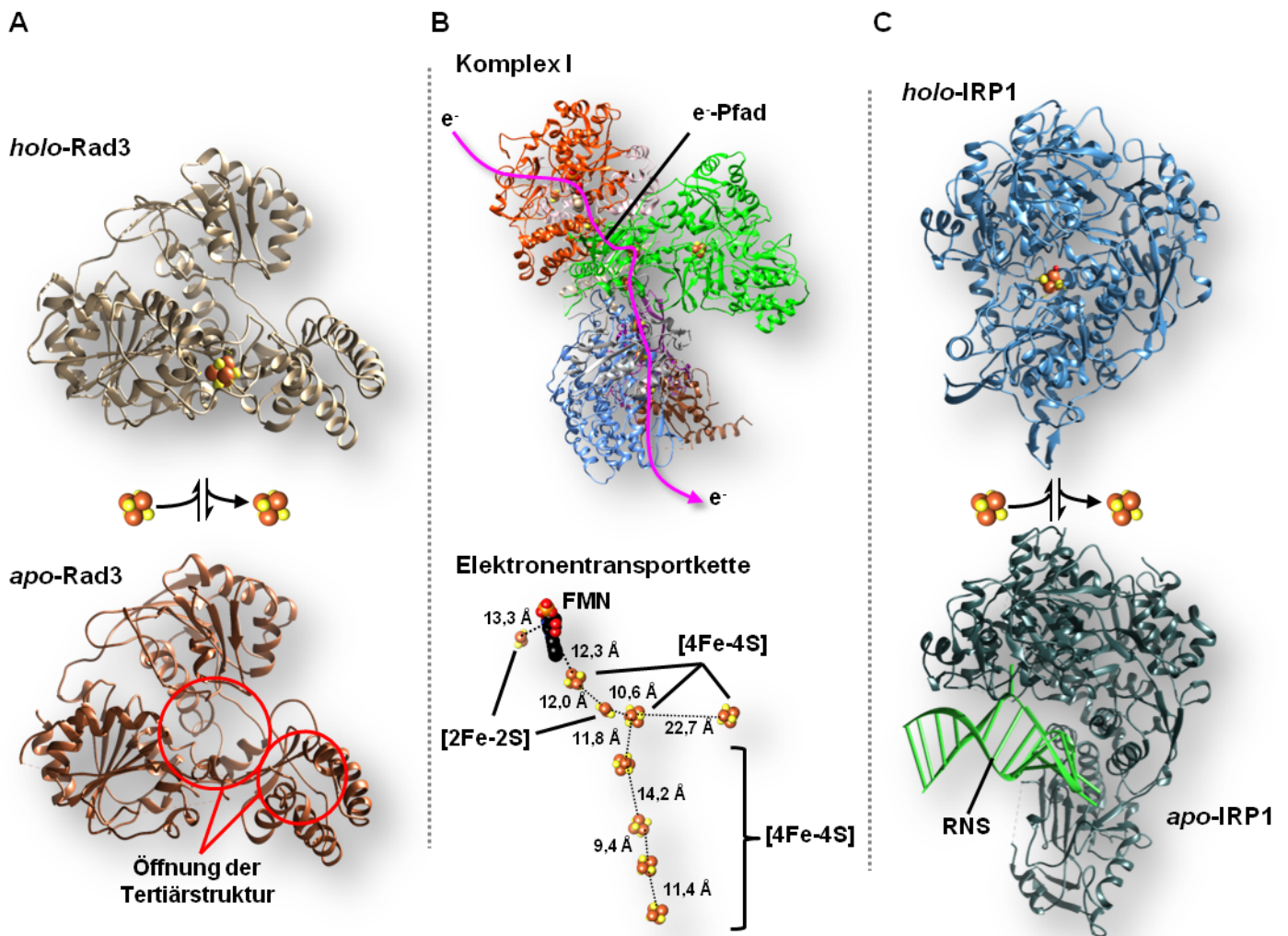


Abb. 1.4.: Fe/S-Cluster haben unterschiedliche Funktionen. Eisen: braun, Schwefel gelb. **A:** Fe/S-Cluster zur Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität von Rad3. *Holo-Rad3* in hellbraun (pdb: 3CRV) und *apo-Rad3* in braun (pdb: 3CRW). Der [4Fe-4S]-Cluster von Rad3 (Untereinheit von Transkriptionsfaktor TFIIH) erhält die Struktur einer Domäne, welche ohne Fe/S-Cluster eine Öffnung erfährt. **B:** Fe/S-Cluster bewerkstelligen einen Elektronentransfer über einen Weg von etwa 100 Å, wobei der Abstand zwischen den einzelnen Fe/S-Clustern maximal 14 Å groß ist. Hierzu werden sowohl [4Fe-4S]-Cluster als auch [2Fe-2S]-Cluster von verschiedenen Untereinheiten koordiniert. **C:** Strukturen der humanen Aconitase (IRP1) in ihrer *holo*-Form (blau) (pdb: 2B3X) und *apo*-Form (stahlblau) im Komplex mit RNS (grün) (pdb: 3SNP). Sie ist ein Beispiel sowohl für eine enzymatische Aktivität (Lewis-Säure) als auch für die regulatorische Funktion von Fe/S-Clustern. Im *holo*-Zustand katalysiert IRP1 eine Isomerisierung seines Substrats und im *apo*-Zustand bindet sie an IRE von bestimmten RNS-Strängen und reguliert so die Expression von Proteinen des Eisenmetabolismus.

Fe/S-Cluster können auch als Sensoren und/oder Regulatoren wirken. Klassische Beispiele dieser Gruppe sind die bakteriellen Transkriptionsfaktoren IscR und FNR (auch SoxR ist hier einzuordnen). Diese Proteine haben die Fähigkeit, sowohl mit als auch ohne Fe/S-Cluster aktiv zu sein und genau hierin besteht ihre besondere Funktion. Je nach Konzentration von Superoxid (O_2^-), Stickstoffmonoxid, Sauerstoff oder Verfügbarkeit von Fe/S-Clustern reprimieren oder aktivieren sie die Expression bestimmter regulatorischer Gene (Green and

Paget, 2004; Spiro, 2006). Im Falle von SoxR führt allerdings nicht der vollständige Verlust, sondern lediglich die Änderung des Redoxzustandes des Fe/S-Clusters zur Aktivierung oder Inaktivierung des Transkriptionsfaktors (Imlay, 2008). Bei höheren Eukaryoten, im speziellen bei Säugetieren, wird eine wichtige regulatorische Rolle vom [4Fe-4S]-Cluster des Proteins IRP1 übernommen (Rouault, 2006). IRP1 („Iron Regulatory Protein 1“) arbeitet in seiner *holo*-Form mit gebundenem [4Fe-4S]-Cluster als zytosolische Aconitase. In seiner *apo*-Form, das heißt ohne gebundenes Fe/S-Cluster, bindet IRP1 an bestimmte „Haarnadel-Strukturen“ innerhalb eines mRNA-Strangs, welche als IRE („Iron Responsive Element“) bezeichnet werden (Klausner et al., 1993) (Abb. 1.4.). Diese IREs befinden sich in nicht-translatierten Bereichen entweder am 3'- oder am 5'-Ende von mRNA-Strängen, die für bestimmte Proteine, welche für die Aufnahme, Speicherung oder Verarbeitung von Eisen zuständig sind kodieren (Hentze et al., 2010; Wang and Pantopoulos, 2011). Je nach Lokalisation der Haarnadel-Strukturen verhindert oder verstärkt die Bindung von IRP1 die Translation der entsprechenden mRNA. Befindet sich die Haarnadel-Struktur am 5'-Ende des mRNA-Strangs, so wird die Translation verhindert, da die Ribosomen, durch IRP1 blockiert, nicht mehr an den mRNA-Strang binden können. Beispiele hierfür sind die Eisenspeicherproteine (Ferritin H und L), ein Enzym der Hämbiosynthese (delta-Aminolävulinatsynthase) und der Eisenexporter (Ferroportin), also allesamt Proteine und Enzyme, welche unter Eisenmangel nicht benötigt werden. Im Gegenteil dazu werden Proteine, welche dem Auffüllen des Eisenhaushalts behilflich sein können, wie zum Beispiel der Transferrinrezeptor, in erhöhter Abundanz benötigt. Die mRNA-Stränge, die für so gearbete Proteine kodieren, tragen eine Haarnadel-Struktur am 3'-Ende. Bindet IRP1 hier, so wird die mRNA stabilisiert (die 3'-Degradation wird verhindert) und die mRNA kann länger abgelesen und damit öfter translatiert werden. Neben diesen vier Hauptfunktionen gibt es noch viele weitere bakterielle und eukaryotische Fe/S-Cluster-abhängige Enzyme unterschiedlichster Eigenschaften, wobei in vielen Fällen die genaue Funktion des Fe/S-Clusters noch nicht bekannt ist (Meyer, 2008).

1.2.3. Biogenese von FeS/ Proteinen

Die Fe/S-Cluster Biogenese wird als eine der grundlegenden Biosynthesewege in allen lebenden Organismen angesehen. Sowohl Prokaryoten als auch Eukaryoten haben mindestens einen Stoffwechselweg, welcher ausschließlich der Fe/S-Cluster Biogenese gewidmet ist. Typischerweise vereinen alle Biogenesewege fünf essentielle Funktionen: 1.) Schwefelmobilisierung durch eine Desulfurase; 2.) Eisenfunktionalisierung durch einen Eisendonator; 3.) Elektronenversorgung durch eine Elektronentransportkette; 4.) *de-novo*-Synthese eines Fe/S-Clusters auf einem Gerüstprotein; 5.) Transfer des Fe/S-Clusters vom Gerüstprotein auf Zielproteine durch dedizierte Transfer-Proteine. In Bakterien kann man drei große Systeme unterscheiden, welche unabhängig voneinander oder redundant ihre Arbeit

verrichten: Das SUF-System (sulphur-utilization factors), das NIF-System (nitrogen fixation) und das ISC-System (iron-sulphur-cluster assembly) (Ayala-Castro et al., 2008). Alle drei Systeme sind mehr oder weniger eng miteinander verwandt und beinhalten einige verwandte Proteine. Die eukaryotische Fe/S-Cluster Biogenese kann in drei Abschnitte eingeteilt werden (Lill and Mühlenhoff, 2008). Die mitochondrielle Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblierungsmaschinerie (**ISC Maschinerie**) ist für die *de novo* Synthese von Fe/S-Clustern verantwortlich und ist essentiell für alle Fe/S-Cluster der eukaryotischen Zelle, darunter auch zytosolische und nukleäre Fe/S-Cluster. Zytosolische Fe/S-Proteine benötigen zusätzlich die so genannte zytosolische Eisen-Schwefelproteinbiogenese Maschinerie (**CIA Maschinerie**). Sie ist essentiell für die Reifung beinahe aller zytosolischen und nukleären Fe/S-Cluster Proteine. ISC und CIA Maschinerie sind über die **ISC Export Maschinerie** miteinander verbunden. Die ISC Export Maschinerie exportiert eine noch unbekannte schwefelhaltige, Glutathion-assoziierte Komponente (Srinivasan et al., 2014) aus dem Mitochondrium ins Zytosol und liefert so den Schwefel für die zytosolische CIA Maschinerie (Abb. 1.5.). Photosynthetisch aktive Eukaryoten wie z.B. Pflanzen besitzen zusätzlich das SUF-System in den Plastiden (Balk and Schaedler, 2014).

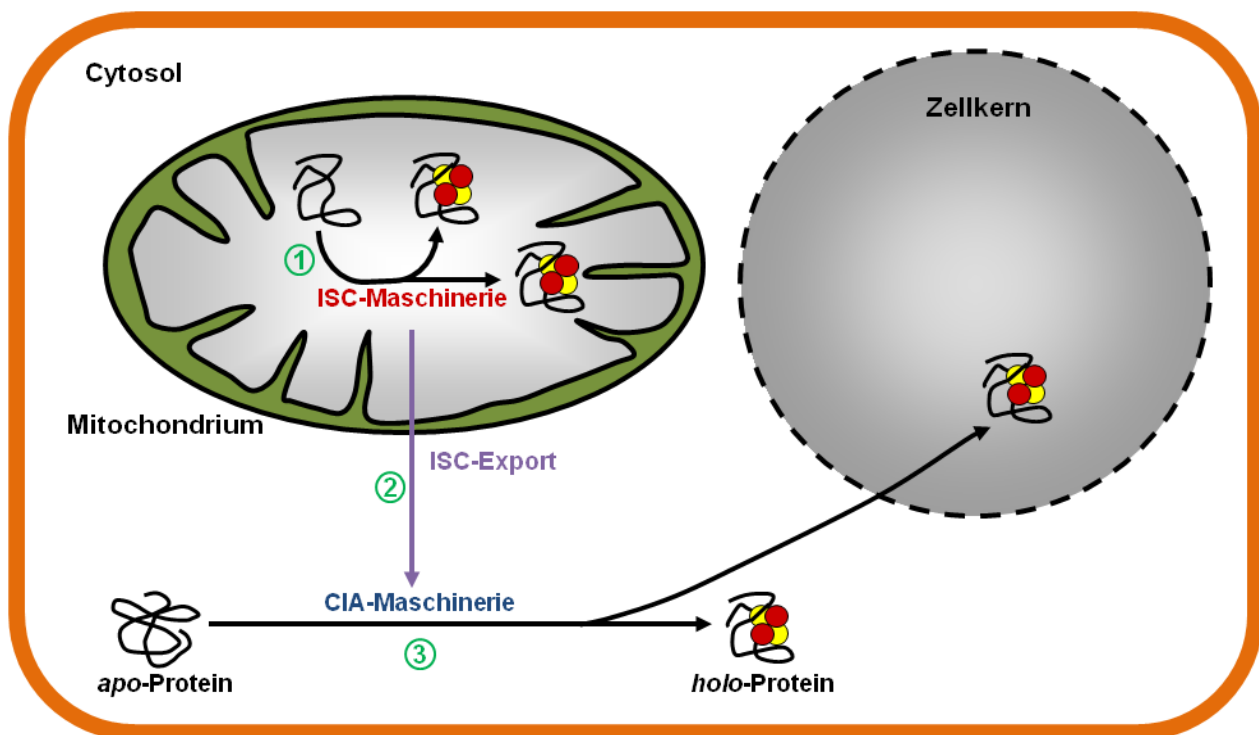


Abb. 1.5.: Modell der zellulären Fe/S-Cluster Biogenese. Eisen: rot, Schwefel gelb. Die Fe/S-Cluster Biogenese einer eukaryotischen Zelle ist in drei Teile geteilt. Die mitochondrielle ISC-Maschinerie (1) synthetisiert den initialen Fe/S-Cluster und maturiert die mitochondriellen Fe/S-Protein. Die ISC-Exportmaschinerie (2) verbindet die ISC-Maschinerie und die CIA-Maschinerie und ist essentiell für alle nicht-mitochondriellen Fe/S-Proteine. Die zytosolische CIA-Maschinerie (3) maturiert alle zytosolischen und kernlokalisierten Fe/S-Proteine.

1.2.4. Mitochondrielle Fe/S-Cluster Biogenese: Die ISC Maschinerie

Die mitochondrielle ISC Maschinerie kann in drei Abschnitte gegliedert werden: Die frühe, die Verteilungs- und die späte ISC Maschinerie (Abb. 1.6.). Der frühe Teil der ISC

Maschinerie ist für die *de novo* Synthese eines [2Fe-2S]-Clusters verantwortlich, der auf andere Proteine übertragbar ist. Sie besteht aus mindestens sechs essentiellen Proteinen. Der zugrunde liegende Mechanismus dieses Teils der ISC Maschinerie ist von Bakterien bis hin zu Wirbeltieren konserviert und beinhaltet die Fähigkeiten a) **Schwefel** in Form eines Persulfids aus einer Cystein-Quelle zu mobilisieren, b) **Eisen** in Form von Fe(II) zu akquirieren und c) **Elektronen** für die Biogenese eines [2Fe-2S]-Clusters auf einem **Gerüstprotein** bereitzustellen.

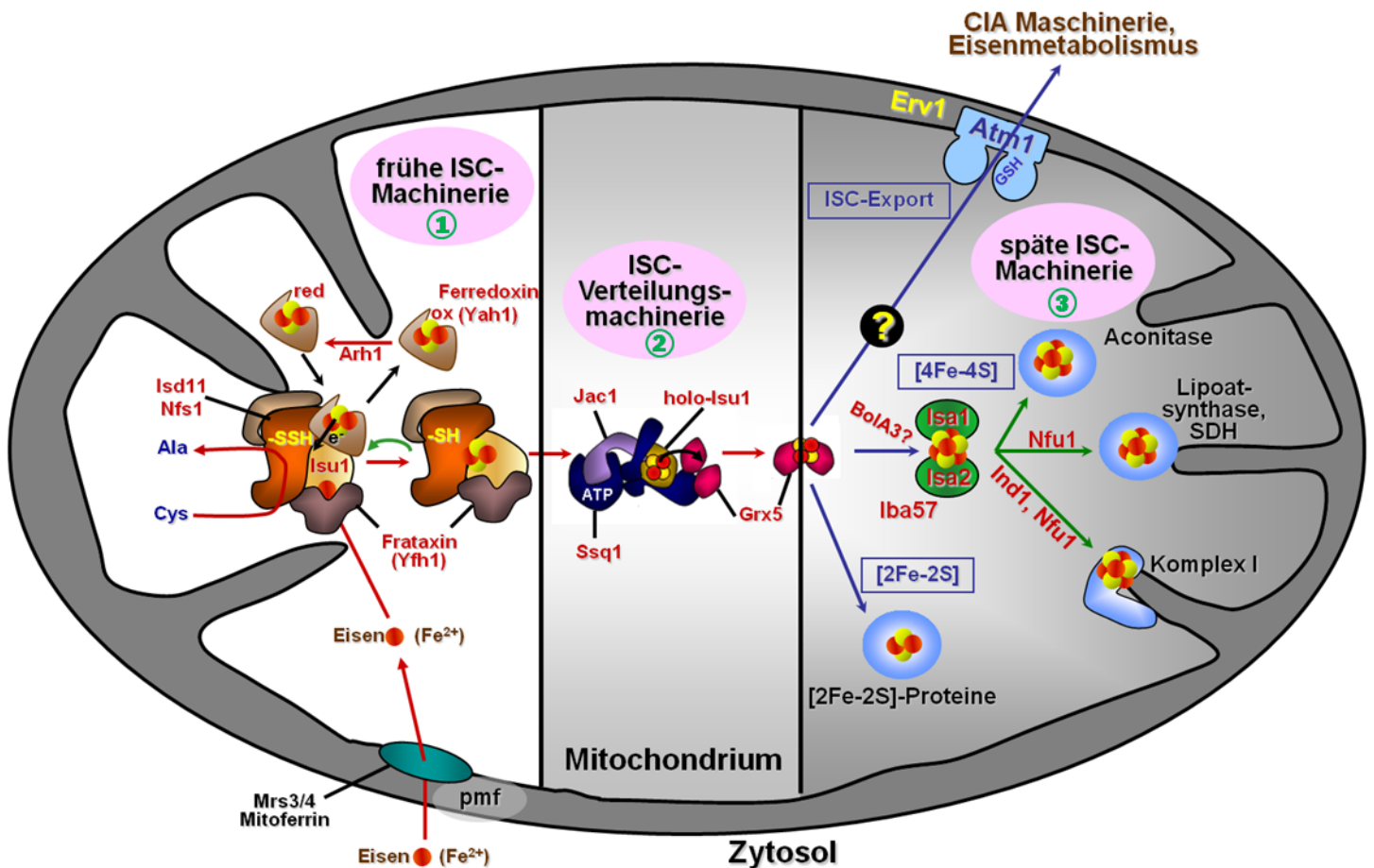


Abb. 1.6.: Modell der mitochondrialen ISC-Maschinerie. Eisen: rot, Schwefel gelb. Die mitochondriale ISC-Maschinerie ist in drei Teile aufgeteilt. Die frühe ISC-Maschinerie (1) synthetisiert den initialen Fe/S-Cluster einer Zelle und besteht aus 6 Proteinen. Die ISC-Verteilungsmaschinerie (2) verteilt den initialen Fe/S-Cluster mit Hilfe eines Chaperonsystems und eines Glutaredoxins auf drei unterschiedliche Zweige, welche als späte ISC-Maschinerie (3) zusammengefasst werden können. Sie wiederum beinhaltet die ISC-Exportmaschinerie, die mitochondriale [4Fe-4S]-Cluster Synthese und die [2Fe-2S]-Maturierung, wobei jeweils spezielle Faktoren benötigt werden.

Die eukaryotische ISC Verteilungsmaschinerie beinhaltet ein Chaperon-System, welches aus mindestens drei Proteinen (dem Hsp70-Protein Ssq1, dem Co-Chaperon Jac1 und dem Nukleotid-Austausch-Faktor Mge1 in Hefe) besteht, und ein Monothiol-Glutaredoxin (Grx5) (Craig and Marszalek, 2002; Mühlenhoff et al., 2003b). Dieser zweite Abschnitt ist dafür zuständig, das gebildete [2Fe-2S] vom Gerüstprotein auf einen transienten Bindungspartner, das Glutaredoxin 5, zu übertragen. Hierfür führt das Chaperon-System das maturierte Gerüstprotein Isu1 an das Monothiol-Glutaredoxin Grx5. Das Hefe Ssq1 interagiert hierfür

mit Hilfe seines Co-Chaperons Jac1 mit dem maturierten Isu1 (Majewska et al., 2013). Gleichzeitig interagiert Ssq1 hochspezifisch mit Grx5 (Uzarska et al., 2013), wodurch eine räumliche Nähe von Grx5 und Isu1 geschaffen wird. Dies ermöglicht einen effizienten Fe/S-Cluster-Transfer von Isu1 auf Grx5.

Die späte ISC Maschinerie beinhaltet sowohl die Synthese von mitochondrialen [4Fe-4S]-Clustern, wie auch die Maturierung der eigentlichen mitochondrialen Zielproteine. Alle Teile der späten ISC Maschinerie, wie auch die ISC Export Maschinerie erhalten ihr „Substrat“ (ein [2Fe-2S]-Cluster oder im Falle der ISC Export Maschinerie eine Glutathion-Komponente) von dem zuvor maturierten Monothiol-Glutaredoxin Grx5. Zur Synthese von [4Fe-4S]-Clustern steht eine dedizierte Maschinerie zur Verfügung, die in Hefe aus den beiden homologen Proteinen Isa1 und Isa2 und der putativen Transferase Iba57 besteht (Gelling et al., 2008; Kaut et al., 2000). Diese Proteine sind vermutlich direkt an der Maturierung von [4Fe-4S]-Proteinen beteiligt, jedoch ist deren molekulare Funktion noch nicht verstanden. Neben diesen allgemeinen Synthesekomponenten existieren auch dedizierte Maturierungsfaktoren, wie z.B. Ind1, Nfu1 und BolA-Proteine. Sie sind allesamt für Maturierung spezieller Fe/S-Proteine zuständig.

1.2.5. Die frühe ISC Maschinerie in Hefe

Die frühe ISC Maschinerie synthetisiert den initiale Fe/S-Cluster der eukaryotischen Zelle. Um Schwefel in Form eines Persulfids bereitzustellen, besitzt die eukaryotische Zelle einen Desulfurasekomplex, welcher L-Cystein zu Alanin umsetzt. Er besteht aus der PLP-abhängigen Desulfurase **Nfs1** (Kispal et al., 1999; Strain et al., 1998) und dem kleinen Aktivatorprotein **Isd11**, das mit Nfs1 einen stabilen Komplex bildet (Wiedemann et al., 2006). Eine potentielle Eisenquelle stellt das für die eukaryotische Zelle essentielle Protein Frataxin (**Yfh1**) dar (Babcock et al., 1997; Mühlhoff et al., 2002). Ob Frataxin allerdings als Eisendonator fungiert, eine aktivierende Rolle für die Desulfuraseaktivität spielt (Bridwell-Rabb et al., 2014; Parent et al., 2015), oder beides vereint, ist noch nicht vollständig geklärt. Die benötigten Elektronen, welche der Reduktion entweder des Persulfids oder eines oxidierten Fe/S-Clusters dienen, werden von der Elektronentransportkette aus Ferredoxin (**Yah1**) und Ferredoxin-Reduktase (**Arh1**) geliefert (Kim et al., 2013; Webert et al., 2014). Durch die Zusammenarbeit dieser fünf beschriebenen Proteine mit dem Gerüstprotein **Isu1** wird auf letzterem *de novo* ein [2Fe-2S]-Cluster synthetisiert (Garland et al., 1999; Gerber et al., 2003; Webert et al., 2014), welches schließlich an Zielproteine weitergegeben werden kann.

1.2.5.1. Das Gerüstprotein Isu1

Das Gerüstprotein Isu1 ist ein hochkonserviertes Genprodukt (Abb. 1.7.) und stellt die Plattform für das erste Fe/S-Cluster der Zelle dar

A



B

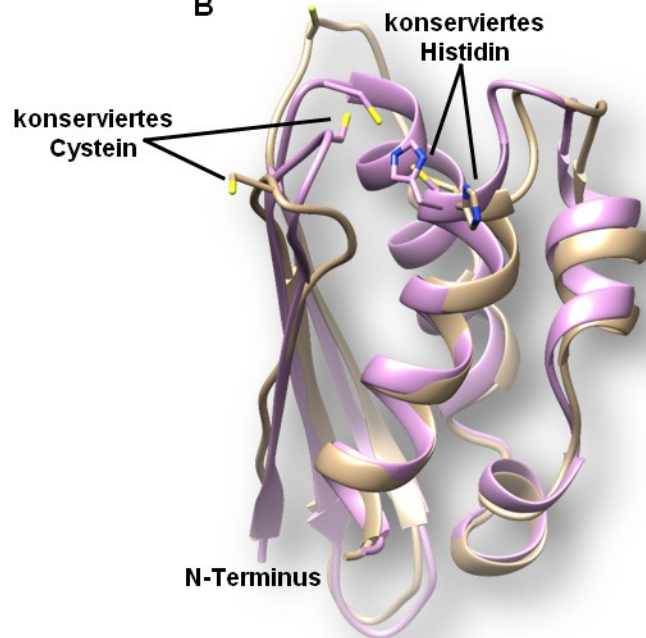


Abb. 1.7.: Isu1 (IscU) ist ein hochkonserviertes Gerüstprotein der Fe/S-Cluster Biosynthese. **A:** Sequenzalignment verschiedener Isu1 bzw. IscU Proteine. Auffällig ist die hohe Konservierung des aktiven Zentrums (gelb und hellblau), welches für die Synthese des Fe/S-Clusters unerlässlich ist und des „LPPVK“-Motivs (grün), welches für die Fe/S-Cluster Übertragung essentiell ist. **B:** Überlagerung des eukaryotischen IscU aus *M. musculus* (rosa) (pdb: 1WFZ) und des bakteriellen IscU aus *E. coli* (hellbraun) (pdb: 2KQK). Auch strukturell zeigt das Gerüstprotein eine hohe Homologie in allen Regionen. Es beinhaltet ein klassisches α - β -Sandwich und drei konservierte Cysteine, wovon zwei je auf einer flexiblen Schleife und eines am Ende einer α -Helix lokalisiert sind. Das konservierte Histidin befindet sich dabei direkt vor dem Cystein am Ende der α -Helix.

(Garland et al., 1999; Gerber et al., 2003; Mühlenhoff et al., 2003b). Damit ist es das Zentrum der frühen ISC Maschinerie. Es sind lediglich Strukturen des bakteriellen Homologs IscU und die von *Mus musculus* (nicht publiziert) (pdb: 1WFZ), bekannt. Alle bekannten Isu1 Homologe sind strukturell konserviert. Die Sekundärstruktur besteht aus drei β -Strängen und vier α -Helices (Abb. 1.7.). Das Protein liegt bei physiologischen Temperaturen in wässriger Lösung gefaltet vor (Kim et al., 2012; Markley et al., 2013), beinhaltet jedoch einen flexiblen N-Terminus. Sein genauer Oligomerisierungszustand ist unklar, jedoch wird angenommen, dass Isu1 *in vivo* transient ein gebrücktes [2Fe-2S]-Cluster als Homodimer koordiniert (Agar et al., 2000; Webert et al., 2014). Einige strukturelle und biochemische Daten beschreiben allerdings auch monomere (Kim et al., 2012) (pdb: 2L4X), trimere (Shimomura et al., 2008) (pdb: 2Z7E), oder sogar oligomere Quartärstrukturen (nicht publiziert) (pdb: 2QQ4). Sein aktives Zentrum besteht aus drei konservierten Cysteinen sowie einem konservierten Histidin, welche, wie im Falle des trimeren IscU, auch alleine einen Fe/S-Cluster koordinieren können. Auf Grund dieses ungewöhnlichen Koordinationszentrums sind allerdings mehrere Koordinations-Szenarien denkbar. Man nimmt an, dass Isu1 als monomer keinen Fe/S-Cluster bindet, sondern ein rhombisches gebrücktes [2Fe-2S]-Cluster als Homodimer koordiniert (Shimomura et al., 2008; Webert et al., 2014; Wu et al., 2002). Dieses kann dann im Weiteren auf andere Fe/S-Proteine übertragen werden, was Isu1 als klassisches Gerüstprotein auszeichnet (Mühlenhoff et al., 2003a).

1.2.5.2. Der Desulfurasekomplex Nfs1/Isd11

Desulfurasen sind allesamt PLP-abhängige, homodimere Enzyme. Sie sind hochkonserviert in allen Reichen des Lebens und erfüllen ihre Aufgabe in unterschiedlichsten Stoffwechselwegen. So sind sie z.B. essentiell für die Biosynthese von Thiamin, Thionukleosiden der tRNS, Biotin, Liponsäure, MoCo (Begley et al., 1999; Lai et al., 2012; Leimkühler and Rajagopalan, 2001; Marquet, 2001) und auch von Fe/S-Clustern. Sie spalten L-Cystein zu L-Alanin, wodurch ein persulfidisch gebundener Schwefel auf das Enzym übertragen wird (Mihara and Esaki, 2002). Neben der Funktionsweise sind auch die Strukturen von PLP-abhängigen Desulfurasen hoch konserviert. Sie besitzen ein aktives Zentrum, wo sie PLP über Wasserstoffbrücken durch Bildung einer Aldimin-Schiff-Base mit einem konservierten Lysin-Rest binden (Abb. 1.8.). Der eukaryotische Desulfurasekomplex Nfs1/Isd11 bildet hier keine Ausnahme. Bis heute ist allerdings weder eine Kristallstruktur noch eine NMR-basierte Struktur einer eukaryotischen Desulfurase bekannt. Auf Grund der starken Homologien zu den bakteriellen Desulfurasen können jedoch Rückschlüsse zumindest auf Nfs1 gezogen werden. Die Struktur der bakterielle Desulfurase IscS wurde in seiner PLP-gebundenen Form gelöst (Cupp-Vickery et al., 2003; Shi et al., 2010) (pdb: 1P3W bzw. 3LVM). Ihre Sekundärstruktur besteht sowohl aus α -Helices wie auch aus β -

Strängen, wobei sich die Mehrzahl an Aminosäureresten in einer α -helikalen Konformation befindet. Sie besteht aus zwei abgegrenzten Domänen. Die kleine Domäne enthält ein konserviertes Cystein, welches für die Persulphid-Bildung und die Schwefel-Übertragung zuständig ist. Die große Domäne beinhaltet dagegen den konservierte Lysin-Rest, das Aldimin-gebundene PLP und die L-Cystein-Bindet tasche (Cupp-Vickery et al., 2003). Im Gegensatz zu Nfs1 ist es im Falle von Isd11 nicht möglich, auf bakterielle Systeme zurückzugreifen, da für dieses Protein keine bakteriellen Homologe bekannt sind. Auf Basis eines *ab initio* Strukturmodells (Amela et al., 2013) wurde ein gefaltetes Protein mit drei α -Helices, welche durch zwei flexible Schleifen miteinander verbunden sind, vorgeschlagen. Neben der räumlichen Struktur ist auch die genaue biologische Funktion von Isd11 nach wie vor unbekannt.

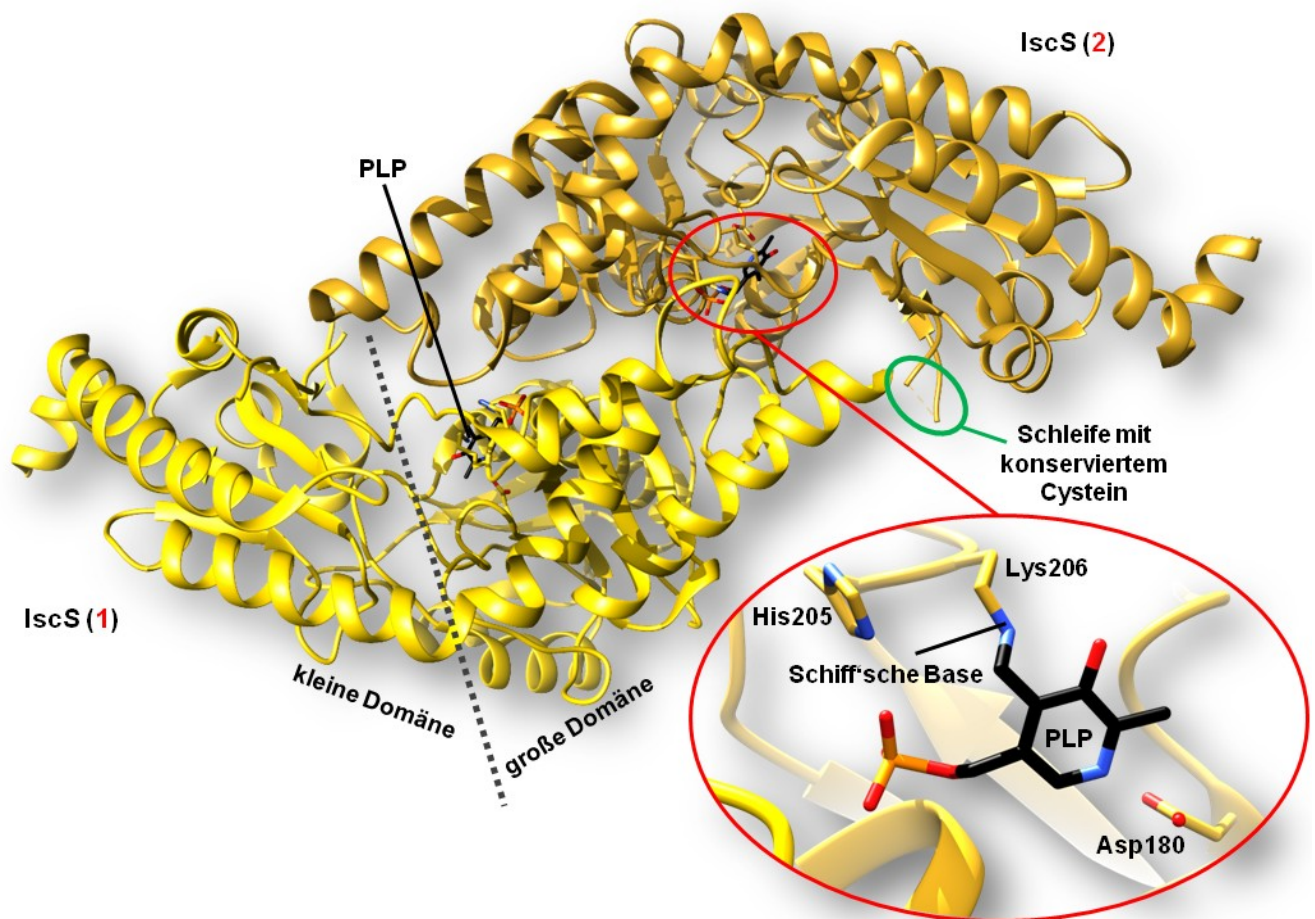


Abb. 1.8.: Die PLP-abhängige Desulfurase Nfs1 bzw. IscS. Die Struktur der bakteriellen Desulfurase IscS aus *E. coli* (pdb: 3LVM) zeigt eine für diese Enzymklasse traditionelle homodimere Konfiguration. Sie besteht aus zwei unabhängig arbeitenden Untereinheiten (1, gelb und 2, gold), welche jeweils eine kleine und eine große Domäne beinhalten. Die große Domäne bindet ein PLP mittels einer Schiff'schen Base (Vergrößerung), welches die Eliminierung von Cystein katalysiert. Die kleine Domäne ist für die Übertragung des produzierten Persulfids auf das Empfängerprotein zuständig und enthält hierfür ein konserviertes Cystein (grüner Kreis).

1.2.5.3. Das Hefe Frataxin-Homolog Yfh1

Frataxin ist ein kleines Protein, das die ihm entgegengebrachte Aufmerksamkeit nicht zuletzt seiner Verbindung zur neurodegenerativen Erkrankung Friedreich-Ataxie (Morbus Friedreich) verdankt (Campuzano et al., 1996). Bei dieser Krankheit liegt in 98% der Fälle eine Verlängerung einer Trinukleotidabfolge (GAA) im ersten Intron vor. Während gesunde Menschen 6-34 dieser GAA-Wiederholungen aufweisen, werden bei Menschen mit klassischem Krankheitsbild 66-1700 Wiederholung gefunden. Nur 2% der Patienten mit Morbus Friedreich weisen Punktmutationen im Frataxin-Gen auf (Ye and Rouault, 2010). In Eukaryoten ist es essentiell für die Biogenese von Fe/S-Clustern (Webert et al., 2014). Dennoch ist seine genaue Funktion bis heute ungeklärt. Es existieren mindestens zwei verschiedene Meinungen bezüglich der Wirkungsweisen von Frataxin. Zum einen wurde, neben der Speicherung von Eisen (Gakh et al., 2002), eine Funktion als Eisen-Donor in der Fe/S-Cluster Biogenese vorgeschlagen (Yoon and Cowan, 2003). In der Tat kann Frataxin bivalente Kationen, darunter auch Eisen mit hoher Affinität binden (Bou-Abdallah et al., 2004; Cook et al., 2006; Pastore and Puccio, 2013; Pastore et al., 2007), allerdings konnte bis heute kein funktioneller Zusammenhang der Eisenbindung mit der *de novo* Synthese eines Fe/S-Clusters zweifelsfrei nachgewiesen werden. Die zweite mögliche Funktion ist die Aktivierung der Desulfurase. Hierzu wurde am bakteriellen Modell gezeigt, dass die Bindung von Frataxin an die Desulfurase möglicherweise strukturelle Änderungen in die Faltung der Desulfurase einführt. Diese Änderungen begrenzen sich auf den N-terminalen Bereich der kleinen Domäne der Desulfurase und bewirken eine Annäherung des konservierten essentiellen Cystein-Restes an das Gerüstprotein Isu1, wodurch die Persulphid-Übertragung erheblich vereinfacht würde (Bridwell-Rabb et al., 2014; Parent et al., 2015). Eine andere, ebenfalls erst kürzlich veröffentlichte Arbeit sieht die „aktivierende“ Rolle von Frataxin eher in einer stabilisierenden Wirkung begründet, wobei die Eisenbindung durch Frataxin den quartären Komplex der frühen ISC Maschinerie stabilisieren soll (Colin et al., 2013). Im Gegensatz zu den funktionellen Ungewissheiten ist Frataxin strukturell bestens charakterisiert. Es existieren sowohl Kristall- als auch NMR-basierte Strukturen, welche die strukturelle Homologie aller Frataxine deutlich zeigen (Abb. 1.9.). Über die Quartärstruktur von Frataxin wird nach wie vor diskutiert. Es wurden monomere (He et al., 2004) (pdb: 2GA5), dimere (Tsai et al., 2011) (pdb: 3S5D), trimere (Söderberg et al., 2011) (pdb: 3OEQ) bis hin zu hexameren Strukturen (nicht publiziert; pdb: 4JPD) veröffentlicht. Die Sekundärstruktur dagegen beinhaltet immer zwei α -Helices und sechs β -Stränge in einer klassischen „ α - β -Sandwich“-Konformation. Obwohl eine Fülle an strukturellen Daten verfügbar ist, ist *bis dato* nicht klar definiert, wo genau Frataxin bivalente Kationen binden kann (Gentry et al., 2013; Rodrigues et al., 2015). Verschiedene Strukturen zeigen eine Metallbindung an unterschiedlichen Resten (Abb. 1.9.), welche zudem nicht alle konserviert sind. Dies erschwert eine genaue Definition von Frataxin als Eisendonator deutlich. Eine

Bindestelle jedoch gilt als gesichert. Es handelt sich um das konservierte Histidin 86 (bezogen auf das humane Protein), welches mit hoher Affinität und sehr spezifisch Fe(II) binden kann und essentiell für die Fe/S-Cluster Biogenese zu sein scheint (Gentry et al., 2013).

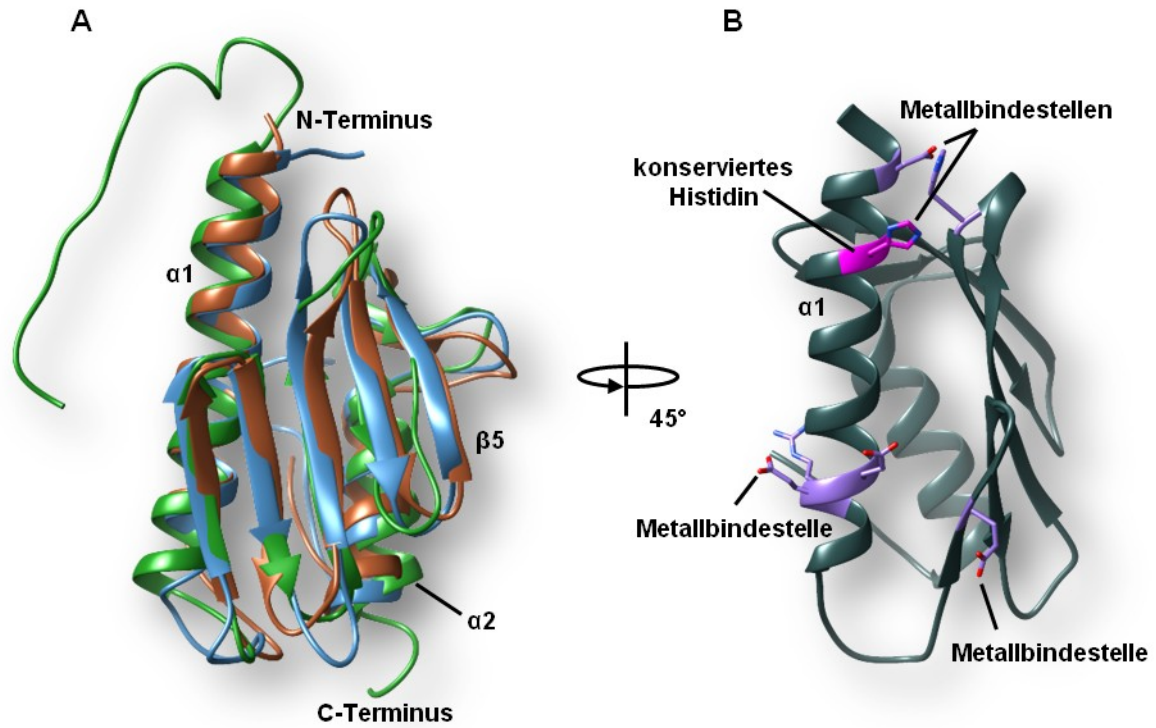


Abb. 1.9.: Frataxin ist ein konserviertes Protein und bindet divalente Kationen. A: Überlagerung von Frataxin-Proteinen aus *E. coli* in braun (CyaY, pdb: 1SOY), *S. cerevisiae* in grün (Yfh1, pdb: 2GA5) und *H. sapiens* in blau (Fxn, pdb: 3S4M). Die Strukturen sind hochkonserviert und unterscheiden sich kaum. Die Länge der N-Termini ist variabel, jedoch ist lediglich die Struktur des Yfh1 NMR-basiert, wodurch nur hier der flexible N-Terminus aufgelöst wurde. **B:** Die potentiellen Bindestellen für divalente Kationen übertragen auf Yfh1 (schiefer). Es wurden sowohl nicht-konservierte (lila) als auch konservierte Stellen (violett) beschrieben. Das konservierte Histidin kann Fe(II) binden und ist essentiell für die Fe/S-Cluster Biogenese.

1.2.5.4. Das Ferredoxin Yah1

Ferredoxine stellen eine große Gruppe unter den Fe/S-Proteinen dar, deren Hauptfunktion allgemein der Elektronentransfer ist. Die Gruppe der Ferredoxine beinhaltet eine Vielzahl von Ferredoxin-Klassen. Der Mensch und andere Säuger besitzen zwei nah verwandte Ferredoxine, welche jedoch völlig unterschiedliche Substrate hoch spezifisch bedienen (Sheftel et al., 2010a). Einerseits Ferredoxin 1 (FDX1), das Homolog des ersten in Wirbeltieren entdeckten Ferredoxins namens Adrenodoxin (SUZUKI and KIMURA, 1965), welches Elektronen von der menschlichen Ferredoxin-Reduktase (FdxR) auf membranständige Zytochrom P450 Enzyme der Steroidbiosynthese überträgt (Sheftel et al., 2010a). Andererseits das Ferredoxin 2 (FDX2), welchem lange Zeit nur wenig Beachtung geschenkt wurde. Es wurde angenommen, dass FDX1 die gleiche Aufgabe wie das *S. cerevisiae*-Ferredoxin Yah1 erfüllt (daher der Name Yah1: yeast adrenodoxin homolog 1). Nachdem jedoch die direkte Abhängigkeit der Fe/S-Cluster Biogenese von Yah1 gezeigt

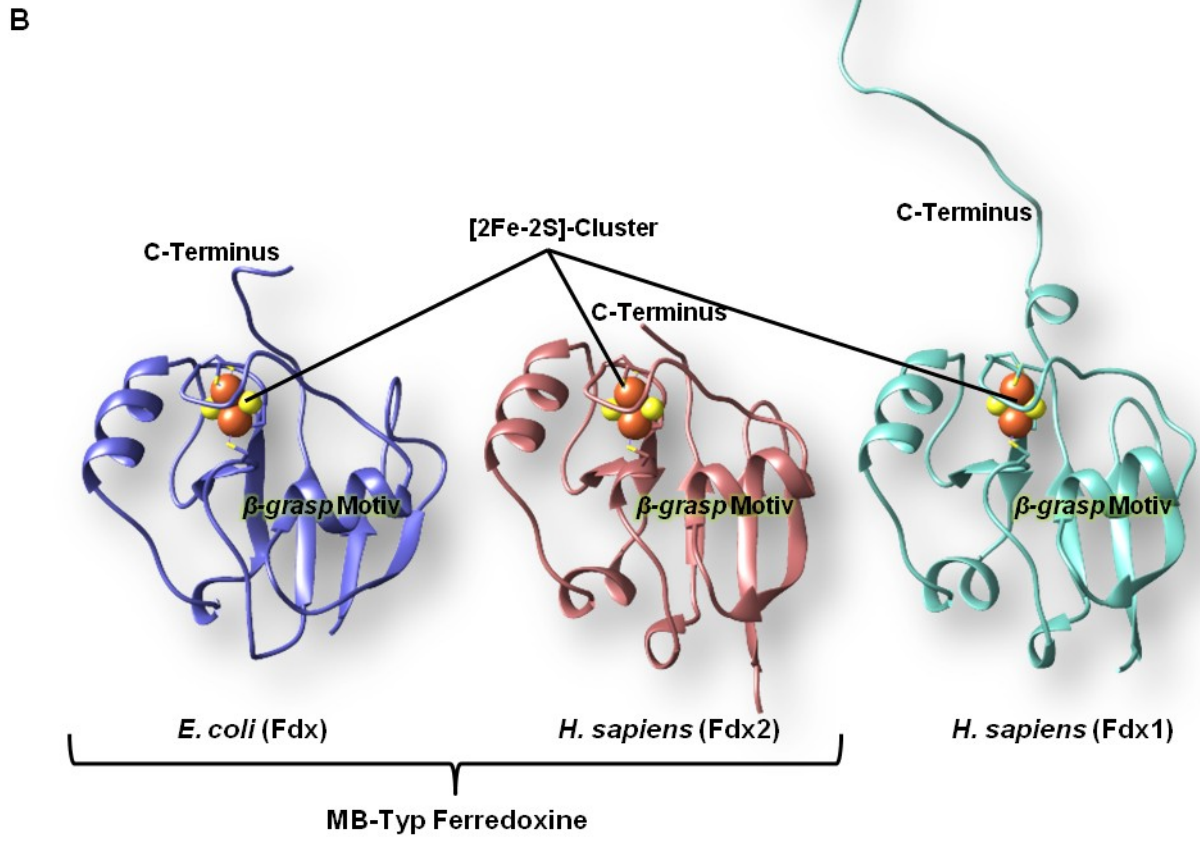
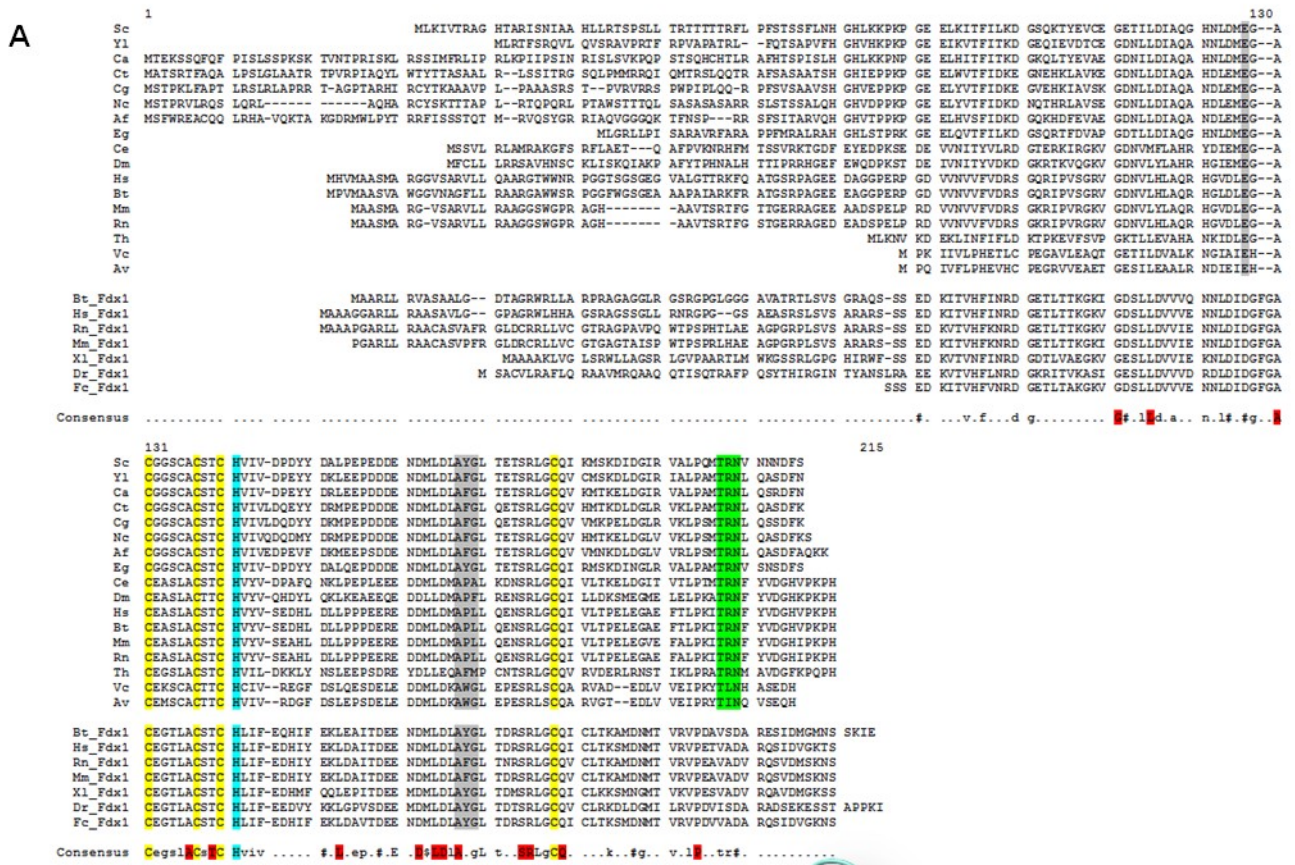


Abb. 1.10.: Ferredoxine sind trotz großer Sequenzunterschiede strukturell hochkonserviert. **A:** Sequenzalignment verschiedener Ferredoxine der Klassen MB-Typ und FDX1-Typ. Alle Ferredoxine des MB-Typs sind in ihrer Primärstruktur verwandt. Auch die Ferredoxine der FDX1-Klasse zeigen eine hohe Sequenzidentität. Beim Vergleich der beiden Klassen fallen jedoch mit Blick auf den C-Terminus Unterschiede auf. **B:** Als Vertreter der MB-Typ-Ferredoxine wurde Fdx aus *E. coli* (blau, pdb: 117H) und FDX2 aus *H. sapiens* (rosa, pdb: 2Y5C) gewählt. Die FDX1-Klasse wird durch FDX1 aus *H. sapiens* (türkies, pdb: 3P1M) vertreten. Die Tertiärstrukturen der beiden Ferredoxinklassen unterscheiden sich nur gering. So hat der C-Terminus von Proteinen der FDX1-Klasse ein sekundäres Strukturelement (α -Helix), während der C-Terminus eines MB-Typ Ferredoxins keine strukturierten Bereiche enthält.

wurde (Lange et al., 2000), FDX1 diese Aufgabe im Menschen aber nicht erfüllen konnte, wurde die Funktion des humanen FDX2 als Teil der humanen ISC Maschinerie angenommen und nachgewiesen (Sheftel et al., 2010a). Yah1 gehört zu den MB-Typ-Ferredoxinen (Mitochondrien-Bakterien-Typ-Ferredoxine) (Dissertation, Holger Weibert, 2011) und ist in Hefe nicht nur an der Biogenese von Fe/S-Clustern beteiligt. Es spielt auch in weiteren metabolischen Prozessen, wie zum Beispiel der Hydroxylierungsreaktion von Häm O in der Häm A Biosynthese (Barros et al., 2001; Barros et al., 2002) und der Biosynthese von Koenzym Q₆, einem wichtigen Elektronentransporter der mitochondrialen Atmungskette, eine Rolle (Pierrel et al., 2010).

Obwohl sich die Primärstrukturen aller Ferredoxingruppen deutlich unterscheiden, sind Sekundär- und Tertiärstrukturen der FDX1- und MB-Typ-Ferredoxine hoch konserviert (Abb. 1.10.). Sie enthalten, um das Fe/S-Cluster herum, das hochkonservierte „*β-grasp*“-Motiv (Orengo and Thornton, 2005). Dieses Motiv besteht aus einem gemischten β -Faltblatt, welches vier β -Stränge und eine seitlich flankierende α -Helix aufweist.

1.3. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die Biogenese und die Funktion von Fe/S-Cluster Clustern sind essentiell für jeden lebenden Organismus. Aus diesem Grunde ist es von äußerster Wichtigkeit, die zugrunde liegenden Mechanismen ihrer Bildung zu verstehen. Die beteiligten Proteine und ihre grundlegende zellbiologische Funktion sind zwar bekannt, jedoch fehlen detaillierte Einblicke auf mechanistischer, biochemischer und struktureller Ebene. Die Klärung der molekularen Mechanismen ist bedeutsam für das Verständnis der Vielzahl an Krankheiten, welche mit der Fehlfunktion von Fe/S-Proteinen oder der Fe/S-Cluster Biogenese assoziiert sind. Ziel dieser Arbeit ist es daher, bisher unbekannte molekulare Mechanismen der initialen Fe/S-Cluster Biogenese und die Struktur der frühen ISC-Maschinerie aufzuklären.

Die frühe ISC Maschinerie bildet *de novo* einen Fe/S-Cluster. Über den zugrunde liegenden Mechanismus ist allerdings nur wenig bekannt. Besonders die Funktion und die Wirkungsweise der essentiellen Proteine Yah1 (Hefe Ferredoxin) und Isu1 (Hefe Gerüstprotein), im Speziellen ihre Zusammenarbeit, sind auf biochemischer Ebene beinahe völlig uncharakterisiert. Hierfür sollte überprüft werden, ob die potentielle Interaktion der beiden Proteine essentiell für die Fe/S-Cluster Biogenese ist und worin deren Aufgabe besteht. Auf Grund der intrinsischen Eigenschaft aller Ferredoxine, unterschiedliche Redoxzustände einzunehmen, stellte sich auch die Frage, in wie fern der Redoxzustand des Ferredoxins Yah1 eine Rolle für die Fe/S-Cluster Biogenese spielt. Um diesen Fragen nachzugehen, sollte zunächst mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) die 3D Strukturen sowohl von reduziertem als auch von oxidiertem Yah1 bestimmt werden. Dies sollte ermöglichen die eventuellen Unterschiede in der Konformation der beiden Redoxzustände und deren funktionelle Relevanz erfassen zu können. Neben Yah1 sollte

außerdem, wiederum durch NMR-spektroskopische Verfahren, die 3D Struktur des Gerüstproteins Isu1 gelöst werden. Dies sollte detaillierte Einblicke in die Funktion liefern, da bis heute lediglich die Struktur eines einzigen eukaryotischen Gerüstproteins (*Mus musculus*; nicht publiziert; pdb: 1WFZ) zwar bekannt, jedoch nicht untersucht war. Weiter sollte, um differenzierte Erkenntnisse zur konkreten Funktion eines potentiellen Heterodimers zu erhalten, auch die 3D Struktur des Komplexes aus dem Ferredoxin Yah1 und dem Gerüstprotein Isu1 durch datengestützte molekulare Modellierung (HADDOCK) bestimmt werden. Schließlich sollten alle erhaltenen strukturellen und mechanistischen Erkenntnisse in die Gesamtheit der frühen ISC Maschinerie mit all ihren Komponenten eingeordnet und die Gesamtstruktur des frühen ISC-Komplexes gelöst werden. Hierzu sollte mit Hilfe der MicroScale Thermophorese eine quantitative Interaktionsanalyse aller beteiligten Proteine erstellt werden, was die Entwicklung eines zeitlich aufgelösten Modells ermöglichen sollte. Mittels „Small-angle X-ray scattering“ (SAXS) sollte eine globale 3D Struktur des vollständigen frühen ISC-Komplexes gelöst werden. Mit Hilfe der Gesamtheit aller Daten sollten abschließend eine bis heute unerreichte Auflösung der zeitlichen Abfolge des Mechanismus‘ und der räumlichen Anordnung des Komplexes der frühen ISC-Maschinerie gewonnen werden.

Um den Mechanismus der frühen ISC Maschinerie über die Grenzen einer Spezies hinweg zu verifizieren, sollten die gewonnenen Erkenntnisse zur Entwicklung eines bereits in ähnlicher Form beschriebenen Testsystems (Webert et al., 2014) verwendet werden. Ziel war es, mittels CD-Spektroskopie zu zeigen, dass der in dieser Arbeit beschriebene Mechanismus nicht nur in Eukaryoten mit klassischen Mitochondrien, sondern auch in solchen mit Mitochondrien-verwandten Organellen (MRO's) vollständig und damit ubiquitär konserviert ist.

2. Materialien

2.1. Geräte

Gerät	Typ (<i>Hersteller</i>)
Autoklav	Systec V-150 (<i>Systec</i>)
Dokumentation Agarose- und SDS-Gele	GDS (<i>Intas</i>)
Elektrophoreseapparatur:	
Agarosegelelektrophorese	Model B1A (<i>Owl separation systems</i>)
SDS-PAGE	Minigel-Twin (<i>Biometra</i>)
Emulsifier	EmulsiFlex® C3 (<i>Avestin</i>)
Sonifier	Sonopuls HD3200 (<i>bandelin</i>)
FPLC-Systeme	ÄKTA™purifier 10/UV-900/Frac-950 (<i>GE Healthcare</i>)
	ÄKTA™prime (<i>GE Healthcare</i>)
pH-Meter	UB-10 (<i>Denver Instruments</i>)
UV/Vis-Sprktralphotometer	U-550 (<i>Jasco</i>)
CD-Spektrometer	J-815 (<i>Jasco</i>)
NMR-Spektrometer	AVANCE 500 (<i>Bruker</i>)
	Avance III 950 (<i>Bruker</i>)
Thermophorese	Monolith NT.115 (<i>NanoTemper Technologies</i>)
SAXS-Strahlungsquelle	BioSAXS BM29 (<i>ESRF, Grenoble</i>)
Waagen	PT 1500 (<i>Sartorius</i>)
	SBC22 (<i>Saltec</i>)
Zentrifugen	Biofuge pico (<i>Heraeus</i>)
	Avanti J-20 XP (<i>Beckmann Coulter</i>)
	Heraeus Fresco 21 (<i>Thermo Scientific</i>)
	5810R (<i>eppendorf</i>)
Anaerobenkammer	Coy (<i>coy</i>)

2.2. Chemikalien, Enzyme, Größenstandards

In dieser Arbeit wurden Chemikalien der Firmen *Sigma-Aldrich*, *Merck*, *Roth*, *AppliChem* und *euriso-top* verwendet. Allesamt in einer Reinheit von mindestens 99%, bzw. der höchstverfügbaren Stufe.

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen und die dazugehörigen Puffer und Additive wurden von der Firma *New England Biolabs* bezogen.

Als Größenstandard für die Agarosegelelektrophorese wurde der „GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder“ der Firma *Fermentas* verwendet. Als Größenstandard für die SDS-PAGE wurde „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (*Fermentas*) verwendet.

Die Kalibration der Gelfiltrationssäulen wurde mit Hilfe des „Kit for Molecular Weights 29000 – 700000“ der Firma *Sigma Aldrich* durchgeführt.

2.3. Synthese der Gene von *C. thermophilum*

Alle Gene der frühen ISC-Maschinerie von *Chaetomium thermophilum* wurden von der Firma *GenScript* (Piscataway, USA) synthetisch hergestellt. Alle Gene wurden zuvor auf Introns untersucht, welche entsprechend entfernt wurden. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der vorhandenen cDNS-Datenbank verglichen und auf Richtigkeit überprüft. Vor der Synthese wurden die Gene Codon-optimiert (Codontabelle siehe Tab.2.1.) und die gewünschten Restriktionsschnittstellen angefügt. Die Gene wurden in einem Standardvektor der Firma *GenScript* (pUC57) geliefert. Die Gene wurden durch die entsprechenden Restriktionsenzyme aus diesem Vektor in den gewünschten Expressionsvektor überführt. Es waren keine weiteren Oligonukleotide zur Konstruktion der Expressionsplasmide notwendig.

AS	G	E	D	V	A	S	K	N	M	I	T	W	C	E N D	Y	F	R	Q	H	L	P
Codon	G G T	G A A	G A T	G T G	G C C	A G C	A A A	A A C	A T G	A T T	A C C	T G G	T G C	T A A	T A T	T T T	C G T	C A G	C A T	C T G	C C G

Tab. 2.1.: Codontabelle. AS: Aminosäure (Einbuchstabencode). Codons werden von oben nach unten gelesen. Die hier angegebenen Codons wurden für die Codon-Optimierung vor Gensynthese verwendet. Es handelt sich um solche Codons welche am besten für die Verwendung in *E. coli* und in *S. cerevisiae* geeignet sind (Codon Usage Database).

2.4. Plasmide

Vektor	Beschreibung	Resistenz-kassette	Referenz
pET28A-HIS-TEV	T7-Promotor, Modifikation: N-terminale Hexa-His-Markierung, TEV-Schnittstelle	Kan ^R	Dr. Martin Bommer (Berlin)
pET15b	T7-Promotor, N-terminale Hexa-His-Markierung	Amp ^R	Novagene
pET21d	T7-Promotor, Modifikation: keine His-Markierung	Amp ^R	Novagene
pET-Duet	T7-Promotor, Modifikation: keine His-Markierung	Amp ^R	Novagen
Plasmid			
pET15b-Yah1	<i>S. cerevisiae</i> Yah1 ab Gly58 ohne Markierung	Amp ^R	Dr. Holger Webert (Marburg)
pET21d-Isu1-His	<i>C. thermophilum</i> Isu1 mit C-terminaler Hexa-His-Markierung	Amp ^R	Dr. Holger Webert (Marburg)
pET-Duet-Nfs1-Isd11	<i>C. thermophilum</i> Nfs1 und <i>C. thermophilum</i> Isd11 mit C-terminaler Hexa-His-Markierung	Amp ^R	Dr. Holger Webert (Marburg)
pET15b-Cfx1	<i>C. thermophilum</i> Cfx1 (Ferredoxin) ohne Markierung	Amp ^R	diese Arbeit
pET28A-HIS-TEV-Yfh1	<i>C. thermophilum</i> Yfh1 mit N-terminaler Hexa-His-Markierung und TEV-Schnittstelle	Kan ^R	diese Arbeit

Tab. 2.2.: Codontabelle. Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide wenn vorhanden mit Insert, ansonsten mit den entsprechenden Eigenschaften. Angegeben sind Resistenzmarker und Erzeuger des Konstrukts.

2.5. Bakterienstämme

Die Handhabung und Lagerung aller Bakterienstämme erfolgte gemäß dem GenTG der Bundesrepublik Deutschland in der jeweils neusten Fassung.

2.5.1. *E. coli* DH5α (Invitrogen)

Genotyp: *F* Φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻ m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ*⁻

Alle Klonierungen wurden mit diesem Stamm durchgeführt. Durch die Deletion von EndonucleaseA und RecA besitzt dieser Stamm eine hohe Transformationseffizienz und eignet sich besonders gut zur Vervielfältigung von Vektoren und Plasmiden.

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

Genotyp: *F ompT, hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻), dcm⁺ Tet^r galλ(DE3) endA Hte*

Alle Proteinexpressionen wurden in diesem Stamm durchgeführt. Der Stamm BL21(DE3)-Gold besitzt das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines lacUV5 Promotors. Dies lässt eine Expression von Genen unter Kontrolle eines T7-Promotors und Induktion durch IPTG zu (Rosenberg et al., 1987; Studier and Moffatt, 1986; Studier et al., 1990). Weiter sind die Gene für die OmpT- und Lon-Proteasen deletiert.

2.6. Medien zur Kultivierung von *E. coli*

2.6.1. Kultivierung von *E. coli* in Vollmedium

Zur Kultivierung von *E. coli* und damit verbundener rekombinanter Expression von Proteinen in Vollmedium wurde entweder LB-Medium (BERTANI, 1951) oder TB-Medium (Tartof and Hobbs, 1987) verwendet (Tab. 2.3.). Es wurde mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt (Ampicillin: 50 µg/L, Kanamycin: 30 µg/L). Je nach Zielprotein verwendete Medien und hinzugefügte Additive sind in Tabelle 3.4. aufgeführt.

	LB-Medium	TB-Medium
Trypton	10 g/L	12 g/L
Hefeextrakt	5 g/L	24 g/L
NaCl	10 g/L	-
Glycerin	-	5 g/L
Phosphatpuffer pH 7,0	-	90 mM

Tab. 2.3.: LB- und TB-Medium: Zusammensetzung. Für die pH-Einstellung wurde 10N NaOH oder 1M HCl verwendet.

Das Medium wurde anschließend auf pH 7,4 eingestellt und 20 min bei 121 °C und 1,5 bar autoklaviert.

2.6.2. Kultivierung von E. coli in Minimalmedium

Für die Markierung der Zielproteine mit ^{15}N und/oder ^{13}C wurde E. coli in Minimalmedium (M9, Zusammensetzung Tab. 2.4.) kultiviert. Zur ^{15}N -Markierung wurden ^{15}N -Ammoniumsulfat und zur ^{13}C -Markierung $^{13}\text{C}_6$ -Glucose der Firma *euriso-top* (Saint-Aubin, Frankreich) verwendet.

M9-Medium		Lösung Q		M9 Salzlösung	
M9 Salzlösung	100 ml/L	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	15,5 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	75,2 g/L
Glukose	3 g/L	ZnCl_2	3,1 mM	KH_2HPO_4	30 g/L
Ammoniumsulfat	1 g/L	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,80 mM	NaCl	5 g/L
MgSO_4	1 mM	$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,21 mM		
CaCl_2	0,3 mM	H_3BO_3	0,81 mM		
Biotin	1 mg	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,4 mM		
Thiamin	1 mg				
Lösung Q	2 ml				

Tab. 2.4.: M9-Medium: Das M9-Medium wurde wie angegeben hergestellt. Glukose und/oder Ammoniumsulfat wurden entweder in ihrer natürlichen Form oder angereichert mit den entsprechenden Isotopen (> 99%) verwendet. Lösung Q beinhaltet zur besseren Lösung der Einzelkomponenten 40 mM HCl. Der pH der M9-Salzlösung wurde mit 10N NaOH oder 1M HCl auf pH 7,4 eingestellt.

3. Methoden

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten und die Handhabung von genetisch veränderten Organismen (GVOs) wurden gemäß Gentechnikgesetz (GenTG) durchgeführt. Alle Arbeiten wurden, wenn vorgeschrieben, in Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. GVO-kontaminierte Materialien und Gerätschaften wurden durch Autoklavieren (121°C, 1,5 bar) inaktiviert und anschließend gereinigt.

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse verwendet (Birnboim and Doly, 1979). Diese Methode dient der Trennung von chromosomaler DNA, RNA-Fragmenten und Proteinen von der, im alkalischen stabilen, superhelikalen, vektorialen DNA. Durchgeführt wurde die Plasmidpräparation mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid-Kits der Firma *Macherey & Nagel* unter Zuhilfenahme der Herstellerangaben.

3.1.2. Aufreinigung von der synthetisierten Gene

Um nach Trennung des synthetisierten Gens vom Versandvektor durch Restriktion und anschließende Agarose-Gelelektrophorese das entsprechende Gen wieder aus dem Gel zu extrahieren, wurde das NucleoSpin® Extract II Kit der Firma *Macherey & Nagel* verwendet. Es basiert auf der Bindung von kleinen DNA-Fragmenten an eine Silikat-Membran (Vogelstein and Gillespie, 1979). Die Durchführung verlief nach Herstellerangaben, wobei das Produkt je nach Ertrag mit 20-30 µl ddH₂O eluiert wurde.

3.1.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die größenpezifische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung von 1% (w/v) Agarosegelen durchgeführt. Die Zusammensetzung von Lauf- und Ladepuffer sind in Tabelle 3.1. zusammengefasst. Die Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht (GDS System der Firma *Intas* oder UV-Schirm) erfolgte durch Färbung mit GelRed® Nucleic Acid Gel Stain der Firma *Biotium* nach Herstellerangaben. Als Größenstandard und zur groben Einschätzung der DNA-Konzentration wurde GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder der Firma *Fermentas* verwendet.

Laufpuffer		Ladepuffer	
Tris-HCl, pH 8,0	40 mM	Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM	EDTA	10 mM
Essigsäure	0,01% (v/v)	Saccharose	65% (w/v)
		Bromphenolblau	0,3% (w/v)

Tab. 3.1: Agarose-Gelelektrophorese-Puffer. Ladepuffer wurde selbst hergestellt in Anlehnung an BlueJuice™ Gel Loading Buffer der Firma *Invitrogen*.

3.1.4. DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA-Fragmenten mittels sequenzspezifischer Endonukleasen basiert auf einer hydrolytischen Spaltung der Phosphodiesterbindung. Hierzu wurden kommerzielle Restriktionsendonukleasen des Typs II der Firmen *Fermentas* und *New England Biolabs* verwendet. Alle Spaltungen wurden gemäß den Herstellerangaben für die entsprechenden Enzyme durchgeführt. Analytische Spaltungen wurden in 10 µl, präparative dagegen in 50 µl Reaktionsvolumen mit 1-3 U Enzym pro 1 µg DNA vollzogen.

3.1.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten, z.B. bei der Herstellung von Expressionsplasmiden durch Insertion des Zielgens in einen Expressionsvektor, wurde die T4-DNA-Ligase (*New England Biolabs*) verwendet. Sie katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen unter ATP-Verbrauch. Die Ligation wurde in Anlehnung an das vom Hersteller erstellte Protokoll durchgeführt, wobei die Inkubationstemperaturen und -zeiten variiert wurden. In Standardligationen wurde der Ansatz 2h bei 21°C und in schwierigen Fällen für 16 h bei 17°C inkubiert. Jeder Ansatz ($V_f = 10\mu\text{l}$) enthielt 1 µl 10x Ligasepuffer und 0,5 µl T4-Ligase. Für alle Ligationen wurden 10-50 ng Vektor-DNA und die dreifache Stoffmenge an Insert-DNA eingesetzt.

3.1.6. Herstellung und Transformation chemisch kompetenter E. coli Zellen

Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen:

- *E. coli* in 5 ml SOB (Tab. 3.2.) inokulieren und bei 30°C übernacht inkubieren
- 1 ml Übernachtskultur in 100 ml SOB verdünnen
- 7,2 ml von 5 M NaCl hinzugeben und schüttelnd bei 30°C bis $OD_{600} \approx 0,5$ inkubieren
- Zellen zentrifugieren (4000rpm, 5 min), Überstand verwerfen
- Zellen vorsichtig in 10 ml kaltem TFB (Tab. 3.2.) resuspendieren
- Inkubation für 10 min auf Eis
- Zugabe von 350 µl DMSO und Reaktionsgefäß mehrmals vorsichtig invertieren
- Zellen für 10 min auf Eis inkubieren
- 100 µl der Zellsuspension in 1ml Reaktionsgefäße überführen und sofort schockgefrieren
- Die Lagerung der Zellen erfolgt bei -80°C

Transformation:

Es wurden je Ansatz 50 - 100 µl kompetenter *E. coli* Zellen verwendet

- Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden
- 1-2 min auf Eis inkubieren und anschließend 1 ml LB ohne Antibiotikum hinzugeben
- Inkubation bei 37°C und 900 rpm für 60 min

- Zellen abzentrifugieren (4000 rpm, 1 min, RT), in 200 µl LB resuspendieren und auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausplattieren
- Zellen über Nacht bei 37°C inkubieren

SOB	
Trypton	20 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
pH 7,0	

MES	
MES-Lösung	1 M
pH 6,2 (mit KOH)	

Tab. 3.2.: Benötigte Medien und Reagenzien zur Herstellung von Kompetenten *E. coli* Zellen.

TFB	
MES	10 mM
RbCl	100 mM
MnCl ₂	45 mM
CaCl ₂	10 mM
Cl ₃ CoH ₁₈ N ₆	3 mM

3.2. Biochemische Methoden

3.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Trennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe. Hierzu werden die Proteine durch DTT oder 2-Mercaptoethanol, Natriumdodecylsulfat (SDS) und Kochen vollständig denaturiert, wobei das Reduktionsmittel alle Disulfidbrücken auftrennt und SDS sowohl die hydrophoben Wechselwirkungen stört, als auch eine gleichmäßige, von der Größe des Proteins abhängige, negative Ladung einbringt. Dies führt schließlich dazu, dass die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen linear vom Logarithmus ihrer Masse abhängt. Je nach Größe der zu trennenden Proteine wurde die Acrylamidkonzentration entsprechend angepasst, wobei sich hochprozentige Gele besser zur Auftrennung kleiner und niedrigprozentige Gele besser zur Auftrennung großer Proteine eignen.

Hier wurde die Methode nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet (Abweichungen siehe Tabelle 3.3.). SDS-PAGE-Proben wurden in Ladepuffer (Tab. 3.3.) aufgenommen, 5 min bei 95°C erhitzt und aufgetragen. Die Visualisierung erfolgte durch Färbung des Gels mittels Coomassie Brilliant Blue (siehe 3.2.2.).

Sammelgel (5 %)	Trenngel (12,5 % - 17,5 %)	Elektrodenpuffer
125 mM Tris-HCl pH 6,8 Tris pH	375 mM Tris-HCl pH 8,8	25 mM Tris pH 8,0
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
0,001 % (v/v) TEMED und 0,05 % (w/v) APS		

Tab. 3.3.: SDS-PAGE Gel- und Pufferzusammensetzungen. Zur Polymerisation wurden sowohl für Sammelgele als auch für Trenngele identische Konzentrationen an Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat (APS) verwendet.

3.2.2. Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Gelen

Mit Hilfe von Coomassie lassen sich Proteine, welche zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, anfärben und sichtbar machen (Bennett and Scott, 1971). Dies dient sowohl der Größenbestimmung des Proteins von Interesse als auch einer ersten Einschätzung der Proteinkonzentration. Im Falle einer Proteinaufreinigung dient diese Methode auch der Kontrolle der Reinheit einer Proteinprobe. Zur schnellen Färbung ohne Notwendigkeit einer Entfärbung des Hintergrundes wurde InstantBlue™ der Firma *expedeon* entsprechend dem Herstellerhinweis verwendet.

3.2.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von Proteinen wurde auf zwei verschiedene Arten ermittelt: die photometrische und die kolorimetrische Konzentrationsbestimmung.

Im Falle der photometrischen Messung macht man sich die Absorption von Licht zunutze, welche bei Proteinen intrinsisch größtenteils durch die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, aber auch in geringerem Maße durch Disulfidbrücken vermittelt wird. Mit Hilfe des Online-Tools „ProtParam“ (www.expasy.org) lässt sich der Extinktionskoeffizient eines Proteins berechnen und nach Absorptionsmessung mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes daraus die Konzentration der Probe ableiten (Gill and von Hippel, 1989). Diese Methode dient allerdings nur der Konzentrationsbestimmung gereinigter Proteinproben, da der Extinktionskoeffizient einer unbekanntem Proteinmischung nicht berechnet werden kann. In solchen Fällen wurde die kolorimetrische Methode nach Bradford verwendet (Bradford, 1976). Hierbei wird der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 verwendet, welcher an die basischen Seitenketten von Proteinen bindet. Durch die Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm (die Probe erscheint blau), wobei diese Verschiebung für eine Konzentrationsbestimmung verwendet werden kann. Verwendet wurde Bradfordlösungskonzentrat der Firma *Biorad*, welches entsprechend den Herstellerangaben verdünnt und behandelt wurde. Für eine akkurate Konzentrationsbestimmung wurde vor jeder Messung eine Eichgerade mit bekannten BSA-Konzentrationen erstellt und auf deren Basis die Proteinkonzentration der unbekanntem Probe berechnet.

3.2.4. Proteinaufreinigung

Für biochemische, biophysikalische und strukturelle Untersuchungen von Proteinen, Proteinkomplexen und Enzymen sind reine, native Proteine von essentieller Bedeutung. Es existiert eine Fülle an Methoden, Proteine und Komplexe aufzureinigen. Hier werden nur die vorgestellt, welche für diese Arbeit relevant sind.

3.2.4.1. Heterologe Genexpression in *E. coli*

Die Überexpression aller rekombinanten Proteine dieser Arbeit erfolgte in *E. coli* des Stammes BI21(DE3)-Gold. Als Vollmedien wurden entweder LB (BERTANI, 1951) oder TB

(Tartof and Hobbs, 1987) verwendet (siehe Tab. 2.3). Minimalmedien (M9, siehe Tab. 2.4) wurden entweder mit Glucose (3g/L, normal oder $^{13}\text{C}_6$) als Kohlenstoff und Ammoniumsulfat (1g/L, normal oder ^{15}N) als Stickstoffquelle versetzt. Nach frischer Transformation wurde eine Vorkultur in LB-Medium mit ca. 50 ml pro 2 l Hauptkultur angesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Vorkultur wurde schließlich abzentrifugiert und das Zellpellet in Puffer (10mM Tris-HCl, pH7,4; 150mM NaCl) gewaschen und nochmals pelletiert. Das Pellet wurde im Anschluss in entsprechendem Medium aufgenommen und in 2 l Hauptkultur in einen 5 l Erlenmeyerkolben überführt. Die Hauptkultur wurde bei 37°C bis zu einer OD_{600} zwischen 0,6 und 0,8 inkubiert und anschließend mittels Zugabe von IPTG induziert. Auch die Zugabe eines eventuellen Additivs erfolgte zu diesem Zeitpunkt (Additive siehe Tab. 3.4.). Die Zellkultur wurde schließlich zwischen 3 und 16 h bei 30°C inkubiert, geerntet und direkt weiterverarbeitet.

Protein	Additiv (Endkonzentration)	Medium
Isu1	kein / FAC (50 μM)	LB / TB
$^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ Isu1	kein	M9
Yah1	50 μM FAC (50 μM)	LB
$^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ Yah1	50 μM FAC (50 μM)	M9
Yfh1/Yfh1Ct	kein / FAC (50 μM)	TB
Nfs1Ct/Isd11Ct	Pyridoxin (5 mM)	LB

Tab. 3.4.: Proteine und entsprechende Additive bzw. Medien. Im Fall von Isu1 und Yfh1 wurde jeweils sowohl mit als auch ohne FAC exprimiert, um entweder Fe bzw. einen Fe/S-Cluster nativ gebunden zu haben, oder aber damit eine eisenfreie Probe gewonnen werden konnte.

3.2.4.2. Zellaufschluss von *E. coli* (präparativ)

Der präparative Zellaufschluss von *E. coli*-Zellen erfolgte je nach Bedarf auf zwei unterschiedliche Arten. Zum einen aerob mittels EmulsiFlex[®] C3 (Überdruckmethode) oder anaerob mittels Sonifizierung (akustische Methode).

Zu jedem Ansatz wurden Protease-Inhibitor-Mix der Firma Roche (50x), Lysozym (*Sigma-Aldrich*, 1 mg/g Zellen) sowie Antifoam (*Sigma-Aldrich*) zugegeben. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 21500 rpm in einem JLA 8.1000 Rotor der Fima Beckmann (4°C, 2 h) entfernt.

3.2.4.3. Chromatographische Methoden

Die Chromatographie dient allgemein der Trennung von Stoffen einer heterogenen Lösung. Für alle Chromatographien in dieser Arbeit wurde entweder das ÄKTA[™]purifier 10 System oder das ÄKTA[™]prime System (*GE Healthcare*) verwendet. Alle verwendeten Puffer wurden mittels Vakuumpumpe sterilfiltriert (0,45 μM Filter) und entgast. Für anaerobe Chromatographien wurden die Puffer zusätzlich in einer Anaerobenkammer (*COY Lab Products*) über Nacht anaerobisiert.

3.2.4.3.1. Affinitätschromatographische Methoden

Bei einer Affinitätschromatographie macht man sich die Eigenschaft spezieller Markierungen zunutze, spezifisch an eine spezielle Matrix zu binden. Zum Einen wurde die Ni-NTA-Chromatographie verwendet, wobei ein Metallion (meist Ni²⁺) durch eine Matrix-gebundene Nitrilotriessigsäure (NTA) chelatiert wird. Dieser Komplex besitzt eine hohe Affinität zu Polyhistidinsequenzen, welche als sogenannte His-Markierung an ein Protein von Interesse fusioniert werden. Die Elution erfolgt dann entweder durch Erniedrigung des pH-Wertes, wobei alle Histidine protoniert werden, oder durch Zugabe von Imidazol, welches das gebundene Protein von der Matrix verdrängt. Ein zuvor durchgeführter Waschschriff mit geringen Imidazolkonzentrationen hilft, durch Lösung unspezifisch gebundener Kontaminationen, die Reinheit deutlich zu erhöhen. Für alle Ni-NTA-Reinigungen wurden 1 ml oder 5 ml His-Trap HP Säulen (*GE Healthcare*) nach Herstellerangaben mit Standardpuffer (Tab. 3.5.) verwendet.

Als weitere Methode wurde die Strep-Tactin-Chromatographie verwendet. Hierbei macht man sich die hohe Affinität eines Oligopeptids (WSHPQFEK) zu einem homotetrameren Streptavidinkomplex zunutze, wobei Streptavidin an eine Matrix gebunden wird. Das Oligopeptid wird an das Protein von Interesse fusioniert und bindet so als Komplex an die Streptavidin-Matrix (Strep-Tactin). Diese Methode hat Vorteile gegenüber der klassischen Ni-NTA-Chromatographie. Meist ist nur eine Ein-Schritt-Reinigung notwendig, da die Bindung hochspezifisch und eine Bindung von Kontaminanten damit sehr unwahrscheinlich ist. Zusätzlich werden keine hohen Konzentrationen an Imidazol oder ähnlichen Elutionsreagenzien verwendet, sondern lediglich eine inaktivierte Form des Biotin, nämlich Desthiobiotin in sehr geringen Konzentrationen (2 mM). Dies macht die Strep-Tactin-Chromatographie zu einer hervorragenden Methode zur Isolierung nativer, intakter Proteine und Proteinkomplexe. Für alle Reinigungen wurde Strep-Tactin[®] der Firma *iba* in selbst gepackten 1 ml bis 20 ml Säulen (je nach erwartetem Proteingehalt) nach Herstellerangaben mit Standardpuffer (Tab. 3.5.) verwendet.

3.2.4.3.2. Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Die Ionenaustauschchromatographie macht sich die intrinsische Ladung eines Proteins, welcher vom isoelektrischen Punkt (pI) des Proteins und dem pH-Wert des umgebenden Lösungsmittels beeinflusst wird, zunutze. Hierbei gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten. Zum Einen die Kationenaustauschchromatographie (CEC), womit sich positiv geladene Proteine durch Interaktion z.B. mit einer Sulfonatgruppe von den übrigen Proteinen trennen lassen. Zum Anderen können negativ geladene Proteine mittels Anionenaustauschchromatographie (AEC) durch Interaktion mit einer positiv geladenen, quartären Ammoniumverbindung, welche an eine Matrix gekoppelt ist, aufgereinigt werden. In beiden Fällen lässt sich das gebundene Protein durch Hochsalzbedingungen wieder eluieren, was in dieser Arbeit immer durch Anlegen eines Gradienten erzielt wurde, um

schwächer und stärker bindende Kontaminanten zu umgehen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich AEC verwendet. Als Matrix wurde hierbei Source 15 Q (GE Healthcare) nach Herstellerangaben mit Standardpuffer (Tab. 3.5.) verwendet.

3.2.4.3.3. Größenaustauschchromatographie (Gelfiltration; SEC)

Die Größenaustauschchromatographie (SEC), oder auch Gelfiltration, ist eine Methode, Partikel ihrer Größe nach zu „sortieren“. Hierbei wird eine heterogene Lösung auf eine Matrix mit Poren definierter Größe gegeben, wodurch die Partikel je nach räumlicher Ausdehnung schneller oder langsamer durch die Gelmatrix diffundieren. Die Gelfiltration dient dabei nicht nur der Reinigung von Proteinen, sondern auch der Abschätzung der Größe z.B. eines Proteins von Interesse. Hierfür entspricht die Diffusionsgeschwindigkeit proportional dem Logarithmus der molekularen Masse eines Proteins.

In dieser Arbeit wurden sowohl analytische, zur Bestimmung des Molekulargewichts (nach Kalibration der Säule mit Standardproteinen) bestimmte, als auch präparative, zur Proteinreinigung bestimmte Gelfiltrationen durchgeführt. Alle für diese Arbeit gereinigten Proteine wurden einer Gelfiltration unterzogen, um Reinheit und Homogenität garantieren zu können. Es wurden ausschließlich vorgefertigte Säulen der Firma *GE Healthcare* unter Beachtung der vom Hersteller angegebenen Spezifikationen meist mit Standardpuffer (Tab. 3.5.) verwendet. Folgende Säulen wurden verwendet: Superdex 200 10/300 GL; High Load Superdex 200 16/60 pg und Heigh Load Superdex 75 16/60.

	Chromatographie Methode			
	Ni-NTA	Strep-Tactin	AEC	SEC
Puffersystem	35 mM K-Phosphat pH 7,4			
Salz	300 mM NaCl	150 mM NaCl	10 mM / 1M NaCl	150 mM NaCl
Additiv 1	5 % (w/v) Glycerin	-	-	5 % (w/v) Glycerin
Additiv 2	15 mM / 300 mM Imidazol	2 mM Desthiobiotin	-	(0,5 mM DTT)

Tab. 3.5.: Chromatographische Methoden und verwendete Puffer. Pufferzusammensetzungen beziehen sich auf Standardpuffer. Etwaige Abweichungen vom Standardpuffer, wie z.B. bei der Reinigung des Komplexes Nfs1/Isd11 oder der Gelfiltration von Cfd1, werden im entsprechenden Abschnitt beschrieben.

3.2.4.4. Ändern des Puffersystems einer Proteinprobe

Je nach Vorhaben kann es nötig sein, bereits gereinigte Proteine in ein abweichendes Puffersystem zu überführen, oder Additive zu entfernen. Hierzu können Entsalzungssäulen verwendet werden, welche eine Gelfiltrationsmatrix (meist Sephadex™ G-25) beinhalten und damit in der Lage sind, hochmolekulare Substanzen (> 5000 Da, z.B. Proteine etc.) von niedermolekularen (< 1000 Da, z.B. Puffer, Salze, Additive, etc.) zu trennen. Damit können Proteine für Spezialanwendungen in ein gewünschtes Puffersystem überführt werden. In dieser Arbeit wurden je nach Volumen der zu überführenden Probe drei verschiedene Säulentypen verwendet: PD-10 Entsalzungssäule für Volumen bis 2,5 ml (*GE Healthcare*);

DextraSEC Pro2 für Volumen bis 200 µl (*AppliChem*) und Zeba™ Spin Entsalzungssäulen bis 130 µl (*Thermo Scientific*).

3.2.4.5. Konzentration von Proteinen und Komplexen

Nach Durchführung der Aufreinigung muss ein Protein im Normalfall zur weiteren Analyse ankonzentriert werden. Hierzu wurden Amicon Ultra-Konzentratoren der Firma *Millipore* mit einem Fassungsvermögen von 5 oder 15 ml und einer Ausschlusstrennung von 10 bzw. 30 kDa je nach Proteingröße verwendet. Die Konzentration fand bei 4°C und 4000*g mit regelmäßigen Unterbrechungen zur Durchmischung (Vorbeugung einer evtl. Aggregation in Regionen deutlich erhöhter Konzentration) statt.

3.3. Biophysikalische Methoden

3.3.1. MicroScale Thermophorese (MST)

Die vergleichsweise neue Technik der MicroScale Thermophorese, entwickelt durch die Firma *NanoTemper Technologies*, basiert auf dem auch Ludwig-Soret-Effekt genannten Phänomen der Diffusion von Teilchen innerhalb eines Temperaturgradienten. Dies tritt in allen Stoffen auf und ist daher universell für alle Teilchen, auch für biologische Makromoleküle, einsetzbar (Duhr and Braun, 2006).

Alle Messungen wurden basierend auf der von den Herstellern veröffentlichten Vorgehensweise durchgeführt (Wienken et al., 2010). Das Zielprotein wurde mit NT-647 (*NanoTemper Technologies*) den Herstellerangaben entsprechend markiert, anschließend aliquottiert und nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Initiale Messungen wurden immer mit einer Endkonzentration von 200 nM des markierten Proteins und einer Titrationsreihe (1:1 mit 200 µM Startkonzentration) des zu überprüfenden Proteins durchgeführt. Zur Verfeinerung einer Messung auf Basis der im Standardansatz erhaltenen Daten wurde die von *NanoTemper Technologies* bereitgestellte Software „Concentration Finder“ verwendet (auf eventuell hinzugefügte Additive wird im entsprechenden Kapitel hingewiesen). Bei jeder Messung wurde darauf geachtet, dass die Fluoreszenzen der einzelnen Proben nicht um mehr als 10% variierten. Alle Messungen beinhalten mindestens drei unabhängige Messreihen, welche je in Triplikaten durchgeführt wurden.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Origin 8 Datenanalyse- und Grafiksoftware (*OriginLab*) unter Verwendung einer sigmoidalen Anpassung mit folgender, eigenhändig implementierter Funktion:

$$T = P_u + \frac{A_b(\varphi + \tau + K_d - \sqrt{(\varphi + \tau + K_d)^2 - 4\varphi\tau})}{2\varphi}$$

T : Thermophorese; P_u : Plateau (ungebundene Fraktion); A_b : Bindungsamplitude; φ : Konzentration des markierten Moleküls; τ : Konzentration des titrierten Moleküls; K_d : Dissoziationskonstante

Anaerobe Thermophorese-Experimente wurden in einer Anaerobenkammer der Firma *COY Lab Products* durchgeführt. Dies beinhaltete sowohl Probenvorbereitung (Markierung und Titration) als auch Probenhandhabung (Überführung in Kapillaren und Positionierung auf der Messvorrichtung). Um Sauerstoffkontamination bei der anschließenden Messung auszuschließen, wurden alle Kapillaren beidseitig mit „SealingWax“ der Firma *NanoTemper Technologies* versiegelt.

Alle Messungen wurden auf einem Monolith NT.115 (Blue/Red) der Firma *NanoTemper Technologies* durchgeführt.

3.3.2. Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS)

Die Kleinwinkel-Röntgenstreuung ist eine Methode zur Analyse von Strukturen von z.B. biologischen Makromolekülen wie Proteinen. Hierfür wird eine homogene Proteinlösung einer definierten Röntgenstrahlung (normalerweise $\lambda = 1,5 \text{ \AA}$) ausgesetzt. Die durch die Probe hervorgerufene Streuung wird als Funktion des Impulsübertrags aufgetragen. Auf Basis dieser Funktion kann mit Hilfe indirekter Fourier Transformation, Guinier Annäherung und der einschlägigen Softwarepakete die Größe und die Form des Partikels in der Lösung mit niedriger Auflösung (klassischerweise um 8 \AA) berechnet werden (Petoukhov and Svergun, 2013).

Alle Proben wurden vor Ort vorbereitet. Proteinkonzentrationen wurden für jede Probe auf 6 mg/ml, 3 mg/ml und 1,5 mg/ml eingestellt. Der Standardpuffer enthielt 35 mM K-Phosphat (pH 7,4) und 150 mM NaCl (auf etwaige Additive wird im entsprechenden Kapitel hingewiesen).

Die Datensammlung erfolgte an der „BioSAXS beamline“ (BM29) der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF), Grenoble, ausgestattet mit einem Pilatus 1M Detektor bei 4°C . Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des ATSAS Softwarepakets (SAS Data Analysis; DAMMIN; GASBOR) (Petoukhov et al., 2012). Zusätzlich wurden sowohl die Streuung I_0 und der Streumassenradius R_g mit Hilfe der Guinier-Annäherung als auch die Paar-Verteilungsfunktion $p(r)$ und die maximale Partikelgröße D_{max} mittels GNOM bestimmt. Die Bestimmung der Beugungsprofile der bereits bekannten Strukturen wurde mittels Cryosol durchgeführt. Das Einpassen der bekannten Strukturen in die durch SAXS bestimmten Dichten erfolgte in Chimera 1.9 (UCSF) mittels „molmap“-Berechnung der entsprechenden Strukturen und automatisiertem „Fit in Map“.

3.4. Spektroskopische Methoden

3.4.1. Circulardichroistische Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

Die CD-Spektroskopie ist eine spezielle spektroskopische Methode, bei der man sich die Eigenschaft optisch aktiver Moleküle zunutze macht, zirkular polarisiertes Licht bei unterschiedlichen Wellenlängen unterschiedlich stark zu absorbieren. In der Biologie wird diese Methode hauptsächlich dazu verwendet, sekundäre Strukturelemente von Proteinen

aufzuklären (UV-CD-Spektroskopie). Neben dieser klassischen Anwendung können durch CD-Spektroskopie im UV/Vis-Bereich aber auch Übergänge von Charge-Transfer-Komplexen detektiert werden. Im nahen Infrarotbereich können außerdem geometrische und elektronische Strukturen durch Beobachtung von d→d Übergängen von Metallen bestimmt werden. Die CD-Spektroskopie im UV/Vis-Bereich wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, den [2Fe-2S]-Cluster des Gerüstproteins Isu1 zu detektieren. Dies wurde auf Basis der publizierten Parameter und Vorgehensweisen durchgeführt (Bonomi et al., 2008; Webert et al., 2014). Die Endkonzentrationen der einzelnen Reaktionskomponenten sind in Tabelle 3.6. und 3.7. aufgeführt, wobei alle Proteine aus *T. hominis* von Dr. Sabine Molik zur Verfügung gestellt wurden. Die Proben wurden strikt anaerob gehandhabt. Die Reaktion wurde im Gegensatz zur beschriebenen Vorgehensweise durch Zugabe des Desulfurasekomplexes Nfs1/Isd11 gestartet. Um die Handhabung möglichst vergleichbar zu halten, wurde die Reaktion im Ansatz ohne Desulfurasekomplex durch Zugabe von Cystein „gestartet“. Die Messdauer betrug immer 15 min. Als Basispuffer wurde 35 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 20 µM PLP verwendet. Alle Komponenten wurden entweder direkt in Basispuffer aufgenommen oder in diesen überführt.

End-konzentration	Lager-konzentration	Komponente	Reaktionsansatz (Pipettiervolumen in µl)	
			ThIsu1	ThFdx
mM	mM	Puffer	262,93	261,78
0,5	50	Na-Ascorbat	3,00	3,00
0,3	30	FeCl ₂	3,00	3,00
0,5	50	NADPH	3,00	3,00
0,2	20	MgCl ₂	3,00	3,00
0,5	50	Cystein	3,00	3,00
µM	µM			
3	607	Yfh1	1,48	1,48
0,3	85,7	hFdxR	1,05	1,05
3	750	Yah1	1,20	-
3	382	ThFdx	-	2,36
2,5	90	Nfs1/Isd11	8,33	8,33
50	1500	ThIsu1	10,00	-
50	1500	Isu1	-	10,00

Tab. 3.6.: Pipettierschema zur Überprüfung der Konservierung von *T. hominis* Isu1 und Fdx. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Nfs1/Isd11 gestartet (grün hinterlegt). Je nach Ansatz wurde das Hefeferreredoxin Yah1 oder das aus *T. hominis* (Fdx) verwendet, um entweder Isu1 aus *T. hominis* oder aus *C. thermophilum* zu rekonstituieren. Jeweils nicht im Ansatz vorhandene Komponenten sind rot hinterlegt.

End-konzentration	Lager-konzentration	Komponente	Reaktionsansatz (Pipettiervolumen in μl)						
			Standard C.t.	Standard T.h.	-Isu1	-Nfs1/Isd11	-Fdx	-FdxR	-Yfh1
mM	mM	Puffer	261,78	261,78	271,78	270,11	264,13	262,83	263,26
0,5	50	Na-Ascorbat	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
0,3	30	FeCl ₂	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
0,5	50	NADPH	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
0,2	20	MgCl ₂	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
0,5	50	Cystein	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
μM	μM								
3	607	ThYfh1	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	1,48	-
0,3	85,7	hFdxR	1,05	1,05	1,05	1,05	1,05	-	1,05
3	382	ThFdx	2,36	2,36	2,36	2,36	-	2,36	2,36
2,5	90	ThNfs1/Isd11	8,33	8,33	8,33	-	8,33	8,33	8,33
50	1500	ThIsu1	-	10,00	-	10,00	10,00	10,00	10,00
50	1500	Isu1	10,00	-	-	-	-	-	-

Tab. 3.7.: Pipettierschema zur Bestimmung der essentiellen Komponenten der frühen ISC-Maschinerie aus *T. hominis*. Die Reaktionen wurden je nach Ansatz durch Zugabe von Nfs1/Isd11 oder Cystein gestartet (grün hinterlegt). Je nach Ansatz wurden verschiedene Komponenten nicht hinzugegeben. Jeweils nicht im Ansatz vorhandene Komponenten sind rot hinterlegt.

3.4.2. Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die NMR-Spektroskopie basiert auf der magnetischen Kernresonanz. Hierbei wird sich zunutze gemacht, dass das magnetische Moment eines Atomkerns, welcher sich in einem starken Magnetfeld befindet, mit einem hochfrequenten magnetischen Wechselfeld in Wechselwirkung tritt. Die Frequenzen eines solchen Feldes befinden sich für biologische Anwendungen derzeit zwischen 500 MHz und 1GHz (in dieser Arbeit 500 MHz bzw. 950 MHz). Allerdings können nur solche Isotope detektiert werden, welche einen von Null verschiedenen Kernspin aufweisen und damit ein magnetisches Moment besitzen (in dieser Arbeit ¹H, ²D, ¹⁵N und ¹³C). In der Biologie nimmt die NMR-Spektroskopie einen wichtigen Platz in der Strukturaufklärung von Proteinen und Proteinkomplexen ein. Hierbei kann NMR, da die Messungen in Lösung geschehen und keiner vorherigen Kristallisation bedürfen, nicht nur Einblicke in die Struktur, sondern auch in die Dynamik und die intramolekularen Wechselwirkungen von Proteinen und Proteinkomplexen liefern.

3.4.2.1. Strukturlösung und Verfeinerung von *Yah1* und *Isu1*

Alle NMR-Experimente, welche für eine Resonanzzuordnung und eine Strukturbestimmung verwendet wurden, wurden entweder auf einem AVANCE 500 oder einem Avance III 950 Spektrometer der Firma *Bruker* durchgeführt. Sowohl oxidiertes und reduziertes *Yah1* als

auch Isu1 wurden je nach Messung entweder einfach mit Hilfe von ^{15}N -Ammoniumsulfat oder doppelt mit Hilfe von ^{15}N -Ammoniumsulfat und $^{13}\text{C}_6$ -Glukose (*Euriso-Top*) als Stickstoff- bzw. Kohlenstoffquelle im Kulturmedium markiert. Die Proteinkonzentration wurde immer auf 0,5 mM eingestellt, um entsprechend starke Signale zu erhalten. Als Puffer wurde 35 mM K-Phosphatpuffer (pH 7,4), 100 mM NaCl und 10% (v/v) D_2O verwendet. Alle NMR-Spektren wurden bei 298 K mit Hilfe der Standard Bruker Software (Topspin) aufgenommen. Zur Analyse der NMR-Spektren wurde das Programm „CARA“ verwendet. Es wurden folgende NMR-Spektren aufgezeichnet: HNC0 (Clubb et al., 1992), HNC0CA, HNCA, CBCACONH, CBCANH (Grzesiek and Bax, 1993), 3D-Tripel-Resonanz NMR-Experimente für die Rückgratzuordnung und sowohl 2D TOCSY also auch hCCH-TOCSY Experimente für die Zuordnung der Seitenketten. Um auch die Struktur des C-Terminus im Falle von Yah1 und des N-Terminus im Falle des Isu1 bestimmen zu können, mussten zusätzliche Experimente durchgeführt werden, welche eine ^{13}C -Direktbestimmung erlaubten: CBCACO, CACO, CON und CANCO (Bermel et al., 2003). Im Falle von Yah1 wurden auf Grund seines paramagnetischen [2Fe-2S]-Clusters noch ^{13}C - ^{13}C COSY Spektren aufgenommen, um auch die sehr breiten und schnell relaxierenden Signale solcher Aminosäuren, welche sich in unmittelbarer Umgebung des Fe/S-Clusters befinden, aufzeichnen zu können.

Die Strukturberechnung erfolgte mittels ATNOS/CANDID/CYANA des Softwarepaketes UNIO (Herrmann et al., 2002). Hierzu wurden die Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins, die chemischen Verschiebungen, drei NOE-Experimente (2D NOESY, 3D ^{13}C NOESY und 3D ^{15}N NOESY) und die entsprechenden Φ und Ψ Torsionswinkel verwendet, welche mit Hilfe von CSI, PECAN und TALOS+ (Shen et al., 2009) zuvor berechnet wurden. Die 20 besten Konformere wurden zur Energieminimierung und für „Molecular Dynamics“ (MD) Berechnungen ausgewählt. Hierzu wurde AMBER 12.0 verwendet (Case et al., 2005). Die Qualität der Strukturen wurde schließlich durch die „Protein Structure Validation Software“ (PSVS) und iCING weiter verfeinert und verifiziert.

3.4.2.2. Datensammlung zur Bestimmung des Komplexes aus Yah1 und Isu1

Entweder ^{15}N -markiertes Yah1 oder ^{15}N -markiertes Isu1 wurden mit dem jeweilig anderen unmarkierten Protein titriert. Von jeder Titrationsstufe (0,25 eq bis 2 eq, in Schritten von 0,25 eq) wurden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren aufgenommen und auf deren Basis die chemischen Verschiebungen verfolgt. Zur Berechnung der relativen chemischen Verschiebung jeder Aminosäure wurde folgende Formel verwendet:

$$\Delta_{av} = \sqrt{\frac{\delta_{HN}^2 + \delta_N^2}{50}}$$

Δ_{av} : durchschnittliche chemische Verschiebung; δ_{HN} : chemische Verschiebung auf der Proton-Achse; δ_N : chemische Verschiebung auf der Stickstoff-Achse

Yah1 wurde ausschließlich in seiner reduzierten Form verwendet, wofür es vor Titration mit 5 mM Na-Dithionit inkubiert wurde, welches direkt vor der Zugabe wieder durch eine PD-10 Entsalzungssäule entfernt wurde. Die Konzentrationen des konstanten Proteins wurden in allen Fällen durch einen entsprechenden Konzentrationsschritt nach jeder Zugabe konstant gehalten (Microcon Ultracell YM-10, Millipore).

3.5. Bioinformatische Methoden

3.5.1. Molekulare Proteinmodellierung

Molekulare Modellierung beschreibt einen computergestützten Prozess der Berechnung von molekularen Strukturen. In der Biologie wird diese Technik dazu angewandt, Proteinstrukturen zu berechnen. Über quantenmechanische Berechnungsverfahren können die auf Basis von mechanistischen und statistischen Ansätzen berechneten Strukturen lokal verfeinert werden. Die quantenmechanische Berechnung ist aufgrund ihrer Komplexität derzeit noch nicht für ganze Proteinstrukturen durchführbar. In dieser Arbeit wurden sowohl die *ab initio* Modellierung, welche eine Berechnung einer Proteinstruktur nur auf Basis der Primärstruktur ermöglicht, als auch Homologiemodellierung, welche eine Strukturberechnung auf Basis ähnlicher, bereits bekannter Strukturen durchführt, verwendet.

Die *ab initio* Modellierung von Isd11 wurde mit Hilfe des I-TASSER Webservers durchgeführt (Roy et al., 2010; Yang et al., 2015; Zhang, 2008).

Zur Homologiemodellierung von Nfs1 wurde der SWISS-MODEL Server verwendet (Arnold et al., 2006; Biasini et al., 2014; Bordoli et al., 2009).

3.5.2. Protein-Protein-Docking

Protein-Protein-Docking beschreibt die computergestützte Berechnung von quartären Strukturen aus bekannten Untereinheiten. Hierfür ist es erforderlich, die Struktur und die molekularen Parameter (Ladung etc.) der gewünschten Untereinheiten zu kennen. Auf Basis dieser Parameter kann eine quartäre Struktur z.B. eines Proteinkomplexes aus zwei Proteinen berechnet werden, wobei der Flexibilität der Untereinheiten Rechnung getragen werden muss. Um ein genaues Modell eines Komplexes zu erhalten, können z.B. mittels NMR auf Basis von chemischen Verschiebungen bestimmte Interaktionsstellen mit in die Berechnung aufgenommen werden. Dies wird dann als „datengestütztes Protein-Protein-Docking“ bezeichnet und beschreibt daher eine Hybridmethode aus experimenteller Biologie und Bioinformatik.

Zur Erstellung des Heterodimers aus Yah1 und Isu1 wurde, auf Basis der per NMR bestimmten chemischen Verschiebungen, ein datengestütztes Protein-Protein-Docking durchgeführt. Hierfür wurde der spezialisierte HADDOCK Webserver in engem Kontakt mit den Entwicklern verwendet (de Vries et al., 2007; Dominguez et al., 2003; van Dijk et al., 2006a; van Dijk et al., 2006b).

Um ein Docking durchführen zu können, welches einen physiologisch relevanten Komplex generiert, wurden sowohl der flexible C-Terminus von Yah1 als auch der flexible N-Terminus von Isu1 während der Dockingprozedur als flexible Regionen definiert. Weiter wurde die Struktur von Isu1, welche C-terminal bis zur letzten Aminosäure der His-Markierung aufgelöst wurde, entsprechend der Uniprot Datenbank (www.uniprot.org; Eintrag: [G0S9W5](http://www.uniprot.org/entry/G0S9W5)) gekürzt. So wurde ein möglicherweise verfälschender Beitrag der His-Markierung vermieden.

3.5.3. Graphische Darstellung von strukturellen Daten

Alle graphischen Abbildung wurden unter Verwendung von „UCSF Chimera 1.9“ erstellt (Pettersen et al., 2004). Es diente auch zur Bearbeitung der strukturellen Daten und zur Einpassung dieser in die durch SAXS ermittelten Ladungsdichten.

4. Ergebnisse

4.1. Die Funktion der ISC-Maschinerie auf molekularer Ebene

4.1.1. Reduziertes und oxidiertes Yah1 sind monomere, gefaltete Proteine

4.1.1.1. NMR Datensammlung und Auswertung

Die Struktur des Hefe-Ferredoxins Yah1 sowohl in seiner oxidierten als auch in seiner reduzierten Form wurde mit Hilfe von NMR Spektroskopie gelöst. Yah1 wurde zuvor mittels Kationenaustauschchromatographie und anschließender Gelfiltration aufgereinigt. Es wurde

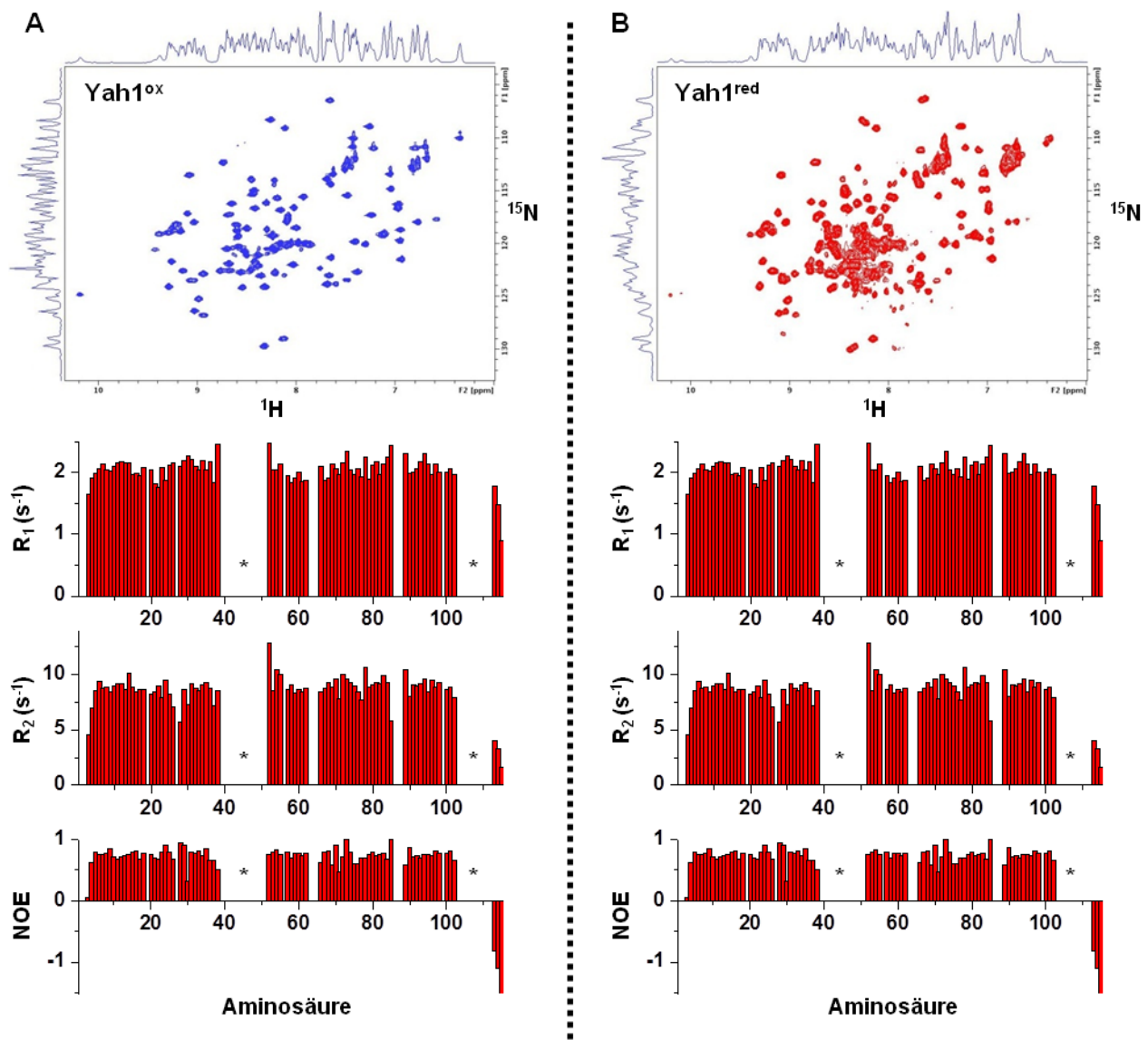


Abb. 4.1.: Primärdaten der NMR-Messungen von reduziertem und oxidiertem Yah1. A: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum und Mobilitätsuntersuchungen (R_1 , R_2 , NOE) für oxidiertes Yah1. Das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum ist typisch für ein monomeres gefaltetes Protein. Aus den negativen NOE-Werten des C-Terminus kann bereits die Flexibilität dessen abgelesen werden. Alle fehlenden Aminosäuren sind nahe dem [2Fe-2S]-Cluster lokalisiert. **B:** ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum und Mobilitätsuntersuchungen (R_1 , R_2 , NOE) für reduziertes Yah1. Das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum ist typisch für ein monomeres gefaltetes Protein und zeigt deutliche Unterschiede zum ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des oxidierten Yah1. Auch hier deuten die negativen NOE-Werte auf eine hohe Flexibilität der C-terminalen Region hin. Alle fehlenden Aminosäuren (*) befinden sich um den [2Fe-2S]-Cluster.

	Yah1 ^{Ox}	Yah1 ^{Red}
NMR Abstands- & Raumgrenzen		
Distanzpunkte		
NOE (gesamt)	1602	1553
Intra-Aminosäure	352	337
Inter-Aminosäure	1250	1216
Sequentiell ($ i-j = 1$)	432	428
Mittlerer Bereich ($ i-j < 4$)	325	324
Weiter Bereich ($ i-j > 5$)	493	464
Raumwinkelpunkte (gesamt)		
Phi (φ)	84	77
Psi (ψ)	84	77
Strukturstatistik		
Vertöße (Mittelwert mit SD)		
Distanzpunkte (Å)	0,19 ± 0,11	0,22 ± 0,06
Raumwinkelpunkte (°)	1,9 ± 0,61	1,6 ± 0,41
Max. Raumwinkelverstoß (°)	2,37	4,15
Max. Distanzverstoß (Å)	0,29	0,28
Abweichungen von idealisierter Geometrie		
Bindungslänge (Å)	0,013	0,013
Bindungswinkel (°)	2,3	2,3
Unzulässig (°)	6,7	6,5
Mittlere RMSD (paarweise)* (Å) (4-38, 52-85, 89-101)		
Schwere Atome	1,01 ± 0,25	1,28 ± 0,27
Rückgrat	0,76 ± 0,22	0,98 ± 0,25
Ramachandran Diagramm Analyse (%)		
Bester Bereich	87,5	90,3
Zusätzlich erlaubter Bereich	11,8	9,7
Großzügig erlaubter Bereich	0,5	0,0
Nicht erlaubter Bereich	0,3	0,0

Tab. 4.1: NMR-Statistik von oxidiertem und reduziertem Yah1. Paarweise RMSD ist auf 20 verfeinerte Strukturen bezogen (*).

¹³C und/oder ¹⁵N markiertes, entweder mit Na-Dithionit reduziertes oder nicht weiter behandeltes Vollängenprotein verwendet (siehe Abb. A.1.). Zunächst wurden alle notwendigen NMR Spektren (siehe 3.4.2.) des ¹⁵N markierten Yah1 aufgezeichnet. Yah1 zeigte ein ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum, das typisch ist für ein größtenteils unelastisches und gefaltetes Protein (Abb. 4.1.). Die im Anschluss durchgeführten NOE Experimente bestätigten dies und zeigten zusätzlich, dass der C-Terminus ungeordnet ist (Abb. 4.1.). Des Weiteren zeigten das NOE Experiment wie auch die R1 und R2 Werte, dass der paramagnetische Charakter des [2Fe-2S]-Clusters nur Auswirkungen auf spezifische Regionen innerhalb des Proteins hat. Diese „Lücken“ wurden mit Hilfe des Kohlenstoff-Direktnachweises (Banci et al., 1990) unter Verwendung des ¹⁵N/¹³C markierten Yah1 auf ihre Assoziation mit dem [2Fe-2S]-Cluster hin überprüft. Mit dieser Methode konnten weitere

Aminosäuren (2, 19, 20, 39, 51, 86, 88, 103-109, 112) aufgelöst und zugeordnet werden (Anhang Abb. A.2.). Dies ermöglichte einen detailgenauen Einblick sowohl in die Organisation und Koordination des [2Fe-2S]-Clusters als auch der Aminosäuren, welche sich in räumlicher Nähe zu diesem befinden. Nach Verfeinerung konnte für Yah1 in oxidiertem Zustand eine strukturelle Auflösung von $0,76 \pm 0,22 \text{ \AA}$ (Tab. 4.1.) und in reduziertem Zustand von $0,98 \pm 0,25 \text{ \AA}$ erreicht werden (Tab. 4.2.).

4.1.1.2. Strukturbeschreibung

Sowohl das oxidierte als auch das reduzierte Hefe Ferredoxin Yah1 zeigten, wie aus den initialen NMR Experimenten bereits erwartet, eine für [2Fe-2S]-Ferredoxine typische kompakte Faltung, welche sowohl α -Helices wie auch β -Faltblätter aufweist. Die vier zentralen β -Stränge werden entsprechend dem β -*grasp* Motiv (bekannt auch aus der Struktur von Ubiquitin, (Murzin et al., 1995)) durch eine α -Helix getrennt und weisen damit die für [2Fe-2S]-Ferredoxine typische $\beta(2)$ - $\alpha(1)$ - $\beta(2)$ Anordnung auf. Neben dem „ β -*grasp*“ Motiv weist Yah1 einen weiteren kurzen β -Strang sowie zwei kurze α -Helices und eine längere α -Helix auf (Abb. 4.2.). Der [2Fe-2S]-Cluster wird über die konservierten Cystein-Reste Cys41, Cys47, Cys50 und Cys87, welche sich allesamt auf einer Schleife befinden, koordiniert und bildet das Zentrum der konservierten hydrophoben Domäne, welche typisch ist für MB-Typ Ferredoxine. Die globale Ladungsverteilung auf Yah1 steht im Konsens mit den bisher bekannten Fakten und zeichnet sich durch eine relativ scharfe Abgrenzung von negativ und positiv geladenen Regionen aus (Abb. 4.2.). So ist eine Seite des Ferredoxins aus Hefe größtenteils positiv, die andere größtenteils negativ geladen. Dieser Umstand erleichtert dem Protein einen effizienten Elektronentransfer und die Etablierung von hochspezifischen Interaktionen. Ein Vergleich der Struktur von Yah1 mit anderen MB-Typ Ferredoxinen (hier dem *E. coli* homolog Fdx und dem humanen FDX2 bzw. ADX1) zeigte, dass die gefalteten Regionen aller [2Fe-2S]-Ferredoxine einander bis auf minimale Unterschiede sehr ähnlich sind (Dissertation, Holger Weibert, 2011) (Abb. 4.3.). Eine direkte Überlagerung von Yah1 mit dem humanen FDX2 zeigt, dass wenig signifikante strukturelle Unterschiede zwischen dem Säugetier-Ferredoxin und dem eines niederen Eukaryoten bestehen (Abb. 4.4.). Ein Unterschied jedoch, dem bisher nur wenig Beachtung geschenkt wurde, ist die Orientierung der für die Koordination des [2Fe-2S]-Clusters essentiellen Schleife. Hier ist eine starke Drehung von etwa $69,4^\circ$ zu beobachten. Dies ist daher von großem Interesse, da die Koordination des [2Fe-2S]-Clusters und die Orientierung der Schleife essentiell für einen erfolgreichen Elektronentransfer sind (siehe 554.1.1.3.). Vergleiche im Hinblick auf die C-terminale Region der beiden Ferredoxine sind nicht möglich, da bisher keine strukturellen Informationen über den äußerst flexiblen C-Terminus

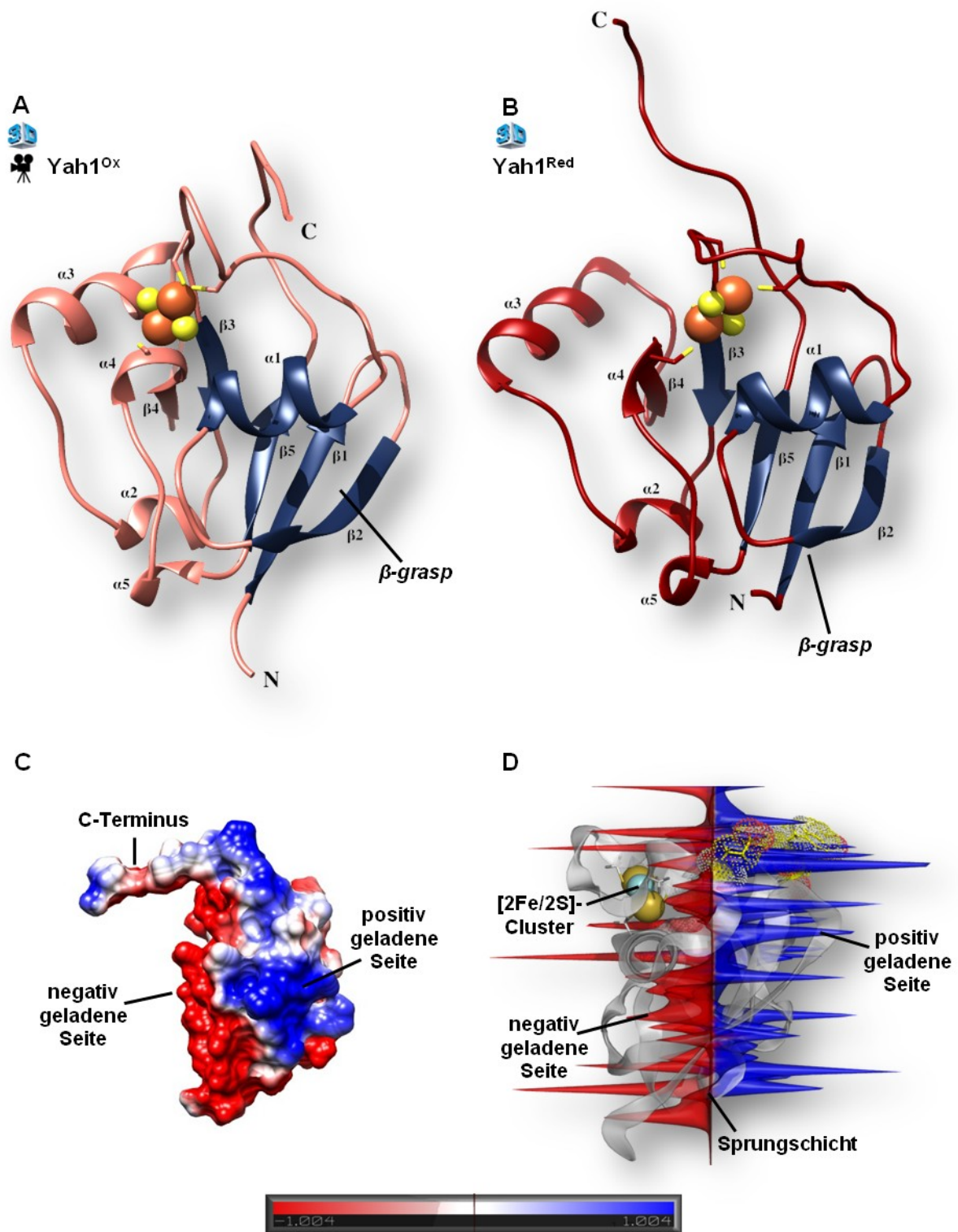


Abb. 4.2.: Die Strukturen von oxidiertem und reduziertem Yah1. **A:** Oxidiertes Yah1 (Yah1^{ox}, hell-rot) mit beschrifteten sekundären Strukturelementen. Der C-Terminus ist oberhalb der Koordinationsschleife lokalisiert und beinhaltet keine sekundären Strukturelemente. Das klassische β -grasp-Motiv (dunkelblau) wird durch die Stränge β 1; β 2, β 3, β 5 und Helix α 1 gebildet. Die Koordination des [2Fe-2S]-Clusters übernehmen die vier konservierten Cysteinreste. (vgl. Abb. 3D.1.) **B:** reduziertem Yah1 (Yah1^{red}, dunkelrot). Identische Darstellung wie für oxidiertes Yah1. Der C-Terminus tendiert in Richtung Oberseite. (vgl. Abb. 3D.1.) **C:** Oberflächenladung von Yah1 am Beispiel von Yah1^{ox}. Die Areale negativer und positiver Partiaalladung verteilen sich größtenteils auf nur jeweils eine Region, welche in sich sehr homogen sind. Yah1 besitzt eine positiv und eine negativ geladene Seite. (vgl. Vid. 1.) **D:** Spike Darstellung der beiden unterschiedlich geladenen Seiten. Die Partiaalladungen von Yah1 sind seitenabhängig und besitzen dazwischen eine Sprungschicht. Der [2Fe-2S]-Cluster ist auf der negativen Seite lokalisiert.

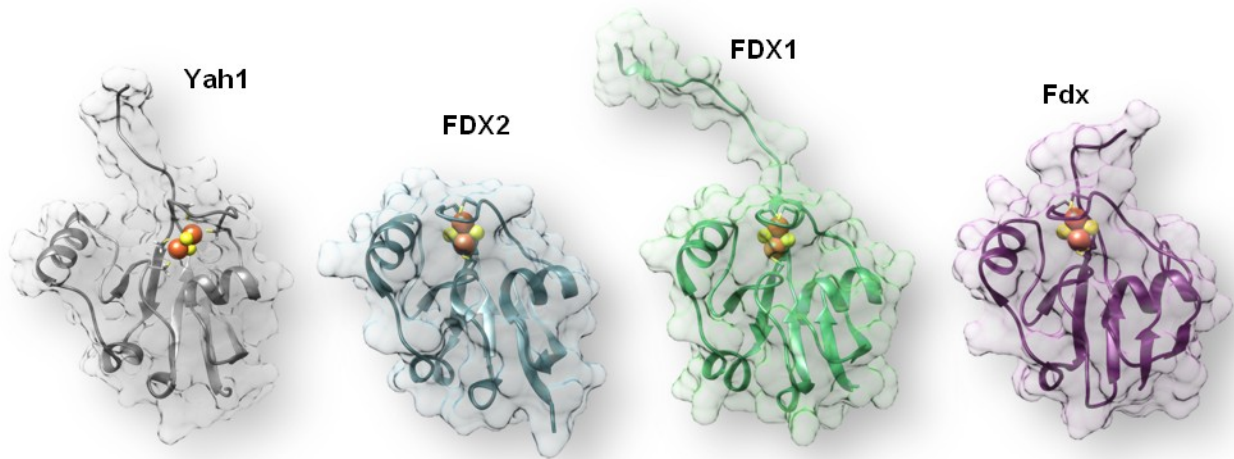


Abb. 4.3.: Vergleich von Yah1 mit FDX2, FDX1 und bakteriellem Ferredoxin (Fdx). A: Das Hefe-Ferredoxin Yah1 (grau) hat einen unstrukturierten weit ausholenden C-Terminus und eine offene Konformation im Bezug auf die Koordinationsschleife. Die Struktur des humanen Ferredoxins FDX2 (schieferfarben) wurde bisher nur ohne seinen C-Terminus gelöst. Die Koordinationsschleife nimmt eine geschlossene Konformation ein. Das humane Ferredoxin FDX1 (grün) wurde inklusive seines C-Terminus strukturell definiert. Der C-Terminus beinhaltet ein α -helikales Strukturelement und befindet sich weit oberhalb des Proteinenzentrums. Die Koordinationsschleife ist wie im Falle des FDX2 geschlossen. Die Struktur des bakteriellen Ferredoxins (Fdx, violett) entspricht der der eukaryotischen Ferredoxine. Sie wurde mit einem verkürzten C-Terminus gelöst und beinhaltet auch eine geschlossene Konformation der Koordinationsschleife.

eines MB-Typ-Ferredoxins gesammelt werden konnten, da dieser, durch seine Flexibilität, eine erfolgreiche Kristallisation verhinderte. Die hier vorgestellte strukturelle Analyse des Yah1 mit Hilfe von NMR Spektroskopie erlaubte nun jedoch erstmals Einblicke in die Orientierung und räumliche Ausdehnung des essentiellen C-Terminus. Die Struktur entspricht einer ungefalteten und hochflexiblen Polypeptidkette, welche sich bevorzugt über

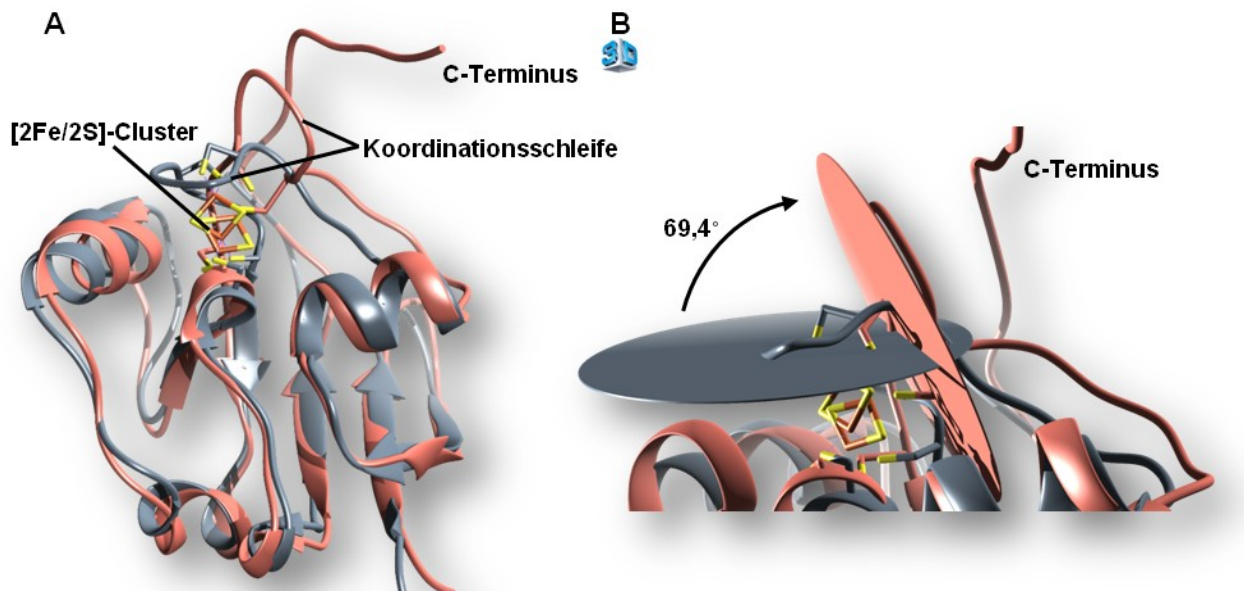


Abb. 4.4.: Strukturelle Unterschiede zwischen humanem FDX2 und Yah1 aus Hefe. A: Superposition von FDX2 (grau) und Yah1^{Ox} (hellrot). Neben der unterschiedlichen Orientierung des [2Fe-2S]-Clusters und der Koordinationsachse fallen wenige strukturelle Abweichungen auf. Das β -grasp-Motiv ist konserviert und auch die Orientierung von Helix α 3 ist nahezu identisch. B: Die Koordinationsachsen von FDX2 und Yah1 sind um $69,4^\circ$ gegeneinander verschoben. Yah1 beinhaltet eine relativ offene Konformation der Koordinationsschleife, wohingegen die des FDX2 eher geschlossen ist. Dies führt auch zur veränderten Orientierung des darunterliegenden [2Fe-2S]-Clusters. (vgl. Abb. 3D.2.)

die hydrophobe Fe/S-Cluster Bindestelle legt (Abb. 4.5.). Hier bleibt jedoch eine außerordentliche Flexibilität vorhanden, wodurch der C-Terminus faktisch jede mögliche Position oberhalb des [2Fe-2S]-Clusters einnehmen kann. Auch das konservierte und essentielle His51 (Kostic et al., 2003) wird rückseitig durch den C-Terminus verdeckt und vor Einflüssen der Umgebung abgeschirmt (Abb. 4.5.). Das His51 selbst ist im Zentrum des Proteins, direkt unterhalb des Fe/S-Clusters lokalisiert und befindet sich auf der Sprungschicht zwischen der negativ und der positiv geladenen Seite des Ferredoxins. Die essentielle Funktion dieses Aminosäurerestes wird beim Vergleich der beiden Oxidationszustände noch deutlicher (siehe 4.1.1.3.).

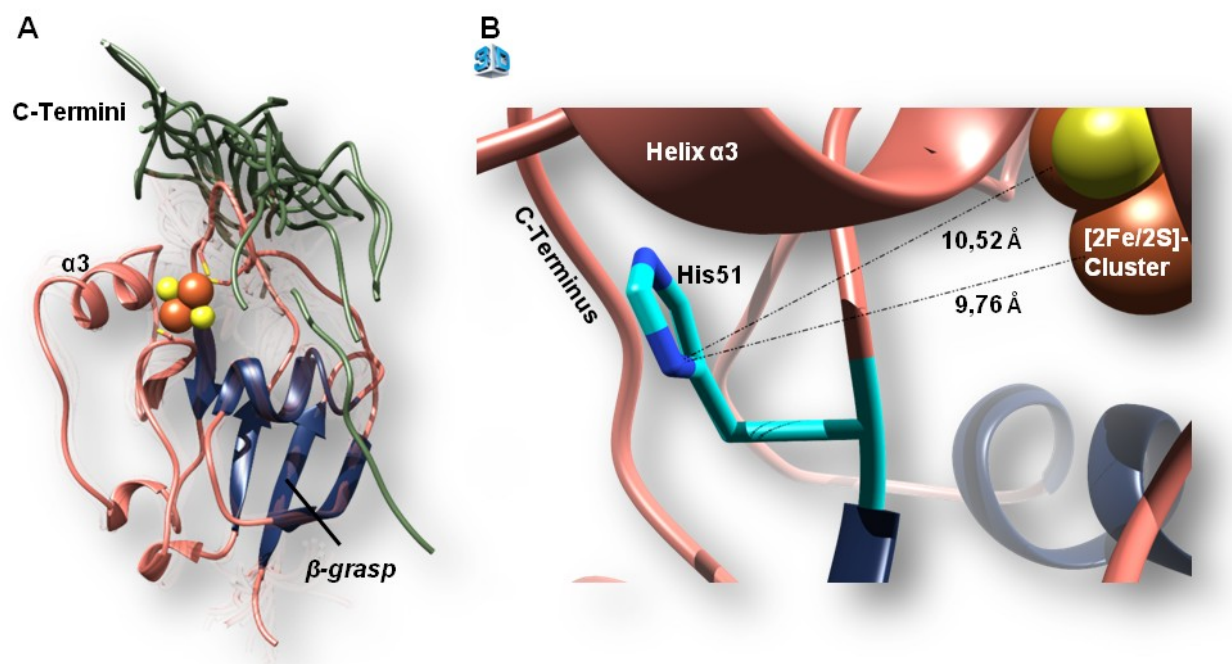


Abb. 4.5.: Der C-Terminus von Yah1 ist hochflexibel und bedeckt den [2Fe-2S]-Cluster und das zentrale His51. **A:** Der C-Terminus (grün) am Beispiel des Yah1^{ox} ist tendenziell oberhalb des [2Fe-2S]-Clusters lokalisiert, wobei er hier flexibel bleibt. **B:** Das konservierte Histidin His51 (zyan) befindet sich im Zentrum des Proteins und wird rückseitig vom C-Terminus bedeckt. Auf der Vorderseite befindet sich der [2Fe-2S]-Cluster in einem Abstand zu His51 um 10 Å. (vgl. Abb. 3D.3.)

4.1.1.3. Unterschiede der Redoxzustände erleichtern den Elektronentransfer

Die augenscheinlichste Veränderung betrifft die globale bzw. regionale Ladungsdichte. Durch Reduktion ist eine deutliche Verschiebung hin zu einer negativeren Oberflächenladung zu beobachten. Dies ist insofern von besonderem Interesse, als sich diese Verschiebungen ausschließlich regional auswirken. Lediglich in der Region um den Fe/S-Cluster und um Helix $\alpha 3$ ist ein deutlicher Anstieg des negativen Charakters zu beobachten. Alle weiteren Teile scheinen größtenteils von der Reduktion nicht beeinflusst zu werden (Abb. 4.6.). Dies lässt auf eine tragende Rolle dieser beiden Teile für die Etablierung von Interaktionen und im Elektronentransferprozess schließen. Weiterführende Erörterungen

zur möglichen Bedeutung dieser regionalen Ladungsverschiebung sind unter 5.1.1. (Diskussion) zusammengestellt.

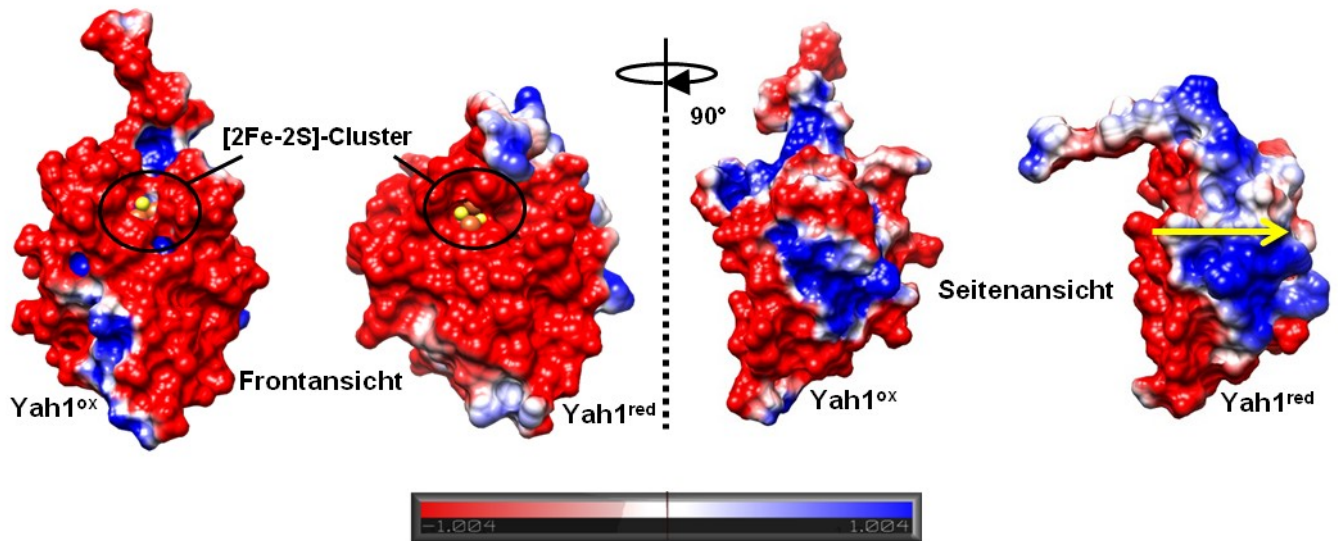


Abb. 4.6.: Ladungsverschiebungen auf Yah1 durch Reduktion. Frontansicht (links) und Seitenansicht (rechts). An der Vorderseite von Yah1 und im speziellen in der Region um den [2Fe-2S]-Cluster nimmt die negative Ladung an der Oberfläche stark zu. Weiter rückt durch Reduktion die Oberflächenladung seitlich und auf der Rückseite ins Positive. Dies schafft einen Ladungsgradienten ($\delta^- \rightarrow \delta^+$) von der Vorderseite zur Rückseite (gelber Pfeil).

Bei einem Vergleich von oxidiertem und reduziertem Yah1 fallen auch mit Blick auf die Tertiärstruktur interessante Unterschiede ins Auge (Abb. 4.7.). Zunächst scheint der C-Terminus im reduzierten Zustand eine deutliche Tendenz in Richtung einer bestimmten Konformation zu haben. Verglichen mit dem vollständig ungeordneten C-Terminus im oxidierten Zustand strebt er im reduzierten Zustand deutlich in Richtung „Vorderseite“, jedoch weiterhin ohne erkennbare sekundäre Strukturelemente aufzuweisen. Dieses Verhalten führt zu einer kompakteren „Oberseite“ des Proteins, als es im oxidierten Yah1 der Fall ist. Weiter konnte eine dramatische Änderung der Orientierung von Helix $\alpha 3$ beobachtet werden, welche schon im Vergleich der beiden Varianten eine „Öffnung“ des Redoxzentrums von Yah1 erkennen lässt. In einer direkten Überlagerung der beiden Red/Ox Zustände lässt sich diese Öffnung der Tertiärstruktur deutlich erkennen (Abb. 4.7.). Eine detaillierte Analyse der Unterschiede in Helix $\alpha 3$ zeigte eine durchschnittliche Verschiebung der z-Achse auf der x-Achse um 5,9 Å. Außerdem wird die gesamte Helix sowohl um die x- als auch um die y-Achse leicht gedreht. Der Überschneidungswinkel der beiden Helices beträgt 10,0°. Bei einem Vergleich mit dem Verhalten der übrigen Helices konnte festgestellt werden, dass die Verschiebung deutlich oberhalb der normalen natürlichen Varianz innerhalb des Proteins liegt ($\alpha 1$: 0,4Å; $\alpha 2$: 0,2Å; $\alpha 4$: 1,0Å; $\alpha 5$: 0,0Å). Der Überschneidungswinkel dagegen konnte nicht zweifelsfrei als spezifisches Red/Ox-Resultat für Helix $\alpha 3$ definiert werden, da eine generelle Drehung der Helices aus der Reduktion zu resultieren scheint ($\alpha 1$: 14,9°; $\alpha 2$: 1,8°; $\alpha 4$: 47°; $\alpha 5$: 11°) (Abb. 4.7.). Helix $\alpha 4$ macht hier die größte Veränderung durch und kann

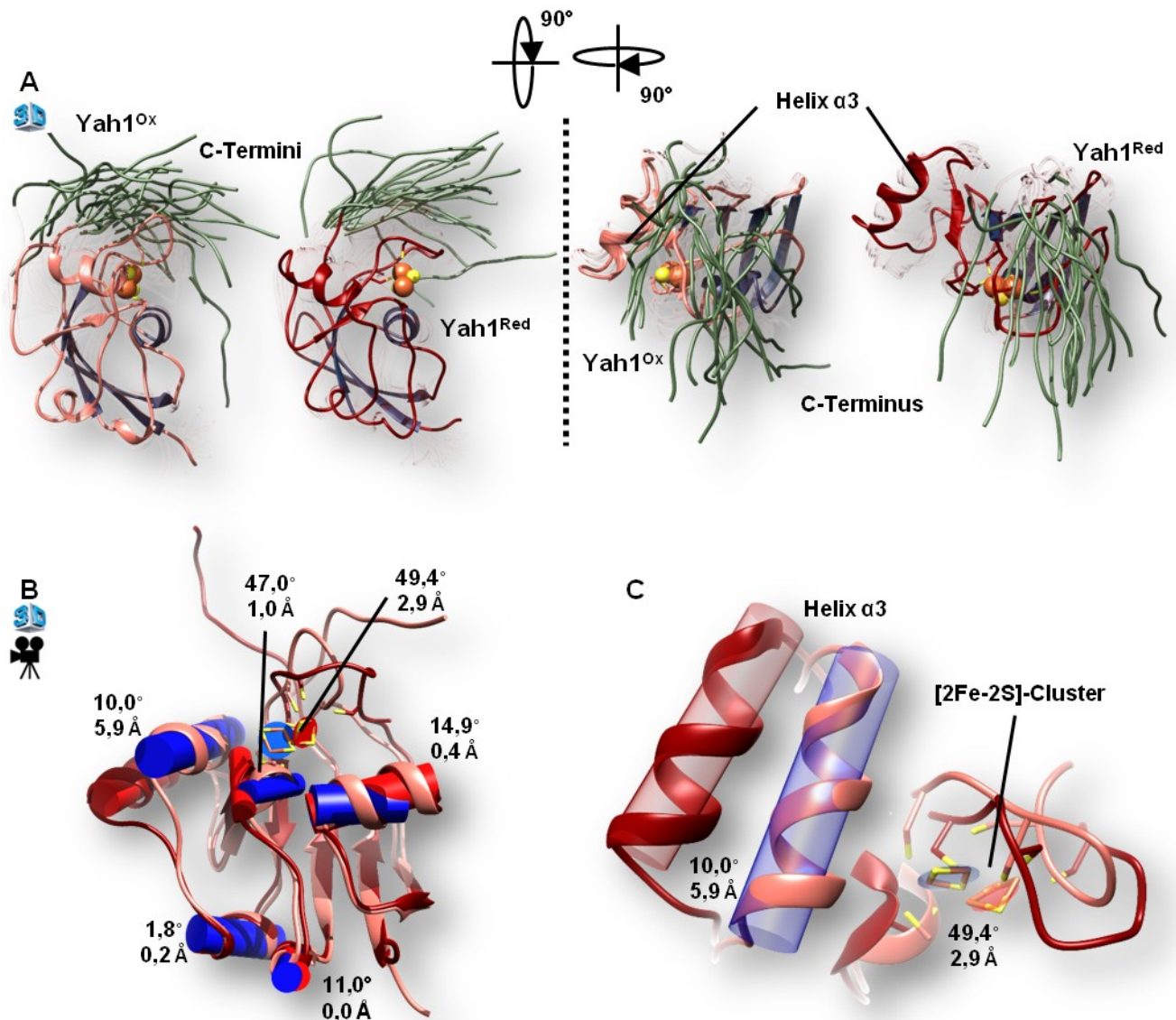


Abb. 4.7.: Reduziertes und oxidiertes Yah1 unterscheiden sich auf struktureller Ebene. A: Globale Strukturunterschiede von Yah1^{red} und Yah1^{ox} (links: Seitenansicht, rechts: Draufsicht). Der C-Terminus des reduzierten Proteins strebt deutlich stärker in Richtung der Proteinvorderseite. Im oxidierten Zustand lokalisiert dieser beinahe vollkommen zufällig. Helix α3 nimmt im reduzierten Zustand eine deutlich offenere Konformation ein, als es im oxidierten Zustand der Fall ist (vgl. Abb. 3D.4.). **B:** Überlagerung von Yah1^{red} und Yah1^{ox}. Alle Helices weisen leichte Drehungen oder Verschiebungen auf. Die stärkste Verschiebung von 5,9 Å macht Helix α3 durch. Auch die Koordinationsachse und der Fe/S-Cluster selbst drehen und verschieben sich (vgl. Abb. 3D.5. und Vid. 2. und 3.). **C:** Detaileintritte in die Verschiebung von Helix α3 und die Änderungen in der Fe/S-Cluster Koordination. Sowohl die Verschiebung von Helix α3 also auch die Drehung des [2Fe-2S]-Clusters um 49,4° sind relevant.

nach erfolgter Reduktion und daraus resultierender intramolekularer Verschiebungen nicht mehr als klassische Helix identifiziert werden. Dies verdeutlicht auf dramatische Weise das Ausmaß der Änderungen durch Reduktion innerhalb des Proteins.

Neben diesen eher global-strukturellen Änderungen konnten bei genauerer Analyse weitere Unterschiede beobachtet werden, welche die Grundlage für die zuvor erwähnten konformationellen Änderungen darstellen. Der offensichtlichste Unterschied auf molekularer Ebene war die Neuordnung des [2Fe-2S]-Clusters und zweier der vier koordinierenden Cys-Reste. Die Reste Cys41 und Cys50, wobei letzteres direkt neben His51 lokalisiert ist,

verschieben sich um etwa 5,5 Å bzw. 3,3 Å (Abb. 4.8.). Diese Verschiebung hat eine Drehung der Koordinationsachse um durchschnittlich 72,9° und eine direkte Drehung und Verschiebung des [2Fe-2S]-Clusters um 49,4° bzw. 2,9 Å zur Folge. Diese enorme, durch Reduktion hervorgerufene Änderung in der Anordnung des [2Fe-2S]-Clusters führt zu einer Drehung der darüber befindlichen Schleife um durchschnittlich 52,9° (Abb. 4.8.). Aus dieser Drehung resultiert eine deutliche Änderung der räumlichen Ausrichtung des His51. So ist es

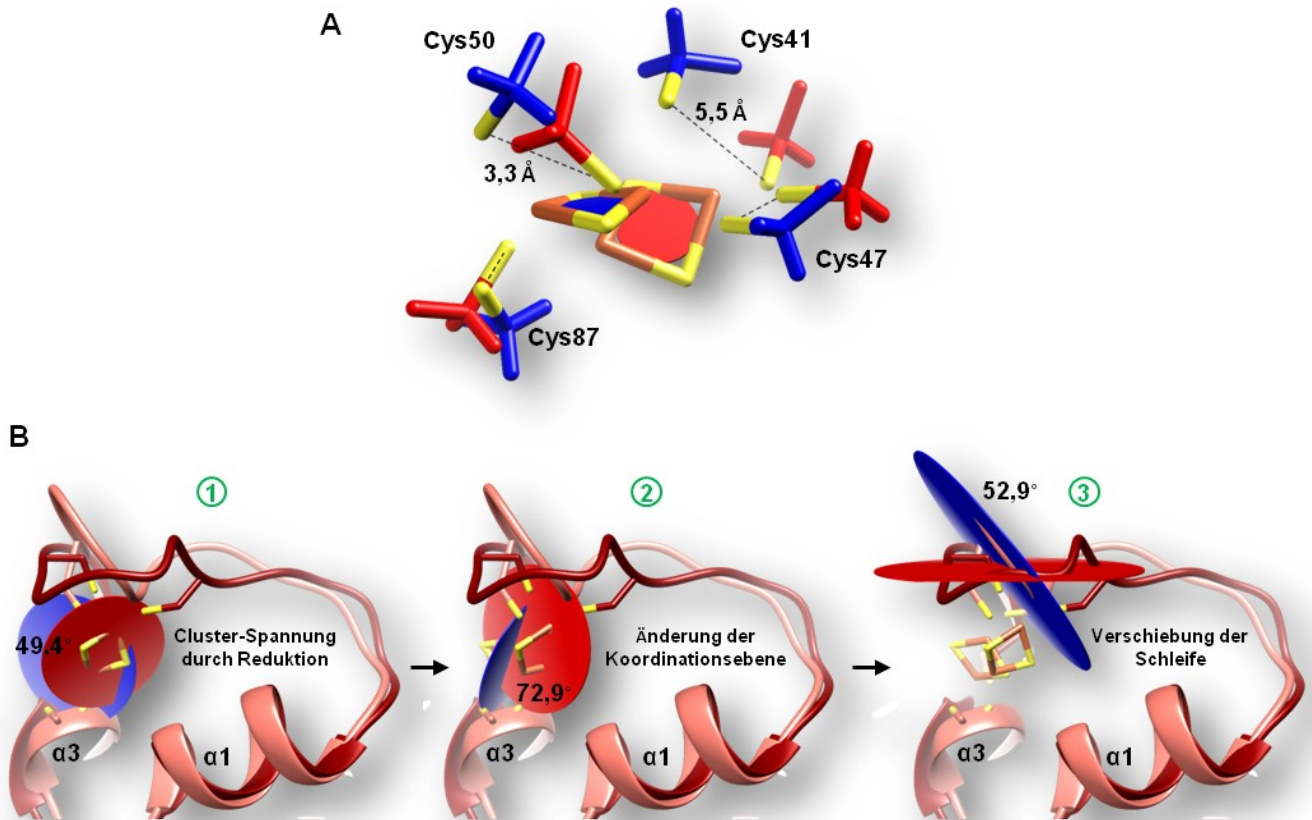


Abb. 4.8.: Effekte des Elektroneninflux auf das elektronische Zentrum von Yah1. **A:** Die Reduktion von Yah1 führt sowohl zu einer Bewegung der koordinierenden Cysteinreste als auch zu einer Relokalisation des [2Fe-2S]-Clusters. In blau jeweils die Reste von oxidiertem und in rot die von reduziertem Yah1. Die Verschiebungen von Cys41 (5,5 Å) und Cys50 (3,3 Å) sind signifikant. **B:** Modell einer möglichen Ereigniskaskade der strukturellen Änderungen innerhalb des Koordinationszentrums von Yah1. In blau die Fe/S-Cluster-Achse, die Koordinationsebene oder die Orientierung der Koordinationsschleife von oxidiertem, in rot die von reduziertem Yah1. Durch Reduktion findet zunächst eine Drehung und „Spannung“ des [2Fe-2S]-Clusters statt (1). Hierdurch wird die Koordinationsebene geändert (2), was schließlich zu einer Verschiebung der Koordinationsschleife (3) führt.

im oxidierten Zustand vornehmlich auf der positiv geladenen Seite des Ferredoxins zu finden, wo es eine bekannte essentielle Wasserstoffbrücke mit Ser83 ausbildet (Kostic et al., 2003). Diese Wasserstoffbrücke wird durch die Drehung der Koordinationsschleife jedoch aufgebrochen, was zu einer erhöhten Flexibilität des His51 führt. Dies führt im Weiteren dazu, dass sich His51 nach Reduktion vornehmlich auf die negative Seite verlagert. Hierzu verschiebt es sich durchschnittlich um 5,9 Å in Richtung des [2Fe-2S]-Clusters und dreht sich gleichzeitig um 77° (Abb. 4.9.). Diese konformationellen Änderungen des His51 tragen wesentlich zur Verschiebung von Helix $\alpha 3$ bei. Das zuvor von His51 gebundene Ser83 bildet

nun eine neue Wasserstoffbrücke mit dem weitgehend konservierten Rest Thr80. Es befindet sich hier immer eine polare Aminosäure. Dies scheint die Ursache für die Verschiebung von Helix $\alpha 3$ darzustellen, da die Schleife zwischen $\alpha 3$ und dem nachfolgenden Strang $\beta 4$ eine deutlich stärkere Krümmung erfährt und $\alpha 3$ damit nach außen drückt (Abb. 4.9.). Diese

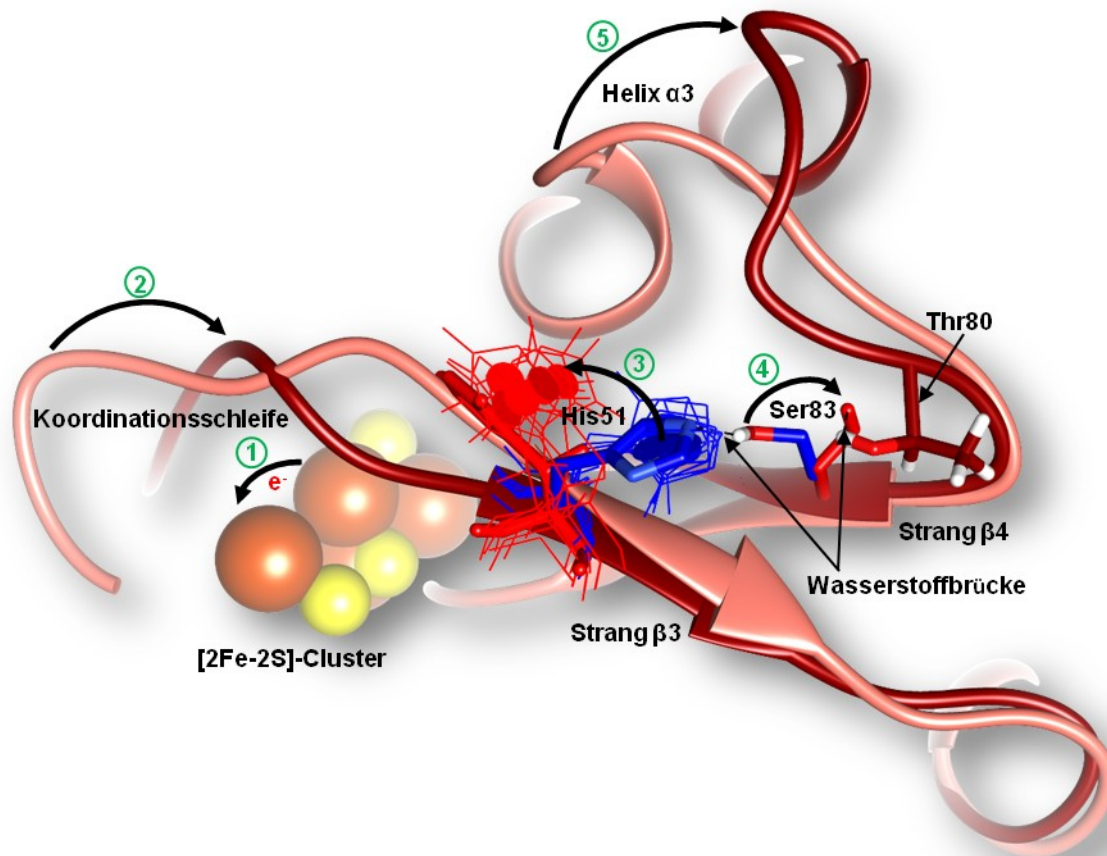



Abb. 4.9.: Reduktion von Yah1 führt zu lokalen Strukturänderungen. Überlagerung der Region mit starken strukturellen Änderungen von Yah1^{ox} (hellrot, blau) und Yah1^{red} (dunkelrot, rot). Durch Reduktion spannt sich zunächst der [2Fe-2S]-Cluster (1). Dies führt zu einer Verschiebung der Koordinationsschleife (2), was strukturelle Änderungen auf Strang $\beta 3$ zur Folge hat. Das auf Strang $\beta 3$ lokalisierte His51 wird dadurch aus dem Wasserstoffbrückenverbund mit Ser83 herausgelöst und neigt sich in Richtung des reduzierten [2Fe-2S]-Clusters (3). Das nun freie Ser83 geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit Thr80 ein (4), was schließlich zu einer Verschiebung von Helix $\alpha 3$ führt (5).

 (vgl. Abb. 3D.6.)

Umstrukturierung der Koordination des [2Fe-2S]-Clusters durch Reduktion und die daraus resultierenden konformationellen Änderungen, im Speziellen die Herauslösung des His51 aus dem Wasserstoffbrückenverbund und die Verschiebung von Helix $\alpha 3$ führen, schließlich zu einer erhöhten Flexibilität des Redoxzentrums von Yah1 und zu einer Verschiebung der intramolekularen Kavitäten. Mit Blick auf den [2Fe-2S]-Cluster und das konservierte His51 konnte festgestellt werden, dass eine direkte räumliche Verbindung nur im Fall des reduzierten Yah1 besteht. Im oxidierten Zustand dagegen verschieben sich diese Kavitäten deutlich, so dass ein direkter Kontakt von His51 mit dem [2Fe-2S]-Cluster nicht mehr möglich ist (Abb. 4.10.). Zusammengefasst erlaubt dies, durch die Öffnung eines „Elektronentunnels“ und die Relokalisierung von His51 einen effizienten Elektronentransport. Dies bestätigt die Hypothese einer essentiellen Funktion des His51 als „Elektronenbrücke“ (Kostic et al., 2003)

und dokumentiert erstmals auch den Elektronentransportweg und die dafür benötigten strukturellen Änderungen in Yah1.

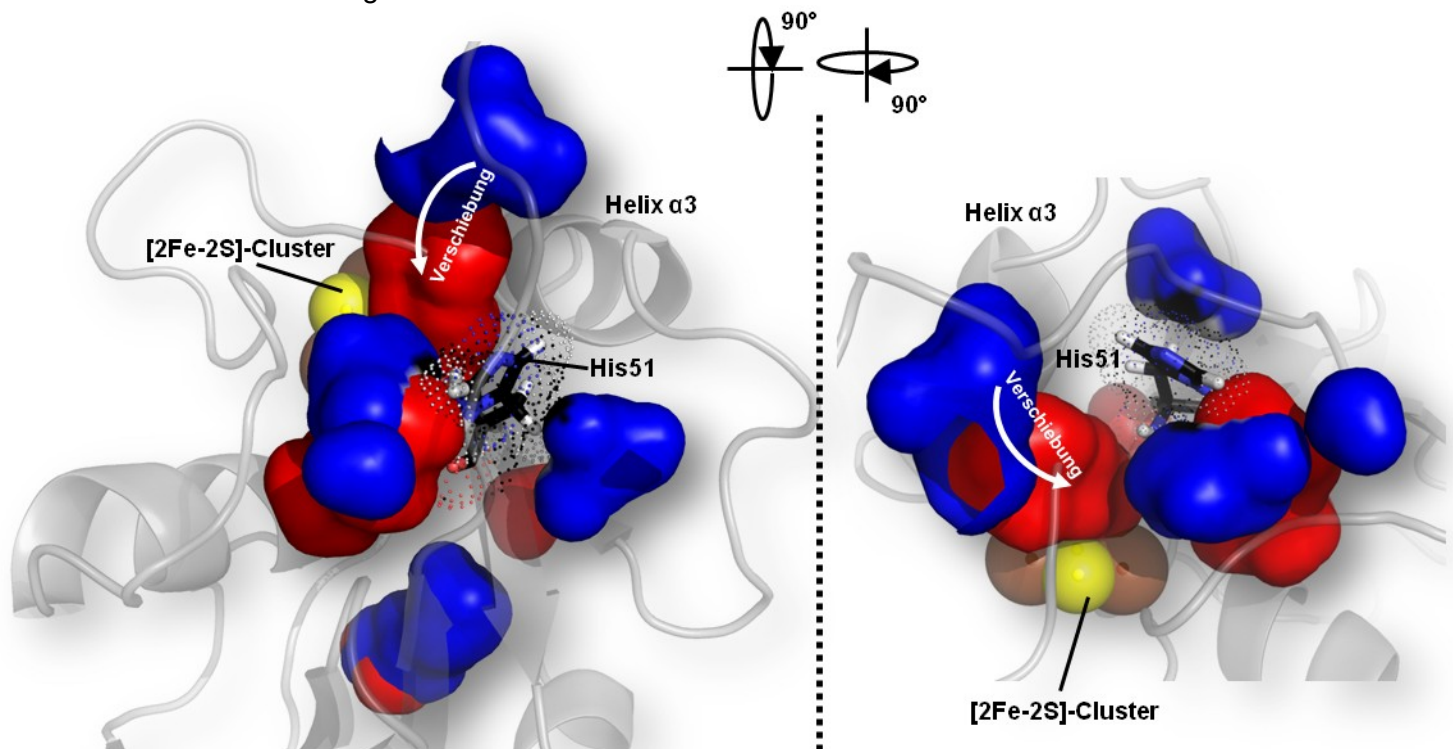


Abb. 4.10.: Verschiebung der Kavitäten innerhalb von Yah1 durch Reduktion. Seitenansicht und Draufsicht auf Yah1 inklusive aller Kavitäten (Yah1^{ox} in blau und Yah1^{red} in rot). Der Großteil aller Kavitäten ist um den [2Fe-2S]-Cluster lokalisiert. Alle Kavitäten verschieben sich durch Reduktion. In der Draufsicht ist zu erkennen, dass zwischen dem [2Fe-2S]-Cluster und His51 nur im reduzierten Zustand eine direkte Verbindung besteht.

4.1.2. Das Gerüstprotein Isu1 ist ein monomeres, gefaltetes Protein

4.1.2.1. NMR Datensammlung und Auswertung

Um die dreidimensionale Struktur des mitochondrialen Gerüstproteins Isu1 von *C. thermophilum* in seiner apo-Form zu lösen, wurde die NMR-Spektroskopie verwendet. Hierzu wurde rekombinant exprimiertes, His-markiertes Isu1 mittels Affinitätschromatographie und Gelfiltration aufgereinigt. (Anhang Abb. A.1.). Wie auch bei der Strukturbestimmung des Hefeferrodoxins Yah1 wurde Isu1 entweder mit ¹⁵N oder mit ¹³C und ¹⁵N markiert (siehe 3.2.4.). Erste Experimente wurden in Anwesenheit des Detergenz Triton X100 durchgeführt. So behandelt zeigte Isu1 während initialer Messungen jedoch ein ¹H-¹⁵N-HSQC Spektrum, welches auf ein größtenteils ungefaltetes und vielleicht oligomerisiertes Protein hindeutete. Neue Messungen ohne Zugabe des Detergenz ergaben ein deutlich besseres ¹H-¹⁵N-HSQC Spektrum, welches auf eine kompakte Faltung von Isu1 in monomerer Form schließen ließ (Abb. 4.11). Nachdem die Qualität von Isu1 damit sichergestellt war, konnten weitere Experimente durchgeführt werden. Zunächst wurde sowohl mit Hilfe eines NOE

Experiments, als auch durch Ermitteln der R1 und R2 Werte bestätigt, dass Isu1 in Lösung gefaltet und als monomeres Protein vorliegt (Abb. 4.11.). Im Anschluss daran wurde die 3-dimensionale Struktur von Isu1 ermittelt. Nach durchgeführten Verfeinerungsschritten konnte eine durchschnittliche Auflösung von $1,04 \pm 0,18 \text{ \AA}$ erzielt werden (Tab. 4.2.).

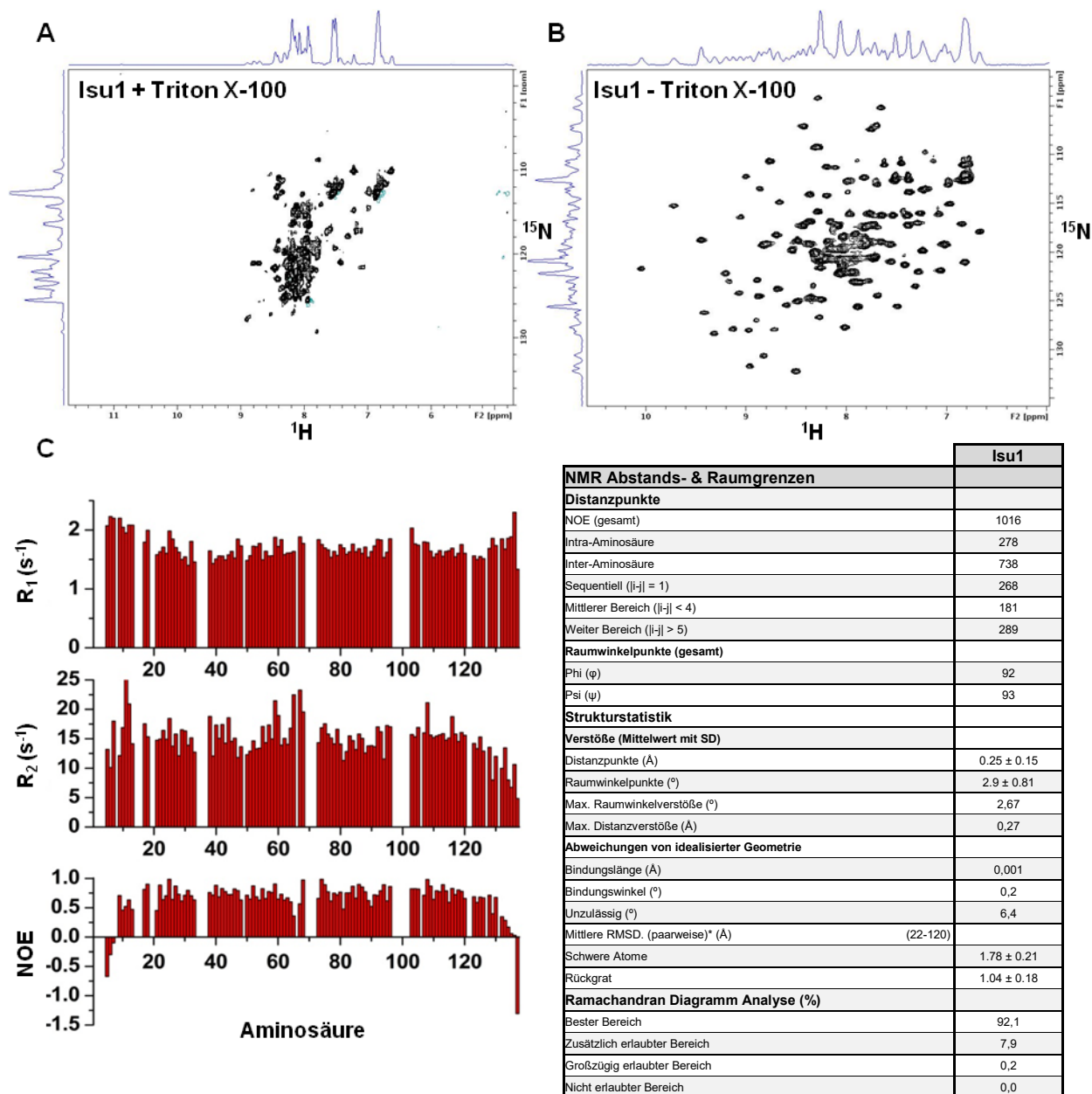


Abb. 4.11.: Primärdaten der NMR-Messungen von Isu1. **A:** ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von Isu1 in Anwesenheit von Triton X-100. Das Spektrum ist typisch für ein ungefaltetes, möglicherweise aggregiertes Protein mit keinerlei Tertiärstruktur. **B:** ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von Isu1 in Abwesenheit von Triton X-100. Das Spektrum ist typisch für ein gefaltetes monomeres Protein. **C:** Mobilitätsuntersuchungen (R_1 , R_2 , NOE) für Isu1. Isu1 ist vollständig gefaltet, lediglich der N-Terminus und die C-terminale His-Markierung sind flexibel (negative NOE).

Tab. 4.2.: NMR Statistik für Isu1. Paarweise RMSD ist auf 20 verfeinerte Strukturen bezogen (*).

4.1.2.2. Strukturbeschreibung

Das Gerüstprotein zeigt als Monomer eine kompakte globuläre Faltung (Tauselrate: $\tau_c = 11,1 \pm 0,8$ ns). Die Kerndomäne besteht aus vier α -Helices und einem dreisträngigen, antiparallelen β -Faltblatt, welche klassisch als „ α - β -Sandwich“ vorliegen. Hierfür bilden die Helices $\alpha 2$ (68-78), $\alpha 3$ (83-87), $\alpha 4$ (92-98) und $\alpha 5$ (110-120) die eine Seite und die Stränge $\beta 1$ (27-33), $\beta 2$ (39-47) und $\beta 3$ (56-64) die andere Seite des „Sandwichs“, wobei nur Helix $\alpha 2$ und $\alpha 5$ direkt an den drei antiparallelen β -Faltblättern angeordnet sind. Helix $\alpha 2$ liegt dabei auf Faltblatt $\beta 1$ und Helix $\alpha 5$ auf Faltblatt $\beta 3$, wohingegen die Helices $\alpha 3$ und $\alpha 4$ auf Helix $\alpha 2$ bzw. Helix $\alpha 5$ zum Liegen kommen. Neben der Kerndomäne liegt eine weitere, N-terminale α -Helix ($\alpha 1$), welche sich durch ihre Lage, Flexibilität, Ausrichtung und Zusammensetzung (alle Helices von Isu1, abgesehen von $\alpha 1$, sind amphipatisch) von den übrigen unterscheidet und nicht mehr als Teil der α - β -Sandwich-Architektur angesehen werden kann (Abb. 4.12.). Diese N-terminale Helix wird durch eine unstrukturierte und hoch flexible

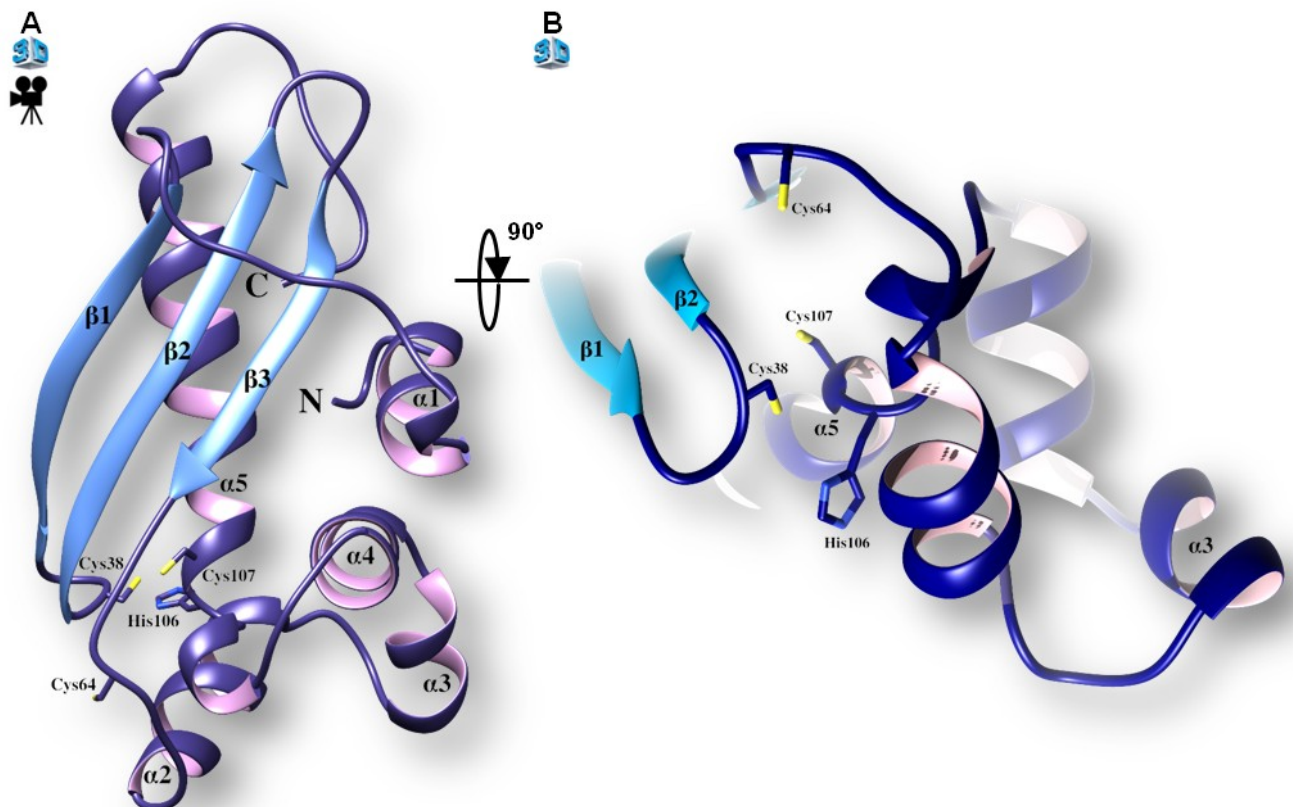


Abb. 4.12.: Die Struktur des Isu1 aus *Chaetomium thermophilum*. **A:** Seitenansicht von Isu1 (β -Stränge in hellblau). Der flexible N-Terminus enthält eine α -helikale Sekundärstruktur. Das aktive Zentrum ist am unteren Ende lokalisiert. (vgl. Vid. 4.) **B:** Das aktive Zentrum von Isu1 befindet sich auf zwei Schleifen und dem Ende einer α -Helix. Cys38 ist zwischen $\beta 1$ und $\beta 2$ und Cys64 zwischen $\beta 3$ und $\alpha 2$ jeweils auf einer Schleife lokalisiert. His 106 und Cys 107 befinden sich am Ende von Helix $\alpha 5$. (vgl. Abb. 3D.7.)

Schleife bis zum äußersten N-Terminus verlängert. Der C-Terminus beinhaltet neben einer kurzen flexiblen Region auch die fusionierte 6xHis-Markierung. Das aktive Zentrum des Proteins besteht aus drei Cystein- und einem Histidin-Rest, welche einen Fe/S-Cluster

koordinieren können (siehe 1.2.5.1.). Cys37 liegt dazu auf der Schleife zwischen $\beta 1$ und $\beta 2$, Cys64 auf der gegenüberliegenden Schleife zwischen $\beta 3$ und $\alpha 2$. Die Seitenketten dieser beiden Reste befinden sich auf der Oberfläche des Proteins und sind gut zugänglich. Der dritte Cys-Rest (Cys107) hingegen liegt am Anfang der längsten Helix $\alpha 4$ direkt hinter dem konservierten His106 und ist größtenteils in einer hydrophoben Umgebung (Lys104, Leu110 und Met41) verborgen (Abb. 4.13.).

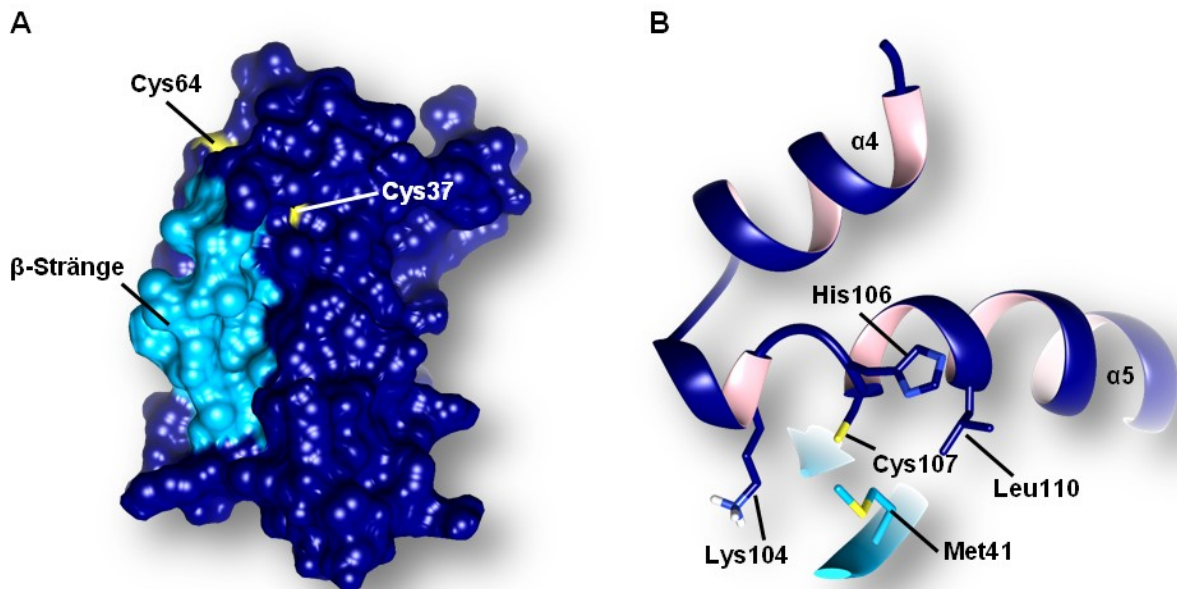


Abb. 4.13.: Lage der konservierten Cysteine von Isu1. **A:** Oberflächendarstellung von Isu1 (β -Stränge in hell-blau). Cys37 und Cys64 sind oberflächenexponiert. His106 und Cys107 sind im Innern des Proteins verborgen. **B:** Cys107 befindet sich in einer hydrophoben Umgebung, welche überwiegend durch Met41, Lys104 und Leu110 gebildet wird.

4.1.2.3. *Isu1* aus *C. thermophilum* ist strukturell konserviert

Um die strukturelle Konservierung der ISC-Gerüstproteine zu zeigen, wurde Isu1 aus *C. thermophilum* mit dem bakteriellen IscU aus *E. coli* und dem bis zu dieser Arbeit einzigen bekannten eukaryotischen Gerüstprotein aus *Mus musculus* (siehe 1.2.5.1.) verglichen. Es zeigte sich neben den bekannten charakteristischen Sequenzhomologien (Anhang Abb. A.3.) nun auch eine starke strukturelle Homologie. Die drei zum Vergleich herangezogenen Gerüstproteine aus Säugetier, niederem Eukaryoten und Bakterium zeigen die charakteristische wohlgefaltete Kerndomäne und einen flexiblen ungefalteten N-Terminus (Abb. 4.14.). Die strukturelle Abweichung (RMSD) des Isu1 aus *C. thermophilum* beträgt verglichen mit IscU aus *E. coli* 1,32Å und mit IscU aus *M. Musculus* 1,23Å. Dies weist damit auf eine nähere Verwandtschaft der beiden eukaryotischen Proteine hin, lässt aber dennoch den Schluss zu, dass auch auf weite evolutionäre Distanzen wenig Varianz innerhalb der Gerüstproteine möglich ist. Mit Blick auf das aktive Zentrum zeigt sich diese Tatsache noch

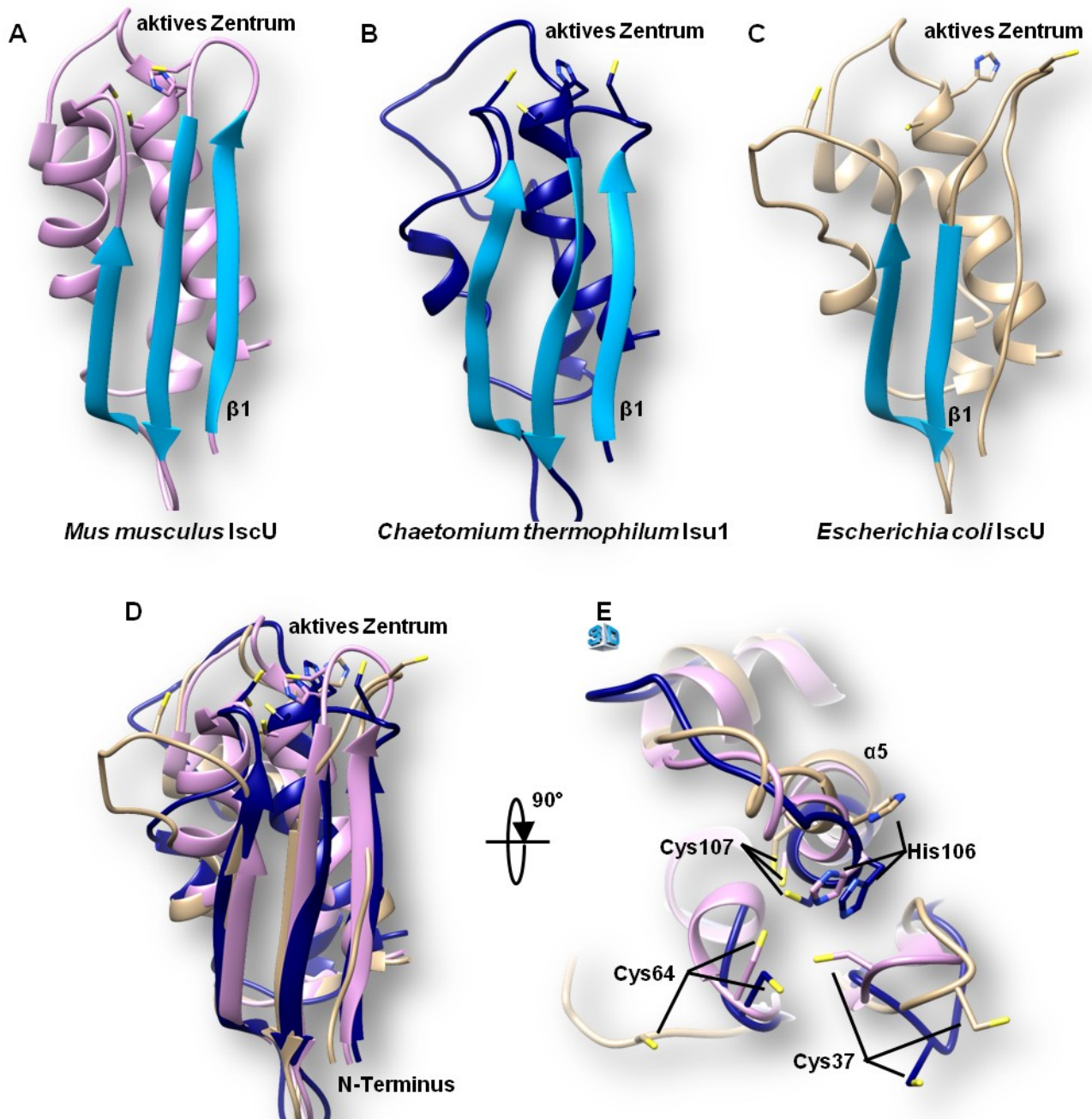


Abb. 4.14.: Vergleich und Überlagerung verschiedener Isu1-Homologe. Die Homologe aus *Mus musculus* (pdb: 1WFZ) (**A**) *Chaetomium thermophilum* (**B**) und *Escherichia coli* (pdb: 2KQK) (**C**) sind in ihrer globalen Struktur sehr ähnlich und besitzen alle das klassische α - β -sandwich Motiv. **D**: Überlagerung der drei Isu1-Homologe (Farbgebung wie in A-C). Die Überlagerung zeigt, dass auch lokal wenige Unterschiede bestehen. Die Faltung ist mit Blick auf die Sekundär- und Tertiärstruktur stark konserviert **E**: Vergleich der aktiven Zentren der drei Isu1-Homologe (Farbgebung wie in A-C). Die Lokalisation der drei essentiellen Cysteine und des konservierten Histidins ist ähnlich. In allen Fällen befinden sich Cys37 und Cys64 jeweils auf einer flexiblen Schleife und Cys107 sowie His106 am Ende von Helix α 5. (vgl. Abb. 3D.8.)

deutlicher (Abb. 4.14.). Die beiden essentiellen Cysteine (Isu1 Cys37 und Cys64) befinden sich jeweils auf einer flexiblen Schleife zwischen β 1 und β 2 bzw. β 3 und α 2. Das dritte essentielle Cystein (Cys107) und das essentielle Histidin (His106) sind dagegen weniger flexibel, daher in ihrer Position noch stärker konserviert. Wie erwartet, bestätigen diese strukturellen Ähnlichkeiten eine mögliche Austauschbarkeit auch über Speziengrenzen hinweg (siehe auch 4.2.).

4.1.3. Yah1 und Isu1 bilden einen heterodimeren Komplex

Der heterodimere Komplex aus dem Ferredoxin Yah1 und dem Gerüstprotein Isu1 ist von zentralem Interesse bei der Aufklärung der molekularen Funktion der frühen ISC-Maschinerie. Um die räumliche Struktur des Komplexes und die Anordnung der einzelnen Monomere auf dem jeweiligen Partner zu bestimmen, wurden NMR Experimente auf der Basis einer Titrationsreihe verwendet (siehe 3.4.2.2.). Hierbei konnten sowohl für Yah1, titriert mit Isu1, als auch für Isu1, titriert mit Yah1, spezifische chemische Verschiebungen innerhalb eines ^1H - ^{15}N -HSQC Spektrums beobachtet werden. Diese chemischen Verschiebungen, welche durch die Interaktion der beiden Partner hervorgerufen wurden, geben einen Hinweis auf die Interaktionsstellen. Mittels weiterführender paramagnetischer NMR-Experimente konnte die genaue Lage von Isu1 auf Yah1 bestimmt werden. Abschließend konnte mit Hilfe von HADDOCK eine Struktur des heterodimeren Komplexes berechnet werden. Die Richtigkeit dieses Komplexes wurde ferner durch SAXS Experimente bestätigt. Somit ergibt sich ein detailreiches Bild der räumlichen Anordnung dieser beiden Proteine zueinander.

4.1.3.1. Die Interaktionsstelle auf Yah1

Zur Bestimmung der Interaktionsstelle von Isu1 auf Yah1 wurde Yah1 mit zunehmenden Konzentrationen von Isu1 titriert. Hierfür wurde die Isu1-Konzentration von 0 bis 2 eq. in Schritten von 0,25 eq. erhöht. Um den möglichen Unterschied zwischen der Interaktion von reduziertem und oxidiertem Yah1 mit Isu1 zu untersuchen, wurden alle Titrationsexperimente mit beiden Redoxzuständen von Yah1 durchgeführt. Bei der Titration von reduziertem Yah1 mit Isu1 konnten bei 1 eq. Isu1 eine vollständige Saturierung der chemischen Verschiebungen erreicht werden (Abb. 4.15. und Anhang Abb. A.4.), wohingegen bei der Titration des oxidierten Yah1 wie erwartet (Webert et al., 2014) keinerlei chemische Verschiebungen detektierbar waren. Dies zeigt auf eindrucksvolle Weise einen beinahe vollständigen Zusammenbruch der Interaktion von oxidiertem Yah1 mit Isu1. Im Gegensatz dazu waren bei der Titration von reduziertem Yah1 mit Isu1 deutliche Verschiebungen innerhalb des ^1H - ^{15}N -HSQC zu erkennen. Nach Analyse der entstandenen Änderungen fiel auf, dass neben neuen chemischen Verschiebungen auch die bereits aus der Bestimmung der Struktur von Yah1 in oxidiertem und reduziertem Zustand bekannten Verschiebungen zwischen den ^1H - ^{15}N -HSQC -Spektren der beiden Redoxzustände (vgl. Abb.4.1. und Abb.4.15.) zu erkennen waren. Dies führte zu der Erkenntnis, dass Yah1 durch Zugabe von Isu1 von seinem reduzierten Zustand langsam in seinen oxidierten Zustand übergeht. Dies hatte zur Folge, dass die Auswertung der ^1H - ^{15}N -HSQC Spektren der Titrationsreihe nicht direkt möglich war. Um eine sinnvolle Auswertung zu erreichen, mussten zunächst alle chemischen Verschiebungen, die aus einer Oxidation des Yah1 herrührten, durch

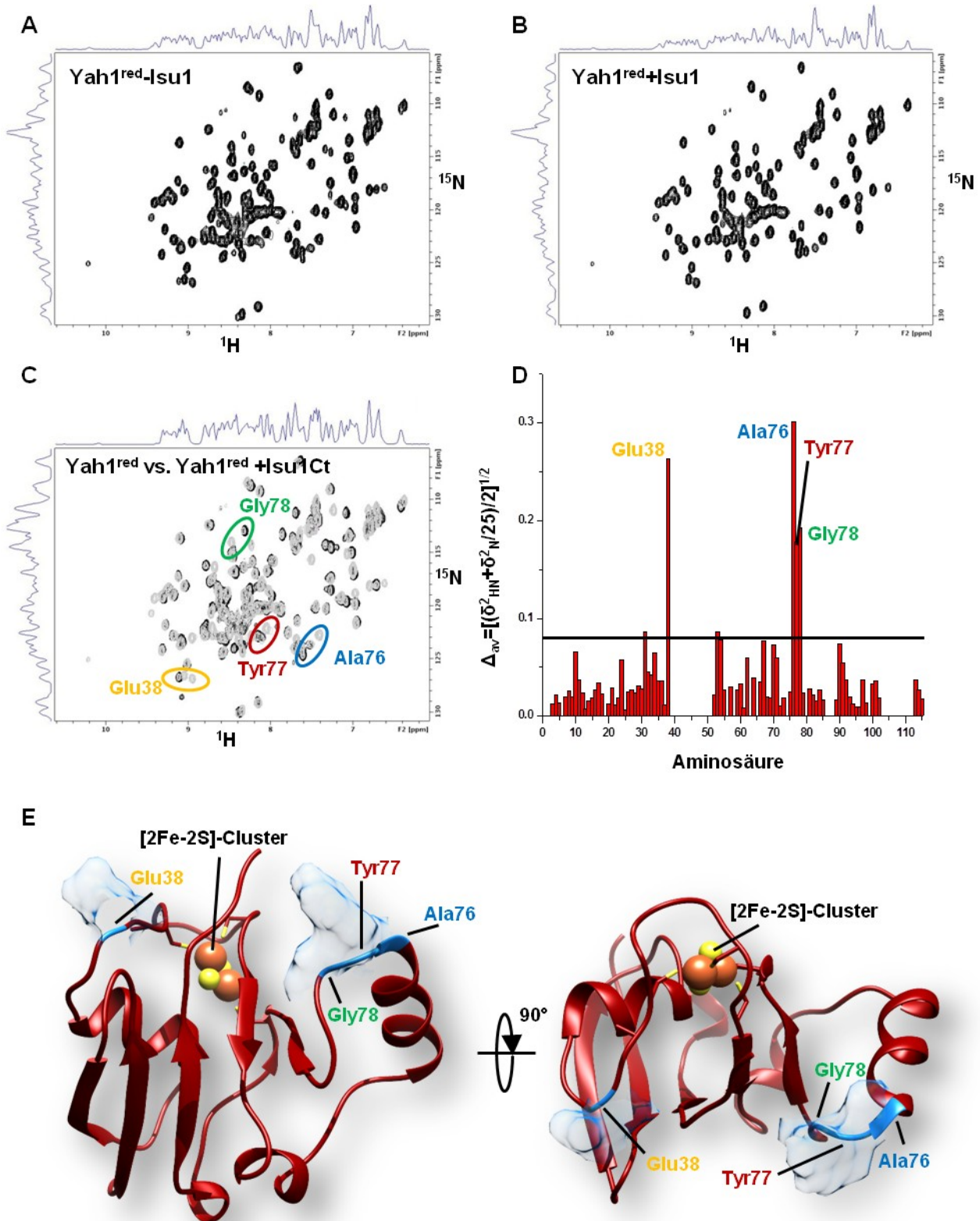


Abb. 4.15.: Potentielle Interaktionsstellen von Isu1 auf Yah1. **A-B:** ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von reduziertem Yah1 alleine und reduziertem Yah1 mit einem Äquivalent Isu1. **C:** Überlagerung der beiden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren (schwarz: Yah1^{red} alleine, grau Yah1^{red}+Isu1). Markiert sind die chemischen Verschiebungen der Aminosäuren, welche ausschließlich auf die Interaktion mit Isu1 zurückgehen. **D:** Balkendiagramm der chemischen Verschiebung. Deutlich oberhalb des Schwellenwertes liegen vier definierte Aminosäuren: Glu38 (gelb), Ala76 (blau), Tyr77 (rot) und Gly78 (grün), welche die potentiellen Interaktionsstellen repräsentieren. **E:** Seitenansicht von hinten und Draufsicht auf Yah1 mit den potentiellen Interaktionsstellen in blau. Sie sind alle auf der Ober- bzw. Rückseite lokalisiert.

Subtraktion des ^1H - ^{15}N -HSQC Spektrums des oxidierten Yah1 aufgespürt und subtrahiert werden. Des Weiteren beinhaltet die Tatsache der Oxidation von Yah1 zusätzlich das

Problem der schwindenden Interaktion mit Isu1. Da Yah1 mit Isu1 nur in seinem reduzierten Zustand stark interagiert, mussten alle Messungen möglichst schnell unter kategorischem Sauerstoffausschluss und Argonatmosphäre durchgeführt werden. Die dennoch auftretende Oxidation von Yah1 wurde entsprechend der Stärke der chemischen Verschiebungen in Konzentration von Yah1 umgerechnet und von dem insgesamt enthaltenen Yah1 abgezogen, um schließlich die Konzentration des interaktionsfähigen reduzierten Yah1 zu erhalten. Durch Anwendung dieser Korrekturen konnten schließlich mindestens vier Aminosäuren mit starken chemischen Verschiebungen bestimmt werden (Abb. 4.15.). Diese Erkenntnisse wurden schließlich auf die zuvor bestimmte Struktur des Yah1 übertragen. Alle vier Aminosäuren, welche eine starke Verschiebung innerhalb des ^1H - ^{15}N -HSQC Spektrums zeigten, befinden sich interessanterweise auf der tendenziell positiv geladenen Seite des Yah1. Hier bildet Glu38, welches bei physiologischem pH deprotoniert vorliegt, als negativ geladene Aminosäure eine Ausnahme. Tyr77 als einzige aromatische Aminosäure mit chemischer Verschiebung stellt neben Glu38 die zweite polare, jedoch in diesem Fall ungeladene Aminosäure dar. Diesen gegenüber stehen die beiden sehr kleinen, unpolaren Aminosäuren Ala76 und Gly78. Das konservierte AYG-Motiv liegt auf Helix α_3 und der darauffolgenden Schleife, wohingegen das konservierte Glu38 schon auf der Koordinationsschleife nach Strang β_1 lokalisiert ist. In der Draufsicht ist gut zu erkennen, dass diese vier Aminosäuren durch ihre Anordnung eine Art „Klammer“ bilden, welche einen potentiellen Interaktionspartner von zwei Seiten binden können (Abb. 4.15.).

4.1.3.2. Die Interaktionsstelle auf Isu1

Um schließlich die räumliche Ausdehnung des Komplexes aus Yah1 und Isu1 detailliert darstellen zu können, musste zunächst auch die Interaktionsstelle von Yah1 auf Isu1 bestimmt werden. Hierzu wurde eine Titrationsreihe erstellt und das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von einfach ^{15}N markiertem Isu1 zusammen mit steigenden Konzentrationen sowohl von oxidiertem, als auch von reduziertem Yah1 aufgezeichnet. Hierzu wurde die Yah1 Konzentration in Schritten von 0,25 eq. von 0 bis 2 eq. erhöht. Bis zu einer 1:1 Mischung von reduziertem Yah1 und Isu1 konnte eine steigende Anzahl an chemischen Verschiebungen beobachtet werden, wohingegen bei der Zugabe von oxidiertem Yah1 keinerlei spektrale Veränderung stattfand. Bei höheren Mischungsverhältnissen über 1:1 mit reduziertem Yah1 konnten keine Verstärkungen oder gar weitere Verschiebungen detektiert werden (Abb. 4.16. und Anhang Abb. A.4.). Somit ergibt sich auch hier eine 1:1 Stöchiometrie des Komplexes aus reduziertem Yah1 und Isu1, was die Taumelrate: $\tau_c = 19,1 \pm 1,8$ ns bestätigte. Um die Interaktionsstelle von reduziertem Yah1 auf Isu1 genauer zu charakterisieren, wurden die Aminosäuren, welche eine durch die Interaktion mit Yah1 hervorgerufene chemische Verschiebung zeigten, bestimmt. Im Detail handelt es sich um folgende Aminosäuren: 38-42,

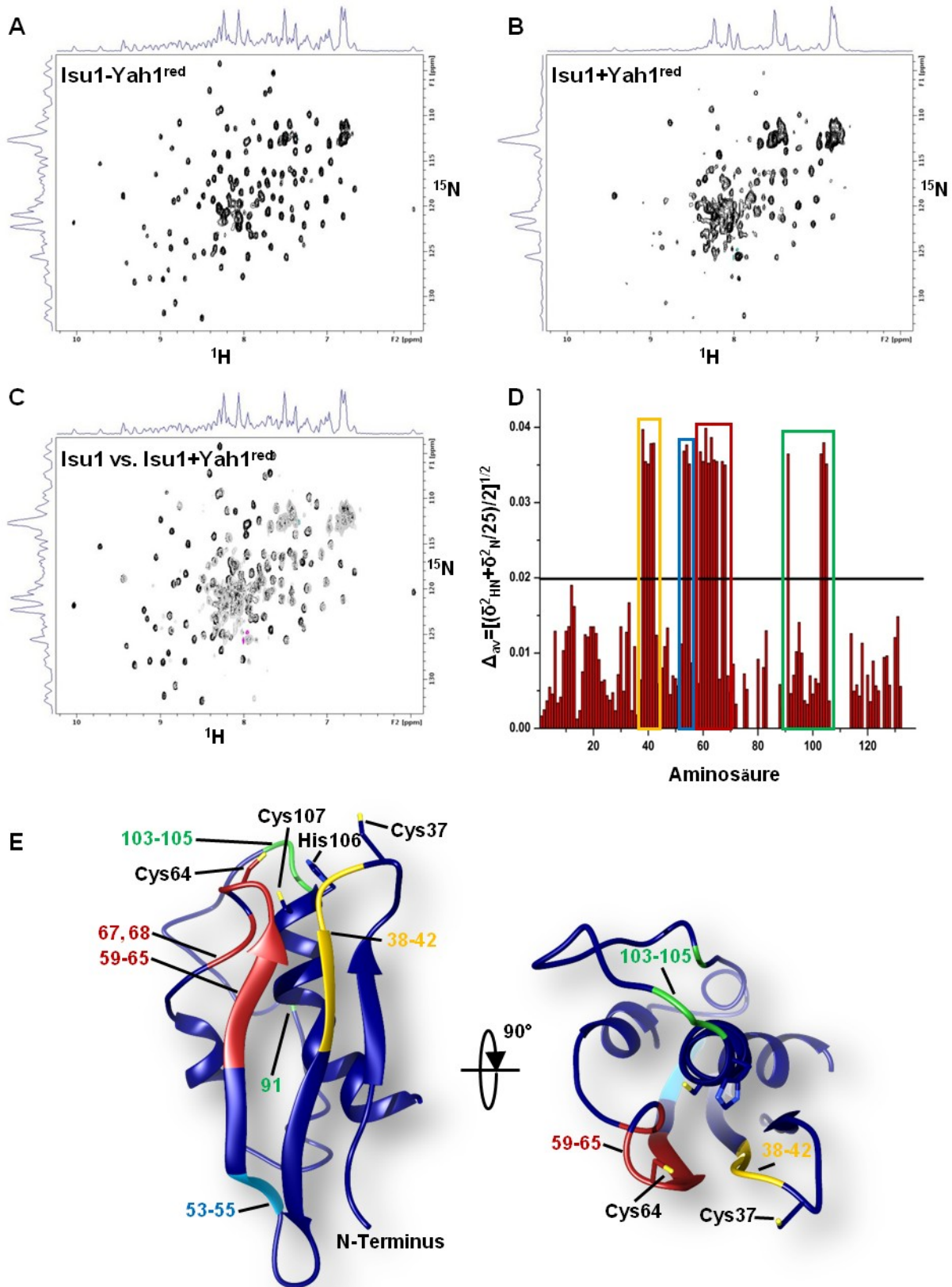


Abb. 4.16.: Potentielle Interaktionsstellen von Yah1 auf Isu1. **A-B:** ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Isu1 alleine und Isu1 mit einem Äquivalent reduziertem Yah1. **C:** Überlagerung der beiden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren (schwarz: Isu1 alleine, grau Isu1+Yah1^{red}). Deutlich zu erkennen sind die starken Veränderungen innerhalb des Spektrums. **D:** Balkendiagramm der chemischen Verschiebungen von Isu1 durch Interaktion mit Yah1^{red}. Oberhalb des Schwellenwertes liegen vier Regionen, welche eine Umgebungsveränderung erfahren. **E:** Seitenansicht und Draufsicht auf Isu1 mit den potentiellen Interaktionsstellen in rot und gelb. Sie sind auf den Strängen β_2 und β_3 lokalisiert. Die übrigen Regionen mit chemischen Verschiebungen (grün und blau) stellen sekundäre Verschiebungen dar.

53-55, 59-65, 67, 68, 91 und 103-105 (Abb. 4.16). Der Großteil dieser Aminosäuren liegt konzentriert auf den β -Strängen β_2 und β_3 des α - β -Sandwichs vor (38-42 bzw. 59-64). Damit befindet sich die Bindungsstelle von Yah1 genau auf der Übergangszone zwischen dem positiv und dem negativ geladenen Areal des Isu1, sehr nahe am aktiven Zentrum und beinhaltet das konservierte Cys64. Die Reste 53-55, 91 sowie 103-105 sind von Seiten des β -Faltblatts nicht direkt erreichbar. Sie sind jedoch über intramolekulare Verbrückungen mit den Resten des β -Faltblatts verbunden. Da chemische Verschiebungen von Aminosäuren generell keine direkte Identifizierung als Interaktionsstelle zulassen, sondern vielmehr solche Aminosäuren detektiert werden, welche auf Grund der Interaktion eine Änderung in ihrer Umgebung und damit ihrer Resonanzen erfahren, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den chemischen Verschiebungen dieser Aminosäuren um Sekundäreffekte handelt. So wurden diese Reste in der weiteren Analyse nicht als Interaktionsstellen behandelt.

4.1.3.3. Beschreibung des Yah1-Isu1 Komplexes

Um schließlich die Komplexstruktur des homodimeren Komplexes aus Yah1 und Isu1 zu bestimmen, wurden die erhaltenen Daten zu einer datengestützten HADDOCK-Modellierung verwendet. Es wurde eine Hauptgruppe, bestehend aus 156 von 200 initialen Komplexen, erhalten. Die Gruppe hat eine durchschnittliche Rückgrat-RMSD von $0,8 \pm 0,5 \text{ \AA}$ innerhalb des strukturierten Bereichs (Abb. 4.17.). Das Ferredoxin Yah1 kommt seitlich auf zwei der drei β -Stränge und teilweise auf Helix α_5 von Isu1 zum Liegen. Dies führt zu einer räumlichen Nähe des $[2\text{Fe-2S}]$ -Clusters des Ferredoxins zum aktiven Zentrum des Isu1. Die Schleife zwischen den Isu1-Strängen β_1 und β_2 , auf der das konservierte Cystein Cys37 lokalisiert ist, dringt dabei tief in das Zentrum von Yah1 ein (Abb. 4.17.). Dies führt dazu, dass die Interaktionsfläche der beiden Proteine verhältnismäßig groß ist ($1614 \pm 28 \text{ \AA}^2$), was wiederum eine starke Oberflächenkomplementarität vermuten lässt (Abb. 4.17.). Die Basis dieser Interaktion bildet eine Gruppe basischer Aminosäurereste (Lysine und Arginine) auf Isu1, welche mit einer sauren Region auf Yah1 interagiert. Dies deutet darauf hin, dass die treibende Kraft der Komplexbildung elektrostatische Wechselwirkungen sind und so die vornehmliche Bindung von reduziertem Yah1 erklärt werden kann. Das globale Aussehen des Yah1-Isu1-Komplexes und die Stöchiometrie wurden mit Hilfe von „SAXS“ weiter verifiziert. Wie erwartet zeigten die erhaltenen Daten eine heterodimere Konfiguration (Abb. 4.18.) und bestätigten die NMR-basierten Hinweise auf eine 1:1 Stöchiometrie. Experimentell wurde ein I_0 von 25,22 bestimmt, wobei bei einem Komplex aus Yah1 und Isu1 ein I_0 von 28,26 erwartet war. Diese Diskrepanz ist auf die His-Markierung zurückzuführen, welcher aufgrund seiner Flexibilität in die I_0 Berechnung nicht einfließt. Mit Blick auf die Paarverteilungsfunktion lässt sich weiter auf eine dimere Konfiguration schließen, was bei der Berechnung der globalen Struktur mittels DAMMIN berücksichtigt wurde. Die globale

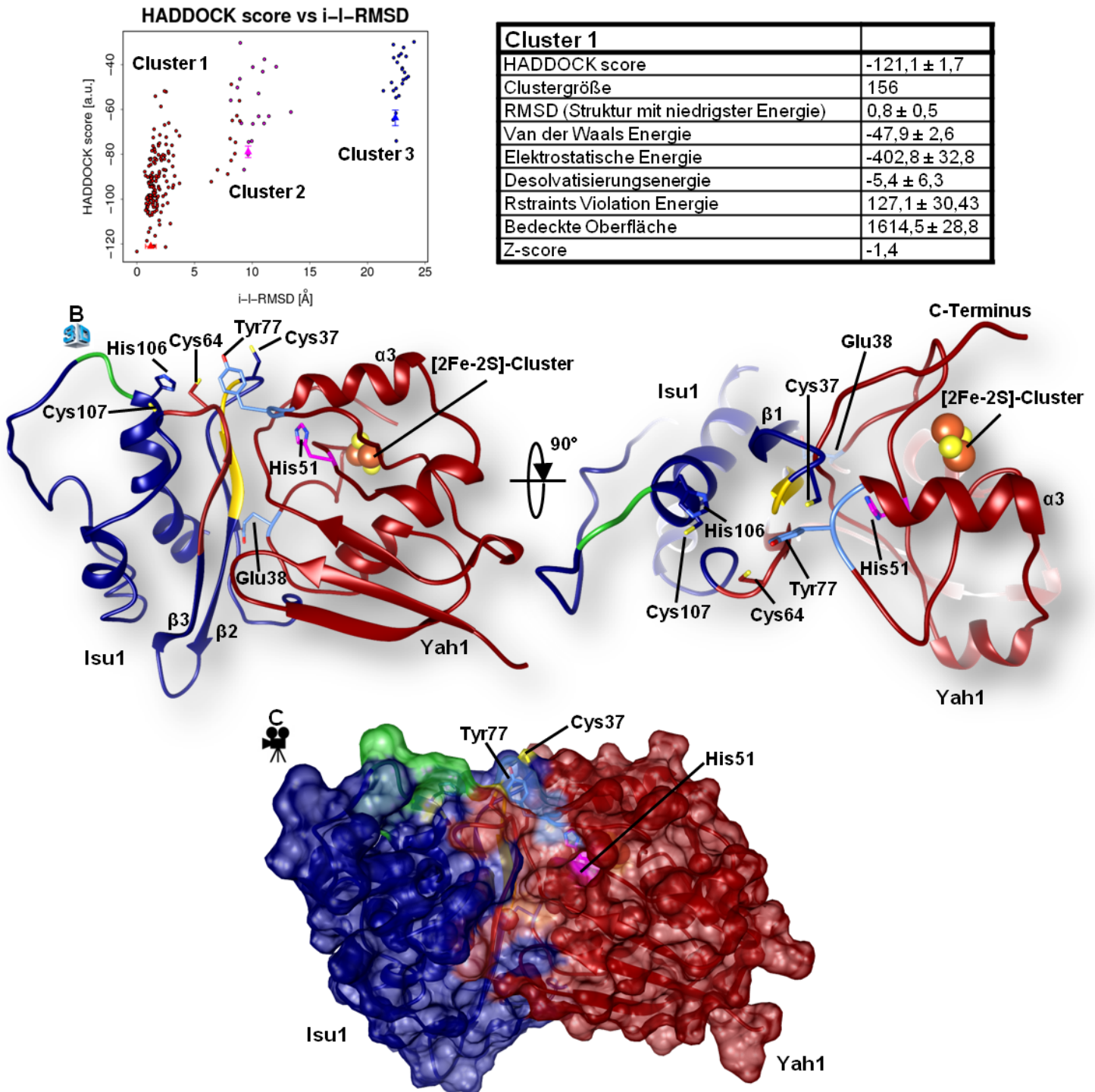


Abb. 4.17.: HADDOCK-Statistik und Struktur des Heterodimers aus Yah1 und Isu1. A: Diagramm des HADDOCK Scores gegen die durchschnittliche RMSD der 200 berechneten Komplexstrukturen aus Yah1 und Isu1. Cluster 1 beinhaltet 156 von 200 Komplexstrukturen mit einer RMSD zwischen 0 und 4 Å. Die Tabelle zeigt alle auswertungsrelevanten Daten der HADDOCK-Berechnung. Die durchschnittliche RMSD beträgt $0,8 \pm 0,5$ Å, wobei die bedeckte Oberfläche $1614,5 \pm 28,8$ Å² beträgt. Alle relevanten Energien befinden sich stark im negativen Bereich, was einen negativen Z-score von -1,4 liefert. **B:** Seitenansicht und Draufsicht auf den Heterodimer aus Yah1 und Isu1. Die zuvor bestimmten Interaktionsstellen von Yah1 (hellblau) und Isu1 (gelb und rot) befinden sich in räumlicher Nähe zueinander. Das aktive Zentrum (im speziellen Cys37 und Cys64) von Isu1 ist nahe beim konservierten His51 und dem [2Fe-2S]-Cluster von Yah1 lokalisiert. (vgl. Abb. 3D.9.) **C:** Oberflächenmodell von Yah1/Isu1. Die beiden Proteine haben eine große Oberflächenkomplementarität. Sowohl Cys37 und Cys64 von Isu1 als auch Tyr77 von Yah1 sind weiterhin oberflächenexponiert. Somit sind diese auch im Komplex zugänglich. (vgl. Vid. 5.)

Ausdehnung des heterodimeren Komplexes, wie er auf Basis dieser Daten berechnet werden kann, stimmt mit den NMR basierten Berechnungen überein (Abb. 4.18.). Somit kann die hier präsentierte Struktur des essentiellen heterodimeren Komplexes aus dem Gerüstproteins Isu1 und dem Ferredoxin Yah1 als gesichert angesehen werden.

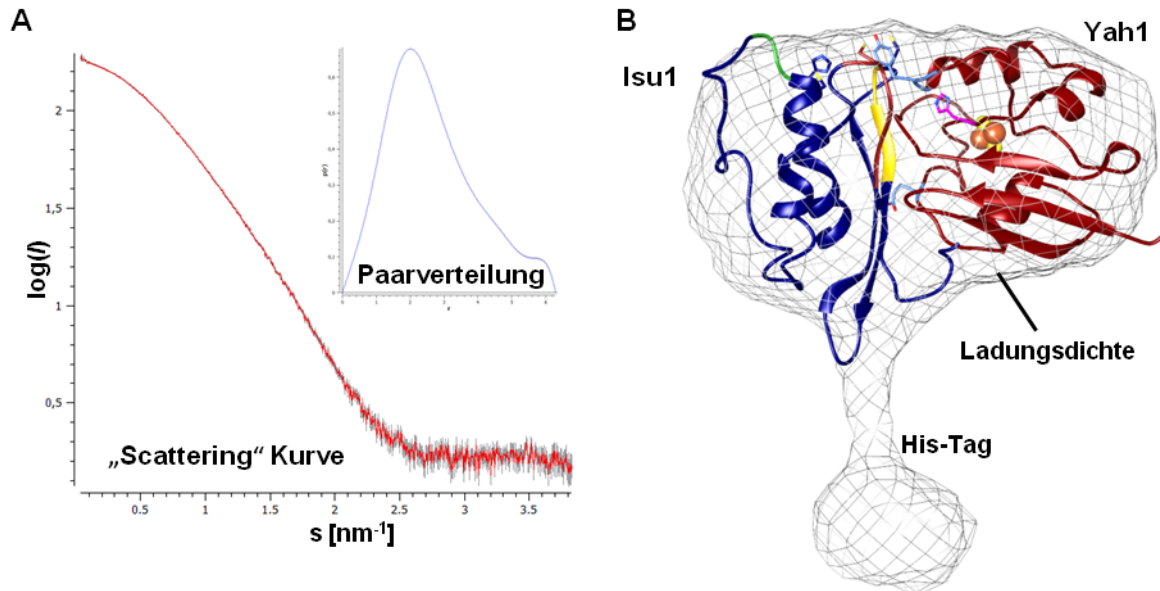


Abb. 4.18.: Analyse des Heterodimers aus Yah1 und Isu1 mittels SAXS. **A:** Scattering Kurve und Paarverteilungsfunktion des Heterodimers aus Yah1 und Isu1. Die Scatteringkurve zeigt keinerlei Degradation im Bereich der kleinen Winkel. Die Paarverteilungsfunktion zeigt eine Form klassisch für einen dimeren Komplex, welcher an der Longitudinalachse interagiert. **B:** Die mittels SAXS bestimmte Ladungsdichte zeichnet die Umrisse des berechneten Komplexes aus Yah1 und Isu1 nach. Der His-Tag an Isu1 ist im Falle der HADDOCK-Berechnung nicht anwesend, weshalb er in der eingepassten Struktur fehlt (experimentelles $l_0 = 28,26$; erwartet: 25,22 für den Komplex aus beiden Proteinen ohne His-Tag).

4.1.4. Der Komplex aus Yah1 und Isu1 ist Teil der frühen ISC-Maschinerie

Es konnte gezeigt werden, dass die physikalische Interaktion von Yah1 und Isu1 auch physiologische Relevanz hat. Hierzu wurde ein CD basiertes Testverfahren verwendet, welches die Verfolgung der Bildung eines Fe/S-Clusters auf Isu1 erlaubt (Webert et al., 2014). Hierbei konnte das künstliche Reduktionsmittel DTT vollständig durch die Elektronentransportkette aus dem Ferredoxin Yah1 und seiner Reduktase ersetzt werden. Dieser Umstand spricht für eine Beteiligung von Yah1 als „Elektronenlieferant“ in der frühen ISC-Maschinerie. Um diese Platzierung nun zu bestätigen und weiterführende mechanistische Einblicke in die Funktion der frühen ISC-Maschinerie zu erhalten, wurden *in-vitro*-Studien der Interaktionen aller primären Komponenten der frühen ISC-Maschinerie mittels Thermophorese durchgeführt. Hierzu wurden alle benötigten Proteine mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie aufgereinigt (siehe 3.2.4. und Anhang Abb. A.1.).

4.1.4.1. *Isu1* interagiert mit *Yah1*, *Yfh1* und *Nfs1* in vitro

Als erstes wurden die Interaktionen aller frühen ISC-Komponenten mit dem Gerüstprotein *Isu1* bestimmt (Abb. 4.19). Hierbei konnte zunächst bestätigt werden, dass die Bindung von *Isu1* zu *Yah1* durch Reduktion des Ferredoxins signifikant um den Faktor 100 verbessert wurde. Die Dissoziationskonstante des *Yah1/Isu1* Komplexes wurde im reduzierten Zustand auf $25,6 \pm 2,3$ nM und im oxidierten Zustand auf 2460 ± 314 nM bestimmt. Diese Daten stimmen mit den Beobachtungen mittels NMR überein und bestätigen einen redoxregulierten Interaktionsmechanismus. Solch ein redoxabhängiger Mechanismus lässt in diesem Fall direkt auf einen Elektronentransport schließen, da, wie zuvor erwähnt, das artifizielle Reduktionsmittel DTT durch reduziertes Ferredoxin (bzw. durch das Elektronentransfersystem $\text{FdxR} \rightarrow \text{Fdx} \rightarrow$) ersetzt werden kann. Um ein abschließendes Bild der Interaktionskarte von *Isu1* als Teil der frühen ISC-Maschinerie zu erhalten, wurden auch die Bindungen zu den übrigen bekannten frühen ISC Komponenten, namentlich dem Desulfurasekomplex *Nfs1/Isd11* und dem Frataxin-Homolog der Hefe (*Yfh1*), bestimmt. Interessanterweise war eine Bindung von *Nfs1/Isd11* an *Isu1* nur in Anwesenheit von Cystein nachzuweisen. Hier lag die Dissoziationskonstante im Bereich der Interaktion von *Isu1* mit *Yah1* (177 ± 37 nM), wohingegen ohne Cystein im Reaktionsansatz keinerlei Bindung gemessen werden konnte. Dies legt nahe, dass *Nfs1/Isd11* durch Bindung von Cystein im aktiven Zentrum eine konformationelle Änderung auch in den äußeren Schichten durchmacht, wodurch eine Bindung von *Isu1* erst ermöglicht wird. Dies wurde im Ansatz bereits auf Basis des bakteriellen Systems beschrieben (Prischi et al., 2010b). Die Analyse der Bindung von *Yfh1* zu *Isu1* ergab eine Dissoziationskonstante von 1403 ± 173 nM. Um schließlich der Frage nachzugehen, ob sich die Bindungen von *Yah1* und *Yfh1* gegenseitig ausschließen, wurde eine komplexere Form der Interaktionsanalyse per Thermophorese angewendet. Hierfür wurde markiertes *Isu1* mit reduziertem *Yah1* vorinkubiert, um so einen Heterodimer zu generieren. Dieser Heterodimer wurde im Anschluss mit *Yfh1* titriert, um eine Dissoziationskonstante für den Komplex aus Heterodimer (*Isu1/Yah1*) und *Yfh1* bestimmen zu können. Durch die ungleich stärkere Affinität von reduziertem *Yah1* zu *Isu1*, verglichen mit *Yfh1* zu *Isu1* und *Yfh1* zu reduziertem *Yah1* ($25,6:1403:295$ nM (vgl. Abb. 4.20.)), lassen sich diese Messungen trotz hoher Komplexität des Systems auf traditionelle Weise auswerten. Die K_d für die Interaktion des Komplexes *Isu1/Yah1* mit *Yfh1* wurde mit 256 ± 46 nM bestimmt. Überraschenderweise weist diese K_d auf eine deutlich bessere Interaktion des *Yfh1* mit dem heterodimeren *Isu1/Yah1* als mit *Isu1* alleine hin. Damit konnte gezeigt werden, dass sich die Bindungen von *Yah1* und *Yfh1* im eukaryotischen System in Bezug auf *Isu1* nicht gegenseitig ausschließen, wie es für das bakterielle System vorgeschlagen wurde (Yan et al., 2013), sondern synergistisch zu einer gesteigerten Affinität führen. Die Interaktionen von *Isu1* lassen sich also wie folgt zusammenfassen. *Isu1* interagiert mit allen

A

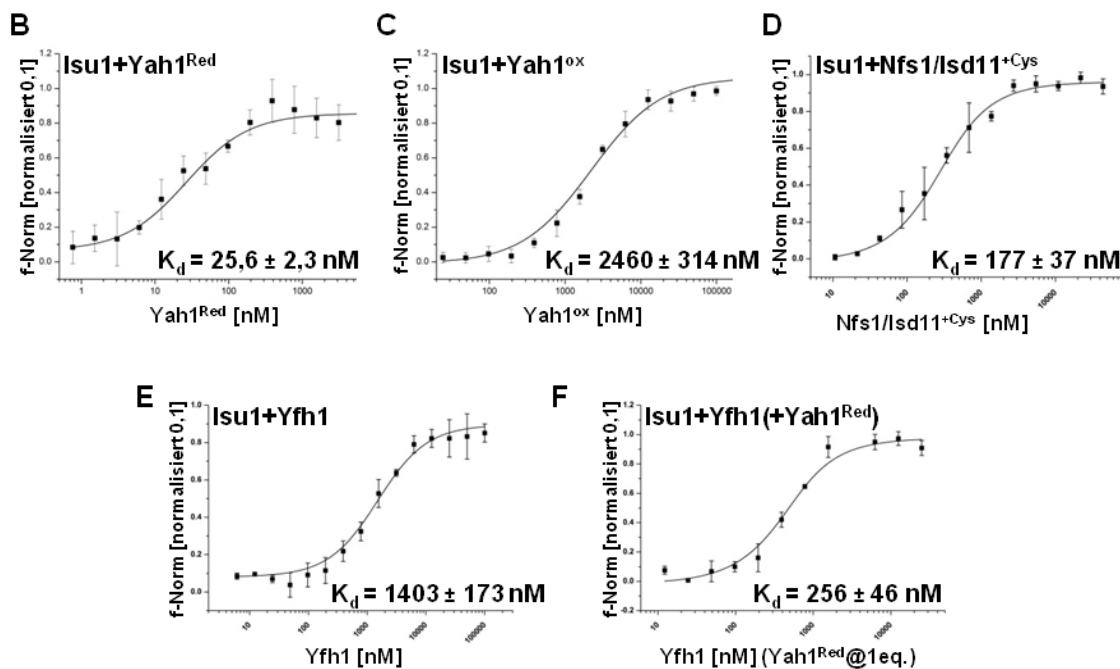
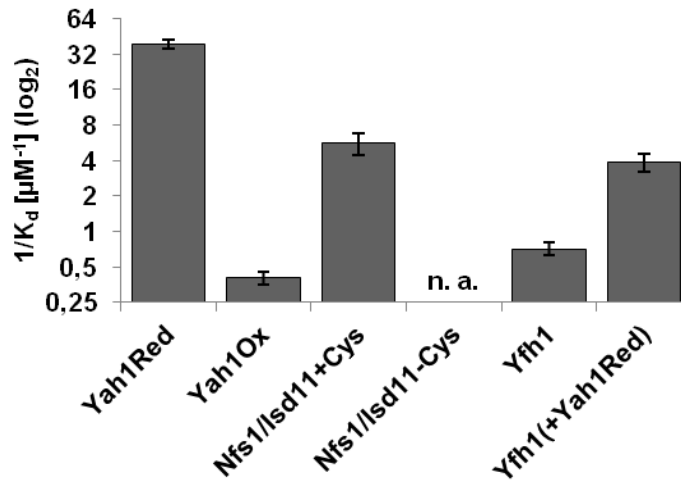


Abb. 4.19.: Interaktionen von Isu1 mit den primären ISC-Faktoren. **A:** Balkendiagramm der Interaktionen von Isu1 mit der entsprechenden Komponente. Werte repräsentieren den Kehrwert der K_d und sind logarithmisch (\log_2) skaliert. Die stärkste Interaktion zeigt reduziertes Yah1, wohingegen oxidiertes Yah1 nur sehr schwach interagiert. Nfs1/Isd11 interagiert nur in Anwesenheit von Cystein. Yfh1 interagiert deutlich besser, wenn Isu1 mit reduziertem Yah1 vorinkubiert wurde. **B-F:** Originaldaten (Punktdiagramme) und sigmoidales Fitting (Kurvendiagramm) der einzelnen Messungen. Alle K_d -Werte sind mit Standardabweichung angegeben. Originaldaten für Nfs1/Isd11-Cys siehe Anhang (Abb. A.5.). (n. a.: nicht auswertbar)

primären Komponenten der frühen ISC-Maschinerie. Mit Yah1 jedoch nur, wenn dieses reduziert ist und mit Nfs1/Isd11 nur unter Zugabe von Cystein. Das Frataxin-Homolog der Hefe Yfh1 bindet, verglichen mit der Bindung von reduziertem Yah1 und Nfs1/Isd11 tendenziell schwächer, jedoch liegt die entsprechende Dissoziationskonstante noch in einem physiologisch relevanten Bereich. Die Bindung kann weiter durch Zugabe von Yah1 und damit einhergehender Bildung des Isu1/Yah1-Komplexes deutlich verbessert werden, was erstens eine Konkurrenz von Yah1 und Yfh1 unwahrscheinlich macht und zweitens auf eine gleichzeitige Wirkung dieser drei Proteine in Verbindung mit Nfs1/Isd11 hindeutet. Dieses

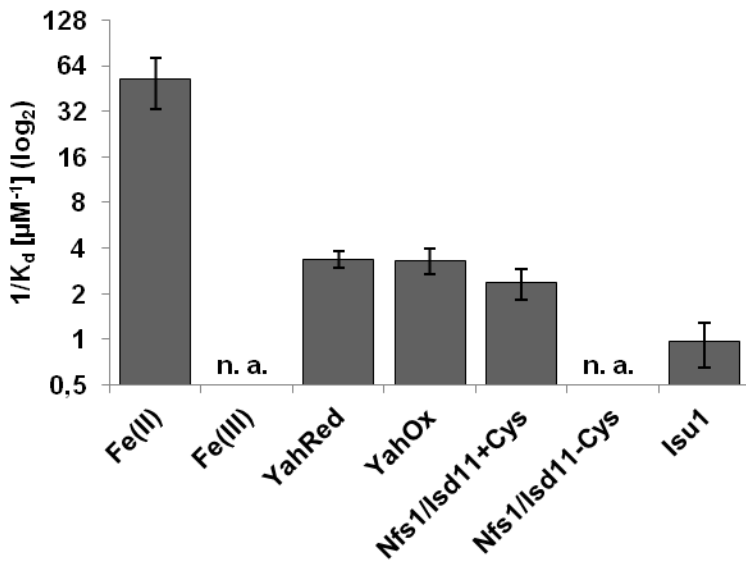
Ergebnis bestätigt die substanzielle Rolle von Isu1 als eine zentrale Komponente der frühen ISC-Maschinerie und damit der gesamten Fe/S-Cluster Biogenese.

4.1.4.2. Frataxin interagiert mit Isu1, Yah1 und Nfs1 und bindet Fe(II) in vitro

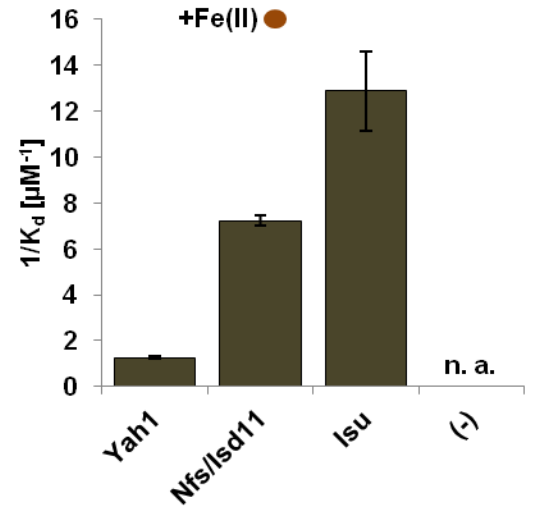
Die Rolle des Frataxin-Homologs in Hefe (Yfh1) innerhalb der Fe/S-Cluster Biogenese ist weitgehend unbekannt, es wird jedoch vermutet, dass es eine Rolle bei der Bereitstellung von Eisen und/oder bei der Übertragung des Schwefels von Nfs1/Isd11 auf Isu1 spielt (siehe 1.2.5.2.). Um eine mögliche Rolle als Eisendonator weiter zu untersuchen, wurden *in-vitro*-Interaktionsstudien für Yfh1 mit dem Fokus auf die Komponenten der frühen ISC-Maschinerie durchgeführt (Abb. 4.20). Es konnte eine hohe Affinität von Yfh1 zu reduziertem Eisen (Fe(II)) im Bereich von $19 \pm 6,2$ nM gezeigt werden. Die Dissoziationskonstante in Bezug auf Eisen in seiner oxidierten Form (Fe(III)) konnte nicht bestimmt werden, da Yfh1 in Verbindung mit Fe(III) stark zur Aggregation neigt (Abb. 4.20.). Dies entspricht den Erwartungen, da in der mitochondriellen Matrix reduzierende Bedingungen (Redoxpotential: -360 mV) vorherrschen (Hu et al., 2008) und Eisen, welches als Fe(II) importiert wird (Lange et al., 1999), vermutlich nicht oxidiert wird. Damit hat eine Bindung von Fe(III) mit anschließender Aggregation von Yfh1 sehr wahrscheinlich keine physiologische Relevanz (Aloria et al., 2004). Die Bindung von Fe(II) dagegen scheint spezifisch zu sein. Die erhaltenen Titrationskurven beinhalten keinerlei Unregelmäßigkeiten, was darauf hinweist, dass hier im Hinblick auf Stöchiometrie und Bindungsstelle eine einzige spezifische Interaktion stattfindet. Um diese Eisenbindung in den Kontext zur frühen ISC-Maschinerie zu bringen, wurden die Dissoziationskonstanten von Yfh1 mit den übrigen primären ISC-Faktoren sowohl für *holo*-Yfh1 als auch für *apo*-Yfh1 bestimmt. Die Bindung zu Nfs1/Isd11 ist wiederum, wie im Falle von Isu1, von Cystein abhängig. So wird auch hier die Bindung von Frataxin zu Nfs1/Isd11 ohne Zugabe von Cystein vollständig verhindert, wohingegen bei Anwesenheit von Cystein bereits für *apo*-Yfh1 eine starke Affinität gezeigt werden konnte (423 ± 96 nM). Diese Interaktion wurde durch Zugabe von Fe(II) weiter gefestigt. In diesem Fall betrug die Dissoziationskonstante von *holo*-Yfh1 und Nfs1/Isd11 138 ± 34 nM. Dies zeigt, dass „beladenes“ Yfh1 eine um den Faktor 3 höhere Affinität zu Nfs1/Isd11 hat. Bezüglich der Interaktion von *apo*-Yfh1 mit Isu1 konnte das Ergebnis aus den Experimenten von Seiten Isu1 bestätigt werden (1040 ± 335 nM). Nach Zugabe von Fe(II) konnte eine dramatische Verbesserung der Interaktion beobachtet werden. *Holo*-Yfh1 interagiert mit Isu1 um den Faktor 16,7 besser als *apo*-Yfh1 (62 ± 9 nM). Dieses Ergebnis legt nahe, dass Frataxin seine Aufgabe vornehmlich in seiner *holo*-Form erfüllt und damit die Eisenbindung für die erfolgreiche Fe/S-Cluster Biogenese von essentieller Bedeutung ist. Mit Blick auf Yah1 fällt auf, dass beide Oxidationszustände eine ähnlich starke Affinität zu *apo*-Yfh1 im

Bereich

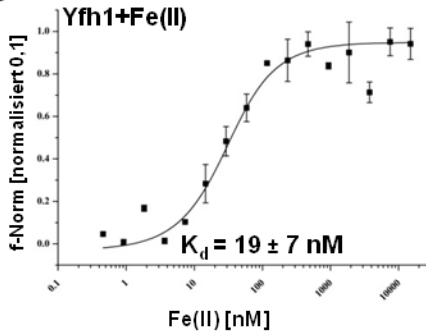
A



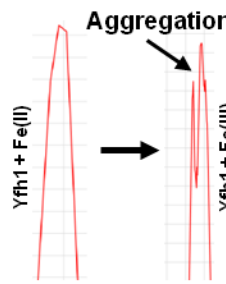
B



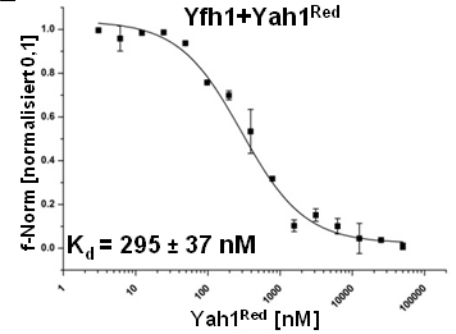
C



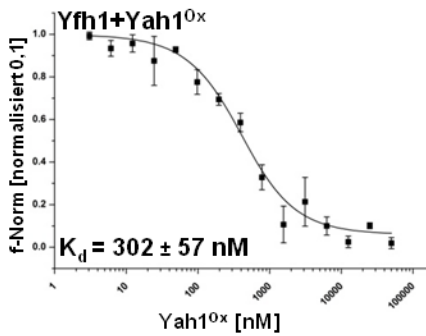
D



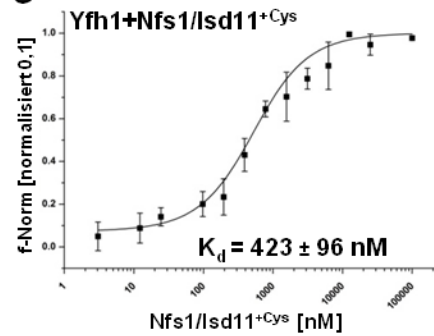
E



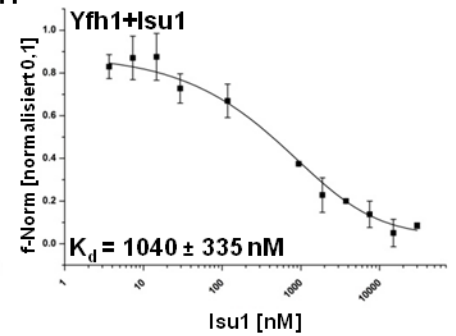
F



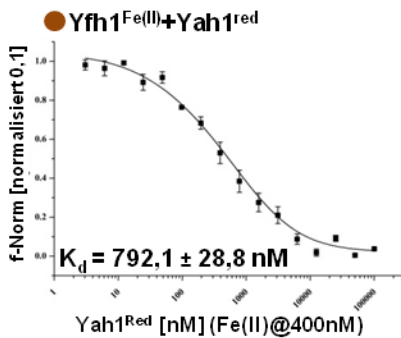
G



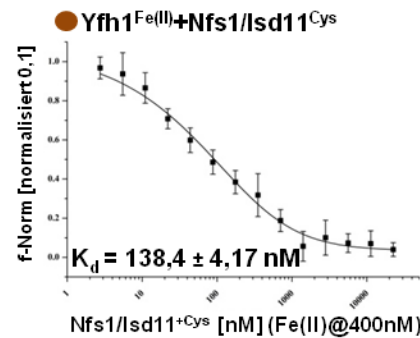
H



I



J



K

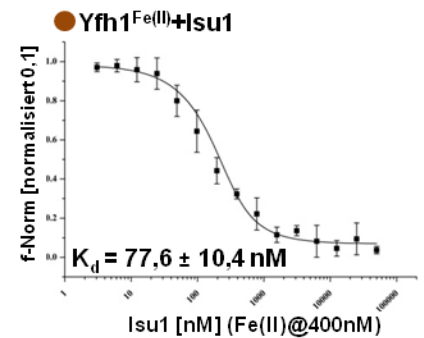


Abb. 4.20.: Interaktionen von Yfh1 mit den primären ISC-Faktoren. **A:** Balkendiagramm der Interaktionen von Yfh1. Alle Werte repräsentieren den Kehrwert der K_d und sind logarithmisch (\log_2) skaliert. Yfh1 interagiert stark mit Fe(II), für Fe(III) konnte dagegen keine K_d bestimmt werden. Die Interaktionen mit reduziertem und oxidiertem Yah1, sowie mit Nfs1/Isd11 und Isu1 bewegen sich in Abwesenheit von Fe(II) alle in einem ähnlichen Bereich (300 nM -1000 nM). **B:** Balkendiagramm der Interaktionen von Yfh1 in Anwesenheit von Fe(II). Die Interaktion mit Yah1 ist geschwächt, wohingegen die Interaktion mit Isu1 gestärkt wird. Auch die Interaktion mit Nfs1/Isd11 ist in einem physiologisch relevanten Bereich. **A-K:** Originaldaten (Punktogramme) und sigmoidales Fitting (Kurvendiagramm) der einzelnen Messungen. Alle K_d -Werte sind mit Standardabweichung angegeben. Im Falle der Messung mit Fe(III) konnten keine Werte ermittelt werden. Der Kapillarscan zeigt eine Aggregation von Yfh1 bei Zugabe von Fe(III) (**C**). Die Titrations bei konstanter Konzentration von Fe(II) (400 nM) sind mit ● gekennzeichnet. Originaldaten für Nfs1/Isd11-Cys und Yfh1 + Fe(II) (konstant) siehe Anhang (Abb. A.6.). (i. a.: nicht auswertbar)

von 300 nM zeigen. Die Bindung von Yfh1 zu reduziertem Yah1 wird im Gegensatz zu den übrigen Interaktionen durch Zugabe von Fe(II) um den Faktor 2 geschwächt (608 ± 30 nM). Die Dissoziationskonstante zwischen *holo*-Yfh1 und oxidiertem Yah1 konnte nicht bestimmt werden, da hier eine Oxidation des Fe(II) und damit eine Aggregation von Yfh1 nicht zu verhindern war. Die Ergebnisse zeigen eine starke Abhängigkeit von Fe(II) im Bezug auf Yfh1. Dies legt nahe, dass die Bindung von Fe(II) essentiell für die Funktion von Frataxin ist. Dies stützt weiter die Vermutung, dass Frataxin als Eisendonator der frühen ISC-Maschinerie fungiert. Obwohl die Zugabe von Fe(II) im Falle der Interaktion mit Yah1 einen konträren Effekt hatte, das heißt die Bindung geschwächt wurde, erscheint eine Interaktion von Yfh1 und Yah1 hier grundsätzlich eher verwunderlich und wird daher unter 5.2.1. (Diskussion) weiter erörtert.

4.1.4.3. Die Desulfurase Nfs1 als zentraler Synthesepplatz der Fe/S-Cluster Biogenese

Schließlich wurden die Interaktionen von Nfs1/Isd11 mit den primären Komponenten der frühen ISC-Maschinerie bestimmt, um einen detaillierten Einblick in die Bindungsmodi von Nfs1/Isd11 mit seinen Partnern der frühen ISC-Maschinerie zu erhalten und damit funktionelle Rückschlüsse ziehen zu können. Unter Abwesenheit von Cystein konnten abgesehen vom Komplex mit oxidiertem Yah1 ($K_d = 171 \pm 38$ nM) keine Interaktionen detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass ein aktiver Komplex nur bei aktivierter Desulfurase gebildet werden kann (siehe Anhang Abb. A.7.).

Unter oxidierenden Bedingungen ist in Anwesenheit von Cystein eine signifikante Bindung sowohl von Yah1 (173 ± 27 nM), als auch von Isu1 (253 ± 80 nM, vgl. auch 4.1.4.1.) an Nfs1/Isd11 festzustellen (Abb. 4.21.). Bei der Messung mit beiden Partnern im Ansatz, wobei die eine Komponente in ihrer Konzentration konstant gehalten und die andere titriert wurde, konnte nur eine schwache Bindung beobachtet werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass oxidiertes Yah1 nur einen schwachen heterodimeren Komplex mit Isu1 ausbildet und hier keine definierte Bindung zwischen zwei Komplexen (Yah1/Isu1 und Nfs1/Isd11) stattfindet. Vielmehr wird ein dynamischer Vorgang dargestellt, welcher sowohl auf der Bindung der monomeren Formen von Yah1^{ox} und Isu1 als auch des Komplexes aus beiden an Nfs1/Isd11

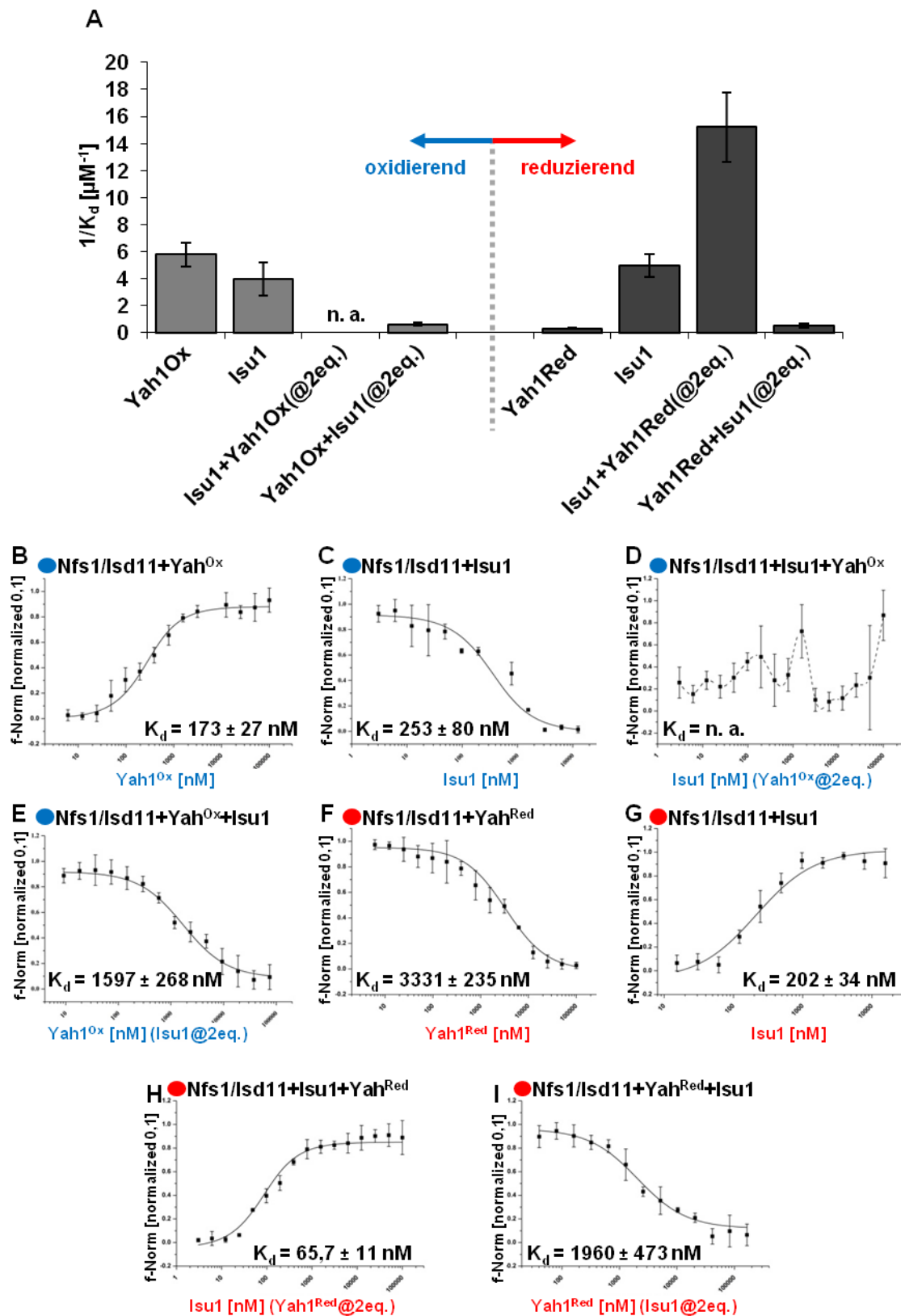


Abb. 4.21.: Interaktionen von Nfs1/Isd11 mit den primären ISC-Faktoren. **A:** Balkendiagramm der Interaktionen von Nfs1/Isd11 in Anwesenheit von Cystein sowohl unter oxidierenden (links, blau) als auch reduzierenden (rechts, rot) Bedingungen (Werte repräsentieren den Kehrwert der K_d). Unter oxidierenden Bedingungen sind die Interaktionen mit Yah1^{ox} und Isu1 im Bereich um 200 nM angesiedelt. Unter reduzierenden Bedingungen kommt die Interaktion mit Yah1^{red} zum Erliegen, wohingegen die Interaktion mit Isu1 keine Änderung erfährt. Nfs1/Isd11 und der Komplex aus Yah1 und Isu1 interagieren sehr gut miteinander, wenn Isu1 titriert wird. Wird Yah1^{red} titriert, ist nur eine Residualinteraktion zu beobachten. **B-I:** Originaldaten (Punktdiagramme) und sigmoidales Fitting (Kurvendiagramm, ausgenommen **D**, kein sigmoidales Fitting möglich). Alle K_d -Werte sind mit Standardabweichung angegeben. Die Messungen unter oxidierenden Bedingungen sind mit ● und solche unter reduzierenden Bedingungen mit ● gekennzeichnet. (n. a.: nicht auswertbar)

basiert. Diese hohe Dynamik führte dazu, dass keine schlüssige Auswertung der Messergebnisse vorgenommen werden konnte.

Unter reduzierenden Bedingungen weist Nfs1/Isd11 in Anwesenheit von Cystein vollkommen andere Affinitäten zu seinen Partnern auf. Hier interagiert Yah1 alleine schlecht (3331 ± 235 nM) und Isu1 unverändert gut (202 ± 34 nM, vgl. auch 4.1.4.1.) mit Nfs1/Isd11. Der Komplex aus Yah1 und Isu1 als stabiler Heterodimer zeigt eine starke Bindung ($65,7 \pm 11$ nM) an den Desulfurasekomplex (Abb. 4.21.). Hierbei ist es von grundlegender Wichtigkeit, welches Molekül titriert und welches in konstanter Konzentration zugegeben wird. Die Konzentration des jeweils konstanten Moleküls wurde in beiden Fällen auf zwei Äquivalente der Konzentration der höchsten Zugabe des titrierten Moleküls festgelegt. Daher kann in der Messreihe „Nfs1/Isd11+Yah1^{Red}(titriert)+Isu1(konstant)“ eine Saturierung von Nfs1/Isd11 durch Isu1 beobachtet werden. Die K_d von 1960 ± 473 nM kann somit nicht auf die Bindung des Komplexes aus Yah1 und Isu1 an Nfs1/Isd11 bezogen werden, sondern spiegelt lediglich eine Residualinteraktion derer wider. Die Bindung des Heterodimers aus Yah1 und Isu1 wird partiell durch die Bindung von monomerem Isu1 an Nfs1/Isd11 verhindert (siehe 5.2.2.). Diese intrinsische Inhibierung kann durch Austausch des titrierten und des konstanten Moleküls umgangen werden. Da reduziertes Yah1 in seiner monomeren Form nur eine äußerst schwache Affinität zu Nfs1/Isd11 besitzt, konkurriert es nur in vernachlässigbarem Maße mit der Bindung des Heterodimers aus Yah1 und Isu1. Daher kann das Ergebnis dieser Messung als verlässlich angesehen werden und dokumentiert ausschließlich die Interaktion von Yah1^{red}/Isu1 mit Nfs1/Isd11.

Es ergeben sich folgende interessante und physiologisch wichtige Erkenntnisse. Im oxidierten Zustand zeigt der Heterodimer aus Yah1 und Isu1 keine Bindung zum Desulfurase-Komplex, jedoch interagieren präferentiell die monomeren Formen der frühen ISC-Komponenten alleine. Im Speziellen ist hier die starke Interaktion von oxidiertem Yah1 bemerkenswert, da dieses im Gegensatz dazu im oxidierten Zustand eine wesentlich geringere Affinität zu Isu1 zeigt (siehe 4.1.4.1.). Zusätzlich kann die Bindung des oxidierten Ferredoxins an Nfs1/Isd11 durch Zugabe katalytischer Mengen ($1 \mu\text{M}$ Endkonzentration) humaner Ferredoxin-Reduktase (hFdxR) und damit einhergehender enzymatischer Reduktion von Yah1 vollständig unterbunden werden (Abb. 4.22.). Dies bedeutet, dass Yah1 durch Reduktion vom Desulfurase-Komplex gelöst wird und anschließend einen Heterodimer mit Isu1 bildet. Dieser Heterodimer aus Yah1 und Isu1 bindet nun bevorzugt an den Desulfurase-Komplex, bis es zu einer Auflösung des Komplexes durch Oxidation von Yah1 kommt. Isu1 verliert dadurch seine Affinität zu Yah1 und kann den Komplex verlassen. Yah1 bleibt zurück, bis es durch seine Reduktase reduziert wird und so die Affinität zu Nfs1/Isd11 verliert. Schließlich kann ein neuer Zyklus beginnen.

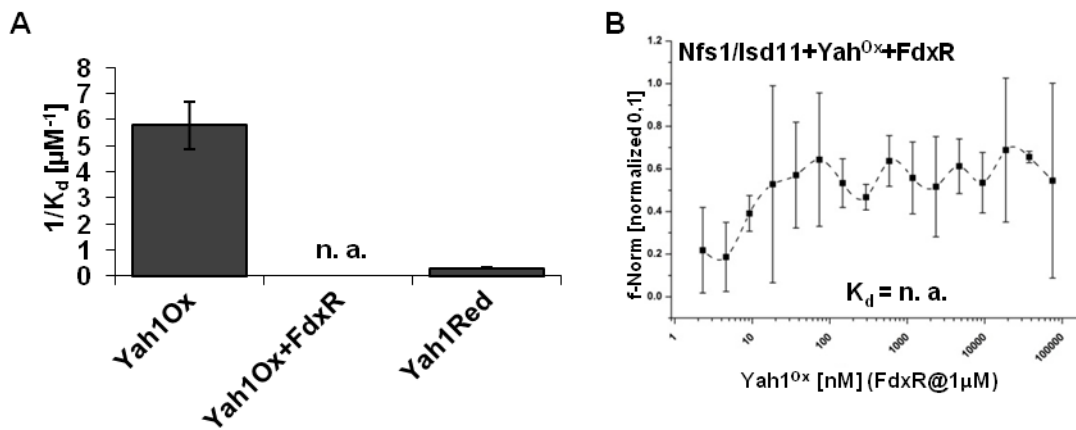


Abb. 4.22.: Die Interaktion von Nfs1/Isd11 mit Yah1 ist redoxabhängig. **A:** Balkendiagramm der Interaktionen von Nfs1/Isd11 mit Yah1 (Werte stellen den Kehrwert der K_d dar). Yah1 interagiert in seinem oxidierten Zustand gut mit Nfs1/Isd11. In seinem reduzierten Zustand ist lediglich eine Residualinteraktion zu sehen. In Anwesenheit der humanen Ferredoxin-Reduktase (FdxR) und dem daraus resultierenden Reduktionsdruck ist keine Interaktion detektierbar. **B:** Originaldaten der Messung mit FdxR. Messwerte (Punktdiagramm) ließen kein sigmoidales Fitting zu (Originaldaten für die Interaktionen mit Yah1^{red} und Yah1^{ox} siehe Abb. 4.21). (n. a.: nicht auswertbar)

Mit Hilfe der gezeigten Ergebnisse lässt sich nun ein zeitlich aufgelöstes Modell der frühen ISC-Maschinerie erstellen (Abb. 4.23.). Neben den einzelnen Monomeren lässt sich nun auch der heterodimere Komplex aus Yah1 und Isu1 der frühen ISC-Maschinerie zuordnen. Es konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung von Yah1 und Isu1 zeitlich vor der Anlagerung an Nfs1/Isd11 stattfindet. Hoch interessant hinsichtlich dieses Komplexes ist die starke Abhängigkeit der verschiedenen Affinitäten vom jeweiligen Redoxzustand. Dies lässt auf eine funktionell und regulatorisch wichtige Rolle des Oxidationszustandes des Systems und im Besonderen des Ferredoxins Yah1 schließen. Weiter zeigen die Ergebnisse, dass Nfs1/Isd11 den zentralen Synthesepunkt des ersten Fe/S-Clusters darstellt, da alle primären Komponenten der frühen ISC-Maschinerie eine starke Affinität zum Desulfurasekomplex aufweisen. Die Abhängigkeit der Komplexbildung von der Anwesenheit von Cystein stellt dabei eine wichtige Regulationsmöglichkeit dar. Auch im Bezug auf Yfh1 konnte die Vermutung, dass es sich bei der Funktion dieses Proteins um die Bereitstellung von Eisen handelt (Layer et al., 2006), weiter untermauert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Yfh1 in seinem *holo*-Zustand eine starke Affinität sowohl zu Isu1 als auch zu Nfs1/Isd11 hat. Zusammengefasst deutet dies darauf hin, dass eine effiziente Bildung des Komplexes der frühen ISC Maschinerie nur in Anwesenheit aller essentiellen Faktoren möglich ist.

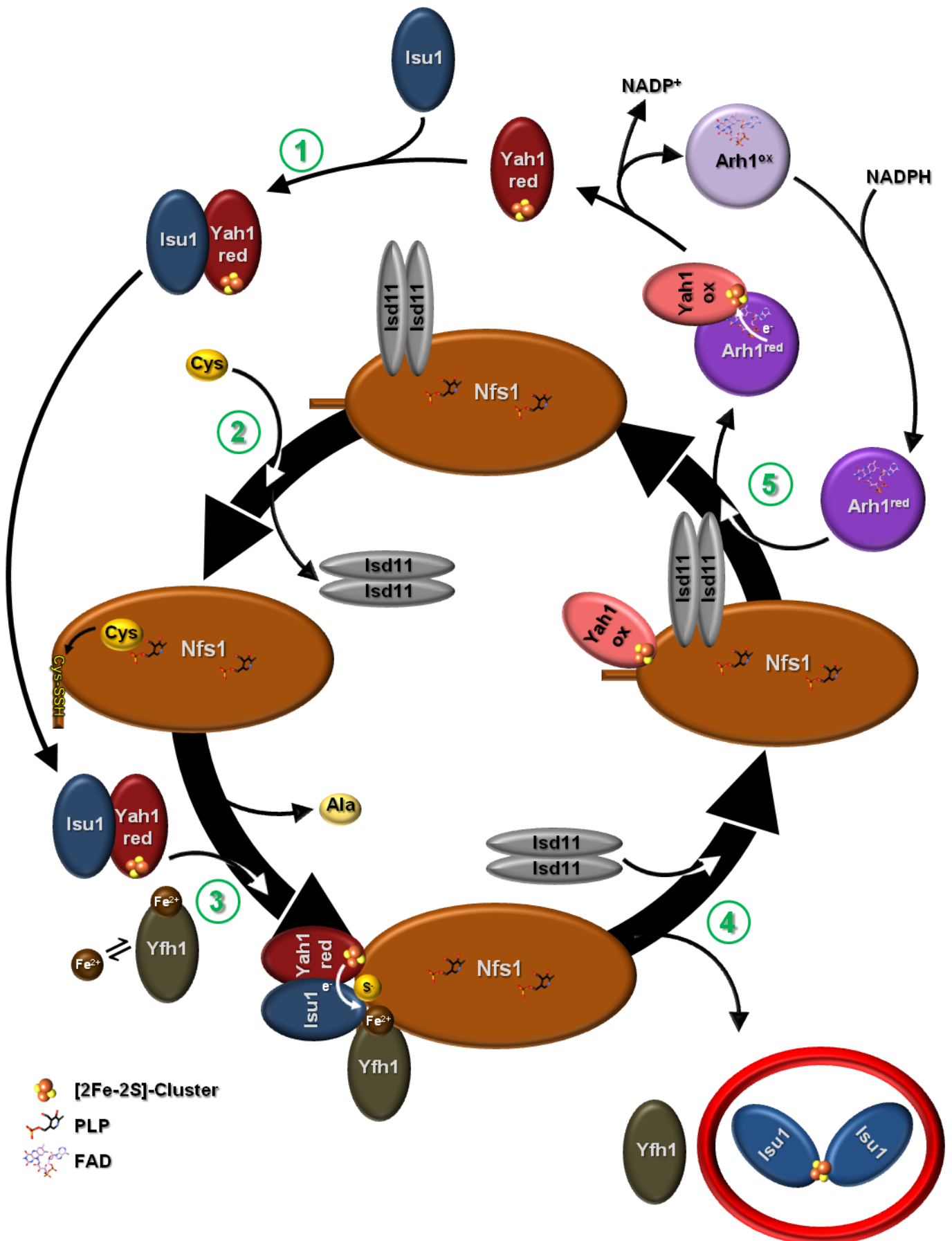


Abb. 4.23.: Modell des Mechanismus der frühen ISC-Maschinerie. Im ersten Schritt wird der Heterodimer aus Yah1^{red} und Isu1 gebildet (1). Nfs1/Isd11 bindet mithilfe seines PLP-Kofaktors Cystein, wobei Isd11 abgelöst wird. Schwefel wird von Cystein auf Cys341 übertragen (2). Sowohl der Komplex aus Yah1 und Isu1 als auch holo-Yfh1 binden an Nfs1 (3). Es erfolgt die Bildung des Fe/S-Clusters auf Isu1 mithilfe des Schwefels von Nfs1, des Eisens von Yfh1 und des Elektrons von Yah1 (4). Isu1 bildet schließlich ein Dimer mit einem gebrückten [2Fe-2S]-Cluster. Das System wird regeneriert durch die erneute Beladung von Yfh1, die Bindung von Isd11 an Nfs1 und der Ablösung von Yah1 von Nfs1 (5). Yah1 wird unter Verbrauch von NADPH durch die Ferredoxin-Reduktase Arh1 reduziert (6). Anschließend können Yah1 und apo-Isu1 wieder einen heterodimeren Komplex bilden und der Zyklus kann von Neuem beginnen.

4.1.5. Die frühe ISC-Maschinerie ist ein multimerer Komplex

Auf Basis der bisher gezeigten Daten und mit Hilfe umfangreicher SAXS-Messungen sollten schließlich die globale Struktur, die genaue Zusammensetzung und die Stöchiometrie der frühen ISC-Maschinerie bestimmt werden. Hierzu wurden alle Faktoren einzeln und in Kombination miteinander vermessen, um schließlich ein detailreiches Bild der Komplexbildung zu erhalten.

4.1.5.1. *Nfs1* und *Isd11* bilden einen hexameren Komplex

Zunächst wurde die globale Struktur der eukaryotischen Desulfurase *Nfs1* und ihres kleinen *LYR*-Aktivatorproteins *Isd11* bestimmt. Mit Hilfe von Homologie- und *ab-initio*-Modellierung wurden hierfür zunächst die entsprechenden Strukturen berechnet, wobei die Struktur des *Nfs1* auf Basis des *E. coli*-Homologs *IscS* und die des *Isd11* *ab initio* berechnet wurden (Abb. 4.24.). Die Struktur des *Isd11* wurde mit bereits publizierten Modellen (Amela et al., 2013) verglichen und zeigte keine Abweichungen.

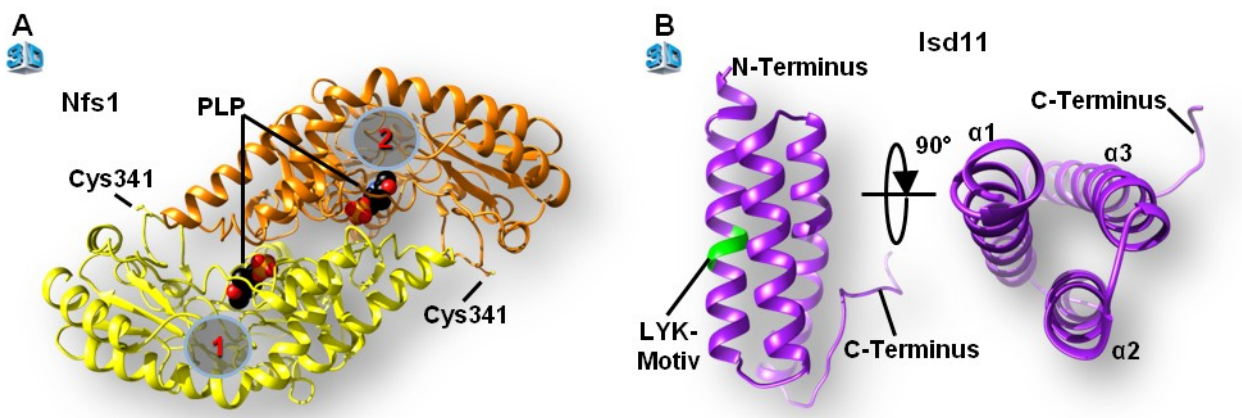


Abb. 4.24.: Modelle der Strukturen von *Nfs1* und *Isd11*. **A:** Ergebnis der Homologiemodellierung von *Nfs1* mithilfe von SWISS-MODEL. *Nfs1* wurde auf Basis von bekannten Strukturen anderer Desulfurasen berechnet. Das Ergebnis zeigt einen Komplex aus zwei Untereinheiten (1 und 2), welche beide jeweils ein PLP als Kofaktor in einer konservierten Bindetasche tragen. Das konservierte Cys341 ist in beiden Untereinheiten oberflächenexponiert. (vgl. Abb. 3D.10.) **B:** *Ab initio* Modell von *Isd11*. Die Struktur von *Isd11* wurde mit I-TASSER berechnet. Es zeigt eine aus drei α -Helices bestehende gefaltete Struktur. Das konservierte LYK-Motiv (auch LYR) dieser Familie ist auf Helix $\alpha 1$ lokalisiert und oberflächenexponiert. (vgl. Abb. 3D.11.)

Um nun die Lage von *Isd11* auf *Nfs1* und damit die allgemeine Struktur des Desulfurasekomplexes zu bestimmen, wurden die zuvor berechneten Modelle auf die erhaltenen SAXS Daten angewendet und die Strukturen mittels Chimera 1.10 „Fit in Map“ eingepasst. Die Messungen ergaben ein *Nfs1*-Dimer mit mindestens vier assoziierten *Isd11* Molekülen, welche sich in zwei Dimere aufteilen (Abb. 4.25.). Die Position der beiden *Isd11* Dimere stimmt annähernd mit der bereits berechneten Position überein (Amela et al., 2013), jedoch konnte die Lokalisation hier weiter verfeinert werden. *Isd11* bindet an *Nfs1*

vorwiegend in der Region von Helix α_6 und der Schleife zwischen Strang β_6 und β_7 . Diese Region befindet sich auf der gegenüberliegenden Seite der PLP- und Cystein-Bindetasche, und beinhaltet größtenteils hydrophobe Reste (Ile163, Ala164, Ala165, Ile166, Met169, Ala172,

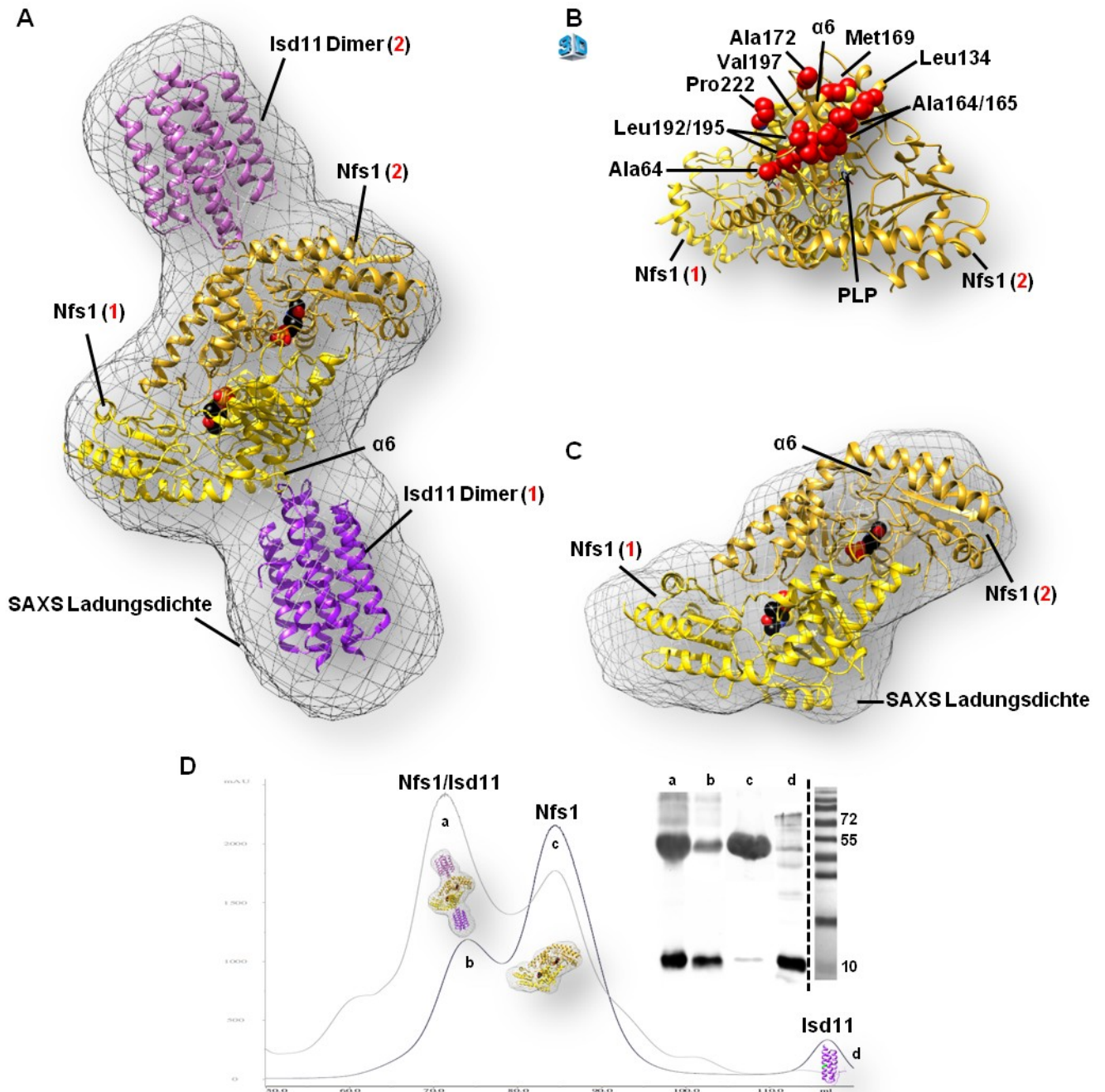


Abb. 4.25: SAXS-Analyse und Gelfiltration des Komplexes aus Nfs1 und Isd11. **A:** SAXS-Ladungsdichte für den Komplex aus Nfs1 und Isd11 in Abwesenheit von Cystein. Nfs1 und Isd11 wurde auf Basis der zuvor berechneten Strukturen in die Ladungsdichte eingepasst. Auf Grund der Größe und Ausdehnung der Ladungsdichte wurde ein Isd11-Dimer vertikal an Nfs1 angelagert. Sowohl der Isd11-Dimer als auch der Heterohexamer wurden verfeinert und energieminiert. Isd11 bindet als Dimer in der Region um Helix α_6 direkt oberhalb des PLP-Kofaktors. **B:** Isd11-Bindestelle auf Nfs1. Die Isd11 Bindestelle befindet sich in einer hydrophoben Region um Helix α_6 , welche aus Alanin, Prolin, Leucin und Methionin gebildet wird. Direkt unterhalb befinden sich der PLP-Kofaktor und die Cystein-Bindetasche. (vgl. Abb. 3D.12.) **C:** SAXS-Ladungsdichte für Nfs1/Isd11 in Anwesenheit von Cystein. Nach Zugabe von Cystein konnte keine Ladungsdichte für Isd11 bestimmte werden. Die Ladungsdichte für Nfs1 deutet aber weiterhin auf gefaltetes Protein in dimerer Konfiguration hin. **D:** Gelfiltration von Nfs1/Isd11 in Abwesenheit (dunkelgrau) und Anwesenheit (hellgrau) von Cystein. Ohne Zugabe von Cystein eluiert Nfs1/Isd11 beinahe vollständig als Komplex. Isd11 alleine kann nicht detektiert werden. Nach Zugabe von Cystein verliert Nfs1 größtenteils die Affinität zu Isd11. Nfs1 und Isd11 eluieren in diesem Fall separat. Es bleibt nur eine geringe Menge an Komplex zurück. Der Einsatz zeigt eine SDS-PAGE der Fraktionen (a-d).

Leu192, Leu195, Val197). Weitere hydrophobe Aminosäurereste in räumlicher Nähe sind Ala64, Leu134 und Pro222, welche allesamt eine Rolle für die Bindung von Isd11 spielen könnten (Abb. 4.25.). Die Lokalisation selbst macht eine direkte mechanistische Auswirkung von Isd11 auf die Fe/S-Cluster Biogenese unwahrscheinlich, jedoch besetzt Isd11 hier eine hydrophobe Oberfläche von Nfs1 und stabilisiert die Tertiärstruktur und damit die katalytische Aktivität von Nfs1. Interessanterweise konnte nach Zugabe eines 2-fachen Überschusses an Cystein zum Komplex aus Nfs1 und Isd11 keine Ladungsdichte für Isd11 mehr gefunden werden. Diese Cystein-abhängige Dissoziation des Komplexes konnte auch mit Hilfe von Gelfiltration mit und ohne Cystein gezeigt werden (Abb. 4.25.). Dies könnte daher rühren, dass die Bindung von Cystein eine konformationelle Änderung auch auf der Oberfläche des Nfs1 verursacht und so die Bindung von Isd11 verhindert bzw. überflüssig macht (Diskussion siehe 5.3.1.). Um für alle weiteren Messungen die korrekte Faltung und

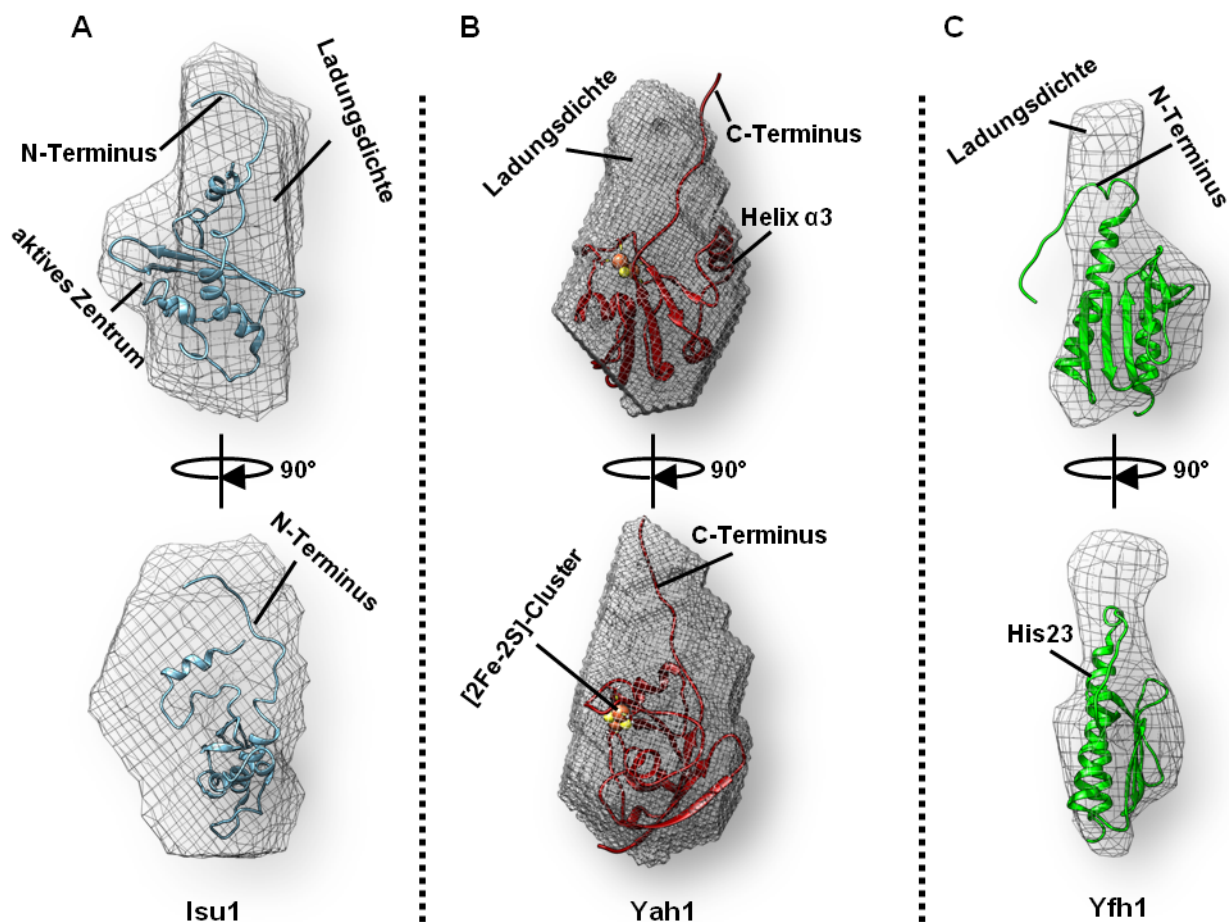


Abb. 4.26: Bestimmung der SAXS-Ladungsdichte der einzelnen primären ISC-Komponenten. A: Ladungsdichte von Isu1 mit eingepasster NMR-basierter Struktur. Isu1 zeigt sich als monomeres gefaltetes Protein unter SAXS-Bedingungen. **B:** Yah1 liefert eine Ladungsdichte, welche ein monomeres gefaltetes Protein vermuten lässt. Eingepasst wurde die NMR-basierte Struktur eines oxidierten Yah1. Der C-Terminus nimmt in der Ladungsdichte den gesamten oberen Teil ein. **C:** Ergebnis der SAXS-Messung von Yfh1. Eingepasst wurde die NMR-basierte Struktur von Yfh1 (pdb: 1XAQ). Der flexible N-Terminus nimmt unter SAXS-Bedingungen eine leicht andere Konformation an.

den korrekten Oligomerisierungszustand der einzelnen Komponenten sicherzustellen, wurden Isu1, Yah1 und Yfh1 zunächst einzeln vermessen (Abb. 4.26. und Anhang Abb. A.8.). Für Yah1 und Isu1 konnte je eine Ladungsdichte entsprechend einem monomeren und globulär gefalteten Protein ermittelt werden, die jeweils mit der in dieser Arbeit ermittelten Struktur global übereinstimmten. Auch Yfh1 zeigte eine klassische globuläre und monomere Form, wie sie bereits mittels SAXS und NMR für das bakterielle Homolog CyaY bestimmt wurde (Nair et al., 2004). Damit konnten alle Komponenten inkl. Nfs1/Isd11 für weitere Messungen verwendet werden.

4.1.5.2. Isu1, Yah1 und Yfh1 binden an ein Nfs1-Homodimer in einer 1:1 Stöchiometrie

Nun wurden zunächst die Stöchiometrie und das Aussehen der einzelnen Subkomplexe gelöst. Hierzu wurden folgende Komplexe vermessen: Nfs1/Isd11+Isu1, Nfs1/Isd11+Yah1, Nfs1/Isd11+Isu1+Yah1, Nfs1/Isd11+Isu1+Yfh1. Da eine Interaktion, wie oben beschrieben, ohne Cystein stark geschwächt ist, wurde auch hier in allen Ansätzen ein 2-facher Überschuss an Cystein hinzu gegeben (Standardpuffersystem siehe 3.3.2.). Dies führte dazu, dass in keinem der Komplexe eine Ladungsdichte für Isd11 detektiert werden konnte (Abb. 4.27.). Aus diesem Grund wird im Weiteren für diese Komplexe Nfs1/Isd11 auf Nfs1 reduziert, da dies der Konfiguration entspricht, obschon Isd11 in jedem Fall in der Probe vorhanden war.

Der Komplex aus Nfs1 und Isu1 zeigt die bekannte Konfiguration, wie sie mittels Kristallographie und SAXS bereits für das bakterielle System, bestehend aus IscS und IscU, gezeigt wurde (Prischi et al., 2010a; Shi et al., 2010). Hierbei kommt je ein Isu1 an je einer Untereinheit des Nfs1-Dimers direkt an der Spitze in räumlicher Nähe zum konservierten Cystein-Rest (Cys341) zum Liegen. Die Lage des Isu1 ermöglicht hierbei einen direkten Zugriff des aktiven Zentrums von Isu1, im Speziellen der beiden essentiellen Cysteine Cys37 und Cys64 auf das durch Nfs1 bereitgestellte Persulfid auf Cys341. Die errechneten Entfernungen der beiden Cysteine auf Isu1 zu Cys341 auf Nfs1 sind nahezu identisch und betragen in beiden Fällen $\sim 6,8\text{\AA}$ (Abb. 4.28.). Somit besteht für beide Cysteinreste die Möglichkeit der Übertragung des Persulfids. Mit Hilfe dieser Daten kann jedoch keine weitere Diskriminierung vorgenommen werden. Inwiefern eine direkte Interaktion der Cysteinreste von Isu1 und Nfs1 eine mechanistische Rolle spielen könnten und welches der Cysteinreste von Isu1 eine essentielle Rolle in der Persulfidübertragung übernehmen könnte, wird weiter unten genauer erörtert (Diskussion siehe 5.1.2.).

Überraschend hingegen war die Lage des Ferredoxins Yah1 auf Nfs1. Die direkte Interaktion, welche in dieser Arbeit durch Thermophorese für das eukaryotische System gezeigt wurde (vgl. 4.1.4.3.), wurde bereits für das bakterielle System vorhergesagt. Auf Basis von *in-silico*-Dockingberechnungen wurde jedoch eine andere Konfiguration vorgeschlagen, welche eine Konkurrenz mit Frataxin zur Folge hätte

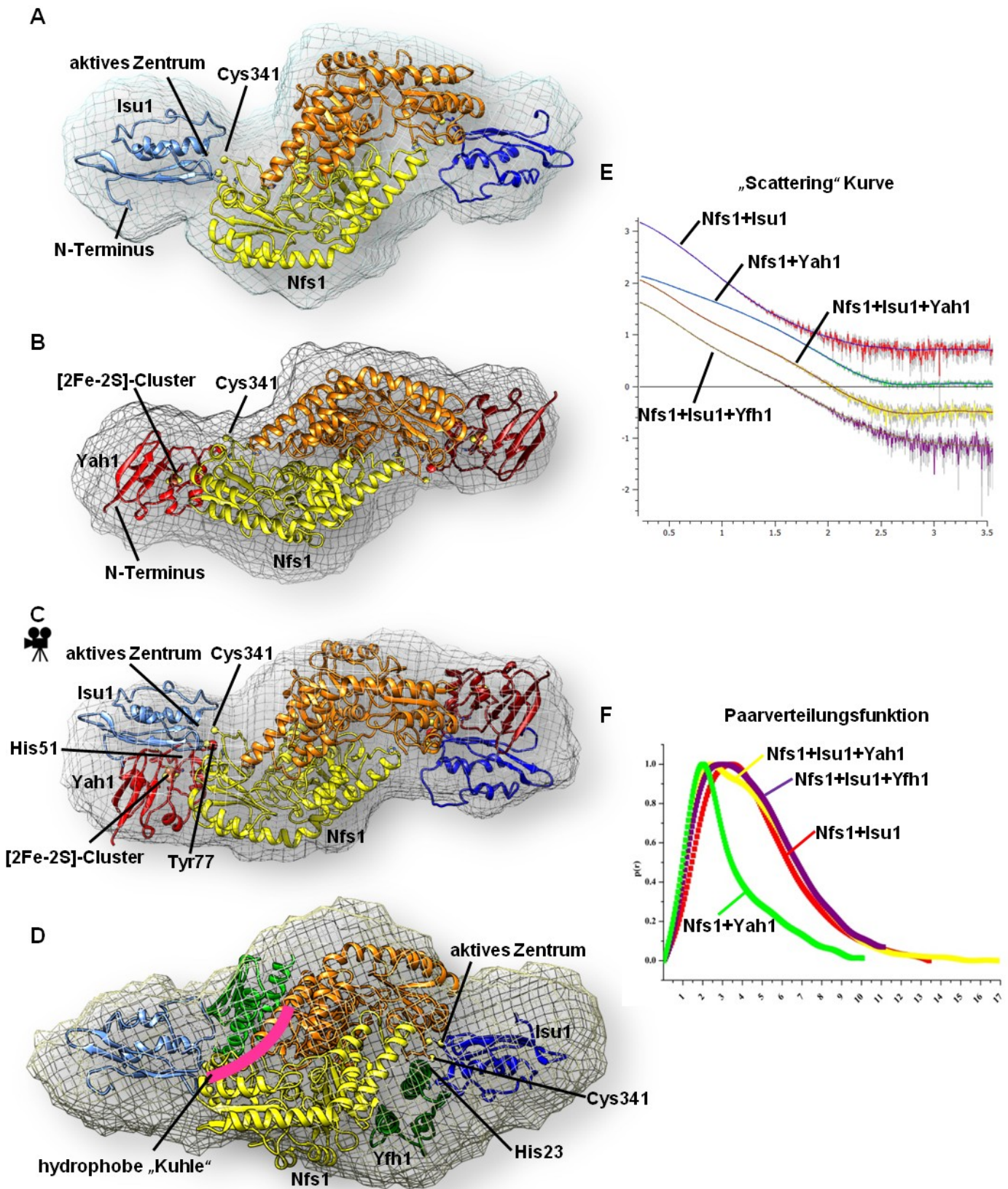


Abb. 4.27: Strukturelle Untersuchung der potentiellen Intermediär- oder Subkomplexe der frühen ISC-Maschinerie mittels SAXS. Alle Messungen wurden in Anwesenheit von Cystein durchgeführt. Eingepasst wurden jeweils die zuvor beschriebenen Strukturen und Komplexe. **A:** Komplex aus Nfs1 (gelb, orange) und Isu1 (blau). Der eukaryotische Komplex stellt sich, ähnlich wie der bakterielle, als Heterotetramer dar, wobei Isu1 mit seinem aktiven Zentrum in räumlicher Nähe zu dem konservierten Cys341 lokalisiert ist. **B:** Die Ladungsdichte für den Komplex aus Nfs1 und Yah1 (rot) lässt auch auf einen heterotetrameren Komplex schließen. Wobei auch hier je ein Yah1 an einer Nfs1-Untereinheit zum Liegen kommt. Dabei ist es leicht seitlich verschoben mit Bezug auf Cys341. **C:** In die Ladungsdichte, welche für den Komplex aus Nfs1, Isu1 und Yah1 erhalten wurde, konnte der NMR-basierte Komplex aus Yah1 und Isu1 zusammen mit Nfs1 eingepasst werden. Die Lokalisationen der Untereinheiten entsprechen den zuvor für A und B bestimmten. (vgl. Vid. 6.) **D:** Yfh1 (grün) bindet an Nfs1 in einer hydrophoben Kuhle (rosa) im Bereich der Schnittstelle der beiden Nfs1-Untereinheiten. Damit ist es auf der gegenüberliegenden Seite von Nfs1 im Bezug auf Yah1 lokalisiert. **E:** Die Scattering-Kurven der einzelnen Messungen zeigen deutliche Unterschiede in der Konformation der Subkomplexe. Sie bestätigen außerdem gefaltete und nicht aggregierte Komplexe. **F:** Die Paarverteilungsfunktionen zeigen die klassischen Formen multimerer Komplexe, wobei nur Nfs1+Yah1 eine außerordentlich hohe Symmetrie aufweist.

(Prischi et al., 2010a; Yan et al., 2013). Diese Bindungsstelle konnte mittels SAXS für das eukaryotische System nicht bestätigt werden. Das Ferredoxin Yah1 bindet vielmehr auf der gegenüberliegenden Seite der vorhergesagten Stelle im Bereich der Schleifen zwischen Helix $\alpha 8$ und Strang $\beta 3$ und Helix $\alpha 9$ und Strang $\beta 10$; auch Helix $\alpha 10$ befindet sich in räumlicher Nähe zu Helix $\alpha 3$ des Ferredoxins und könnte zu der Interaktion beitragen (Abb. 4.28). Diese Lokalisation beinhaltet, dass eine lokalisationsbedingte Kompetition von Frataxin und Ferredoxin im eukaryotischen System nicht gegeben ist und eine synergistische Wirkung aller Komponenten möglich ist.

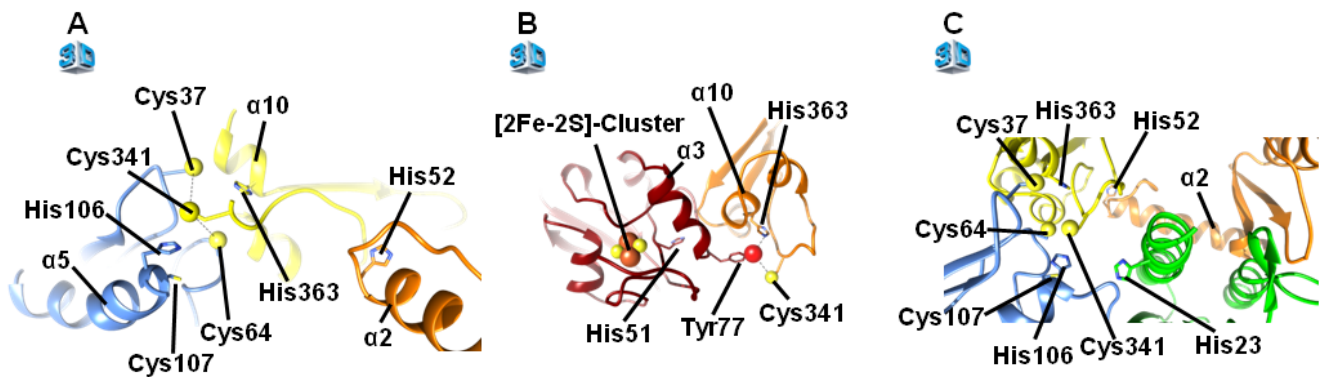


Abb. 4.28.: Alle primären ISC-Komponenten binden in räumlicher Nähe zu Cys341 von Nfs1. A: Lokalisation von Isu1 (hellblau) auf Nfs1 (gelb, orange). Isu1 kommt mit seinem aktiven Zentrum in der Nähe von Helix $\alpha 10$ zum Liegen. Die konservierten Cysteinreste Cys 37 und Cys 64 sind dabei in kurzer Distanz zu Cys 341 von Nfs1 lokalisiert. (vgl. Abb. 3D.13.) **B:** Komplex aus Yah1 (rot) und Nfs1. Yah1 ist seitlich von Helix $\alpha 10$ lokalisiert. Das konservierte His 51 und Tyr 77 auf Helix $\alpha 3$ von Yah1 befinden sich dabei in räumlicher Nähe zu Cys 341. (vgl. Abb. 3D.14.) **C:** Komplex aus Yfh1 (grün), Isu1 und Nfs1. Yfh1 bindet in einer hydrophoben Kuhle auf Nfs1, wobei es hierbei auch mit Isu1 interagiert. Sein konserviertes His 21 zeigt in Richtung des aktiven Zentrums von Isu1 und befindet sich in der Nähe des konservierten His 106 von Isu1. (vgl. Abb. 3D.15.)

Um nun zu überprüfen, ob die Lage von Yah1 und Isu1 auf Nfs1 mit der Struktur des Komplexes aus Yah1 und Isu1 vereinbar ist, wurde die globale Struktur des Komplexes aus Nfs1, Yah1 und Isu1 bestimmt. Hierzu wurde neben Cystein auch Na-Dithionit hinzugefügt, um die Bildung des Isu1/Yah1^{red}-Komplexes sicherzustellen. Die zuvor bestimmten Ladungsdichten der beiden Subkomplexe (Nfs1/Isu1 und Nfs1/Yah1) konnten nahezu vollständig zu der erhaltenen Dichte von Nfs1/Isu1/Yah1 vereinigt werden. Außerdem konnte die per NMR bestimmte Struktur des Isu1/Yah1-Komplexes ohne Anpassungen in die Ladungsdichte eingefügt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Lage der einzelnen Monomere genau der Lage des Komplexes aus beiden Proteinen auf Nfs1 entspricht. Weiter zeigt dieses Ergebnis, dass der auf Basis von NMR-Experimenten erhaltene, heterodimere Komplex Isu1/Yah1 in der in dieser Arbeit gezeigten Konfiguration an Nfs1 bindet und somit zunächst ein heterohexamerer Komplex (Isu1-Yah1-Nfs1-Nfs1'-Yah1'-Isu1') gebildet wird. Weiter sollte die Lage des Frataxin-Homologes Yfh1 auf Nfs1 in Verbindung mit Isu1 bestimmt werden. Tatsächlich konnte eine gleichzeitige Bindung von Isu1 und Yfh1 gezeigt werden, wobei sich Isu1 an den zuvor bestimmten Stellen befindet. Die Lage des Yfh1 konnte so

bestätigt werden, wie sie für das bakterielle System bereits gezeigt wurde (Prischi et al., 2010a). Yfh1 kommt auf Nfs1 im Bereich von Helix $\alpha 2$, der Schleife zwischen dieser und Strang $\beta 1$ und der Schleife nach $\beta 7$ in einer hydrophoben Kuhle, welche gemeinsam aus beiden Nfs1 Untereinheiten gebildet wird, zum Liegen. Interessanterweise bindet Yfh1 distal zum Fe/S-Cluster Bildungszentrum der entsprechenden Nfs1-Untereinheit, jedoch wiederum proximal zu dem der zweiten Untereinheit (Nfs1') (Abb. 4.27./28.). Somit ist Yfh1 wahrscheinlich nicht am Mechanismus seines Bindungspartners, sondern vielmehr an dem der gegenüberliegenden Untereinheit beteiligt. Dies macht die Bildung eines Nfs1-Dimers für eine produktive Fe/S-Cluster Biogenese unerlässlich.

4.1.5.3. Die frühe ISC-Maschinerie ist in ihrer aktiven Form ein Multi-Protein-Komplex

Um schließlich die Frage nach dem globalen Aussehen und der genauen Stöchiometrie der frühen ISC-Maschinerie beantworten zu können, sollte die Ladungsdichte des vollständigen Komplexes aus Nfs1, Isd11, Isu1, Yah1 und Yfh1 bestimmt werden. Um eine erfolgreiche Bindung aller Komponenten zu gewährleisten, wurde Cystein in 2fachem Überschuss zugegeben. Ziel dessen war es, Cystein in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen, um Isu1, Yah1 und Yfh1 eine Bindung zu ermöglichen, gleichzeitig aber auch einen vollständigen Verbrauch des Cysteins durch den nun aktiven Komplex zu gewährleisten, um auch das Protein Isd11 wieder akquirieren zu können. Gleichzeitig wurde, durch Weglassen von Eisen im Reaktionsansatz, die Bildung eines Fe/S-Clusters und die damit einhergehende Auflösung des Komplexes verhindert. Die sich ergebende Ladungsdichte kann als „ISC-Kreuz“ beschrieben werden (Abb. 4.29.). Sie vereinigt alle zuvor beschriebenen Komplexe miteinander und lässt auf einen dodekameren Komplex schließen, welcher sich aus Isu1-Yah1-Yfh1-Nfs1-Isd11-Isd11-Isd11'-Isd11'-Nfs1'-Yfh1'-Yah1'-Isu1' zusammensetzt (Abb. 4.29.). Die Lage der einzelnen Komponenten ist identisch mit der zuvor bestimmten Lokalisation. Die Konformation des Dodekamers lässt wiederum auf einen dimeren Komplex schließen, wobei die Desulfurase Nfs1 simultan oder durch einen „Flip-Flop“-ähnlichen Reaktionsmechanismus beidseitig Schwefel in Form eines Persulfids zur Verfügung stellt und dieses via Cys 341 auf Cys37 oder/und auf Cys64 des Gerüstproteins Isu1 überträgt. Das Persulfid kann weiter durch die gegebene räumliche Nähe des Ferredoxins Yah1 von diesem reduziert werden und stellt schließlich den für die Bildung von Fe/S-Clustern wichtigen Schwefel (S^{2-}) dar. Mit Hilfe der globalen Struktur des Komplexes lässt sich nun auch die wahrscheinliche Lage des Tyrosins 77 des Yah1, welches schon bei Interaktionsstudien mit Isu1 auffiel (siehe 4.1.4.1.), innerhalb des aktiven Komplexes zeigen. Es dringt tief in das aktive Zentrum von Isu1 und Nfs1 ein und spielt somit sehr wahrscheinlich zumindest strukturell eine wichtige Rolle bei der Reduktion des Persulfids. Neben Tyr77 ist auch His51 essentiell für die Funktion von Yah1, im Speziellen mit Blick auf

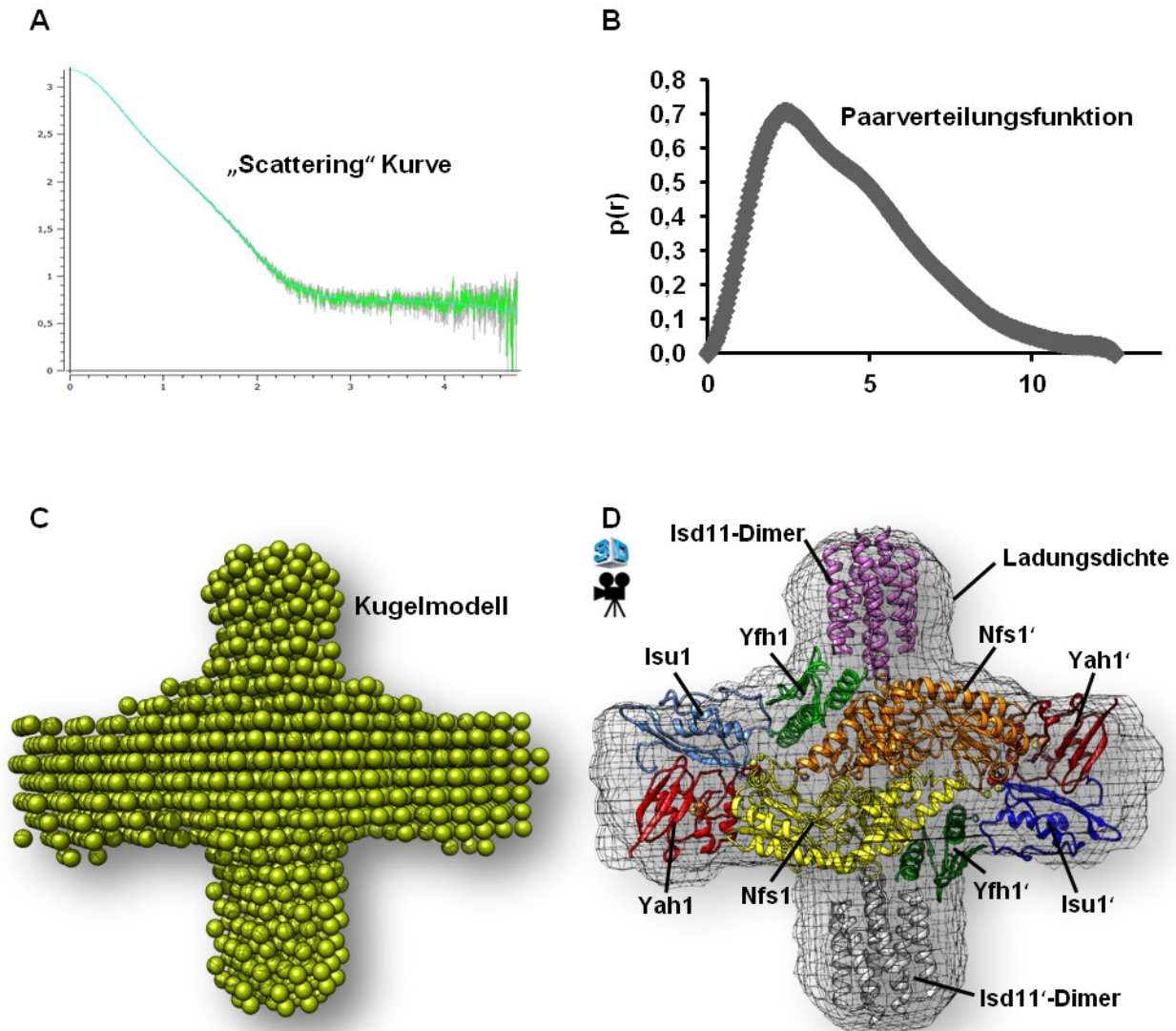


Abb. 4.29.: Der dodekamere Komplex der frühen ISC-Maschinerie; das „ISC-Kreuz“. **A:** Die Scattering-Kurve lässt auf einen wohlgefalteten und nicht aggregierten Komplex schließen. **B:** Die Paarverteilungsfunktion weist auf einen definierten teilsymmetrischen, jedoch sowohl longitudinal als auch transversal oligomeren Komplex hin. Dies lässt auf eine kreuzförmige Struktur schließen. **C:** Das Kugelmodell der Berechnung der Ladungsdichte zeigt eine kreuzförmige Ausdehnung des ISC-Komplexes. **D:** Nach Berechnung der einzelnen Subkomplexe wurde der Gesamtkomplex berechnet und in die Ladungsdichte eingepasst. Die Lokalisationen von Isd11, Yah1, Isu1 und Yfh1 auf Nfs1 stimmen mit den zuvor bestimmten Subkomplexen überein. Es handelt sich um einen Dodekamer, welcher aus einem Homodimer zweier Heterohexamere besteht. (vgl. Abb. 3D.16. und Vid. 7.)

den Elektronenfluss (Kostic et al., 2003). Hierfür kann es als „Elektronenbrücke“ fungieren (siehe 4.1.3.3.), wobei es das Elektron, ausgehend vom [2Fe-2S]-Cluster des Yah1, in Richtung Tyr77 und damit hin zu den konservierten Cysteinen des Isu1 leitet. Damit kann erstmals, innerhalb der auflösungsbedingten Grenzen, ein Elektronentransportweg durch das Ferredoxin Yah1 bei der *de-novo*-Bildung von Fe/S-Clustern postuliert werden (Abb. 4.30.). Weiter kann anhand der hier gezeigten räumlichen Nähe des Frataxins Yfh1, insbesondere seines Histidins 23, in Relation zum aktiven Zentrum des Isu1 und der Interaktionsstudien zu Yfh1 und Fe(II) die Hypothese des Frataxins als Eisendonator weiter gefestigt und untermauert werden. Im Speziellen zeigt sich hier, dass sehr wahrscheinlich das konservierte und mehrfach als Eisenbindungsstelle bezeichnete His23 (siehe 1.2.5.3., humanes Frataxin His86) in räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum des Isu1 zum Liegen kommt. Die Distanz

von ~14 Å zwischen His23 und dem essentiellen Cys64 auf Isu1 kann durch das ebenfalls essentielle His106 auf Isu1 weiter auf ~8 Å (His23^{Yfh1} → His106^{Isu1}) und 6,5 Å (His106^{Isu1} → Cys64^{Isu1}) überbrückt und verkürzt werden. Auch das konservierte Cys37 auf Isu1 befindet sich in ähnlicher Entfernung von ~14 Å zu His23 auf Yfh1 (Abb. 4.30.). Somit ist auch hier eine Eisenübergabe denkbar. Neben den Faktoren, welche alle essentiell und biochemisch direkt am Prozess beteiligt sind, konnte auch die ungefähre Lage von Isd11 auf einem funktionell aktiven Komplex gezeigt werden. Die Funktion von Isd11 jedoch ist aus der hier gezeigten globalen Struktur nicht ersichtlich. Dies hängt einerseits mit den fehlenden strukturellen Daten des Isd11, andererseits mit der Lage des Isd11 Dimers auf Nfs1 zusammen. Es zeigt sich, dass Isd11, wie in 4.1.5.1. für Nfs1/Isd11 alleine schon beschrieben, auch im Komplex einen hydrophoben Teil der Oberfläche von Nfs1 besetzt. Jedoch existiert keine direkte Verbindung von Isd11 mit dem aktiven Zentrum von Nfs1 und es befindet sich nicht in räumlicher Nähe zu einem der übrigen Komponenten. Damit kann eine offensichtliche, direkte und mechanistische Beteiligung von Isd11 an der Synthese eines Fe/S-Clusters ausgeschlossen werden. Vielmehr legen die Daten eine regulatorische Funktion nahe (Diskussion siehe 5.3.1.).

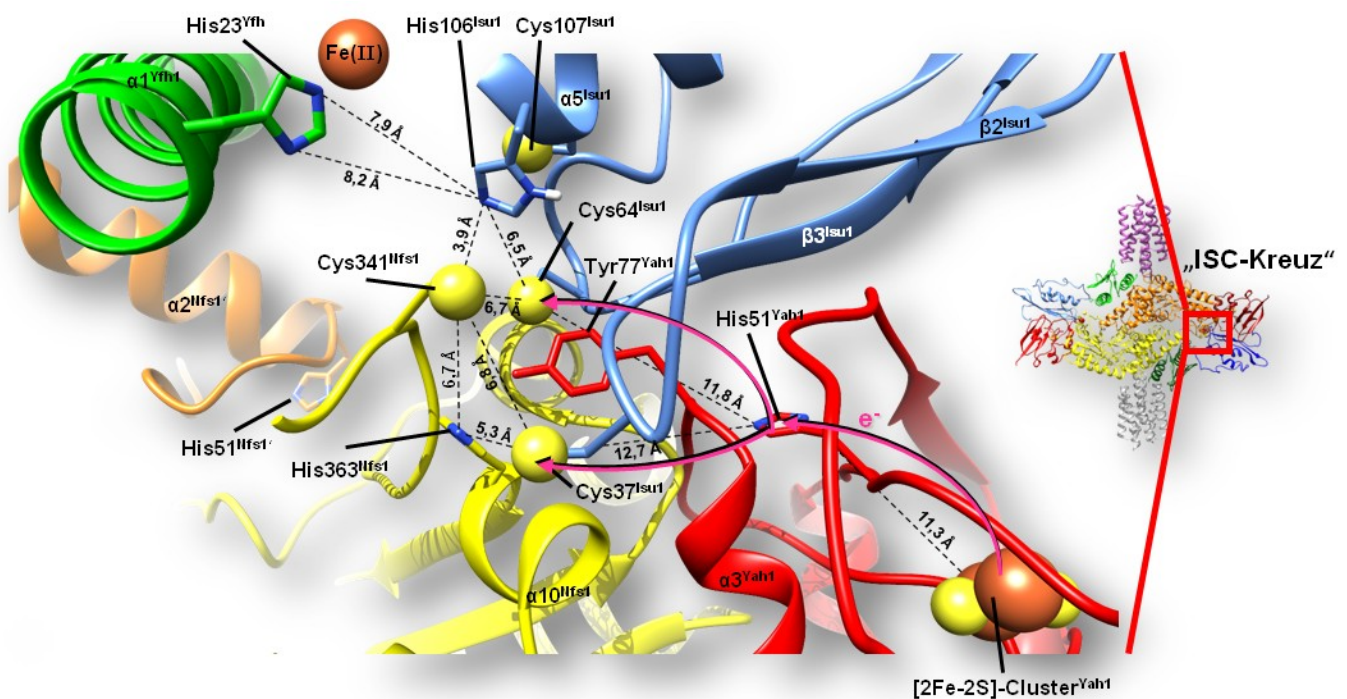



Abb. 4.30.: Model der frühen ISC-Maschinerie auf molekularer Ebene: Intramolekulare Abstände können als gesichert, intermolekulare Abstände als Näherungswert angesehen werden. Alle intermolekularen Abstände basieren auf der invariablen Lokalisation der entsprechenden Aminosäurereste. Yfh1 (grün), Isu1 (blau) und Yah1 (rot) kommen allesamt in räumlicher Nähe des Cys341 auf Nfs1 (gelb/orange) zum Liegen. Tyr77 des Yah1 dringt dabei in das aktive Zentrum von Isu1 ein und befindet sich in der Mitte von Cys37, Cys64 (Isu1) und Cys341 (Nfs1). Die Abstände von Cys37 und Cys64 jeweils zu Cys341 betragen je unter 7 Å, was eine Persulfidübertragung auf beide Cysteine des Isu1 möglich macht. His51 des Yah1 befindet sich auch für beide Cysteine in einer Entfernung, welche eine effiziente Elektronenübertragung zulässt (12,7 Å für Cys37 und 11,8 Å für Cys64). Die Entfernung von His51 zum [2Fe-2S]-Cluster des Yah1 beträgt dabei 11,3 Å. Die Lage des Yfh1 lässt eine potentielle Eisenübergabe zu. Das konservierte His23 des Yfh1 ist dafür nahe dem konservierten His106 des Isu1 lokalisiert (Entfernung ~8 Å). Dies könne auch die Wichtigkeit von His106 des Isu1 bedingen und definiert dieses als mögliche „Eisenbrücke“.

 (vgl. Abb. 3D.17.)

4.2. Die Rolle des Komplexes aus Yah1 und Isu1 ist hochkonserviert

Um neben der sequentiellen (siehe Abb. 5.1. für Yah1 bzw. Anhang Abb. A.3. für Isu1 und A.9. für Nfs1 und Yfh1) und, soweit bekannt, der strukturellen (vgl. Abb. 1.7., 1.9., 1.10.) auch die mechanistische Konservierung der frühen ISC-Maschinerie und im Speziellen die der Rolle und Funktion des Isu1-Yah1-Komplexes auch über weite evolutionäre Entfernung zu überprüfen, wurde der Modellorganismus *Trachipleistophora hominis* (*T. hominis*) herangezogen. Da dieser Organismus nicht, oder nicht mehr, über voll funktionsfähige Mitochondrien, sondern über Mitosomen verfügt, eignet er sich hervorragend zur Überprüfung der Hypothese, dass die Zusammensetzung und Funktion der frühen ISC-Maschinerie eine kaum veränderliche Konstante in allen Reichen des Lebens darstellt. Hierzu wurden zunächst alle erforderlichen Proteine aus *T. hominis* mittels rekombinanter Expression in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt (siehe 3.2.4.) (Abb. 4.31.). Zur anschließenden mechanistischen Überprüfung wurde das bereits etablierte CD-basierte Isu1-Rekonstitutions-Testverfahren verwendet (Webert et al., 2014). Hierfür wurde zunächst die Qualität des *T. hominis* Isu1 (ThIsu1) durch chemische Rekonstitution überprüft. ThIsu1 zeigte in seiner *holo*-Form ein nahezu identisches CD-Spektrum zum Isu1 aus *S. cerevisiae* oder *C. thermophilum* (Abb. 4.31). Weiter konnte gezeigt werden, dass ThIsu1 auch mit Hilfe der frühen ISC-Maschinerie aus *C. thermophilum* maturiert werden konnte, was die funktionelle Homologie der beiden Gerüstproteine aus unterschiedlichsten Organismen nachweist.

Um den konservierten Charakter der Ferredoxine weiter experimentell zu untersuchen, wurde ein Rekonstitutionsexperiment mit ThFdx und den primären ISC-Komponenten aus *C. thermophilum* durchgeführt. Wie erwartet konnte Isu1 maturiert werden, jedoch mit einer leicht verringerten Rate. Dies hängt sehr wahrscheinlich mit der Effizienz der Reduktion des Ferredoxins zusammen, da wie zuvor die humane FdxR verwendet wurde. Die evolutionäre Distanz von *T. hominis* und *Homo sapiens* führt wahrscheinlich zu einer verringerten Reduktionsrate und damit zu einer langsameren Bildung von Fe/S-Clustern.

Nachdem die funktionellen Homologien des Gerüstproteins und des Ferredoxins nachgewiesen werden konnten, wurde die Abhängigkeit des Systems von allen frühen ISC-Komponenten überprüft. Es zeigte sich klar, dass die frühe ISC-Maschinerie von *T. hominis* aus denselben Komponenten aufgebaut ist wie die von *S. cerevisiae* oder *C. thermophilum* (Abb. 4.32.). Wurde die Reaktion in Abwesenheit einer der ISC-Komponenten durchgeführt, konnte nur noch eine Hintergrundaktivität beobachtet werden (Diskussion siehe 5.4.). Die Reaktionsgeschwindigkeit des mitochondrialen Systems war ähnlich der des Systems aus *C. thermophilum* (Umsatzraten *C.t.*: 0,68 versus *T.h.*: 0,75). Auch die Effizienz der Fe/S-Cluster

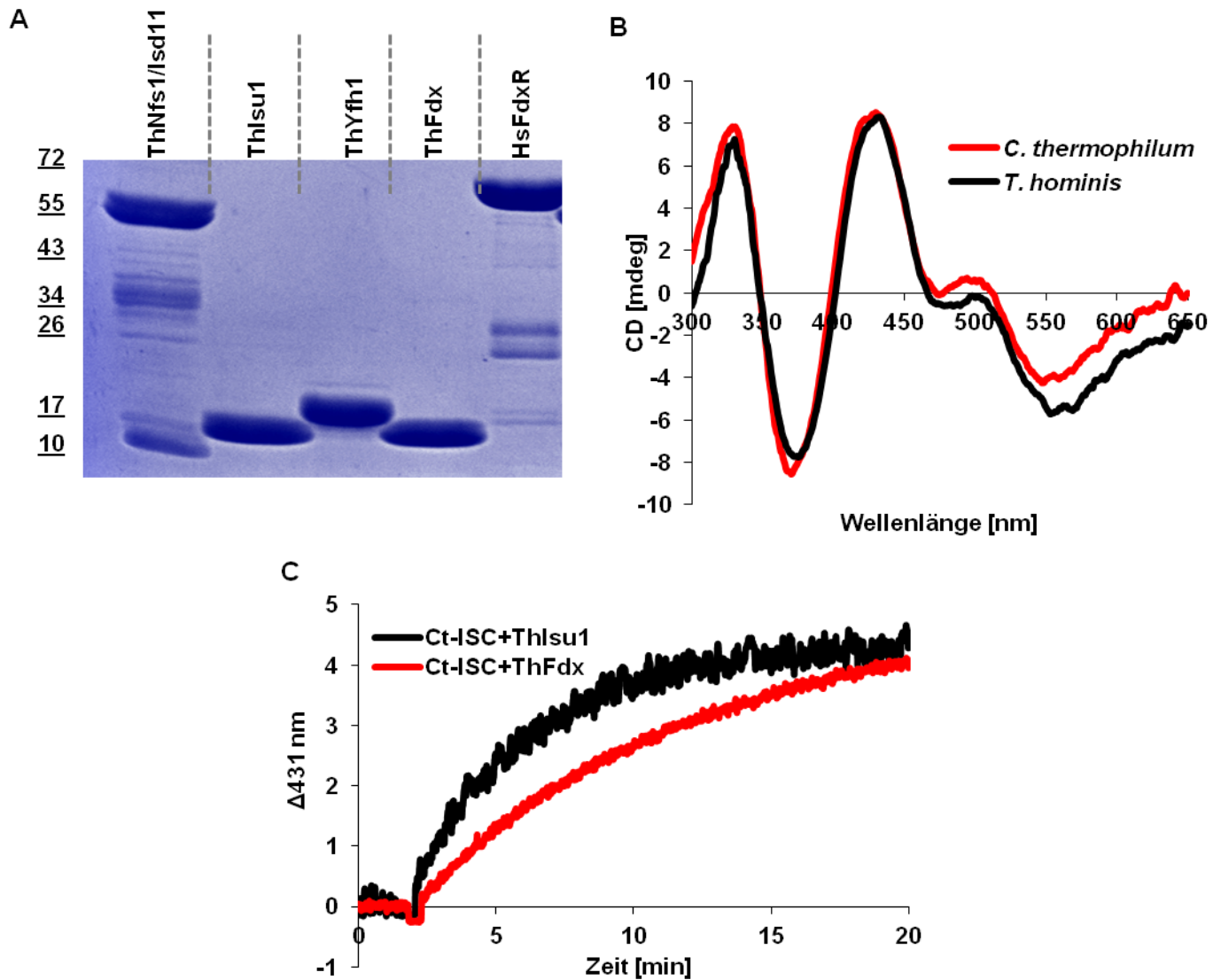


Abb. 4.31.: Die ISC-Komponenten von *T. hominis* sind hochkonserviert und können die die von *C. thermophilum* ersetzen. **A:** SDS-PAGE der gereinigten Proteine aus *T. hominis*. **B:** Die CD-VIS-Spektren von CtIsu1 (rot) und ThIsu1 (schwarz) sind sehr ähnlich. 100µM CtIsu1 oder ThIsu1 wurden chemisch (FeCl₃, Li₂S, DTT) rekonstituiert. **C:** Maturierung von 50 µM ThIsu1 mit Hilfe der ISC-Maschinerie aus *C. thermophilum* (schwarz) und von 50 µM CtIsu1 mit Hilfe des Fdx aus *T. hominis* (übrige Proteine aus *C. thermophilum*, rot).

Bildung war ähnlich, worauf ähnlich große Endsignale bei identischer Isu1-Konzentration hindeuten (~ 4 mdeg bei 50 µM Isu1) (Abb. 4.32.).

Diese beeindruckenden Gemeinsamkeiten und die vollständige Konservierung der frühen ISC-Faktoren legen nahe, dass es sich hier um einen über weite evolutionäre Distanzen hinweg hoch konservierten Mechanismus handelt. Dies ist umso bemerkenswerter, da Mitosomen alle anderen klassischen mitochondriellen Funktionen verloren haben. Offensichtlich wurde während der drastischen Reduktion des Organells die wichtige Funktion der Fe/S-Proteinbiogenese nicht oder nur unwesentlich verändert.

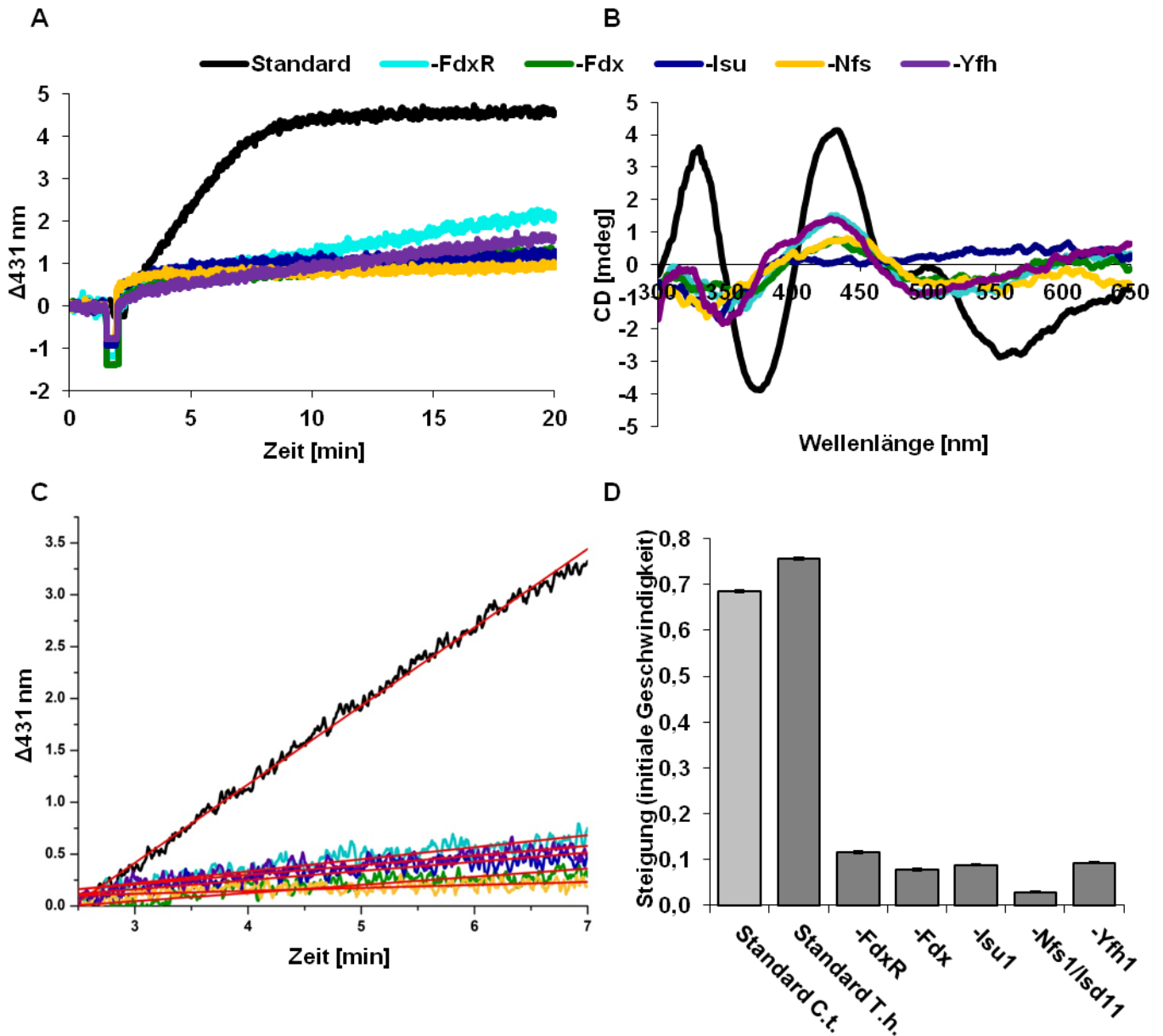


Abb. 4.32.: Die frühe ISC-Maschinerie von *T. hominis* ist abhängig von allen bekannten Faktoren: Farbgebung gilt für die Abbildungen A-C. **A:** CD-basierte Rekonstitutionsuntersuchung für die Maturierung von Thlsu1 mit Hilfe der frühen ISC-Maschinerie aus *T. hominis*. Nur bei Zugabe aller Komponenten, Cystein und Fe(II) findet eine schnelle und effektive Maturierung von Thlsu1 statt. **B:** CD-Spektren der entsprechenden Probe aus A nach 20 Minuten. Ein ausgeprägtes Signal für einen [2Fe-2S]-Cluster auf Thlsu1 ist nur in der Standardreaktion zu sehen. **C:** Initiale Steigung der Kurven aus A. Die Steigungen repräsentieren die initialen Geschwindigkeiten der Reaktionen. **D:** Balkendiagramm der initialen Steigung. Lediglich die Standardreaktion mit den Komponenten aus *T. hominis* zeigt eine vergleichbare Geschwindigkeit wie die von *C. thermophilum*. Alle übrigen Reaktionen zeigen lediglich eine Hintergrundaktivität.

5. Diskussion

5.1. Der Komplex aus Yah1 und Isu1 bildet sich redoxspezifisch

In dieser Arbeit konnte erstmals die Struktur des essentiellen Subkomplexes der frühen ISC-Maschinerie aus Yah1 und Isu1 mittels NMR gelöst werden. Es konnte gezeigt werden, welche Aminosäuren der beiden Proteine potentiell an der Interaktion beteiligt sind. Damit konnte auch ein Teil der Substratspezifität des Ferredoxins erklärt werden. Ein weiterer Teil dieser Spezifität ergab sich aus der Redoxabhängigkeit der Interaktion. So konnte erstmals demonstriert werden, dass für eine starke Interaktion von Yah1 und Isu1 eine vorhergehende Reduktion von Yah1 obligat ist. Die Reduktion führt innerhalb des Ferredoxins zu strukturellen Änderungen, welche die Grundlage für eine stärkere Interaktion bilden. Abschließend konnte ein möglicher Mechanismus des Elektronentransports auf molekularer Ebene postuliert werden.

5.1.1. Ferredoxine: So ähnlich und doch verschieden

Vergleicht man die Strukturen des Hefe-Ferredoxins Yah1 und der Ferredoxine FDX1 (ADX) und FDX2 des Menschen, so fallen wenige Unterschiede in ihrer Tertiärstruktur auf. Dies ist gerade mit Blick auf die funktionelle Divergenz der beiden humanen Ferredoxine überraschend. So ist das humane FDX1 an der Steroidbiosynthese beteiligt, das FDX2 jedoch vornehmlich der Biogenese von Fe/S-Clustern gewidmet (Sheftel et al., 2010). Erstaunlich ist, dass gerade die Aminosäurereste, welche in dieser Arbeit mittels NMR als mögliche Interaktionsstellen für die Heterodimerisierung mit Isu1 bestimmt wurden, sowohl in Ferredoxinen des MB-Typs als auch in Ferredoxinen des Typs FDX1 hoch konserviert sind. Dies lässt den Schluss zu, dass diese Region nur in geringem Maße an der Substratspezifität beteiligt ist, und deutet darauf hin, dass diese Aminosäurereste im Gegenteil vielmehr eine universelle Rolle in der Funktion aller Ferredoxine erfüllen. Die durch die Interaktion mit Isu1 bedeckte Fläche auf Yah1 beträgt jedoch etwa 1614 \AA^2 , was auf ein umfangreiches Interaktionsareal schließen lässt, welches nicht ausschließlich aus den vier durch NMR-basierte chemische Verschiebungen bestimmten Aminosäuren gebildet wird. Vielmehr umfasst es, auf Basis des berechneten Komplexes aus Yah1 und Isu1, auch den C-Terminus des Ferredoxins. Hierfür konnten allerdings wegen der enormen Flexibilität und der Delokalisation der C-terminalen Region keine ^1H - ^{15}N -HSQC Daten und daher keine chemischen Verschiebungen gesammelt werden. Wendet man den Fokus nun aber auf genau diese, sekundär bestimmten Interaktionsstellen, so lässt sich eine wichtige Rolle des C-Terminus auch strukturell vorhersagen. Funktionell wurde bereits gezeigt, dass humanes FDX1 durch Austausch der letzten 24 Aminosäuren partiell in FDX2 umgewandelt wird und den Verlust von Yah1 in Hefe kompensieren kann (Dissertation Holger Webert, 2011). Hier

ist auch ein augenscheinlicher Unterschied der beiden Ferredoxinklassen in ihrer Primärstruktur zu sehen. Ferredoxine des Typs FDX1 verfügen über einen deutlich verkürzten C-Terminus, wobei MB-Typ-Ferredoxine in ihrem langen C-Terminus ein konserviertes TRN-Motiv aufweisen (Abb. 5.1.). Auch die Sekundärstruktur der beiden Ferredoxin-Typen unterscheidet sich hier. Der C-Terminus des humanen FDX1 weist im Gegensatz zu Yah1, als Vertreter der MB-Typ Ferredoxine, einen α -helikalen Anteil am äußersten C-Terminus auf (Abb. 5.1.). Es muss also davon ausgegangen werden, dass der C-Terminus von Ferredoxinen einen großen Teil der Substratspezifität vermittelt, wobei aber auch das unterschiedliche Reduktionsverhalten der beiden Klassen eine wichtige Rolle spielt. So ist, wie im Falle von Yah1, auch bei FDX2 durch Reduktion eine deutliche Verbesserung in der Interaktion mit Isu1 zu beobachten (Abb. 5.1.). Dies ist jedoch bei FDX1 nicht der Fall. Für FDX1 in seinem oxidierten Zustand wurde eine im Vergleich zu oxidiertem FDX2 leicht verminderte Affinität zu Isu1 bestimmt ($K_d = 5,7 \mu\text{M}$). Nach Reduktion des FDX1 konnte jedoch keine Verbesserung der Interaktion, wie im Falle von FDX2, detektiert werden; im Gegenteil kam es zu einem völligen Zusammenbruch der Interaktion. Dies könnte darauf hinweisen, dass auch FDX1 eine konformationelle Änderung durch Reduktion durchmacht, sich diese aber von der in MB-Typ Ferredoxinen deutlich unterscheidet. Man kann vermuten, dass diese Konformationsänderung auch die Interaktion des FDX1 zu Zytocrom P450 deutlich erhöht. Dies zeigt anschaulich, dass strukturelle Veränderungen eines Ferredoxins durch Reduktion eine essentielle Rolle bei der Vermittlung der Substratspezifität spielen.

Die Reaktion (Struktur und Oberflächenladung) des Yah1 auf Reduktion ist jedoch nicht ausschließlich für eine Verbesserung der Substratspezifität und damit für eine verstärkte Interaktion mit Isu1 verantwortlich, sondern trägt auch maßgeblich zu einem effektiven Elektronentransport bei. Die beiden augenscheinlichsten Änderungen neben den beschriebenen strukturellen Änderungen betreffen hier die Oberflächenladung und die Verschiebung von intramolekularen Kavitäten in Yah1. Die Verschiebung dieser Kavitäten verhält sich hierbei wie das Öffnen einer molekularen Schranke, wobei eine räumliche Verbindung des reduzierten Fe/S-Clusters und des His51 geschaffen wird. Gleichzeitig wird durch die Änderung der Oberflächenladung sowohl ein Ladungsgradient erstellt, als auch der potentielle Elektronentransportweg durch negative Ladungen seitlich begrenzt (Abb. 5.1.). Durch dieses Verhalten kann im reduzierten Yah1 ein spezifischer, unidirektionaler und gerichteter Elektronenfluss gewährleistet werden. Es ist also zu vermuten, dass das Ferredoxin Yah1 sowohl die Elektronen für die Fe/S-Cluster Biogenese liefert, als auch selbst für deren Übertragung sorgt, indem es eine intrinsische Schranke öffnet und den Elektronenpfad genau vorgibt.

Abb. 5.1. Unterschied der Ferredoxin-Klassen und Spezifität von Yah1 bzw. FDX2. **A:** Ferredoxine zeigen auch zwischen den Klassen eine hohe Sequenzidentität (rote Pfeile: *T. hominis* Fdx). MB-Typ-Ferredoxine besitzen im Gegensatz zu FDX1-Ferredoxinen ein konserviertes TRN-Motiv am C-Terminus (grün). Die Bindestelle des [2Fe-2S]-Clusters (gelb) sowie das His51 (hellblau) sind in beiden Typen stark konserviert. Die Bindestelle zu Isu1 ist grau hinterlegt. Das essentielle Glu38 ist in FDX1-Ferredoxinen nicht konserviert. Die redoxsensitive Region auf Helix $\alpha 3$ (AYG, grau) ist auch in FDX1-Typen konserviert. Pfeil in rosa zeigt den Start des rekombinant exprimierten Proteins an. (Sc: *S. cerevisiae*; Yl: *Y. lipolytica*; Ca: *C. albicans*; Ct: *C. thermophilum*; Cg: *C. globosum*; Nc: *N. crassa*; Af: *A. fumigatus*; Eg: *E. gossypii*; Ce: *C. elegans*; Dm: *D. melanogaster*; Hs: *H. sapiens*; Bt: *B. taurus*; Mm: *M. musculus*; Rn: *R. norvegicus*; Th: *T. hominis*; Vc: *V. cholerae*; Av: *A. vinelandii*) **B:** Vergleich von FDX2 (pdb: 2Y5C), Yah1 und FDX1 (pdb: 3P1M). Der C-Terminus von FDX2 wurde bis heute nicht aufgelöst. Von Yah1 und FDX1 sind die Strukturen der C-Termini bekannt und unterscheiden sich in ihrer Sekundärstruktur. Der C-Terminus von FDX1 beinhaltet im Gegensatz zu Yah1 eine α -helikale Region. **C:** FDX1 und FDX2 unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität (aus (Webert et al., 2014)). Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde Thermophorese mit markiertem Isu1 verwendet. Es wurde entweder FDX1 oder FDX2 in angemerktem Redoxzustand titriert. FDX2 zeigt dieselbe Redoxabhängigkeit wie Yah1 (vgl. Abb. 4.19.), wohingegen FDX1 in reduziertem Zustand keinerlei Affinität zu Isu1 zeigt. (n. a.: nicht auswertbar) **D:** Vergleich der Oberflächenladungen von oxidiertem und reduziertem Yah1. Oxidiertes Yah1 zeigt einen Ladungsgradienten in Richtung des Fe/S-Clusters (gelber Pfeil), was eine Reduktion durch FdxR vereinfacht. Reduziertes Yah1 beinhaltet einen Ladungsgradienten vom Fe/S-Cluster in Richtung (gelber Pfeil) Interaktionsfläche mit Isu1 (durch blauen Balken angedeutet), was die Elektronenübertragung auf Isu1 effizient gestaltet.

5.1.2. Isu1: Ein hochkonserviertes Gerüstprotein der Fe/S-Cluster Biogenese

Die in dieser Arbeit präsentierte Struktur des Isu1 stellt die zweite bis heute gelöste Struktur eines eukaryotischen Fe/S-Gerüstproteins dar. Neben der Struktur des IscU aus verschiedenen bakteriellen Organismen ist lediglich die des IscU der Maus (*Mus musculus*) bekannt. Letztere wurde im Komplex mit einem Zink-Ion mittels NMR gelöst (Abb. 5.2., pdb: 1WFZ). Die Koordinationsstelle des Zn ist identisch mit dem aktiven Zentrum und der Bindestelle des Fe/S-Clusters, wie sie sich beispielsweise in der Struktur des IscU aus *Aquifex aeolicus* darstellt, wobei es sich hier um die Kristallstruktur eines asymmetrischen IscU-Trimers handelt (Abb. 5.2., pdb: 2Z7E), welche *in vivo* keine physiologische Relevanz haben dürfte. In allen Fällen, ob mit oder ohne Kofaktor, ist das aktive Zentrum des Gerüstproteins hoch konserviert. Der genaue Oligomerisierungszustand des Isu1 nach erfolgter Fe/S-Cluster Synthese ist allerdings nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Es wird jedoch angenommen und allgemein akzeptiert, dass das Endprodukt der frühen ISC-Maschinerie ein homodimerer [2Fe-2S]-gebrückter Komplex aus Isu1 ist (Webert et al., 2014). Dies steht im Konsens mit den hier vorgestellten Daten, da eine Koordination eines Fe/S-Clusters durch die drei Cysteinreste (Cys38, Cys64, Cys107) und dem Histidinrest (His106) zwar grundsätzlich möglich ist, durch die geringe Flexibilität von Cys107 und His106 jedoch eher unwahrscheinlich scheint. Auch der heterodimere Komplex aus Yah1 und Isu1 legt eine spätere Homodimerisierung nahe, da ein effizienter Elektronentransfer maximal auf zwei der drei Cysteinreste möglich ist, wobei der dritte Cysteinrest (Cys107) dabei weit vom aktiven Zentrum entfernt zum Liegen kommt (vgl. Abb. 4.30.). Damit lässt sich auch vermuten, dass lediglich Cys64 und Cys38 als Empfänger eines Persulfids in Frage kommen, da sich nur diese in einer produktiven Entfernung zum Donor-Cystein Cys341 des Nfs1 und zum Elektronenlieferanten Yah1 befinden.

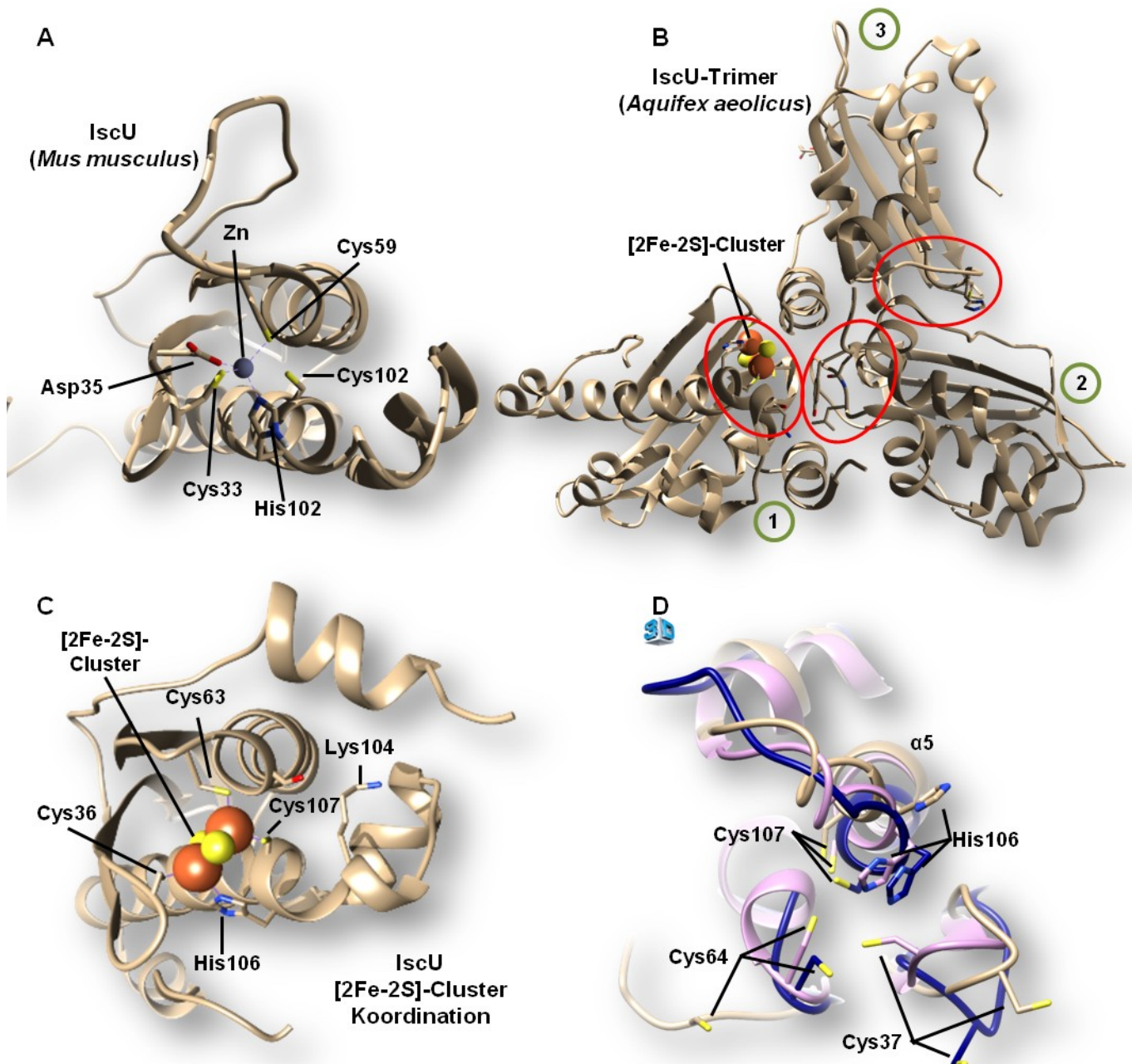


Abb. 5.2. Das aktive Zentrum des Gerüstproteins Isu1 ist strukturell hochkonserviert. **A:** NMR-basierte Struktur des IscU von *Mus musculus* (pdb: 1WFZ). Das aktive Zentrum koordiniert ein Zink-Ion, wobei Cys102 (Isu1-Cys107) kein Ligand ist. Zusätzlich zu Cys33, Cys59 und His101 ist Asp35 an der Koordination beteiligt. **B:** Trimere Konfiguration des IscU aus *Aquifex aeolicus* (pdb: 2Z7E). Die Untereinheit 1 koordiniert im Gegensatz zu 2 und 3 einen [2Fe-2S]-Cluster. Die roten Kreise weisen auf das aktive Zentrum der jeweiligen Untereinheit hin. **C:** Aktives Zentrum von IscU aus *Aquifex aeolicus*. Der [2Fe-2S]-Cluster wird von den drei konservierten Cysteinen und dem ebenfalls konservierten Histidin koordiniert, wobei Lys104 hier die Sekundärstruktur von Helix $\alpha 5$ aufbricht. **D:** Das aktive Zentrum der Gerüstproteine von Bakterien und Eukaryoten ist hoch konserviert (*M. musculus*: rosa, *C. thermophilum*: blau, *E. coli*: beige). Im Speziellen fällt hier die konservierte Lage der essentiellen Aminosäurereste von Cys37, Cys64, Cys107 und His106 auf (vgl. Abb. 4.14.).

5.1.3. Der 3D-Struktur des Yah1-Isu1-Komplexes

Die Interaktionsstellen auf Yah1 und Isu1 für den jeweils anderen Partner wurden mit Hilfe von NMR auf Basis von chemischen Verschiebungen bestimmt. Im Falle des Yah1 besteht wenig Zweifel daran, dass die bestimmten Aminosäurereste auch tatsächlich direkt an der Interaktion beteiligt sind, da es sich um eine sehr geringe Anzahl an Resten und damit um

eine sehr definierte Region handelt. Vielmehr besteht hier die Möglichkeit, dass auf Grund fehlender ^1H - ^{15}N -HSQC-Informationen gerade im Hinblick auf den C-Terminus einige Interaktionsstellen nicht detektiert werden konnten (vgl. 5.1.). Im Fall von Isu1 stellt sich dies konträr dar. Hier wurden mindestens 6 Aminosäuren gefunden, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit (weite Distanzen vom Zentrum der chemischen Verschiebungen) nur aus sekundären Gründen eine Änderung im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum zeigen. Dies lässt sich hauptsächlich auf intramolekulare Rückkopplung zurückführen, da diese Regionen entweder direkt am aktiven Zentrum des Proteins (103-105, 91) oder in der Verlängerung von Strang $\beta 3$ (53-55), auf welchem der Großteil der potentiellen Interaktionsstellen lokalisiert ist, liegen (Abb. 5.3.).

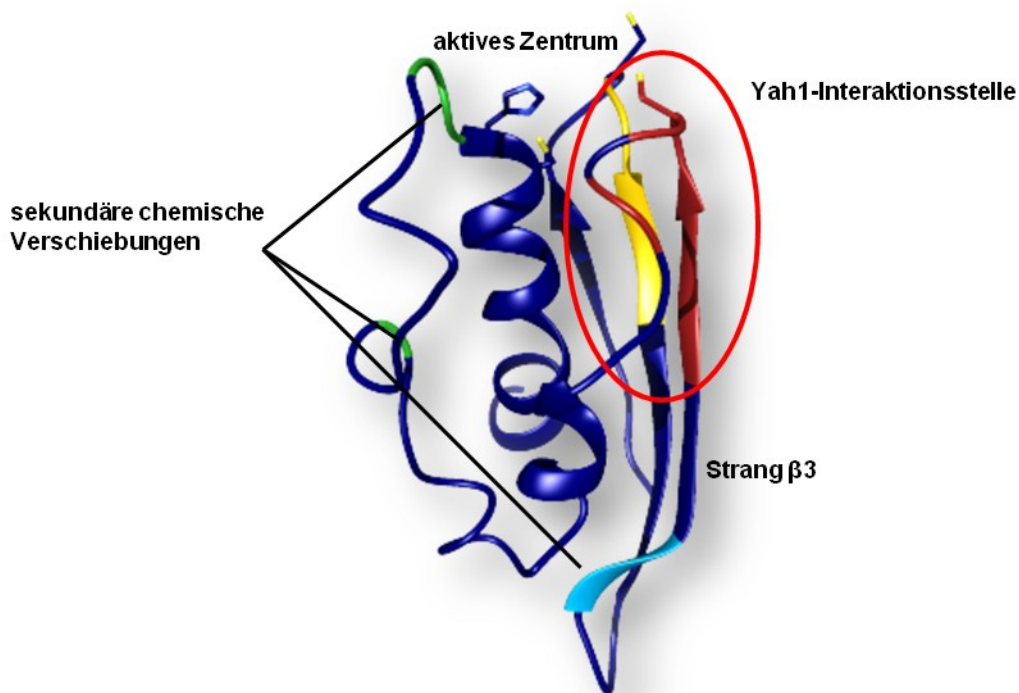


Abb. 5.3. Sekundäre chemische Verschiebungen auf Isu1. Isu1 zeigt bei Interaktion mit Yah1red auch chemische Verschiebungen, die vermutlich nicht die direkte Interaktionsfläche anzeigen, sondern sekundäre Strukturveränderungen beinhalten. In grün und hellblau sind diese chemischen Verschiebungen markiert. In gelb und rot sind diejenigen Aminosäuren markiert, welche das Zentrum und damit die wahrscheinliche Interaktionsstelle von Yah1 darstellen. Der rote Kreis umfasst die per NMR bestimmte Interaktionsfläche mit Yah1.

Der Komplex aus Yah1 und Isu1 präsentiert sich als Heterodimer, welcher mit Hilfe von HADDOCK auf Basis der beschriebenen chemischen Verschiebungen errechnet wurde. Er besitzt eine erstaunlich große Berührungsfläche, was auf eine hohe Oberflächenkomplementarität hinweist. Der HADDOCK score befindet sich mit $-121,1 \pm 1,7$ in einem Bereich, in dem die Berechnung als sehr verlässlich angesehen werden kann. Darauf deuten auch RMSD ($0,8 \pm 0,5$) und Z-Score ($-1,4$) hin. Ein weiteres Qualitätsmerkmal stellt die Clustergröße dar. Hier wurden 156 von insgesamt 200 Strukturen einem

HADDOCK-Cluster zugeschrieben, was zeigt, dass hier kaum Varianzen in der Orientierung der beiden Proteine zueinander zu finden sind. Damit kann abschließend festgestellt werden, dass der berechnete Komplex sehr wahrscheinlich die physiologisch relevante räumliche Ausdehnung des Komplexes aus Yah1 und Isu1 widerspiegelt und das erste Mal einen Blick auf einen wichtigen Subkomplex der Fe/S-Cluster Biogenese gewährt. Vergleicht man diesen Komplex mit dem bereits gezeigten Komplex aus FDX2 und seiner Reduktase AdxR (humane Homologe von Yah1 und Arh1) (Müller et al., 2001), so fällt auf, dass sich diese Interaktionsstellen stark überschneiden (Abb. 5.4.). Dies deutet auf einen spezifischen Elektronentransportweg hin, durch welchen Elektronen in beide Richtungen transportiert werden können. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zum möglichen Mechanismus des

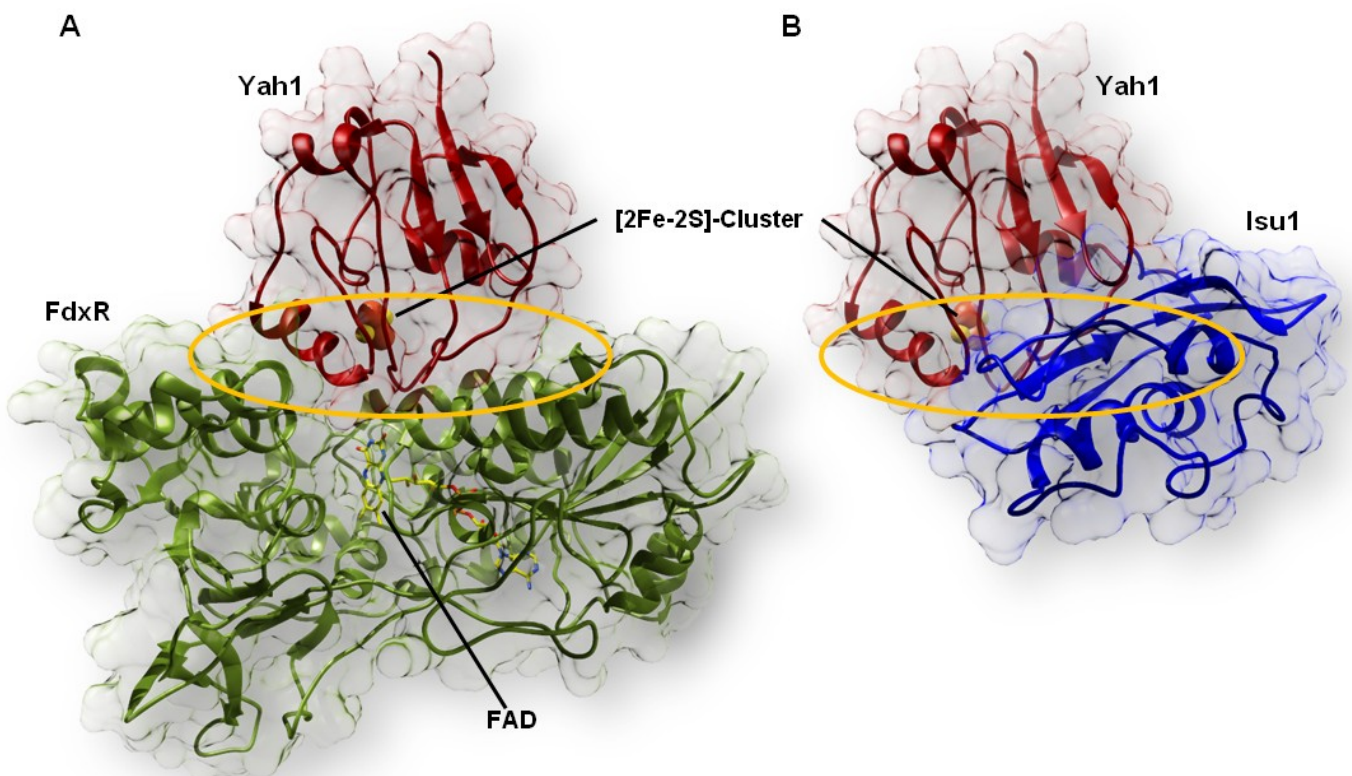


Abb. 5.4. Die konservierte Interaktionsstelle für FdxR und Isu1 auf Yah1. A: Komplex von FdxR (grün) mit Yah1 (rot) auf Basis des FdxR-FDX1 Heterodimeres aus *Bos taurus* (pdb: 1E6E). Die mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmte Interaktionsstelle von FdxR auf FDX1 bzw. Yah1 ist im Bereich von Helix $\alpha 3$ der gegenüberliegenden Seite des Fe/S-Clusters lokalisiert. Der gelbe Kreis umschließt die konservierte Interaktionsfläche auf Yah1 mit seiner Reduktase. **B:** Die in dieser Arbeit auf Basis von NMR bestimmte Struktur des Heterodimers aus Yah1 und Isu1. Die Interaktionsstelle von Isu1 auf Yah1 ist der, von FdxR sehr ähnlich. Der gelbe Kreis (gleiche Orientierung wie in A) zeigt, dass die Interaktionsstelle von FdxR auf Yah1 nur teilweise mit der von Isu1 auf Yah1 überlappt.

Elektronentransports, auch gerade im Hinblick auf die Oberflächenladung (vgl. 5.1.1.), zeigen, dass eine Interaktion von Yah1 mit seiner Reduktase sehr wahrscheinlich nur stattfinden kann, wenn Yah1 oxidiert vorliegt. Auch ein effizienter Elektronentransport erscheint nur möglich, wenn der entsprechende Ladungsgradient durch Oxidation im Vergleich zum reduzierten Zustand des Ferredoxins umgekehrt wird. So kann davon

ausgegangen werden, dass der in dieser Arbeit beschriebene Elektronentransportweg bidirektional funktioniert und dass die beobachteten redoxabhängigen Ladungs- und Strukturveränderungen eine große Rolle auch für die Interaktion mit der Ferredoxinreduktase und damit für einen erfolgreichen zyklischen Ablauf des Gesamtprozesses spielen.

5.2. Die ISC-Maschinerie beinhaltet ein komplexes Interaktionsnetzwerk

Bis heute war unklar, welche der Komponenten der frühen ISC-Maschinerie miteinander interagieren und welcher Natur diese Interaktionen sind. Die Bestimmung einer Interaktionskarte der frühen ISC-Maschinerie war von zentraler Wichtigkeit für deren Verständnis und bietet nun erstmals detailreiche Einblicke in deren Mechanismus und Sequenz.

5.2.1. Frataxin: Ein Protein mit zwei Funktionen?

Der wohl am meisten beforschte, jedoch in Bezug auf die Fe/S-Cluster Biogenese am wenigsten funktionell verstandene Faktor der frühen ISC-Maschinerie ist das Frataxin (in dieser Arbeit dessen Hefehomolog Yfh1). Bis heute bleibt die Funktion dieses Proteins rätselhaft. Auf Basis der Menge an Publikationen bezüglich Eisenbindung und Eisenanlieferung (Adinolfi et al., 2002; Aloria et al., 2004; Babcock et al., 1997; Foury, 1999; Gentry et al., 2013; Nair et al., 2004; Schagerlöf et al., 2008; Stemmler et al., 2010) wurde in dieser Arbeit nicht nur die Interaktion mit anderen ISC-Faktoren überprüft, sondern auch die Eisenbindung bestimmt. Gegenüber der hohen Affinität zu Fe(II) ($19 \pm 6,2$ nM) konnten die Experimente mit Fe(III) nicht ausgewertet werden. Frataxin tendiert stark zur Aggregation bei Zugabe von Eisen in seiner oxidierten Form. Diese Aggregation hat allerdings sehr wahrscheinlich in Eukaryoten keine physiologische Relevanz, da das Milieu, in dem Frataxin vornehmlich arbeitet, stark reduzierend ist (Mitochondrien, Mitosomen, etc.). Die spezifische Bindung von Eisen in seiner reduzierten Form hingegen führte nicht zu einer Aggregation. Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass Frataxin lediglich Fe(II) zur Verfügung stellen kann, was mit den Ansprüchen an eine Eisenquelle für die Fe/S-Cluster Biogenese im Konsens steht. Damit könnte Frataxin *in vivo* durchaus die Funktion eines Eisen-Donors übernehmen.

Hierauf deutet auch das Interaktionsmuster von Yfh1 hin. Wie erwartet interagiert Yfh1 sowohl mit dem Desulfurasekomplex Nfs1/Isd11 als auch mit dem Gerüstprotein Isu1, kommt also an einer Stelle zum Liegen, wo Eisen benötigt wird. Auch die gezeigte Verstärkung der Interaktionen des Frataxins mit Nfs1/Isd11 und Isu1 durch Zugabe von Fe(II) unterstützt die Hypothese des Eisen-Donors weiter. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur Interaktion des Frataxins mit dem Ferredoxin Yah1 hingegen müssen angezweifelt werden. Auf Basis der vorhandenen und in dieser Arbeit bestätigten Daten kann

davon ausgegangen werden, dass Frataxin im Bereich der Helix $\alpha 2$ von Nfs1 zum Liegen kommt. Betrachtet man nun die Lage von Isu1 auf Nfs1 und die Lage von Yah1 auf Isu1, so ist klar ersichtlich, dass Yfh1 mit Bezug auf Isu1 distal zu Yah1 bindet (vgl. Abb. 4.29.). Ein weiterer Umstand, welcher die direkte Interaktion von Yfh1 mit Yah1 fragwürdig macht, ist die Unabhängigkeit der Interaktion vom Redoxzustand von Yah1. Dieser hat keinen Einfluss auf die Bindungskonstante und ist damit gerade im Hinblick auf die strukturellen und ladungsbedingten Oberflächenänderungen des Ferredoxins durch Reduktion sehr zweifelhaft. Würde Frataxin funktionell relevant an Yah1 binden, würde es sehr wahrscheinlich die Region für eine Interaktion nutzen, welche für Yah1-Isu1 und Yah1-Arh1 gezeigt wurde (vgl. Abb. 5.4.). Diese Interaktionsstelle ist allerdings stark redoxsensitiv. Dies würde unweigerlich zu einer Veränderung der Bindungskonstante führen. Da dies aber nicht der Fall ist, muss die physiologische Relevanz dieser Interaktion angezweifelt werden.

5.2.2. Nfs1/Isd11: Der zentrale Dreh- und Angelpunkt der Fe/S-Cluster Biogenese

Der Desulfurasekomplex aus Nfs1 und Isd11 stellte sich als zentraler Synthesepunkt für die *de novo* Synthese des Fe/S-Clusters dar. Mit diesem Komplex interagieren die Faktoren der frühen ISC-Maschinerie Isu1, Yah1 und Yfh1. Alle Interaktionen zeigen sowohl eine Abhängigkeit vom Oxidationszustand des Systems als auch von der Anwesenheit von Cystein. Cystein ist in diesem Fall *de rigueur*, da ohne dessen Zugabe keinerlei Interaktionen bestimmt werden konnten. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist eine Änderung in der Tertiär- oder der Quartärstruktur des Nfs1/Isd11. Hierbei wäre denkbar, dass durch Eintritt von Cystein in den Komplex intramolekulare Kavitäten verschoben werden, was sich letztlich auch auf die Oberfläche des Komplexes auswirken könnte. Eine besonders interessante Region, in der wahrscheinlich solche strukturellen Änderungen stattfinden, ist die um das konservierte Cys341 herum (vgl. 5.3.1.).

Die Abhängigkeit vom Redoxzustand des Systems scheint eine wichtige mechanistische Funktion zu haben. So bindet, wie erwartet, Isu1 in beiden Oxidationszuständen des Systems an Nfs1/Isd11, wohingegen Yah1 nur gut im oxidierten Zustand an Nfs1/Isd11 bindet. Dies lässt auf einen Mechanismus schließen, welcher vorsieht, Yah1 nach erfolgter Elektronenübergabe zunächst am Desulfurasekomplex festzuhalten, bis eine Reduktion von Yah1 die Bindung löst. Anschließend kann Yah1 wieder mit Isu1 interagieren und der Zyklus kann von neuem beginnen (vgl. Abb. 4.23.). Auch der Komplex aus Yah1 und Isu1 wurde auf seine Interaktionsfähigkeit mit Nfs1/Isd11 hin überprüft. Unter oxidierenden Bedingungen konnte hier je nach Interaktionspartner keine bzw. nur eine schwache Affinität festgestellt werden. Da Yah1 und Isu1 unter oxidierenden Bedingungen gut mit Nfs1/Isd11 interagieren, jedoch nur sehr schlecht miteinander, lassen die Daten zur Interaktion von Yah1 und Isu1 gemeinsam mit Nfs1/Isd11 keine genauere Interpretation zu. Hier haben mindestens zwei

Bindungskonstanten ($Nfs1/Isd11+Isu1$ und $Nfs1/Isd11+Yah1$) einen Einfluss auf das Ergebnis, was eine verlässliche quantitative Auswertung unmöglich macht. Unter reduzierenden Bedingungen verhalten sich die Interaktionen mit $Nfs1/Isd11$ dagegen völlig anders. Hier fällt jedoch insbesondere der Unterschied der Bindungskonstanten bei den beiden Messungen mit dem Komplex aus $Yah1$ und $Isu1$ auf (vgl. Abb. 4.21.). Es ist von Wichtigkeit, welcher der beiden Faktoren in konstanter Konzentration im Ansatz vorliegt und welcher titriert wird (Abb. 5.5.). Ist $Isu1$ in konstanter Konzentration im Ansatz vorhanden, so blockiert es die Bindung des Komplexes aus $Yah1$ und $Isu1$. Der Grund hierfür ist, dass $Isu1$ mindestens in zweifachem Überschuss verglichen mit $Yah1$ vorhanden ist und auch alleine gut an $Nfs1/Isd11$ bindet. Dies führt dazu, dass sich der Komplex aus $Yah1$ und $Isu1$ bildet, zur gleichen Zeit aber $Nfs1/Isd11$ durch $Isu1$ alleine schon besetzt wird. Der Komplex aus $Yah1$ und $Isu1$ kann damit nicht mehr effizient an $Nfs1/Isd11$ binden. Somit liefert diese Messung keine zweifelsfrei verwertbaren Ergebnisse. Anders verhält es sich im Ansatz mit konstanter Konzentration von $Yah1$. Hier ist $Yah1$ in mindestens zweifachem Überschuss verglichen mit $Isu1$ vorhanden. Da $Yah1$ in seiner reduzierten Form jedoch sehr schlecht mit $Nfs1/Isd11$ interagiert, findet hier keine Blockade der Bindung des Komplexes aus $Yah1$ und $Isu1$ statt. Daher kann die Interaktion des Komplexes aus $Yah1$ und $Isu1$ mit $Nfs1/Isd11$ ungehindert stattfinden und dieses Ergebnis als verlässlich angesehen werden.

Weiter konnte mit der Thermophorese auch der Frage der gleichzeitigen Bindung von $Yfh1$ und $Yah1$ an $Nfs1/Isd11$ nachgegangen werden. Bereits publizierte Ergebnisse, welche im bakteriellen System eine Inhibierung der Ferredoxinbindung durch Zugabe von Frataxin beschreiben (Yan et al., 2013), konnten im mitochondriellen System nicht bestätigt werden. Obwohl diese Messungen nur unter oxidierenden Bedingung durchgeführt werden konnten, da eine signifikante Bindung von $Yah1$ an $Nfs1/Isd11$ unter reduzierenden Bedingungen nicht gegeben ist, konnte deutlich gezeigt werden, dass die Zugabe von Frataxin keinen Effekt auf die Bindung von $Yah1$ an $Nfs1/Isd11$ hat. Das bakterielle und eukaryotische System scheinen sich also mindestens in diesem Punkt deutlich voneinander zu unterscheiden. So kann im bakteriellen System anscheinend kein oligomerer Komplex aus allen frühen ISC-Komponenten gebildet werden, da sich Ferredoxin und Frataxin hier gegenseitig ausschließen. Im eukaryotischen System ist dies allerdings unerlässlich, um eine funktionelle Maschinerie zu rekonstituieren (Webert et al., 2014) (vgl. Abb. 4.32.).

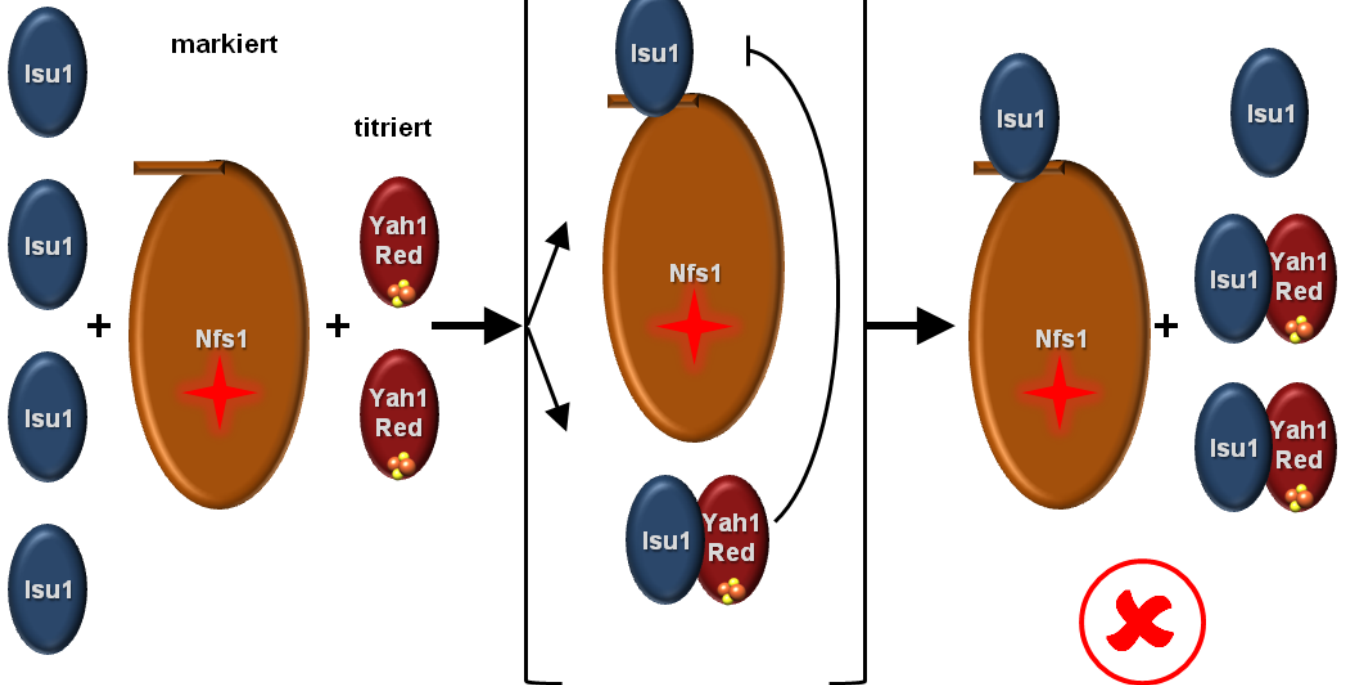
5.3. Die Struktur und Funktion der frühen ISC-Maschinerie

Die in dieser Arbeit vorgestellte Gesamtstruktur der frühen ISC-Maschinerie ist der erste Ansatz zu einem vollkommenen Verständnis der initialen Schritte der Fe/S-Cluster Biogenese in eukaryotischen Zellen. Gleichzeitig ist es das erste Mal möglich, alle

Komponenten einem zentralen Komplex zuzuordnen, dessen globale Struktur darüber hinaus bestimmt werden konnte.

A

konstant



B

konstant

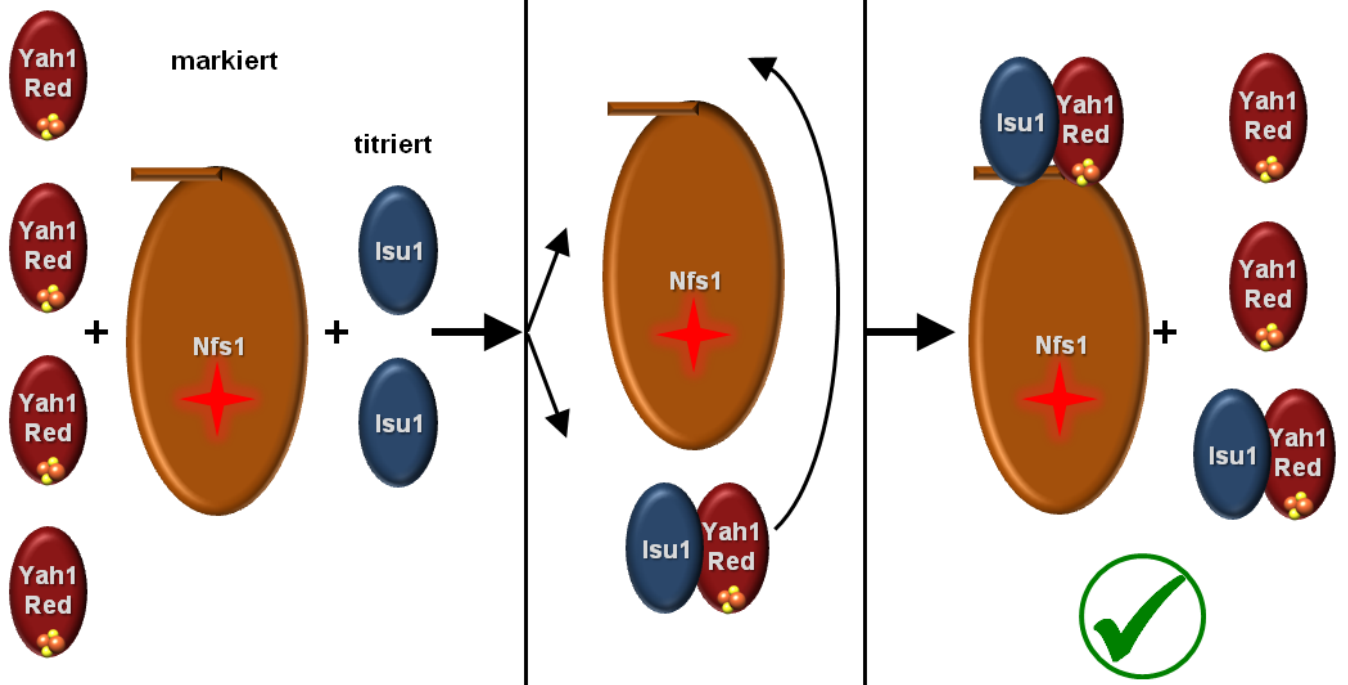


Abb. 5.5. Die Bindung des Komplexes aus Yah1 und Isu1 wird durch hohe Isu1-Konzentrationen blockiert. Beinhaltet der Versuchsaufbau einen konstanten mindestens zweifachen Überschuss an Isu1 verglichen mit dem titrierten Yah1(A), so wird die Bindestelle auf Nfs1/Isd11 durch Isu1 blockiert und der Komplex aus Yah1 und Isu1 kann nicht binden. Befindet sich Yah1 konstant in mindestens zweifachem Überschuss verglichen mit dem titrierten Isu1 im Reaktionsansatz (B), so bindet nur der Komplex aus Yah1 und Isu1 an Nfs1/Isd11, da Yah1 in seiner reduzierten Form schlecht mit Nfs1/Isd11 interagiert. In beiden Fällen wurde Nfs1/Isd11 mittels NT647 markiert (roter Stern).

5.3.1. In Gegenwart von Cystein dissoziiert Isd11 transient von der Desulfurase Nfs1

Die Desulfurase Nfs1 ist ein in beinahe allen Organismen hochkonserviertes Enzym, welches allerdings in eukaryotischen Zellen ein zusätzliches kleines Protein (Isd11) unbekannter Funktion mit einem konservierten LYR/K-Motiv benötigt. Auf Grund der hohen Sequenzhomologien konnte für diese Arbeit auch von einer starken strukturellen Ähnlichkeit von Nfs1 und dem bakteriellen Homolog IscS ausgegangen werden. Auf Basis dieser Annahme konnte eine Modellstruktur von Nfs1 errechnet werden, welche sehr wahrscheinlich die *in vivo* relevante Tertiär- und Quartärstruktur aufweist. Dies verhält sich mit Blick auf Isd11 anders. Es existieren bis heute keinerlei strukturellen Informationen für diesen ISC-Faktor. Daher wurde für diese Arbeit ein *ab initio* Modell des Isd11 mit Hilfe des „iTasser“ Webservers (AG Zhang, University of Michigan) erstellt. Die erhaltene Struktur spiegelt demnach eine wahrscheinliche und nicht die gesicherte Konfiguration wider. Für diese Arbeit ist dies jedoch nicht von primärer Wichtigkeit, da hier der Fokus auf der Lokalisation von Isd11 auf Nfs1 lag. Es konnte mittels SAXS gezeigt werden, dass die dimere Struktur der prokaryotischen Desulfurase in Eukaryoten konserviert ist. Weiter konnte die wahrscheinliche Bindungsstelle von Isd11 bestimmt werden, welche sich leicht von der berechneten unterscheidet (Amela et al., 2013). Die Bindestellen auf Nfs1 weichen allerdings nur gering voneinander ab (Abb. 5.6.). Größere Unterschiede betreffen die Anzahl an Isd11-Molekülen pro und die Orientierung dieser auf Nfs1. Die SAXS-basierte Ladungsdichte ließ auf mindestens zwei Isd11 pro Nfs1 schließen, wobei diese in ihrer Längsachse senkrecht zu Nfs1 ausgerichtet sind. Die berechnete Lokalisation sieht dagegen nur ein Isd11 je Nfs1 vor, welches eine waagerechte Orientierung einnimmt. Überraschend war schließlich, dass eine Ladungsdichte von Isd11 mittels SAXS nicht immer gefunden werden konnte. Dahin gehend konnte gezeigt werden, dass die Präsenz von Isd11 auf Nfs1 Cystein-abhängig zu sein scheint. Dieser Umstand zeigt deutlich die dramatischen Änderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur durch Bindung von Cystein. Der Umsatz von Cystein muss demnach neben der Relokalisation der Schleife mit Cys341 auch mindestens eine weitere strukturelle Änderung hervorrufen, welche sich auf die hydrophobe Stelle um Helix $\alpha 6$ auswirkt und somit eine Isd11 Freisetzung verursacht. Dies erscheint auch im Hinblick auf die räumliche Nähe (zwischen 11 Å und 20 Å) der Region um Helix $\alpha 6$ und dem aktiven Zentrum und damit der Cysteinbindestelle der Desulfurase als denkbar (Abb. 5.6.). Die Freisetzung scheint jedoch reversibel zu sein, da bei Zugabe geringer Mengen Cystein und Gewährleistung eines vollständigen Verbrauchs dessen eine erneute Bindung von Isd11 beobachtet werden kann. Dieser Umstand wurde in dieser Arbeit ausgenutzt, um ein vollständiges Modell der frühen ISC-Maschinerie inklusive Isd11 zu erhalten.

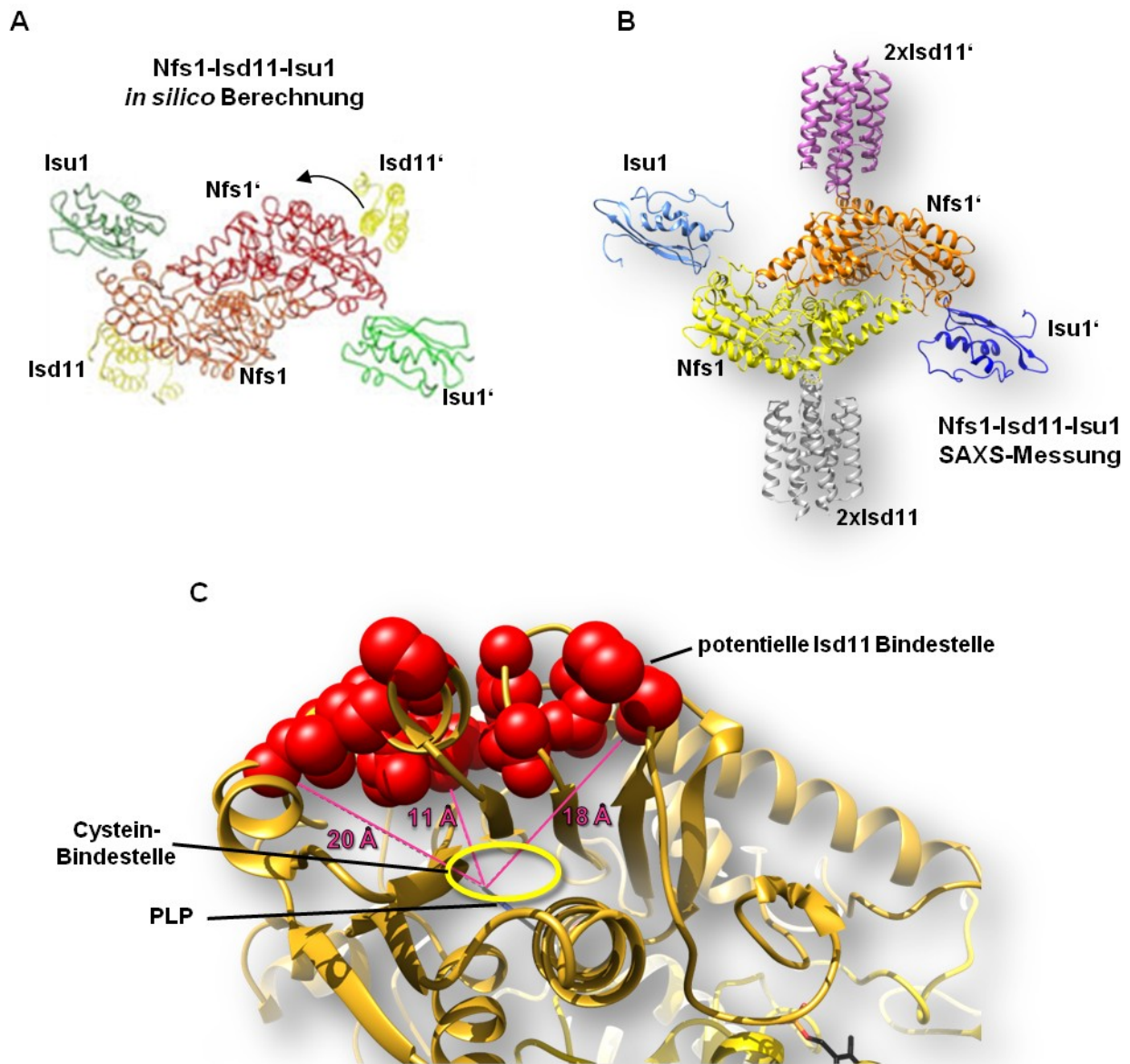


Abb. 5.6. Nfs1 interagiert mit einem Isd11-Dimer in der Region um Helix α_6 nahe der Cystein-Bindestelle. (A) Abbildung der berechneten Bindestelle von Isd11 auf Basis eines Nfs1-Isu1 Homologiemodells (Amela et. al.). Isd11 kommt distal zu Isu1 auf Nfs1 zum Liegen. Isu1 befindet sich an der durch Röntgenstrukturanalyse gezeigten Stelle. (B) Modell des Heterooktamers aus Nfs1, Isd11 und Isu1 auf Basis von durch SAXS bestimmten Ladungsdichten. Verglichen mit der berechneten Stelle unterscheidet sich die Lokalisation von Isd11 auf Nfs1 nur leicht, die Orientierung dagegen stark. Sowohl eine Drehung von Isd11 als auch eine mögliche Dimerisierung sind zu erkennen. Die Isu1-Bindestelle ist jedoch sehr ähnlich zur Vorhersage. (C) Lage der Isd11-Bindestelle auf Nfs1 (Kugeldarstellung in rot) mit Bezug auf die Cystein-Bindestelle (gelber Kreis). Es besteht eine räumliche Nähe zwischen Cystein- und Isd11-Bindestelle (11 Å – 20 Å), was sehr wahrscheinlich eine Modifikation der Isd11-Bindestelle durch Cysteinbindung an Nfs1 zur Folge hat.

5.3.2. Die 3D-Struktur der frühen ISC-Maschinerie

Die in dieser Arbeit präsentierte globale Struktur der frühen ISC-Maschinerie bietet erstmals detaillierte Einblicke in die Anordnung der einzelnen Komponenten und deren Funktion bei der *de novo* Biogenese eines Fe/S-Clusters.

Die frühe ISC-Maschinerie stellt sich in dieser Arbeit als Heterododekamer dar, welcher durch einen Homodimer zweier Heterohexamere gebildet wird, wobei je ein Yah1, Isu1, Yfh1, Nfs1 und zwei Isd11 einen der beiden Hexamere bilden (vgl. Abb. 4.29.). Die Zusammenstellung erfolgte mittels Crysol (ATSAS) und „fit in map“ (Chimera). Der Komplex

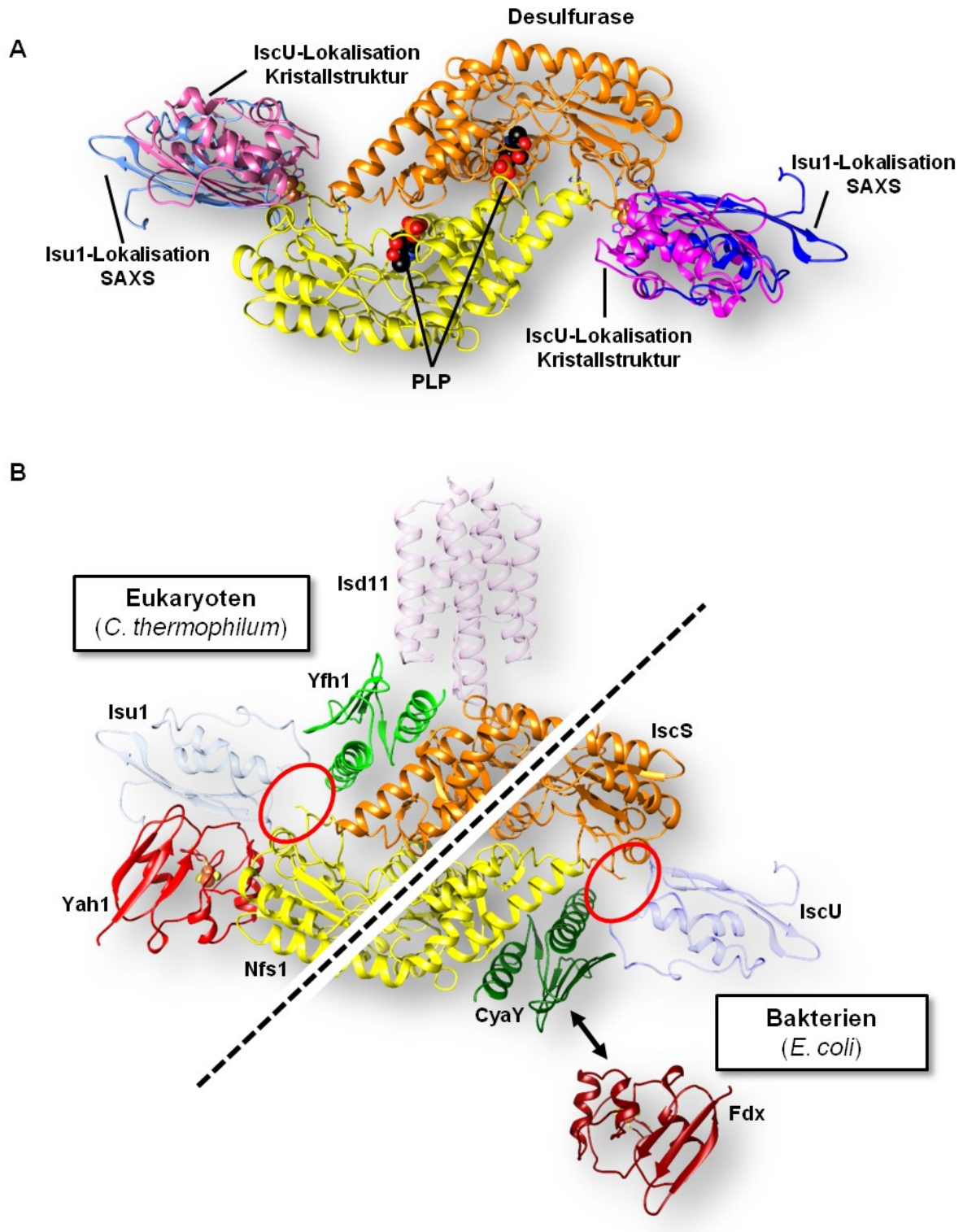


Abb. 5.7. Die Lokalisation von Isu1 ist im Gegensatz zur Bindestelle von Ferredoxin in Eukaryoten und Bakterien konserviert. (A) Überlagerung der Isu1 bzw. IscU Lokalisation. Die IscU Lokalisation beruht auf Röntgenstrukturanalysen (Marinoni et al., 2012), wohingegen die Lokalisation von Isu1 auf SAXS beruht. Die Lokalisation ist identisch und befindet sich in der Nähe des konservierten Cys341 von Nfs1, bzw. IscS. (B) Vergleich der frühen ISC Maschinerie von Eukaryoten (links) und Bakterien (rechts) am Beispiel von *C. thermophilum* und *E. coli*. Die Lage des aktiven Zentrums ist konserviert (rote Kreise). Das bakterielle System verfügt jedoch nach derzeitigem Kenntnisstand nicht über ein Isd11-Homolog. Ein weiterer Unterschied ist die Bindung des Ferredoxins. In Bakterien wird eine abwechselnde Bindung von Frataxin (CyaY) und Ferredoxin (Fdx) vermutet, wohingegen bei Eukaryoten auf Basis von Thermophorese- und SAXS-Daten eine gleichzeitige Bindung von Yfh1 und Yah1 gezeigt wurde.

wurde Faktor für Faktor aufgebaut, wobei für jeden Subkomplex SAXS-Daten gesammelt und die entsprechenden Strukturen hierfür berechnet wurden. So kann kein Zweifel an der Identität der entsprechenden Ladungsdichten bestehen. Basis der Zusammenstellungen waren das Homologiemodell von Nfs1, das *ab initio* Modell von Isd11, die mittels NMR bestimmten Strukturen von Yah1 und Isu1 bzw. der in dieser Arbeit vorgestellte Komplex aus Yah1 und Isu1 als auch die NMR basierte Struktur von Yfh1 (He et al., 2004)(pdb: 2GA5) (vgl. Abb. 1.9.). Zunächst wurde die Lage des Isu1 auf Nfs1 mit der der bekannten Kristallstruktur des IscS-IscU Komplexes (Marinoni et al., 2012) (pdb: 4EB5) (Abb. 5.7.) verglichen. Es zeigte sich, dass der Komplex aus Isu1 und Nfs1 dem des bakteriellen Systems entspricht. Auch die Lage von Yfh1 wurde mit der bereits bekannten Lage im bakteriellen System verglichen (Prischi et al., 2010a) (Abb. 5.7.). Es zeigte sich, dass auch hier die Lokalisation des Frataxins in beiden Systemen identisch ist. Beim Vergleich der Lage des Ferredoxins jedoch zeigten sich erhebliche Unterschiede. Das Modell des bakteriellen Systems, welches ausschließlich auf Docking-Berechnungen basiert, schlägt die Lokalisation von Ferredoxin an der Stelle der Frataxinbindung vor (Yan et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass dies im eukaryotischen System nicht der Fall ist, da das Ferredoxin distal mit Bezug zu Isu1 auf Nfs1 zum Liegen kommt. Diese Lokalisation steht im Einklang mit der Struktur des Komplexes aus Yah1 und Isu1, wodurch schließlich auch der biosynthetische Komplex aus Yah1 und Isu1 in die Ladungsdichte eingepasst werden konnte. Dies steht im Konsens mit vorhandenen funktionellen Daten (Webert et al., 2014).

Da die Auflösung, wie es für SAXS generell der Fall ist, intrinsisch niedrig ist und sich im Bereich von 8 Å bewegt, konnten nur wenige Informationen auf atomarer Ebene eindeutig gesammelt werden. Da die Einzelstrukturen jedoch deutlich höher aufgelöst sind und an einigen wichtigen Stellen keine intrinsischen Varianzen aufweisen, konnte dennoch ein detailreiches Model der frühen ISC-Maschinerie erstellt werden, welches erstmals auch Einblicke auf molekularer Ebene gestattet. Ein sehr interessanter neuer Einblick ist hier die räumliche Nähe des Tyr77 des Yah1 zum aktiven Zentrum des Isu1 und zum essentiellen Cys341 des Nfs1 (vgl. 4.1.5.3.). Eine zweifelfreie Lokalisation ist auf Basis der niedrig auflösenden SAXS Daten *per se* nicht möglich, jedoch lässt sich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit die relative Position bestimmen, da die strukturellen Daten, welche mittels NMR für Yah1 gesammelt wurden, keine Abweichungen in Bezug auf Tyr77 zeigen. Tyr77 ist in allen 20 Konformeren an derselben Stelle lokalisiert (Abb. 5.8.). Ähnlich verhält es sich mit dem aktiven Zentrum von Isu1. Hier befinden sich die beiden konservierten Cysteine Cys37 und Cys64 zwar jeweils auf einer flexiblen Schleife, jedoch bewegen sich diese nur in einem sehr engen Radius, welcher durch die Bindung an Nfs1 weiter verkleinert wird. Dies ergibt sich durch die Anordnung der umgebenden Teile von Nfs1, welche eine Bewegung der Cysteine heraus aus dem aktiven Zentrum, mit einem Radius von etwa 10 Å, verhindert. Somit können die berechneten Entfernungen zwar nicht als absolut, jedoch als

sehr wahrscheinliche Näherungswerte angesehen werden, da die molekularen Strukturen der Einzelkomponenten bekannt sind.

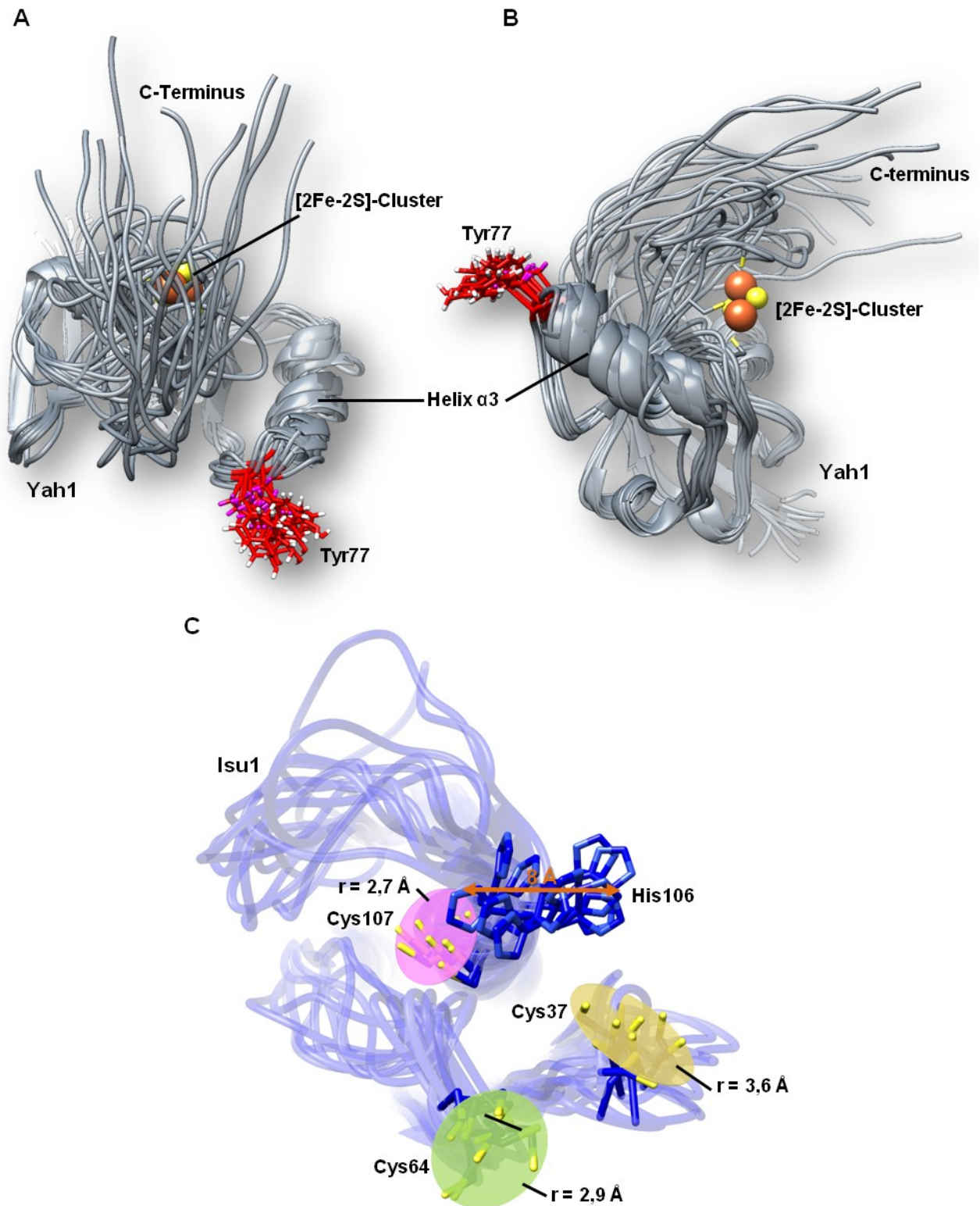


Abb. 5.8. Die Ausrichtungen des Tyr77 von Yah1 und der essentiellen Aminosäuren des Isu1 sind invariant. Die NMR-basierte Struktur des reduzierten Yah1 zeigt, dass die Ausrichtung und räumliche Lage des Tyr77 (dargestellt in rot) in allen Konformeren sowohl in der Draufsicht (**A**) als auch in der Seitenansicht (**B**) nahezu identisch ist. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden lediglich 12 der 20 Konformeren zufällig ausgewählt. **C:** Die Lokalisation der konservierten Aminosäuren des aktiven Zentrums von Isu1 ist nicht variabel. Cys37 bewegt sich innerhalb eines Radius von 3,6 Å (gelb), Cys64 von 2,9 Å (grün) und Cys107 von 2,7 Å (rosa). Die maximale Bewegung von His106 entlang der längsten Achse beträgt 8 Å. Auch hier wurden 12 von 20 Konformeren zufällig ausgewählt.

5.4. Die frühe ISC-Maschinerie ist ein hochkonservierter Komplex

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass eukaryotische Organismen, welche keine Mitochondrien, sondern ausschließlich Mitosomen beherbergen, einen vollständig identischen Mechanismus zur Fe/S-Cluster Biogenese verwenden. Dies konnte mit Hilfe eines CD-basierten Messverfahrens bewiesen werden. Neben der Austauschbarkeit der Komponenten des jeweiligen Systems gegen die des anderen Systems war auch die Ähnlichkeit der Endsignale beeindruckend. Sowohl im System von *C. thermophilum* als auch in dem von *T. hominis* konnten annähernd identische Endsignale für einen Isu1-gebundenen Fe/S-Cluster erreicht werden, was sowohl auf eine ähnliche Effizienz des Gerüstproteins als auch auf eine identische Koordinationsweise hinweist. Letzteres wird durch die Übereinstimmung der CD-Spektren von *holo*-Isu1 der beiden Spezies weiter untermauert (vgl. Abb. 4.32.). Zusammen zeigen diese Ergebnisse die Konservierung des Gerüstproteins Isu1 und die Gleichartigkeit des Endproduktes der frühen ISC-Maschinerie. Auch die Geschwindigkeiten, mit der Fe/S-Cluster durch beide Systeme gebildet werden, sind erstaunlich ähnlich. Um diese ähnliche Gesamtkinetik der beiden Systeme zu erhalten, müssen die einzelnen Schritte absolut konserviert sein, da kleinste Abweichungen in einem der Zwischenschritte massive Auswirkungen auf die endgültige Umsatzrate hätten.

Die Reaktionen zeigen leichte Hintergrundaktivitäten. Neben spezifischen Möglichkeiten gilt für alle Reaktionen die Eventualität einer geringen Kontamination mit bakteriellen ISC-Systemkomponenten. Diese wird durch die jeweils zu Grunde liegende Reinigungsstrategie und anschließende Gelfiltration zwar maximal minimiert, kann jedoch nicht mit vollständiger Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reaktion ohne FdxR zeigt die größte Hintergrundaktivität, was damit zusammenhängen könnte, dass Ferredoxin zwangsläufig partiell reduziert zugegeben wird, die gesamte Reaktion unter anaeroben Bedingungen stattfindet und NADPH im Reaktionsansatz vorhanden ist. Dies führt zunächst dazu, dass durch das bereits reduzierte Ferredoxin ein Zyklus vollständig ausgeführt werden kann. Mit Blick auf die Standardredoxpotentiale von Ferredoxin (-430 mV), NADPH (-370 mV) und einer Disulfidbrücke im Persulfidintermediat (-250 mV) ist es weiter denkbar, dass möglicherweise in geringem Maße eine unspezifische Elektronenübertragung von NADPH direkt auf ein Persulfid im ISC-Komplex stattfinden kann. Für die erhöhte Hintergrundaktivität im Falle des Ansatzes ohne Yfh1 ist ein möglicher Grund in seiner Funktion zu suchen. Mit Blick auf die Hypothese eines Eisendonors ist potentiell eine Fe/S-Cluster Bildung auch ohne Eisendonor vorstellbar, da Eisen selbst im Reaktionsansatz vorhanden ist und mit hinreichend Zeit seinen Weg auch ohne spezifischen Transportfaktor finden wird. Dies führt, wie im Ansatz ohne FdxR, zu einer eher zufälligen Bildung eines Fe/S-Clusters. Die Reaktionsansätze ohne Yah1 oder Nfs1/Isd1 zeigen kaum Hintergrundaktivität, welche in beiden Fällen der Negativkontrolle (Ansatz ohne Isu1) ähnelt. Vergleicht man aber die Reaktionsgeschwindigkeiten, so zeigt sich deutlich, dass alle beschriebenen

Hintergrundaktivitäten von geringer Signifikanz sind. Verglichen mit der kompletten Reaktion, sind die Hintergrundreaktionen um mindestens den Faktor 6,5 langsamer (vgl. Abb. 4.32.).

5.5. Schlussfolgerung und Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse tragen maßgeblich zum besseren Verständnis des initialen Schrittes der Fe/S-Cluster Biogenese bei. Es konnte gezeigt werden, dass das Ferredoxin Yah1 direkt und spezifisch mit dem Gerüstprotein Isu1 interagiert. Die Bildung dieses Komplexes findet vor der Bildung des dodekameren ISC-Komplexes statt und ist essentiell für die Bildung von Fe/S-Clustern. Weiter konnte eine vollständige Interaktionskarte der frühen ISC-Maschinerie erstellt werden, welche erstmals den Vorschlag eines detaillierten Modells erlaubt (vgl. Abb. 4.23.). Diese Interaktionsstudien führten weiter zu einem besseren Verständnis des Frataxins Yfh1. So konnte nahegelegt werden, dass keine Konkurrenz zwischen Yfh1 und Yah1 besteht, sondern im Gegenteil eine gleichzeitige Bindung stattfindet, um die Bildung eines Fe/S-Clusters auf Isu1 zu erzielen. Auch konnte eine spezifische Eisenbindung von Fe(II) durch Frataxin bestätigt werden. Schließlich gewähren die in dieser Arbeit mittels SAXS erhaltenen Daten erstmals Einblicke in den strukturellen Aufbau und die molekulare Funktion der frühen ISC-Maschinerie. Es konnte die wahrscheinliche Lage des kleinen LYR/K-Proteins Isd11 auf Nfs1 bestimmt und gezeigt werden, dass dieses sehr wahrscheinlich nicht direkt am Biogeneseprozess beteiligt ist. Damit bleibt dessen Funktion nach wie vor offen. Weiter konnte die Lokalisation aller essentiellen ISC-Komponenten auf Nfs1 bestimmt und so der zentrale synthetische Komplex definiert werden. Auf Basis der ersten vollständigen Komplexstruktur konnten abschließend ein möglicher Elektronentransportweg, ein denkbarer Eisenimportweg und ein wahrscheinlicher Fe/S-Cluster Biogenesemechanismus postuliert werden.

Die Gesamtheit der in dieser Arbeit zusammengestellten Daten stellt die Grundlage für weitere Untersuchungen dar. So ist es auf Basis des mittels NMR bestimmten Heterodimers aus Yah1 und Isu1 nun möglich, durch zielgerichtete Mutagenese eine Röntgenstrukturanalyse durchzuführen, da hierdurch Faktoren, welche eine Kristallisation bis heute verhinderten, beseitigt werden können. Die Kristallisation des heterodimeren Komplexes aus Yah1 und Isu1 hätte, verglichen mit den NMR-basierten Messungen, den Vorteil, dass die gesamte Interaktionsfläche, inklusive des C-Terminus, bestimmt werden könnte. Auch die Interaktionsstudien des vollständigen ISC-Komplexes und die mit SAXS bestimmten globalen Strukturen, sowohl der Subkomplexe als auch des vollständigen Komplexes, liefern einen wertvollen Beitrag zur zukünftigen Bestimmung einer hochauflösenden Struktur dieser Komplexe mittels Röntgenstrukturanalyse.

Zusätzlich sind nun auch weiterführende mechanistische Untersuchungen denkbar. Zum einen konnte die Möglichkeit, dass Frataxin einen potentiellen Eisendonator darstellt, weiter erhärtet werden, jedoch müssen hier weiterführende Experimente zeigen, ob dies die einzige

Funktion dieses äußerst wichtigen Proteins darstellt. Weiter zeigt diese Arbeit, dass das kleine Aktivatorprotein Isd11 keineswegs dauerhaft an Nfs1 gebunden ist, sondern vielmehr eine Art Zyklus durchläuft, welcher auf der Anwesenheit von Cystein basiert. Dies stellt eine vollkommen neue Beobachtung dar, wobei das Verständnis des genauen Grundes hierfür und damit der genauen Funktion von Isd11 Ziel weiterer Forschungsarbeit sein muss. Mit Hilfe höher auflösender struktureller und weiterführender mechanistischer Analysen könnte die frühe ISC-Maschinerie bald auf atomarer Ebene vollständig verstanden sein, was sowohl für alle folgenden Schritte der Fe/S-Cluster Biogenese als auch für humanmedizinische Zwecke von immenser Wichtigkeit wäre.

6. Quellen

Adinolfi, S., Trifuoggi, M., Politou, A.S., Martin, S., and Pastore, A. (2002). A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum Mol Genet* 11, 1865-1877.

Aloria, K., Schilke, B., Andrew, A., and Craig, E.A. (2004). Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo. *EMBO Rep* 5, 1096-1101.

Amela, I., Delicado, P., Gómez, A., Querol, E., and Cedano, J. (2013). A dynamic model of the proteins that form the initial iron-sulfur cluster biogenesis machinery in yeast mitochondria. *Protein J* 32, 183-196.

Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., and Kaplan, J. (1997). Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 276, 1709-1712.

Foury, F. (1999). Low iron concentration and aconitase deficiency in a yeast frataxin homologue deficient strain. *FEBS Lett* 456, 281-284.

Gentry, L.E., Thacker, M.A., Doughty, R., Timkovich, R., and Busenlehner, L.S. (2013). His86 from the N-terminus of frataxin coordinates iron and is required for Fe-S cluster synthesis. *Biochemistry* 52, 6085-6096.

He, Y., Alam, S.L., Proteasa, S.V., Zhang, Y., Lesuisse, E., Dancis, A., and Stemmler, T.L. (2004). Yeast frataxin solution structure, iron binding, and ferrocyclase interaction. *Biochemistry* 43, 16254-16262.

Marinoni, E.N., de Oliveira, J.S., Nicolet, Y., Raulfs, E.C., Amara, P., Dean, D.R., and Fontecilla-Camps, J.C. (2012). (IscS-IscU)₂ complex structures provide insights into Fe₂S₂ biogenesis and transfer. *Angewandte Chemie* 51, 5439-5442.

Müller, J.J., Lapko, A., Bourenkov, G., Ruckpaul, K., and Heinemann, U. (2001). Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis. *J Biol Chem* 276, 2786-2789.

Nair, M., Adinolfi, S., Pastore, C., Kelly, G., Temussi, P., and Pastore, A. (2004). Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, CyaY: mapping the iron binding sites. *Structure* 12, 2037-2048.

Prischi, F., Konarev, P.V., Iannuzzi, C., Pastore, C., Adinolfi, S., Martin, S.R., Svergun, D.I., and Pastore, A. (2010). Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nat Commun* 1, 95.

Schagerlöff, U., Elmlund, H., Gakh, O., Nordlund, G., Hebert, H., Lindahl, M., Isaya, G., and Al-Karadaghi, S. (2008). Structural basis of the iron storage function of frataxin from single-particle reconstruction of the iron-loaded oligomer. *Biochemistry* 47, 4948-4954.

Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Elsässer, H.P., Mühlenhoff, U., Webert, H., Hobler, A., Hannemann, F., Bernhardt, R., and 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.

Stemmler, T.L., Lesuisse, E., Pain, D., and Dancis, A. (2010). Frataxin and mitochondrial FeS cluster biogenesis. *The Journal of biological chemistry* 285, 26737-26743.

Webert, H., Freibert, S.A., Gallo, A., Heidenreich, T., Linne, U., Amlacher, S., Hurt, E., Mühlenhoff, U., Banci, L., and Lill, R. (2014). Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nat Commun* 5, 5013.

Yan, R., Adinolfi, S., and Pastore, A. (2015). Ferredoxin, in conjunction with NADPH and ferredoxin-NADP reductase, transfers electrons to the IscS/IscU complex to promote iron-sulfur cluster assembly. *Biochim Biophys Acta* 1854, 1113-1117.

Yan, R., Konarev, P.V., Iannuzzi, C., Adinolfi, S., Roche, B., Kelly, G., Simon, L., Martin, S.R., Py, B., Barras, F., *et al.* (2013). Ferredoxin competes with bacterial frataxin in binding to the desulfurase IscS. *J Biol Chem* 288, 24777-24787.

Aloria, K., Schilke, B., Andrew, A., and Craig, E.A. (2004). Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo. *EMBO Rep* 5, 1096-1101.

Amela, I., Delicado, P., Gómez, A., Querol, E., and Cedano, J. (2013). A dynamic model of the proteins that form the initial iron-sulfur cluster biogenesis machinery in yeast mitochondria. *Protein J* 32, 183-196.

Banci, L., Bertini, I., and Luchinat, C. (1990). The ¹H NMR parameters of magnetically coupled dimers—The Fe₂S₂ proteins as an example. In *Structure and Bonding* (Springer Berlin Heidelberg), pp. 113-136.

Hu, J., Dong, L., and Outten, C.E. (2008). The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. *J Biol Chem* 283, 29126-29134.

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

Lange, H., Kispal, G., and Lill, R. (1999). Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria. *J Biol Chem* 274, 18989-18996.

Layer, G., Ollagnier-de Choudens, S., Sanakis, Y., and 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. *J Biol Chem* 281, 16256-16263.

Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T., and Chothia, C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* 247, 536-540.

Nair, M., Adinolfi, S., Pastore, C., Kelly, G., Temussi, P., and Pastore, A. (2004). Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, CyaY: mapping the iron binding sites. *Structure* 12, 2037-2048.

Prischi, F., Konarev, P.V., Iannuzzi, C., Pastore, C., Adinolfi, S., Martin, S.R., Svergun, D.I., and Pastore, A. (2010a). Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nat Commun* 1, 95.

Prischi, F., Pastore, C., Carroni, M., Iannuzzi, C., Adinolfi, S., Temussi, P., and Pastore, A. (2010b). Of the vulnerability of orphan complex proteins: the case study of the *E. coli* IscU and IscS proteins. *Protein Expr Purif* 73, 161-166.

Shi, R., Proteau, A., Villarroya, M., Moukadiri, I., Zhang, L., Trempe, J.F., Matte, A., Armengod, M.E., and Cygler, M. (2010). Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS Biol* 8, e1000354.

Webert, H., Freibert, S.A., Gallo, A., Heidenreich, T., Linne, U., Amlacher, S., Hurt, E., Mühlenhoff, U., Banci, L., and Lill, R. (2014). Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nat Commun* 5, 5013.

Yan, R., Konarev, P.V., Iannuzzi, C., Adinolfi, S., Roche, B., Kelly, G., Simon, L., Martin, S.R., Py, B., Barras, F., *et al.* (2013). Ferredoxin competes with bacterial frataxin in binding to the desulfurase IscS. *J Biol Chem* 288, 24777-24787.

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

Bennett, J., and Scott, K.J. (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem* 43, 173-182.

Bermel, W., Bertini, I., Felli, I.C., Kümmerle, R., and Pierattelli, R. (2003). ¹³C direct detection experiments on the paramagnetic oxidized monomeric copper, zinc superoxide dismutase. *J Am Chem Soc* 125, 16423-16429.

BERTANI, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62, 293-300.

Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T.G., Bertoni, M., Bordoli, L., *et al.* (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 42, W252-258.

Birnboim, H.C., and 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., and Vickery, L.E. (2008). Studies on the mechanism of catalysis of iron-sulfur cluster transfer from IscU[2Fe2S] by HscA/HscB chaperones. *Biochemistry* 47, 12795-12801.

Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J., and Schwede, T. (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat Protoc* 4, 1-13.

Bradford, M.M. (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.

Case, D.A., Cheatham, T.E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K.M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., and Woods, R.J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* 26, 1668-1688.

Clubb, R.T., Thanabal, V., and Wagner, G. (1992). A constant-time three-dimensional triple-resonance pulse scheme to correlate intraresidue ¹HN, ¹⁵N, and ¹³C' chemical shifts in ¹⁵N-¹³C-labelled proteins. *Journal of Magnetic Resonance* 97, 5.

de Vries, S.J., van Dijk, A.D., Krzeminski, M., van Dijk, M., Thureau, A., Hsu, V., Wassenaar, T., and Bonvin, A.M. (2007). HADDOCK versus HADDOCK: new features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. *Proteins* 69, 726-733.

Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A.M. (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc* 125, 1731-1737.

Duhr, S., and Braun, D. (2006). Why molecules move along a temperature gradient. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19678-19682.

Gill, S.C., and von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.

Grzesiek, S., and Bax, A. (1993). Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly ¹³C/¹⁵N-enriched proteins. *J Biomol NMR* 3, 185-204.

Herrmann, T., Güntert, P., and Wüthrich, K. (2002). Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS. *J Biomol NMR* 24, 171-189.

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

Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.

Petoukhov, M.V., Franke, D., Shkumatov, A.V., Tria, G., Kikhney, A.G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H.D., Konarev, P.V., and Svergun, D.I. (2012). New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* 45, 342-350.

Petoukhov, M.V., and Svergun, D.I. (2013). Applications of small-angle X-ray scattering to biomacromolecular solutions. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 429-437.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612.

Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5, 725-738.

Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G., and Bax, A. (2009). TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J Biomol NMR* 44, 213-223.

Tartof, K.D., and Hobbs, C.A. (1987). *Focus* 9, 1.

van Dijk, A.D., Kaptein, R., Boelens, R., and Bonvin, A.M. (2006a). Combining NMR relaxation with chemical shift perturbation data to drive protein-protein docking. *J Biomol NMR* 34, 237-244.

van Dijk, M., van Dijk, A.D., Hsu, V., Boelens, R., and Bonvin, A.M. (2006b). Information-driven protein-DNA docking using HADDOCK: it is a matter of flexibility. *Nucleic Acids Res* 34, 3317-3325.

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

Webert, H., Freibert, S.A., Gallo, A., Heidenreich, T., Linne, U., Amlacher, S., Hurt, E., Mühlenhoff, U., Banci, L., and Lill, R. (2014). Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nat Commun* 5, 5013.

Wienken, C.J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D., and Duhr, S. (2010). Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nature communications* 1, 100.

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12, 7-8.

Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9, 40.

BERTANI, G. (1951). Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62, 293-300.

Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.S., Lin, S.W., Dunn, J.J., and Studier, F.W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56, 125-135.

Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.

Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185, 60-89.

Tartof, K.D., and Hobbs, C.A. (1987). *Focus* 9, 1.

Adams, M.W. (1990). The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim Biophys Acta* 1020, 115-145.

Adinolfi, S., Trifuoggi, M., Politou, A.S., Martin, S., and Pastore, A. (2002). A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum Mol Genet* 11, 1865-1877.

Agar, J.N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B.H., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2000). IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry* 39, 7856-7862.

Aloria, K., Schilke, B., Andrew, A., and Craig, E.A. (2004). Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo. *EMBO Rep* 5, 1096-1101.

Amela, I., Delicado, P., Gómez, A., Querol, E., and Cedano, J. (2013). A dynamic model of the proteins that form the initial iron-sulfur cluster biogenesis machinery in yeast mitochondria. *Protein J* 32, 183-196.

Anderson, M.E., and Lindahl, P.A. (1994). Organization of clusters and internal electron pathways in CO dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*: relevance to the mechanism of catalysis and cyanide inhibition. *Biochemistry* 33, 8702-8711.

Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and 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., and Outten, F.W. (2008). Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 110-125.

Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., and Kaplan, J. (1997). Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 276, 1709-1712.

Balk, J., and Schaedler, T.A. (2014). Iron cofactor assembly in plants. *Annu Rev Plant Biol* 65, 125-153.

Banci, L., Bertini, I., and Luchinat, C. (1990). The ¹H NMR parameters of magnetically coupled dimers—The Fe₂S₂ proteins as an example. In *Structure and Bonding* (Springer Berlin Heidelberg), pp. 113-136.

Barros, M.H., Carlson, C.G., Glerum, D.M., and Tzagoloff, A. (2001). Involvement of mitochondrial ferredoxin and Cox15p in hydroxylation of heme O. *FEBS Lett* 492, 133-138.

Barros, M.H., Nobrega, F.G., and Tzagoloff, A. (2002). Mitochondrial ferredoxin is required for heme A synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277, 9997-10002.

Begley, T.P., Xi, J., Kinsland, C., Taylor, S., and McLafferty, F. (1999). The enzymology of sulfur activation during thiamin and biotin biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 3, 623-629.

Beinert, H., Holm, R.H., and Münck, E. (1997). Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277, 653-659.

Bennett, J., and Scott, K.J. (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem* 43, 173-182.

Bermel, W., Bertini, I., Felli, I.C., Kümmerle, R., and Pierattelli, R. (2003). ^{13}C direct detection experiments on the paramagnetic oxidized monomeric copper, zinc superoxide dismutase. *J Am Chem Soc* **125**, 16423-16429.

BERTANI, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**, 293-300.

Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T.G., Bertoni, M., Bordoli, L., *et al.* (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* **42**, W252-258.

Birnboim, H.C., and 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., and Vickery, L.E. (2008). Studies on the mechanism of catalysis of iron-sulfur cluster transfer from IscU[$2\text{Fe}2\text{S}$] by HscA/HscB chaperones. *Biochemistry* **47**, 12795-12801.

Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J., and Schwede, T. (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat Protoc* **4**, 1-13.

Bou-Abdallah, F., Adinolfi, S., Pastore, A., Laue, T.M., and Dennis Chasteen, N. (2004). Iron binding and oxidation kinetics in frataxin CyaY of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **341**, 605-615.

Boxma, B., de Graaf, R.M., van der Staay, G.W., van Alen, T.A., Ricard, G., Gabaldón, T., van Hoek, A.H., Moon-van der Staay, S.Y., Koopman, W.J., van Hellemond, J.J., *et al.* (2005). An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* **434**, 74-79.

Bradford, M.M. (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.

Bridwell-Rabb, J., Fox, N.G., Tsai, C.L., Winn, A.M., and Barondeau, D.P. (2014). Human frataxin activates Fe-S cluster biosynthesis by facilitating sulfur transfer chemistry. *Biochemistry* **53**, 4904-4913.

Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M.D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., *et al.* (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**, 1423-1427.

Case, D.A., Cheatham, T.E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K.M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., and Woods, R.J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* **26**, 1668-1688.

Clubb, R.T., Thanabal, V., and Wagner, G. (1992). A constant-time three-dimensional triple-resonance pulse scheme to correlate intraresidue ^1H N, ^{15}N , and ^{13}C chemical shifts in ^{15}N - ^{13}C -labelled proteins. *Journal of Magnetic Resonance* **97**, 5.

Colin, F., Martelli, A., Clémancey, M., Latour, J.M., Gambarelli, S., Zeppieri, L., Birck, C., Page, A., Puccio, H., and Ollagnier de Choudens, S. (2013). Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe $_4\text{S}_4$ cluster assembly. *J Am Chem Soc* **135**, 733-740.

Cook, J.D., Bencze, K.Z., Jankovic, A.D., Crater, A.K., Busch, C.N., Bradley, P.B., Stemmler, A.J., Spaller, M.R., and Stemmler, T.L. (2006). Monomeric yeast frataxin is an iron-binding protein. *Biochemistry* **45**, 7767-7777.

- Craig, E.A., and Marszalek, J. (2002). A specialized mitochondrial molecular chaperone system: a role in formation of Fe/S centers. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1658-1665.
- Cupp-Vickery, J.R., Urbina, H., and Vickery, L.E. (2003). Crystal structure of IscS, a cysteine desulfurase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **330**, 1049-1059.
- de Vries, S.J., van Dijk, A.D., Krzeminski, M., van Dijk, M., Thureau, A., Hsu, V., Wassenaar, T., and Bonvin, A.M. (2007). HADDOCK versus HADDOCK: new features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. *Proteins* **69**, 726-733.
- DerVartanian, D.V., Orme-Johnson, W.H., Hansen, R.E., and Beinert, H. (1967). Identification of sulfur as component of the EPR signal at g equals 1.94 by isotopic substitution. *Biochem Biophys Res Commun* **26**, 569-576.
- Dobbek, H., Svetlitchnyi, V., Gremer, L., Huber, R., and Meyer, O. (2001). Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster. *Science* **293**, 1281-1285.
- Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A.M. (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc* **125**, 1731-1737.
- Dos Santos, P.C., Dean, D.R., Hu, Y., and Ribbe, M.W. (2004). Formation and insertion of the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. *Chem Rev* **104**, 1159-1173.
- Douglas, S., Zauner, S., Fraunholz, M., Beaton, M., Penny, S., Deng, L.T., Wu, X., Reith, M., Cavalier-Smith, T., and Maier, U.G. (2001). The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature* **410**, 1091-1096.
- Duhr, S., and Braun, D. (2006). Why molecules move along a temperature gradient. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19678-19682.
- Eady, R.R., Smith, B.E., Cook, K.A., and Postgate, J.R. (1972). Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Purification and properties of the component proteins. *Biochem J* **128**, 655-675.
- Foury, F. (1999). Low iron concentration and aconitase deficiency in a yeast frataxin homologue deficient strain. *FEBS Lett* **456**, 281-284.
- Gakh, O., Adamec, J., Gacy, A.M., Twesten, R.D., Owen, W.G., and Isaya, G. (2002). Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry* **41**, 6798-6804.
- Garland, S.A., Hoff, K., Vickery, L.E., and Culotta, V.C. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *J Mol Biol* **294**, 897-907.
- Gelling, C., Dawes, I.W., Richhardt, N., Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2008). Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Mol Cell Biol* **28**, 1851-1861.
- Gentry, L.E., Thacker, M.A., Doughty, R., Timkovich, R., and Busenlehner, L.S. (2013). His86 from the N-terminus of frataxin coordinates iron and is required for Fe-S cluster synthesis. *Biochemistry* **52**, 6085-6096.
- George, G.N., Prince, R.C., Stokley, K.E., Adams, M.W., and Stockley, K.E. (1989). X-ray-absorption-spectroscopic evidence for a novel iron cluster in hydrogenase II from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem J* **259**, 597-600.

- Gerber, J., Mühlenhoff, U., and Lill, R. (2003). An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep* 4, 906-911.
- Gill, S.C., and von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.
- Green, J., and Paget, M.S. (2004). Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol* 2, 954-966.
- Grzesiek, S., and Bax, A. (1993). Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly ¹³C/¹⁵N-enriched proteins. *J Biomol NMR* 3, 185-204.
- He, Y., Alam, S.L., Proteasa, S.V., Zhang, Y., Lesuisse, E., Dancis, A., and Stemmler, T.L. (2004). Yeast frataxin solution structure, iron binding, and ferroxidase interaction. *Biochemistry* 43, 16254-16262.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Galy, B., and Camaschella, C. (2010). Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142, 24-38.
- Herrmann, T., Güntert, P., and Wüthrich, K. (2002). Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS. *J Biomol NMR* 24, 171-189.
- Hu, J., Dong, L., and Outten, C.E. (2008). The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. *J Biol Chem* 283, 29126-29134.
- Imlay, J.A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 77, 755-776.
- Kaplan, J., Canonico, P.G., and Caspar, W.J. (1973). Electron spin resonance studies of spin-labeled mammalian cells by detection of surface-membrane signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 66-70.
- Kaut, A., Lange, H., Diekert, K., Kispal, G., and Lill, R. (2000). Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function. *J Biol Chem* 275, 15955-15961.
- Kim, J.H., Frederick, R.O., Reinen, N.M., Troupis, A.T., and Markley, J.L. (2013). [2Fe-2S]-Ferredoxin binds directly to cysteine desulfurase and supplies an electron for iron-sulfur cluster assembly but is displaced by the scaffold protein or bacterial frataxin. *Journal of the American Chemical Society*.
- Kim, J.H., Tonelli, M., Kim, T., and Markley, J.L. (2012). Three-dimensional structure and determinants of stability of the iron-sulfur cluster scaffold protein IscU from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 51, 5557-5563.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., and Lill, R. (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* 18, 3981-3989.
- Klausner, R.D., Rouault, T.A., and Harford, J.B. (1993). Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* 72, 19-28.
- Kostic, M., Bernhardt, R., and Pochapsky, T.C. (2003). A conserved histidine in vertebrate-type ferredoxins is critical for redox-dependent dynamics. *Biochemistry* 42, 8171-8182.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lai, R.Y., Huang, S., Fenwick, M.K., Hazra, A., Zhang, Y., Rajashankar, K., Philmus, B., Kinsland, C., Sanders, J.M., Ealick, S.E., *et al.* (2012). Thiamin pyrimidine biosynthesis in *Candida albicans* : a remarkable reaction between histidine and pyridoxal phosphate. *J Am Chem Soc* *134*, 9157-9159.
- Lange, H., Kaut, A., Kispal, G., and 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., and Lill, R. (1999). Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria. *J Biol Chem* *274*, 18989-18996.
- Layer, G., Ollagnier-de Choudens, S., Sanakis, Y., and 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. *J Biol Chem* *281*, 16256-16263.
- Leimkühler, S., and Rajagopalan, K.V. (2001). A sulfurtransferase is required in the transfer of cysteine sulfur in the in vitro synthesis of molybdopterin from precursor Z in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* *276*, 22024-22031.
- Lill, R., and Mühlhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem* *77*, 669-700.
- Lindmark, D.G., and Müller, M. (1973). Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Trichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J Biol Chem* *248*, 7724-7728.
- Majewska, J., Ciesielski, S.J., Schilke, B., Kominek, J., Blenska, A., Delewski, W., Song, J.Y., Marszalek, J., Craig, E.A., and Dutkiewicz, R. (2013). Binding of the chaperone Jac1 protein and cysteine desulfurase Nfs1 to the iron-sulfur cluster scaffold Isu protein is mutually exclusive. *J Biol Chem* *288*, 29134-29142.
- Marinoni, E.N., de Oliveira, J.S., Nicolet, Y., Raulfs, E.C., Amara, P., Dean, D.R., and Fontecilla-Camps, J.C. (2012). (IscS-IscU)₂ complex structures provide insights into Fe₂S₂ biogenesis and transfer. *Angewandte Chemie* *51*, 5439-5442.
- Markley, J.L., Kim, J.H., Dai, Z., Bothe, J.R., Cai, K., Frederick, R.O., and Tonelli, M. (2013). Metamorphic protein IscU alternates conformations in the course of its role as the scaffold protein for iron-sulfur cluster biosynthesis and delivery. *FEBS letters* *587*, 1172-1179.
- Marquet, A. (2001). Enzymology of carbon-sulfur bond formation. *Curr Opin Chem Biol* *5*, 541-549.
- Meyer, J. (2008). Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *J Biol Inorg Chem* *13*, 157-170.
- Mihara, H., and Esaki, N. (2002). Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol* *60*, 12-23.
- Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T., and Chothia, C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* *247*, 536-540.
- Mühlhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., and Lill, R. (2003a). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J* *22*, 4815-4825.

- Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., and Lill, R. (2003b). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J* 22, 4815-4825.
- Mühlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G., and Lill, R. (2002). The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum Mol Genet* 11, 2025-2036.
- Müller, J.J., Lapko, A., Bourenkov, G., Ruckpaul, K., and Heinemann, U. (2001). Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis. *J Biol Chem* 276, 2786-2789.
- Nair, M., Adinolfi, S., Pastore, C., Kelly, G., Temussi, P., and Pastore, A. (2004). Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, CyaY: mapping the iron binding sites. *Structure* 12, 2037-2048.
- Nakamura, A., Osonoi, T., and Terauchi, Y. (2010). Relationship between urinary sodium excretion and pioglitazone-induced edema. *J Diabetes Investig* 1, 208-211.
- Orengo, C.A., and Thornton, J.M. (2005). Protein families and their evolution-a structural perspective. *Annu Rev Biochem* 74, 867-900.
- Orme-Johnson, W.H., Hamilton, W.D., Jones, T.L., Tso, M.Y., Burris, R.H., Shah, V.K., and Brill, W.J. (1972). Electron paramagnetic resonance of nitrogenase and nitrogenase components from *Clostridium pasteurianum* W5 and *Azotobacter vinelandii* OP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 3142-3145.
- Page, C.C., Moser, C.C., Chen, X., and Dutton, P.L. (1999). Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* 402, 47-52.
- Parent, A., Elduque, X., Cornu, D., Belot, L., Le Caer, J.P., Grandas, A., Toledano, M.B., and D'Autréaux, B. (2015). Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. *Nat Commun* 6, 5686.
- Pastore, A., and Puccio, H. (2013). Frataxin: a protein in search for a function. *J Neurochem* 126 Suppl 1, 43-52.
- Pastore, C., Franzese, M., Sica, F., Temussi, P., and Pastore, A. (2007). Understanding the binding properties of an unusual metal-binding protein--a study of bacterial frataxin. *FEBS J* 274, 4199-4210.
- Percudani, R., and Peracchi, A. (2003). A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep* 4, 850-854.
- Petoukhov, M.V., Franke, D., Shkumatov, A.V., Tria, G., Kikhney, A.G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H.D., Konarev, P.V., and Svergun, D.I. (2012). New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* 45, 342-350.
- Petoukhov, M.V., and Svergun, D.I. (2013). Applications of small-angle X-ray scattering to biomacromolecular solutions. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 429-437.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612.

- Pienkos, P.T., Shah, V.K., and Brill, W.J. (1977). Molybdenum cofactors from molybdoenzymes and in vitro reconstitution of nitrogenase and nitrate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5468-5471.
- Pierrel, F., Hamelin, O., Douki, T., Kieffer-Jaquinod, S., Mühlhoff, U., Ozeir, M., Lill, R., and Fontecave, M. (2010). Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis. *Chem Biol* 17, 449-459.
- Prischi, F., Konarev, P.V., Iannuzzi, C., Pastore, C., Adinolfi, S., Martin, S.R., Svergun, D.I., and Pastore, A. (2010a). Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nat Commun* 1, 95.
- Prischi, F., Pastore, C., Carroni, M., Iannuzzi, C., Adinolfi, S., Temussi, P., and Pastore, A. (2010b). Of the vulnerability of orphan complex proteins: the case study of the E. coli IscU and IscS proteins. *Protein Expr Purif* 73, 161-166.
- Rao, K.K., Evans, M.C., Cammack, R., Hall, D.O., Thompson, C.L., Jackson, P.J., and Johnson, C.E. (1972). Mössbauer effect in rubredoxin. Determination of the hyperfine field of the iron in a simple iron-sulphur protein. *Biochem J* 129, 1063-1070.
- Rodrigues, A.V., Kandegedara, A., Rotondo, J.A., Dancis, A., and Stemmler, T.L. (2015). Iron loading site on the Fe-S cluster assembly scaffold protein is distinct from the active site. *Biometals* 28, 567-576.
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.S., Lin, S.W., Dunn, J.J., and Studier, F.W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56, 125-135.
- Rouault, T.A. (2006). The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol* 2, 406-414.
- Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5, 725-738.
- Rusnak, F.M., Adams, M.W., Mortenson, L.E., and Münck, E. (1987). Mössbauer study of *Clostridium pasteurianum* hydrogenase II. Evidence for a novel three-iron cluster. *J Biol Chem* 262, 38-41.
- Schagerlöff, U., Elmlund, H., Gakh, O., Nordlund, G., Hebert, H., Lindahl, M., Isaya, G., and Al-Karadaghi, S. (2008). Structural basis of the iron storage function of frataxin from single-particle reconstruction of the iron-loaded oligomer. *Biochemistry* 47, 4948-4954.
- Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Elsasser, H.P., Mühlhoff, U., Webert, H., Hobler, A., Hannemann, F., Bernhardt, R., and Lill, R. (2010a). Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11775-11780.
- Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Elsässer, H.P., Mühlhoff, U., Webert, H., Hobler, A., Hannemann, F., Bernhardt, R., and Lill, R. (2010b). 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.
- Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G., and Bax, A. (2009). TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J Biomol NMR* 44, 213-223.

- Shethna, Y.I., DerVartanian, D.V., and Beinert, H. (1968). Non heme (iron-sulfur) proteins of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem Biophys Res Commun* 31, 862-868.
- Shi, R., Proteau, A., Villarroya, M., Moukadiri, I., Zhang, L., Trempe, J.F., Matte, A., Armengod, M.E., and Cygler, M. (2010). Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS Biol* 8, e1000354.
- Shimomura, Y., Wada, K., Fukuyama, K., and Takahashi, Y. (2008). The asymmetric trimeric architecture of [2Fe-2S] IscU: implications for its scaffolding during iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Mol Biol* 383, 133-143.
- Spiro, S. (2006). Nitric oxide-sensing mechanisms in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* 34, 200-202.
- Srinivasan, V., Pierik, A.J., and Lill, R. (2014). Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1. *Science* 343, 1137-1140.
- Stemmler, T.L., Lesuisse, E., Pain, D., and Dancis, A. (2010). Frataxin and mitochondrial FeS cluster biogenesis. *The Journal of biological chemistry* 285, 26737-26743.
- Strain, J., Lorenz, C.R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G.A., Ta, D.T., Vickery, L.E., and Culotta, V.C. (1998). Suppressors of superoxide dismutase (SOD1) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem* 273, 31138-31144.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185, 60-89.
- SUZUKI, K., and KIMURA, T. (1965). AN IRON PROTEIN AS A COMPONENT OF STEROID 11-BETA-HYDROXYLASE COMPLEX. *Biochem Biophys Res Commun* 19, 340-345.
- Söderberg, C.A., Shkumatov, A.V., Rajan, S., Gakh, O., Svergun, D.I., Isaya, G., and Al-Karadaghi, S. (2011). Oligomerization propensity and flexibility of yeast frataxin studied by X-ray crystallography and small-angle X-ray scattering. *J Mol Biol* 414, 783-797.
- Tartof, K.D., and Hobbs, C.A. (1987). *Focus* 9, 1.
- Tovar, J., Fischer, A., and Clark, C.G. (1999). The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* 32, 1013-1021.
- Tsai, C.L., Bridwell-Rabb, J., and Barondeau, D.P. (2011). Friedreich's ataxia variants I154F and W155R diminish frataxin-based activation of the iron-sulfur cluster assembly complex. *Biochemistry* 50, 6478-6487.
- Uzarska, M.A., Dutkiewicz, R., Freibert, S.A., Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2013). The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Mol Biol Cell* 24, 1830-1841.
- van Dijk, A.D., Kaptein, R., Boelens, R., and Bonvin, A.M. (2006a). Combining NMR relaxation with chemical shift perturbation data to drive protein-protein docking. *J Biomol NMR* 34, 237-244.

- van Dijk, M., van Dijk, A.D., Hsu, V., Boelens, R., and Bonvin, A.M. (2006b). Information-driven protein-DNA docking using HADDOCK: it is a matter of flexibility. *Nucleic Acids Res* **34**, 3317-3325.
- Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 615-619.
- Wang, J., and Pantopoulos, K. (2011). Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J* **434**, 365-381.
- Webert, H., Freibert, S.A., Gallo, A., Heidenreich, T., Linne, U., Amlacher, S., Hurt, E., Mühlenhoff, U., Banci, L., and Lill, R. (2014). Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nat Commun* **5**, 5013.
- White, M.F. (2009). Structure, function and evolution of the XPD family of iron-sulfur-containing 5'→3' DNA helicases. *Biochem Soc Trans* **37**, 547-551.
- Wiedemann, N., Urzica, E., Guiard, B., Müller, H., Lohaus, C., Meyer, H.E., Ryan, M.T., Meisinger, C., Mühlenhoff, U., Lill, R., *et al.* (2006). Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *EMBO J* **25**, 184-195.
- Wienken, C.J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D., and Duhr, S. (2010). Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nature communications* **1**, 100.
- Williams, B.A., Hirt, R.P., Lucocq, J.M., and Embley, T.M. (2002). A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* **418**, 865-869.
- Wu, G., Mansy, S.S., Wu Sp, S.P., Surerus, K.K., Foster, M.W., and Cowan, J.A. (2002). Characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein (ISU1) from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry* **41**, 5024-5032.
- Wächtershäuser, G. (1990). Evolution of the first metabolic cycles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 200-204.
- Yan, R., Adinolfi, S., and Pastore, A. (2015). Ferredoxin, in conjunction with NADPH and ferredoxin-NADP reductase, transfers electrons to the IscS/IscU complex to promote iron-sulfur cluster assembly. *Biochim Biophys Acta* **1854**, 1113-1117.
- Yan, R., Konarev, P.V., Iannuzzi, C., Adinolfi, S., Roche, B., Kelly, G., Simon, L., Martin, S.R., Py, B., Barras, F., *et al.* (2013). Ferredoxin competes with bacterial frataxin in binding to the desulfurase IscS. *J Biol Chem* **288**, 24777-24787.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* **12**, 7-8.
- Ye, H., and Rouault, T.A. (2010). Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry* **49**, 4945-4956.
- Yoon, T., and Cowan, J.A. (2003). Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J Am Chem Soc* **125**, 6078-6084.
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40.

Zickermann, V., Wirth, C., Nasiri, H., Siegmund, K., Schwalbe, H., Hunte, C., and Brandt, U. (2015). Structural biology. Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I. *Science* 347, 44-49.

7. Anhang

Abb. A.1.

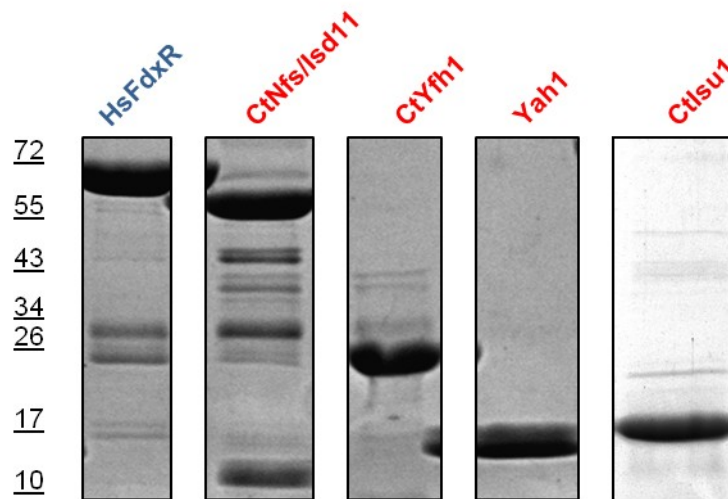


Abb. A.1.: SDS-PAGE-Analyse der gereinigten ISC-Proteine aus *H. sapiens* und *C. thermophilum*. Die Kontaminationen in der Probe der Ferredoxin-Reduktase (HfDxR) und dem Desulfurasekomplex (Nfs1/lsd11) sind zu vernachlässigen.

Abb. A.2.

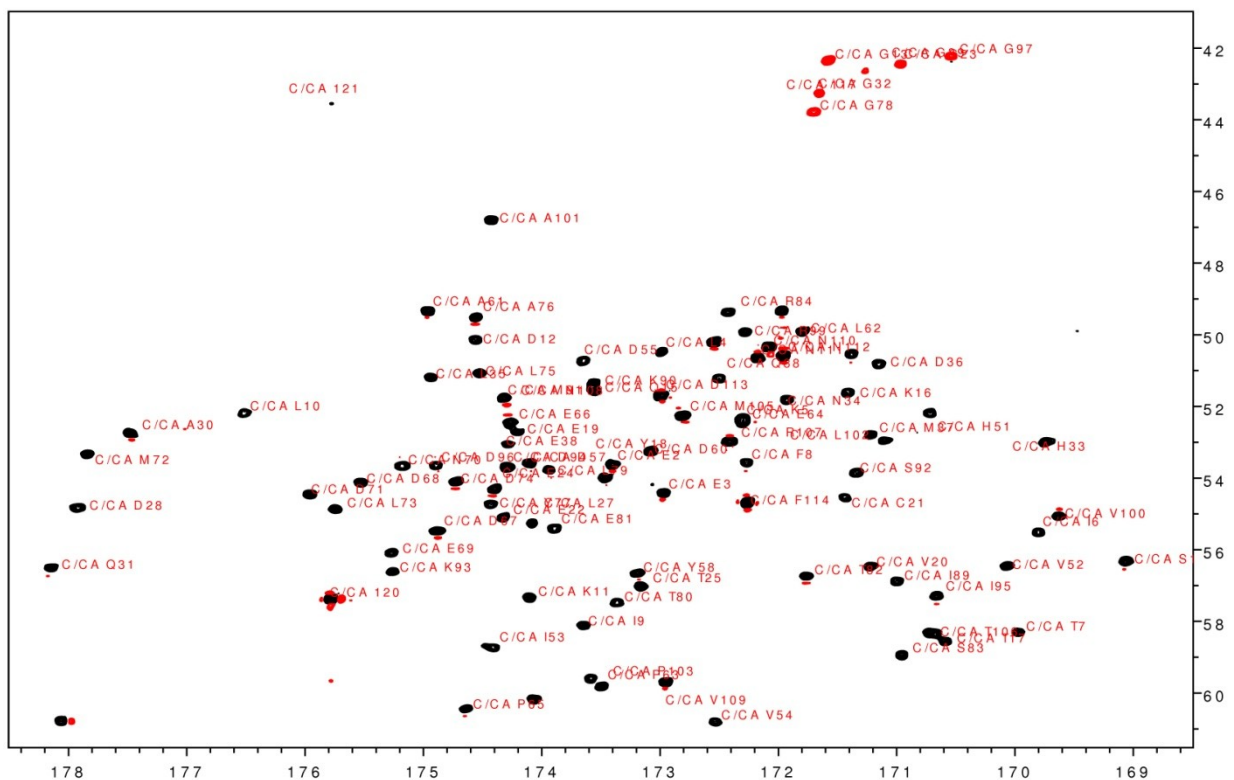


Abb. A.2.: Ergebnis der ^{13}C -Direkt-Detektion. Um sehr langsam relaxierende Aminosäuren in der Nähe des paramagnetischen Fe/S-Clusters zu detektieren, wurden solche Aminosäuren mittels ^{13}C -Direkt-Detektion erfasst und zugeordnet.

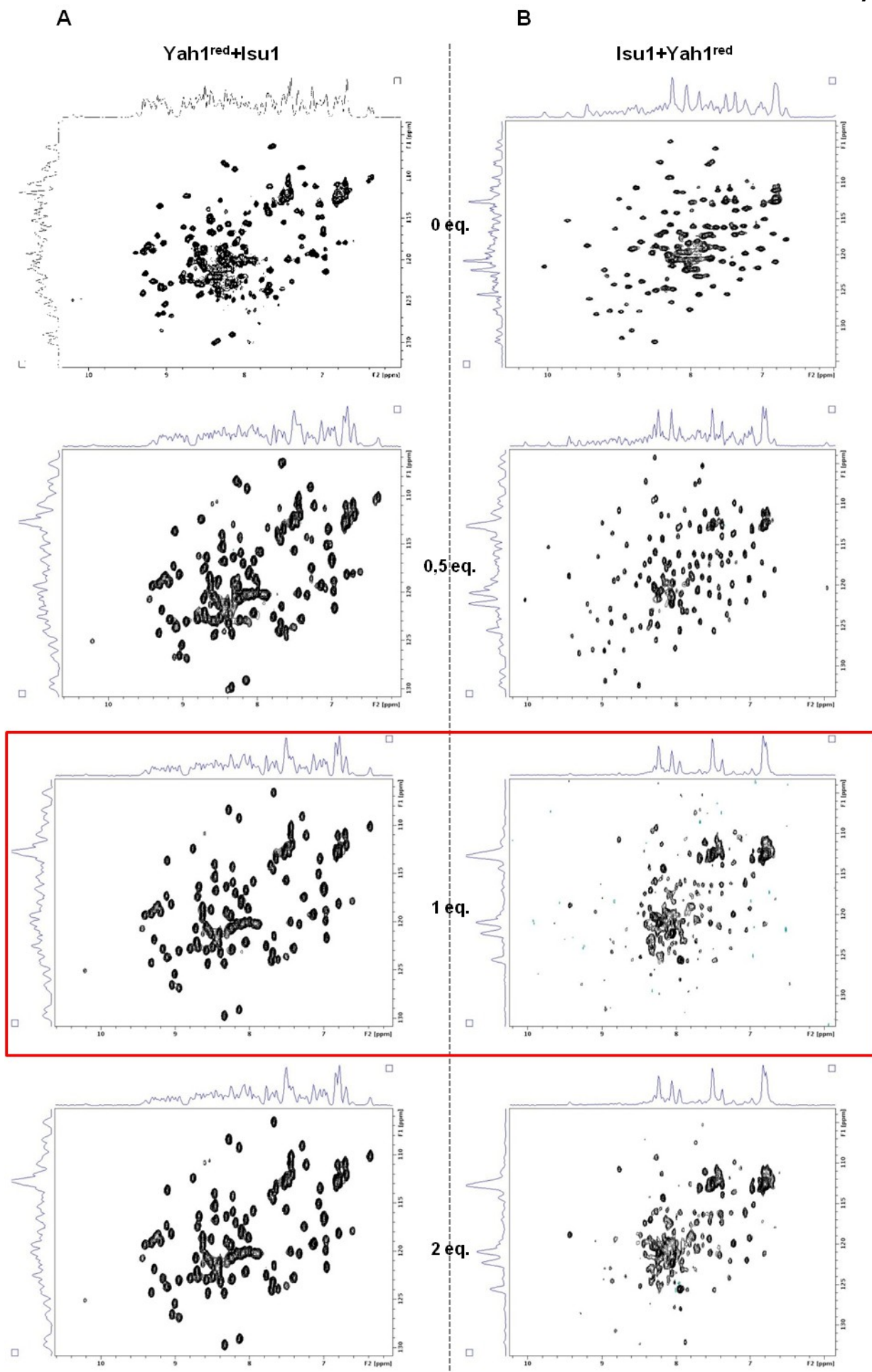


Abb. A.4.: Titrationsreihen zur Bestimmung der potentiellen Interaktionsflächen auf Yah1 und Isu1. Es wurde ^1H - ^{15}N -HSQC Spektren mit verschiedenen Konzentrationen (0 eq., 0.5 eq., 1 eq., 2 eq.) des jeweiligen Interaktionspartners (**A**: Yah1^{red} mit Isu1 und **B**: Isu1 mit Yah1^{red}) aufgezeichnet. Bis zu einer 1:1 Stöchiometrie (1 eq.) konnte eine Verstärkung der chemischen Verschiebungen beobachtet werden. Bei einem Vergleich von den Titrationsstufen mit 1 eq. und 2 eq. konnten keine Veränderung detektiert werden. Für die weitere Auswertung wurden die Spektren mit jeweils 1 eq. des Interaktionspartners verwendet (rot umrahmt).

Abb. A.5.

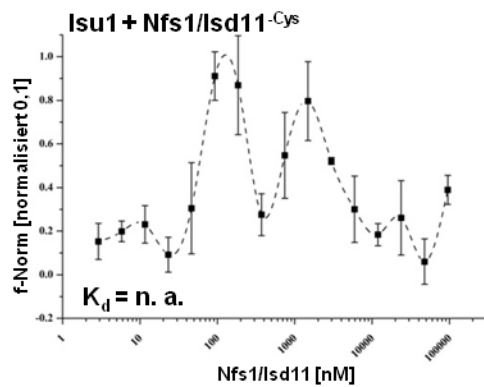


Abb. A.5.: Originaldaten zur Messreihe Isu1 titriert mit Nfs1/Isd11 ohne Zugabe von Cystein. In Abwesenheit von Cystein konnte keine Interaktion von Nfs1/Isd11 mit Isu1 detektiert werden.

Abb. A.6.

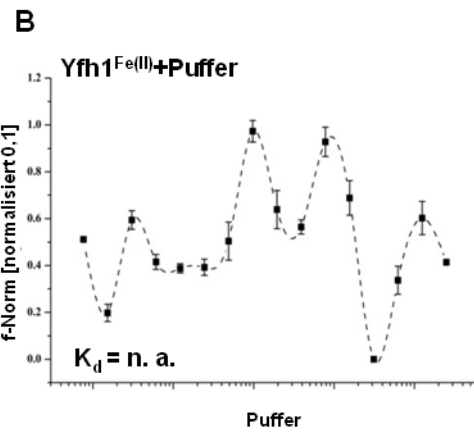
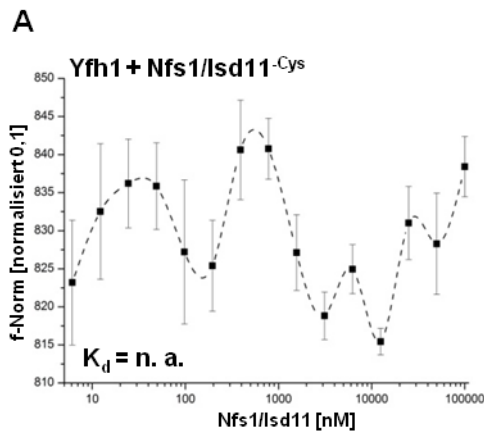


Abb. A.6.: Originaldaten zur Messreihe Yfh1 titriert mit Nfs1/Isd11 ohne Zugabe von Cystein und Negativkontrolle zu den Messungen in Anwesenheit von Fe(II). **A:** Ohne Zugabe von Cystein konnte keine Interaktion von Nfs1/Isd11 mit Yfh1 festgestellt werden. **B:** Kontrollversuch zu den Messungen mit *holo*-Yfh1. Zur Kontrolle, ob eine konstante Fe(II)-Konzentration im Ansatz einen Effekt auf Yfh1 alleine besitzt, wurde eine Messreihe mit Puffer als titrierte Komponente durchgeführt. Es konnte kein Effekt registriert werden.

Abb. A.7.

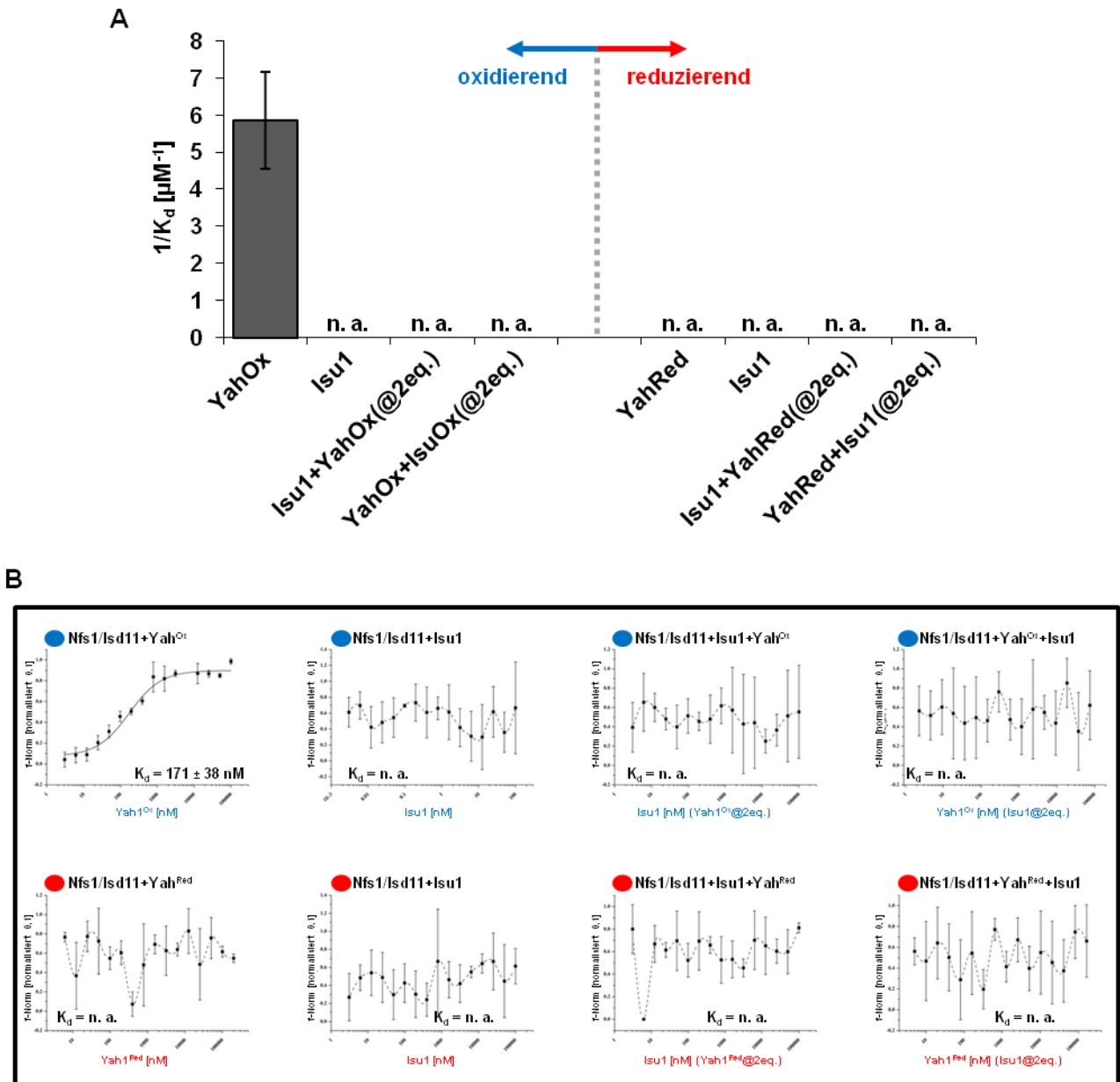


Abb. A.7.: Daten zur Bestimmung der Interaktionen von Nfs1/Isd11 in Abwesenheit von Cystein. **A:** Balkendiagramm der Interaktionen von Nfs1/Isd11 in Abwesenheit von Cystein. Ausschließlich oxidiertes Yah1 interagiert unbeeinträchtigt gut mit dem Desulfurasekomplex. Alle weiteren primären ISC-Faktoren verlieren vollständig ihre Affinität zu Nfs1/Isd11 sowohl unter oxidierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen. **B:** Originaldaten der Messungen mittels Thermophorese. Bis auf die Messreihe mit oxidiertem Yah1 konnte weder unter oxidierenden (blau) noch unter reduzierenden Bedingungen (rot) ein sigmoidales Fitting erzielt und somit keine K_d bestimmt werden. (n. a.: nicht auswertbar)

Abb. A.8.

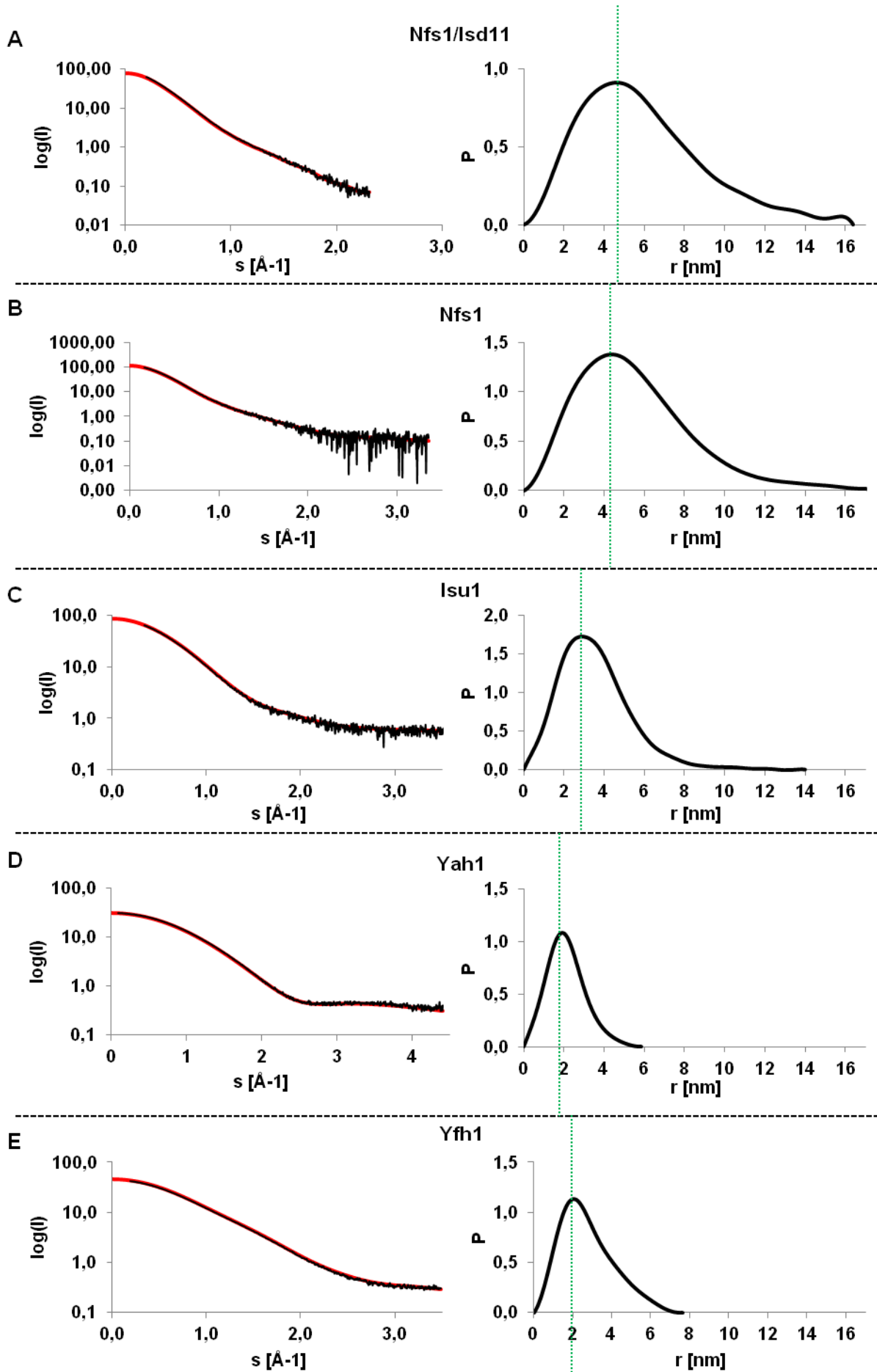


Abb. A.8.: Scattering-Kurven und Paarverteilungsfunktionen der primären Faktoren der frühen ISC-Maschinerie. Scatteringkurven (links) mit Fitting (rot) und Paarverteilungsfunktion (rechts) von Nfs1/Isd11 (A), Nfs1 (B), Isu1 (C), Yah1 (D) und Yfh1 (E). Alle Scattering-Kurven zeigen keinerlei Aggregation und lassen auch im Bereich der größeren Winkel eine Auswertung zu. Die asymmetrischen Paarverteilungsfunktionen von Nfs1/Isd11 (A) und Nfs1 (B) deuten auf eine dimere Anordnung hin, wobei im Falle von Nfs1/Isd11 auch eine Symmetrie höherer Ordnung zu erkennen ist. Dagegen weisen die Paarverteilungsfunktionen von Isu1, Yah1 und Yfh1 eine hohe Symmetrie auf, was klassisch für monomere Proteine ist. Die mittleren Radien der einzelnen Proteine (grün) zeigen deutliche Unterschiede und bestätigen die jeweils erwartete Größe.

8. Videobeschreibungen

Vid. 1: Oxidiertes Yah1. Das in Ferredoxinen konservierte β -grasp-Motiv ist in dunkelblau dargestellt. Originalabbildung: 4.2.

Vid. 2: Vergleich von oxidiertem (hellrot) und reduziertem (dunkelrot) Yah1. Helices wurden im Falle des oxidierten Yah1 in blau gefüllt, bei reduziertem Yah1 in rot. Originalabbildung: 4.7.

Vid. 3: Animation des Ablaufs der Konformationsänderung von Yah1 durch Reduktion. Die Animation wurde mit Hilfe von Chimera 1.9 und „Morph“ erstellt. Es wurde eine lineare Bewegung aller Atome innerhalb der Polypeptidkette der beiden Redoxzustände von oxidiert nach reduziert errechnet. In grau die errechneten Intermediate (Helix $\alpha 3$ in türkies), in dunkelrot reduziertes Yah1 und in hellrot oxidiertes Yah1. Das konservierte Histidin 51 ist in rosa, das konservierte Tyrosin 77 in türkies dargestellt. Originalabbildung: 4.7.

Vid. 4: NMR-basierte Struktur des Isu1 aus *Chaetomium thermophilum*. Alle β -Stränge sind in hellblau dargestellt. Die konservierten Cysteine und das konservierte Histidin, welche das aktive Zentrum bilden sind mit Seitenketten dargestellt. Originalabbildung: 4.12.

Vid. 5: Der Komplex aus Yah1 und Isu1, basiert auf NMR und HADDOCK. Transparente Oberflächendarstellung mit Yah1 in rot und Isu1 in blau. Das konservierte His51 von Yah1 ist in rosa dargestellt. Die Farbkodierung auf Isu1 entspricht der jeweiligen Region mit chemischen Verschiebungen von Isu1. Originalabbildung: 4.17.

Vid. 6: Der SAXS-basierte Komplex aus Nfs1, Yah1 und Isu1. Nfs1 in gelb/ornage, Yah1 in rot (hell und dunkel), Isu1 in blau (hell und dunkel). Sowohl das konservierte Tyr 77 des Yah1 als auch konservierten Cysteine von Nfs1 und Isu1 sind als Sphären dargestellt. Originalabbildung: 4.27.

Vid. 7: Das SAXS-basierte ISC-Kreuz. In grau und rosa Isd11 (je als Dimer), in grün (hell und dunkel) Yfh1, in gelb und orange Nfs1, in rot (hell und dunkel) Yah1 und in blau (hell und dunkel) Isu1. Die Seitenketten der essentiellen Aminosäurereste sind dargestellt. Der Komplex wurde auf Basis aller vorherigen SAXS-Daten als ganzes in die Ladungsdichte eingepasst.

9. Abbildungsverzeichnis

Wenn hier nicht aufgeführt, wurde die Abbildung für diese Arbeit erstellt.

Abb. 1.1.: Modifiziert nach Mariana Ruiz Villarreal, Hamburg

Abb. 1.5.: Modifiziert nach Roland Lill, Marburg

Abb. 1.6.: Modifiziert nach Roland Lill, Marburg

Abb. 5.1./C: aus (Webert et al., 2014)

10. Lebenslauf

Sven-Andreas Freibert, M.Sc.

Ockershäuser Allee 28
D-35037 Marburg

Mobile: +49-176-2392-4699
E-Mail: freibers@staff.uni-marburg.de

Personal data

Date of birth: 06.12.1983
Place of birth: Freiburg im Breisgau, Germany
Marital status: married
Nationality: German

Education

2005 – 2006	Undergraduate studies in physics and mathematics at the Philipps-Universität Marburg, Germany
2006 – 2008	Undergraduate studies in biology at the Philipps-Universität Marburg, Germany Examination in „Zellbiologie“ Bachelorthesis at the Institut für Zytobiologie und Zytopathologie (AG Prof. Dr. Roland Lill) Titel: „Funktionelle Reinigung des CIA-Proteins Nar1p aus <i>S. cerevisiae</i> “
04.06.2008	Receiving the degree: „Bachelor of Science“ Overall grade: “sehr gut” (1.6)
2008 – 2010	Graduate studies in „Molecular and Cellular Biology“ at the Philipps-Universität Marburg, Germany Examination in: „Zellbiologie“ Masterthesis at the Institut für Zytobiologie und Zytopathologie (AG Prof. Dr. Roland Lill) Titel: „Identifizierung, Charakterisierung und funktionelle Reinigung von CIA-Proteinen aus <i>Chaetomium thermophilum</i> “
15.04.2010	Receiving the degree: „Master of Science“ Overall grade: “ausgezeichnet” (1.1)
2010 – today	PhD Student at Philipps-Universität Marburg, Germany, Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, AG Prof. Dr. Roland Lill

Research grants

2010 – 2013 Fellowship of the Max-Planck Gesellschaft (R.Lill)

- 2013 Short-term internship grant from the LOEWE Center for Synthetic Microbiology (SYNMIKRO) conducted at Humboldt Universität zu Berlin, Institut für Strukturbiologie (AG Prof. Dr. Holger Dobbek)
- 2014 Short-term Travelling Fellowships for Structural Biologists (3 months) by Bio-NMR and Instruct conducted at University of Florence, CERM

Internships

- 04/2007 – 06/2007 Internship at Dade Behring, Marburg, Germany; department „Research and Development“, AG Dr. Thilo Henckel
- 08/2009 – 10/2009 Internship at Eppendorf AG, Hamburg, Germany; department “Product Management”, Dr. Claudia Hoffmann

Particular skills

- Languages: English (fluent)
 French (basics)
 Latin (basics)
- EDV: Competent knowledge in using PC and Mac, particularly in using MS Word, MS Excel, MS PowerPoint, Open Office, Adobe, PyMOL Chimera and Origin8G

Course-related activities

- Supervision of practicals in cellular und microbial biology
- Supervision of laboratory internships
- Supervision of bachelor students
- Supervision of master students

Marburg, 06.10.2015

11. Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Roland Lill. Für die Möglichkeit der Promotion, die vielen lehrreichen Diskussionen und Erklärungen, das Vertrauen und andauernde Unterstützung sage ich danke!

Ein großes Dankeschön auch an Jude Przyborski für die Bereitschaft, meine Arbeit als Korreferent zu begutachten.

Vielen Dank an Vasundara Srinivasan sowohl für die Hilfe in strukturbioologischen Fragen als auch für die Begutachtung meiner Arbeit im Namen von Synmikro.

Ich danke Prof. Lucia Banci für die Unterstützung bei allen NMR-Experimenten und die vielen Diskussionen und Ideen. Dr. Angelo Gallo danke ich für die praktische Unterstützung bei der Durchführung der NMR-Experimente und die entstandene Freundschaft.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Zytobiologie, insbesondere der AG Lill, danke ich für die gute Atmosphäre, des Spaß bei der Arbeit und diverse Grillpartys! Vielen Dank an Euch alle!!

Ich danke der Firma NanoTemper für die hilfreichen Diskussionen und Interpretationshinweise. Im Speziellen danke ich Dr. Nina Schlinck für die uneingeschränkte Hilfe bei der Entwicklung neuer Anwendungen.

Meinen Freunden danke ich für die hilfreiche Unterstützung und die oft geführten Diskussionen. Ganz besonders danke ich hier Christian Wolfgang Schink, der mit seiner anderen Sicht auf die Dinge oft neue Blickwinkel eröffnet hat und Carmen Friedrich, durch die das ganze Studium deutlich an Spaß gewonnen hat.

Last but not least bedanke ich bei meiner Familie:

Mama, diese Arbeit ist Dir gewidmet!

Papa, vielen Dank für all die Unterstützung, egal was war!

Anke, ohne Dich wäre dies alles nicht möglich gewesen!

Uwe, Tina und Till, Danke, dass Ihr uns bei unserer Ankunft in Marburg so herzlich aufgenommen habt und mir immer hilfsbereit zur Seite standet.

Und ganz besonders Dir, meine Tritschie, sage ich danke! Danke, dass Du immer da warst, danke, dass Du immer an mich geglaubt hast... Danke, dass es Dich gibt!

Auch dem gesamten Krey-Mob danke ich für die super Abende, nicht nur mit Wasser...

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**„Der frühe Teil der mitochondrialen
Eisen-Schwefel-Cluster Assemblierungsmaschinerie:
Strukturelle und mechanistische Einblicke“**

im Institut für Zytobiologie und Zytopathologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Roland Lill ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

(Ort, Datum)

Sven-Andreas Freibert