

Aus dem Institut für Zytobiologie und Zytopathologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Roland Lill  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Mechanistische Charakterisierung von  
ISC-Assemblierungsfaktoren bei der Maturierung  
mitochondrialer [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Proteine**

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

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Benjamin Dennis Weiler**

aus Hanau

Marburg, 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 13.06.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Roland Lill

1. Korreferent: Prof. Dr. Uwe Maier

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der  
Philipps-Universität Marburg  
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer  
Creative Commons  
Namensnennung  
Keine kommerzielle Nutzung  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen  
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

**Meiner Familie gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

Publikationen.....	viii
Zusammenfassung.....	ix
Summary.....	xi
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Historie und Funktion von Fe/S-Proteinen.....	1
1.2 Dreidimensionale Strukturen von Fe/S-Clustern.....	2
1.3 Biogenese von Fe/S-Clustern und Proteinen.....	3
1.4 Die mitochondriale ISC-Maschinerie.....	6
1.5 Späte ISC-Assemblierungsfaktoren.....	10
1.5.1 Rolle und Funktion des monothiolen Glutaredoxin GLRX5.....	11
1.5.2 Die A-Typ-ISC-Proteine ISCA1 und ISCA2.....	15
1.5.2.1 Das A-Typ-ISC-Protein ISCA1.....	16
1.5.2.2 Das A-Typ-ISC-Protein ISCA2.....	17
1.5.3 Die späte ISC-Komponente IBA57.....	18
1.5.4 BOLA Proteine, spezifische ISC-Assemblierungsfaktoren.....	20
1.5.5 Nfu1-Proteine.....	22
<b>2 Aufgabenstellung und Zielsetzung.....</b>	<b>24</b>
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>25</b>
3.1 Mechanismus und Spezifität von Fe/S-Clustertransfersystemen.....	25
3.1.1 Das [2Fe-2S]-Transfersystem: Indirekter enzymatischer Nachweis von holo-Ferredoxin.....	26
3.1.2 Das physiologische Dithiol-Glutaredoxin-Reduktionssystem Grx1/GSH ersetzt artifizielle Reduktionsmittel in [2Fe-2S]-Transferreaktionen.....	28
3.1.3 NFU1 transferiert ohne artifizielle Reduktionsmittel einen [4Fe-4S]-Cluster auf [4Fe-4S]-Zielproteine.....	33
3.1.4 GSH katalysiert nicht die reduktive Kopplung von [2Fe-2S] <sup>2+</sup> -Clustern zu [4Fe-4S] <sup>2+</sup> -Clustern.....	37
3.1.5 Die Elektronentransportkette, IBA57 und die A-Typ-ISC-Proteine spielen <i>in vitro</i> eine essentielle Rolle bei der Fe/S-Clusterkonversion.....	39
3.2 Biophysikalische Charakterisierung des mitochondrialen monothiolen Glutaredoxin GLRX5 im Komplex mit BOLA- Proteinen.....	44
3.2.1 GLRX5-BOLA-Interaktionsstudien mittels MicroScale Thermophorese ...	45
3.2.1.1 Unterschiedliche <i>in vitro</i> Affinitäten der humanen BOLA-Proteine zum humanen Glutaredoxin GLRX5.....	45
3.2.2 BOLA1 und GLRX5 bilden einen stöchiometrischen GLRX5-BOLA1-Komplex.....	48
3.2.3 Die Bildung eines GLRX5-BOLA3-Komplexes ist GSH-abhängig.....	54

3.2.4	Spektroskopische Studien zur Interaktion von GLRX5 mit BOLA-Proteinen .....	57
3.2.4.1	GLRX5 und die holoGLRX5-BOLA-Komplexe binden einen [2Fe-2S]-Cluster .....	57
3.2.4.2	Die Interaktion von BOLA1 mit GLRX5 bewirkt CD-spektroskopische Änderungen .....	59
3.2.4.3	Stabilität der holoGLRX5-BOLA-Komplexe gegenüber Oxidation und Reduktion	62
3.2.4.4	BOLA1 verhindert im GLRX5-BOLA1-Komplex den Fe/S-Clustertransfer .....	65
3.3	Untersuchungen zur Koordination des im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters.....	67
3.3.1	<i>In vitro</i> Charakterisierung der Histidine des BOLA1-Proteins .....	69
3.3.1.1	Der [2Fe-2S]-Cluster im holoGLRX5-BOLA1-Komplex wird von einem Histidin koordiniert.....	69
3.3.1.2	His102 ist im holoGLRX5-BOLA1-Komplex nicht essentiell für die Fe/S-Clusterkoordination .....	70
3.3.1.3	Nur der holoGLRX5-BOLA1H102/67/58A-Komplex kann einen Fe/S-Cluster auf [2Fe-2S]-Proteine übertragen .....	77
3.3.2	<i>In vivo</i> Charakterisierung der BOLA1 Histidine .....	79
3.3.2.1	Histidin H102 ist nicht essentiell für eine Fe/S-Cluster-koordination im holoGLRX5-BOLA1-Komplex.....	79
3.3.2.2	Das für die Fe/S-Clusterkoordination im holoGLRX5-BOLA1-Komplex wichtige H102 ist funktionell essentiell .....	81
4	Diskussion.....	85
4.1	Mechanismus und Spezifität von Fe/S-Clustertransfersystemen.....	85
4.1.1	Das Dithiol-Glutaredoxin-Reduktionssystem Grx1/GSH kann das artifizielle DTT in Fe/S-Clustertransferreaktionen ersetzen.....	85
4.1.2	Substratspezifischer Transfer eines GLRX5 gebundenen [2Fe-2S]-Clusters.....	87
4.1.3	Für die Maturierung von [4Fe-4S]-Clustern sind die <i>in vivo</i> ISC-Komponenten auch <i>in vitro</i> essentiell .....	90
4.2	Die Rolle der mitochondrialen Bol-Proteine in der ISC-Assemblierungsmaschinerie .....	93
4.2.1	Humanes GLRX5 bildet mit BOLA1 einen holoGLRX5-BOLA1-Komplex, der einen [2Fe-2S]-Cluster koordiniert.....	94
4.2.2	Die holoGLRX5-BOLA3-Komplexbildung ist GSH-abhängig.....	97
4.2.3	BOLA3 labilisiert, BOLA1 stabilisiert einen im heterologen Komplex gebundenen Fe/S-Cluster .....	98
4.3	Die Fe/S-Clusterkoordination im holoGLRX5-BOLA1-Komplex.....	102
4.3.1	Das Histidin H102 ist im GLRX5-BOLA1-Komplex <i>in vivo</i> funktionell essentiell, aber nicht essentiell für die Fe/S-Clusterkoordination .....	103

---

5	Ausblick .....	106
6	Abkürzungsverzeichnis .....	108
7	Material und Methoden .....	109
7.1	Materialien .....	109
7.1.1	Geräte.....	109
7.1.2	Chemikalien.....	110
7.1.3	Komplettsysteme .....	111
7.1.4	Enzyme .....	111
7.1.5	Antikörper.....	112
7.1.6	Größenstandards .....	112
7.1.7	Oligonukleotide.....	112
7.2	Plasmide .....	114
7.2.1	Ausgangsplasmide für die Expression in <i>E. coli</i> .....	114
7.2.1.1	pET-Duet-1 .....	114
7.2.1.2	pRSF-Duet-1 .....	115
7.2.2	Plasmide zur Expression in <i>E. coli</i> .....	116
7.2.3	Ausgangsplasmide für die Expression in <i>S. cerevisiae</i> .....	117
7.2.4	Plasmide zur Expression in <i>S. cerevisiae</i> .....	117
7.3	<i>E. coli</i> -Stämme .....	118
7.3.1	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	118
7.3.2	<i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	118
7.3.3	<i>E. coli</i> C41(DE3).....	118
7.4	<i>S. cerevisiae</i> -Stamm .....	118
7.5	Medien.....	118
7.5.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	119
7.5.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	119
7.6	Molekularbiologische Methoden .....	120
7.6.1	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> .....	120
7.6.2	Agarose Gelelektrophorese.....	120
7.6.3	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	120
7.6.4	Reinigung von DNA aus PCR-Reaktionen und Agarosegelen .....	121
7.7	Modifikation von DNA .....	122
7.7.1	Restriktionsverdau von DNA.....	122
7.7.2	Ligation von DNA-Fragmenten.....	122
7.8	Zellbiologische Methoden .....	122
7.8.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	122
7.8.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	123

---

7.8.3	Transformation chemisch kompetenter <i>S. cerevisiae</i> Zellen.....	123
7.9	Proteinbiochemische Methoden .....	123
7.9.1	Messung der Absorption bei 280 nm.....	123
7.9.2	Proteinbestimmungen nach Bradford .....	124
7.9.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	124
7.9.4	Färben von Proteinen mit <i>Coomassie Brilliant-Blue</i> .....	125
7.9.5	MicroScale Thermophorese (MST).....	125
7.9.6	Western Blot.....	125
7.9.7	Immundetektion von Proteinen .....	126
7.10	Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen.....	126
7.10.1	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> .....	127
7.10.2	Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA .....	127
7.10.3	Gelfiltrationschromatographie .....	128
7.10.4	Umpuffern von Proteinen .....	128
7.10.5	Konzentrierung von Proteinen .....	128
7.10.6	UV/Vis-Spektroskopie .....	128
7.10.7	CD-Spektroskopie .....	129
7.10.8	Chemische Rekonstitution von Fe/S-Proteinen .....	129
7.10.9	Bestimmung des Eisenionengehaltes mit Feren .....	130
7.10.10	Bestimmung des Sulfidionengehaltes .....	130
7.11	Fe/S-Cluster Transfer .....	131
7.11.1	Enzymtestsysteme .....	132
7.11.1.1	Quantifizierung von holo-Ferredoxinen.....	132
7.11.1.2	Aconitase.....	133
7.11.1.3	Leu1 (Isopropylmalat-Isomerase) .....	133
8	Anhang.....	134
9	Literatur .....	142
10	Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	158
11	Danksagung .....	159

## Publikationen

Teile dieser Arbeit sind bereits in folgenden Veröffentlichungen zu finden:

Uzarska, M.A.\* , Nasta, V.\* , Weiler, B.D.\*, Spantgar, F., Ciofi-Baffoni, S., Saviello, M.R., Gonnelli, L., Mühlenhoff, U., Banci, L., and Lill, R. (2016). **Mitochondrial Bol1 and Bol3 function as assembly factors for specific iron-sulfur proteins.** *Elife* 5.

Buchkapitel:

Freibert, SA.\* , Weiler, BD.\*, Bill, E., Mühlenhoff, U., Lill, R., (2017). **Biochemical reconstitution and spectroscopic analysis of iron-sulfur proteins.** *Methods Enzymol.* Part B, Vol. 599.

---

\* gleichberechtigte Erstautorenschaft

Melber, A., Na, U., Vashisht, A., Weiler, B.D., Lill, R., Wohlschlegel, J.A., and Winge, D.R. (2016). **Role of Nfu1 and Bol3 in iron-sulfur cluster transfer to mitochondrial clients.** *Elife* 5.

Weiler, BD., Brück, M., Lill, R., Mühlenhoff, U., (2017). **Dithiol glutaredoxins promote target-specific Fe/S cluster transfer to Fe/S apo-proteins.** (fertiges Manuskript)

Weiler, BD., Mühlenhoff, U., Lill, R., (2017). **Fe/S cluster binding between GLRX5 and BOLA1 is dependent on coordination by BOLA1.** (Manuskript in Vorbereitung)

**Weitere Veröffentlichungen:**

Netz, DJ., Genau, HM., Weiler, BD., Bill, E., Pierik, AJ., Lill, R., (2016). **The conserved protein Dre2 uses essential [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters for its function in cytosolic iron-sulfur protein assembly.** *Biochem. J.*, 14, 2073-85.

**Ehrungen:**

**Young Scientist Award** - 2015 - Iron Sulfur Cluster Biogenesis and Regulation June 23-26, 2015 Bergamo Italy.

## Zusammenfassung

Eisen-Schwefel-(Fe/S)-Proteine sind in fast allen Lebensformen zu finden, an einer Vielzahl essentieller zellulärer Prozesse beteiligt und in unterschiedlichen Kompartimenten der eukaryotischen Zelle lokalisiert. In (nicht-grünen) Eukaryoten gibt es zwei Assemblierungsmaschinerien, die für die Maturierung von Fe/S-Proteinen verantwortlich sind. Die zytosolische Fe/S-Protein-Assemblierungsmaschinerie (CIA) mit 11 Proteinfaktoren und die aus 17 Proteinen bestehende mitochondriale Fe/S-Cluster-Assemblierungsmaschinerie (ISC), die an der Biogenese aller zellulären Fe/S-Proteine beteiligt ist. Im ersten Schritt der ISC-Maschinerie wird ein [2Fe-2S]-Cluster *de novo* auf dem Gerüstprotein ISCU synthetisiert und mit Hilfe eines Chaperonsystems auf das Monothiol-Glutaredoxin GLRX5 transferiert. Der auf GLRX5 transient gebundene [2Fe-2S]-Cluster kann entweder direkt auf [2Fe-2S]-Zielproteine übertragen oder nach *in vivo* Untersuchungen von den ISCA-IBA57 Proteinen zu einem [4Fe-4S]-Cluster konvertiert werden. Für die Insertion des [4Fe-4S]-Clusters in Apozielproteine werden noch weitere spezialisierte ISC-Proteine benötigt. Hierzu zählt beispielsweise NFU1, das transient einen [4Fe-4S]-Cluster bindet und diesen auf spezielle Zielproteine wie der Aconitase (ACO2) überträgt. Zwei weitere Proteine, BOLA1 und BOLA3, sind vermeintlich zusätzliche spezifische ISC-Proteine. Sowohl die Synthese eines [4Fe-4S]-Clusters als auch die an die [2Fe-2S]- oder [4Fe-4S]-Clustersynthese anschließende Clusterinsertion in entsprechende Zielproteine sind biochemisch weitestgehend unbekannt. Im eukaryotischen System ist bisher weder der [2Fe-2S]- noch der [4Fe-4S]-Clustertransfer unter physiologischen Bedingungen mechanistisch aufgeklärt worden. Alle bisherigen Fe/S-Clustertransfersysteme wurden ausnahmslos in Gegenwart von artifiziellen, thiol-spezifischen Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol (DTT) durchgeführt. Da DTT in diesen Transfersystemen meist essentiell war, blieb einerseits unklar, welche physiologischen Reduktionsmittel das DTT in der Zelle ersetzen. Andererseits ging aus diesen *in vitro* Untersuchungen nicht hervor, ob die beobachteten Transferreaktionen überhaupt physiologische Relevanz besitzen und auch *in vivo* so ablaufen, wie sie *in vitro* beobachtet wurden.

In dieser Arbeit konnte, unter Verwendung des physiologischen Dithiol-Glutaredoxin-Glutathion-Reduktionssystems (Grx1/GSH) anstelle des DTT, ein zielspezifischer [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Clustertransfer auf Zielproteine *in vitro* nachgestellt werden. Der [2Fe-2S]-Clustertransfer von GLRX5 auf das natürliche Zielprotein, das mitochondriale Ferredoxin FDX1, erfolgte in weniger als 15 Sekunden ohne Beteiligung weiterer Hilfsproteine. Demgegenüber war der Transfer eines [2Fe-2S]-Clusters von GLRX5 auf ein [4Fe-4S]-Zielprotein nicht spontan ohne weiteres möglich. Auch der [4Fe-4S]-Cluster des späten ISC-Proteins NFU1 konnte in Gegenwart von Grx1/GSH jedoch ohne Hilfsproteine auf [4Fe-4S]-Zielproteine (ACO2, Leu1) übertragen werden. Für die Konversion eines GLRX5-gebundenen [2Fe-2S]- zu einem [4Fe-4S]-Cluster und die anschließende Insertion des [4Fe-4S]-Clusters in ACO2 waren *in vitro* wie erwartet die späten ISC-Komponenten ISCA1, ISCA2, IBA57, aber

überraschenderweise auch die Elektronentransferkette (FDX2/FDXR/NADPH) essentiell notwendig. Grx1/GSH fungierte bei diesen Transferprozessen offensichtlich nur für die Reduktion der Zielproteine, nicht aber für die reduktive Kopplung von  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Clustern zu einem  $[4\text{Fe-4S}]^{4+}$ -Cluster, was *in vitro* auch mit Hilfe von DTT artifiziiell erfolgen kann. Zum ersten Mal konnten damit sowohl für den  $[2\text{Fe-2S}]$ - als auch den  $[4\text{Fe-4S}]$ -Clustertransfer physiologisch relevante *in vitro* Ergebnisse erzielt werden, die exakt die *in vivo* Verhältnisse widerspiegeln.

Die mitochondrialen Proteine BOLA1 und BOLA3 der BOLA-Familie wurden als zusätzliche spezifische ISC-Proteine vermutet, da Patienten mit multiplen mitochondrialem Dysfunktionssyndrom 2 (MMDS2) durch den funktionellen Verlust des BOLA3-Proteins ein vergleichbares Krankheitsbild aufwiesen wie Patienten mit Mutationen im *NFU1*-Gen (MMDS1). *In vivo* Analysen in Hefe hatten gezeigt, dass Bol1 und Bol3 für die Insertion von  $[4\text{Fe-4S}]$ -Clustern in spezifische Zielproteine, wie der Lipoatsynthase (LIAS) und der Succinatdehydrogenase (SDH), nicht aber für  $[2\text{Fe-2S}]$ -Proteine wie Ferredoxine notwendig sind. Beide Hefe Bol-Proteine haben *in vivo* überlappende Funktionen. In dieser Arbeit konnte mit biochemischen Methoden wie MicroScale Thermophorese, analytischer Gelfiltration, UV/Vis- und CD-Spektroskopie gezeigt werden, dass das humane BOLA1 einen heterodimeren Komplex sowohl mit der Apo- als auch der Holoform des GLRX5 bildet. Der GLRX5-BOLA1-Komplex wies im Vergleich zum homodimeren GLRX5-GLRX5-Komplex unterschiedliche CD-spektroskopische Eigenschaften auf. Der  $[2\text{Fe-2S}]$ -Cluster war im GLRX5-BOLA1-Komplex stabiler gebunden als im homodimeren GLRX5, gegenüber Reduktion geschützt und konnte nicht auf  $[2\text{Fe-2S}]$ -Zielproteine transferiert werden. Um zu untersuchen, wie der  $[2\text{Fe-2S}]$ -Cluster durch BOLA1 koordiniert wird, wurden die konservierten Histidinreste (H102, H67, H58) zu Alanin mutiert. Obwohl *in vivo* Experimente gezeigt hatten, dass H102 funktionell essentiell ist, war dieser Rest *in vitro* nicht entscheidend für die Fe/S-Clusterbindung. Der GLRX5-BOLA1H102A-Komplex war reduktionsstabil und zeigte vergleichbare spektroskopische Eigenschaften wie der GLRX5-BOLA1-Komplex. Eine Alaninsubstitution von H67 und H58 und der Dreifachmutante (H102/67/58A) hingegen zeigte veränderte spektroskopische Eigenschaften im GLRX5-BOLA1-Komplex und eine Labilität gegenüber Reduktion. Dennoch bindet der GLRX5-BOLA1-Komplex auch nach Alaninsubstitution aller Histidine einen Fe/S-Cluster, was darauf hindeutet, dass der Fe/S-Cluster auf eine andere Art (GSH) stabilisiert wird. BOLA3 hingegen verhielt sich ganz anders als BOLA1. Es interagierte mit der Apoform von GLRX5, mit der Holoform hingegen nur in Gegenwart von GSH. Der Fe/S-Cluster am GLRX5-BOLA3+GSH-Komplex war labil gebunden, nicht gegen Reduktion geschützt und konnte leicht auf  $[2\text{Fe-2S}]$ -Zielproteine transferiert werden. Die aus diesen *in vitro* Daten hervorgehende unterschiedliche biochemische Rolle der humanen GLRX5-BOLA-Komplexe muss physiologisch durch eingehende *in vivo* Studien aufgeklärt werden.

## Summary

Iron sulfur (Fe/S) proteins occur in all domains of life, and they fulfil essential functions in electron transfer, catalysis, and regulation of gene expression. In (non-green) eukaryotes, two assembly systems are involved in the maturation of Fe/S proteins located in mitochondria, cytosol and nucleus: The cytosolic iron-sulfur protein assembly (CIA) machinery with its 11 protein factors and the mitochondrial iron sulfur cluster (ISC) assembly machinery, which is composed of 17 proteins and participates in the maturation of all cellular Fe/S proteins. Biogenesis of Fe/S-clusters in the ISC system involves the *de novo* synthesis of a [2Fe-2S] cluster on the scaffold protein ISCU, and its subsequent transfer to the monothiol glutaredoxin GLRX5 by the means of a dedicated Hsp70 chaperon system. The transiently bound [2Fe-2S] clusters on GLRX5 can be transferred to [2Fe-2S] target apoproteins or are converted to a [4Fe-4S] cluster. Based on *in vivo* findings the human ISC proteins ISCA1, ISCA2 and IBA57 are essential for the formation of a [4Fe-4S] cluster. Moreover, specialized ISC proteins are needed for the insertion of [4Fe-4S] clusters into target proteins. The ISC targeting factors NFU1 assists Fe/S-cluster insertion into dedicated apoproteins like aconitase (ACO2) by transiently binding a [4Fe-4S] cluster. Two other proteins, BOLA1 and BOLA3, are supposed to be additional specific ISC targeting factors. Although the synthesis of [2Fe-2S] clusters on ISCU is becoming well understood, the formation of [4Fe-4S] clusters and the mechanism of transfer of [2Fe-2S] or [4Fe-4S] clusters to recipient proteins is largely unknown. For the eukaryotic systems neither [2Fe-2S] nor [4Fe-4S] cluster transfer experiments *in vitro* were performed under physiological conditions, because all previous experiments contained the artificial thiol-specific reductant dithiothreitol (DTT). The often essential role of DTT in these *in vitro* systems is not understood so far and it is not clear, what compound might replace DTT *in vivo*.

In this work, substrate-specific [2Fe-2S] and [4Fe-4S] cluster transfer reactions were established in the presence of the physiological cellular thiol-reducing system composed of the dithiol glutaredoxin Grx1 and glutathione (GSH). In the presence of this thiol redox system, Fe/S cluster transfer reactions involving the mitochondrial ISC transfer factor GLRX5 displayed substrate specificity and unprecedented speed: Transfer of a [2Fe-2S] cluster from human GLRX5 to human ferredoxin (FDX1), its natural substrate, was efficiently completed in less than 15 seconds. The [4Fe-4S] ISC transfer factor NFU1 also efficiently matured [4Fe-4S] proteins (ACO2, Leu1) in the presence of Grx1/GSH. In contrast, the direct transfer of a [2Fe-2S]-cluster from GLRX5 to a [4Fe-4S] proteins failed in the presence of Grx1 and GSH, indicating that [2Fe-2S]<sup>2+</sup> clusters are not reductively coupled to a [4Fe-4S]<sup>2+</sup> cluster by Grx1/GSH. However, in the presence of the human ISC proteins ISCA1, ISCA2, IBA57 and an electron transfer chain (FDX2/FDXR/NADPH) the conversion of [2Fe-2S]-clusters into [4Fe-4S]-cluster and its insertion into ACO2 was observed in the presence of Grx1/GSH. In this

reaction, the transiently bound [2Fe-2S] cluster on GLRX5 functions as a Fe/S donor. Taken together, in the first part of the work *in vitro* Fe/S transfer systems were developed that faithfully mimic a [2Fe-2S] and [4Fe-4S] cluster transfer reactions without artificial additives. While the transfer of [2Fe-2S] cluster from GLRX5 was spontaneous, the formation and insertion of [4Fe-4S] clusters on aconitase depended on all ISC components known to be required *in vivo* for [4Fe-4S] cluster synthesis and on an electron transfer chain. These findings strongly suggest that the transfer reactions closely resemble the *in vivo* situation.

Two proteins of the BOLA family, BOLA1 and BOLA3, likely act as specific ISC targeting factors. Patients with a functional loss of BOLA3 suffer from a multiple mitochondrial dysfunction syndrome 2 (MMDS2). This patient phenotype was similar to patients who had mutations in the gene for the specific ISC targeting factor *NFU1* (MMDS1). *In vivo* analysis characterized the yeast Bol proteins as specific mitochondrial ISC factors that facilitate [4Fe-4S] cluster insertion into a subset of mitochondrial proteins such as lipoate synthase and succinate dehydrogenase. The yeast Bol proteins perform largely overlapping functions.

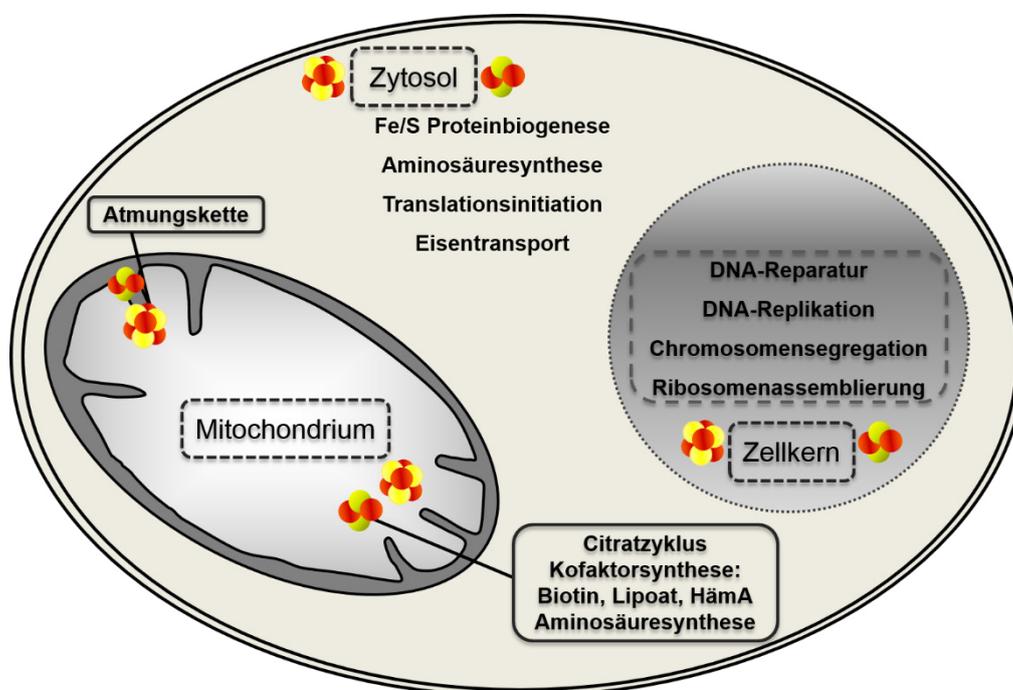
Here, it is shown by *in vitro* methods (MicroScale Thermophoresis, analytical gel filtration, UV/Vis- and CD-spectroscopy) that human BOLA1 and BOLA3 form heterodimeric complexes with GLRX5. BOLA1 interacts with both the apo- and holo-form of GLRX5. Compared to a homodimeric holoGLRX5-GLRX5 complex, the heterodimeric holoGLRX5-BOLA1-complex displays altered CD-spectroscopic features, the [2Fe-2S] cluster was more stable, protected against reduction, and could not be transferred to [2Fe-2S] target proteins. To determine the coordination ligands of the [2Fe-2S] cluster in a holoGLRX5-BOLA1 complex, conserved histidine residues (H102, H67, H58) were replaced by alanine. A GLRX5-BOLA1H102A complex was stable against reduction and displayed similar CD-spectroscopic features as the native GLRX5-BOLA1 complex. Histidine residue H102 is essential *in vivo*, but apparently not needed for Fe/S cluster binding *in vitro*. In contrast, the Fe/S cluster on a GLRX5-BOLA1mut complex (mut: H58A, H67A, H102/67/58A) was reductively labile and displayed altered CD-spectroscopic features. When all conserved histidine residues were replaced by alanine, Fe/S cluster binding was still detectable suggesting that GSH can stabilize the Fe/S cluster in a GLRX5-BOLA1 complex. BOLA3 showed a different behavior. It formed a dimeric complex with the apo form of GLRX5, but formation of the holo complex required the presence of GSH. This holoGLRX5-BOLA3 complex bound a [2Fe-2S] cluster in labile fashion. The cluster was not protected against reduction and Fe/S cluster transfer rates of the homodimeric GLRX5 and the GLRX5-BOLA3 complex were nearly identical.

Taken together, the two GLRX5-BOLA complexes displayed distinct biochemical characteristics *in vitro* suggesting that the human BOLA proteins perform differential functions *in vivo*.

# 1 Einleitung

## 1.1 Historie und Funktion von Fe/S-Proteinen

Eisen-Schwefel-Cluster (Fe/S-Cluster) zählen zu den ältesten Proteinkofaktoren in lebenden Organismen. In den frühen 1960er Jahren wurden Fe/S-Cluster durch Studien an photosynthetischen Organismen (Amon, 1958), stickstofffixierenden Bakterien (Mortenson *et al.*, 1962) und Eukaryoten (Beinert und Lee, 1961) erstmals beschrieben. Es zeigte sich, dass Fe/S-Proteine zur damaligen Zeit unbekannte Elektronenspinresonanzsignale (ESR-Signale) aufwiesen und biologische Funktionen bei der Elektronenübertragung wahrnahmen. Fe/S-Proteine sind in fast allen Lebensformen zu finden, an einer Vielzahl essentieller zellulärer Prozesse beteiligt und in unterschiedlichen Kompartimenten der eukaryotischen Zelle lokalisiert (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Viele zelluläre Prozesse sind von Fe/S-Proteinen abhängig.** Fe/S-Proteine sind sowohl in den Mitochondrien, dem Zytosol als auch im Zellkern lokalisiert und übernehmen wichtige essentielle Funktionen. Nach Lill und Mühlenhoff 2008.

Fe/S-Cluster übernehmen vielfältige Aufgaben: Elektronentransferreaktionen, Katalyse und regulatorische Prozesse sind die bekanntesten Funktionen von Fe/S-Clustern (Beinert *et al.*, 1997a). Eine der Hauptaufgaben ist der intermolekulare oder intramolekulare Elektronentransfer. Der Elektronentransfer resultiert hierbei aus dem Wechsel der Oxidationsstufe +2 und +3 des Eisenkations (Beinert *et al.*, 1997b), wobei der Fe/S-Cluster sowohl als Elektronendonator, als auch Elektronenakzeptor fungieren kann. Bekannte Beispiele

für Elektronentransferreaktionen sind die Komplexe I-III der bakteriellen und mitochondrialen Atmungskette, das Photosystem I in Plastiden, Ferredoxine und Hydrogenasen.

Eine weitere gut untersuchte Funktion ist die Enzymkatalyse. Ein klassisches Beispiel ist die Aconitase, bei der ein freies, nicht von einer Aminosäure koordiniertes Eisenion eines [4Fe-4S]-Clusters als Lewis-Säure fungiert und somit die Abspaltung eines Wassermoleküls des Substrates Citrat katalysiert. Durch erneute Wasseranlagerung an das gebildete Aconitat wird schließlich das Isocitrat gebildet (Beinert *et al.*, 1996). Eine weitere wichtige Enzymklasse sind Radikal-SAM-Enzyme (SAM = S-Adenosyl-Methionin). Hierzu zählen beispielsweise die Biotin- und Lipoatsynthase (LIAS), welche jeweils zwei Fe/S-Cluster binden (Booker *et al.*, 2007; Cicchillo *et al.*, 2004). Ein Fe/S-Cluster der beiden Enzyme ist für die Bildung eines Adenosyl-Radikals verantwortlich, welches die Substrate Desthiobiotin und Oktansäure aktiviert. Die Funktion des zweiten Fe/S-Clusters liegt in der Schwefelbereitstellung für Biotin oder Liponsäure (McCarthy und Booker, 2017).

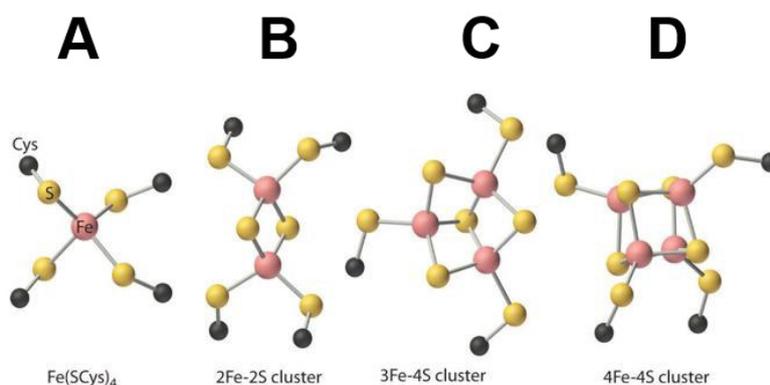
Weitere wichtige katalytische Funktionen für bakterielle und eukaryotische Fe/S-Enzyme bestehen im Metabolismus (Meyer, 2008). Allerdings ist bei vielen Proteinen die Funktion des Fe/S-Kofaktors noch nicht geklärt. Vermutlich hat der Fe/S-Cluster auch strukturelle Aufgaben bei der Stabilisierung oder bei der Ausbildung von bestimmten Faltungsmotiven (Lill, 2009a). Diese strukturelle und stabilisierende Aufgabe eines Fe/S-Clusters könnte auf die kürzlich entdeckten und einen [4Fe-4S]-Cluster enthaltenden Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Helikasen zutreffen, die an der Basen-Austausch-Reparatur beteiligt sind. Hierzu zählen die Helikasen Rad3 (*S. cerevisiae*), XPD (*H. sapiens*) und FancJ (*H. sapiens*) (Rudolf *et al.*, 2006). Des Weiteren können Fe/S-Cluster als Sensor von Umweltbedingungen oder als Transkriptionsfaktoren fungieren, in dem durch Erfassen der extrazellulären Bedingungen eine Antwort auf die Umweltbedingungen durch Genregulation erfolgt. Beispiele hierfür sind die bakteriellen Transkriptionsfaktoren FNR, SoxR oder IscR, die abhängig von der Konzentration an Sauerstoff, Superoxid/Stickstoffmonoxid oder Fe/S-Clustern bestimmte Gene aktivieren oder reprimieren. Das Umschalten zwischen Aktivierung und Repression ist abhängig von der Anwesenheit oder Abwesenheit eines Fe/S-Clusters (FNR, IscR) oder vom Redoxzustand des [2Fe-2S]-Clusters (SoxR) (Imlay, 2008).

## 1.2 Dreidimensionale Strukturen von Fe/S-Clustern

Fe/S-Cluster sind von den Archaeen über Eubakterien bis hin zu den Eukaryoten in allen Lebensformen vertreten. Mit dem gegebenen Umfeld des Proteins können Fe/S-Cluster Redoxpotentiale von -500 mV bis zu +300 mV erreichen (Meyer, 2008). Der rhombische [2Fe-2S]- (Abbildung 2B), der kubische [4Fe-4S]- (Abbildung 2D) und der [3Fe-4S]-Cluster (Abbildung 2C) gehören zu den einfachsten und am weitesten verbreiteten Fe/S-Clustern und repräsentieren mehr als 90% aller Fe/S-Cluster Kofaktoren. Der kubane [4Fe-4S] Cluster ist

in mehr als 60% aller zellulären Fe/S-Cluster zu finden, der dinukleare [2Fe-2S]-Cluster ist in verschiedene Spezies um die 10-30% repräsentiert (Andreini *et al.*, 2017). Das Eisenkation ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) wird tetraedrisch von Sulfidliganden ( $\text{RS}^{2-}$ ) koordiniert (Beinert *et al.*, 1997a), wobei die Eisenionen hauptsächlich von Cysteinen an Proteine koordiniert werden. In komplexeren Fe/S-Clusterstrukturen sind mittlerweile auch alternative Liganden (Asp, Arg, Ser, CO,  $\text{CN}^-$ , u.v.m.) bekannt (Lill, 2009b). Fe/S-Cluster können unter anaeroben Bedingungen spontan aus  $\text{Fe}^{2+/3+}$ ,  $\text{RS}^-$  und  $\text{S}^{2-}$  gebildet werden und werden dem Gebiet der Metallkoordinationschemie zugeordnet.

Viele Proteine können auch mehr als einen Fe/S-Cluster binden. Bekannte Beispiele hierfür sind der bakterielle Komplex I (9 Fe/S-Cluster) oder der mitochondriale Komplex I (8 Fe/S-Cluster). Zu den am frühesten identifizierten und charakterisierten Fe/S-Proteinen gehören die Komplexe I-III der mitochondrialen Atmungskette, sowie pflanzliche, bakterielle und eukaryotische Ferredoxine (Beinert und Albracht, 1982; Meinhardt *et al.*, 1987).



**Abbildung 2: Strukturen von Fe/S-Clustern.** (A) Rubredoxin: Tetraedrische Koordination des Eisenkations durch Sulfidliganden ( $\text{RS}^-$ ). Die einfachsten und am häufigsten vorkommenden Typen von Fe/S-Clustern sind: (B) Rhombischer [2Fe-2S]-Cluster, (C) [3Fe-4S]-Cluster und (D) der kubische [4Fe-4S]-Cluster. Aus Averill und Eldredge, 2012.

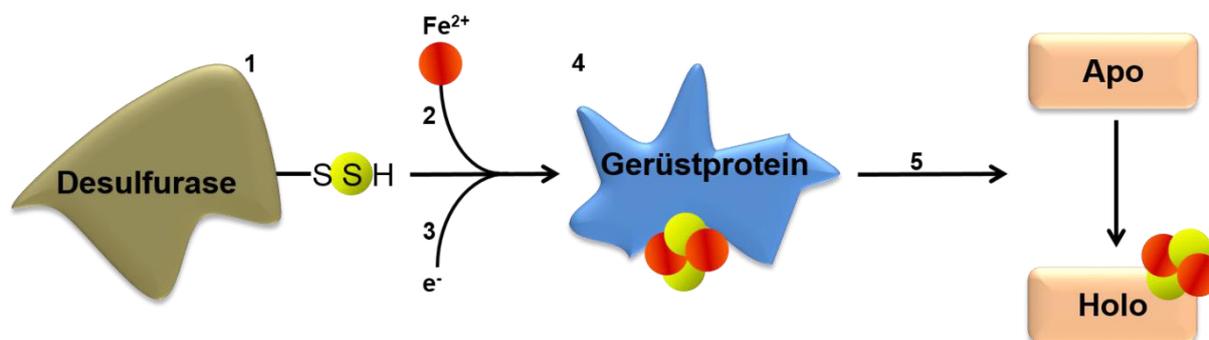
Der [3Fe-4S]-Cluster, der in vielen Fällen stabiler als ein [4Fe-4S]-Cluster ist, kann durch den Verlust eines Eisenions des kubanen [4Fe-4S]-Clusters erhalten werden. Des Weiteren gibt es auch komplexere Fe/S-Cluster, wie beispielsweise den P-Cluster der Nitrogenase. Hierbei sind zwei [4Fe-4S]-Cluster über ein Sulfidion verbrückt. Auch Fe/S-Cluster, in denen das Eisenion durch beispielsweise ein Molybdänion substituiert wurde, wodurch ein Fe/S-Molybdän-Cluster gebildet wird, sind bekannt (Beinert, 2000).

### 1.3 Biogenese von Fe/S-Clustern und Proteinen

Mitte der 1960er Jahre wurde nachgewiesen, dass Fe/S-Proteine *in vitro* aus Eisen und Sulfid rekonstituiert werden können (Malkin und Rabinowitz, 1966). *In vivo* ist dafür allerdings ein komplexes biochemisches Biogenesesystem notwendig. Trotz der Unterschiede

verschiedener bakterieller und eukaryotischer Biogenesysteme gelten für die Fe/S-Clusterbiogenese in Zellen drei grundlegende Hauptschritte (Abbildung 3).

1. *De novo* Assemblierung eines Fe/S-Clusters auf einem Gerüstprotein.
2. Transfer des Fe/S-Clusters vom Gerüstprotein auf intermediäre Fe/S-Clusterassemblierungsproteine.
3. Transfer und Insertion in Apozielproteine.

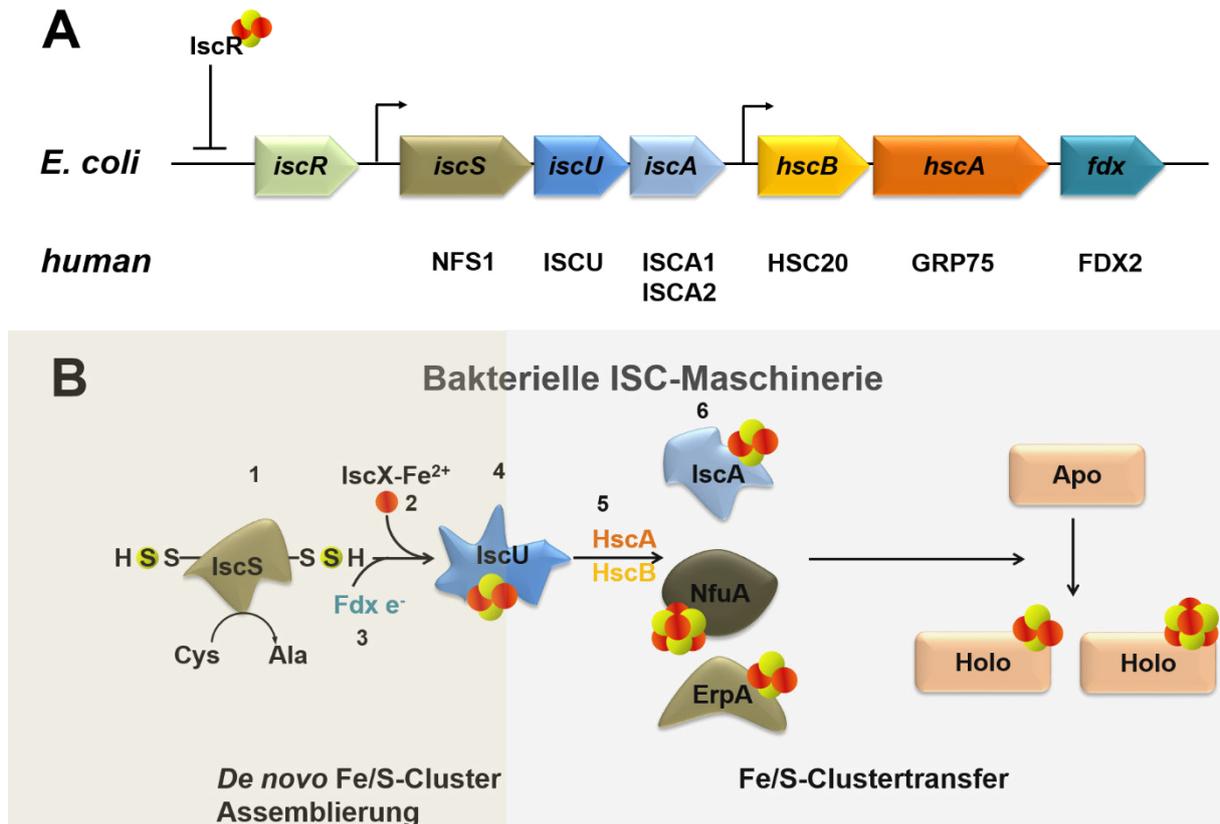


**Abbildung 3: Biosynthetische Prinzipien der Fe/S-Biogenese.** (1) Schwefeldonor: Die Cysteindesulfurase (NifS, IscS oder SufS in Bakterien, Nfs1-Iscd11-Acp1 im Mitochondrium) aktiviert den Schwefel, der für die Fe/S-Clustersynthese benötigt wird, indem aus Cystein Alanin gebildet wird. Als Intermediat wird Persulfid auf einem konservierten Cysteinrest des Enzyms gebildet. (2) Eisendonator: Das Eisenion liegt vermutlich frei in Lösung vor, weshalb spezifische Eisendonatoren benötigt werden, um das freie Eisenion zum Gerüstprotein zu transportieren. Als Eisendonatoren könnten im Bakterien CyaY und im Mitochondrium Yfh1 dienen. (3) Elektronentransfer: Für die Reduktion von S<sup>0</sup> zu S<sup>2-</sup> werden Elektronen benötigt. Diese stammen von einer Elektronentransferkette bestehend aus einem Ferredoxin, einer Ferredoxinreduktase und NADPH. (4) Gerüstprotein: Dieses Protein bindet Fe/S-Cluster über Cysteinreste in einer labilen Form, so dass dieser anschließend auf die Zielproteine übertragen werden können. Als Gerüstproteine fungieren das hoch konservierten bakterielle IscU und SufU und das eukaryotische Isu1. (5) Fe/S-Cluster Transferproteine: Spezifische Faktoren sind für den Transfer des labilen Fe/S-Clusters auf die Apo-proteine, die schließlich von der Apo- zur Holoform konvertiert werden, zuständig. Nach Lill 2009b.

Die Reifung bakterieller Fe/S-Proteine wurde intensiv in dem Modellorganismus *E. coli* (Barras *et al.*, 2005) und azotrophen (stickstofffixierendem) *Azotobacter vinelandii* untersucht (Roche *et al.*, 2013). Hierbei wurden drei unterschiedliche Systeme für die Biogenese von bakteriellen Fe/S-Proteinen identifiziert:

1. Das NIF (*nitrogen fixation*)-System, welches für die spezifische Reifung der Nitrogenase in azotrophen Bakterien zuständig ist,
2. Die ISC (*iron-sulfur cluster*)-Maschinerie und
3. Das SUF (*sulfur mobilization*)-System.

Mittels Endosymbiose wurden im Zuge der Evolution die ISC-Maschinerie in die Mitochondrien (Lill *et al.*, 2006; Lill und Muhlenhoff, 2008) und das SUF-System in die Plastide der Eukaryoten übertragen (Balk und Lobreaux, 2005; Xu und Moller, 2008). Die Reifung von bakteriellen Fe/S-Proteinen unter stressfreien Bedingungen wird vor allem durch die ISC-Maschinerie vorgenommen (Abbildung 4), während unter oxidativen Stress die SUF-Maschinerie beteiligt ist (Bandyopadhyay *et al.*, 2008a; Fontecave und Ollagnier-de-Choudens, 2008; Johnson *et al.*, 2005a).



**Abbildung 4: Schematischer Überblick der Fe/S-Biogenese im ISC-System. (A)** Gencluster der bakteriellen ISC-Maschinerie. Der Gencluster besteht aus einem regulatorischen Protein (IscR), einer Cysteindesulfurase (IscS), einem Gerüstprotein (IscU), dem A-Typ Carrier (IscA), einem DnaJ Ko-Chaperon (HscB), einem DnaK Chaperon (HscA) und einem Ferredoxin (Fdx). Die Proteine der ISC-Maschinerie sind konserviert (Einleitung, Kapitel 1.4, Seite 6). Einige zum bakteriellen ISC-System homologe humane Proteine sind unterhalb des Genclusters aufgeführt. **(B)** Bakterielle ISC-Maschinerie. Diese besteht aus der Cysteindesulfurase IscS, die den Schwefel (gelber Kreis) von Cysteinen freisetzt und ein IscS gebundenes Persulfid (-SSH) an einem Cysteinrest bildet (1). Ein labiler Fe/S-Cluster wird *de novo* auf dem Gerüstproteine IscU gebildet (4). Die *de novo* Fe/S-Cluster-Synthese beinhaltet, dass Eisenionen (2) (roter Kreis) von IscX auf das Gerüstprotein übertragen werden. Das Ferredoxin (3) reduziert den Schwefel des Cysteins zu Sulfid. Anschließend erfolgt der durch ein HscA/HscB-Chaperonsystem (5) unterstützte Transfer von dem Gerüstprotein auf die intermediäre Assemblierungsfaktoren (6) IscA, NfuA oder ErpA, die den Fe/S-Cluster schließlich in Apozielproteine insertieren. Farbkodierung: Gelbbraun: *iscS*, IscS; dunkelblau: *iscU*, IscU; hellblau: *iscA*, IscA; orange-gelb: *hscB*, HscB; orange: *hscA*, HscA, aquamarinblau: *fdx*, Fdx.

In Eukaryoten spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle beim Abbau von Fettsäuren, im Eisenmetabolismus, der Synthese von Häm, im Zitronensäurezyklus, bei der ATP-Produktion und Synthese von Fe/S-Proteinen (Einleitung, Abbildung 1, Seite 1). Mitochondrien sind der Ort der Fe/S-Clustersynthese aller zellulärer Fe/S-Proteine. Für die Bildung zytosolischer und nuklearer eukaryotischer Fe/S-Cluster wird sowohl die mitochondriale ISC-Assemblierungsmaschinerie als auch ein mitochondriales ISC-Export-System benötigt (Kispal *et al.*, 1999). Das System, welches in Eukaryoten an der Reifung zytosolischer und nuklearer Fe/S-Proteine beteiligt ist, wird als CIA (*cytosolic iron sulfur protein assembly machinery*)-Maschinerie bezeichnet (Lill *et al.*, 2006; Lill und Muhlenhoff, 2008). Die meisten Studien der ISC- und CIA-Maschinerie wurden am Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Neuere Untersuchungen im humanen System zeigten, dass die Hauptkomponenten der beiden Maschinerien von der Hefe bis hin zum Menschen hoch konserviert sind (Lill und Mühlenhoff, 2005; Stehling *et al.*, 2014). Durch die Entdeckung der Mitosomen wurde das Wissen über die mitochondriale ISC-Maschinerie weiter ausgebaut (Tovar *et al.*, 1999). Bei Mitosomen handelt es sich um Organellen mit einer Doppelmembran, die sich von den Mitochondrien ableiten, ihre Funktion aber im Laufe der Evolution auf ein Minimum reduziert haben. Die bekanntesten Funktionen der Mitochondrien wie beispielsweise oxidative Phosphorylierung, Häm-Synthese, Zitratzyklus, Fettsäure-oxidation und mitochondriale Genexpression haben Mitosomen verloren (Hjort *et al.*, 2010; Shiflett und Johnson, 2010). Die wichtigsten Schlüsselkomponenten für die Reifung von Fe/S-Proteinen wurden beibehalten (Goldberg *et al.*, 2008; Tovar *et al.*, 2003), was die unverzichtbare Rolle der Fe/S-Proteinbiogenese verdeutlicht. Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine sind in der ISC-Assemblierungsmaschinerie, genauer im späten Teil der ISC-Maschinerie lokalisiert, und werden daher im nachfolgenden nochmals näher erläutert.

## 1.4 Die mitochondriale ISC-Maschinerie

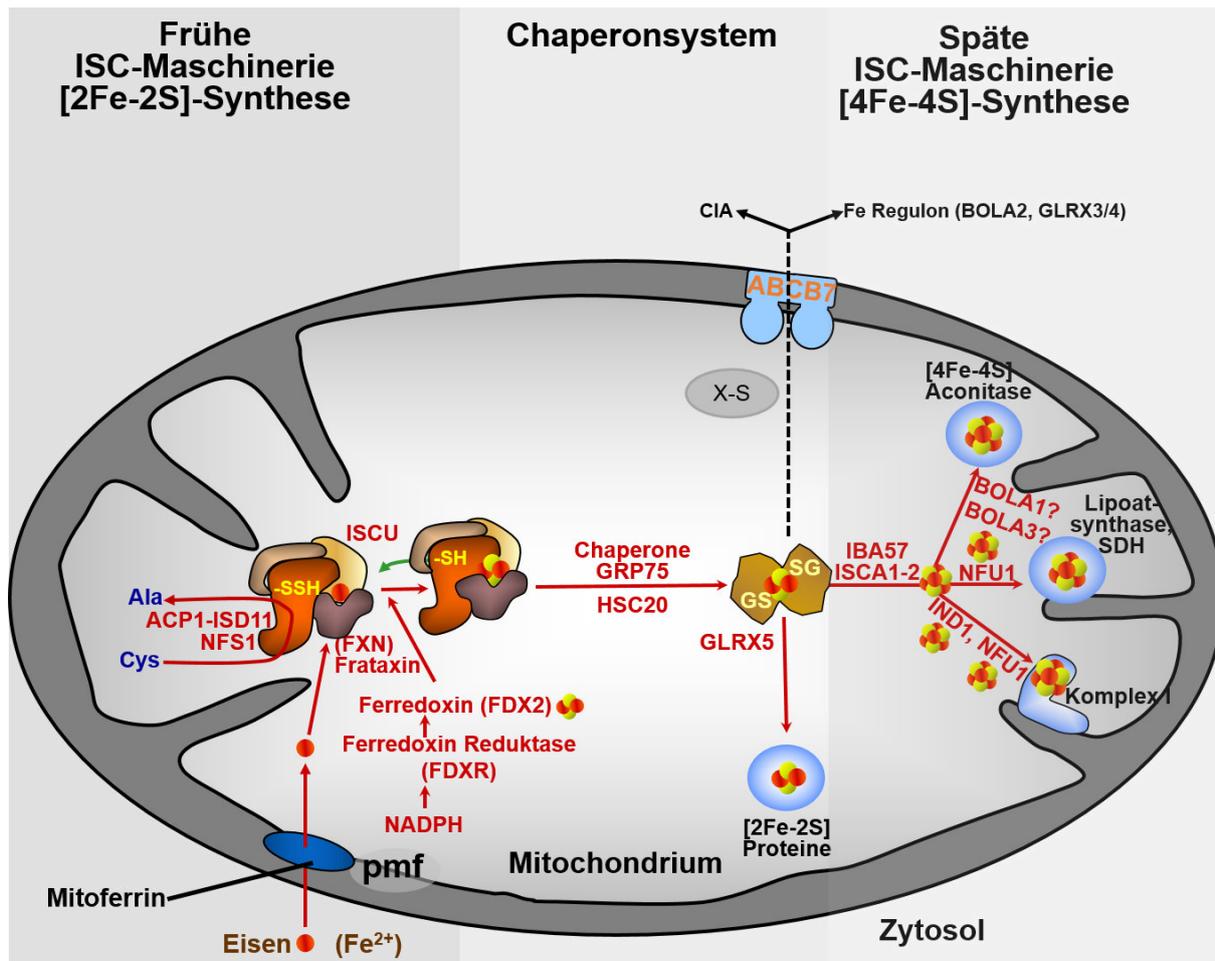
Die mitochondriale ISC-Maschinerie besteht aus 17 Proteinen, die in drei Hauptschritten an der Reifung von Fe/S-Proteinen (Abbildung 5) beteiligt sind (Braymer und Lill, 2017).

1. Frühe ISC-Maschinerie, [2Fe-2S]-Synthese: *De novo Synthese* eines [2Fe-2S]-Clusters auf dem Gerüstprotein ISCU.
2. Chaperonsystem: Durch ein Hsp70 Chaperonsystem dissoziiert der auf ISCU gebundene Fe/S-Cluster und wird auf intermediäre ISC-Proteine wie GLRX5 übertragen, die den Fe/S-Cluster transient binden.
3. Späte ISC-Maschinerie, [4Fe-4S]-Synthese: Über die späten ISC-Faktoren wird der Fe/S-Cluster in Apozielproteine eingebaut.

Diese Arbeit befasst sich hauptsächlich mit dem Schritt der späten ISC-Maschinerie, weshalb die Schritte 1 und 2 nur kurz zusammengefasst werden. Im ersten Schritt wird auf dem

Gerüstprotein ISCU *de novo* ein [2Fe-2S]-Cluster synthetisiert. Abhängig vom mitochondrialen Membranpotential und den mitochondrialen Transportern Mitoferrin wird das benötigte Eisenion in seiner zweiwertigen Form ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in das Mitochondrium transportiert (Foury und Roganti, 2002; Mühlenhoff *et al.*, 2003b; Zhang *et al.*, 2006). Der Schwefel des Fe/S-Clusters wird bei Eukaryoten durch einen Schwefeldonor, der Cysteindesulfurase NFS1, die mit dem LYR-Protein ISD11 und Acylcarrierprotein ACP1 interagiert, mobilisiert (Adam *et al.*, 2006; Cory *et al.*, 2017; Mühlenhoff *et al.*, 2004; Wiedemann *et al.*, 2006). Hierbei wird der Cysteinrest im aktiven Zentrum des NFS1, der die  $\gamma$ -Sulfhydrylgruppe (-SH) des freien Cysteinsubstrates nukleophil angreift, abgespalten, wodurch ein Persulfid (-SSH) entsteht und Alanin gebildet wird (Lill und Mühlenhoff, 2008). Der NFS1-ISD11-ACP1-Komplex interagiert sowohl mit dem Gerüstprotein ISCU als auch mit Frataxin, dem potentiellen Eisendonator (Bencze *et al.*, 2006; Colin *et al.*, 2013). In Gegenwart von Eisenionen wird der Komplex bestehend aus NFS1-ISD11 und Frataxin stabiler (Gerber *et al.*, 2003; Mühlenhoff *et al.*, 2003a; Schmucker *et al.*, 2011; Wang und Craig, 2008). Des Weiteren wird eine Elektronentransferkette, die die Komponenten NADPH, Ferredoxinreduktase (FDXR) und Ferredoxin (FDX2) umfasst, vermutlich zur Reduktion des Schwefels (S-SH) zu einem Sulfidion ( $\text{S}^{2-}$ ), das in dieser Form in den Fe/S-Cluster eingebaut wird, benötigt (Shi *et al.*, 2012). Als Elektronendonator in der Elektronentransferkette fungiert NADPH (Kim *et al.*, 2013; Lange *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Mühlenhoff *et al.*, 2002; Webert *et al.*, 2014).

Im zweiten Schritt wird der auf dem homodimeren ISCU verbrückte [2Fe-2S]-Cluster (Agar *et al.*, 2000b; Webert *et al.*, 2014) durch weitere Hilfsproteine auf intermediäre ISC-Proteine wie das Monothiol-Glutaredoxin GLRX5 übertragen. Das ATP-abhängige Hsp70 Chaperon GRP75 (Hitzeschockprotein) (Shan und Cortopassi, 2012; Shan *et al.*, 2007), das an ein konserviertes LPPVK-Motiv des ISCU bindet (Bonomi *et al.*, 2008; Chandramouli und Johnson, 2006), das DnaJ-ähnliche Co-Chaperon HSC20 (Hoff *et al.*, 2003; Uhrigshardt *et al.*, 2010) und der Nukleotidaustauschfaktor Mge1 helfen bei der Dissoziation des [2Fe-2S]-Clusters und bei der Übertragung auf GLRX5 (Craig und Marszalek, 2002; Majewska *et al.*, 2013; Uzarska *et al.*, 2013; Vickery und Cupp-Vickery, 2007).



**Abbildung 5: Modell der mitochondrialen ISC-Maschinerie.** Durch das mitochondriale Membranpotential und den mitochondrialen Transporter Mitoferrin werden Eisenionen in ihrer zweiwertigen Form ( $Fe^{2+}$ ) in die Mitochondrien transportiert. Im Mitochondrium findet auf dem Gerüstprotein ISCU eine *de novo* Assemblierung eines  $[2Fe-2S]$ -Clusters statt. Für die Assemblierung des Fe/S-Clusters sind weitere Komponenten, wie das Eisenchaperon Frataxin (FXN), der Cysteindesulfurase-Komplex (NFS1-ISC11-ACP1) und Elektronen von der Elektronentransferkette FDX2/FDXR/NADPH nötig. Der Fe/S-Cluster wird anschließend mit Hilfe des Chaperonsystems, bestehend aus dem Hsp70 Chaperon GRP75, dem Ko-Chaperon HSC20, die die Dissoziation des Fe/S-Clusters erleichtern, auf das Monothiol-Glutaredoxin GLRX5 übertragen. GLRX5 transferiert den transient gebundenen  $[2Fe-2S]$ -Cluster direkt auf  $[2Fe-2S]$ -Zielproteine. Die späten ISC-Komponenten ISCA1, ISCA2 und IBA57 unterstützen die Konversion eines  $[2Fe-2S]$ - in einen  $[4Fe-4S]$ -Cluster und sind daher für die Fe/S-Clusterassemblierung aller Proteine mit einem  $[4Fe-4S]$ -Cluster essentiell notwendig. Der genaue Mechanismus der Konversion eines  $[2Fe-2S]$ - zu einem  $[4Fe-4S]$ -Cluster ist allerdings noch unbekannt. Für den Einbau von Fe/S-Clustern in bestimmte Proteinfamilien sind zusätzlich noch weitere ISC-Proteine notwendig. So wird für die Assemblierung des Fe/S-Cluster auf der Aconitase zusätzlich noch NFU1 benötigt. Nach Braymer und Lill 2017.

Die genaue Rolle und die funktionellen Prozesse der mitochondrialen Fe/S-Biogenese wurden Ende des letzten Jahrhunderts erforscht (Lill *et al.*, 1996). Der mitochondrialen ISC-Maschinerie kommt hierbei eine wichtige Rolle zu. Eine Reihe von Komponenten der ISC Maschinerie sind bisher bekannt (Abbildung 5, Tabelle 1, Seite 9). Die zentrale Bedeutung der mitochondrialen Fe/S-Proteinbiogenese zeigt sich darin, dass eine Vielzahl von Krankheiten in Säugetieren bekannt ist, die mit Fehlern der Fe/S-Proteinbiogenese oder Fe/S-Proteinen in

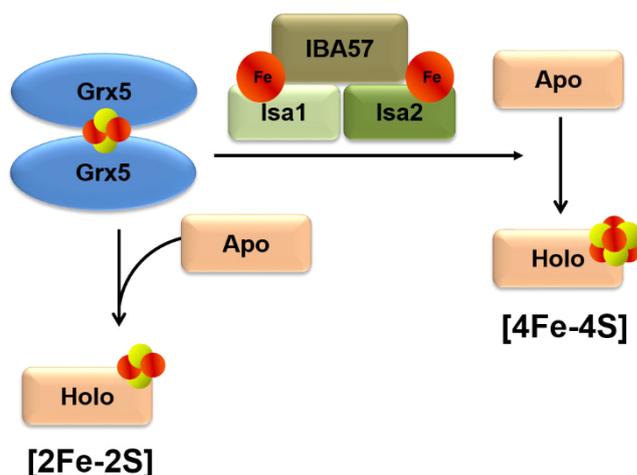
Verbindung stehen. Die nachfolgende Tabelle 1 zeigt die Komponenten der ISC-Maschinerie, sowie Krankheitsbeispiele, die mit der Fe/S-Proteinassemblierung verbunden sind. Einige dieser Komponenten besitzen selbst einen Fe/S-Cluster, der oft nur transient gebunden wird. Nachfolgend wird nochmals genauer auf die humanen Komponenten der späten ISC-Assemblierungsmaschinerie eingegangen.

**Tabelle 1: ISC-Proteinfaktoren und deren Funktion in der ISC-Maschinerie.**

Name (Human)	Name (Hefe)	Beschreibung/Funktion	Fe/S-Cluster	Krankheit
<b>Frühe ISC-Maschinerie [2Fe-2S]-Synthese</b>				
Mitoferrin	Mrs3, Mrs4	Mitochondrialer Transporter/ putativer Eisentransporter	-	Erythro poet. Protoporphyrurie
NFS1	Nfs1	Cysteindesulfurase/ Schwefeldonor	-	
ISD11	Isd11	ISC-Biogenese Desulfurase	-	
		Interagierendes Protein 11 kDa		
FDXR	Arh1	Ferredoxinreduktase	-	Tumorsuppressor
FDX2	Yah1	Ferredoxin/Elektronentransport	[2Fe-2S]	Muskelmypopathie
FXN	Yfh1	Frataxin/ Eisendonator und Aktivator (allosterischer Regulator Nfs1)	-	Friedreichs Ataxia
ACP1	Acp1	Acylcarrierprotein, mitochondr. Präkursor	-	
ISCU	Isu1, Isu2	Gerüstprotein	[2Fe-2S]	Myopathie
<b>Chaperonsystem</b>				
GRP75	Ssq1, Ssc1	Mitochondriales Hsp70 Chaperon/ Fe/S-Cluster Transfer	-	
HSC20	Jac1	Mitochondriales Hsp70 Chaperon/ Fe/S-Cluster Transfer	-	
GRPE-L1/2	Mge1	Mitochondriales GrpE/ Nukleotidaustausch	-	
GLRX5	Grx5	Glutaredoxin 5/ Fe/S-Cluster Transfer	[2Fe-2S]	Sideroblastische Anämie
<b>Späte ISC-Maschinerie [4Fe-4S]-Synthese</b>				
ISCA1, ISCA2	Isa1, Isa2	A-Typ ISC-Assemblierungsprotein/ Biogenese von [4Fe-4S]-Clustern	?	
IBA57	Iba57	Isa-interagierendes Protein/ Biogenese von [4Fe-4S]-Clustern	-	Myopathie/ Enzephalopathie
NFU1	Nfu1	Gerüstprotein/ Reifung der Lipoat-synthase (LIAS) und SDH	[4Fe-4S]	MMDS1: Multiples mitochondr. Dysfunktionssyndrom
IND1 (NUBPL)	-	Fe/S-Protein für NADPH- Dehydrogenase Reifung des Atmungskettenkomplexes I	[4Fe-4S]	Enzephalopathie
BOLA1	Bol1	Potentiell Glutaredoxin interagierendes Protein/ Reifung der LIAS und SDH	-	
BOLA3	Bol3	Reifung der LIAS und SDH	-	MMDS2: Multiples mitochondr. Dysfunktionssyndrom

## 1.5 Späte ISC-Assemblierungsfaktoren

Die A-Typ-ISC-Proteine Isa1 (human ISCA1), Isa2 (human ISCA2) und Iba57 (human IBA57) nehmen sowohl in Hefe als auch humanen Zellen eine spezifische Rolle in der Fe/S-Clusterassemblierung mitochondrialer Proteine mit [4Fe-4S]-Clustern wahr (Gelling *et al.*, 2008; Mühlhoff *et al.*, 2007; Mühlhoff *et al.*, 2011; Sheftel *et al.*, 2012a). Die Depletionsexperimente von *isa/iba57* in Hefe- und humanen Zellen zeigten, dass jedes dieser Proteine für die Reifung von [4Fe-4S]-Clustern essentiell ist (Mühlhoff *et al.*, 2011; Sheftel *et al.*, 2012b). Die Assemblierung eines [4Fe-4S]-Clusters ist vollständig gehemmt, wodurch es zum kompletten Ausfall der Funktion von z. B. der mitochondrialen Aconitase, Liponsäuresynthase oder den Komplexen I/II der Atmungskette kommt. Auch ein Verlust von mitochondrialer DNA oder morphologische Veränderungen wie der Verlust der Cristae Membranen oder eine Erweiterung der Organellen konnte beobachtet werden (Sheftel *et al.*, 2012a).



**Abbildung 6: Modell der mitochondrialen [4Fe-4S]-Proteinasssemblierung.** Der auf dem Monothiol-Glutaredoxin Grx5 transient gebundene [2Fe-2S]-Cluster wird in einem nur wenig bekannten biochemischen Mechanismus (Brancaccio *et al.*, 2014) mit Hilfe von Isa1/Isa2 und Iba57 in einen [4Fe-4S]-Cluster konvertiert. Die *S. cerevisiae* Isa-Proteine können Eisen binden (Mühlhoff 2011), welches für die Bildung von mitochondrialen [4Fe-4S]-Proteinen gebraucht werden könnte. Nach Mühlhoff *et al.*, 2011.

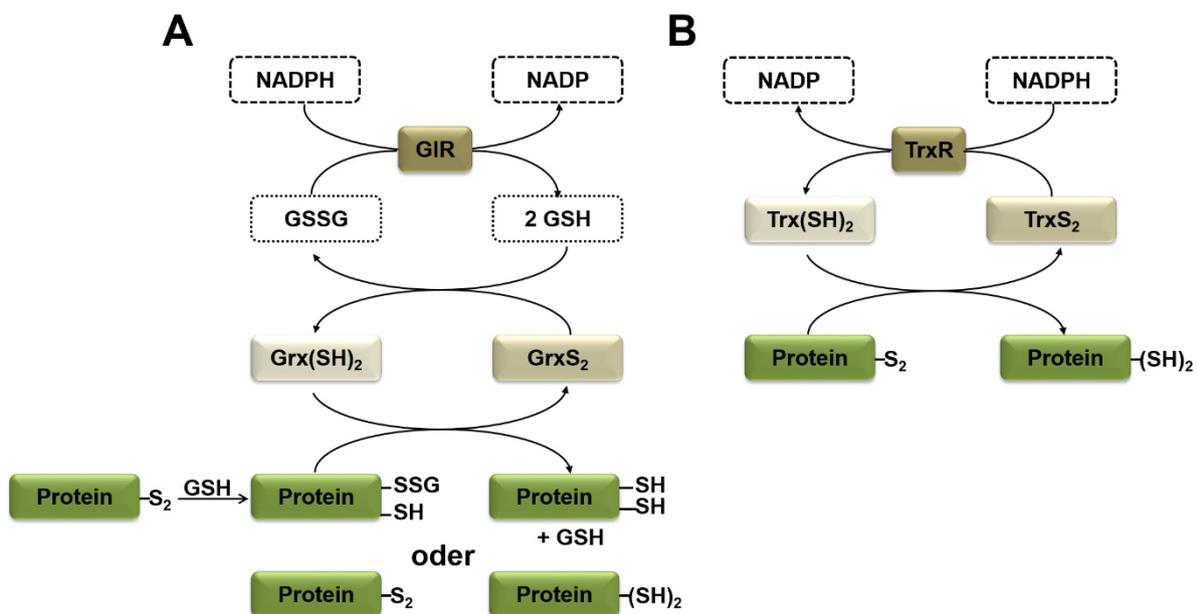
Eine Interaktion der A-Typ-ISC-Proteine mit dem GLRX5 konnte gezeigt werden (Kim *et al.*, 2010; Rodriguez-Manzanares *et al.*, 2002). Der genaue funktionelle Hintergrund dieser Interaktion ist allerdings unbekannt. Die A-Typ-ISC-Proteine, die ihre Funktion im heterodimeren Isa1/Isa2-Komplex wahrnehmen, haben keine redundante Rolle und können sich funktionell nicht ersetzen. Die bakteriellen A-Typ Homologen IscA, SufA und ErpA können nur Isa1, aber nicht Isa2 in Hefe komplementieren (Mühlhoff *et al.*, 2011). Die A-Typ-ISC-Proteine können vergleichbar mit ihren bakteriellen Homologen einen [2Fe-2S]-Cluster (Gupta *et al.*, 2009; Mapolelo *et al.*, 2012; Py und Barras, 2010; Wang *et al.*, 2010) oder Eisen koordinieren (Mühlhoff *et al.*, 2011). Auch für das humane ISCA1 konnte nach Expression und Aufreinigung aus *E. coli* eine Eisenkoordinierung beobachtet werden (Lu *et al.*, 2010).

Eine Depletion von Iba57 oder einem [4Fe-4S]-Protein wie beispielsweise der mitochondrialen Aconitase hat eine Eisenakkumulierung auf den Isa-Proteinen zur Folge (Mühlenhoff *et al.*, 2011). Auf Grund der Beobachtung, dass im bakteriellen System SufA einen [2Fe-2S]-Cluster *in vivo* binden und auf Apoproteine übertragen kann, wurde auch den A-Typ-ISC-Proteinen eine Funktion als Fe/S-Transferprotein zugeschrieben (Py und Barras, 2010), wobei die Isa-Proteine in einem späten Schritt der ISC-Maschinerie agieren (Mühlenhoff *et al.*, 2011). Diese Funktion konnte dadurch gezeigt werden, dass das auf den Hefe Isa-Proteinen gebundene Eisen nicht Teil des auf dem frühen ISC-Proteinfaktor Isu1 gebundenen Fe/S-Clusters ist (Mühlenhoff *et al.*, 2011).

Über die genaue Funktion der A-Typ-ISC-Proteine Isa1, Isa2 und Iba57, sowie den biochemischen Mechanismus der Konversion eines [2Fe-2S]-Clusters in einen [4Fe-4S]-Cluster ist bislang nur wenig bekannt (Brancaccio *et al.*, 2014; Mühlenhoff *et al.*, 2011).

### 1.5.1 Rolle und Funktion des monothiolen Glutaredoxin GLRX5

Das Thioredoxinsystem, bestehend aus Thioredoxin (Trx), NADPH und der Thioredoxinreduktase (TrxR) und das Glutaredoxinsystem, welches die Komponenten Glutaredoxin (Grx), NADPH, GSH und eine Glutathionreduktase (GIR) besitzt, zählen zu den zellulären Redoxsystemen (Abbildung 7), die für die Regulation und Aufrechterhaltung eines Thiol-Disulfidgleichgewichtes zuständig sind (Meyer *et al.*, 2009).



**Abbildung 7: Vergleich der Reaktionen des Glutaredoxin- und Thioredoxinsystems. (A)** Ein oxidiertes Protein ( $S_2$ , SSG) wird durch das Glutaredoxin  $Grx(SH)_2$  reduziert. Das oxidierte  $GrxS_2$  wiederum wird durch Glutathion (GSH) reduziert. Oxidiertes Glutathion (GSSG) wird mit Hilfe der Glutathionreduktase (GIR) unter Zuhilfenahme von NADPH-Reduktionsäquivalenten wieder zu GSH reduziert. **(B)** Reduziertes Thioredoxin  $Trx(SH)_2$  reduziert ein oxidiertes Protein und wird dadurch selbst oxidiert ( $TrxS_2$ ). Oxidiertes  $TrxS_2$  wiederum wird mit Hilfe der Thioredoxinreduktase (TrxR) und NADPH-Reduktionsäquivalenten reduziert. Nach Pillay *et al.* 2009.

Glutaredoxine und Thioredoxine besitzen ein ähnliches Faltungsmotiv die „Thioredoxin-faltung“. Ein Motiv, das sich durch vier bis fünf verknüpfte *beta*-( $\beta$ )-Faltblätter, die von drei oder mehr *alpha*-( $\alpha$ )-Helices umgeben sind, auszeichnet (Berndt *et al.*, 2008). Trx-Deletionen in *E. coli* können durch Glutaredoxine gerettet werden (Holmgren und Reichard, 1967). Trotz gewisser Gemeinsamkeiten stellte sich schnell heraus, dass es doch Unterschiede bezüglich Substratspezifität und zellulärer Aktivität gab.

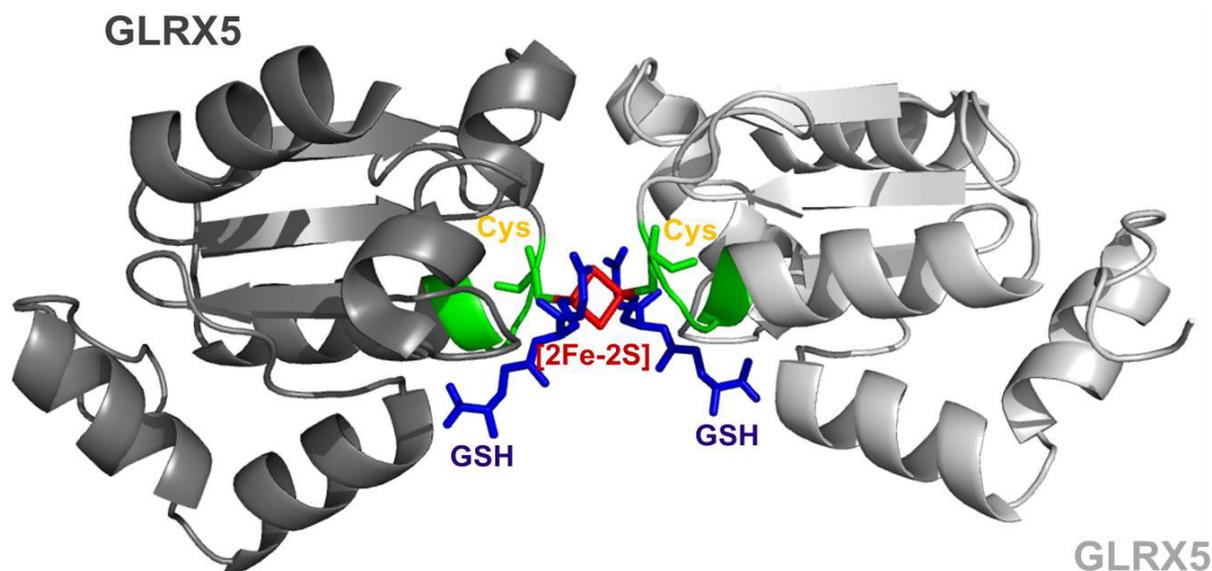
Glutaredoxine besitzen ein konserviertes Motiv in der aktiven Seite mit ein bis zwei Cysteinen, eine Glutathionbindungsseite und eine hydrophobe Oberfläche, die der Substratbindung dient (Xia *et al.*, 1992). Abhängig von der aktiven Seite können die Glutaredoxine in zwei Hauptklassen, Dithiol-Glutaredoxine mit einem CXXC-Motiv und Monothiol-Glutaredoxine mit einem CGFS-Motiv in der aktiven Seite, eingeteilt werden.

In *S. cerevisiae* wurden acht Glutaredoxine identifiziert von denen die zytosolischen Dithiol-Glutaredoxine Grx1 und Grx2 dem Schutz der Zellen gegen Oxidantien, wie Wasserstoffperoxid oder Menadion dienen (Luikenhuis *et al.*, 1998). Mindestens eines der Dithiol-Glutaredoxine Grx1 bzw. Grx2 ist für das Überleben der Zelle notwendig (Draculic *et al.*, 2000). Grx3, Grx4 und Grx5 hingegen sind Monothiol-Glutaredoxine (Rodriguez-Manzaneque *et al.*, 1999). Das Fehlen von Grx3 oder Grx4 hat keinen großen Effekt für die Empfindlichkeit gegenüber Oxidantien zur Folge. Eine Depletion von Grx3/Grx4, oder die Abwesenheit eines Fe/S-Clusters auf Grx3/Grx4 führt zu einer Eisenakkumulierung im Zytosol. Die Zelle kann das akkumulierte Eisen allerdings nicht nutzen (Mühlenhoff *et al.*, 2010; Ojeda *et al.*, 2006). Grx3/Grx4 nimmt daher zusätzlich zur Funktion als Eisensensor eine Funktion bei der Verteilung von Eisen zu eisenabhängigen Enzymen und Proteinen wahr. Grx5 hingegen hat eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Oxidantien, weshalb das Fehlen von Grx5 oxidativen Schaden an Proteinen oder Wachstumsstörungen in Minimalmedium verursacht (Rodriguez-Manzaneque *et al.*, 1999). Die Entdeckungen weiterer Glutaredoxine sorgten für eine Klassifizierung in 6 Gruppen (siehe Tabelle 2). Diese Klassifizierung ist abhängig vom Sequenzmotiv der aktiven Stelle, Unterschiede in der GSH-Bindung und der Bildung von Multidomänfusionsproteinen (Rouhier, 2010).

**Tabelle 2: Klassifizierung der Glutaredoxine. Nach Rouhier *et al.* 2010.**

Einteilung Klasse	Domäne	aktive Seite	Beispiele
I	einfache Grx Domäne	Monothiol oder Dithiol mit CPX (C/S)-CGXC-, CPFC- oder CSX (C/S)-Motiv	<i>hGLRX1, hGLRX2, ScGrx1, ScGrx2, und EcGrx1-3</i>
II	einfache oder multiple Grx-Domäne, die mit Trx oder weiteren Domänen fusioniert ist	CGFS-Motiv	einfach: <i>GLRX5, ScGrx5, EcGrxD, GrxS14 und GrxS16</i> Multidomän: <i>PICOT, GLRX3 ScGrx3/4</i>
III	einfache Grx-Domäne	CCXX-Motiv	höhere Pflanzen
IV	zu zwei Domänen fusionierte Grx-Domäne	CXX(C/S) Motiv	photosynthet. Organismen
V	zu einer Domäne fusionierte Grx Domäne	CPWG Motiv	Cyanobakterien
VI	zu einer Domäne fusionierte Grx Domäne	CPW(C/S) Motiv	Cyanobakterien

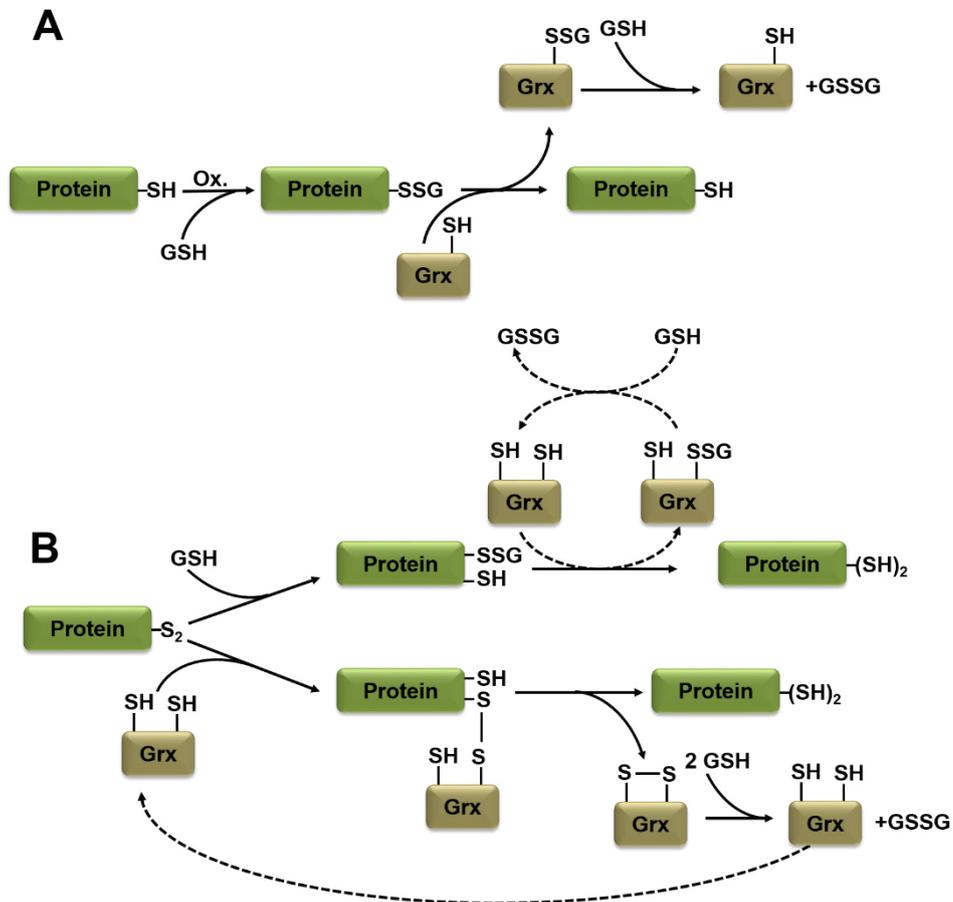
Grx3, Grx4 und Grx5 haben hoch konservierte strukturelle Domänen und können, wie Abbildung 8 zeigt, einen Cystein und Glutathion-kooordinierten [2Fe-2S]-Cluster binden.



**Abbildung 8: Kristallstruktur von humanen GLRX5.** GLRX5 bindet im homodimeren holoGLRX5-GLRX5-Komplex einen verbrückten [2Fe-2S]-Cluster (rot). Der [2Fe-2S]-Cluster wird durch das Cystein (grün) im aktiven Zentrum und ein Glutathion (GSH) (blau) pro GLRX5-Monomer (grau, hellgrau) koordiniert (Johansson *et al.*, 2011). PDB 3GX8

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit dem Monothiol-Glutaredoxin GLRX5, einem Klasse 2 Protein (Tabelle 2, Abbildung 8), gearbeitet, weshalb dieses nochmal genauer betrachtet wird. GLRX5 ist im Mitochondrium lokalisiert und besitzt nur ein Cystein in der aktiven Stelle und kann Trx oder ein Dithiol-Grx ersetzen (Bushweller *et al.*, 1992). Oxidativer Stress erhöhte die Proteincarbonylierung in einer *grx5* Deletionsmutante und führte zu der Annahme, dass Grx5 für die Dethiolierung des Tdh3 GAPDH Isoenzym zuständig ist (Shenton und Grant, 2003).

Shenton *et al.* postulierten 2003 eine Funktion des monothiolen Glutaredoxins bei der Reduktion von Proteinen mit Disulfidbrücken. Abbildung 9 zeigt die potentiellen zellulären Mechanismen, die Glutaredoxine wahrnehmen können.



**Abbildung 9: Vergleich von Monothiol- und Dithiol-Glutaredoxinen unterstützten Reaktionsmechanismen.** Glutaredoxine können sowohl Disulfidbrücken ( $S_2$ ) tragende als auch glutathionylierte (SSG) Proteine reduzieren. **(A)** Im Monothiol-Glutaredoxin unterstützten Reaktionsmechanismus ist nur eine aktive Stelle an den Deglutathionierungen beteiligt. Das Cystein im aktiven Zentrum wird gebraucht, um das glutathionylierte Protein (SSG) und GSH zu reduzieren. Die Regeneration von glutathionylierten Grx(SSG), erfolgt durch GSH. **(B)** Im Dithiol-Glutaredoxin unterstützten Reaktionsmechanismus können zwei Thiolgruppen des Glutaredoxins (Grx) benutzt werden, um entweder Disulfidbrücken ( $S_2$ ) oder Glutathionylierungsaddukte (SSG) an Proteinen zu reduzieren, wobei sich auf Grx entweder eine intramolekulare Disulfidbrücke oder ein Glutathionylierungsaddukt (SSG) ausbildet. Diese Disulfidbrücken auf Grx werden schließlich mit Reduktionsäquivalenten an reduzierten Glutathion wieder zu Thiolen reduziert. Nach Herrero und de la Torre-Ruiz, 2007, Rouhier *et al.*, 2008.

Studien in *S. cerevisiae grx5Δ* Deletionsmutanten zeigten, dass Grx5 wahrscheinlich nicht an einem Monothiol-Glutaredoxin unterstützten Reaktionsmechanismus beteiligt ist, sondern an der Fe/S-Clusterbiogenese mitwirkt. Zum einem war die Aktivität von Fe/S-Clusterenzymen in einer *grx5Δ* Hefezelle stark reduziert und zum anderen wurde eine Eisenakkumulierung beobachtet. Eine ähnliche Beobachtung konnte für humane- und Zebrafischzellen gemacht werden (Wingert *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2010). Eine Depletion von GLRX5 in der

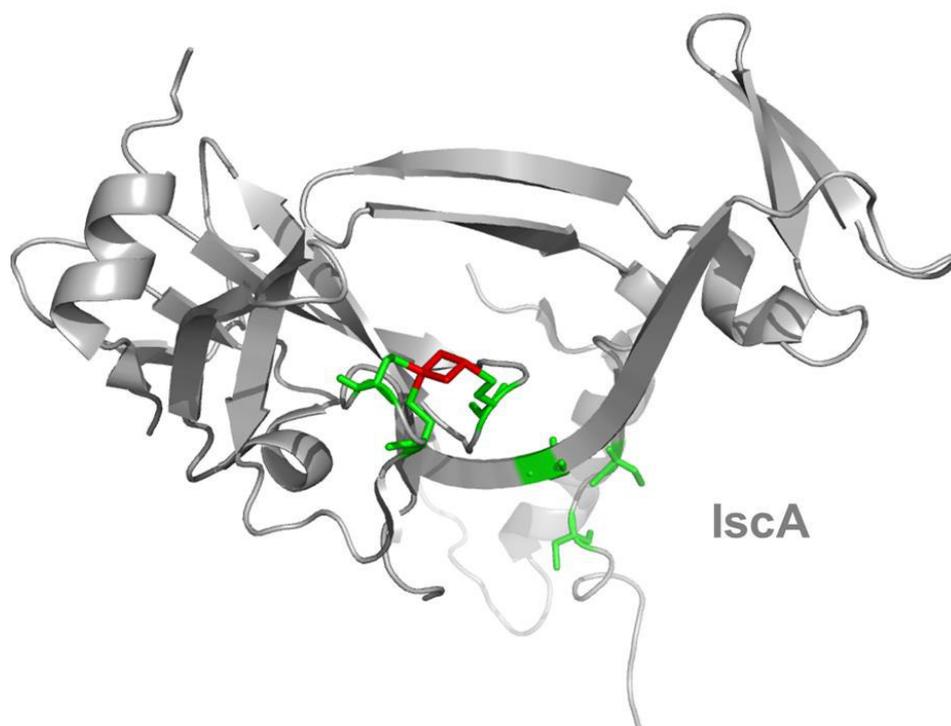
Zebrafischmutante *shiraz* führt zu einer Inaktivierung der mitochondrialen Aconitase und starker IRP1-Bindung. Schwerwiegende Anämie war die Folge dieser Depletion (Camaschella *et al.*, 2007). Bei Menschen führt die Depletion von GLRX5 zu einer sideroplastischen Anämie (Ye *et al.*, 2010). In *E. coli* ist das GLRX5-Homolog *grxD* ebenfalls an der Fe/S-Clusterbiogenese beteiligt. Die Funktion des Monothiol-Glutaredoxin Grx5 ist über verschiedene Organismen konserviert, *grx5* Deletionen können sowohl durch eukaryotische als auch prokaryotische Monothiol-Homologe ersetzt werden (Bandyopadhyay *et al.*, 2008b). <sup>55</sup>Fe-Experimente an *grx5Δ* Hefezellen zeigten eine Eisenakkumulierung auf Isu1, wodurch für Grx5 die Rolle eines Fe/S-Clustertransferproteins, das nach Isu1 agiert, postuliert wurde (Mühlenhoff *et al.*, 2003b). Diese Beobachtung konnte durch weitere Daten anderer Gruppen bestätigt werden: Eine Überexpression des Hsp70 Chaperons Ssq1 unterdrückt den *grx5Δ* Phänotyp (Rodriguez-Manzaneque *et al.*, 2002) sowie die Interaktion von Grx5 mit den A-Typ-ISC-Proteinen, die zum späteren Teil der ISC-Maschinerie gehören (Kim *et al.*, 2010). Viele in der Literatur beschriebenen Funktionen für Grx5 und dessen pflanzliche, humane und parasitäre Homologe deuten auf einen auf Grx5 labil gebundenen Fe/S-Cluster hin (Bandyopadhyay *et al.*, 2008b; Picciocchi *et al.*, 2007; Rada *et al.*, 2009). Diese Annahme wird durch *in vitro* Studien am pflanzlichen GrxS14, in denen ein schneller und effizienter Fe/S-Clustertransfer beobachtet wurde, unterstützt (Bandyopadhyay *et al.*, 2008b). Cysteinmutationsstudien am *E. coli* Homolog Grx4 zeigten, dass der auf dem Glutaredoxin gebundene [2Fe-2S]-Cluster mit jeweils einem Cystein des aktiven Zentrums und einem GSH Molekül pro Monomer koordiniert wird (Abbildung 8) (Bandyopadhyay *et al.*, 2008b; Iwema *et al.*, 2009; Rouhier *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011). Die genaue Rolle des GLRX5 ist allerdings immer noch nicht bekannt. Auch wenn bisher eine Fe/S-Clusterübertragung unter artifiziellen Bedingungen postuliert wurde, ist die physiologische Relevanz noch unklar.

### 1.5.2 Die A-Typ-ISC-Proteine ISCA1 und ISCA2

Die A-Typ-ISC-Proteine Isa1 (human ISCA1) und Isa2 (human ISCA2) zählen zu den späten ISC-Komponenten (Einleitung, Kapitel 1.5, Seite 10). Sowohl in humanen Zellen als auch in Hefe nehmen die A-Typ-ISC-Proteine im Zusammenspiel mit Iba57 (human IBA57) eine essentielle Funktion bei der Maturierung von mitochondrialen [4Fe-4S]-Proteinen wahr (Gelling *et al.*, 2008; Mühlenhoff *et al.*, 2007; Mühlenhoff *et al.*, 2011; Sheftel *et al.*, 2012a). Die A-Typ-ISC-Proteine, Isa1 und Isa2, bilden einen heterodimeren Komplex, haben keine redundante Rolle und können sich funktionell nicht ersetzen (Mühlenhoff *et al.*, 2011). Nachfolgend wird nochmal genauer auf die späten ISC-Komponenten ISCA1, ISCA2 und IBA57 eingegangen.

### 1.5.2.1 Das A-Typ-ISC-Protein ISCA1

Bei dem A-Typ-ISC-Protein Isa1 (human ISCA1) handelt es sich um ein hochkonserviertes mitochondriales Protein, das in Bakterien und Eukaryoten Funktionen bei der Fe/S-Clusterassemblierung wahrnimmt (Schwartz *et al.*, 2001; Takahashi und Nakamura, 1999; Vinella *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 1998). Die essentielle Rolle der A-Typ-ISC-Proteine wird in Depletionsexperimenten deutlich. Eine Depletion des *E. coli* *IscA* und dessen Paralogen *SufA* hat sowohl in *Azotobacter vinelandii* (Johnson *et al.*, 2005b) als auch in *E. coli* unter aeroben Bedingungen einen Wachstumsdefekt zur Folge (Lu *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009). In *S. cerevisiae* führt die Depletion des ISCA1 Homologen Isa1 zum Verlust von mitochondrialer DNA und zu einer Lysin- und Glutamat-Auxotrophie (Jensen und Culotta, 2000; Kaut *et al.*, 2000). In HeLa-Zellen resultiert RNAi knockdown von ISCA1 in einer Abnahme der Aktivität von Fe/S-Cluster-abhängigen Enzymen sowohl im Mitochondrium als auch im Zytosol (Song *et al.*, 2009). Depletionsexperimente in humanen HeLa-Zellen deuten darauf hin, dass ISCA1 und ISCA2 im späten Schritt der ISC-Maschinerie zusammenarbeiten (Sheftel *et al.*, 2012b). Die Studien an ISCA1 und dessen Homologen zeigen, dass ISCA1 eine entscheidende Rolle in der [4Fe-4S]-Clustersynthese wahrnimmt. Vergleichbar mit ihren bakteriellen Homologen können die Isa-Proteine einen [2Fe-2S]-Cluster koordinieren (Abbildung 10) (Gupta *et al.*, 2009; Mapolelo *et al.*, 2012; Py und Barras, 2010; Wang *et al.*, 2010), oder Eisen binden (Mühlenhoff *et al.*, 2011).



**Abbildung 10: Kristallstruktur des bakteriellen ISC-Proteins IscA.** Der IscA-Homodimer (Morimoto *et al.*, 2006) koordiniert asymmetrisch einen [2Fe-2S]-Cluster (rot). Grün markiert sind die Cysteine des konservierten CX<sub>n</sub>CXC (n = 60-80) Sequenzmotivs. Nach Morimoto *et al.* 2006. PDB:1XOG

Auch für das humane ISCA1 konnte bereits nach Expression und Aufreinigung aus *E. coli* eine Eisenkoordinierung beobachtet werden (Lu *et al.*, 2010). Fe/S-Cluster werden hauptsächlich über Cysteine koordiniert (Einleitung, Kapitel 1.2, Seite 2). ISCA1 enthält drei konservierte Cysteine, die im Motiv CX<sub>n</sub>CXC (n = 60-80) angeordnet sind (Abbildung 11). Ähnliche Aminosäuresequenzmotive sind bereits für die *Desulfo gigas* Aldehydoxidoreduktase (Romão *et al.*, 1995) und *Azotobacter vinelandii* NifU bekannt (Yuvaniyama *et al.*, 2000).

```

E. coli Isca          -----MSITLSD
Ct. therm. Isal     TAAQQHQSQFQSQSSSVSTTEKTQTTASIQQSAPSTTQQQP SARPRSRLRTPRKAAMTLTP
S. cerev. Isal      ETIKSHEEAIAKKQNKAI---DEQIAAAVSKND--C-SCTEPPKRRKRLRPRKALITLSP
H. sap. ISCA1       -----MSASL-----VRATVRAVSKRKLQPTRAALTLP
Mus. Mus ISCA1      -----MSASL-----VRATVRAVSKRKLQPTRAALTLP
                                     :**:
```

```

E. coli Isca          SAAARVNTFLANRGKGFGLRLGVRTSGCSGMAYVLEFVDEPTPEDIVFEDKGVKVVVDGK
Ct. therm. Isal     AAVAHLRELLN-QPEPKLIKVGVRNRGCSGLAYHLEYVDKPGPFDELVEQDGVKVLIDSK
S. cerev. Isal      KAIKHLRALLA-QPEPKLIRVSARNRGCSGLTYDLQYITEPGKFDEVVEQDGVKIVIDSK
H. sap. ISCA1       SAVNKIKQLLKDKPEHVGKVGVRTRGCNGLSYTLEYTKTKGDSDEEVIQDGVRVFIEKK
Mus. Mus ISCA1      SAVNKIKQLLKDKPEHVGKVGVRTRGCNGLSYSLEYTKTKGDSDEEVIQDGVRVFIEKK
*   :. : * : : : : : * . * : * * : : * . : * * : : : *
```

```

E. coli Isca          SLQFLDGTQLDFVKEGLNEGFKFTNPVNDKCGCGESFHV
Ct. therm. Isal     ALFSIIGSEMDWVENELSRQRFVFRNPNI-CCCGESFMV
S. cerev. Isal      ALFSIIGSEMDWIDDKLASKFVFKNPNSKGTCCCGESFMV
H. sap. ISCA1       AQLTLLGTEM DYVEDKLSSEFVFNPNIKGTCCCGESFNI
Mus. Mus ISCA1      AQLTLLGTEM DYVEDKLSSEFVFNPNIKGTCCCGESFHV
:   : * : : * : : : * . * * * * : * * * * * :
```

**Abbildung 11: Primärsequenzvergleich von Isa1 (humanes ISCA1).** Für den Sequenzvergleich wurden die Proteine aus *E. coli*, *Chaetomium thermophilum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens* und *Mus musculus* ausgewählt. Der N-terminale Sequenzbereich ist nicht bei allen Organismen gezeigt. Der Sequenzvergleich wurde mit der Software Clustal-Omega erstellt.

Neuere biochemische *in vitro* Untersuchungen mit rekombinanten ISCA1- und ISCA2-Proteinen zeigten einen Fe/S-Clustertransfer und eine Protein-Protein-Interaktion mit humanen GLRX5 (Banci *et al.*, 2014), wobei *in vitro* ein heterodimerer ISCA1/ISCA2-Komplex als Plattform für die [4Fe-4S]-Clusterassemblierung gebildet wird. An Hand der *in vitro* Daten wird angenommen, dass der transient gebundene [2Fe-2S]-Cluster des GLRX5 für die Maturierung von [4Fe-4S]-Clustern benötigt wird (Brancaccio *et al.*, 2014).

Die bisherigen biochemischen *in vitro* Daten basieren alle auf einem artifiziellen Transfersystem, die physiologische Relevanz der Fe/S-Transfersysteme, sowie die genaue biochemische Funktion von ISCA1, ist allerdings noch unklar.

### 1.5.2.2 Das A-Typ-ISC-Protein ISCA2

Bei Isa2 (human ISCA2), handelt es sich um ein mitochondriales Matrixprotein, welches wie Isa1 im späten Teil der ISC-Maschinerie lokalisiert ist. Zusammen mit Isa1 und Iba57 katalysiert Isa2 die Bildung und Insertion von [4Fe-4S]-Clustern auf Apozielproteinen (Gelling

*et al.*, 2008; Mühlenhoff *et al.*, 2007; Mühlenhoff *et al.*, 2011; Sheffel *et al.*, 2012a). In genetischen Untersuchungen wurde eine Rolle des Isa2 im Biotinmetabolismus bei der Konversion von Desthiobiotin zu Biotin, einem Enzym, das als prosthetische Gruppe in vielen Carboxylasen fungiert, festgestellt (Mühlenhoff *et al.*, 2007). Die *de novo* Synthese der beiden auf der Biotinsynthase (Bio2) gebunden Fe/S-Cluster ist bei einer Depletion von Isa2 wie auch Isa1 nicht betroffen. Isa2 ist für die katalytische *in vivo* Funktion, aber nicht für die *de novo* Synthese der auf Bio2 gebundenen Fe/S-Clusters zuständig. Isa2 enthält ähnlich wie Isa1 drei konservierte Cysteine, die im Motiv CX<sub>n</sub>CXC (n = 60-80) angeordnet sind (Abbildung 12). Im Gegensatz zu Isa1 kann Isa2 nicht durch bakterielle A-Typ-ISC-Proteine ersetzt werden.

```

E. coli IscA      LSISERASNRLAE--I-YRNSKENLRISVESGGCHGFGYQNLTLLEPATKPKDIKNDVKDKKEF
Ct. therm. Isa2  LEITPRAGKRLTEIMKKDTPHLLALRIQVESGGCHGFGYVMRLVTLPPSLPTPEPAPSS
S. cerev. Isa2   I T L S D S A A A R V N T F L A - N R G K G F G L R L G V R T S G C S G M A Y V L E F V D E P T P E D - - - - -
H. sap. ISCA2    I R L T D S C V Q R - - - L L E - I T E G S E F L R L Q V E G G G C S G F Q Y K F S L D T V I N P D D - - - - -
Mus. Mus ISCA2   I R L T D S C V Q R - - - L L E - I T E G S E F L R L Q V E G G G C S G F Q Y K F S L D T V I N P D D - - - - -
                  :  :  .  *                               ** : * . . * * * : * : :

E. coli IscA      S D D L D D D D S K D I I Y V - - - - - L P E D K G R V I I D S K S L N I L N N T T L Y T N E L I G S S F K I
Ct. therm. Isa2  D D T T A T L H E D D T I F A W T P D E S M A E P D I T S P K I I L D L A S L E L L K D S K V D F T Q E L I G S Q F K I
S. cerev. Isa2   - - - - - I V - - - - - F E D K G V K V V V D G K S L Q F L D G T Q L D F V K E G L N E G F K F
H. sap. ISCA2    - - - - - R V - - - - - F E Q G G A R V V V D S D S L A F V K G A Q V D F S Q E L I R S S F Q V
Mus. Mus ISCA2   - - - - - R V - - - - - F E Q G G A R V V V D S D S L A F V K G A Q V D F S Q E L I R S S F Q V
                  .                               : : : * * * : : : : : * * : . * : .

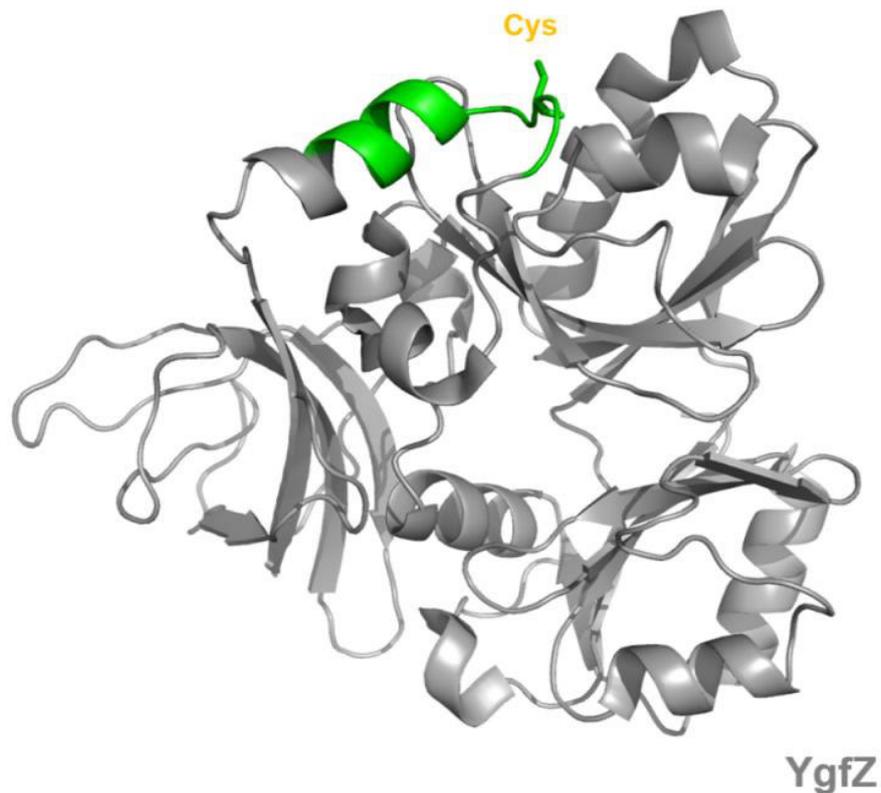
E. coli IscA      I - N G S L K S S C G C G S S F D I E N
Ct. therm. Isa2  V D N P K A T S S C G C G T S F D I K -
S. cerev. Isa2   - T N P N V K D E C G C G E S F H V - -
H. sap. ISCA2    L N N P Q A Q Q G C S C G S S F S I K L
Mus. Mus ISCA2   L N N P Q A Q Q G C S C G S S F S V K V
                  * . . * . * * * * :
    
```

**Abbildung 12: Primärsequenzvergleich von Isa2 (humanes ISCA2).** Für den Primärsequenzvergleich wurden die Proteine aus *E. coli*, *Chaetomium thermophilum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens* und *Mus musculus* ausgewählt. Grün markiert sind die konservierten Cysteinreste des CX<sub>n</sub>CXC Sequenzmotivs. Der N-terminale Sequenzbereich ist nicht bei allen Organismen gezeigt. Der Sequenzvergleich wurde mit der Software Clustal-Omega erstellt.

### 1.5.3 Die späte ISC-Komponente IBA57

Die späte ISC-Komponente Iba57 (human IBA57) ist essentiell für die mitochondriale DNA. Es wurde erstmals in genetischen Screens in *S. cerevisiae* identifiziert (Takeda *et al.*, 1985). *In vivo* und *in vitro* Studien zeigten eine spezifische Funktion von Iba57 bei der Bildung der Homoaconitase, der mitochondrialen Aconitase als auch eine katalytische Funktion bei den Radikal-SAM-Proteinen Biotin und Liponsäuresynthase (Gelling *et al.*, 2008). Iba57 interagiert zusammen mit den A-Typ-ISC-Proteinen und nimmt mit diesen eine in Eukaryoten universelle Funktion wahr (Gelling *et al.*, 2008). Die Primärsequenz von Iba57 ist nicht vergleichbar mit anderen Fe/S-Assemblierungsfaktoren, sie weist eine zu Tetrahydrofolat-bindenden Enzymen ähnliche Primärsequenz auf. Sowohl *S. cerevisiae* Iba57 als auch das *E. coli* Homolog YgfZ

gehören zur COG0354-Proteinfamilie, die sich durch ein konserviertes KGC[Y/F]-X-GQE-X<sub>3</sub>-[R/K]-Motiv auszeichnet. Die Struktur des bakteriellen Homologen YgfZ (Teplyakov *et al.*, 2004) zeigt einen Disulfid-verbrückten Dimer, der *in vivo* allerdings nicht gefunden wurde. Iba57 besitzt ein konserviertes Cystein, welches in den Pflanzenhomologen durch Thioredoxine reduziert werden kann (Hägglund *et al.*, 2008) (Abbildung 13).



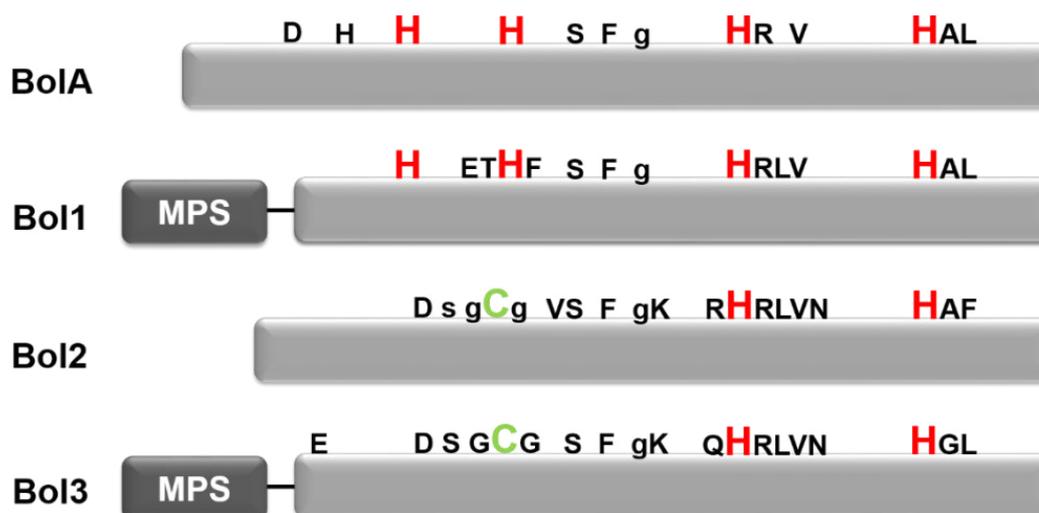
**Abbildung 13: Kristallstruktur des IBA57 Homologen YgfZ aus *E. coli*.** Das *E. coli* Homolog YgfZ ist lediglich im Bereich der potentiellen Tetrahydrofolat-Bindungsdomäne konserviert. Insgesamt weisen YgfZ und IBA57 nur eine 42%-ige Sequenzidentität auf. Der konservierte Bereich COG0354-Proteinfamilie K<sub>226</sub>GCYTGQEMVAR<sub>237</sub> mit dem Cystein ist grün hervorgehoben. Nach Teplyakov *et al.* 2014. PDB 1NRK

Der konservierte Cysteinrest ist zusätzlich auch für die Plumbagin Sensitivität (Lin *et al.*, 2010) in einigen Bakterien entscheidend. Bei Plumbagin handelt es sich um eine organische Komponente aus Pflanzen, die das Wachstum bestimmter Bakterienstämme inhibieren kann. Einige *E. coli*-Stämme sind resistent gegen Plumbagin, eine Mutation des konservierten Cystein 228 führt allerdings zum Verlust dieser Resistenz (Lin *et al.*, 2010). Die biochemische Funktion des konservierten Cysteins in IBA57 ist bislang unklar. Mutationen in humanen IBA57 führen nach Untersuchungen an verschiedenen IBA57 Patienten zu auffälligen Störungen im mitochondrialen Metabolismus, schwere Myopathie mit Enzephalopathie ist die Folge. Bei den Patienten lag eine Mutation in einer nicht konservierten Aminosäure (Glutamin 314) zu einem Prolin vor. Diese führt zu Fehlern in der Atmungskette, insbesondere der Komplexe I/II, Defekten an der Aconitase und in Lipolat-enthaltenden Enzymen (Debray *et al.*, 2015). Diese

Störungen des Fe/S-Metabolismus waren nach der Geburt letal. Zusätzlich war auch die Aktivität des Komplexes IV (Cytochrom c Oxidase), der keinen Fe/S-Cluster besitzt, reduziert (Ajit Bolar *et al.*, 2013). Dieser Phänotyp konnte bereits in Hefe- und humanen Zellen beobachtet werden (Gelling *et al.*, 2008; Sheftel *et al.*, 2012a). Die genaue molekulare Ursache ist unbekannt.

### 1.5.4 BOLA Proteine, spezifische ISC-Assemblierungsfaktoren

Ende der 80er Jahre wurde bei Funktionsuntersuchungen von D-Alanin-Carboxypeptidasen (CPase) in *E. coli*, die eine Rolle bei der Ausbildung der Murin Schicht bilden, das *bolA* Gen entdeckt. Deletion von zwei *E. coli* CPasen PBP5 und PBP6 hatte keine Auswirkung auf die Zellteilung (Spratt, 1980). Daraufhin untersuchten Aldea *et al.* (1989) einen Faktor der an diesem Prozess beteiligt war. Hierbei wurde das *bolA* Gen identifiziert, welches bei Überexpression anstelle der typischen *E. coli*-Stäbchenform die Bildung einer rundlichen Morphologie verursacht (Aldea *et al.*, 1989). BOLA Proteine sind in allen lebenden Organismen zu finden und in den verschiedenen Organismen hoch konserviert (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Schema der bakteriellen BOLA- und eukaryotischen Bol1-, Bol2- und Bol3-Proteine.** Die über eine Vielzahl von Organismen konservierten Aminosäuren der BOLA-Familie sind dargestellt. Die konservierten Histidine sind rot, die konservierten Cysteine sind grün hervorgehoben. MPS: Mitochondriale Präsequenz.

Die genaue molekulare Funktion der Bol-Proteine ist allerdings noch unbekannt. Über die eukaryotischen Homologen ist bisher noch weniger bekannt als über die bakteriellen Homologen. In menschlichen Zellen wie auch in Hefezellen gibt es drei BOLA-Proteine. Bol1 (humanes BOLA1) und Bol3 (humanes BOLA3) sind im Mitochondrium lokalisiert, Bol2 (humanes BOLA2) im Zytosol. Eine Doppeldeletion von *bol1/bol3* in *S. cerevisiae* führt zu milden Defekten einiger weniger [4Fe-4S]-Komponenten, wie der Lipoatsynthase (LIAS) und Succinatdehydrogenase (SDH) (Uzarska *et al.*, 2016).

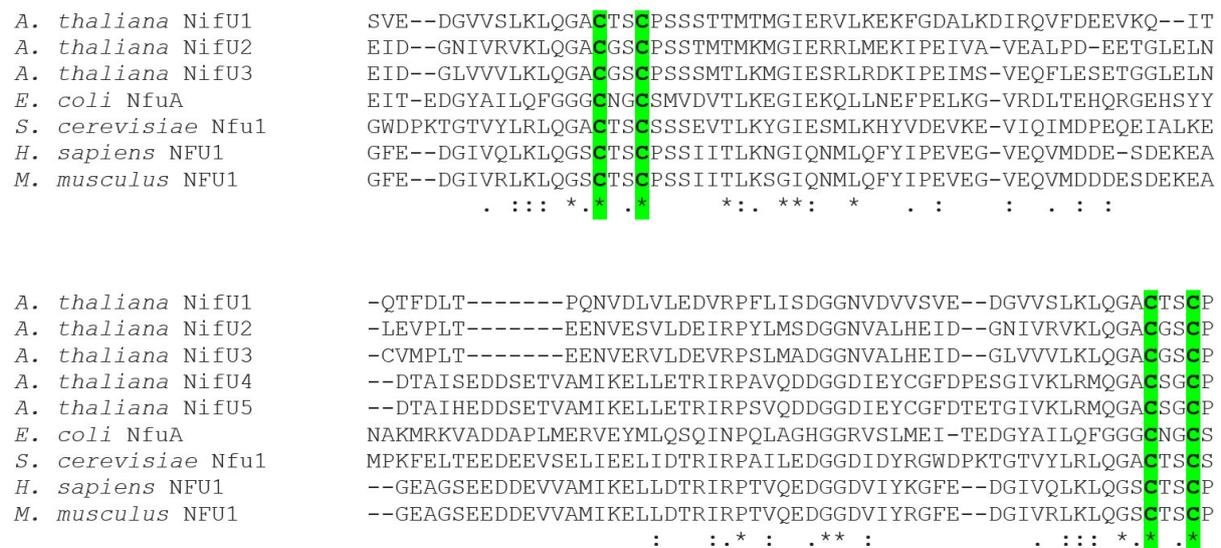
Bioinformatische Studien, kombiniert mit Genomsequenzierungen, physikalischen Interaktionsdaten und dreidimensionale Strukturen lieferten erste Hinweise auf potentielle Interaktionspartner der BOLA-Proteine und zeigten, dass BOLA-Proteine homolog zur Peroxidreduktase OsmC sind und eine zur Klasse II KH-Proteinfaltung ähnliche Proteinfaltung aufweisen (Huynen *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu Peroxidreduktasen, die Hydroperoxid zu Alkohol reduzieren können, besitzen die BOLA-Proteine keine zwei konservierten Cysteine. Daher können sie nicht als Reduktionsäquivalente dienen. Phylogenetische Studien deuteten auf eine genomische Assoziation mit Monothiol-Glutaredoxinen hin, was durch die in einem Koimmunopräzipitationsexperiment entdeckte Grx3-Bol2 Interaktion verifiziert werden konnte (Bhan *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2000). Das zytosolische Bol2 ist ein Protein, welches an der Regulierung des Eisenregulons als Antwort auf eine erniedrigte Fe/S-Clusterbiosynthese mitwirkt. Die Gruppe um Jerry Kaplan fand heraus, dass Mutationen in *bol2* zu einer Erhöhung der Transkription des Eisenregulons führten (Kumanovics *et al.*, 2008). *In vitro* konnte für Grx3/Grx4 und Bol2 ein heterodimerer Komplex mit verbrücktem [2Fe-2S]-Cluster identifiziert werden. Dieser Fe/S-Cluster wird durch ein Cystein in der aktiven Stelle des Grx3/Grx4, GSH und dem Histidin 103 des Bol2 koordiniert (Li *et al.*, 2011). Es wird postuliert, dass der Komplex als Kontrollsignal der zellulären Eisenmenge auf das Eisenregulon einwirkt. Auch im humanen System konnte die Bildung eines GLRX3-BOLA2-Komplexes beobachtet werden (Willems *et al.*, 2013). Die von Willems *et al.* 2013 beobachtete Interaktion des humanen mitochondrialen BOLA1 mit GLRX5 deutet auf eine über verschiedene Organismen konservierte Funktion für einen Grx-BOLA-Komplex hin. BOLA1 wird zusammen mit Monothiol-Glutaredoxinen eine Rolle als Reduktase zugeschrieben (Huynen *et al.*, 2005). Biochemische Beweise für die genaue physiologische und biochemische Rolle von BOLA1 bzw. der GLRX5-BOLA1-Komplexe fehlen allerdings. Überexpression von mitochondrialen BOLA1 führt zu einer Abschwächung des Effekts einer GSH Depletion auf das Thiolredoxpotential und schützt vor morphologischen Veränderungen.

Ein weiteres mitochondriales Protein der BOLA-Familie ist BOLA3, das humane Bol3 Homolog (Cameron *et al.*, 2011). Vergleichbar mit Patienten, die eine fehlerhafte Expression von NFU1 aufweisen (Einleitung, Kapitel 1.5.5, Seite 22), leiden Patienten mit einer Leserastermutation im *bolA3* Gen an dem biochemischen Phänotyp der MMDS2 Krankheit (multiples mitochondriales Dysfunktionssyndrom) (Stehling *et al.*, 2014), weshalb für BOLA3 eine Funktion als ISC-Assemblierungsfaktor im späten Teil der ISC-Maschinerie ähnlich zu NFU1 angenommen wird. Allerdings haben die Hefe Bol-Proteine überlappende Funktionen und können Nfu1 nicht ersetzen (Uzarska *et al.*, 2016). Ähnlich zu NFU1 ist bei einem BOLA3-Defekt die Ausbildung der Komplexe I und II der Atmungskette beeinträchtigt (Cameron *et al.*, 2011; Wesley *et al.*, 2017). Auch ein erniedrigtes Lipoatsyntheselevel ist ein Kennzeichen eines BOLA3-Defekts (Cameron *et al.*, 2011). Ein deutscher Patient weist zusätzlich zu den

bereits aufgeführten biochemischen Merkmalen eines BOLA3-Defekts noch Probleme im Komplex III auf (Haack 2013). In einigen Studien wurde auch eine Interaktion von BOLA3 mit einem Glutaredoxin, vergleichbar mit BOLA1 beobachtet (Cameron et al., 2011). Von dem bakteriellen NFU1 Homologen NfuA ist bekannt, dass BolA-Proteine nicht nur mit Glutaredoxinen interagieren können (Boutigny et al., 2013; Roret et al., 2014; Yeung et al., 2011). Auf Grund des Phänotyps könnte angenommen werden, dass BOLA3 eine ähnliche Funktion bei der Fe/S-Clusterinsertion wie NFU1 im späten Teil der ISC-Maschinerie wahrnimmt. Die genaue physiologische und biochemische Rolle der BOLA-Proteine ist allerdings bisher unbekannt.

### 1.5.5 Nfu1-Proteine

Nfu1 (humanes NFU1) ist ein hochkonserviertes mitochondriales Matrixprotein, das im späten Teil der mitochondrialen ISC-Maschinerie lokalisiert ist. Nfu-Proteine, benannt nach dem *A. vinelandii* NifU, weisen eine evolutionär hoch konservierte Domäne mit einem konservierten CXXC-Motiv auf, die transient einen [4Fe-4S]-Cluster binden kann (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Primärsequenzvergleich des konservierten Bereichs von Nfu1 (humanes NFU1).** Für den Primärsequenzvergleich wurden die Proteine aus *A. thaliana*, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens* und *Mus musculus* ausgewählt. Grün markiert ist das konservierte Cystein des CXXC Sequenzmotivs. Der N-terminale Sequenzbereich ist nicht gezeigt. Der Sequenzvergleich wurde mit der Software Clustal-Omega erstellt.

Die Rolle von Nfu-Proteinen in der Fe/S-Clusterbiogenese wurde in einem *S. cerevisiae* Screen festgestellt, in dem *nfu1* Deletionen zusammen mit einer *ssq1* Deletion synthetisch letal wirkten (Schilke et al., 1999). Hefe Nfu1 ist nicht essentiell für die Zelle, da eine alleinige *nfu1* Deletion nur ein geringeres Zellwachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen und eine höhere Sensitivität der Zellen gegenüber Stress, aber keine gravierenden Defekte im Zellmetabolismus, zeigte. Sowohl die Aktivitäten von Fe/S-Clusterenzymen als auch

Eisenakkumulierung in Mitochondrien waren nur leicht betroffen. Eine Funktion von Nfu1 in der mitochondrialen ISC-Assemblierungsmaschinerie wurde erst durch eine Doppeldeletion von *isu1/nfu1*, die Fehler in der Atmungskette, erniedrigte Aktivitäten von Fe/S-Clusterenzymen und eine Eisenakkumulierung in Mitochondrien verursacht, festgestellt (Schilke *et al.*, 1999). Eine Deletion von *nfuA* in *E. coli* und *A. vinelandii* führt zu Wachstumsdefekten unter oxidativem Stress oder Eisenmangel (Angelini *et al.*, 2008; Yabe *et al.*, 2004). *In vitro* konnte auf NfuA ein [4Fe-4S]-Cluster rekonstituiert und auf die Aconitase bzw. Lipoylsynthase (LipA) übertragen werden (Angelini *et al.*, 2008; McCarthy und Booker, 2017). Im Gegensatz zum humanen System codiert *A. thaliana* fünf Nfu-ähnliche Proteine, wobei Nfu1-3 in Plastiden und Nfu4-5 in Mitochondrien lokalisiert sind. Sowohl *nifU1-3* als auch *nifU4-5* konnten *nfu1/isu1Δ* Hefezellen (Schilke *et al.*, 1999), die einen Fe/S-Defekt auf einigen Enzymen der Atmungskette und ein vermindertes Zellwachstum aufwiesen, retten (Leon *et al.*, 2003). *In vitro* konnte ein auf NifU2 labil gebundener [2Fe-2S]-Cluster beobachtet werden (Leon *et al.*, 2003). Die *nifU*-Gene sind für die Pflanzen nicht essentiell, obwohl eine *nifU2* Deletion die Photosynthese, das Blattwachstum als auch Fe/S-Clusterassemblierung von [4Fe-4S]-Proteinen und [2Fe-2S]-Ferredoxinen betrifft (Touraine *et al.*, 2004; Yabe *et al.*, 2004). Für das humane NFU1 konnte 2003 ein von zwei NFU1 Monomeren koordinierter [4Fe-4S]-Cluster beobachtet werden (Tong *et al.*, 2003). Diese Beobachtung steht in Einklang mit der vermuteten Funktion in der Fe/S-Proteinbiogenese. Die Wichtigkeit des humanen NFU1 zeigte sich durch die Entdeckung von Patienten, die Mutationen im *NFU1* Gen aufwiesen (Cameron *et al.*, 2011; Navarro-Sastre *et al.*, 2011). Bei den Patienten wurde sowohl eine Nonsense-Mutation (Cameron *et al.*, 2011), die in einem kompletten NFU1 Verlust resultierte, als auch eine Punktmutation (G→C) identifiziert (Navarro-Sastre *et al.*, 2011). In beiden Fällen wurden die Patienten zunächst symptomfrei geboren. Im Laufe der Entwicklung zeigten sich allerdings biochemische Defekte mit verringerten Aktivitäten auf Liponsäure-abhängigen Proteinen, wie Pyruvatdehydrogenase (PDH) und  $\alpha$ -Ketoglutarat-dehydrogenase (KGDH), sowie eine Hyperglykämie und eine Erhöhung der Ketosäuren (Cameron *et al.*, 2011; Navarro-Sastre *et al.*, 2011). Dieser Phänotyp, der ähnlich zum BOLA3 Phänotyp ist, kann durch einen Defekt auf dem Fe/S-Clusterenzym Liponsäuresynthase erklärt werden (Hiltunen *et al.*, 2010). Trotz der Patientenstudien ist bisher wenig über die genaue biochemische Funktion von Nfu1 in der Fe/S-Clusterbiogenese bekannt.

## 2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Innerhalb der letzten Jahre wurde das Wissen über die eukaryotische mitochondriale ISC-Maschinerie immer mehr ausgebaut. Auch wenn viele Studien zur *de novo* Synthese von [2Fe-2S]-Clustern auf ISCU vorhanden sind, ist der anschließende Transfer von Fe/S-Clustern von den intermediären ISC-Proteinen in entsprechende [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Zielproteine weitestgehend unbekannt. Im eukaryotischen System ist bisher weder der Transfer von [2Fe-2S]- noch der Transfer von [4Fe-4S]-Clustern auf Apozielproteine unter physiologischen Bedingungen untersucht worden. Dies ist aber wichtig, da der Transfer eines Fe/S-Clusters auf ein Zielprotein den letzten entscheidenden Schritt der zellulären Biogenese darstellt. Alle bisherigen *in vitro* Fe/S-Transfersysteme wurden ausnahmslos in Gegenwart von artifiziellen thioispezifischen Reduktionsmitteln wie DTT durchgeführt (Banci *et al.*, 2014; Bandyopadhyay *et al.*, 2008b; Gao *et al.*, 2013; Krebs *et al.*, 2001; Mapolelo *et al.*, 2013). Die Rolle dieser bisher in den Transfersystemen eingesetzten nicht physiologischen thioispezifischen Reduktionsmittel ist weitestgehend unklar und lässt daran zweifeln, ob die beobachteten Transferreaktionen wirklich physiologische Relevanz besitzen. Aus diesem Grund ist auch die Funktion vieler ISC-Proteine, wie beispielsweise des monothiolen Glutaredoxins GLRX5 oder NFU1 noch nicht genau geklärt bzw. basiert auf *in vitro* Analysen in Gegenwart artifizieller Reduktionsmittel, deren Ergebnisse als physiologisch relevant angenommen wurden. Die vorliegende Arbeit hatte daher zwei Zielsetzungen: Zum einen sollte ein *in vitro* System entwickelt werden, mit dessen Hilfe die Übertragung eines Fe/S-Clusters auf ein Zielprotein unter möglichst physiologischen Bedingungen nachgestellt werden kann. Hierbei sollte die Funktion der in der Literatur als potentielle Fe/S-Clusterdonoren beschriebenen ISC-Proteine (GLRX5, NFU1) in der Fe/S-Clusterbiogenese studiert werden. Der biochemische Mechanismus der Konversion eines [2Fe-2S]-Clusters zu einem [4Fe-4S]-Cluster ist bisher noch unbekannt. Mit Hilfe eines *in vitro* Transfersystems sollte auch versucht werden, die biochemische Konversion eines [2Fe-2S]- in einen [4Fe-4S]-Cluster mit den *in vivo* essentiellen und an der Konversion beteiligten ISC-Assemblierungsfaktoren ISCA1, ISCA2 und IBA57 unter physiologischen Bedingungen nachzustellen.

Die am späten Schritt der ISC-Maschinerie beteiligten ISCA-IBA57 Proteine benötigen für die Insertion des [4Fe-4S]-Clusters auf Zielproteine spezialisierte Interaktionspartner, die bei der Insertion eines transient gebundenen [4Fe-4S]-Clusters in spezielle Zielproteine wie der Lipoatsynthase helfen. Zwei Proteine der BOLA-Familie, BOLA1 und BOLA3, sind wahrscheinlich zusätzliche spezifische späte ISC-Komponenten. Im zweiten Teil der Arbeit sollte *in vitro* die molekulare Funktion dieser beiden späten ISC-Komponenten näher charakterisiert werden. Die genaue Funktion der BOLA-Proteine und deren potentielle Interaktionspartner sind bisher unbekannt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Mechanismus und Spezifität von Fe/S-Clustertransfersystemen

Die Übertragung und Insertion von Fe/S-Clustern in Apozielproteine ist ein essentieller Schritt der Fe/S-Proteinbiogenese. Fehler bei der Übertragung oder Insertion von Fe/S-Clustern können oftmals zu schwerwiegenden Krankheiten, wie beispielsweise Myopathie oder mitochondrialen Dysfunktionssyndrom führen (Einleitung, Tabelle 1, Seite 9) (Ajit Bolar *et al.*, 2013; Nordin *et al.*, 2012; Rouault, 2012; Spiegel *et al.*, 2013; Stehling *et al.*, 2014). Der Transfer eines Fe/S-Clusters auf ein Apozielprotein stellt den letzten entscheidenden Schritt der zellulären Fe/S-Biogenese dar. Der Mechanismus dieser Reaktion und die Funktion der daran beteiligten ISC-Assemblierungsfaktoren sind bisher unzureichend charakterisiert worden. Für das Verständnis der generellen Funktion der ISC-Assemblierungsfaktoren in der Fe/S-Biogenese ist die Entwicklung eines *in vitro* Fe/S-Transfersystems daher unerlässlich.

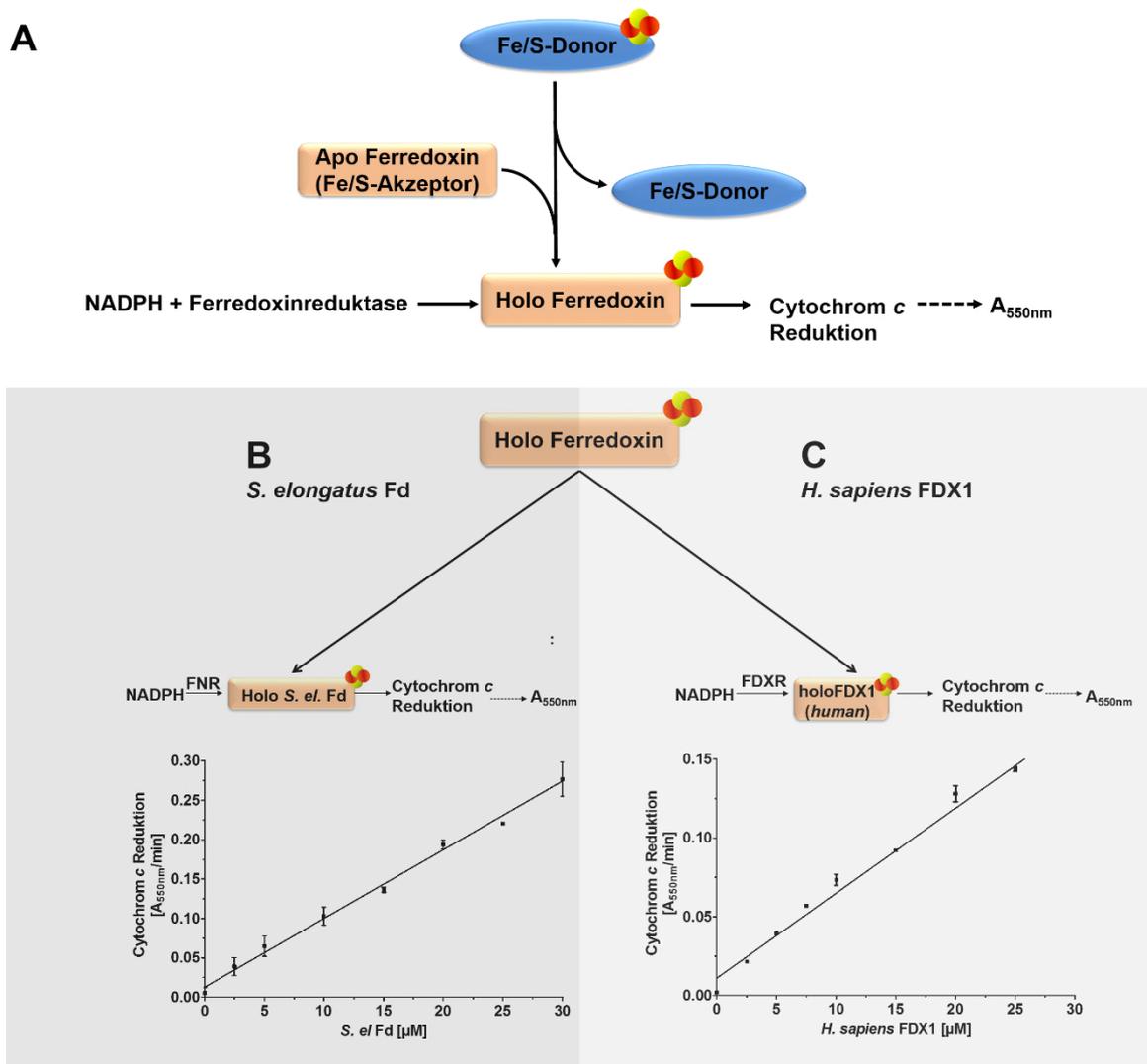
In der bisherigen Literatur wurde eine Vielzahl von Fe/S-Cluster Transfersystemen beschrieben. *In vitro* wird oftmals ein Holoprotein als Fe/S-Donor mit einem Apozielprotein als Fe/S-Akzeptor in Gegenwart des thioispezifischen Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) gemischt und ein Fe/S-Clustertransfer verfolgt (Banci *et al.*, 2014; Bandyopadhyay *et al.*, 2008b; Gao *et al.*, 2013; Krebs *et al.*, 2001; Mapolelo *et al.*, 2013). Ein so *in vitro* beobachteter Fe/S-Clustertransfer wird oftmals als Beweis für eine Funktion des jeweilig untersuchten Donorproteins als Fe/S-Transfer- oder Fe/S-Überträgerprotein angesehen. Die Reaktion wird oft als physiologisch relevant betrachtet, selbst wenn das Apozielprotein meist nicht aus dem gleichen Organismus oder Kompartiment wie der Donor stammt. Das physiologische Pendant des bisher in den Transfersystemen eingesetzten nicht physiologischen thioispezifischen Reduktionsmittels DTT ist weitestgehend unklar und lässt daran zweifeln, ob die *in vitro* beobachteten Transferreaktionen wirklich physiologische Relevanz besitzen und tatsächlich *in vivo* so ablaufen, wie sie *in vitro* beobachtet wurden.

Für das Verständnis des Mechanismus eines Fe/S-Clustertransfers ist es daher wichtig, ein *in vitro* System zu entwickeln, in dem im Gegensatz zur bisherigen Literatur keine artifiziellen thioispezifischen Reduktionsmittel wie DTT eingesetzt werden. Im Nachfolgenden wurde ein von artifiziellen Reduktionsmitteln freies *in vitro* [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Clustertransfersystem entwickelt, mit welchem verschiedene frühe und späte ISC-Assemblierungsfaktoren auf ihre potentielle Rolle im Fe/S-Clustertransfer untersucht wurden. Die ISC-Assemblierungsfaktoren (ISCU2, ISCA1, ISCA2, GLRX5, NFU1) wurden als Fe/S-Donoren, Apozielproteine (Ferrodoxine, ACO2, Leu1) wurden als Fe/S-Akzeptoren, eingesetzt.

### 3.1.1 Das [2Fe-2S]-Transfersystem: Indirekter enzymatischer Nachweis von holo-Ferredoxin

Zur Studie des Transfers von [2Fe-2S]-Clustern wurden zwei verschiedene [2Fe-2S]-Ferredoxine als Fe/S-Clusterakzeptoren verwendet, ein [2Fe-2S]-Ferredoxin aus dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* (*S. el.* Fd) und das humane mitochondriale Ferredoxin (FDX1). Diese wurden rekombinant in *E. coli* produziert und der Fe/S-Cluster durch Fällung mit HCl entfernt (Moulis *et al.*, 1996). Die apo-Ferredoxine wurden mit potentiellen Fe/S-Clusterdonoren gemischt, zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, und anschließend in diesen die Menge des zu diesem Zeitpunkt gebildeten holo-Ferredoxins quantifiziert. Für die Quantifizierung des gebildeten holo-Ferredoxins wurde ein enzymatischer Test verwendet, der auf der artifiziellen Reduktion von Cytochrom *c* durch ein [2Fe-2S]-holo-Ferredoxin in Gegenwart seiner zugehörigen Ferredoxin-NADPH-Reduktase basiert (Abbildung 16) (Böhme, 1977; Lazzarini und San Pietro, 1962). Die Cytochrom *c* Reduktion ist abhängig von der Konzentration an gebildeten holo-Ferredoxin, die wiederum von der Effizienz der Fe/S-Clusterübertragung des eingesetzten Fe/S-Donorproteins auf ein apo-Ferredoxin abhängt. Die erhaltene Änderung der Absorption bei 550 nm ( $A_{550\text{nm}}$ ) nach Cytochrom *c* Reduktion kann daher als Maß für die Effizienz einer Fe/S-Clusterübertragung angesehen werden.

Für den in dieser Arbeit verwendeten enzymatischen Nachweis zur Bildung von holo *S. el.* Fd bzw. holoFDX1 wurde zunächst eine Kalibrierung vorgenommen (Abbildung 16B/C), um die Effizienz der aus dem Fe/S-Clustertransfer erhaltenen Daten einordnen zu können. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen des jeweiligen holo-Ferredoxins in dem später verwendeten Reaktionsvolumen (4  $\mu\text{L}$  für *S. el.* Fd, 5  $\mu\text{L}$  für FDX1) eingesetzt und die Cytochrom *c* Reduktion bei einer Absorption von 550 nm ( $A_{550\text{nm}}$ ) ermittelt. In den später durchgeführten Fe/S-Clustertransfermessungen wurden jeweils 25  $\mu\text{M}$  des apo-Ferredoxin eingesetzt. Nach der Kalibrationskurve in Abbildung 16B war in dem verwendeten Fe/S-Transfersystem mit *S. el.* Fd als Apozielprotein eine maximale Absorption von 0,25  $A_{550\text{nm}}/\text{min}$  möglich, was 100% gebildeten holo *S. el.* Fd entspricht. Analog entsprach nach der Kalibrationskurve in Abbildung 16C eine holoFDX1-Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  (100%-iger Transfer) einer Absorption von 0,15  $A_{550\text{nm}}/\text{min}$ .



**Abbildung 16: Prinzip und Kalibrierung des enzymatischen Nachweises von holo-Ferredoxinen.** (A) Der enzymatische Nachweis der gebildeten Menge des holo-Ferredoxin basiert auf der Reduktion von Cytochrom c durch reduziertes holo-Ferredoxin (orange). Das Ferredoxin wird durch eine Elektronentransferkette bestehend aus NADPH und der zugehörigen NADPH-abhängigen Ferredoxinreduktase reduziert. Die Cytochrom c Reduktion ist von der holo-Ferredoxinbildung abhängig. Die gebildete Menge an holo-Ferredoxin ist wiederum von der Effizienz der Fe/S-Clusterübertragung des eingesetzten Fe/S-Donorproteins (blau) auf ein apo-Ferredoxin abhängig. (B/C) Für die Kalibrierung des Testsystems basierend auf Cytochrom c Reduktion wurde die jeweilige holo-Ferredoxinkonzentration an (A) *S. el.* Fd oder (B) FDX1 in einem Volumen von 4  $\mu$ L (*S. el.* Fd) oder 5  $\mu$ L (FDX1) zugegeben. Das zugegebene Volumen entspricht dem Volumen, welches auch zur Quantifizierung im jeweiligen Fe/S-Clustertransfersystem verwendet wurde. Die Cytochrom c Reduktion wurde in Gegenwart der zugehörigen Ferredoxin-NADPH-Reduktase (FNR für *S. el.* Fd, FDXR für FDX1) bei 550 nm verfolgt. Die *S. el.* Fd-Messungen wurden in Fd-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl und 2 mM  $MgCl_2$ ) und die FDX1-Messungen in FDX1-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl und 2 mM  $MgCl_2$ ) durchgeführt.

Die aus dem Fe/S-Clustertransfer erhaltenen  $A_{550nm}/min$  von verschiedenen Fe/S-Donoren der nachfolgenden Kapitel wurden mit der Kalibrierung verglichen, um die Effizienz des Fe/S-Clustertransfers auf das apo-Ferredoxin quantitativ einschätzen zu können.

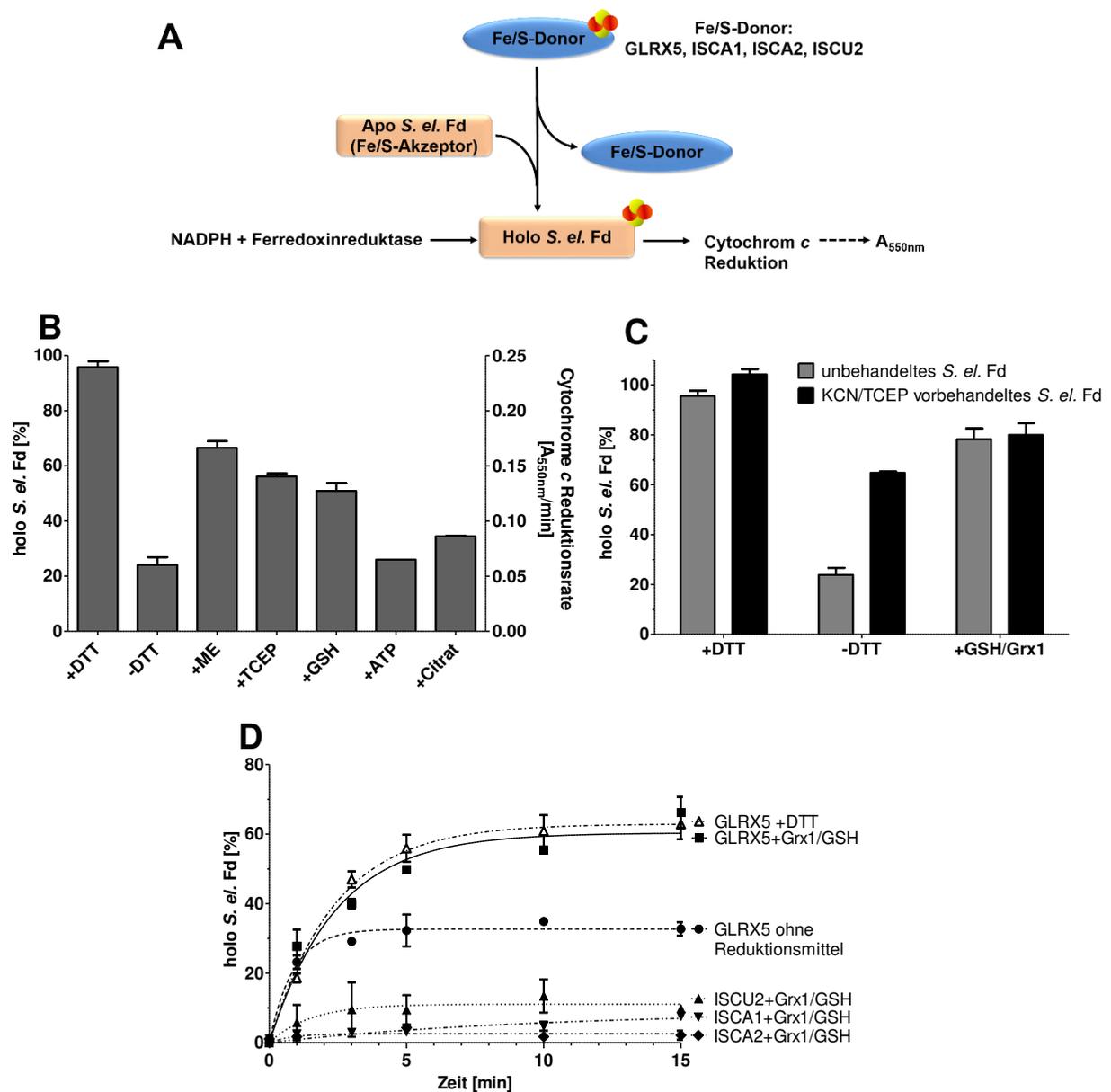
### 3.1.2 Das physiologische Dithiol-Glutaredoxin-Reduktionssystem Grx1/GSH ersetzt artifizielle Reduktionsmittel in [2Fe-2S]- Transferreaktionen

Im eukaryotischen System ist bisher weder der [2Fe-2S]-Clustertransfer noch der [4Fe-4S]-Clustertransfer aufgeklärt worden. Im Gegensatz zum bakteriellen System, in dem bereits Erkenntnisse über die Chaperon-induzierte [2Fe-2S]-Transferreaktion vorliegen (*Bonomi et al.*, 2011; Chandramouli und Johnson, 2006), ist der Mechanismus des [2Fe-2S]-Transfers und die Insertion eines [2Fe-2S]-Clusters in [2Fe-2S]-Zielproteine für das eukaryotische System noch weitestgehend unbekannt. Die nachfolgenden *in vitro* Ergebnisse liefern wichtige neue Erkenntnisse über Fe/S-Clustertransferreaktionen für das eukaryotische System. Um den initialen Schritt und die Mechanismen eines Fe/S-Clustertransfers *in vivo* zu verstehen, sollte das hier *in vitro* entwickelte Fe/S-Transfersystem die Situation der lebenden Zelle möglichst genau nachahmen. Nach Modellvorstellungen aus Studien *in vivo* ist das mitochondriale Monothiol-Glutaredoxin GLRX5 der beste ISC-Kandidat mit einer direkten Rolle im Fe/S-Clustertransfer auf apo-[2Fe-2S]-Proteine. Es wurde daher zunächst humanes GLRX5 verwendet, das rekombinant in *E. coli* produziert wurde und nach Reinigung als Apoprotein anfiel (Anhang, Abbildung 57, Seite 134). Der [2Fe-2S]-Cluster auf GLRX5 wurde unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Eisen- und Sulfidionen sowie eines Reduktionsmittels chemisch rekonstituiert. Üblicherweise wird für eine chemische Rekonstitution DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol (ME) als Reduktionsmittel verwendet. Um eine Kontamination der im Fe/S-Clustertransfersystem verwendeten Proteine mit diesen artifiziellen Substanzen zu vermeiden, wurde GLRX5 in Gegenwart von GSH chemisch rekonstituiert. Die chemische Rekonstitution von GLRX5 mit GSH lieferte ein nahezu identisches CD-Spektrum wie das mit DTT rekonstituierte Protein (Anhang, Abbildung 58, Seite 134).

Das eingesetzte Verhältnis von Donor zu Akzeptor im Transfersystem betrug 2:1 (50  $\mu$ M : 25  $\mu$ M). Der Donor GLRX5 wurde mit dem Akzeptor, dem apo-Ferredoxin, unter anaeroben Bedingungen gemischt und die Menge holo-Ferredoxin wie in Kapitel 3.1.1 (Seite 26) beschrieben quantifiziert. Eine Absorption  $A_{550\text{nm}}/\text{min}$  von 0,25 entspricht einer Bildung von 100% holo *S. el. Fd* (Abbildung 16). In Gegenwart von DTT war die Bildung von holo *S. el. Fd* nach 10 min vollständig ( $\sim$ 100%) abgeschlossen (Abbildung 17). Auch die Zugabe von Reduktionsmitteln, wie beispielsweise  $\beta$ -Mercaptoethanol (ME) oder Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP), die zur Reduktion von Cysteinen eingesetzt werden, zeigten einen effizienten [2Fe-2S]-Clustertransfer von 60% nach 10 Minuten. Reaktionen ohne DTT bzw. mit anderen Biomolekülen wie ATP oder Citrat hingegen zeigten lediglich eine ca. 25%-ige Bildung des holo *S. el. Fd* (Abbildung 17B). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass DTT primär das Fe/S-Akzeptorprotein (*S. el. Fd*) reduziert und nicht direkt mit dem Fe/S-Donor GLRX5 interagiert und so einen [2Fe-2S]-Clustertransfer ermöglicht. Zum Beweis dieser

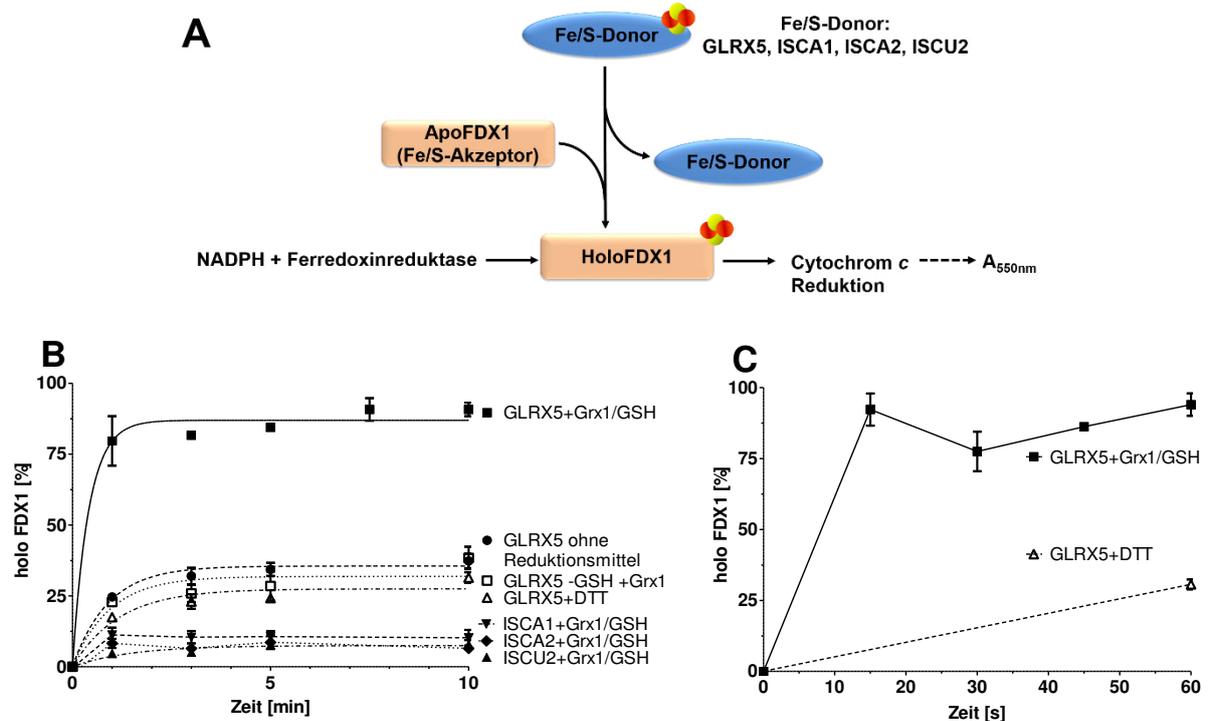
Schlussfolgerung wurde das apo *S. el.* Fd direkt vor der Messung anaerob mit 10 mM TCEP und 100 mM Kaliumcyanid (KCN) DTT-frei reduziert und die Reagenzien mittels Dialyse unter anaeroben Bedingungen vollständig entfernt. Dieses frisch reduzierte (vorbehandelte) apo *S. el.* Fd wurde unmittelbar ohne weitere Reagenzien im Transfersystem mit humanen holoGLRX5 eingesetzt und konnte effizient maturiert werden (Abbildung 17B). Dies zeigt, dass ein effizienter Transfer eines [2Fe-2S]-Clusters von einem Donorprotein zu einem Akzeptorprotein ohne zusätzliche Reagenzien effizient ablaufen kann, sofern das Fe/S-Akzeptorprotein reduziert vorliegt. Bekannt ist, dass nur auf reduzierte Akzeptorproteine ein Fe/S-Cluster effizient übertragen werden kann (Bak und Elliott, 2014), unerwartet war allerdings, dass die unter anaeroben Bedingungen mit dem Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptoethanol und HCl-gefällten Ferredoxine wieder Disulfidbrücken bildeten bzw. zur Oxidation neigten. Dieses Erkenntnis macht den Einsatz von Reduktionsmitteln für einen effizienten Fe/S-Clustertransfer unerlässlich und liefert auch die Erklärung, weshalb in vielen *in vitro* Transfersystemen artifizielle thiol-spezifische Reduktionsmittel wie DTT verwendet werden. Für ein *in vitro* relevantes Transfersystem ist es aber unerlässlich das nicht physiologische DTT durch ein physiologisches Pendant zu ersetzen. In lebenden Zellen werden Disulfidbrücken in Proteinen durch Dithiol-Glutaredoxine und GSH reduziert (Einleitung, Abbildung 9, Seite 14). In der Tat zeigte sich, dass in Gegenwart eines physiologischen Reduktionssystems bestehend aus dem Dithiol-Glutaredoxin Grx1 (*Mus musculus*) und einem Überschuss GSH (4 mM) vergleichbare Transfergeschwindigkeiten wie bei Zugabe von artifiziellen Reduktionsmitteln wie DTT (Abbildung 17C/D) erreicht wurden. Unter den gegebenen Messbedingungen wurden weitere ISC-Assemblierungsfaktoren (ISCA1, ISCA2, ISCU2) auf ihre Fe/S-Clustertransferfähigkeit getestet. Um eine Kontamination von DTT zu verhindern wurden diese in Gegenwart von  $\beta$ -Mercaptoethanol rekonstituiert und anschließend zweimal durch eine kleine Gelfiltrationssäule entsalzt. In Gegenwart von Grx1/GSH zeigten diese chemisch rekonstituierten ISC-Assemblierungsfaktoren (ISCA1, ISCA2, ISCU2) allerdings keinen effizienten Fe/S-Clustertransfer ihres [2Fe-2S]-Clusters auf apo *S. el.* Fd (Abbildung 17D), was darauf hindeutet, dass ISCU2 und die A-Typ-ISC-Proteine (ISCA1, ISCA2) ohne weitere Hilfsproteine keinen Fe/S-Cluster transferieren können.

Die erhaltenen Transferdaten von holoGLRX5 auf *S. el.* Fd (Abbildung 17D) können nach einer Reaktion pseudo-1. Ordnung gefittet werden (Anhang, Abbildung 59, Seite 135). Die erhaltene Geschwindigkeitskonstante ( $k_{\text{obs}}$ ) dieser Reaktion betrug in Gegenwart von Grx1/GSH  $k_{\text{obs}} = 140 (\pm 30) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und war mit der Geschwindigkeitskonstante in Gegenwart von DTT ( $k_{\text{obs}} = 140 (\pm 30) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) ungefähr vergleichbar.



**Abbildung 17: Der auf dem humanen GLRX5 gebundene [2Fe-2S]-Cluster kann auf das apo *S. el.* Ferredoxin (*S. el.* Fd) übertragen werden. (A) Prinzip des enzymatischen Nachweises der Bildung von holo *S. el.* Fd (orange) (analog zu Abbildung 16A). Als mögliche Fe/S-Clusterdonoren (blau) wurden verschiedene ISC-Assemblierungsfaktoren verwendet (GLRX5, ISCA1, ISCA2 und ISCU2), die zuvor chemisch rekonstituiert wurden. (B) Bildung von holo *S. el.* Fd nach 10-minütiger Inkubation von apo *S. el.* Fd (25  $\mu$ M) mit holoGLRX5 (50  $\mu$ M) in Gegenwart von 2 mM DTT, ohne Reduktionsmittel (-DTT), 4 mM ME, 4 mM TCEP, 4 mM GSH, 4 mM ATP oder 4 mM Citrat. (C) [2Fe-2S]-Clustertransfer nach 10 minütiger Inkubation von holoGLRX5 (50  $\mu$ M) in Gegenwart von 2 mM DTT, Abwesenheit von Reduktionsmitteln (-DTT) oder Gegenwart von 25  $\mu$ M Grx1 (*Mus musculus*) und 4 mM GSH auf apo *S. el.* Fd (25  $\mu$ M). Apo *S. el.* Fd (25  $\mu$ M) wurde unbehandelt benutzt (graue Balken) oder vor Benutzung mit 10 mM TCEP und 100 mM KCN vorbehandelt (schwarze Balken). (D) Zeitlicher Verlauf des [2Fe-2S]-Clustertransfers von 50  $\mu$ M holoGLRX5 (■), 50  $\mu$ M holoISCU2 (▲), 50  $\mu$ M holoISCA1 (▼), 50  $\mu$ M holoISCA2 (◆), 50  $\mu$ M holoGLRX5 + 2 mM DTT (Δ) oder von 50  $\mu$ M holoGLRX5 in Abwesenheit von Reduktionsmitteln (●) auf 25  $\mu$ M apo *S. el.* Fd in Gegenwart von 25  $\mu$ M Grx1 und 4 mM GSH zu den angegebenen Zeitpunkten. Fehlerbalken zeigen n = 2 unabhängige Messungen an. Die erhaltenen Daten wurden mit GraphPad Prism5 nach einer Reaktion pseudo-1. Ordnung gefittet. Die Fe/S-Clustertransfermessungen wurden in Fd-Puffer (Abbildung 16) durchgeführt.**

Im nächsten Schritt in Richtung eines *in vitro* Transfersystems, das der Situation in der Zelle nahe kommt, wurde nun der Transfer des [2Fe-2S]-Clusters von humanem GLRX5 auf das humane mitochondriale Ferredoxin (FDX1), ein physiologisch relevantes Fe/S-Zielprotein von GLRX5, untersucht (Abbildung 18). Auch diese Reaktion konnte mittels Reduktase-vermittelter Cytochrom *c* Reduktion verfolgt werden (Abbildung 16B).



**Abbildung 18:** In Gegenwart des Dithiol-Glutaredoxins Grx1 und GSH wird der auf humanem GLRX5 gebundene [2Fe-2S]-Cluster schnell und effizient auf humanes apo-Ferredoxin (FDX1) übertragen. (A) Prinzip des enzymatischen Nachweises (analog zu Abbildung 17A) der Bildung von holoFDX1. (B) Zeitlicher Verlauf des [2Fe-2S]-Clustertransfers von jeweils 50  $\mu$ M holoGLRX5 (■), holoISCA1 (▼), holoISCA2 (◆), oder holoISCU2 (▲) auf 25  $\mu$ M humanes apoFDX1 in Gegenwart von 25  $\mu$ M Grx1 und 4 mM GSH. Zusätzlich wurde der Transfer von GLRX5 ohne Reduktionsmittel (●), in Gegenwart von 2 mM DTT (Δ) und mit 25  $\mu$ M Grx1 aber ohne GSH (□) zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. (C) Frühe Phase des Fe/S-Clustertransfers von 50  $\mu$ M holoGLRX5 auf 25  $\mu$ M apoFDX1 in Gegenwart von 25  $\mu$ M Grx1 und 4 mM GSH (■) oder 2 mM DTT (Δ). Fehlerbalken zeigen  $n = 2$  unabhängige Messungen an. Die erhaltenen Daten wurden mit GraphPad Prism5 nach einer Reaktion pseudo-1. Ordnung gefittet. Fe/S-Clustertransfermessungen wurden in FDX1-Puffer (Abbildung 16) durchgeführt.

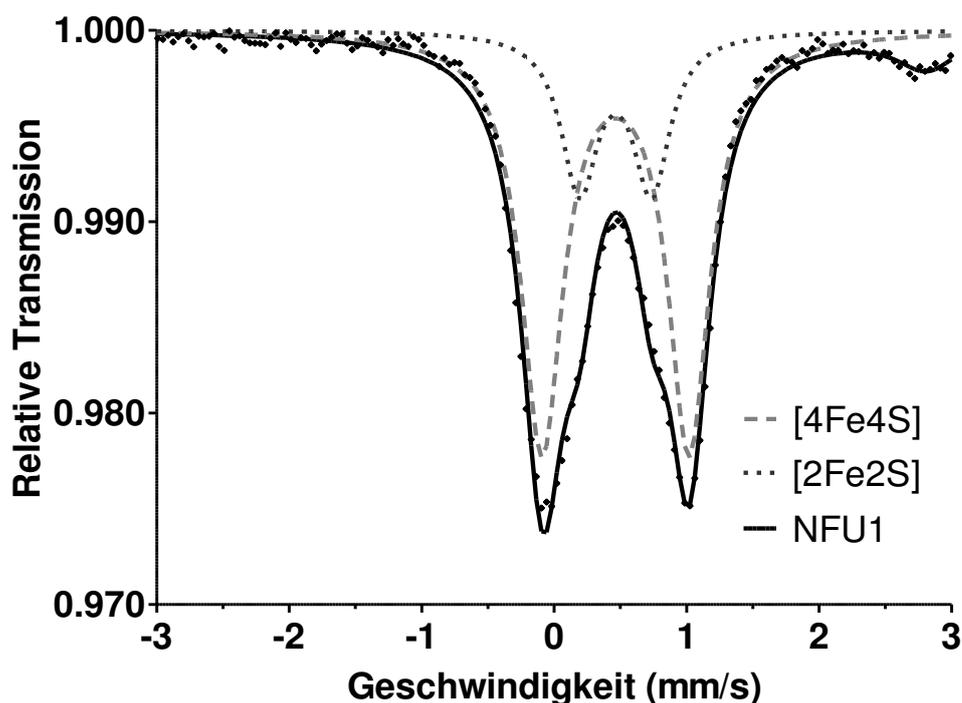
In Gegenwart von Grx1/GSH war die Reaktion in weniger als 15 Sekunden bereits vollständig beendet (Abbildung 18C). Dies war erheblich schneller als der Transfer von humanem GLRX5 auf das artfremde bakterielle apo-Ferredoxin aus *S. elongatus* und zeigt somit, dass Fe/S-Transferreaktionen Substratspezifität hinsichtlich des Akzeptorproteins aufweisen. Ein kürzeres Messintervall als 15 Sekunden war mit den gegebenen Messbedingungen nicht möglich, so dass offen bleibt wie schnell diese Reaktion in einem aufeinander abgestimmten System aus Donor- und Akzeptorprotein wirklich ist. Interessanterweise erfolgte der Transfer

auf apoFDX1 in Gegenwart von Grx1/GSH erheblich schneller ( $k_{\text{obs}} = 11000 (\pm 1300) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) als in Gegenwart von DTT ( $k_{\text{obs}} = 3000 (\pm 650) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Dies bedeutet, dass in einem homologen, aufeinander abgestimmten System aus Donor- und Akzeptorprotein aus dem gleichen Organismus und gleichen zellulärem Kompartiment der eigentliche Transfer des Fe/S-Cluster erheblich schneller sein kann, als die langsame DTT-vermittelte Reduktion des Akzeptorproteins. Diese Beobachtung ist neu. Auch in dem Fe/S-Transfersystem mit apoFDX1 als Fe/S-Akzeptor wurden unter den gegebenen Messbedingungen die chemisch rekonstituierten ISC-Assemblierungsfaktoren ISCA1, ISCA2 und ISCU2 auf ihre Fe/S-Clustertransferfähigkeit getestet. Diese Proteine zeigten allerdings auch im homologen System keinen effizienten Transfer eines [2Fe-2S]-Clusters auf humanes FDX1 (Abbildung 18B), was darauf hindeutet, dass ISCU2 ( $k_{\text{obs}} = 230 (\pm 115) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) und die A-Typ-ISC-Proteine ( $k_{\text{obs}} = 250 (\pm 130) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) ohne weitere Hilfsproteine keinen Fe/S-Cluster transferieren können.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil ein *in vitro* System für den Transfer von [2Fe-2S]-Clustern auf ein [2Fe-2S]-Akzeptor entwickelt werden, das auf den Zusatz artifizieller Substanzen verzichtet. Dies war möglich, in dem artifizielle Reduktionsmittel wie DTT durch das physiologische thiol-spezifische Reduktionssystem aus einem Dithiol-Glutaredoxin (Grx1) und Glutathion ersetzt wurde. In Abwesenheit thiol-spezifischer Reduktionsmittel war der Transfer sehr ineffizient, was bedeutet, dass das Akzeptorprotein für einen erfolgreichen Fe/S-Clustertransfer vollständig reduziert werden muss, um Polysulfane und Disulfidbrücken zu beseitigen. Obwohl die Apozielproteine während der Reinigung unter anaeroben Bedingungen reduziert wurden, trugen sie dennoch Disulfidbrücken. Auf mit Disulfidbrücken und Polysulfanen oxidierten Proteinen konnte kein Fe/S-Cluster effizient übertragen werden. Das Grx1/GSH-Reduktionssystem reduzierte die Disulfidbrücken wieder zu Thiolen, wodurch ein effizienter Transfer beobachtet werden konnte. In Gegenwart von Grx1/GSH zeigten die Geschwindigkeiten von Transferreaktionen von [2Fe-2S]-Clustern eine interessante Abhängigkeit von Donor- und Akzeptorpaaren, so war der Transfer des mitochondrialen GLRX5 auf das mitochondriale FDX1, ein mögliches physiologisches Zielprotein, erheblich schneller als auf ein bakterielles Ferredoxin. Weiterhin konnte von den hier verwendeten ISC-Proteinen nur das Donorprotein GLRX5 effizient einen [2Fe-2S]-Cluster auf ein apo-Ferredoxin übertragen. Die ISC-Assemblierungsfaktoren ISCU2, ISCA1 und ISCA2 konnten dies nicht. Dies steht in Einklang mit *in vivo* Daten, nach denen die ISCA-Proteine nicht an der [2Fe-2S]-Clusterübertragung beteiligt sind (Sheftel *et al.*, 2012a). ISCU2 benötigt für die Übertragung eines Fe/S-Clusters ein Chaperonsystem (Ciesielski *et al.*, 2012; Majewska *et al.*, 2013). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein ISC-Assemblierungsfaktor mit einer Funktion als Fe/S-Clusterdonor auf ein oder mehrere Apozielproteine spezifisch adaptiert ist und diese rasch bedient, während der Transfer auf andere Apozeleproteine viel langsamer ist.

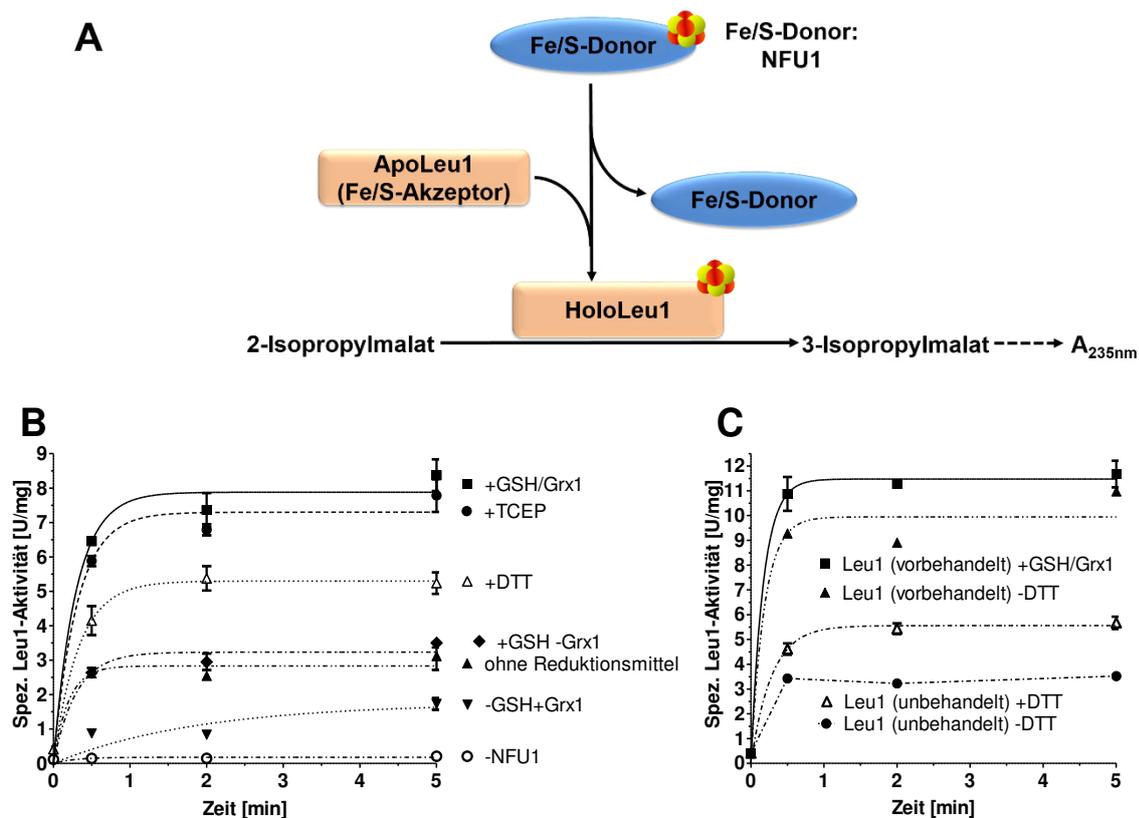
### 3.1.3 NFU1 transferiert ohne artifizielle Reduktionsmittel einen [4Fe-4S]-Cluster auf [4Fe-4S]-Zielproteine

Mit dem hier entwickelten Fe/S-Clustertransfersystem konnte *in vitro* im eukaryotischen System der Transfer eines [2Fe-2S]-Clusters auf einen natürlichen Apoakzeptor unter physiologisch relevanten Bedingungen charakterisiert werden (Ergebnisse, Kapitel 3.1.2, Seite 28). Der [4Fe-4S]-Clustertransfer ist im eukaryotischen System hingegen noch völlig unklar, vor allem deshalb, weil eine Reihe weiterer ISC-Faktoren an diesem Schritt beteiligt sind (Einleitung, Abbildung 5, Seite 8). An Hand der Erkenntnisse über den Transfer von [2Fe-2S]-Clustern (Ergebnisse, Kapitel 3.1.2, Seite 28) wurde nachfolgend versucht, die Synthese und Übertragung eines [4Fe-4S]-Clusters *in vitro* nachzustellen. Zunächst wurde der Transfer von einem einfachen [4Fe-4S]-Donor auf ein einfaches apo-[4Fe-4S]-Akzeptorprotein (ACO2, Leu1) untersucht (Abbildung 20). Als Donor wurde chemisch rekonstituiertes NFU1 (Abbildung 19) verwendet, da dessen Fehlen in *S. cerevisiae* mit einem milden Defekt der mitochondrialen Aconitase einhergeht (Navarro-Sastre *et al.*, 2011).



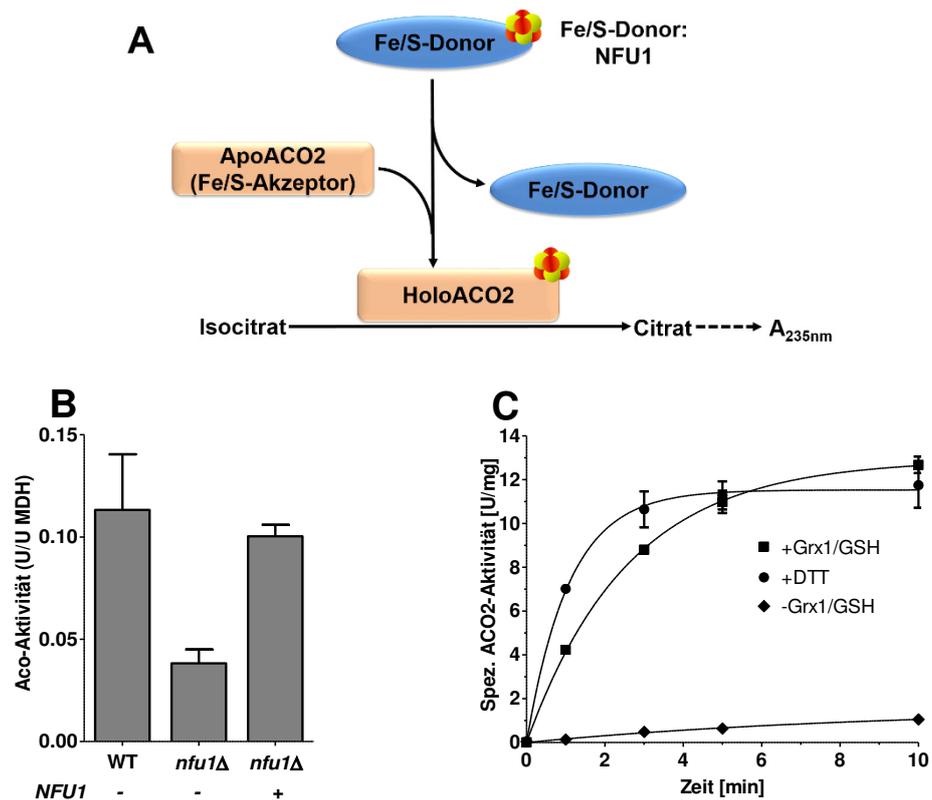
**Abbildung 19: Auf NFU1 kann chemisch ein [4Fe-4S] Cluster rekonstituiert werden.** Bei 80 K aufgenommenes Null-Feld Mößbauerspektrum von 300  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{57}$  rekonstituiertem NFU1 (schwarz —). Die beiden grau gestrichelten Linien repräsentieren zwei Lorentzspektren für [2Fe-2S] Cluster (dunkelgrau ●●) und [4Fe-4S] Cluster (hellgrau –). Mit einer molaren Stöchiometrie von 1:4 ([2Fe-2S]:[4Fe-4S]) konnten die simulierten Spektren für den [2Fe-2S]-Cluster und den [4Fe-4S]-Cluster angepasst werden. Diese Daten wurden bereits in Freibert *et al* 2018 publiziert.

Als [4Fe-4S]-Akzeptoren wurden die humane mitochondriale Aconitase (ACO2) (Abbildung 21) und das zytosolische Leu1 aus *S. cerevisiae* verwendet (Abbildung 20), das auch als [4Fe-4S]-Protein in den Mitochondrien maturiert werden kann (Lange *et al.*, 2000). Die Enzymaktivitäten beider Proteine (ACO2, Leu1) können einfach verfolgt werden. Für die Messung der holo-Aconitaseaktivität wurde die Absorptionsänderung von *cis*-Isocitrat bei 235 nm verfolgt. HoloLeu1 katalysiert die Umwandlung von 2-Isopropylmalat zu 3-Isopropylmalat (Abbildung 20A). Diese Isomerisierung kann ebenfalls bei 235 nm verfolgt werden. Auch im [4Fe-4S]-Transfersystem wurde ein Verhältnis von Fe/S-Donor (holoNFU1) zu Akzeptor (apoACO2, apoLeu1) von 2:1 (50  $\mu$ M : 25  $\mu$ M) gewählt.



**Abbildung 20: Grx1/GSH reduziert das [4Fe-4S]-Zielprotein Leu1 und ermöglicht einen [4Fe-4S]-Clustertransfer von NFU1 auf apoLeu1. (A)** Der enzymatische Nachweis der gebildeten Menge des holoLeu1 (orange) basiert auf der Bildung von 3-Isopropylmalat. Als [4Fe-4S]-Clusterdonor (blau) wurde chemisch rekonstituiertes NFU1 eingesetzt (Anhang, Abbildung 60, Seite 135). Für die Transferreaktion wurden 25  $\mu$ M apoLeu1 entweder **(B)** unbehandelt oder **(C)** nach vorheriger Behandlung mit 10 mM TCEP und 100 mM KCN eingesetzt (vorbehandelt). **(B)** Der Fe/S-Clustertransfer von chemisch rekonstituiertem NFU1 (50  $\mu$ M) auf 25  $\mu$ M apo Leu1 in Gegenwart der folgenden Komponenten: 25  $\mu$ M Grx1/ 4 mM GSH (■), 4 mM TCEP (●), 2 mM DTT (Δ), 4 mM GSH (◆), ohne Reduktionsmittel (▲), 25  $\mu$ M Grx1 (▼) und ohne NFU1 (○). **(C)** Für den Fe/S-Clustertransfer wurde vorbehandeltes apoLeu1 (25  $\mu$ M) mit holoNFU1 (50  $\mu$ M) in Gegenwart (■) oder Abwesenheit (▲) von 25  $\mu$ M Grx1/ 4 mM GSH versetzt und der Transfer über einen Zeitraum von 5 Minuten verfolgt. Zum besseren Vergleich der Transferreaktion wurden 25  $\mu$ M unbehandeltes Leu1 in Gegenwart (Δ) oder Abwesenheit (●) von 2 mM DTT mit 50  $\mu$ M chemisch rekonstituiertem NFU1 versetzt. Fehlerbalken zeigen n = 2 unabhängige Messungen an. Die erhaltenen Daten wurden mit GraphPad Prism5 nach einer Reaktion pseudo-1. Ordnung gefittet. Die Fe/S-Clustertransfermessungen wurden in 14all-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl) durchgeführt.

In Gegenwart von DTT konnte der auf NFU1 gebundene Fe/S-Cluster auf Leu1 innerhalb von 5 min nahezu vollständig transferiert werden (Abbildung 20B). In Abwesenheit von DTT wurde eine initiale schnelle Reaktion niedriger Amplitude beobachtet, die nach ~1 min im Wesentlichen beendet war. Wurde DTT durch Grx1/GSH ersetzt, war die Reaktion auch nach ~1 min beendet, die gebildete Menge an aktiven holoLeu1 war allerdings doppelt so hoch wie in der DTT-unterstützten Reaktion (Abbildung 20B). Ein vergleichbares Ergebnis wurde für den Fe/S-Clustertransfer in Gegenwart von TCEP beobachtet. Wurde Leu1 vor der Messung anaerob mit 10 mM TCEP und 100 mM KCN vorbehandelt und die Reagenzien mittels Dialyse unter anaeroben Bedingungen entfernt, wurde eine noch schnellere Reaktion beobachtet (Abbildung 20C). Dies zeigt wieder, dass auch im [4Fe-4S]-Transfer thioispezifische Reduktionsmittel eine Funktion in der Reduktion des Fe/S-Akzeptors wahrnehmen, obwohl die Proteine bereits während der Aufreinigung mit TCEP und KCN behandelt wurden. Bei vorbehandelten apoLeu1 war keine qualitative Änderung durch die Zugabe von Grx1/GSH zu beobachten (Abbildung 20C), was daran liegt, dass das Protein nach erneuter Reduktion vollständig von Disulfidbrücken befreit wurde. Grx1/GSH reduzierte wie bereits in Kapitel 3.1.1 (Seite 26) beobachtet nur Disulfidbrücken und hat bei einem bereits vollständig reduzierten Protein keinen Einfluss auf den Transfer. Um ein homologes System aus Fe/S-Clusterdonor und -akzeptor aus dem gleichen Organismus zu studieren wurde die humane ACO2 als [4Fe-4S]-Akzeptor verwendet (Abbildung 21). In *S. cerevisiae* führt die Deletion von NFU1 zu einem ca. 50% Aktivitätsverlust der Aconitase (Abbildung 21B), was darauf schließen lässt, dass Nfu1 einen Fe/S-Cluster auf die Aconitase übertragen könnte und als Hilfsprotein bei der Fe/S-Clusterübertragung mitwirkt (Uzarska *et al.*, 2016). *In vitro* konnte im homologen System mit humanem NFU1 als Fe/S-Donor ein effizienter Fe/S-Clustertransfer auf apoACO2 beobachtet werden (Abbildung 21C). Allerdings war die Geschwindigkeit in Gegenwart von Grx1/GSH nicht viel schneller als in Gegenwart von DTT, was die Frage offen lässt, ob NFU1 eine direkte Rolle bei der Maturierung eines [4Fe-4S]-Proteins spielt oder nur eine Funktion als Hilfsprotein wahrnimmt. Hinzu kommt, dass die erhaltene Geschwindigkeitskonstante des Fe/S-Transfers von NFU1 auf die mitochondriale ACO2 ( $k_{\text{obs}} = 257 (\pm 12) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) fast zehnmals langsamer war als die Geschwindigkeitskonstante des Fe/S-Transfer von NFU1 auf das zytosolische Leu1 ( $k_{\text{obs}} = 2300 (\pm 500) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), obwohl NFU1 bei der Insertion eines [4Fe-4S]-Clusters auf mitochondrial exprimiertes Leu1 keine Rolle spielt (Anhang, Abbildung 61, Seite 136).



**Abbildung 21: [4Fe-4S]-Clustertransfer von NFU1 auf mitochondriale ACO2.** (A) Der enzymatische Nachweis der gebildeten Menge der holoACO2 (orange) basiert auf der Absorptionsänderung von *cis*-Isocitrat. Als [4Fe-4S]-Clusterdonor (blau) wurde chemisch rekonstituiertes NFU1 eingesetzt. (B) Aconitaseaktivität des Zellextraktes von W303-1A Wildtyp (WT) und *nfu1Δ*-Zellen. *nfu1Δ*-Hefezellen wurden entweder mit einem Leervektor (ohne Gen) oder mit einem *NFU1*-Plasmid transformiert. Hefezellen wurden in Minimalmedium mit 2% Galactose kultiviert. Enzymaktivitäten der Aconitase wurden auf die Enzymaktivitäten der Malatdehydrogenase normalisiert. Fehlerbalken geben die Standardabweichung SD ( $n = 4$ ) wieder. (C) Zeitlicher Verlauf des Fe/S-Clustertransfer von chemisch rekonstituiertem humanen NFU1 (50  $\mu$ M) auf apoACO2 (25  $\mu$ M) in Gegenwart von 25  $\mu$ M Grx1/ 4 mM GSH (■), DTT (●) oder ohne Reduktionsmittel (◆). Die Reaktion wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten verfolgt. Fehlerbalken zeigen  $n = 2$  unabhängige Messungen an. Die erhaltenen Daten wurden mit GraphPad Prism5 nach einer Reaktion pseudo-1. Ordnung gefittet. Die Messungen wurden in 14all-Puffer (Abbildung 20) durchgeführt.

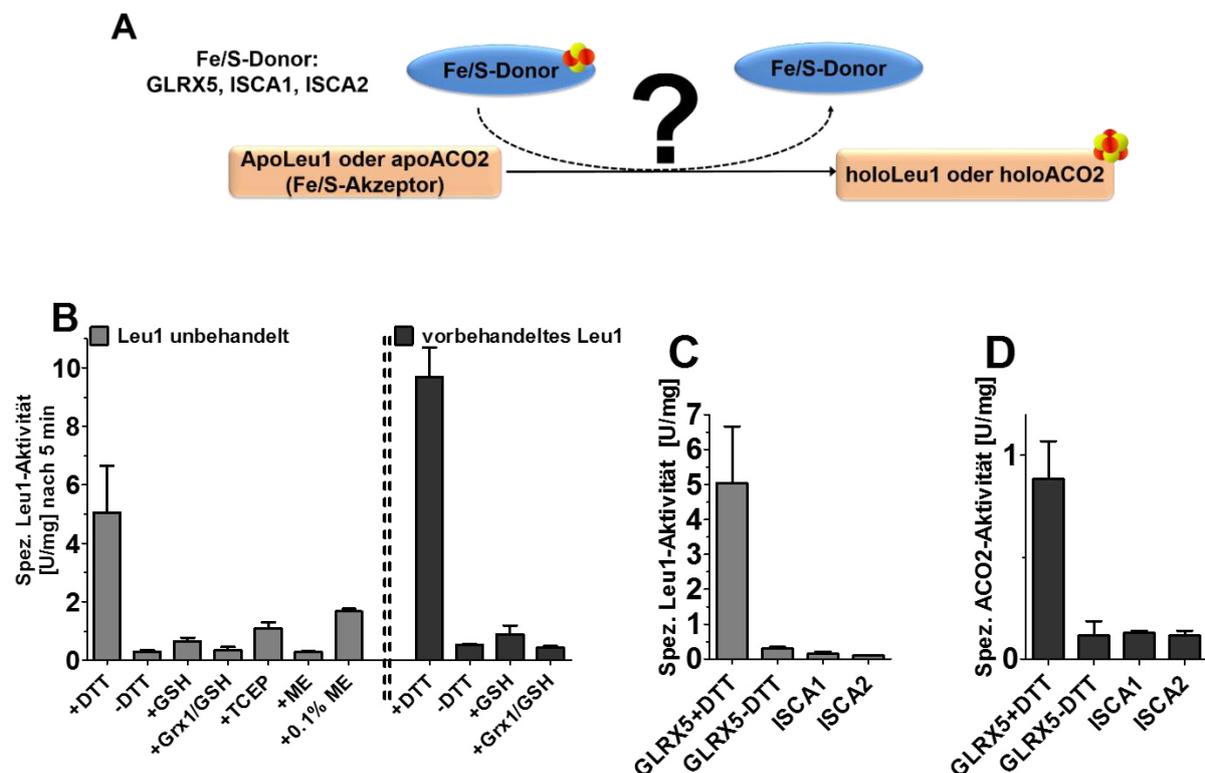
Zusammenfassend konnte auch für einen [4Fe-4S]-Clustertransfer gezeigt werden, dass die Reduktion des Akzeptorproteins essentiell für einen effizienten Fe/S-Clustertransfer ist. Das Dithiol-Reduktionssystem Grx1/GSH konnte apo-[4Fe-4S]-Proteine reduzieren und das artifizielle DTT *in vitro* ersetzen. Vergleichbar zu apoLeu1, wurde apoACO2 nur in Gegenwart von Reduktionsmitteln effizient von holoNFU1 maturiert. Allerdings konnte die Anwesenheit von Grx1/GSH die Maturierung von ACO2 im Vergleich zu DTT nicht signifikant verbessern. Die für ACO2 erhaltene Geschwindigkeitskonstante ( $k_{obs} = 257 (\pm 12) M^{-1}s^{-1}$ ) im ACO2-Transfersystem war zudem zehnfach langsamer als die des nicht-physiologischen Akzeptors Leu1 ( $k_{obs} = 2300 (\pm 500) M^{-1}s^{-1}$ ), der *in vivo* auch dann nicht NFU1 abhängig maturiert wird, wenn er künstlich in Mitochondrien exprimiert wird (Anhang, Abbildung 61, Seite 136). Dies könnte darauf hindeuten, dass NFU1 nicht direkt als Fe/S-Clusterdonor für mitochondriale

[4Fe-4S]-Proteine fungiert. Eine weitere Möglichkeit wäre auch, dass noch weitere ISC-Komponenten fehlen, die den Fe/S-Clustertransfer von NFU1 auf die ACO2 unterstützen. Diese Frage lässt sich im Moment nicht beantworten.

### 3.1.4 GSH katalysiert nicht die reduktive Kopplung von [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Clustern zu [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Clustern

In der bisherigen Literatur existiert eine Vielzahl von *in vitro* Fe/S-Transfersystemen, die von einem [2Fe-2S]-Donor ausgehend einen Transfer auf ein [4Fe-4S]-Zielprotein postulieren. Hierbei wurde ausschließlich in Gegenwart des artifiziellen Reduktionsmittels DTT gearbeitet (Banci *et al.*, 2014; Brancaccio *et al.*, 2014). Nachfolgend wird daher der Transfer eines [2Fe-2S]-Donors auf [4Fe-4S]-Akzeptoren unter Ausschluss von DTT aber in Gegenwart des natürlichen Grx1/GSH-Reduktionssystems charakterisiert (Abbildung 22). Zunächst wurde untersucht, ob GLRX5 als [2Fe-2S]-Donor in Gegenwart des physiologischen Dithiol-Reduktionssystems Grx1/GSH die Maturierung von Zielproteinen mit [4Fe-4S]-Clustern (ACO2, Leu1) unterstützen kann (Abbildung 22). In Gegenwart von DTT können sowohl ein Transfer als auch eine Konversion des [2Fe-2S]-Clusters auf GLRX5 zu einem [4Fe-4S]-Cluster auf Leu1 beobachtet werden (Abbildung 22B). Bei unmittelbar vor der Reaktion mit TCEP und KCN vorbehandeltem Leu1 zeigte sich sogar eine noch höhere Transfergeschwindigkeit (Abbildung 22B). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei einem DTT-vermittelten [2Fe-2S]-Clustertransfer von GLRX5 auf die humane ACO2 (Abbildung 22D). Ohne DTT hingegen lief nur eine geringe Hintergrundreaktion ab. Auch in Gegenwart der thioispezifischen Reduktionsmittel TCEP oder  $\beta$ -Mercaptoethanol (ME) konnte kein Transfer eines [2Fe-2S]-Clusters auf [4Fe-4S]-Zielproteine beobachtet werden. Mit TCEP und KCN vorbehandeltes Leu1 konnte abgesehen von DTT mit keinem der verwendeten Reduktionsmittel zu einem aktiven Akzeptor des GLRX5-Clusters konvertiert werden. Auch das *in vivo* vorkommende Grx1/GSH System, welches im [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Transfersystem DTT ersetzt, konnte keinen Fe/S-Transfer ausgehend von GLRX5 auf Leu1 oder ACO2 vermitteln (Abbildung 22C/D). Dies bedeutet, dass DTT in dieser Reaktion *in vitro* eine zusätzliche Funktion ausübt, die über die reine Reduktion der Thiolgruppen des Akzeptorproteins hinausgeht. Ein oxidiertes [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Cluster besteht formell aus 2 Fe<sup>3+</sup>- und 2 S<sup>2-</sup>-Ionen. Der [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster hingegen aus 2 Fe<sup>2+</sup>-, 2 Fe<sup>3+</sup>- und 4 S<sup>2-</sup>-Ionen. Für die Umwandlung von zwei oxidierten [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Clustern zu einem [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster werden also zwei Elektronen benötigt. Diese sogenannte „reduktive Kopplung“ eines [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Clusters in einen [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster kann *in vitro* in Gegenwart von DTT offensichtlich ablaufen. Sie wird aber nicht durch Glutathion oder andere artifizielle thioispezifische Reduktionsmittel unterstützt. Aus *in vivo* Studien ist bekannt, dass sowohl die A-Typ-ISC-Proteine ISCA1 und ISCA2 als auch IBA57 essentiell für die Konversion von [2Fe-2S]-Clustern zu [4Fe-4S]-

Clustern sind (Gelling *et al.*, 2008; Mühlenhoff *et al.*, 2007; Mühlenhoff *et al.*, 2011; Sheftel *et al.*, 2012a). In *isa/iba57Δ*-Hefezellen und depletierten humanen Zellen ist die Assemblierung eines [4Fe-4S]-Clusters gehemmt ist, wodurch Defekte auf beispielsweise der mitochondrialen Aconitase, Liponsäuresynthase oder den Komplexen I/II der Atmungskette auftreten (Mühlenhoff *et al.*, 2011; Sheftel *et al.*, 2012a). Auch ein Verlust von mitochondrialer DNA, oder morphologische Veränderungen wie der Verlust der Cristae oder eine Erweiterung der Organellen konnte in humanen Zellen beobachtet werden (Sheftel *et al.*, 2012a). Bakterielle Homologe der A-Typ-ISC-Proteine können mit einem [2Fe-2S]-Cluster isoliert oder rekonstituiert werden (Wollenberg *et al.*, 2003). Auf Grund der Erkenntnisse aus dem bakteriellen System (Morimoto *et al.*, 2006; Py und Barras, 2010), wurden mit einem Fe/S-Cluster chemisch rekonstituierte A-Typ-ISC-Proteine (Anhang, Abbildung 62A/B, Seite 136) ebenfalls in Gegenwart von Grx1/GSH *in vitro* zur Maturierung von Leu1 und ACO2 eingesetzt (Abbildung 22C/D).



**Abbildung 22: Grx1/GSH unterstützt nicht die Konversion und den Transfer eines [2Fe-2S]-Clusters auf einen [4Fe-4S]-Akzeptor.** (A) Inkubation eines [2Fe-2S]-Clusterdonors (blau) mit entweder apoLeu1 oder apoACO2 (orange). Der enzymatische Nachweis der holoLeu1- bzw. holoACO2-Bildung wurde analog zu Abbildung 20/ Abbildung 21 untersucht. (B) Aktivierung von unbehandeltem Leu1 (hellgraue Balken) oder mit TCEP/KCN vorbehandeltem Leu1 (dunkelgraue Balken) (25  $\mu$ M) durch 50  $\mu$ M chemisch rekonstituiertes holoGLRX5 in Gegenwart von 2 mM DTT, ohne Reduktionsmittel (-DTT), 4 mM GSH, 25  $\mu$ M Grx1/ 4 mM GSH, 4 mM TCEP, 4 mM ME und 0,1% ME. (C/D) Fe/S-Clustertransfer von 50  $\mu$ M chemisch rekonstituiertem GLRX5 in Gegenwart von 2 mM DTT oder Abwesenheit von Reduktionsmitteln (-DTT), 50  $\mu$ M ISCA1 oder 50  $\mu$ M ISCA2 auf (C) 25  $\mu$ M Leu1 oder (D) 25  $\mu$ M ACO2 in Gegenwart von 25  $\mu$ M Grx1 und 4 mM GSH. Fehlerbalken zeigen n = 2 unabhängige Messungen an. Fe/S-Cluster Transfermessungen wurden in 14all-Puffer für 5 min durchgeführt.

Sowohl ISCA1 als auch ISCA2 können den rekonstituierten Fe/S-Cluster nicht auf Leu1 (Abbildung 22C) bzw. ACO2 (Abbildung 22D) übertragen, was darauf hindeutet, dass diese ISC-Proteine weitere Hilfsproteine für eine Konversion zu einem [4Fe-4S]-Cluster benötigen. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass verschiedene [2Fe-2S]-Cluster tragende Proteine unter physiologischen Bedingungen in Gegenwart von Grx1/GSH ihren Fe/S-Cluster nicht ohne weiteres spontan auf ein [4Fe-4S]-Zielprotein übertragen können. Neben dem Transfer des Fe/S-Clusters ist hierzu eine reduktive Kopplung von zwei [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Clustern in einen [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster nötig. Diese kann *in vitro* in Gegenwart von DTT ablaufen. Sie wird aber nicht durch Glutathion oder andere artifizielle thiol-spezifische Reduktionsmittel unterstützt. Es stellt sich daher die Frage, welche Moleküle diese Rolle in der Zelle ausüben.

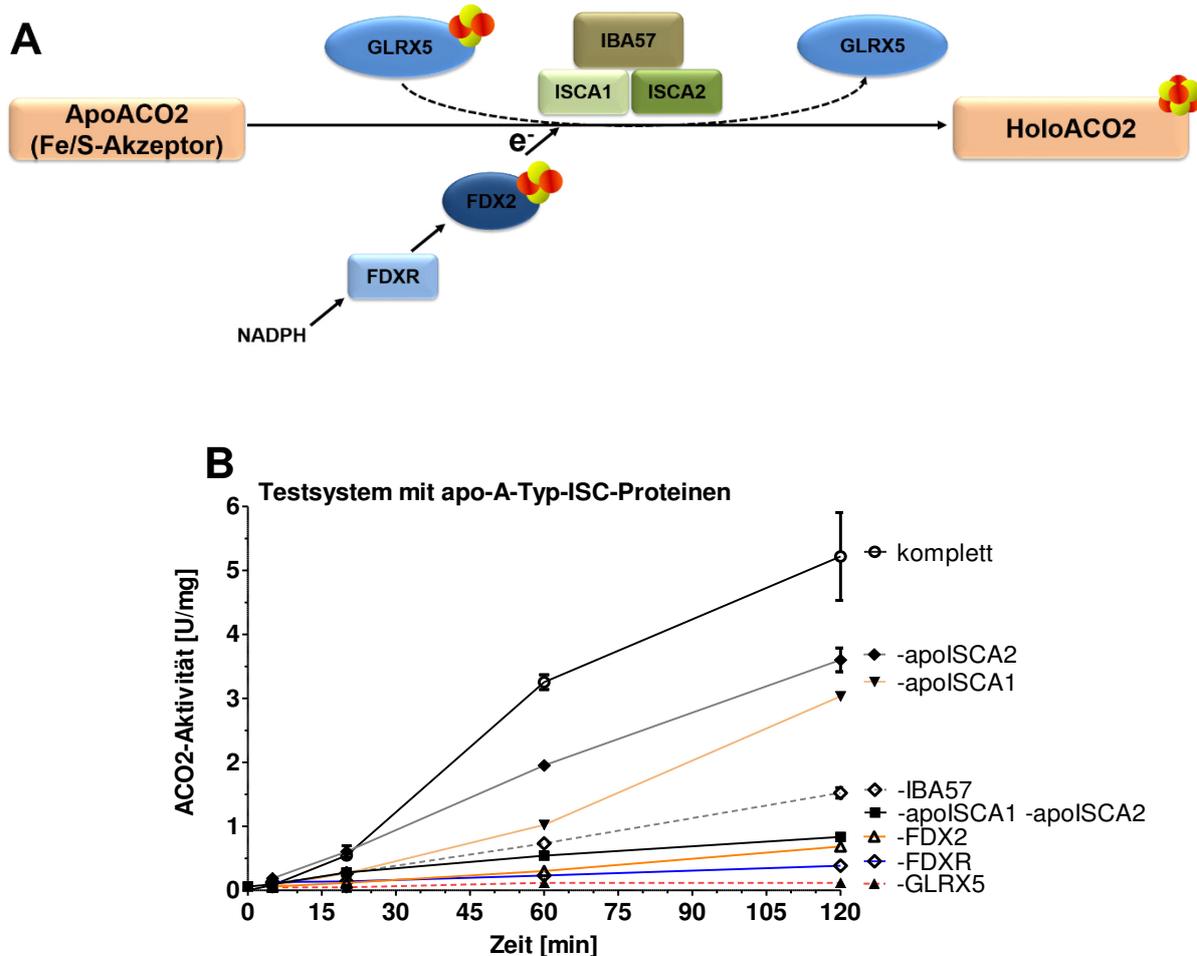
### 3.1.5 Die Elektronentransportkette, IBA57 und die A-Typ-ISC-Proteine spielen *in vitro* eine essentielle Rolle bei der Fe/S-Clusterkonversion

Abschließend wurde auf Basis der bisherigen Experimente die Synthese eines [4Fe-4S]-Clusters charakterisiert. Aus *in vivo* Studien ist bekannt, dass sowohl die A-Typ-ISC-Proteine ISCA1/ISCA2 als auch IBA57 essentiell für die Konversion eines [2Fe-2S]-Clusters zu einem [4Fe-4S]-Cluster sind (Gelling *et al.*, 2008; Mühlenhoff *et al.*, 2007; Mühlenhoff *et al.*, 2011; Sheftel *et al.*, 2012b). Außerdem wird aus *in vitro* Fe/S-Cluster Transferversuchen vermutet, dass GLRX5 nicht nur eine Fe/S-Cluster übertragende Funktion für [2Fe-2S]-Cluster besitzt, sondern auch eine Rolle als Fe/S-Donor für [4Fe-4S]-Proteine spielen könnte (Brancaccio *et al.*, 2014). Allerdings wurden diese Transfersysteme ausschließlich in Gegenwart des artifiziellen Reduktionsmittels DTT und in Abwesenheit der *in vivo* essentiellen ISC-Komponenten IBA57 durchgeführt (Brancaccio *et al.*, 2014).

Auf Basis der bisherigen Erkenntnisse wurde nun versucht, *in vitro* den Transfer und die Konversion von [2Fe-2S]-Clustern in einen [4Fe-4S]-Cluster auf einem Apozielprotein mit den *in vivo* essentiellen A-Typ-ISC-Proteinen (ISCA1/ISCA2) und IBA57 nachzustellen. Hierfür wurde ein homologes Fe/S-Transfersystem aus ausschließlich humanen Komponenten mit holoGLRX5 als [2Fe-2S]-Donor und ACO2 als [4Fe-4S]-Akzeptor verwendet. Um eine Fe/S-Clusterkonversion zu verfolgen, wurde das auf der Bildung von holoACO2 basierende Transfersystem verwendet (Ergebnisse, Kapitel 3.1.3, Seite 33). Auch wenn das Dithiol-Reduktionssystem Grx1/GSH keine Rolle bei der reduktiven Kopplung von [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Clustern in [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster spielte (Ergebnisse, Kapitel 3.1.4, Seite 37), wurde zusätzlich Grx1/GSH verwendet, um die Reduktion von Polysulfanen bzw. Disulfidbrücken auf dem Akzeptorprotein zu gewährleisten.

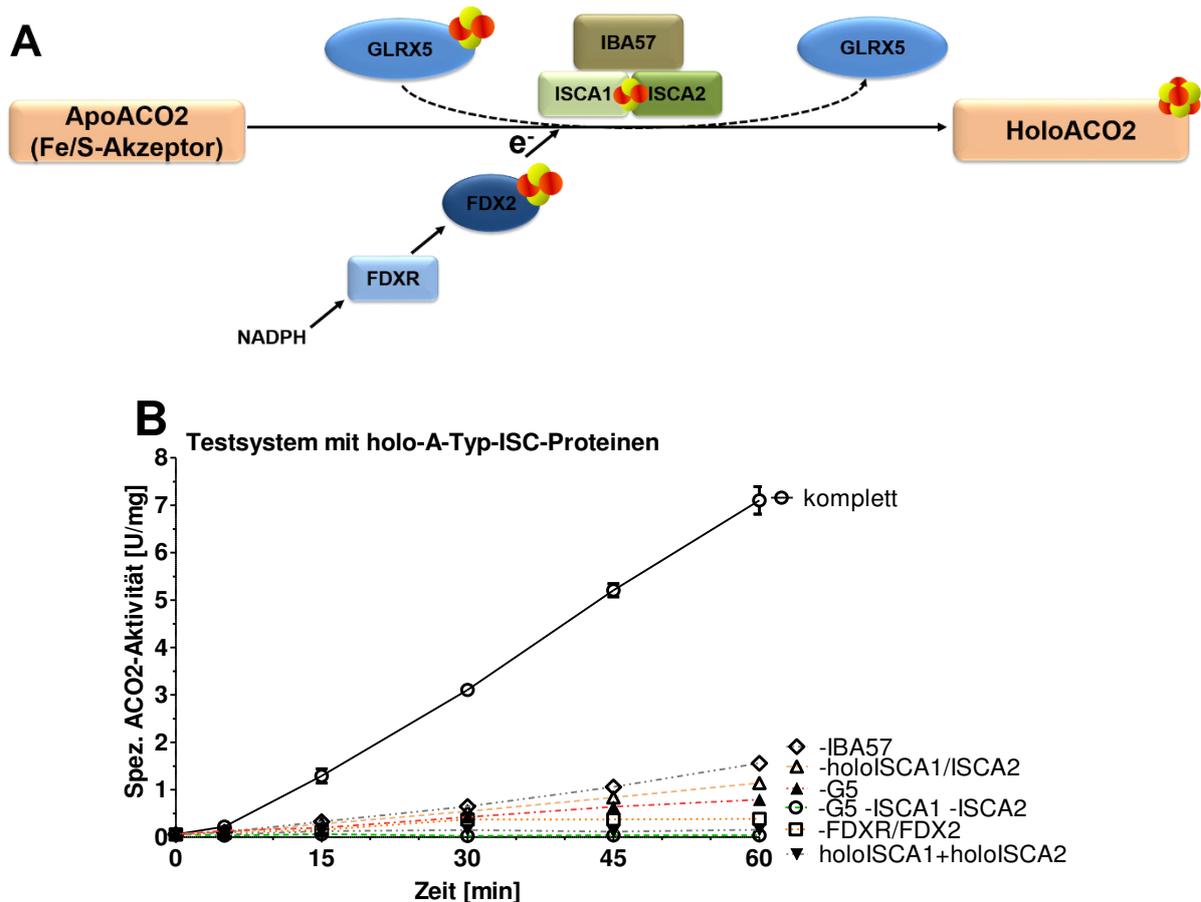
Für die Umwandlung von zwei oxidierten [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Clustern zu einem [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster werden Elektronen benötigt, da ein oxidiertes [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Cluster formal aus 2 Fe<sup>3+</sup>- und 2 S<sup>2-</sup>-

Ionen besteht. Der  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster hingegen aus 2  $\text{Fe}^{2+}$ -, 2  $\text{Fe}^{3+}$ - und 4  $\text{S}^{2-}$ -Ionen. Die Elektronen könnten für die Reduktion des  $\text{Fe}^{3+}$ -Ions zu  $\text{Fe}^{2+}$ -Ion benötigt werden. Für die Bereitstellung der Elektronen wurde daher dem Transfersystem die Elektronentransferkette bestehend aus Ferredoxin (FDX2), der Ferredoxinreduktase (FDXR) und NADPH zugesetzt, für die bereits eine elektronenliefernde Funktion im frühen Schritt der Fe/S-Proteinbiogenese bekannt ist (Einleitung, Kapitel 1.4, Seite 6). Aus *in vivo* Studien in Hefe ist bekannt, dass die A-Typ-ISC-Proteine ihre Funktion wahrscheinlich im heterodimeren Isa1/Isa2-Komplex wahrnehmen (Mühlenhoff *et al.*, 2011). Aus diesem Grund wurden die humanen A-Typ-ISC-Proteine ISCA1 und ISCA2 zusammen vorinkubiert, um die Bildung eines heterodimeren ISCA1/ISCA2-Komplexes zu unterstützen. Als  $[2\text{Fe-2S}]$ -Clusterdonor wurde wieder chemisch rekonstituiertes GLRX5 verwendet. Dieses wurde zusammen mit vorinkubiertem apo-ISCA1/ISCA2, IBA57, der Elektronentransferkette (FDX2/FDXR/NADPH) und apoACO2 gemischt und die Aconitaseaktivität über eine Zeit von 2 Stunden verfolgt (Abbildung 23). In der Tat ließ sich ACO2 in dieser Mischung reaktivieren. Die Reaktion war zwar sehr langsam, erreichte aber nach 2 Stunden eine Aktivität von 5 U/mg (Abbildung 23). Offensichtlich sind in dieser Mischung alle Komponenten vorhanden, die eine reduktive Kopplung von  $[2\text{Fe-2S}]$ -Clustern zu  $[4\text{Fe-4S}]$ -Clustern ohne artifizielle Zusatzstoffe bewerkstelligen. Es ist naheliegend, dass die Elektronen für diese reduktive Kopplung durch die Elektronentransferkette FDX2/FDXR/NADPH bereitgestellt werden. In der Tat wurde fast keine Aktivierung von ACO2 beobachtet, sobald eine Komponente der Elektronentransferkette, FDX2 oder FDXR fehlte. Dies beweist, dass diese Elektronentransferkette die Elektronen für die reduktive Kopplung unter diesen experimentellen Bedingungen bereitstellt. Der Ursprung des  $[4\text{Fe-4S}]$ -Clusters auf ACO2 war der  $[2\text{Fe-2S}]$ -Cluster auf GLRX5, da die Reaktion in Abwesenheit von GLRX5 zusammenbrach (Abbildung 23). IBA57 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle, da die Rate der Aktivierung von ACO2 in Abwesenheit von IBA57 stark herabgesetzt war. Die essentielle Rolle von ISCA1 und ISCA2 konnte in diesem Testsystem jedoch nicht nachgestellt werden, da zwar in Abwesenheit von apoISCA1 oder apoISCA2 die Aktivierung von ACO2 verlangsamt war, allerdings war sie immer noch deutlich messbar. *In vivo* müssen allerdings alle drei Proteine ISCA1/ISCA2 und IBA57 für die Bildung eines  $[4\text{Fe-4S}]$ -Clusters auf der Aconitase zusammen vorliegen (Mühlenhoff *et al.*, 2011; Sheftel *et al.*, 2012b). Dies spiegelt sich in diesem Versuchsaufbau nicht vollständig wieder. Dies und die im Vergleich zu den bisherigen Ergebnissen (Kapitel 3.1.2/3.1.3, Seite 28) geringe Geschwindigkeit von über zwei Stunden, lassen daher vermuten, dass einzelne Komponenten (z.B. apo-ISCA1/ISCA2) nicht korrekt arbeiten.



**Abbildung 23:** Die apo-A-Typ-ISC-Proteine ISCA1/ISCA2 sind *in vitro* für einen Fe/S-Clustertransfer auf die Aconitase nicht essentiell. **(A)** Schematische Darstellung der Konversion eines [2Fe-2S]-Clusters zu einem [4Fe-4S]-Cluster in Gegenwart der dargestellten ISC-Proteine. Chemisch rekonstituiertes GLRX5 wurde mit IBA57, apoISCA1/ISCA2 und einer Elektronentransferkette (FDX2/FDXR/NADPH) zusammen mit apoACO2 inkubiert. **(B)** Zeitlicher Verlauf der Aktivierung von apoACO2 (25  $\mu$ M) durch chemisch rekonstituiertes GLRX5 (50  $\mu$ M) in Gegenwart von 5  $\mu$ M apo-ISCA1/ISCA2, 5  $\mu$ M IBA57, 1  $\mu$ M FDX2/FDXR und 1 mM NADPH (komplett) (○), komplett ohne IBA57 (◇), komplett ohne apoISCA1 (▼), komplett ohne apoISCA2 (◆), komplett ohne apoISCA1/ISCA2 (■), komplett ohne GLRX5 (▲) und komplett ohne FDXR (△) in Gegenwart von 25  $\mu$ M Grx1 und 4 mM GSH. Fehlerbalken zeigen n = 2 unabhängige Messungen an. Fe/S-Clustertransfermessungen wurden für die angegebenen Zeiten in 14all- Puffer durchgeführt.

Sowohl für die humanen A-Typ-ISC-Proteine (Banci *et al.*, 2014) als auch in Studien mit den bakteriellen IscA-Homologen konnte *in vitro* die Bildung eines Fe/S-Clusters auf den A-Typ-ISC-Proteinen beobachtet werden (Gupta *et al.*, 2009; Mapolelo *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010). ISCA1 und ISCA2 wurden daher als chemisch korekonstituierte Holoenzyme zusammen mit IBA57 und der Elektronentransferkette FDX2/FDXR/NADPH zur Aktivierung von apoACO2 eingesetzt (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Die holo-A-Typ-ISC-Proteine ISCA1/ISCA2, IBA57 und die Elektronentransferkette FDX2/FDXR/NADPH sind *in vitro* für einen Fe/S-Clustertransfer auf die Aconitase essentiell. (A)** Schematische Darstellung der Konversion eines [2Fe-2S]-Clusters zu einem [4Fe-4S]-Cluster in Gegenwart der dargestellten ISC-Proteine. Chemisch rekonstituiertes GLRX5 wurde mit IBA57, holo-ISCA1/ISCA2 und einer Elektronentransferkette (FDX2/FDXR/NADPH) zusammen mit apoACO2 inkubiert. **(B)** Zeitlicher Verlauf der Aktivierung von 25  $\mu$ M apoACO2 durch 50  $\mu$ M chemisch rekonstituiertes GLRX5 in Gegenwart von 5  $\mu$ M chemisch korekonstituiertem holoISCA1/ISCA2, 5  $\mu$ M IBA57, 1  $\mu$ M FDX2/FDXR und 1 mM NADPH (komplett) (○), komplett ohne IBA57 (◇), komplett ohne korekonstituiertes holoISCA1/ISCA2 (△), komplett ohne GLRX5 (▲), komplett ohne FDXR/FDX2 (□), komplett ohne holoISCA1+holoISCA2 (▼) und komplett ohne GLRX5/ISCA1/ISCA2 (○) in Gegenwart von 25  $\mu$ M Grx1 und 4 mM GSH. HoloACO2-Aktivitäten wurde durch die Änderung der Absorption von *cis*-Isocitrat verfolgt. Fehlerbalken zeigen n = 2 unabhängige Messungen an. Fe/S-Clustertransfermessungen wurden für die angegebenen Zeiten in 14all- Puffer durchgeführt.

Tatsächlich war die Bildung eines [4Fe-4S]-Clusters auf der apoACO2 in Gegenwart der holo-A-Typ-ISC-Proteine wesentlich schneller als in Gegenwart von apoISCA1 und apoISCA2. Nach einer Stunde wurde eine ACO2-Aktivität von 7,5 U/mg erreicht. Dies war höher als nach zwei Stunden in Gegenwart von apoISCA1 und apoISCA2. In Abwesenheit von holoISCA1/ISCA2 sowie in Gegenwart der einzeln rekonstituierten A-Typ-ISC-Proteine (holoISCA1+holoISCA2) war kaum eine Aktivierung von ACO2-messbar. Diese Beobachtungen deuten drauf hin, dass die A-Typ-ISC-Proteine in ihrer Holoform vorliegen

müssen, um die Konversion von [2Fe-2S]-Clustern zu einem [4Fe-4S]-Cluster zu ermöglichen. In Abwesenheit von IBA57 oder FDX2/FDXR war wiederum kaum eine Aktivierung von ACO2 messbar, was zeigt, dass diese ISC-Komponenten in diesem *in vitro* System tatsächlich essentiell am Transfer und der Konversion eines Fe/S-Clusters beteiligt sind. Auch in Abwesenheit von GLRX5 fand keine Fe/S-Clusterkonversion mehr statt, was nahelegt, dass nicht der Fe/S-Cluster der holo-A-Typ-ISC-Proteine übertragen wurde, sondern GLRX5 als Fe/S-Donor fungierte.

Zusammenfassend war mit dem hier gezeigten experimentellen Aufbau eine klare Abhängigkeit der Maturierung von [4Fe-4S]-Proteinen von den ISC-Komponenten IBA57, ISCA1/ISCA2 in Gegenwart des natürlichen Reduktionssystems Grx1/GSH und ohne artifizielle Reduktionsmittel *in vitro* nachstellbar. Zum ersten Mal konnten somit *in vitro* Ergebnisse erzielt werden, die die aus *in vivo* Daten bekannten Bedingungen widerspiegeln. Hierbei fungierte holoGLRX5 als Fe/S-Donor und nicht ISCA1 oder ISCA2. Die *in vitro* Aktivierung der apoACO2 war darüber hinaus von einer funktionierenden Elektronentransferkette aus einem Ferredoxin (FDX2), einer Ferredoxinreduktase (FDXR) und NADPH abhängig. Dies zeigt, dass diese Elektronentransferkette *in vitro* die reduktive Kopplung von zwei oxidierten [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Clustern in einen [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster katalysieren kann. Ob dies *in vivo* ebenfalls der Fall ist, muss offen bleiben, da das Fehlen von FDX2 zu einem Zusammenbruch der Funktion der frühen ISC-Maschine führt, und daher eine weitere Rolle für FDX2 in der späten Phase der Maturierung mitochondrialer Proteine *in vivo* nicht untersucht werden kann. Die Geschwindigkeit des *in vitro* Systems ist allerdings noch recht langsam, was nahe legt, dass möglicherweise noch weitere spezialisierte ISC-Assemblierungsfaktoren wie beispielsweise NFU1, die bei der Insertion eines [4Fe-4S]-Clusters in spezielle Zielproteine wie der Aconitase (ACO2) helfen, fehlen.

Zusammenfassend bildet das in dieser Arbeit in Gegenwart des physiologischen, thiol-spezifischen Grx1/GSH-Redoxsystems entwickelte Fe/S-Clustertransfersystem die zelluläre Situation *in vitro* wirklichkeitsgetreu nach und zeigt zum ersten Mal, dass physiologisch relevante Transferreaktionen auch *in vitro* schnell (innerhalb weniger Sekunden) ablaufen. Die hier erhaltene Erkenntnis über Spezifität und daraus resultierender Geschwindigkeit für einen Fe/S-Clustertransfer auf einen Akzeptor könnte für zukünftige Studien als Entscheidungskriterium dafür gelten, ob ein *in vitro* beobachteter Fe/S-Clustertransfer auch tatsächlich physiologische Relevanz hat.

### 3.2 Biophysikalische Charakterisierung des mitochondrialen monothiolen Glutaredoxin GLRX5 im Komplex mit BOLA-Proteinen

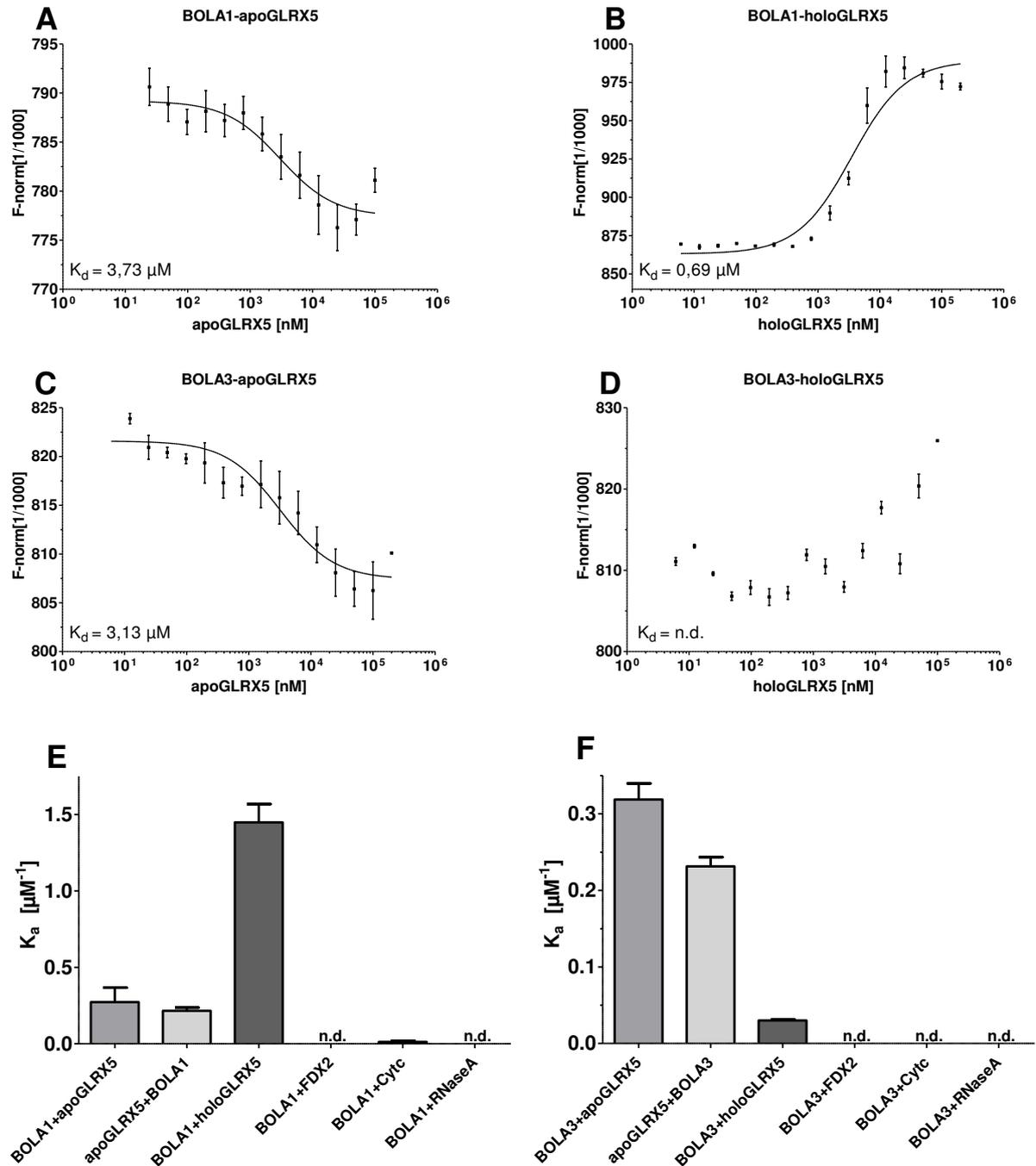
Die Biosynthese von Fe/S-Clustern benötigt die Funktion der mitochondrialen ISC-Assemblierungsmaschinerie (Einleitung, Kapitel 1.4, Seite 6). Während die Bildung eines [2Fe-2S]-Clusters untersucht ist (Agar *et al.*, 2000a; Kim *et al.*, 2013; Raulfs *et al.*, 2008; Yoon und Cowan, 2003), ist sowohl die Biogenese eines [4Fe-4S]-Clusters als auch die Fe/S-Clusterinsertion in entsprechende Apozielproteine wenig verstanden. *In vivo* Erkenntnisse und die *in vitro* Untersuchungen dieser Arbeit (Ergebnisse, Kapitel 3.1.5, Seite 39) legen allerdings nahe, dass an der Bildung mitochondrialer [4Fe-4S]-Cluster die A-Typ-ISC-Proteine ISCA1/ISCA2 und IBA57 beteiligt sind (Mühlenhoff *et al.*, 2007; Mühlenhoff *et al.*, 2011). Nach den gängigen Modellvorstellungen konvertieren die ISCA-IBA57 Proteine den auf GLRX5 transient gebundenen [2Fe-2S]-Cluster zu einem [4Fe-4S]-Cluster. Der molekulare Mechanismus ist jedoch bisher völlig unbekannt. Für die Insertion eines [4Fe-4S]-Clusters in Apozielproteine benötigen die ISCA-IBA57 Proteine spezialisierte Interaktionspartner, hierzu zählen beispielsweise NFU1 und IND1, die bei der Insertion eines transient gebundenen [4Fe-4S]-Clusters in spezielle Zielproteine wie der Aconitase (ACO2) oder dem Komplex I helfen. Zwei weitere Proteine, BOLA1 und BOLA3, der BOLA-Familie sind vermeintlich zusätzliche spezifische ISC-Proteine (Dlouhy *et al.*, 2016; Melber *et al.*, 2016; Uzarska *et al.*, 2016). Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, dass Patienten mit einem funktionellen Verlust von BOLA3 einen vergleichbares Phänotyp (MMDS2) wie Patienten mit Mutationen im *NFU1* Gen (MMDS1) aufweisen (Stehling *et al.*, 2014). Frühere Studien zeigten eine Interaktion und die Bildung eines stabilen Komplexes der BOLA-Proteine mit Glutaredoxinen (Li *et al.*, 2009). Auch bakterielle BOLA-Homologen können mit dem Glutaredoxin GrxD interagieren (Yeung *et al.*, 2011). Analysen *in vivo* haben gezeigt, dass *S. c.* Bol1 und *S. c.* Bol3 für die *de novo* Bildung von Fe/S-Clustern auf spezifischen mitochondrialen [4Fe-4S]-Proteinen, wie der Lipoatsynthase (LIAS) und Succinatdehydrogenase (SDH), aber nicht für [2Fe-2S]-Cluster Proteine wie Ferredoxin notwendig sind (Uzarska *et al.*, 2016). Beide Hefe Bol-Proteine haben *in vivo* überlappende Funktionen (Uzarska *et al.*, 2016), was die Bestimmung ihrer genauen Rolle zusätzlich erschwert. Hinzu kommt, dass auch *in vivo* der Nachweis eines eukaryotischen GLRX5-BOLA-Komplexes mittels Koimmunopräzipitation sich als schwierig herausstellte. Um ein genaueres biochemisches Verständnis über die Rolle der humanen BOLA-Proteine zu erhalten, wurden daher verschiedene *in vitro* Methoden verwendet. Die im nachfolgenden dargestellten Ergebnisse bilden zusammen mit den parallel durchgeführten *in vivo* Analysen an *S. cerevisiae* (Uzarska *et al.*, 2016) die biochemische Basis zur Erklärung der möglichen biologischen Funktion der BOLA-Proteine, was den BOLA3 Phänotyp von Patienten ohne funktionelle BOLA-Proteine zwanglos erklärt.

### 3.2.1 GLRX5-BOLA-Interaktionsstudien mittels MicroScale

#### Thermophorese

#### 3.2.1.1 Unterschiedliche *in vitro* Affinitäten der humanen BOLA-Proteine zum humanen Glutaredoxin GLRX5

Um die biochemische Rolle der BOLA-Proteine besser zu charakterisieren, wurden *in vitro* Experimente mit den humanen Homologen BOLA1 und BOLA3 durchgeführt. N-terminal His<sub>6</sub>-markierte BOLA-Proteine wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert (Methoden, Kapitel 7.10, Seite 126) und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie (Äkta-System, Säule Superdex 16/60 200) gereinigt (Anhang, Abbildung 64, Seite 137). Um die *in vitro* Interaktion der BOLA-Proteine mit potentiellen Interaktionspartnern, insbesondere Glutaredoxinen zu untersuchen, wurde die MicroScale Thermophorese (MST) verwendet (Abbildung 25). Hierbei handelt es sich um eine Gleichgewichtsmethode (Methoden, Kapitel 7.9.5, Seite 125), die auf der Diffusion von Molekülen entlang eines Temperaturgradienten, der durch einen Laserimpuls induziert wird, basiert. In dieser Methode zeigen Proteinkomplexe ein im Vergleich zu Einzelmolekülen verändertes Diffusionsverhalten. Ein fluoreszenzmarkiertes Protein (Anhang, Abbildung 63, Seite 137) mit konstanter Konzentration wird gegen ein weiteres nicht markiertes Protein mit verschiedenen Konzentrationen titriert (Methoden, Kapitel 7.9.5, Seite 126). In den nachfolgend dargestellten Experimenten wurden unterschiedliche Konzentrationen des humanen Monothiol-Glutaredoxin GLRX5 mit einer konstanten Konzentration an fluoreszenzmarkierten BOLA-Protein (BOLA1 oder BOLA3) versetzt und das Diffusionsverhalten entlang eines Temperaturgradienten gemessen. Die Affinität der BOLA-Proteine für das mitochondriale GLRX5 wurde sowohl in seiner Apoform (Abbildung 25A/C), als auch in seiner chemisch rekonstituierten Holoform getestet (Abbildung 25B/D). Die erfolgreiche chemische Rekonstitution des holoGLRX5 wurde zuvor mittels UV/Vis-Spektroskopie, CD-Spektroskopie und Eisen- und Sulfidionenbestimmung überprüft (Anhang, Abbildung 57, Seite 134). Die Analyse mittels MicroScale Thermophorese legte nahe, dass sowohl das fluoreszenzmarkierte BOLA1 als auch das fluoreszenzmarkierte BOLA3 mit nahezu gleicher Affinität mit apoGLRX5 ( $K_d(\text{BOLA1-apoGLRX5}) = 3,73 \mu\text{M}$ ;  $K_d(\text{BOLA3-apoGLRX5}) = 3,13 \mu\text{M}$ ) interagieren (Abbildung 25A/C). Ein vergleichbares Ergebnis wurde erhalten, wenn fluoreszenzmarkiertes apoGLRX5 mit BOLA1 oder BOLA3 titriert wurde ( $K_d(\text{apoGLRX5-BOLA1}) = 4,65 \mu\text{M}$ ;  $K_d(\text{apoGLRX5-BOLA3}) = 4,32 \mu\text{M}$ ).

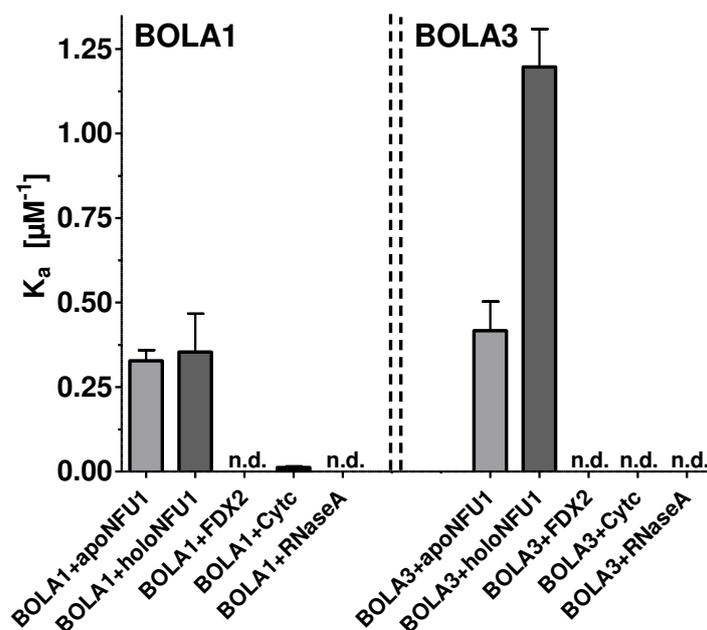


**Abbildung 25: BOLA1 interagiert mit holoGLRX5, BOLA3 hingegen nicht. (A-D)** Fluoreszenzmarkiertes (A/B) BOLA1- oder (C/D) BOLA3-Protein wurde mit einer konstanten Konzentration von 200 nM mit verschiedenen Konzentrationen (6,1 nM - 200 μM) (A/C) apoGLRX5 oder (B/D) holoGLRX5 gemischt. (E/F) Assoziationskonstanten ( $K_a = 1/K_d$ ) der mittels MicroScale Thermophorese erhaltenen Dissoziationskonstanten von (E) BOLA1 und (F) BOLA3. Humanes mitochondriales Ferredoxin (FDX2), Cytochrom *c* (Cyt<sub>c</sub>) und RNase A wurden als Kontrollproteine verwendet. Fehlerbalken deuten die Standardabweichung SD ( $n=3$ ) an. Das erst genannte Protein war mit dem Fluoreszenzmarker versehen. Für die MicroScale Thermophorese (MST)-Messungen wurde MST-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20, 0,05 mg/mL BSA, 5% Glycerin) verwendet. n.d., nicht detektierbar. Diese Daten wurden bereits in Melber *et al.* 2016 publiziert.

Affinitätsmessungen der BOLA-Proteine mit chemisch rekonstituiertem holoGLRX5 hingegen zeigten deutliche Affinitätsunterschiede (Abbildung 25B/D). Eine bevorzugte Interaktion von

BOLA1 mit holoGLRX5 ( $K_d(\text{BOLA1-holoGLRX5}) = 0,69 \mu\text{M}$ ) (Abbildung 25B) war erkennbar, und im Vergleich zur Interaktion von BOLA1 mit apoGLRX5 (Abbildung 25a) fünfmal stärker. Im Gegensatz hierzu konnte keine Interaktion von holoGLRX5 mit BOLA3 nachgewiesen werden ( $K_d = \text{n.d.}$ ) (Abbildung 25D). Die mittels MicroScale Thermophorese erhaltenen Dissoziationskonstanten wurden als Assoziationskonstanten ( $K_a = 1/K_d$ ) aufgetragen (Abbildung 25E/F). Die Spezifität der erhaltenen Interaktionsdaten wurde mit den Kontrollproteinen Cytochrom *c* (Cyt $c$ ), Ferredoxin (FDX2) und RNase A überprüft, wobei Ferredoxin (FDX2) ebenfalls in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist. Es wurde keine Interaktion der BOLA-Proteine mit diesen Kontrollproteinen beobachtet, was darauf hindeutet, dass die mittels MicroScale Thermophorese erhaltenen Daten auf eine spezifische Interaktion hinweisen.

Die geringe Affinität von BOLA3 zu holoGLRX5 im Gegensatz zur Apoform des GLRX5 (Abbildung 25F) könnte bedeuten, dass BOLA3 einen anderen Interaktionspartner aus der späten ISC-Maschinerie haben könnte. Proteomische Analysen lieferten Hinweise für diese Hypothese, da in einem Bol3-Koimmunopräzipitationsexperiment in Hefe geringe Mengen des ISC-Proteins Nfu1 gefunden wurden (Boutigny *et al.*, 2013; Roret *et al.*, 2014). Ausgehend von weiteren Koimmunopräzipitationsexperimenten der amerikanischen Gruppe um Prof. Dennis Winge (Melber *et al.*, 2016), wurde daher in dieser Arbeit die Affinität der humanen BOLA1- bzw. BOLA3-Proteine mit NFU1 sowohl in seiner Apo- als auch Holoform *in vitro* mittels MicroScale Thermophorese untersucht (Abbildung 26).



**Abbildung 26: BOLA3 interagiert mit der späten ISC-Komponente NFU1.** Assoziationskonstanten ( $K_a$ ) der mittels MicroScale Thermophorese erhaltenen Dissoziationskonstanten (Anhang, Abbildung 65, Seite 138). Fehlerbalken deuten die Standardabweichung SD ( $n=3$ ) an. Es wurden die gleichen Kontrollproteine und der gleiche MST-Puffer wie in Abbildung 25 verwendet. Das erst genannte Protein wurde mit dem Fluoreszenzmarker markiert. Diese Daten wurden bereits in Uzarska *et al.* 2016 publiziert.

BOLA1 zeigte eine vergleichbare Affinität zu apoNFU1 ( $K_d(\text{BOLA1-apoNFU1}) = 3,59 \mu\text{M}$ ) (Anhang, Abbildung 65A, Seite 138) und holoNFU1 ( $K_d(\text{BOLA1-holoNFU1}) = 2,14 \mu\text{M}$ ) (Anhang, Abbildung 65C, Seite 138). BOLA3 hingegen hatte eine vierfach höhere Affinität zu holoNFU1 ( $K_d(\text{BOLA3-holoNFU1}) = 0,84 \mu\text{M}$ ) (Anhang, Abbildung 65D, Seite 138) als zu apoNFU1 ( $K_d(\text{BOLA3-apoNFU1}) = 3,57 \mu\text{M}$ ) (Anhang, Abbildung 65B, Seite 138). Die Spezifität der erhaltenen Interaktionsdaten wurde auch in dieser Messung mit den Kontrollproteinen Cytochrom c (Cytc), Ferredoxin (FDX2) und RNase A überprüft (Abbildung 26). Eine Interaktion der BOLA-Proteine mit den Kontrollproteinen wurde auch hier nicht beobachtet, was darauf hindeutet, dass die mittels MicroScale Thermophorese erhaltenen Daten auf eine spezifische Interaktion hindeuten.

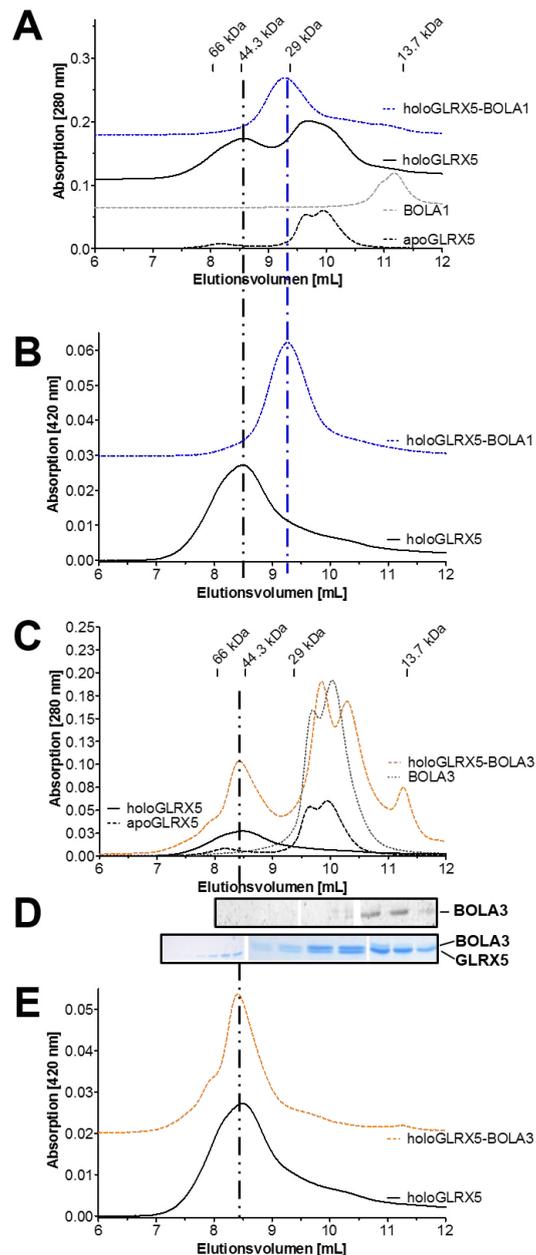
Zusammenfassend deuteten die mittels MicroScale Thermophorese erhaltenen Daten auf eine unterschiedliche Rolle der mitochondrialen BOLA-Proteine in der ISC-Assemblierungsmaschinerie hin: BOLA1 interagiert mit dem Monothiol-Glutaredoxin GLRX5. Eine Interaktion zwischen BOLA1 und holoGLRX5 war im Vergleich zur Apoform des GLRX5 bevorzugt. BOLA3 hingegen interagiert besonders gut mit der Holoform von NFU1.

### **3.2.2 BOLA1 und GLRX5 bilden einen stöchiometrischen GLRX5-BOLA1-Komplex**

Mittels MicroScale Thermophorese (Ergebnisse, Kapitel 3.2.1, Seite 45) konnte nicht aufgeklärt werden, in welcher Stöchiometrie BOLA-Proteine mit dem Monothiol-Glutaredoxin GLRX5 interagieren. Für das bakterielle BOLA-Homolog IbaG ist auch erst seit 2016 die Bildung eines stöchiometrischen homodimeren Komplexes mit dem Glutaredoxin Grx4 bekannt (Dlouhy *et al.*, 2016). Dieser von Dlouhy *et al.* 2016 beschriebene Grx4-IbaG-Komplex wurde mittels analytischer Gelfiltration aufgeklärt, da der heterodimere Grx4-IbaG-Komplex sich im Elutionsverhalten von einem homodimeren Grx4-Grx4-Komplex unterschied. Für die mitochondrialen eukaryotischen BOLA-Proteine hingegen liegt bisher keine genaue Charakterisierung eines GLRX5-BOLA-Komplexes vor. Eine analytische Gelfiltration soll den BOLA-Komplex näher charakterisieren (Abbildung 27). Mit Hilfe einer analytischen Gelfiltration kann sowohl die Größe von einzelnen Proteinen, als auch die Bildung eines Komplexes durch Unterschiede im Elutionsverhalten untersucht werden, wobei ausgenutzt wird, dass ein homodimerer GLRX5-GLRX5-Komplex bei einem anderen Elutionsvolumen als ein heterodimerer GLRX5-BOLA1-Komplex eluieren würde. Um die Stöchiometrie der gebildeten GLRX5-BOLA-Komplexe im Vergleich zum GLRX5 im homodimeren-Komplex zu untersuchen, wurde daher eine analytische Gelfiltration unter anaeroben Bedingungen durchgeführt (Abbildung 27). Um die apparenten Molmassen der einzelnen Komponenten zu quantifizieren, wurden kommerzielle Molekularmassenstandards (BSA (66 kDa), Ovalbumin (44,3 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und RNaseI (13,7 kDa)) benutzt. Die analytische

Gelfiltration wurde mit einer Shodex HW 802.5-Säule auf einem HPLC-System der Firma Waters durchgeführt. Für die HPLC wurde der Standardpufferpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl und 5% Glycerin), der in einer Anaerobenkammer hergestellt wurde, verwendet. Um die Bildung eines holoGLRX5-BOLA-Komplexes zu analysieren wurden zunächst die für die HPLC verwendeten Proben unter anaeroben Bedingungen re- bzw. korekonstituiert. Eine Rekonstitution ist eine *in vitro* Methode, in der unter anaeroben Bedingungen unter Zugabe von Eisen- und Sulfidionen ein Fe/S-Cluster auf Apoproteinen gebildet wird (Methoden, Kapitel 7.10.8, Seite 129). Bei der in dieser Arbeit zusätzlich verwendeten Korekonstitution wurden sowohl das GLRX5- als auch das jeweilige BOLA-Protein stöchiometrisch eingesetzt und mit Eisen- und Sulfidionen zusammen rekonstituiert.

Während des HPLC-Laufs wurde sowohl bei 280 nm das Proteinsignal (Abbildung 27A/C) als auch bei 420 nm das Fe/S-Clustersignal (Abbildung 27B/E) verfolgt. Chemisch rekonstituiertes holoGLRX5 eluierte bei 8,45 mL (~44 kDa), korekonstituiertes GLRX5-BOLA1 hingegen eluierte bei 9,25 mL (~29 kDa). Dieser signifikante Unterschied im Elutionsverhalten bei der Detektion des Fe/S-Clustersignals (420 nm) deutete auf die Bildung eines holoGLRX5-BOLA1-Komplexes hin (Abbildung 27B). Auch das zusätzlich gemessene Proteinsignal (280 nm) (Abbildung 27A) des mit äquimolaren Mengen GLRX5 und BOLA1 korekonstituierten GLRX5-BOLA1-Komplexes zeigte signifikante Unterschiede im Vergleich zum chemisch rekonstituierten GLRX5-GLRX5-Komplex. GLRX5-BOLA1 weist ein klar definiertes 280 nm-Signal bei einem Elutionsvolumen von 9,25 mL auf, das identisch mit dem Fe/S-Clustersignal bei 420 nm ist. Dabei handelt es sich eindeutig um einen GLRX5-BOLA1-Komplex, der einen Fe/S-Cluster gebunden hat. Dieser GLRX5-BOLA1-Komplex eluierte nach Kalibrierung der Gelfiltrationssäule mit Molekularmassenstandards bei ~29 kDa, dies deutet auf die Bildung eines GLRX5-BOLA1-Komplexes mit einer heterodimeren (1:1)-Stöchiometrie (His<sub>6</sub>-GLRX5: 15,89 kDa; His<sub>6</sub>-BOLA1: 13,1 kDa) hin. Es war kein ungebundenes BOLA1 im Elutionsprofil zu erkennen. Der holoGLRX5-GLRX5-Komplex hingegen war innerhalb der 30 minütigen analytischen Gelfiltration sehr labil und zeigte daher bei einer Absorption von 280 nm mehrere Signale (8,45 mL, 9,7 mL und 10,2 mL) (Abbildung 27A). Bei dem Signal bei 8,45 mL handelt es sich um den holoGLRX5-GLRX5-Komplex, die beiden Signale bei 9,7 mL und 10,2 mL sind apoGLRX5-Konformere, was bedeutet, dass der holoGLRX5-Komplex offensichtlich zerfiel. Die korekonstituierte GLRX5-BOLA3-Probe hingegen zeigte ein zum GLRX5-BOLA1-Komplex unterschiedliches Elutionsverhalten (Abbildung 27C/E). Das Signal bei 420 nm (8,45 mL) des GLRX5-BOLA3 gebundenen Fe/S-Clusters war mit dem Signal des GLRX5-Fe/S-Clusters identisch, was wie in den vorherigen Ergebnissen darauf hindeutet, dass kein GLRX5-BOLA3-Komplex gebildet wird. Ein GLRX5-BOLA3-Komplex (His<sub>6</sub>-GLRX5: 15,89 kDa; His<sub>6</sub>-BOLA3: 11,1 kDa) müsste vergleichbar mit GLRX5-BOLA1 signifikant unterschiedliches Elutionsverhalten aufweisen.

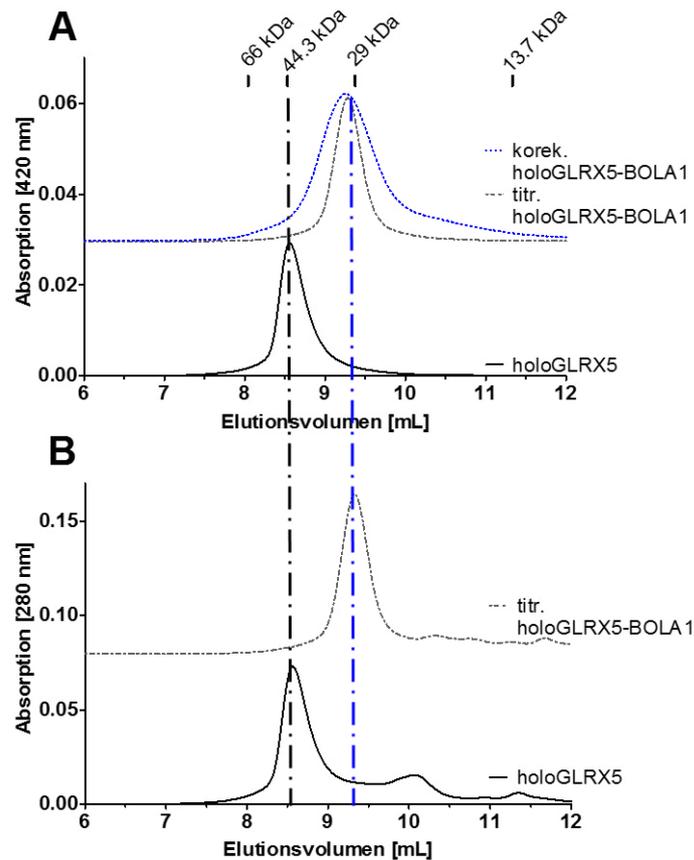


**Abbildung 27: BOLA1 bildet mit GLRX5 einen stabilen heterodimeren holoGLRX5-BOLA1-Komplex.** (A) Elutionsprofil der analytischen Gelfiltration von apoGLRX5 (schwarz - -), BOLA1 (grau - - , aufgesetzt um OD 0,06), holoGLRX5 (schwarz — , aufgesetzt um OD 0,11) und GLRX5-BOLA1 (blau ●— , aufgesetzt um 0,18) bei 280 nm. (B) Elutionsprofil von chemisch rekonstituiertem holoGLRX5 (schwarz —) und stöchiometrisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA1 (blau ●— , aufgesetzt um OD 0,03) bei 420 nm parallel zu (A). (C) Elutionsprofil von holoGLRX5 (schwarz —), apoGLRX5 (schwarz - -), holoGLRX5-BOLA3 (orange ●—) und BOLA3 (schwarz ●●) bei 280 nm. (D) Die Fraktionen des holoGLRX5-BOLA3 wurden mittels Coomassie (unten) und Immunofärbung (oben) analysiert. (E) Elutionsprofil von chemisch rekonstituiertem holoGLRX5 (schwarz —) und korekonstituiertem GLRX5-BOLA3 (orange ●— , aufgesetzt um OD 0,02) bei 420 nm parallel zu (C). Die analytische Gelfiltration wurde mit anaeroben Standardpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5% Glycerin) durchgeführt. Die Elutionspositionen der Molekularmassenstandards sind in kDa angedeutet. Als Molekularmassenstandard wurde BSA (66 kDa), Ovalbumin (44,3 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und RNaseI (13,7 kDa) verwendet. Diese Daten wurden bereits in Uzarska *et al.* 2016 publiziert.

Um zu untersuchen, ob ein holoGLRX5-BOLA3-Komplex gebildet wurde oder nur der homodimere holoGLRX5-GLRX5-Komplex mit ungebundenem BOLA3 in Lösung vorlag, wurde ein SDS-PAGE-Gel und eine Immunfärbung der einzelnen GLRX5-BOLA3-Proteinfraktionen gegen BOLA3 durchgeführt (Abbildung 27D). Bei Fraktionen, die bei einem Volumen von 7.0 mL bis 9.0 mL eluierten, handelte es sich um GLRX5. Bei dem Signal bei 8,45 mL handelt es sich sowohl bei dem chemisch rekonstituierten GLRX5-GLRX5-Komplex, als auch bei der chemisch korekonstituierten GLRX5-BOLA3-Probe eindeutig um das GLRX5-Signal. Es wurde daher kein GLRX5-BOLA3-Komplex gebildet. Die zuletzt eluierten Fraktionen identifizierten BOLA3 (9,25 mL - 11,0 mL) und apoGLRX5 (9,7 mL und 10,3 mL).

Zusammenfassend konnte mittels analytischer Gelfiltration gezeigt werden, dass ein homodimerer holoGLRX5-GLRX5-Komplex vorliegt, der entweder nur partiell holo konvertiert war, oder während der analytischen Gelfiltration, die außerhalb der Anaerobenkammer stand, aber mit anaeroben Puffer durchgeführt wurde, wieder in monomeres apoGLRX5 zerfiel. Eine Analyse des Eisen- und Sulfidionengehaltes von holoGLRX5 ( $\sim 0,89 \text{ Fe}^{2+}$ - und  $0,94 \text{ S}^{2-}$ -Ionen pro Monomer) deutete allerdings auf eine fast vollständige Rekonstitution mit einem  $[2\text{Fe-2S}]$ -Cluster hin, was auf die Labilität des im holoGLRX5-GLRX5-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters schließen lässt. ApoGLRX5 eluierte als Monomer. Des Weiteren wurde gezeigt, dass BOLA3 unter Standardpufferbedingungen nach Korekonstitution mit GLRX5 keinen GLRX5-BOLA3-Komplex bildet. Die korekonstituierte GLRX5-BOLA3-Probe zeigte identisches Elutionsverhalten wie der homodimere holoGLRX5-GLRX5-Komplex. Eine SDS-PAGE-Gel Analyse und eine Immunofärbung gegen BOLA3 konnten BOLA3 nicht im Komplex mit GLRX5 identifizieren. BOLA1 hingegen bildete nach Korekonstitution mit GLRX5 einen stöchiometrischen heterodimeren holoGLRX5-BOLA1-Komplex, der ein signifikant unterschiedliches Elutionsverhalten als der homodimere holoGLRX5-GLRX5-Komplex aufwies. In korekonstituierten GLRX5-BOLA1 war kein freies BOLA1 im Elutionsprofil (280 nm) mehr nachweisbar.

Das BOLA1-Protein bildete mit apoGLRX5 nach Korekonstitution einen stöchiometrischen heterodimeren apoGLRX5-BOLA1-Komplex. Da bei einer Korekonstitution die beiden Apoproteine miteinander gemischt wurden, und erst anschließend der Fe/S-Cluster chemisch rekonstituiert wurde, ist unklar, ob die Interaktion des BOLA1 mit GLRX5 dazu führt, dass ein GLRX5 des homodimeren holoGLRX5-GLRX5 zur Bildung eines holoGLRX5-BOLA1 substituiert wird. Um dies zu überprüfen, wurde eine analytische Gelfiltration mit einem chemisch rekonstituierten homodimeren holoGLRX5-GLRX5-Komplex, der mit einer stöchiometrischen Konzentration des BOLA1-Proteins versetzt wurde, durchgeführt. Das Elutionsprofil des heterodimeren holoGLRX5-GLRX5-Komplexes nach einer stöchiometrischen Zugabe des BOLA1-Proteins war identisch mit dem des korekonstituierten GLRX5-BOLA1-Komplexes (Abbildung 28).



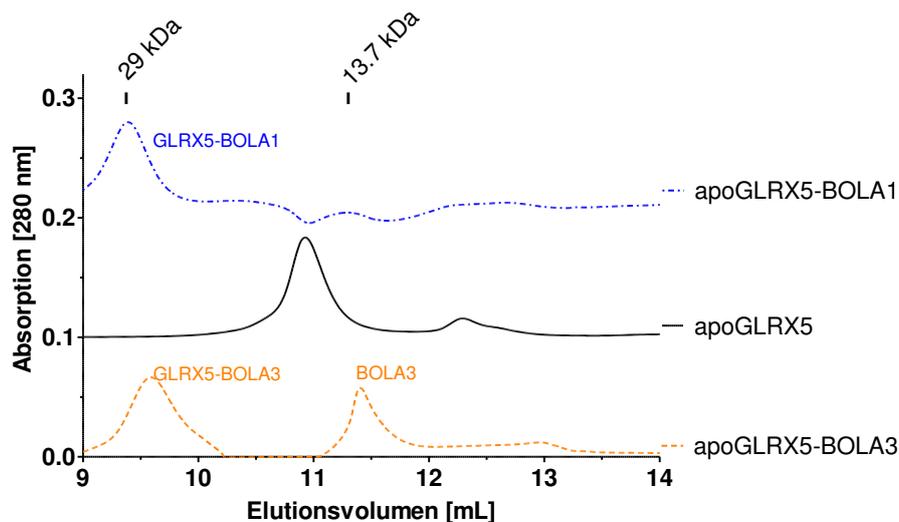
**Abbildung 28: Ein holoGLRX5-BOLA1-Komplex wird auch nach Zugabe von BOLA1 zu einem homodimeren holoGLRX5-GLRX5-Komplex gebildet.** (A) Elutionsprofil der analytischen Gelfiltration wie in Abbildung 27 von chemisch rekonstituiertem GLRX5 (schwarz —), chemisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA1 (blau ●—) und holoGLRX5 nach stöchiometrischer BOLA1-Zugabe (grau ●●) bei 420 nm. Die Elutionspositionen der Molekularmassenstandards sind in kDa angedeutet. (B) Elutionsprofil der analytischen Gelfiltration bei 280 nm von holoGLRX5 (schwarz —) und holoGLRX5 nach Zugabe stöchiometrischer BOLA1-Zugabe (grau ●●) parallel zu (A). Die analytische Gelfiltration wurde mit anaeroben Standardpuffer und den gleichen Molekularmassenstandards wie in Abbildung 27 durchgeführt.

Bei 280 nm (Abbildung 28B) konnte in der analytischen Gelfiltration allerdings nur ein Signal beobachtet werden, das mit dem des Fe/S-Clustersignals bei 420 nm identisch war (Abbildung 28A). Die mittels Gelfiltration ermittelte Stöchiometrie legt nahe, dass ein heterodimerer holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebildet wird. Dies setzt voraus, dass ein GLRX5 des homodimeren holoGLRX5-GLRX5-Komplexes durch ein BOLA1 substituiert wird. Die Bildung von apoGLRX5 war im Elutionsprofil bei 280 nm allerdings nicht erkennbar, was darauf hindeutet, dass auch das apoGLRX5 mit BOLA1 einen apoGLRX5-BOLA1-Komplex bildet. Eine Interaktion von apoGLRX5 mit BOLA1 wurde in der Thermophorese bereits festgestellt (Ergebnisse, Kapitel 3.2.1.1, Abbildung 25, Seite 46). Da sowohl der holoGLRX5-BOLA1-Komplex als auch der apoGLRX5-BOLA1-Komplex die gleiche Molekularmasse besitzen, zeigen diese auf der analytischen Gelfiltration ein identisches Elutionsvolumen. Die Bildung eines stöchiometrischen holoGLRX5-BOLA1-Komplexes nach Zugabe des BOLA1-Proteins

zu einem rekonstituierten holoGLRX5-GLRX5-Komplex lässt auf einen Ligandenaustausch eines GLRX5 durch ein BOLA1 schließen, wobei apoGLRX5 entstehen müsste. Dies war allerdings nicht zu beobachten (Abbildung 28B). Dies wiederum lässt darauf schließen, dass auch das durch BOLA1 ersetzte apoGLRX5 mit BOLA1 interagieren kann.

Um dies direkt zu überprüfen wurde eine analytische Gelfiltration durchgeführt, nachdem apoGLRX5 mit stöchiometrischen Mengen der BOLA-Proteine inkubiert wurde (Abbildung 29). Diese Experimente verifizierten die Interaktion von apoGLRX5 mit BOLA-Proteinen.

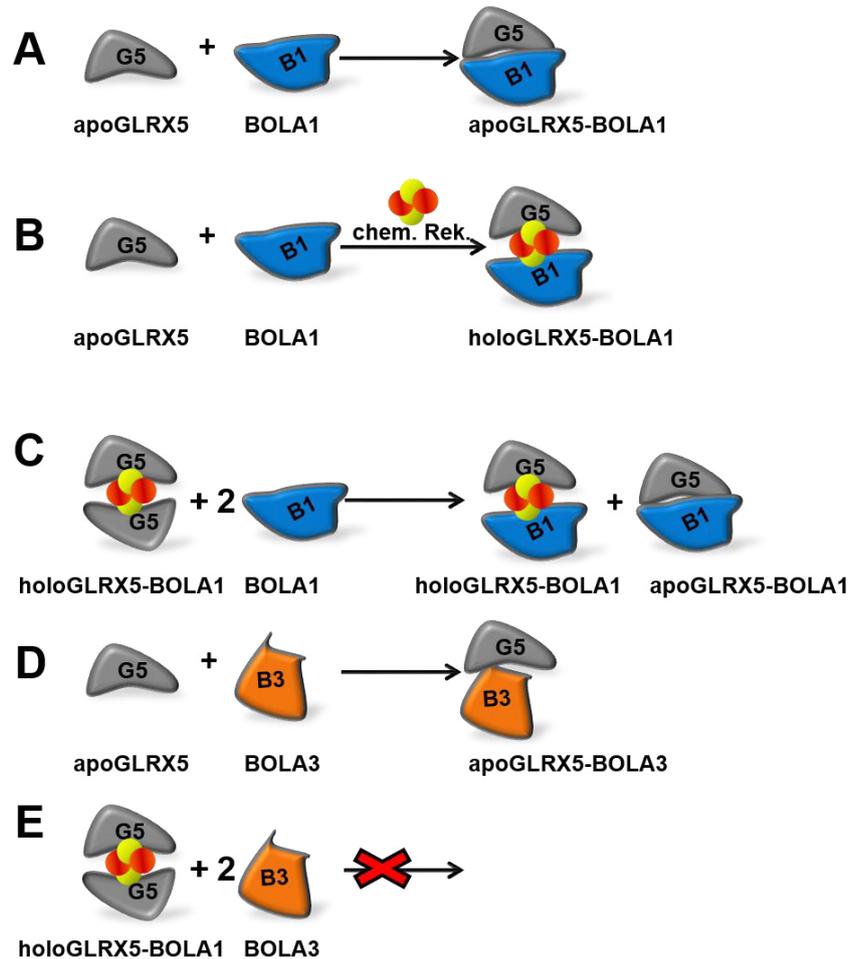
Der apoGLRX5-BOLA1-Komplex eluierte bei einem identischen Elutionsvolumen (~9,25 mL) wie der holoGLRX5-BOLA1-Komplex. Der Holo- und Apokomplex unterschieden sich nicht im Elutionsprofil, was auch der Grund dafür ist, dass kein apoGLRX5 in Abbildung 28 erkennbar war. Bei dem 280 nm-Signal bei 9,25 mL in Abbildung 27 (Seite 50) handelt es sich deshalb sowohl um einen apoGLRX5-BOLA1- als auch holoGLRX5-BOLA1-Komplex. Der apoGLRX5-BOLA3-Komplex eluierte im Gegensatz zur holoGLRX5-BOLA3-Probe bei 9,55 mL. Ein Vergleich mit Molekularmassenstandards deutete darauf hin, dass es sich um einen heterodimeren Komplex handelt (His<sub>6</sub>-GLRX5: 15,89 kDa; His<sub>6</sub>-BOLA3: 11,1 kDa). Auch ungebundenes BOLA3 war im Elutionsprofil zu finden.



**Abbildung 29: Beide BOLA-Proteine bilden mit apoGLRX5 einen stabilen apoGLRX5-BOLA-Komplex.** Elutionsprofil von stöchiometrischen Mengen apoGLRX5-BOLA3 (orange), apoGLRX5 (schwarz —, aufgesetzt um OD 0,1) und apoGLRX5-BOLA1 (blau •–, aufgesetzt um OD 0,2) bei 280 nm. Die Elutionspositionen der Molekularmassenstandards sind in kDa angedeutet. Die analytische Gelfiltration wurde mit dem Standardpuffer (Abbildung 27) durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard wurde die Carboanhydrase (29 kDa) und RNase I (13,7 kDa) verwendet.

Zusammenfassend konnte mittels analytischer Gelfiltration der Apoproteine wie bereits für den holoGLRX5-BOLA1-Komplex beobachtet werden, dass BOLA1 mit apoGLRX5 interagiert und einen apoGLRX5-BOLA1-Komplex bildet, der ein identisches Elutionsverhalten wie der holoGLRX5-BOLA1-Komplex aufweist.

BOLA3 hingegen interagiert nur mit apoGLRX5 und bildet einen stabilen apoGLRX5-BOLA3-Komplex. Die analytische Gelfiltration des apoGLRX5-Proteins mit BOLA-Proteinen (Abbildung 29) verifiziert das mittels MicroScale Thermophorese (Abbildung 25) erhaltene Ergebnis der Interaktionen von BOLA-Proteinen mit apoGLRX5 (Abbildung 30).

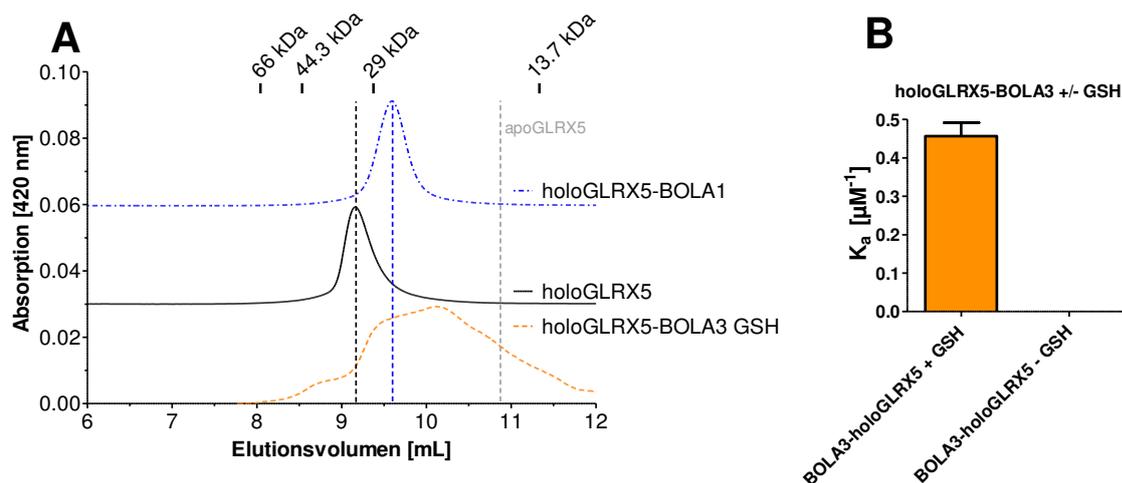


**Abbildung 30: BOLA1 interagiert mit holo- und apoGLRX5, BOLA3 hingegen nur mit apoGLRX5.** (A) Interaktion von BOLA1 mit apoGLRX5 und Bildung eines apoGLRX5-BOLA1-Komplexes. (B) Nach chemischer Korekonstitution von BOLA1 mit apoGLRX5 wird ein holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebildet. (C) BOLA1 interagiert mit chemisch rekonstituiertem GLRX5 und bildet sowohl einen holoGLRX5-BOLA1- als auch apoGLRX5-BOLA1-Komplex. (D) BOLA3 interagiert mit apoGLRX5 und bildet einen apoGLRX5-BOLA3-Komplex. (E) BOLA3 interagiert nicht mit chemisch rekonstituiertem GLRX5. Alle HPLC-Messungen wurden in anaeroben Standardpuffer durchgeführt.

### 3.2.3 Die Bildung eines GLRX5-BOLA3-Komplexes ist GSH-abhängig

*In vivo* Daten deuten darauf hin, dass die Hefe Bol-Proteine, Bol1 und Bol3, eine überlappende Funktion wahrnehmen (Uzarska *et al.*, 2016). Zusätzlich zu unseren *in vitro* Daten zeigten die von unseren Kooperationspartnern in Italien durchgeführten NMR-Experimente (Uzarska *et al.*, 2016), dass BOLA3 eine Affinität zu holoGLRX5 aufweist. Dies konnte mittels der eingesetzten MicroScale Thermophorese (Ergebnisse, Kapitel 3.2.1, Seite 45) und

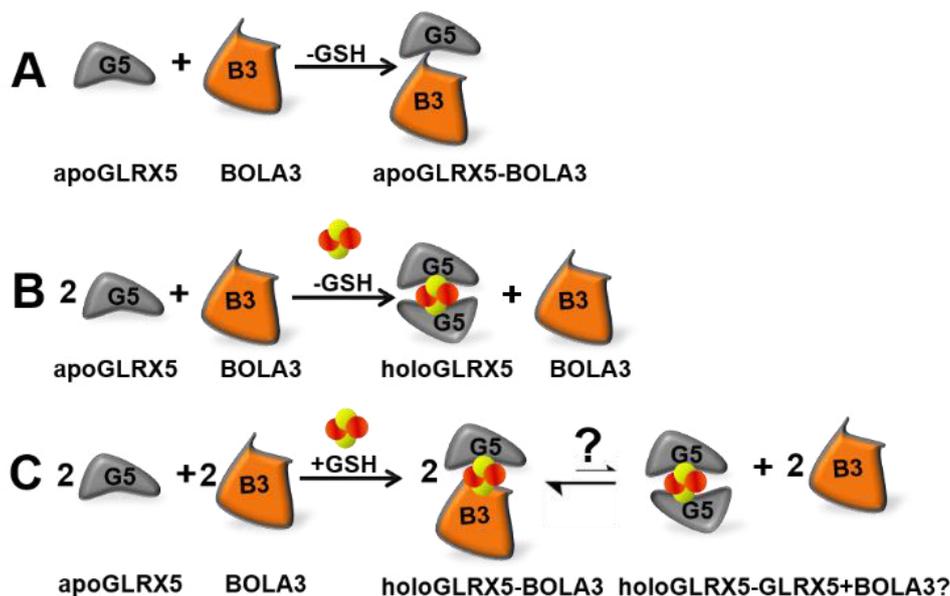
analytischen Gelfiltration (Ergebnisse, Kapitel 3.2.2, Seite 48) nicht verifiziert werden. Die Pufferbedingungen bei den durchgeführten NMR-Experimenten unterschieden sich allerdings im Puffersystem, Ionenstärke, GSH-Gehalt als auch im pH-Wert von dem bei der Rekonstitution verwendeten Standardpuffer. Um die Abhängigkeit der Bildung eines GLRX5-BOLA Komplexes von verschiedenen Pufferbedingungen zu testen, wurde daher eine weitere analytische Gelfiltration mit einem GSH-haltigem Puffer durchgeführt (Abbildung 31).



**Abbildung 31: BOLA3 bildet in Gegenwart von GSH einen GLRX5-BOLA3+GSH-Komplex.** (A) Elutionsprofil der analytischen Gelfiltration von korekonstituiertem holoGLRX5-BOLA3+GSH (orange ●–), holoGLRX5 (schwarz —, aufgesetzt um OD 0,03) und korekonstituiertem holoGLRX5-BOLA1 (blau ●–, aufgesetzt um OD 0,06) bei 420 nm. Das Elutionsvolumen von apoGLRX5 bei 280 nm ist grau (–) angedeutet. (B) Assoziationskonstanten ( $K_a$ ) der mittels MicroScale Thermophorese erhaltenen Dissoziationskonstanten (Anhang, Abbildung 66, Seite 138) von BOLA3 und holoGLRX5 in Gegenwart und Abwesenheit von 5 mM GSH. Fehlerbalken deuten die Standardabweichung SD ( $n=3$ ) an. Dem Thermophoresepuffer (Abbildung 25) wurden in den +GSH-Messungen zusätzlich 5 mM GSH zugesetzt. Das erst genannte Protein wurde mit dem Fluoreszenzmarker markiert. Die Elutionspositionen der Molekularmassenstandards sind in kDa angedeutet. Die analytische Gelfiltration wurde in anaeroben NMR-Puffer (50 mM  $KP_i$  pH 7,4, 5 mM GSH) durchgeführt. Molekularmassenstandard siehe Abbildung 27.

Für die analytische Gelfiltration von korekonstituiertem GLRX5-BOLA3 wurde der gleiche Puffer, wie er für die NMR-Spektroskopiemessung verwendet wurde eingesetzt (NMR-Puffer: 50 mM  $KP_i$  pH 7,0, 5 mM GSH) (Uzarska *et al.*, 2016). Die HPLC wurde mit anaerob hergestellten NMR-Puffer auf einer Shodex 802,5-Säule (Ergebnisse, Kapitel 3.2.2, Seite 48) durchgeführt. Auch für diese Messung wurde das Fe/S-Clustersignal bei 420 nm charakterisiert. Die Detektion des 420 nm-Signals (Abbildung 31) verdeutlichte erneut die Stabilität des im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters. Der holoGLRX5-BOLA1-Komplex eluierte mit einem definierten Signal 0,25 mL hinter dem Signal des 29 kDa Molekularmassenstandards bei 9,6 mL. Dieses Elutionsvolumen ist im Vergleich zu den vorherigen Elutionsprofilen (Ergebnisse, Kapitel 3.2.2, Abbildung 27, Seite 50) leicht verschoben,

was aber an den geänderten Pufferbedingungen liegen könnte. Im Gegensatz zu allen bisherigen Daten zeigte eine mit NMR-Puffer korekonstituierte GLRX5-BOLA3-Probe ein verändertes Elutionsvolumen im Vergleich zum holoGLRX5-GLRX5-Komplex. Das 420 nm Signal erstreckt sich allerdings über einen Bereich von 4 mL (8,0 mL-12 mL) im Elutionsprofil. Dies deutete darauf hin, dass in Gegenwart von GSH kein definierter, stabiler GLRX5-BOLA3-Komplex vorliegt. Um zu überprüfen, ob GSH tatsächlich für die Affinität und Bildung eines GLRX5-BOLA3-Komplexes verantwortlich ist, wurde MicroScale Thermophorese in Gegenwart und Abwesenheit von 5 mM GSH mit BOLA3 (fluoreszenzmarkiert) und holoGLRX5 durchgeführt (Abbildung 31B). Das BOLA3 scheint in dem für die NMR-Spektroskopie verwendeten Puffer eine Affinität zu holoGLRX5 zu besitzen, die das Elutionsverhalten des GLRX5 beeinflusst. Der homodimere holoGLRX5-GLRX5-Komplex zeigte ähnlich wie der heterodimere GLRX5-BOLA1-Komplex ein definiertes Maximum der Absorption bei 420 nm. Auch das Elutionsprofil des holoGLRX5-GLRX5-Komplexes ist unter diesen Pufferbedingungen (NMR-Puffer) auf 9,15 mL verschoben. Die analytische Gelfiltration in anaeroben NMR-Puffer zeigte ein im Vergleich zu holoGLRX5-GLRX5 verändertes Verhalten von korekonstituierten GLRX5-BOLA3. Zusammenfassend hat BOLA3 *in vitro* unter Standardpufferbedingungen (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5% Glycerin) keine Affinität zu GLRX5. In Gegenwart von GSH hingegen hat BOLA3 eine Affinität zu GLRX5 (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Die Bildung eines GLRX5-BOLA3-Komplexes ist GSH-abhängig. (A)** BOLA3 bildet auch in Abwesenheit von GSH mit apoGLRX5 einen apoGLRX5-BOLA3-Komplex. **(B)** Nach chemischer Korekonstitution von GLRX5 und BOLA3 in Abwesenheit von GSH entsteht ein homodimerer holoGLRX5-GLRX5-Komplex. BOLA3 liegt ungebunden in Lösung vor. **(C)** In Gegenwart von GSH hat BOLA3 nach chemischer Korekonstitution eine Affinität zu GLRX5. Dieser GLRX5-BOLA3-Komplex ist jedoch nicht stabil.

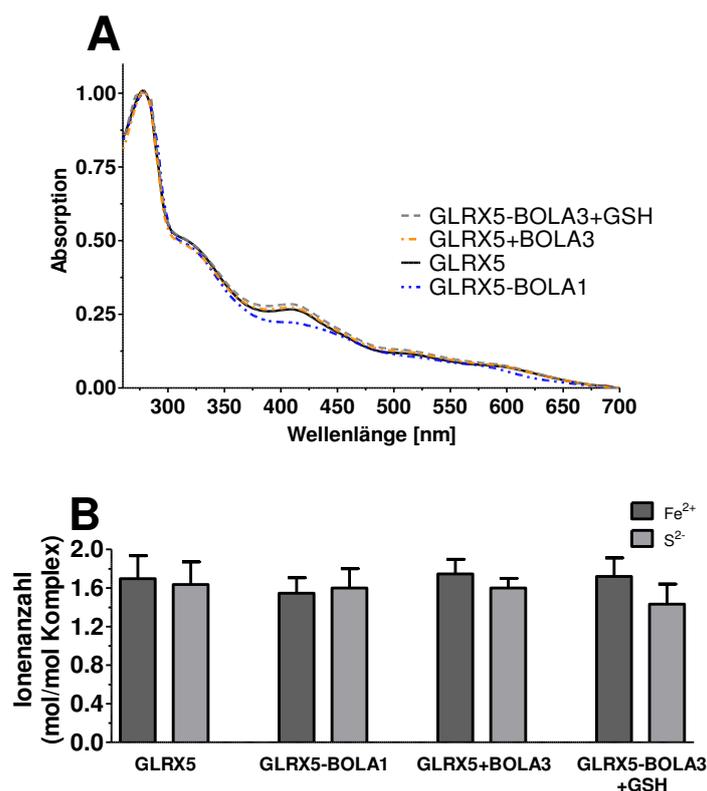
Um die Affinität von BOLA3 zu GLRX5 weiter zu charakterisieren, wurden daher die nachfolgenden spektroskopischen Messungen sowohl in Gegenwart als auch Abwesenheit von GSH durchgeführt.

### **3.2.4 Spektroskopische Studien zur Interaktion von GLRX5 mit BOLA-Proteinen**

#### **3.2.4.1 GLRX5 und die holoGLRX5-BOLA-Komplexe binden einen [2Fe-2S]-Cluster**

Die mittels MicroScale Thermophorese (Ergebnisse Kapitel 3.2.1, Seite 45) und analytischer Gelfiltration (Ergebnisse Kapitel 3.2.2/3.2.3, Seite 48) erhaltenen Erkenntnisse deuteten auf eine Komplexbildung der BOLA-Proteine mit verschiedenen ISC-Proteinen hin, die durch unterschiedliche Affinitäten charakterisiert ist. Zur weiteren Analyse dieser Komplexe, ihrer Fe/S-Clusterbindung und Fe/S-Clusterumgebung wurden spektroskopische Methoden verwendet. Fe/S-Cluster absorbieren Licht fast im gesamten Wellenbereich des nahen UV und des sichtbaren Lichts (Vis) und sind durch charakteristische Banden gekennzeichnet (Methoden, Kapitel 7.10.6, Seite 128). Damit eignen sich die UV/Vis- und CD-Spektroskopie zur Untersuchung der möglichen Fe/S-Clusterbindung sowie einer Charakterisierung des gebundenen Fe/S-Clustertypus.

Zunächst wurde der holoGLRX5-GLRX5-Komplex, und die korekonstituierten GLRX5-BOLA-Proben mit UV/Vis-Spektroskopie (Abbildung 33A) und einer Eisen- und Sulfidionenbestimmung (Abbildung 33B) auf die Art des gebundenen Fe/S-Clusters untersucht (Abbildung 33). Korekonstituiertes GLRX5 mit BOLA3 verhielt sich in den bereits durchgeführten Messungen (Ergebnisse, Kapitel 3.2.2, Seite 48) wie der homodimere GLRX5-GLRX5-Komplex, weshalb die unter Standardbedingungen korekonstituierten Proben von GLRX5 mit BOLA3 nachfolgend als GLRX5+BOLA3 bezeichnet werden. Eine Korekonstitution in Gegenwart von GSH deutet auf eine Komplexbildung von GLRX5 mit BOLA3 hin, weshalb diese Proben nachfolgend als GLRX5-BOLA3+GSH bezeichnet werden. In der Regel sind UV/Vis-Spektren eines [2Fe-2S]-Proteins im Vergleich zu einem [4Fe-4S]-Protein komplexer und zeigen verschiedene typische und charakteristische Absorptionsmaxima bei 410 nm - 430 nm, 470 nm, gelegentlich auch einen breiten Absorptionsmaxima bei 550-600 nm (Methoden, Kapitel 7.10.6, Seite 128). Das UV/Vis-Spektrum eines [4Fe-4S]-Proteins hingegen zeigt weniger Charakteristika, lediglich bei 400-420 nm ist ein Absorptionsmaximum in Form einer breiten Schulter erkennbar.



**Abbildung 33: Humanes GLRX5 bindet sowohl als Homodimer als auch nach chemischer Korekonstitution mit BOLA1 oder BOLA3 einen [2Fe-2S]-Cluster.** UV/Vis-Spektren von 100  $\mu\text{M}$  chemisch rekonstituiertem GLRX5 (schwarz, —) und chemisch korekonstituiertem GLRX5+BOLA3 (orange, - -), GLRX5-BOLA3+GSH (grau, - -) und GLRX5-BOLA1 (blau, •-) im Bereich von 280-700 nm. Alle Proben zeigen Absorptionsmaxima bei 320 nm, 425 nm, 520 nm und 600 nm. **(B)** Eisen- und Sulfidionenbestimmung von GLRX5, GLRX5-BOLA1, GLRX5+BOLA3 und GLRX5-BOLA3+GSH. Puffer (GLRX5, GLRX5-BOLA1, GLRX5+BOLA3): Standardpuffer, Puffer (GLRX5-BOLA3+GSH): NMR-Puffer. Korekonstituiertes GLRX5 mit BOLA3 verhielt sich in allen durchgeführten Messungen wie homodimeres GLRX5, daher wird es nachfolgend nur noch als GLRX5+BOLA3 bezeichnet.

Das UV/Vis-Spektrum des GLRX5+BOLA3 in Standardpuffer wies im Vergleich zum UV/Vis-Spektrum des GLRX5-Komplexes keine signifikante Veränderung auf (Abbildung 33), was darauf hindeutet, dass keine GLRX5-BOLA3-Komplexbindung, sondern nur die Bildung eines homodimeren holoGLRX5-GLRX5-Komplexes, vorliegt (Abbildung 32B). Im NMR-Puffer (GLRX5-BOLA3+GSH) hingegen waren spektrale Änderungen im Vergleich zum holoGLRX5-GLRX5-Komplex erkennbar. Bei gleicher Proteinkonzentration war das Absorptionsmaximum bei 420 nm verbreitert. Auch der GLRX5-BOLA1-Komplex zeigte spektrale Veränderung. Das GLRX5-BOLA1 Spektrum wies im Bereich von 420 nm einen zu GLRX5-BOLA3+GSH und GLRX5 veränderten flacheren Verlauf auf, der eine ins rötliche verschobene Änderung des Absorptionsmaximums bewirkte. Das erhaltene UV/Vis-Spektrum und die durchgeführte Eisen- und Sulfidionenbestimmung deutete an Hand der typischen Absorptionsbanden bei 320 nm, 420 nm und 550 nm auf einen von dem holoGLRX5-GLRX5-Komplex und den holoGLRX5-BOLA-Komplexen gebundenen [2Fe-2S]-Cluster hin. Weitere Aussagen bezüglich der Stabilität des im GLRX5-BOLA-Komplexes gebundenen Fe/S-Clusters als auch

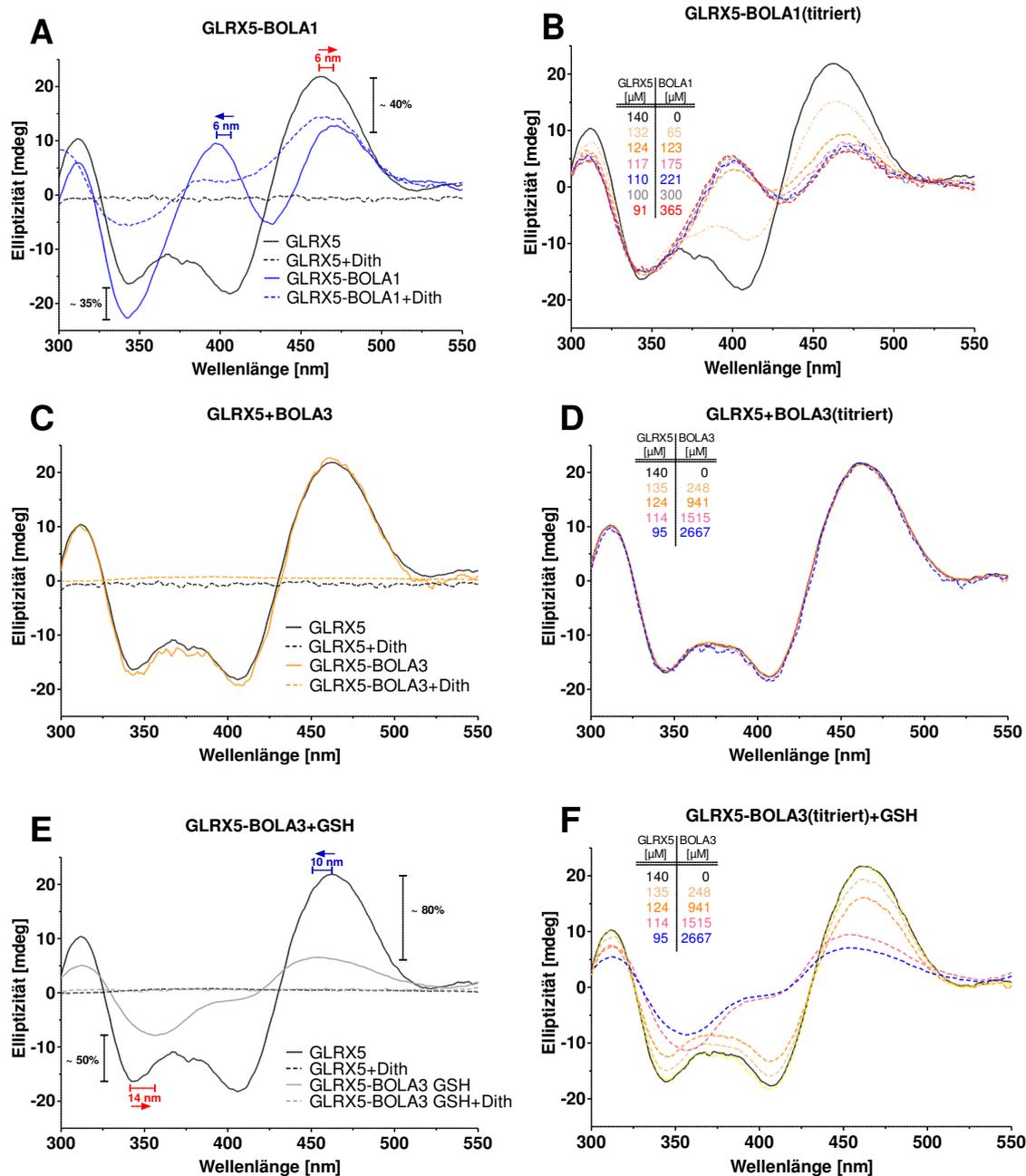
der Aminosäuren, die an der Fe/S-Cluster Koordination beteiligt sind, kann mittels UV/Vis-Spektroskopie für die korekonstituierten GLRX5-BOLA-Proben nicht gemacht werden. Hierfür bieten sich weitere biophysikalische Methoden wie CD-Spektroskopie an.

### **3.2.4.2 Die Interaktion von BOLA1 mit GLRX5 bewirkt CD-spektroskopische Änderungen**

Viele Fe/S-Cluster sind chiral und können daher mittels zirkulärer Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) detektiert werden (Abbildung 34). Hierbei kann im Gegensatz zur UV/Vis-Spektroskopie der Verlauf eines Spektrums nicht vorhergesagt werden. Viele [4Fe-4S]-Cluster Proteine besitzen nur CD-Spektren mit sehr schwacher Intensität oder überhaupt keine, wie beispielsweise NFU1. Bei [2Fe-2S]-Proteinen hingegen können oft für das jeweilige Protein charakteristische CD-Spektren erhalten werden, wobei der Fe/S-Cluster charakteristische Signale im sichtbaren Bereich eines CD-Spektrums aufweist. Diese Eigenschaft kann sowohl für kinetische Studien als auch zum Detektieren einer Änderung des Fe/S-Cluster-umgebenden Umfelds –ausgelöst beispielsweise durch einen Ligandenaustausch– ausgenutzt werden. Voraussetzung ist, dass der Fe/S-Cluster CD-spektroskopisch aktiv ist. Der [2Fe-2S]-Cluster des humanen GLRX5 zeigt im Gegensatz zu dem des Hefehomologs Grx5 ein CD-Spektrum (Abbildung 34A). Weiterhin zeigte sich, dass nach Rekonstitution eines Fe/S-Clusters auf GLRX5 in Gegenwart von stöchiometrischen Mengen BOLA1 spektrale Änderungen im CD-Spektrum im Vergleich zum holoGLRX5-GLRX5-Komplex erkennbar waren. Im Gegensatz zum CD-Spektrum des holoGLRX5-GLRX5-Komplexes wies das CD-Spektrum des holoGLRX5-BOLA1-Komplexes einen eindeutigen Unterschied in der Elliptizität im Bereich von 400 nm auf (Abbildung 34A). Der positive versus negative Elliptizitätsunterschied geht mit einer 6 nm Blauverschiebung des Maximums bei 400 nm einher. Weiterhin verlor das Signal bei ~460 nm bei gleicher Konzentration etwa 40% an Intensität und war um 6 nm Rot-verschoben. Überraschenderweise kam es auch zu spektralen Veränderungen, wenn zum holoGLRX5-GLRX5-Komplex BOLA1 hinzutitriert wurde (Abbildung 34B). Jenseits einer 1:1 (GLRX5:BOLA1)-Stöchiometrie zeigten sich keine weiteren spektralen Veränderungen und das erhaltene CD Spektrum ähnelte sehr stark dem bei der Korekonstitution von GLRX5 und BOLA1 erhaltenen Spektrum (Abbildung 34A/B). Im Gegensatz hierzu zeigten sich bei der Verwendung des Standardpuffers weder nach der Korekonstitution eines Fe/S-Clusters auf GLRX5 in Gegenwart von BOLA3 (Abbildung 34C) noch bei Titration unterschiedlicher BOLA3-Konzentrationen zum zuvor chemisch rekonstituierten holoGLRX5-GLRX5-Komplex (Abbildung 34D) signifikante Änderungen des

CD-Spektrums des homodimeren GLRX5-GLRX5-Komplexes. Auch ein bis zu zehnfacher molarer Überschuss an BOLA3 bewirkte keine Änderung der CD-Spektren.

Bei Verwendung des NMR-Puffers (zusätzliches GSH) zeigten sich sowohl nach Korekonstitution von GLRX5 und BOLA3 (Abbildung 34E) als auch nach Zugabe von BOLA3 zu bereits rekonstituierten holoGLRX5-GLRX5 (Abbildung 34F) CD-spektroskopische Änderungen im Vergleich zum holoGLRX5-GLRX5-Spektrum. Das CD-Spektrum des korekonstituierten holoGLRX5-BOLA3+GSH-Komplexes in Gegenwart von 5 mM GSH zeigte im Vergleich zum CD-Spektrum des holoGLRX5-GLRX5-Komplexes einen eindeutigen Unterschied in Bereich von ~460 nm auf (Abbildung 34E). Das Maximum bei 454 nm war um 10 nm ins Blau verschoben und zeigte eine Verringerung der Signalintensität von 80%. Das Minimum bei ~350 nm ist bei gleicher Konzentration etwa um 35% an Intensität verringert und war signifikant um 14 nm Rot-verschoben. Interessanterweise kam es erst bei einem 15-fachen molaren Überschuss von BOLA3 zu bereits chemisch rekonstituierten holoGLRX5 zu einer CD-spektroskopischen Änderung, die auf die Bildung eines GLRX5-BOLA3+GSH-Komplexes in Anwesenheit von GSH schließen ließ. (Abbildung 34F). Für den auf GLRX5 gebundenen [2Fe-2S]-Cluster ist bekannt, dass er gegenüber Dithionit instabil ist (Ye *et al.*, 2010). Um die Stabilität des in den holoGLRX5-BOLA1- und holoGLRX5-BOLA3-Proben gebundenen Fe/S-Clusters zu testen, wurde den chemisch rekonstituierten Proben daher jeweils 2 mM (Endkonzentration) des Reduktionsmittels Dithionit hinzugesetzt und ein zusätzliches CD-Spektrum aufgenommen. Der Fe/S-Cluster des holoGLRX5-BOLA1-Komplexes (Abbildung 34A), der sich CD-spektroskopisch von dem des holoGLRX5-GLRX5-Komplexes unterscheidet, war im Gegensatz zum GLRX5-GLRX5-Komplex stabil und geschützt gegenüber Dithionitreduktion. In dem CD-Spektrum des mit Dithionit reduzierten GLRX5-BOLA1 Komplexes blieb das Signal bei 460 nm erhalten, wobei das bei 400 nm allerdings verschwand (Abbildung 34A). Im Gegensatz hierzu war der Fe/S-Cluster in den holoGLRX5-BOLA3-Proben (Abbildung 34C/E) genauso sensitiv wie der Fe/S-Cluster im holoGLRX5-GLRX5-Komplex. Ein ähnliches Ergebnis der Dithionitstabilität wurde für das mit BOLA1 und BOLA3 titrierte holoGLRX5-GLRX5 erhalten (Abbildung 34B/D). Der schon bei einer 1:1 Stöchiometrie erhaltene GLRX5-BOLA1-Komplex war stabil gegenüber Reduktion, die holoGLRX5-BOLA3-Proben hingegen nicht (Anhang, Abbildung 67, Seite 139).



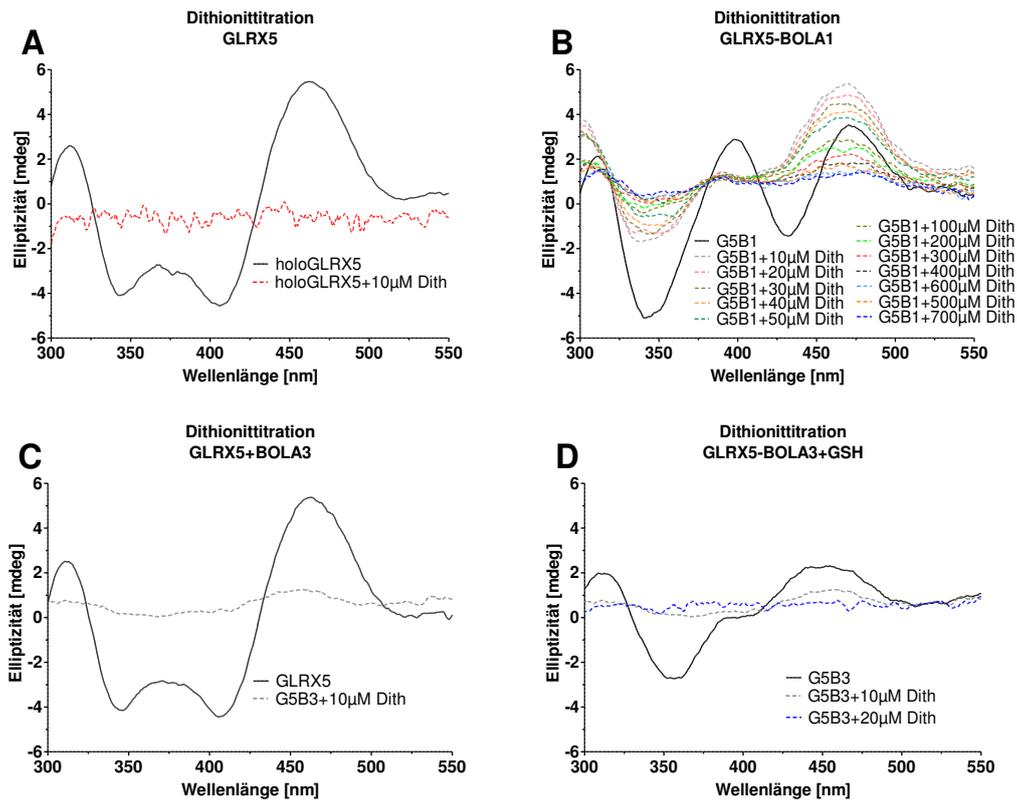
**Abbildung 34: Humanes BOLA1 stabilisiert den in einem holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundenen [2Fe-2S]-Cluster.** (A) CD-Spektren von chemisch rekonstituiertem GLRX5 (schwarz —, 200  $\mu\text{M}$ ) und korekonstituiertem GLRX5-BOLA1 (blau —, 200  $\mu\text{M}$ ) unter anaeroben Bedingungen. Zusätzlich wurden CD-Spektren nach der Zugabe des Reduktionsmittels Dithionit (2 mM Endkonzentration) aufgenommen (GLRX5+Dith schwarz - -, GLRX5-BOLA1+Dith blau - -). (B) Chemisch rekonstituiertes GLRX5 wurde mit den in der Tabelle gezeigten Konzentrationen an BOLA1-Protein titriert und die CD-Spektren (verdünnungskorrigiert) unter anaeroben Bedingungen aufgenommen. Die Experimente in (C) und (E) wurden analog zu (A), die in (D) und (F) analog zu (B) durchgeführt. CD-Spektren von korekonstituiertem (C) GLRX5+BOLA3 (orange —, 200  $\mu\text{M}$ ), (E) GLRX5-BOLA3+GSH (grau, —). (D/F) Chemisch rekonstituiertes GLRX5 wurde in (D) Abwesenheit oder (F) Gegenwart von GSH mit den in der Tabelle gezeigten Konzentrationen BOLA3 titriert und die CD-Spektren (verdünnungskorrigiert) unter anaeroben Bedingungen aufgenommen. Signifikante Verschiebungen zu niedrigen Wellenlängen sind blau und Verschiebungen zu höheren Wellenlängen rot markiert. Puffer wie in Abbildung 33. Die Daten (A-D) wurden bereits in Uzarska *et al.* 2016 publiziert.

Zusammenfassend wurde mittels CD-Spektroskopie festgestellt, dass die Interaktion des BOLA1 mit GLRX5 sowohl in einem korekonstituierten GLRX5-BOLA1-Komplex als auch nach Zugabe des BOLA1-Proteins zu einem bereits rekonstituierten holoGLRX5-GLRX5-Komplex die CD-spektroskopischen Eigenschaften beeinflusst. GLRX5-BOLA3 wies in dem verwendeten Standardpuffer ein zum homodimeren holoGLRX5-GLRX5-Komplex vergleichbares spektrales Verhalten auf, was auf keine signifikante Interaktion des BOLA3-Proteins mit GLRX5 hindeutet. In Gegenwart von GSH hingegen zeigten sich nach Korekonstitution von GLRX5 und BOLA3 eindeutige spektrale Unterschiede im Vergleich zum holoGLRX5-GLRX5-Komplex. Diese spektralen Unterschiede wurden auch beobachtet, wenn bereits rekonstituiertes GLRX5 mit einem hohen Überschuss BOLA3 versetzt wurde. Zusätzlich konnten Unterschiede bezüglich der Stabilität des Fe/S-Clusters gegenüber des Reduktionsmittels Dithionit festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass BOLA1, jedoch nicht BOLA3 den Fe/S-Cluster im heterodimeren GLRX5-BOLA-Komplex stabilisiert. BOLA3 interagiert nur mit GLRX5, wenn physiologisch relevante Bedingungen (Gegenwart an GSH) eingestellt sind.

### 3.2.4.3 Stabilität der holoGLRX5-BOLA-Komplexe gegenüber

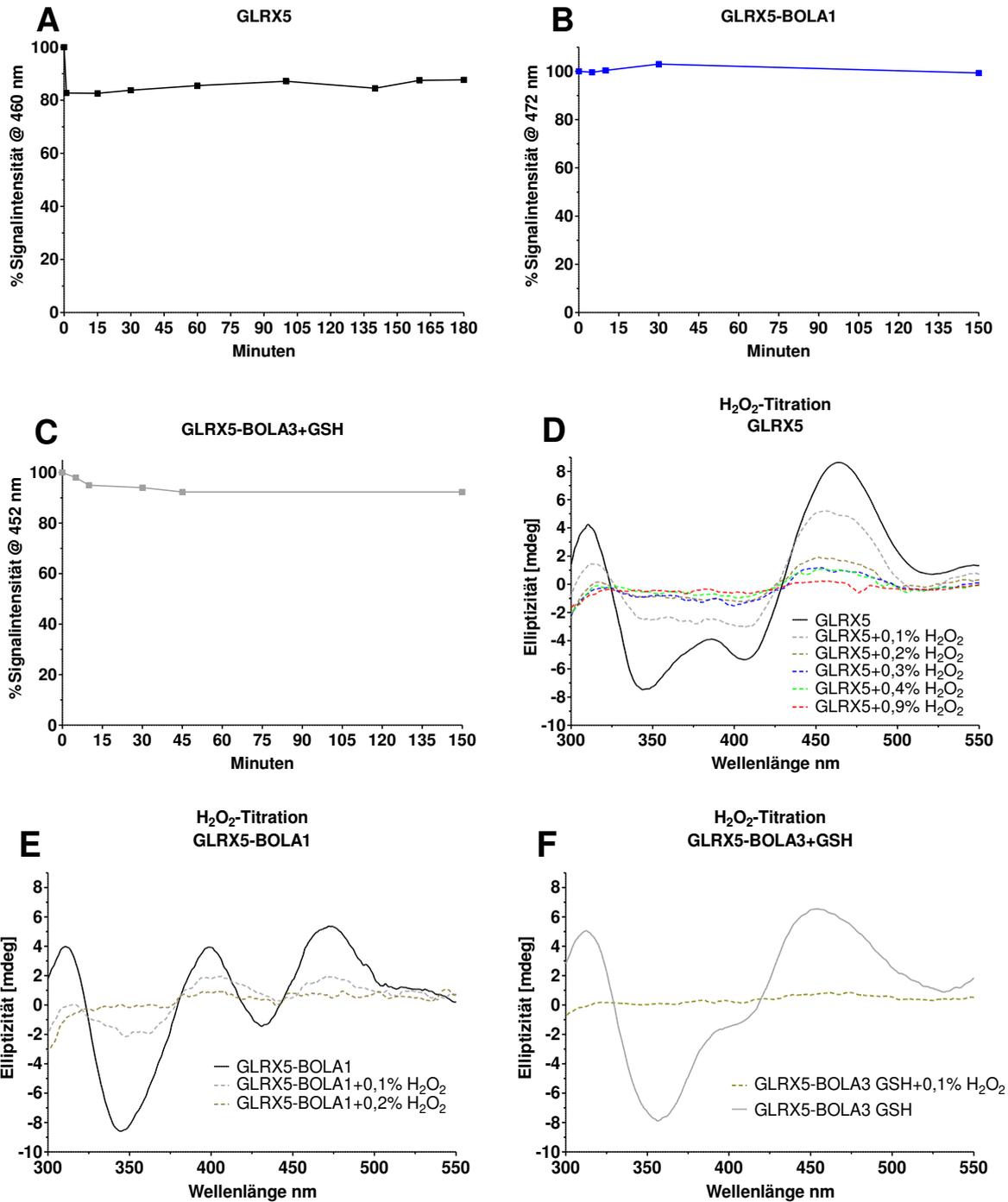
#### Oxidation und Reduktion

Die Sensitivität des homodimeren holoGLRX5-GLRX5-Komplexes im Vergleich zum holoGLRX5-BOLA1-Komplex nach der Zugabe des Reduktionsmittels Dithionit deutete auf einen Stabilitätsunterschied des gebundenen Fe/S-Clusters hin. Die CD-spektroskopische Verfolgung einer Dithionittitration von chemisch rekonstituiertem GLRX5 (Abbildung 35A) oder chemisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA3 (Abbildung 35C/D) zeigte, dass bereits eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Reduktionsmittel ausreichen, um den auf holoGLRX5-GLRX5 oder GLRX5+BOLA3 gebundenen Fe/S-Cluster zu labilisieren. Die nahezu gleiche Labilität des Fe/S-Clusters gegenüber Reduktion für den im Standardpuffer rekonstituierten holoGLRX5-GLRX5-Komplex als auch der im Standardpuffer korekonstituierten GLRX5+BOLA3-Probe waren auffällig. Wie in den vorhergehenden *in vitro* Experimenten gezeigt, deutet dies darauf hin, dass unter Standardpufferbedingungen auch in der korekonstituierten Probe von GLRX5 und BOLA3 nur der homodimere holoGLRX5-GLRX5-Komplex vorliegt. Nachfolgend wurden daher nur noch die GLRX5-BOLA3-Proben in Gegenwart von einer konstanten Konzentration von 5 mM GSH analysiert (GLRX5-BOLA3+GSH). Der vom holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundene Fe/S-Cluster blieb im Vergleich zum Fe/S-Cluster des GLRX5-GLRX5-, sowie des GLRX5-BOLA3+GSH-Komplexes bis zu einem 20-fachen molaren Dithionitüberschuss stabil (Abbildung 35B).



**Abbildung 35: Der Fe/S-Cluster des holoGLRX5-BOLA1-Komplexes ist stabil gegenüber Reduktion.** CD-Spektren nach Titration mit den in der Abbildung gezeigten Konzentration an Dithionit von (A) chemisch rekonstituiertem holoGLRX5 (30 µM), (B) chemisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA1 (30 µM), (C) chemisch korekonstituiertem GLRX5+BOLA3 (30 µM) und (D) chemisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA3+GSH (30 µM). Die CD-Spektren wurden unter anaeroben Bedingungen in Standardpuffer (GLRX5, GLRX5-BOLA1, GLRX5-BOLA3) oder NMR-Puffer (GLRX5-BOLA3+GSH) aufgenommen.

Um die Stabilitätsunterschiede genauer betrachten zu können, wurde weiterführend das Verhalten des Fe/S-Clusters gegenüber Oxidation untersucht (Abbildung 36). Hierzu wurden sowohl der chemisch rekonstituierte holoGLRX5-GLRX5-Komplex als auch die unter anaeroben Bedingungen chemisch korekonstituierten GLRX5-BOLA-Proben (GLRX5-BOLA1 im Standardpuffer, GLRX5-BOLA3+GSH im GSH-haltigem NMR-Puffer) bis zu 120 min in Gegenwart von Luftsauerstoff inkubiert (Abbildung 36A-C), wobei in regelmäßigen Abständen CD-Spektren aufgenommen wurden. Die Signalintensität des Hauptsignals im CD-Spektrum wurde über die Zeit verfolgt. Eine Signalintensität von 100% entspricht dem CD-Signal unter anaeroben Bedingungen (Abbildung 36A-C). In den CD-Spektren wurden keine signifikante Änderung der Signalintensität für den GLRX5-GLRX5- (Abbildung 36A) und die GLRX5-BOLA-Komplexe beobachtet (Abbildung 36B/C), was bedeutet, dass der Fe/S-Cluster gegenüber Oxidation mit Luftsauerstoff stabil ist.



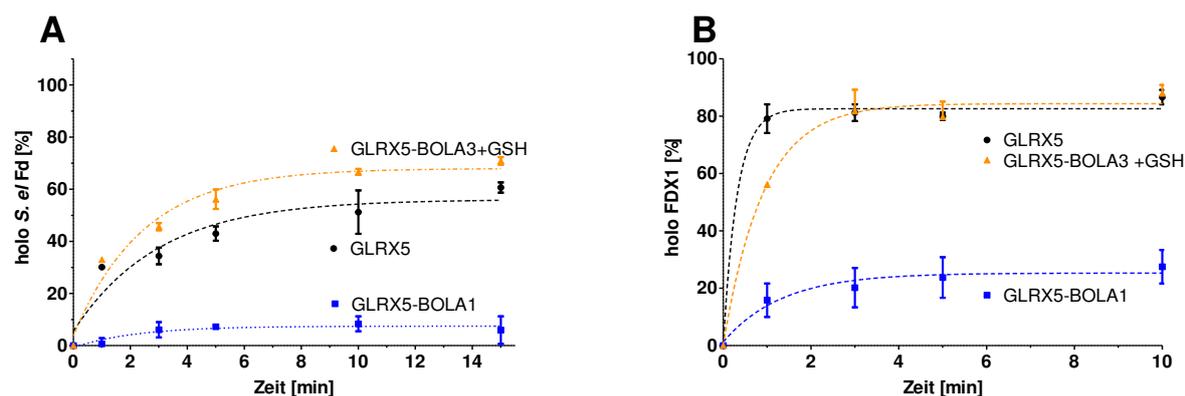
**Abbildung 36: Der holoGLRX5-GLRX5- und die holoGLRX5-BOLA-Komplexe sind gegenüber Luftsauerstoff stabil, aber nicht gegenüber Wasserstoffperoxid. (A-C)** Prozentuale Signalintensitätsänderung der jeweiligen Hauptsignale des holoGLRX5-GLRX5- und holoGLRX5-BOLA-Komplexes. Die anaeroben Proben von **(A)** chemisch rekonstituiertem GLRX5 (schwarz), **(B)** chemisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA1 (blau) und **(C)** chemisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA3 (orange) wurden bei geöffneter Küvette über die Zeit in Gegenwart von Luftsauerstoff gerührt, wobei in regelmäßigen Abständen CD-Spektren der Proben aufgenommen wurden. **(D-F)** CD-Spektren von **(D)** chemisch rekonstituiertem GLRX5, **(E)** chemisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA1 und **(F)** chemisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA3+GSH nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Titrations mit den in der Abbildung dargestellten Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die CD-Spektren wurden in Standardpuffer (GLRX5, GRX5-BOLA1) und NMR-Puffer (GLRX5-BOLA3+GSH) unter anaeroben Bedingungen aufgenommen.

Gegenüber einer Oxidation mit Wasserstoffperoxid waren die GLRX5-BOLA-Komplexe nicht stabil. Der Fe/S-Cluster des GLRX5-BOLA3+GSH-Komplexes (Abbildung 36F) war im Vergleich zum GLRX5-BOLA1-Komplex (Abbildung 36E) interessanterweise labilisiert. Ein völlig anderes Ergebnis wurde für den chemischen rekonstituierten GLRX5-GLRX5-Komplex erhalten. Dieser war gegen das starke Oxidationsmittel  $H_2O_2$  am stabilsten. Die interessanterweise unterschiedliche Sensitivität der holoGLRX5-BOLA-Komplexe gegen Reduktion und Oxidation könnte auf eine differenzierte biologische Rolle der GLRX5-BOLA-Komplexe hindeuten.

#### **3.2.4.4 BOLA1 verhindert im GLRX5-BOLA1-Komplex den Fe/S-Clustertransfer**

Wie in einem früheren Kapitel (Ergebnisse, Kapitel 3.1, Seite 25) gezeigt ist ein Fe/S-Clustertransfer u.a. von der Stabilität des auf einem Donorprotein gebundenen Fe/S-Clusters abhängig. Um den Einfluss der BOLA-Proteine im holoGLRX5-BOLA-Komplex auf die Effizienz eines Fe/S-Transfers zu untersuchen, wurde die Fe/S-Clustertransferfähigkeit des chemisch rekonstituierten GLRX5-GLRX5-Komplexes (Fe/S-Donor) und der korekonstituierten GLRX5-BOLA-Komplexe (Fe/S-Donor) auf die [2Fe-2S]-Apozielproteine *S. el* Fd und FDX1 analysiert (Abbildung 37). Wie oben erwähnt basiert dieses Fe/S-Clustertransfersystem auf der Bildung von holo-Ferredoxin, was an Hand der Reduktion von Cytochrom *c* verfolgt wird (Ergebnisse, Kapitel 3.1, Seite 25).

Der chemisch rekonstituierte GLRX5-GLRX5-Komplex (Fe/S-Donor) bindet einen labilen Fe/S-Cluster, der sowohl auf das Apozielprotein *S. el* Fd als auch auf das humane apoFDX1 transferiert werden kann (Ergebnisse, Kapitel 3.1.2, Seite 28). Auch der im holoGLRX5-BOLA3+GSH-Komplex gebundene Fe/S-Cluster konnte auf apo *S. el* Fd und apoFDX1 transferiert werden. Interessanterweise war der Fe/S-Cluster des holoGLRX5-BOLA3+GSH-Komplexes nach chemischen Korekonstitution von GLRX5 und BOLA3 im Vergleich zu dem Fe/S-Cluster des GLRX5-GLRX5-Komplexes labiler gebunden (Abbildung 34A), wodurch die Transferfähigkeit des Fe/S-Clusters auf das Apozielprotein *S. el* Fd erhöht wurde. Im homologen System mit FDX1 als Apozielprotein hingegen wurde eine zum Transfer des holoGLRX5-Fe/S-Clusters vergleichbare Menge holoFDX1 in Gegenwart des GLRX5-BOLA3+GSH-Komplexes gebildet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass BOLA3 den im GLRX5-BOLA3+GSH-Komplex gebundenen Fe/S-Cluster labilisiert. Im GLRX5-BOLA1-Komplex war die Transferfähigkeit hingegen so stark erniedrigt, dass fast kein Fe/S-Clustertransfer auf *S. el* Fd möglich war (Abbildung 37A). Im humanen Fe/S-Clustertransfersystem wurde ein vergleichbares Ergebnis erhalten (Abbildung 37B).



**Abbildung 37: Der Fe/S-Cluster des GLRX5-BOLA3-Komplexes jedoch nicht der des GLRX5-BOLA1-Komplexes ist auf [2Fe-2S]-Zielproteine übertragbar. (A/B)** Chemisch rekonstituiertes GLRX5 (50  $\mu$ M, schwarz), chemisch korekonstituiertes GLRX5-BOLA1 (50  $\mu$ M, blau) und chemisch korekonstituiertes GLRX5-BOLA3+GSH (50  $\mu$ M, orange) wurden mit **(A)** 25  $\mu$ M apo S. el. Fd oder **(B)** apoFDX1 gemischt und die Bildung von **(A)** holo S. el. Fd und **(B)** holoFDX1 bestimmt (Ergebnisse, Kapitel 3.1, Seite 25). Die Messungen wurden im Fd-Puffer (Abbildung 16) oder FDX1-Puffer (Abbildung 16) in Gegenwart von 25  $\mu$ M Grx1 und 4 mM GSH durchgeführt. Die chemische Rekonstitution wurde zuvor in Standardpuffer (GLRX5, GLRX5-BOLA1) oder in NMR-Puffer (GLRX5-BOLA3+GSH) durchgeführt. Fehlerbalken (n=2) geben die Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen wieder.

Zusammenfassend konnten mittels des Fe/S-Clustertransfersystems die vorherigen Interpretationen der Thermophorese (Ergebnisse, Kapitel 3.2.1, Seite 45) und der CD-Spektroskopie (Ergebnisse, Kapitel 3.2.4, Seite 57) verifiziert werden. Das Fe/S-Clustertransfersystem zeigte, wie auch die reduktiven und oxidativen Stabilitätsuntersuchungen (Ergebnisse, Kapitel 3.2.4.3, Seite 62), dass der im holoGLRX5-BOLA3+GSH-Komplex gebundene Fe/S-Cluster im Vergleich zum Fe/S-Cluster des holoGLRX5-GLRX5-Komplexes labilisiert wird. Der Fe/S-Cluster des GLRX5-BOLA1-Komplexes hingegen wird stabil isoliert und ist daher nicht mehr transferierbar. Die *in vitro* Daten zeigten, dass unter Standardpufferbedingungen in Abwesenheit von GSH eine korekonstituierte GLRX5-BOLA3-Probe sich wie ein chemisch rekonstituierter homodimerer GLRX5-GLRX5-Komplex verhielt, was darauf hindeutet, dass keine heterodimere GLRX5-BOLA3-Komplexbildung vorliegt bzw. nur eine geringe Affinität von BOLA3 zu GLRX5 besteht, die darüber hinaus sensitiv gegenüber Änderungen der Pufferbedingungen ist (Abbildung 32B/C). In Gegenwart von GSH (NMR-Puffer) wurde nach chemischer Korekonstitution von GLRX5 und BOLA3 ein GLRX5-BOLA3+GSH-Komplex gebildet, der den Fe/S-Cluster labil gebunden hatte. Die Daten deuteten allerdings auch darauf hin, dass der gebildete holoGLRX5-BOLA3+GSH-Komplex dissoziiert (Abbildung 32C), da BOLA3 nur eine geringe Affinität zu GLRX5 besitzt. Nach Korekonstitution von GLRX5 mit BOLA1 hingegen zeigten die *in vitro* Methoden die Bildung eines stöchiometrischen definierten holoGLRX5-BOLA1-Komplexes (Abbildung 30A/B/C), dessen [2Fe-2S]-Cluster stabil gebunden und vor Reduktion geschützt ist. Die im holoGLRX5-BOLA1-Komplex an der Koordination des Fe/S-Clusters beteiligten Aminosäuren sind bislang

unklar. Nachfolgend (Ergebnisse, Kapitel 3.3, Seite 67) wird daher die Koordination des im holoGLRX5-BOLA1 gebundenen Fe/S-Clusters charakterisiert.

### 3.3 Untersuchungen zur Koordination des im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters

Die im holoGLRX5-BOLA1-Komplex an der Koordination des Fe/S-Clusters beteiligten Aminosäuren sind bislang unklar. In diesem Kapitel wird daher die Koordination des im holoGLRX5-BOLA1 gebundenen Fe/S-Clusters charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen (Ergebnisse, Kapitel 3.2, Seite 44), dass *in vitro* ein heterodimerer holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebildet wird, in dem der [2Fe2S]-Cluster stabil gebunden wird und gegen Reduktion geschützt ist (Uzarska *et al.*, 2016). Die Koordination des im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters ist bisher allerdings nicht charakterisiert.

Im homodimeren holoGLRX5-GLRX5-Komplex wird der [2Fe-2S]-Cluster von einem Cystein des konservierten CGF-Motivs und des gebundenen Glutathions in der aktiven Stelle pro GLRX5-Monomer koordiniert (Johansson *et al.*, 2011). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass für die Bildung eines heterodimeren holoGLRX5-BOLA1-Komplexes ein Ligandenaustausch stattfindet (Ergebnisse, Kapitel 3.2.2, Seite 48). BOLA1-Liganden müssten bei einem Ligandenaustausch für die Koordination des Fe/S-Clusters im holoGLRX5-BOLA1-Komplex zwei Koordinationsstellen, ein Cysteinrest des CGF-Motivs und ein GSH am GLRX5 ersetzen. Fe/S-Cluster werden hauptsächlich durch Cysteine koordiniert. Als Liganden können neben Cysteinen allerdings auch Histidine fungieren (Bak und Elliott, 2014). Multi-Primärsequenzvergleiche von BOLA1-verwandten Unterfamilien (Abbildung 38A) zeigen, dass BOLA1 keine konservierten Cysteine, dafür aber mehrere konservierte Histidine (H58, H67, H86 und H102), besitzt (Abbildung 38A).

Die Histidine H58 und H67, die im *beta* ( $\beta$ )-Faltblatt  $\beta 2$ , wie auch zwischen  $\beta 1$  und  $\beta 2$  in der Schleife sitzen und als potentielle Fe/S-Clusterliganden für BOLA1 fungieren könnten, liegen strukturell in der Nähe des konservierten und essentiellen H102 (Abbildung 38B) (Melber *et al.*, 2016). Zusätzlich zu den drei strukturell sehr naheliegenden Histidinen H102, H67 und H58 besitzt BOLA1 auch noch ein konserviertes Histidin H86 in der *alpha* ( $\alpha$ )-Helix  $\alpha 2$  und ein nur in höheren Eukaryoten vorkommendes H90 (Abbildung 38A). Da diese beiden Histidinreste weit von der per NMR definierten Interaktionsstelle zu GLRX5 entfernt liegen, kommen sie wahrscheinlich nicht als Fe/S-Clusterliganden in Betracht. Die bisherige Literatur zu Grx-BolA-Komplexen postuliert, dass der [2Fe-2S]-Cluster durch das konservierte C-terminale Histidin (H102 in BOLA1) koordiniert wird (Li *et al.*, 2011; Nasta *et al.*, 2017). Die Histidine des humanen holoGLRX5-BOLA1-Komplexes wurden bislang biochemisch nicht charakterisiert.

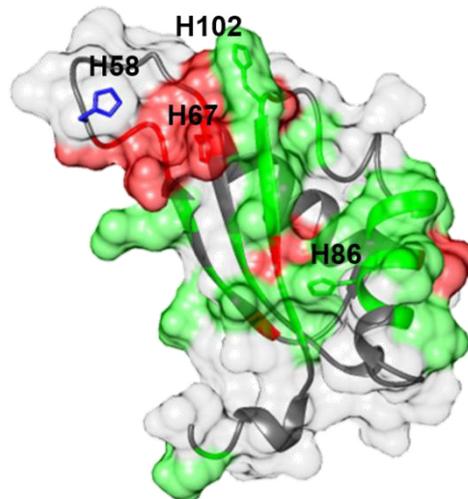
*In vivo* konnte der Wachstumsdefekt einer mit *bol1*H93A (entspricht humanem H102) transformierten *bol1/bol3* $\Delta$ -Hefezelle auf Glycerol/Laktat-Medium nicht komplementiert werden (Melber *et al.*, 2016), was für die essentielle Funktion dieses Histidinrestes spricht.

**A**

<i>S. c. Boli</i>	MF KRAMSTDGVF ARTILKRLEC GFDPDYKNFAF GLYNDSHRKK GHAGVQGNVS A-ETHPRIEM VSRKFEGLKL PQRHRMVYSL LQDEMAQANG --IHALQLSL 130
Ashbya	MFAPFV KRMLSQASSL PANMSTCGPI SEQIKLKVRE RFPDLRHFA -IYNDYKHA GHAGMEHAAN RTESHLRLEV VSEQFSGMAL FRHRLLYTL LDDEIKH-HG --VHALQLTT
Candida	MLRSFI RRMSSAKPFO ISHSETPGPI ESSIIISKITN EFKPL-YFK -IDNDSHKA HHAGIRGAKN KTESHFRLEI VSDVFEKSL PARHRLVYSL LANELKN-DG --VHALQKMT
Yarrowia	MLRI RFVLRQTTLL RHMSSNTPI TDAINSRVKQ EFTPV-FFK -VNDSHKHA HHAMRGSDN TIESHFRLLTI VSDKFEKSA PIRHRMVYKL FEEMAQPNG --LHALSLTT
Magnaporthe	MASNTFM EDAIRTKISA TFQPS-RLE -IHNDSHLHA HHKAMGGSTS R-ETHFRVLV TSEQFRSKNO PARHRAIYSL LKDEMAKEGG --IHALQLKT
Aspergillus	MLPIR SRPGLLEPRL FSPLRTLLP RMSSTSATEM EDTIREKITA AFSPS-TLI -IRNDSHLHA HHAFMGGVTS K-ETHFRVTI TSSAFQSKMO PARHRMVYSL LKDEMSREGG --IHALQLRT
Neurospora	MASSTVT SESFSSTFM EDAIREKITT HLAFR-TLQ -IHNDSHLHA HHAMRGVTS R-ETHFRVVI SDAFKRKMQ PARHRLVYGL LKDEMAKEGG --IHALQLRT
Chaetherm	MASKTFV EDAIREKINA ALKPT-RLE -IYNDSHLR HHAMVGNST T-ETHFRLVI TSDAFQSKMO PARHRMVYAL LKDEMSREGG --IHALQLTT
Schizosacc	M IRRFFHTMGR QDRIVYKTLSE ALTKDKIT-- -LYNDSYKHA HHAMKGVPP TNETHFRLEI VSPFSGMSR VARHRLVYGL LKDEFD--GG --LHALQITS
Danio	MDPSVPRPV ETTIIRTKLQ ALNPEHLEVI NESHRHVVPP GSESHFRVLV VSLQFEGLSL LQRHRLVNET LKEELSTC-- --IHALSIQA
Canis	ML SGQLVRHLES MAGRVCLSR SAGLGTIGFV EAAIRTKLEQ ALNPEHLEVR NESDRAVPP GSETHFRVAV VSRFEGLSL LQRHRLVHAA LSEELAGR-- --VHALAIOT
Bos	ML SGQLVRLFS MASRVCMERG SAGSGVIGFV EAAIRTKLEQ ALNPEVLELR NESGCHVPP GSETHFRVAV VSRFEGLSL LQRHRLVHAA LSEELAGR-- --VHALAIQA
<i>h. s. BOLA1</i>	ML SGRLVLGLVS MAGRVCLCG SAGSGAIGFV EAAIRTKLEE ALSPEVLELR NESGCHVPP GSETHFRVAV VSRFEGLSL LQRHRLVHAA LAEELGGP-- --VHALAIQA
Ciona	MSFTLHTIT HRVLKPGYKL SRSELSRIQ KDIVTNSFY SMDSNLGV QOTIQEKLES FYKPTYLEVV NESYHVVPP GSESHFRVVV VSDIFDQOSH IQRHGVNHL LKEELSGK-- --IHALSIQA
Dictyoste	M IRNLINGQLF KTSIETVKVR YFVNNNNNN NNNNGGGEPI KNTIIEKLSN QFKPIHLDVV NESYHVVPP GSETHFRVVI VSDIFNGKSV VAGHRLINDT LKNEMKNG-- --VHALSIC
Drosophila	MLNFTLRLRT GVSIRNLNQL TPTISSLGG- ---ILPRATM SQEAGQVPI ESAMRKALMT ELKPVYLEVI NESPCNVPP RSETHFRVAV VSRFEGLSL IQRHRLVNDT VKNALKEAGF EPHHALSIEA
Apis	MTQNPVI ELSIKKLLID FLNPSYIEVI NESYHVVSK GSETHFRVIV VSDLFKDKPL IQRHGMINKL LAEELQGG-- --VHALSIVA
Caenorhab	MSTLSEGVF ARLLKEKLEFA AFQPKHLEVE CESHANVPP GAETHFRVOV VSDEFEGKRV IQRHRLVNTC LAELALATT-- --VHALRIDA

58                      67                      86    90                      102

**B**



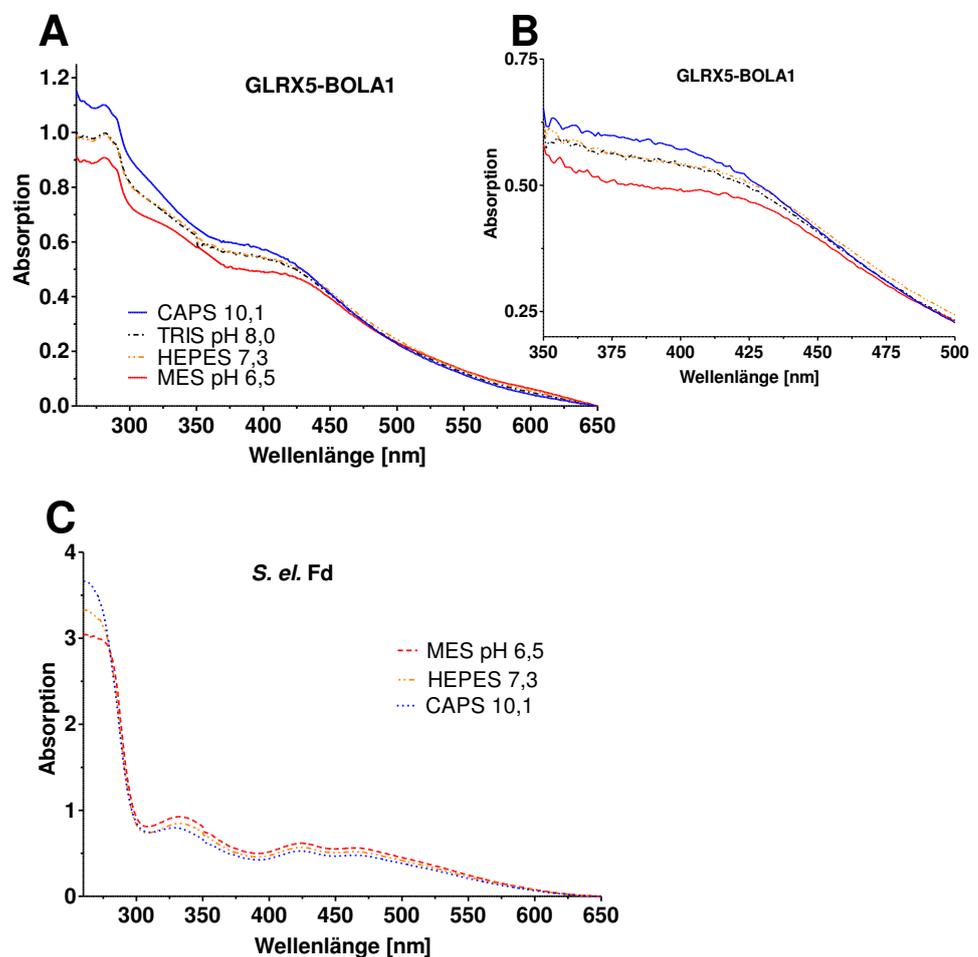
**Abbildung 38: BOLA1 besitzt mehrere konservierte Histidine, die einen Fe/S-Cluster koordinieren könnten. (A)** Sequenzvergleich von BOLA1-Homologen. Hervorgehoben sind die konservierten Histidine und die Aminosäuren der mit NMR-Spektroskopie gelösten humanen BOLA1-Struktur. **(B)** Struktur des BOLA1-Proteins mit den konservierten Histidinen H102, H86, H67 und H58. Das in der  $\alpha$ -Helix sitzenden H90 ist nicht konserviert und nur im humanen BOLA1 zu finden. Grün markiert sind die Regionen mit signifikanten chemischen Verschiebungen sowohl bei apo- als auch holoGLRX5-BOLA1-Komplexbildung. Regionen, die nur im holoGLRX5-BOLA1-Komplex chemische Verschiebungen aufweisen, sind rot markiert. Modifizierte Abbildung nach Uzarska *et al.* 2016. PDB 5LCI.

Um die biochemische Funktion der Histidine des BOLA1 im GLRX5-BOLA1-Komplex zu charakterisieren, wurden verschiedene *in vitro* Methoden, wie analytische Gelfiltration, UV/Vis- und CD-Spektroskopie durchgeführt (Ergebnisse, Kapitel 3.3.1, Seite 69). Zusätzlich zur *in vitro* Charakterisierung wurde auch eine *in vivo* Analyse der konservierten Histidine vorgenommen (Ergebnisse, Kapitel 3.3.2, Seite 79).

### 3.3.1 *In vitro* Charakterisierung der Histidine des BOLA1-Proteins

#### 3.3.1.1 Der [2Fe-2S]-Cluster im holoGLRX5-BOLA1-Komplex wird von einem Histidin koordiniert

Die Koordination eines Fe/S-Clusters durch ein Histidin bewirkt bei unterschiedlichen pH-Werten, bedingt durch Protonierung und Deprotonierung des im Imidazolring sitzenden Stickstoffs, eine charakteristische Verschiebung im sichtbaren Bereich des UV/Vis-Spektrums (Kuilu *et al.*, 1992). Um zu überprüfen, ob eine Koordination des im GLRX5-BOLA1-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters durch ein BOLA1-Histidin vorliegt, wurde der korekonstituierte GLRX5-BOLA1-Komplex unter anaeroben Bedingungen in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten durch UV/Vis-Spektroskopie untersucht (Abbildung 39A/B).



**Abbildung 39: Der [2Fe-2S]-Cluster im holoGLRX5-BOLA1-Komplex ist Histidin koordiniert. (A)** UV/Vis-Spektrum im Bereich von 260 nm - 650 nm von chemisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA1 bei verschiedenen pH-Werten im Bereich von pH 6,5 - 10,1 (CAPS (— blau): pH 10,1, Tris-HCl (— grü): pH 8,0, HEPES (— — schwarz): pH 7,3 und MES (— rot): pH 6,5. **(B)** Ausschnitt aus **(A)** im Bereich von 350 nm - 500 nm. **(C)** UV/Vis-Spektrum von holo *S. el. Fd* im Bereich von 260 nm - 650 nm bei verschiedenen pH-Werten im Bereich von pH 6,5 - 10,1 (CAPS (— — blau): pH 10,1, HEPES (— — schwarz): pH 7,3 und MES (— — rot): pH 6,5). Alle Puffer enthielten zusätzlich zu 50 mM CAPS/Tris/HEPES oder MES noch 150 mM NaCl und 5% Glycerin.

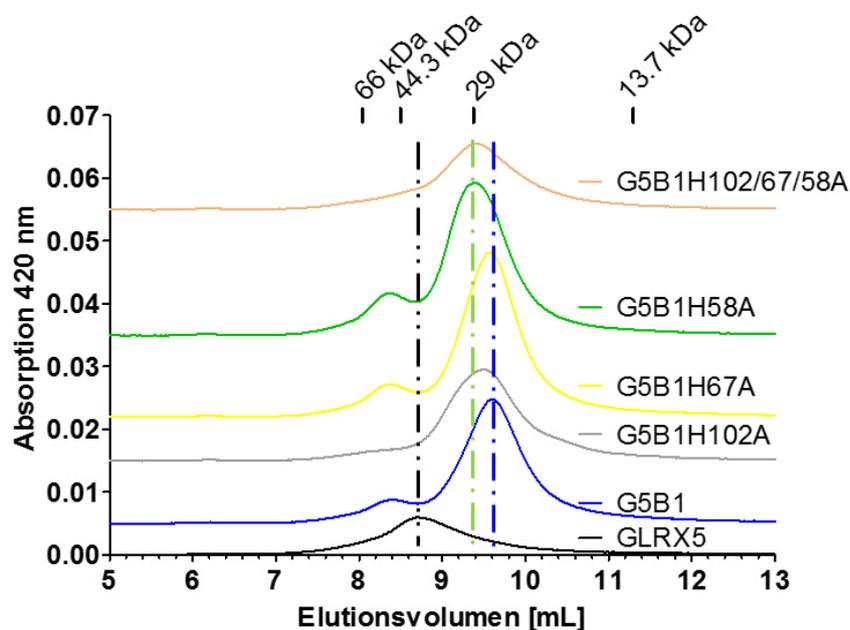
Als Kontrollprotein wurde holo *S. el. Fd*, dessen Fe/S-Cluster von Cysteinen koordiniert wird, verwendet (Abbildung 39C). Bei pH-Werten von pH 7,3 bzw. pH 8,0 verlaufen die holoGLRX5-BOLA1-UV/Vis-Spektren identisch. Bei höheren pH-Werten (CAPS pH 10.1) ist das Absorptionsmaximum bei 408 nm (Tris PH 8,0, HEPES 7,3) zu niedrigeren Wellenlängen (399 nm) Blau-verschoben, was auf eine Koordination des GLRX5-BOLA1-Fe/S-Clusters durch ein Histidin hindeutet (Kuila *et al.*, 1992). Das erhaltene Ergebnis war konsistent mit der Literatur, in der für eine Koordination eines Fe/S-Clusters durch ein Histidin eine Verschiebung des UV/Vis-Spektrums zu niedrigeren Wellenlängen beobachtet wurde (Kuila *et al.*, 1992). Bei höheren pH-Werten zeigten sich zusätzlich zur Verschiebung der Absorptionsmaxima auch Unterschiede im Verlauf der UV/Vis-Spektren, was auf eine Histidinkoordination hindeutet. Die Abhängigkeit des spektralen Verlaufs der UV/Vis-Spektren vom pH-Wert legte nahe, dass im GLRX5-BOLA1-Komplex der Fe/S-Cluster mittels eines oder mehrerer BOLA1-Histidine koordiniert wird. Wie in dem Sequenzvergleich (Abbildung 38A) erkenntlich, gibt es mehrere Histidine, die als potentielle Fe/S-Clusterliganden fungieren könnten. Im Nachfolgenden wird daher versucht, die genaue biochemische Funktion der konservierten Histidine zu charakterisieren.

### **3.3.1.2 His102 ist im holoGLRX5-BOLA1-Komplex nicht essentiell für die Fe/S-Clusterkoordination**

Um zu testen, welches der konservierten Histidine (Ergebnisse, Abbildung 38A, Seite 68) in die [2Fe-2S]-Clusterkoordination des holoGLRX5-BOLA1-Komplexes involviert ist, wurden Punktmutationen der Histidine (H) zu Alanin (A) vorgenommen. Nachfolgend wird zur Vereinfachung der Begriff eines GLRX5-BOLA1mut-Komplexes eingeführt, mut steht hierbei stellvertretend für die jeweilige Mutation (mut: H102A, H67A, H58A oder H102/67/58A).

Damit auftretende Stabilitätsunterschiede des Fe/S-Clusters in einem holoGLRX5-BOLA1mut-Komplex nicht durch fehlerhaft gefaltete BOLA1mut-Proteine zu Stande kommen, wurde die Faltung der mutierten Proteine mit CD-Spektroskopie im UV-Bereich verfolgt. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede (Anhang, Abbildung 69A-J, Seite 141). Durch die Analyse der Proteinfaltung, konnte gezeigt werden, dass Unterschiede der GLRX5-BOLA1mut-Komplexe nicht durch fehlerhaft gefaltete Proteine, sondern tatsächlich durch die jeweilige eingeführte Mutation verursacht werden. Um zu überprüfen, ob nach chemischer Korekonstitution von GLRX5 mit BOLA1mut-Proteinen ein heterodimerer Holokomplex gebildet wird, wurde eine analytische Gelfiltration im anaeroben Standardpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5% Glycerin) per HPLC (Shodex 802.5-Säule) bei 420 nm zur Detektion des Fe/S-Clustersignals wie in Kapitel 3.2.2 (Seite 48) durchgeführt (Abbildung 40). Unabhängig von der eingefügten BOLA1-Mutation interagierten alle BOLA1mut-Proteine mit GLRX5 und bildeten einen GLRX5-BOLA1mut-Komplex. Wie in Kapitel 3.2.2 (Seite 48) beobachtet, könnte es sich

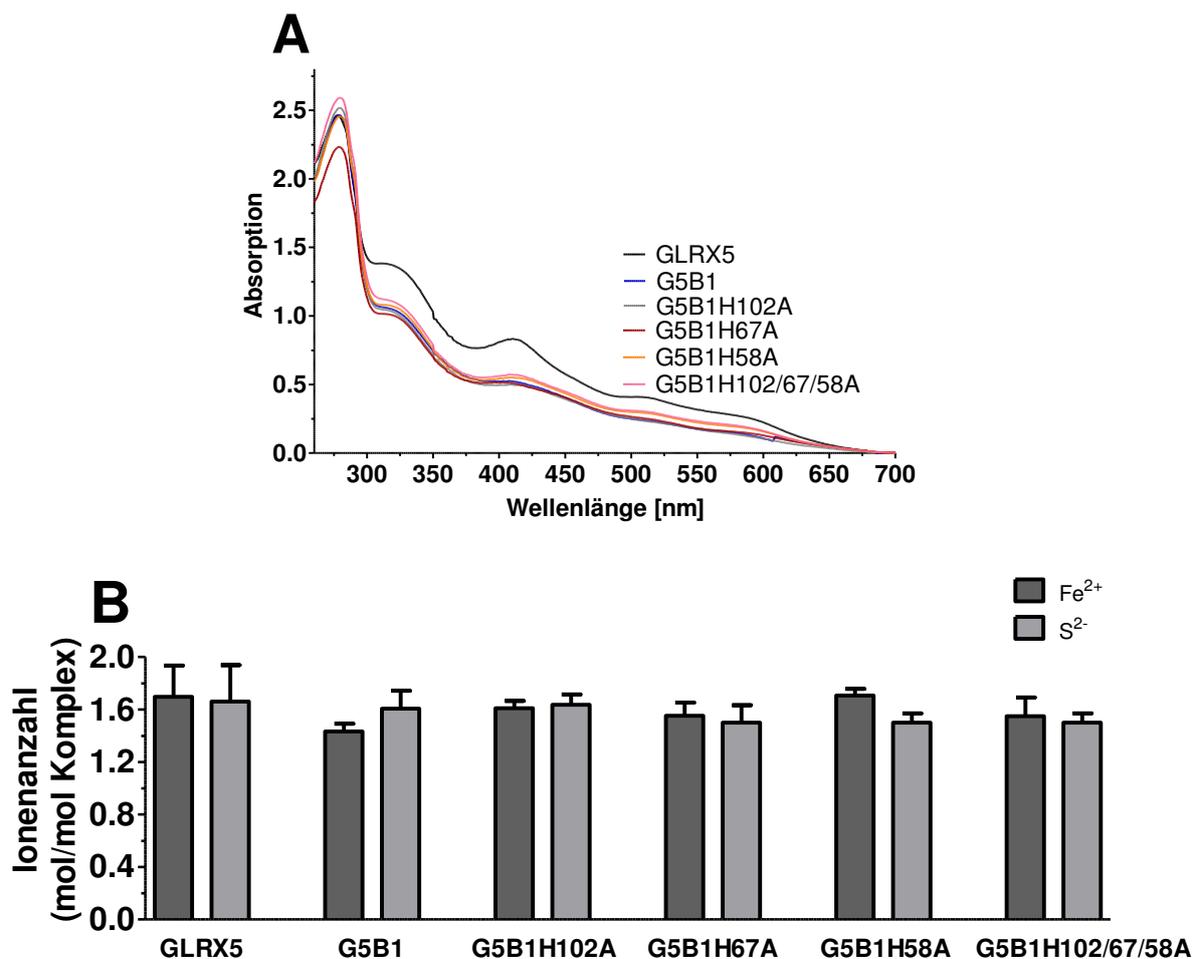
hierbei auch um einen apoGLRX5-BOLA1mut-Komplex handeln. Da allerdings bei 420 nm (Fe/S-Clustersignal) ein Signal im Elutionsverlauf detektiert wurde, muss es sich hierbei um einen Holokomplex gebundenen Fe/S-Cluster handeln. Es konnte bereits gezeigt werden (Ergebnisse, Kapitel 3.2.2, Abbildung 27, Seite 50), dass Unterschiede im Elutionsvolumen eines homodimeren holoGLRX5-GLRX5- und heterodimeren holoGLRX5-BOLA1-Komplexes auftreten, was Rückschlüsse auf die Bildung eines holoGLRX5-BOLA1-Komplexes zuließ. Das unterschiedliche Elutionsverhalten der beiden Komplexe lässt auf die Bildung eines GLRX5-BOLA1mut-Komplexes schließen. Die holoGLRX5-BOLA1mut-Komplexe unterschieden sich allerdings im Elutionsverhalten untereinander, was durch unterschiedliche Quartärstrukturen der Komplexe bedingt sein könnte. Der holoGLRX5-BOLA1mut-Komplex mit den Alaninsubstitutionen H102A/67/58A wies die geringste Intensität bei 420 nm auf, was darauf schließen lässt, dass der Fe/S-Cluster nur noch labil gebunden ist und spontan zerfällt.



**Abbildung 40: Bildung eines holoGLRX5-BOLAmut-Komplexes nach Mutation der konservierten Histidine.**

Elutionsprofil der analytischen Gelfiltration von stöchiometrisch rekonstituiertem holoGLRX5 (schwarz), chemisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA1 (blau, aufgesetzt um OD 0,005), chemisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA1 H102A (grau, aufgesetzt um OD 0,015), chemisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA1 H67A (gelb, aufgesetzt um OD 0,021), chemisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA1 H58A (orange, aufgesetzt um OD 0,035) und chemisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA1 H102/67/58A (gelbbraun, aufgesetzt um OD 0,055) bei 420 nm. Die analytische Gelfiltration wurde wie in Abbildung 27 durchgeführt.

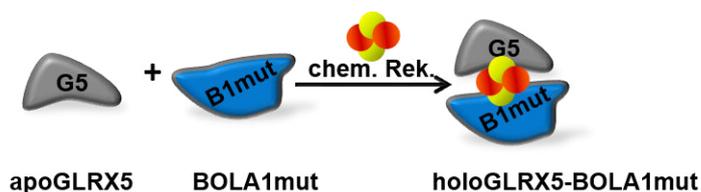
Alle GLRX5-BOLA1mut-Komplexe konnten trotz einer Alaninsubstitution der konservierten Histidine einen Fe/S-Cluster binden. Zusätzlich zur analytischen Gelfiltration unter anaeroben Bedingungen wurde ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen und der Eisen- und Sulfidgehalt der holoGLRX5-BOLA1mut-Proben bestimmt, um die Art des gebundenen Fe/S-Clusters zu charakterisieren (Abbildung 41).



**Abbildung 41: Mutation der konservierten Histidine führt nicht zum Verlust der Fe/S-Clusterbindung im holoGLRX5-BOLA1mut-Komplex.** UV/Vis-Spektroskopie im Bereich von 260 nm – 700 nm von chemisch rekonstituiertem GLRX5 (schwarz) und den chemisch korekonstituierten GLRX5-BOLA1mut-Komplexen: GLRX5-BOLA1 (blau), GLRX5-BOLA1H102A (grau), GLRX5-BOLA1H67A (rot), GLRX5-BOLA1H58A (orange) und GLRX5-BOLA1H102/67/56A (gelb). (B) Eisen- und Sulfidionenbestimmung von GLRX5, GLRX5-BOLA1 (G5B1) und den GLRX5-BOLA1mut-Komplexen G5B1H102A, G5B1H67A, G5B1H58A und G5B1H102/67/58A. Alle UV/Vis-Spektren wurden in Standardpuffer mit einer Proteinkonzentration von 100  $\mu$ M durchgeführt. Fehlerbalken deuten die Standardabweichung SD ( $n = 3$ ) an.

Das UV/Vis-Spektrum der holoGLRX5-BOLA1-Einzelmutanten (H102A, H67A, H58A) als auch der GLRX5-BOLA1-Dreifachmutante (H102/67/58A) deutete darauf hin, dass trotz Mutation der potentiellen Fe/S-Clusterliganden ein [2Fe-2S]-Cluster mit charakteristischen Maxima bei 320, 420, 520, 600 nm im holoGLRX5-BOLA1mut-Komplex gebunden wurde. Die Analyse des Eisen- und Sulfidionengehaltes mit jeweils  $\sim 1,6$  Fe<sup>2+</sup>- und  $\sim 1,6$  S<sup>2-</sup>-Ionen pro Proteinkomplex legte nahe, dass es sich bei dem im heterodimeren holoGLRX5-BOLA1mut-Komplex gebundenen Fe/S-Cluster um einen GLRX5-BOLA1mut verbrückten [2Fe-2S]-Cluster handelt.

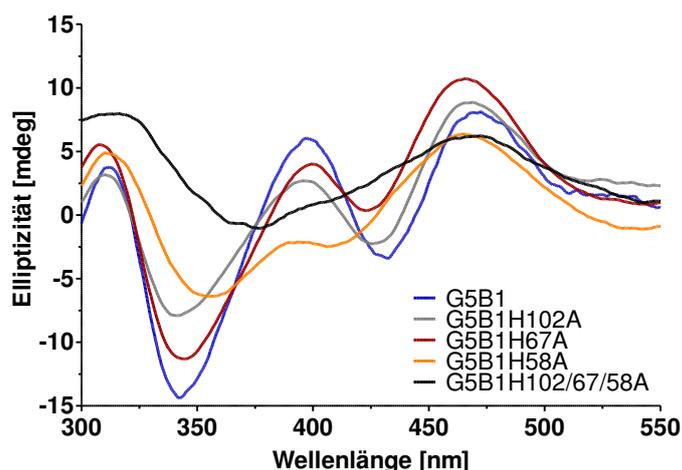
Zusammenfassend bildet sich auch nach Korekonstitution von GLRX5 mit BOLA1mut ein heterodimerer holoGLRX5-BOLA1mut-Komplex. Der im holoGLRX5-BOLA1mut-Komplex gebundene Fe/S-Cluster wird unabhängig von der eingefügten Mutation koordiniert. Damit kann keinem der konservierten Histidine eine bedeutende Rolle bei der Koordination des [2Fe-2S]-Clusters zugeordnet werden.



mut: H102A, H67A, H58A, H102/67/58A

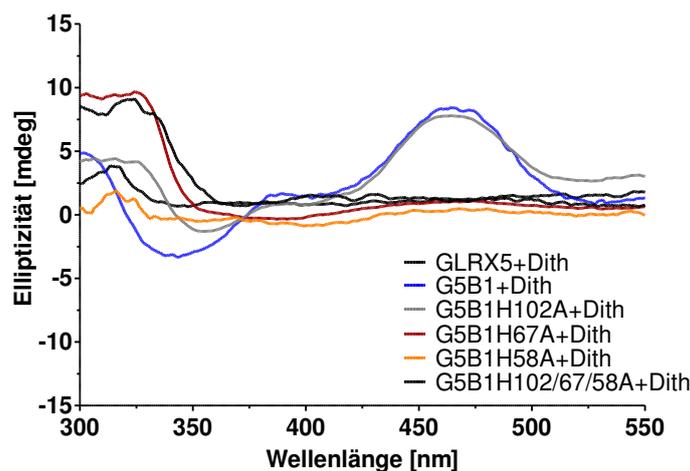
**Abbildung 42: BOLA1 interagiert unabhängig von einer eingeführten Histidinmutation (H/A) mit GLRX5 zu einem GLRX5-BOLA1mut-Komplex.**

Auch die Untersuchung der holoGLRX5-BOLA1mut-Komplexe mit CD-Spektroskopie führte zu einer ähnlichen Schlussfolgerung (Abbildung 43). Zusätzlich zu den in der Abbildung 43 gezeigten Mutationen der drei konservierten Histidine (H102A, H67A, H58A) wurde auch das Histidin H90 und H86 zu Alanin mutiert (H90A, H86A) und deren Auswirkung auf das spektroskopische Verhalten untersucht (Anhang, Abbildung 68A-F, Seite 140). Es zeigten sich allerdings keine Veränderungen des holoGLRX5-BOLA1mut-Komplexes (mut: H90A, H86A) im CD-spektroskopischen Verhalten im Vergleich zum holoGLRX5-BOLA1-Komplex. Diese Alaninsubstitutionen wurden daher nicht weiter charakterisiert.



**Abbildung 43: Mutationen der konservierten Histidine führen zu einer Veränderung aber nicht zum Verlust des im holoGLRX5-BOLA1mut-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters.** Unter anaeroben Bedingungen aufgenommene CD-Spektren von chemisch rekonstituiertem GLRX5 (schwarz), korekonstituiertem GLRX5-BOLA1 (blau) und den jeweiligen korekonstituierten Proben von GLRX5-BOLA1H102A (grau), GLRX5-BOLA1H67A (rot), GLRX5-BOLA1H58A (orange) und GLRX5-BOLA1H102/67/56A (schwarz). Alle CD-Spektren wurden in Standardpuffer mit einer Proteinkonzentration von 150  $\mu$ M aufgenommen.

Die nachfolgende Betrachtung der CD-Spektren ist immer auf den Vergleich zum holoGLRX5-BOLA1-Komplex bezogen. In der CD-Spektroskopie zeigte sich, dass nach Korekonstitution von stöchiometrischen Mengen GLRX5 mit BOLA1H67A oder BOLA1H58A spektrale Änderungen im CD-Spektrum auftraten. Der holoGLRX5-BOLA1H67A-Komplex war signifikant 6 nm Blau-verschoben. Das Signal bei ~460 nm ist bei gleicher Konzentration um etwa 15% stärker, bei ~400 nm und ~345 nm hingegen um ~30% abgeschwächt. Der holoGLRX5-BOLA1H58A-Komplex war auch signifikant um ~8 nm Blau-verschoben, wobei das Maximum bei ~460 nm um 30% abgeschwächt ist. Im Bereich von ~400 nm ist anstelle eines Maximums nur noch eine Schulter erkennbar, die um fast 90% der Signalintensität des holoGLRX5-BOLA1 Maximums abgeschwächt wurde. Das Minimum ist um ~10 nm Rot-verschoben und spektral um 60% vermindert. Das CD-Spektrum des holoGLRX5-BOLA1H102A-Komplexes hingegen weist eine ähnliche Signalintensität bei ~460 nm auf und ist nur um ~2 nm Blau-verschoben. Das zusätzliche Maximum bei ~400 nm und das Minimum bei ~345 nm ist nicht signifikant verschoben, obwohl die Signalintensität um ~50% verringert ist. Die Alaninsubstitution der drei Histidine H102, H67 und H58 im holoGLRX5-BOLA1H102/67/58A-Komplex führte zu einer starken Änderung des CD-Spektrums, aber nicht zum Verlust des im holoGLRX5-BOLA1H102/67/58A-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters. Wie in den holoGLRX5-BOLA1H67A- und holoGLRX5-BOLA1H58A-Komplexen war das Maximum des holoGLRX5-BOLA1H102/67/58A-Komplexes bei ~460 nm ~6 nm Blau-verschoben, wobei das Maximum zusätzlich noch stark verbreitert war. Im Gegensatz zu allen anderen GLRX5-BOLA1mut-Komplexen (mut: H102A, H67A, H58A) gab es keine drei Extrema. Zusätzlich zum Maximum bei ~460 nm lag nur noch ein Minimum bei ~375 nm vor. Dieses war im Vergleich zu den Extrema der anderen GLRX5-BOLA1mut-Komplexe (mut: H102A, H67A, H58A) signifikant um ~15 nm Rot-verschoben und nur schwach ausgeprägt. Es wurde bereits die Dithionitsensitivität der holoGLRX5-BOLA-Komplexe beschrieben (Ergebnisse, Kapitel 3.2.4.3, Abbildung 35, Seite 63). Um den Einfluss der Substitution eines Histidins durch ein Alanin im holoGLRX5-BOLA1mut-Komplex zu untersuchen, wurden die holoGLRX5-BOLA1mut-Komplexe mit 2 mM Dithionit behandelt. Eine Alaninsubstitution eines koordinierenden Histidins sollte einen Einfluss auf die Stabilität des im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters haben. Die CD-spektroskopische Verfolgung einer Änderung der Fe/S-Clusterstabilität nach Dithionitzugabe kann daher einen Rückschluss auf die Fe/S-Clusterkoordinierung zu lassen. Die Stabilität des Fe/S-Clusters in dem chemisch korekonstituierten GLRX5-BOLA1mut-Komplexen (mut: H102A, H67A, H58A, H102/67/58A) wurde in der Gegenwart von 2 mM Dithionit (Abbildung 44) CD-spektroskopisch untersucht. Das CD-spektroskopische Verhalten der GLRX5-BOLA1mut-Komplexe in Gegenwart von 2 mM Dithionit ist in Tabelle 3 (Seite 76) vereinfacht zusammengefasst.



**Abbildung 44: Nach Mutation der konservierten Histidine ist nur noch der holoGLRX5-BOLA1H102A-Komplex gegen Reduktion geschützt. (A)** Unter anaeroben Bedingungen aufgenommene CD-Spektren von chemisch rekonstituiertem GLRX5 (schwarz), chemisch korekonstituiertem GLRX5-BOLA1 (blau) und den jeweiligen dargestellten korekonstituierten Proben von GLRX5-BOLA1H102A (grau), GLRX5-BOLA1H67A (rot), GLRX5-BOLA1H58A (orange) und GLRX5-BOLA1H102/67/56A (schwarz) nach Zugabe von Dithionit (Endkonzentration 2 mM). Alle CD-Spektren wurden in Standardpuffer mit einer Proteinkonzentration von 150  $\mu$ M aufgenommen.

Im CD-Spektrum sowohl des holoGLRX5-BOLA1H67A- als auch des holoGLRX5-BOLA1H58A-Komplexes war eine Labilisierung des Fe/S-Clusters durch Reduktion mit Dithionit zu beobachten. Widererwartend war die Alaninsubstitution des in der Literatur (Li *et al.*, 2011; Nasta *et al.*, 2017; Roret *et al.*, 2014) als Fe/S-Clusterligand postulierten H102 im holoGLRX5-BOLA1H102A-Komplex gegenüber Dithionit stabil, die der strukturell zum H102 naheliegenden konservierten Histidine H67 und H58 allerdings nicht (Abbildung 38B/C). Mit Hilfe von BOLA1-Doppelmutanten (Tabelle 3, Seite 76) konnte reproduziert werden, dass im holoGLRX5-BOLA1mut-Komplex (mut: H67A, H58A) sowohl das H67 als auch das H58 für die Labilisierung des gebundenen Fe/S-Clusters verantwortlich war. Wurde in einen holoGLRX5-BOLAmut-Komplex (mut: H102A, H90A, H86A) mit einem gegen Reduktion geschützten Fe/S-Cluster die Mutation H67A oder H58A eingeführt, dann war der zunächst stabil gebundene Fe/S-Cluster nicht mehr gegen Dithionitreduktion geschützt und wurde labilisiert (Anhang, Abbildung 68, Seite 140). Dies deutet darauf hin, dass die Histidine H67 und H58 eine Funktion bei der Koordination des im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundenen Fe/S-Cluster wahrnehmen könnten. Die Alaninsubstitution der nicht konservierten Histidine H86 und H90 hatten keinen Einfluss auf die Stabilität des gebundenen Fe/S-Clusters im GLRX5-BOLA1mut-Komplex (Tabelle 3, Seite 76).

**Tabelle 3: Zusammenfassung der CD-spektroskopischen Beobachtungen der untersuchten holoGLRX5-BOLA1mut-Komplexe nach Dithionitzugabe.** Schwarz hervorgehoben sind die über verschiedene Organismen konservierten Histidine. Die aufgeführten holoGLRX5-BOLA1-Doppelmutanten sind im Anhang (Seite 140) zu finden. + : stabil gegen Zugabe von 2 mM Dithionit, - : labil gegen Zugabe von 2 mM Dithionit.

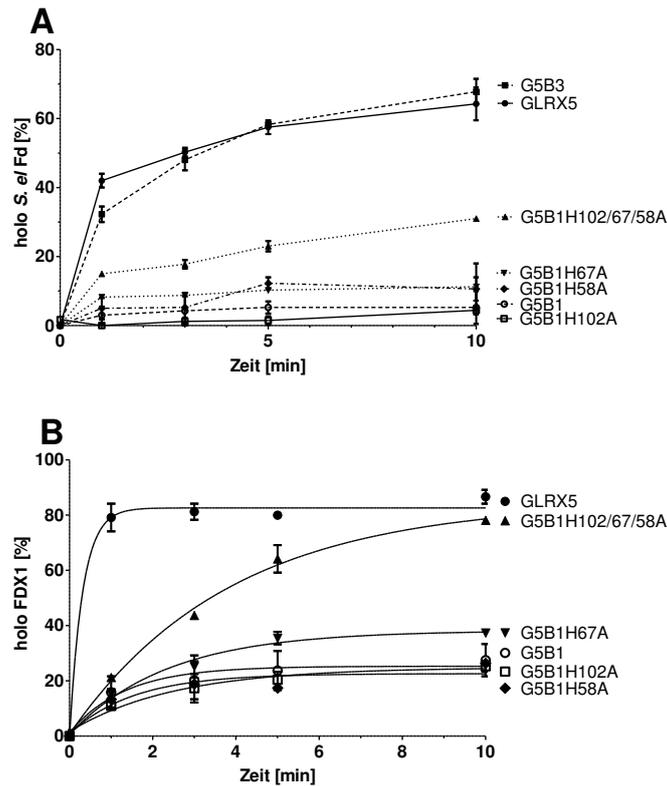
Korekonstituierte Komplexe	Dithionitstabilität
GLRX5	-
G5B1	+
G5B1 <b>H102A</b>	+
G5B1 <b>H90A</b>	+
G5B1 H86A	+
G5B1 <b>H67A</b>	-
G5B1 <b>H58A</b>	-
G5B1 <b>H102A/H58A</b>	-
G5B1 <b>H102A/H67A</b>	-
G5B1 <b>H102A/H90A</b>	+
G5B1 <b>H102A/H86A</b>	+
G5B1 <b>H102A/H67A/H58A</b>	-
G5B1 <b>H102A/H86A/H67A</b>	-
G5B1 <b>H102A/H90A/H58A</b>	-

Mittels CD-Spektroskopie wurden spektrale Änderungen der holoGLRX5-BOLA1mut-Komplexe (mut: H67A, H58A, H102/67/58A), bedingt durch eine Änderung des Fe/S-Clusterumgebenden Umfeldes, im Vergleich zum holoGLRX5-BOLA1-Komplex festgestellt. Der Fe/S-Cluster dieser Komplexe war labiler und nicht mehr gegenüber Reduktion geschützt. Dies deutet darauf hin, dass die beiden Reste eine stabilisierende Rolle bei der Fe/S-Clusterkoordination wahrnehmen könnten, da eine Substitution zum Verlust des Fe/S-Clusters nach Dithionitzugabe führt. Der holoGLRX5-BOLA1H102A-Komplex hingegen wies im CD-Spektrum die gleichen Extrema wie der GLRX5-BOLA1-Komplex auf, was darauf hindeutet dass eine Alaninsubstitution des H102 keinen wesentlichen Einfluss auf den im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundenen Fe/S-Cluster hat und daher kein essentieller Fe/S-Clusterligand ist.

### 3.3.1.3 Nur der holoGLRX5-BOLA1H102/67/58A-Komplex kann einen Fe/S-Cluster auf [2Fe-2S]-Proteine übertragen

Ein Fe/S-Clustertransfer hängt wie bereits gezeigt (Ergebnisse, Kapitel 3.1.2, Seite 28) u.a. von der Stabilität der Fe/S-Clusterbindung im Donorprotein ab. Um die Stabilität der Fe/S-Clusterbindung und Fähigkeit der holoGLRX5-BOLA1mut-Komplexe (mut: H102A, H67A, H58A, H102/67/58A), einen Fe/S-Cluster auf ein Apozielprotein zu transferieren, zu untersuchen, wurden wie in Kapitel 3.2.4.4 (Seite 65) Fe/S-Clustertransferexperimente sowohl mit apo *S. el. Fd* (Abbildung 45A) als auch mit humanen apoFDX1 (Abbildung 45B) als Akzeptorprotein durchgeführt. Gemessen wurde die prozentual entstandene Menge an holo-Ferredoxin (Ergebnisse, Kapitel 3.1, Seite 25). Die Menge an gebildeten Ferredoxin ist ein Maß für die Transferfähigkeit eines Fe/S-Clusterdonorproteins. Der Fe/S-Transfer von den holoGLRX5-BOLAmut-Komplexen (mut: H102A, H67A, H58A, H102/67/58A) auf apo *S. el. Fd* (Abbildung 45A) oder humanes apoFDX1 (Abbildung 45B) war ähnlich effizient. Nach 10-minütiger Inkubation des Akzeptorproteins *S. el. Fd* mit den Fe/S-Donoren holoGLRX5-GLRX5 und korekonstituiertem GLRX5-BOLA3+GSH wurden ungefähr 65% holo *S. el. Fd* gebildet. Der korekonstituierte GLRX5-BOLA1-Komplex und alle korekonstituierten Einzelmutanten des GLRX5-BOLA1mut-Komplexes (mut: H102A, H67A, H58A) zeigten als Fe/S-Donoren identisches Fe/S-Cluster Transferverhalten mit einer entstandenen holo *S. el. Fd*-Menge von weniger als 10%, was darauf hindeutet, dass der Fe/S-Cluster trotz Alaninsubstitution stabil gebunden wurde und nicht auf ein Akzeptorprotein transferiert werden kann. Nur die mit GLRX5 korekonstituierte BOLA1-Dreifachmutante (H102/H67/H58A) konnte nach 10-minütiger Inkubation mit apo *S. el. Fd* ungefähr 25% holo *S. el. Fd* generieren.

Bei der Verwendung des homologen humanen Systems mit apoFDX1 als Apozielprotein (Abbildung 45B), konnte für die korekonstituierten GLRX5-BOLA1mut-Komplexe (Fe/S-Donoren) ein zum *S. el. Fd* vergleichbares Transferverhalten erhalten werden. Für den Fe/S-Donor holoGLRX5 war in weniger als einer Minute der Fe/S-Clustertransfer mit der Bildung von 80% holoFDX1 abgeschlossen (vergleiche Ergebnisse, Kapitel 3.1.2, Abbildung 18, Seite 31). Korekonstituiertes GLRX5-BOLA1 und mit BOLA1-Einzelmutanten korekonstituiertes GLRX5 konnten hingegen nach 10-minütiger Inkubation mit apoFDX1 lediglich 15-20% holoFDX1 generieren, was auf einen in den holoGLRX5-BOLA1mut-Komplexen (mut: H102A, H67A, H58A) stabil gebundenen Fe/S-Cluster schließen lässt. Der korekonstituierte holoGLRX5BOLA1H102/H67/H58A-Komplex hingegen konnte eine zum GLRX5-GLRX5-Komplex vergleichbare holoFDX1-Bildung nach 10-minütiger Inkubation erreichen, der Fe/S-Clustertransfer war aber deutlich langsamer als der Fe/S-Transfer des holoGLRX5-GLRX5-Komplexes. Dies legt nahe, dass der Fe/S-Cluster nach Alaninsubstitution der drei Histidine (H102/H67/58A) labilisiert wurde.



**Abbildung 45: BOLA1 stabilisiert auch nach Einzelmutation der konservierten Histidine den gebundenen [2Fe-2S]-Cluster relativ zum homodimeren GLRX5.** [2Fe-2S]-Cluster Transfer von 50  $\mu$ M chemisch rekonstituiertem holoGLRX5 (●), 50  $\mu$ M chemisch korekonstituiertem holoGLRX5-BOLA3+GSH (■), 50  $\mu$ M chemisch korekonstituiertem G5B1H102/67/58A (▲), 50  $\mu$ M chemisch korekonstituiertem G5B1H58A (◆) 50  $\mu$ M chemisch korekonstituiertem G5B1H67A (▼), 50  $\mu$ M chemisch korekonstituiertem G5B1 (○) und 50  $\mu$ M chemisch korekonstituiertem G5B1H102A (□) auf (A) 25  $\mu$ M S. el. apo-Ferredoxin oder (B) humanes apoFDX1 in Gegenwart von 25  $\mu$ M Grx1 und 4 mM GSH zu den dargestellten Zeitpunkten. Fehlerbalken geben n = 2 unabhängige Messungen wieder. Die Fe/S-Clustertransfermessungen wurden in Fd-Puffer (Abbildung 16B) oder FDX1-Puffer (Abbildung 16C) durchgeführt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl im Fe/S-Transfersystem mit apo S. el. Fd- als auch im homologen Fe/S-Transfersystem mit apoFDX1 als Fe/S-Akzeptor zusätzlich zum holoGLRX5-GLRX5-Komplex nur der korekonstituierte GLRX5-BOLA1H102/67/58A-Komplex als Fe/S-Donor einen Fe/S-Cluster auf ein [2Fe-2S]-Zielprotein überträgt (Abbildung 45). Bei nur einer Alaninsubstitution (H102A, H67A, H58) im BOLA1 war der Fe/S-Cluster im holoGLRX5-BOLA1mut-Komplex noch stabil gebunden, was nahelegt, dass die drei strukturell naheliegenden Histidine H102, H67 und H58 (Ergebnisse, Abbildung 38, Seite 68) die Mutation von nur einem Histidin kompensieren könnten, in dem die anderen beiden Histidine den Fe/S-Cluster koordinieren. Erstaunlich ist hierbei, dass auch ohne Histidine eine Fe/S-Clusterbildung zu beobachten war.

Obwohl mittels analytischer Gelfiltration (Ergebnisse, Abbildung 40, Seite 71), Eisen- und Sulfidionenbestimmung (Ergebnisse, Abbildung 41B, Seite 72) und spektroskopischer Methoden (UV/Vis, CD) (Ergebnisse, Abbildung 41/Abbildung 43, Seite 72/73) nachgewiesen

wurde, dass alle GLRX5-BOLA1mut-Komplexe (mut: H102A, H67A, H58A, H102/67/58A) einen Fe/S-Cluster gebunden hatten, konnte nur der im GLRX5-BOLA1H102/67/58A-Komplex gebundene Fe/S-Cluster transferiert werden, was auf die Labilität des im GLRX5-BOLA1H102/67/58A gebundenen Fe/S-Clusters hindeutet.

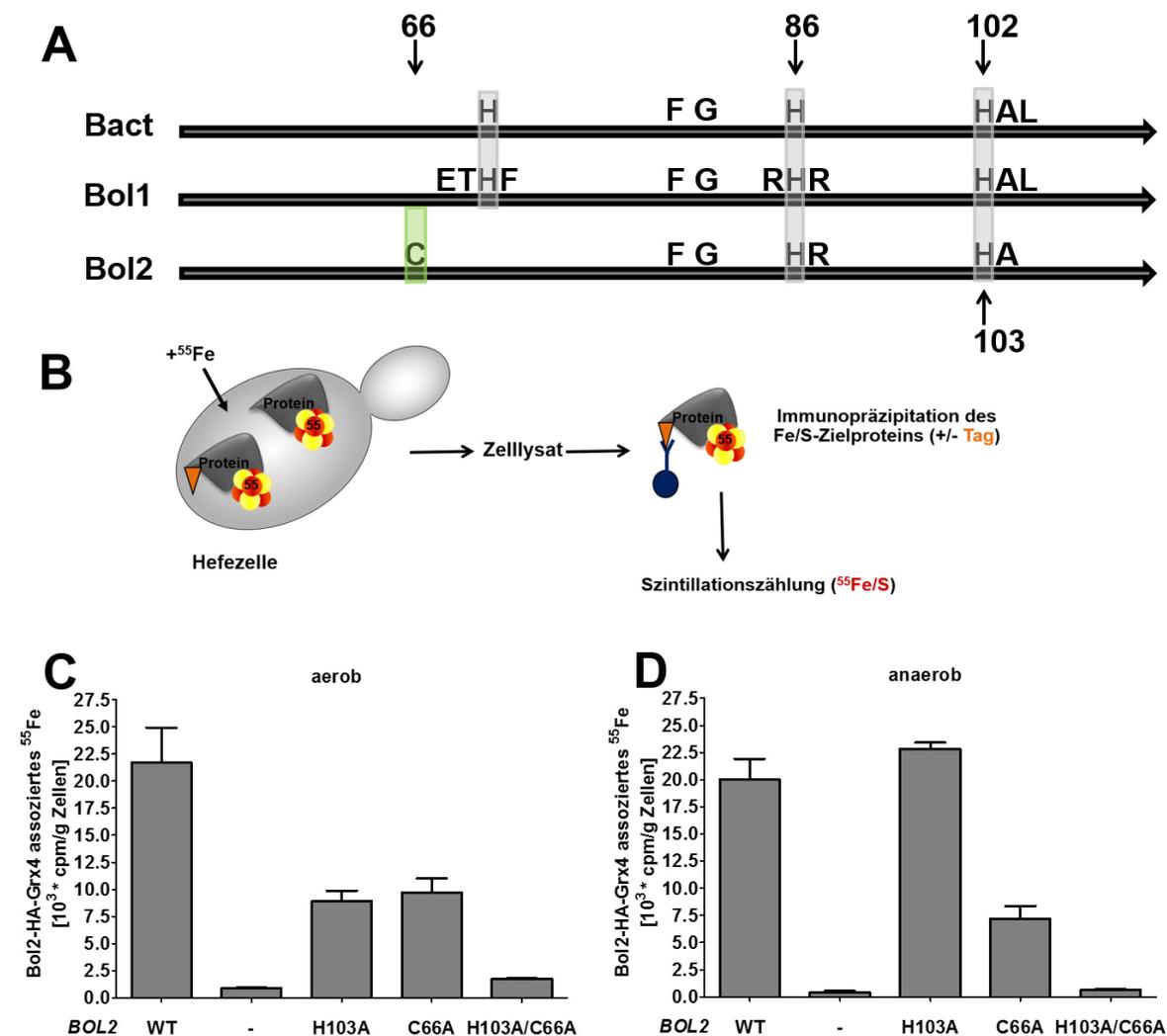
Die mit den *in vitro* Methoden erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass von den drei strukturell naheliegenden Histidinen H102, H67 und H58, nur das H67 und H58 eine Funktion in der Koordination eines Fe/S-Clusters wahrnehmen, wobei eine Alaninsubstitution eines Histidins durch die beiden anderen Histidine kompensiert werden kann.

### 3.3.2 *In vivo* Charakterisierung der BOLA1 Histidine

#### 3.3.2.1 Histidin H102 ist nicht essentiell für eine Fe/S-Clusterkoordination im holoGLRX5-BOLA1-Komplex

Im holoGLRX5-BOLA1H102A-Komplex ist der Fe/S-Cluster stabil gebunden und durch Reduktion geschützt (Ergebnisse, Kapitel 3.3.1.2, Seite 70), weshalb nachfolgend *in vivo* untersucht wurde, ob das in der Literatur als Fe/S-Clusterligand postulierte H102 tatsächlich eine Clusterbindung im holoGLRX5-BOLA1-Komplex wahrnimmt. Eine gut etablierte Methode zur Identifizierung von Fe/S-Clusterliganden ist die radioaktive <sup>55</sup>Fe-Markierung in Hefe. Hierfür werden zur Bestimmung der *de novo* Fe/S-Proteinreifung kultivierte Hefezellen unter Eisenmangel mit radioaktiven <sup>55</sup>Fe versetzt und anschließend der Einbau des <sup>55</sup>Fe durch Immunpräzipitation des Fe/S-Zielproteins untersucht (Abbildung 46B). Eine messbare <sup>55</sup>Fe-Konzentration deutet auf eine erfolgreiche Fe/S-Clustersynthese auf dem Zielprotein hin.

Sowohl für das Hefe Bol1 als auch das Hefe Grx5 zeigte sich allerdings durch in der Vergangenheit durchgeführte *in vivo* Experimente, dass sowohl das Hefe Grx5, der Hefe Grx5-Bol1-Komplex als auch der humane GLRX5-BOLA1 in Hefe nicht radioaktiv mit <sup>55</sup>Fe markiert werden konnten, was die Frage aufwirft, ob ein Grx5-Bol1-Komplex *in vivo* eine Rolle spielt. Wie aus Abbildung 46A ersichtlich besitzen auch andere Bol-Proteine, wie z.B. das zytosolische Bol2 ebenfalls konservierte Histidine. Bol2 besitzt ein zum konservierten Histidin H102 des BOLA1-Proteins konserviertes Histidin H103. Für den Grx4-Bol2-Fe/S-Cluster wird auf Basis spektroskopischer Daten postuliert, dass dieser von jeweils einem Cystein (C66) und Histidin (H102) des Bol2-Proteins koordiniert wird (Li *et al.*, 2011). Für das Bol2 im Grx4-Bol-Komplex bestand die Möglichkeit *in vivo* den Fe/S-Cluster mittels einer <sup>55</sup>Fe-Markierung in Hefe zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde für die <sup>55</sup>Fe-Markierung in Hefezellen das zytosolische Bol2, welches mit zytosolischen Grx4 interagiert (Li *et al.*, 2009), verwendet (Abbildung 46C/D). Das Bol2 war mit einem HA-Tag markiert, wodurch der Grx4-Bol2-Komplex immunpräzipitiert werden konnte.



**Abbildung 46: Das konservierte Histidin H103 (H102 in BOLA1) ist nicht essentiell für die Fe/S-Clusterbindung im Bol2.** (A) Vereinfachter Sequenzvergleich der bakteriellen Bol-Proteine mit dem mitochondrialen Hefe Bol1 und zytosolischen Hefe Bol2. In der Literatur ist auf Basis spektroskopischer Methoden das für Bol1 als auch für Bol2 konservierte Histidin 102 (grau) und Cystein 66 (grün) des Bol2 als Fe/S-Clusterligand beschrieben (Li *et al.*, 2011; Nasta *et al.*, 2017) (B) Bei der Bestimmung der *de novo* Fe/S-Proteinreifung werden unter Eisenmangel kultivierte Hefezellen mit  $^{55}\text{Fe}$  versetzt und anschließend der Einbau des radioaktiven Eisenisotops durch Immunpräzipitation von Fe/S-Zielproteinen untersucht. (C-D) WT (W303a)-, *bol2* $\Delta$ -Zellen wurden mit einem Plasmid zur Überexpression von Grx4 transformiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit *BOL2*, *BOL2H103A*, *BOL2C66A* und *BOL2H103A/H66A* transformiert. Die Zellen wurden 16 h aerob (C) oder anaerob (D) in eisenarmen Minimalmedium mit Glucose kultiviert. Anschließend erfolgte die Markierung mit  $^{55}\text{Fe}$  für 2 h. Die *de novo* Fe/S-Clustersynthese wurde durch Immunpräzipitation von Bol2-HA mit HA-Sepharose und anschließende Szintillationszählung bestimmt. Die gemessene Radioaktivität wurde pro Gramm Zellen angegeben. Fehlerbalken geben die Standardabweichung SD (n=4) an.

Vergleichbar zu den *in vitro* Ergebnissen des humanen holoGLRX5-BOLA1mut-Komplexes (mut: H102A) zeigte sich für den *in vivo* analysierten Fe/S-Cluster des Grx4-Bol2-Komplexes, dass eine Alaninsubstitution der postulierten Fe/S-Clusterliganden (H103A oder C66A) nicht zu einem kompletten Verlust des Fe/S-Clusters im Grx4-Bol2-Komplex führte. Das Bol2H103A

und Bol2C66A zeigte sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen keinen vollständigen Rückgang der  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung im Grx4-Bol2-Komplex in Hefe, was darauf hindeutete, dass trotz Mutation der postulierten Fe/S-Clusterliganden immer noch ein Fe/S-Cluster gebunden wurde und der entsprechende Ligand nicht essentiell für eine Fe/S-Clusterkoordinierung ist. Lediglich die Bol2-Doppelmutante H103A/C66A zeigte eine zu einer *bol2* $\Delta$ -Hefezelle vergleichbare  $^{55}\text{Fe}$ -Menge. Unter anaeroben Bedingungen wies eine Bol2H103A-Mutante sogar eine zum Bol2-Wildtyp unveränderte Fe-Menge auf (Abbildung 46D). Die  $^{55}\text{Fe}$ -Konzentration der C66A-Mutationen war im Vergleich zum WT sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen um 60% verringert.

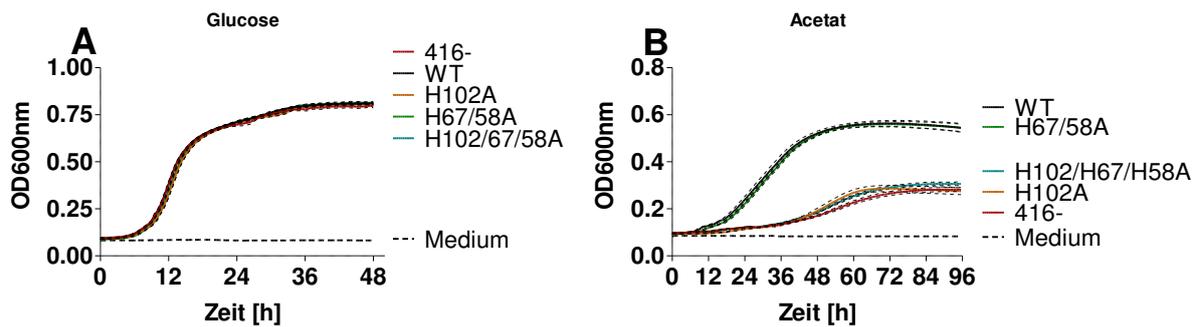
Zusammenfassend deutete die  $^{55}\text{Fe}$ -Markierung darauf hin, dass das Histidin H103 des Bol2 im Grx4-Bol2-Komplex nicht essentiell für Fe/S-Clusterbindung ist. Dieses Erkenntnis ist vergleichbar mit den *in vitro* Erkenntnissen (Ergebnisse, Kapitel 3.3.1, Seite 69) des humanen holoGLRX5-BOLA1H102A-Komplexes.

### **3.3.2.2 Das für die Fe/S-Clusterkoordination im holoGLRX5-BOLA1-Komplex wichtige H102 ist funktionell essentiell**

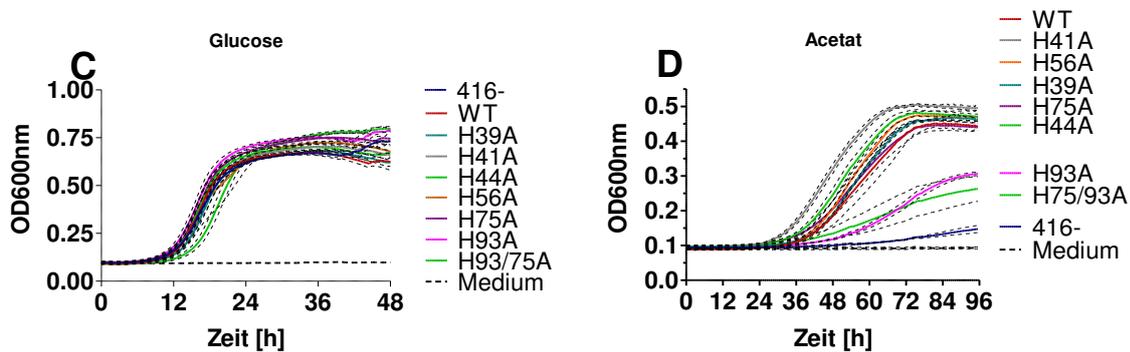
Alle bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass das H102 im holoGLRX5-BOLA1-Komplex nicht essentiell für die Fe/S-Clusterkoordination ist. An Hand der spektroskopischen Daten (Ergebnisse, Abbildung 43, Seite 73) deutete sich an, dass die zum H102 naheliegenden Histidine H67 und H58 als Fe/S-Clusterliganden fungieren könnten. Abschließend wurde, um die biochemische Funktion von Mutationen der konservierten Histidine wie auch der nicht konservierten Histidine *in vivo* zu testen, das Wachstumsverhalten von sowohl humanen BOLA1mut- als auch Hefe Bol1mut-Proteinen getestet. Ausgenutzt wird hierbei, dass *bol1/bol3* $\Delta$ -Hefezellen einen Wachstumsdefekt in acetathaltigem Minimalmedium aufweisen. Die BOLA1- und Bol1-Proteine wurden in Hefe exprimiert und deren Wachstumsverhalten in flüssigem Medium in einem Tecan Plattenlesegerät auf einer Zellkulturplatte über 4 Tage untersucht (Abbildung 47). An Hand des Sequenzvergleichs ist gut erkennbar (Abbildung 47E), dass bis auf das Histidin H58 alle weiteren Histidine (H102, H86, H67) sowohl im humanen als auch Hefe Bol1 konserviert sind. Hefe Bol1 besitzt für das humane Histidin H58 drei potentielle Histidine (H39, H41 und H44).

Die Expression von humanem BOLA1 in *bol1/bol3* $\Delta$ -Hefezellen konnte deren Wachstumsdefekt kompensieren. Ferner wurde das Wachstumsverhalten des Wildtyp BOLA1 und der BOLA1-Mutanten H102A, H67/58A und H102/67/58A in acetathaltigem Flüssigmedium untersucht (Abbildung 47B/D).

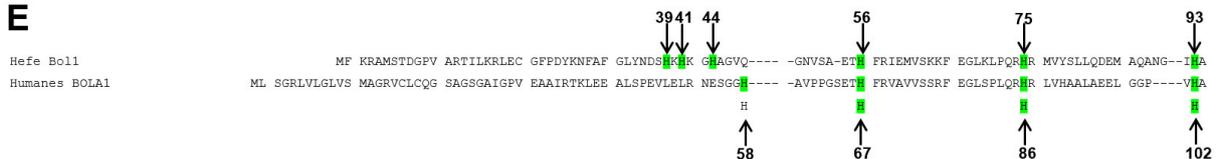
## Human



## Hefe



## E



**Abbildung 47: Von drei konservierten Histidinen ist nur das Histidin H102 essentiell für die Kompensation des Wachstumsdefektes.** (A) *bol1/bol3Δ*-Hefezellen wurden mit einem p416-Leervektor (ohne Gen) und p416-Plasmiden, die die angegebenen humanen *BOLA1*-Mutanten enthielten, transformiert. Die Hefezellen wurden ü.N. in flüssigem SC Glucose Medium (2% w/v Glucose) mit den entsprechenden Aminosäuren kultiviert, auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 in 500 µL SC-Medium verdünnt und auf einer 48er Zellkulturplatte bei 30 °C für 4 Tage inkubiert. (B) Analog zu (A) wurden *bol1/bol3Δ*-Hefezellen mit einem p416-Leervektor (ohne Gen), oder dem jeweiligen humanen p416-*BOLA1*-Plasmid transformiert. Hefezellen wurden ü.N. in Minimalmedium ohne Uracil mit 2% Glucose als Kohlenstoffquelle kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 in 500 µL Minimalmedium ohne Uracil mit Acetat (2% w/v) auf einer 48er Zellkulturplatte bei 30 °C für 4 Tage inkubiert. (C/D) *bol1/bol3Δ*-Hefezellen, wurden mit einem Leervektor und dem jeweiligen 416-*BOLA1*-Plasmid transformiert und in (C) flüssigem SC Glucose Medium (2% w/v Glucose) oder (D) flüssigem Acetatmedium (2% w/v) wie in (A) und (B) kultiviert. Die OD<sub>600nm</sub> wurde im Tecan Plattenlesegerät alle 30 min gemessen. (E) Sequenzvergleich des N-terminalen Bereichs von Hefe Bol1 und humanem BOLA1. Konservierte Histidine sind grün markiert. Für das Histidin 58 des humanen BOLA1 besitzt Bol1 drei potentielle Histidine (H39, H41 und H44).

Lediglich die *BOLA1*-Mutante mit der Alaninsubstitution H102A zeigte sowohl als *BOLA1*-Einzelmutante (H102A, H67A, H58A) als auch in der *BOLA1*H102/67/58A-Mutante einen Wachstumsdefekt auf acetathaltigem Medium. Die *BOLA1*H67/58A-Doppelmutante hingegen zeigte Wildtypverhalten. Ein vergleichbares Ergebnis wurde für das Hefe Bol1-Protein erhalten

(Abbildung 47D). Das zum humanen H102 analoge Histidin 93 im Hefe Bol1-Protein zeigte einen deutlichen Wachstumsdefekt sowohl für die Bol1H93A- als auch für die Bol1H93/75A-Mutante, wobei eine alleinige Bol1H75A-Mutation keine Veränderung im Wachstumsverhalten im Vergleich zum Bol1-Wildtyp zeigte, was darauf hindeutet, dass die Alaninsubstitution des H93A für den Wachstumsdefekt verantwortlich ist und in Hefe eine funktionell wichtige Rolle wahrnimmt. Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens zeigte, dass nur das Histidin 102 (humanes BOLA1) bzw. H93 (Hefe Bol1) essentiell für die Funktion des BOLA-Proteins ist. Die mittels analytischer Gelfiltration (Ergebnisse, Abbildung 40, Seite 71), UV/Vis-Spektroskopie (Ergebnisse, Abbildung 41, Seite 72), CD-Spektroskopie (Ergebnisse, Abbildung 43, Seite 73), Fe/S-Clustertransfer (Ergebnisse, Abbildung 45, Seite 78), radioaktiver  $^{55}\text{Fe}$ -Markierung in Hefe (Ergebnisse, Abbildung 46, Seite 80) und Wachstumsexperimente in Hefe (Ergebnisse, Abbildung 47, Seite 82) erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Histidinkoordination des Fe/S-Clusters vorliegt. Das konservierte und in der Literatur auf spektroskopischer Basis als Fe/S-Clusterligand beschriebene Histidin 102 ist *in vivo* essentiell für die Funktion, aber sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nicht essentiell für eine Fe/S-Clusterbindung. Es zeigte sich zusätzlich, dass trotz Mutationen der konservierten Histidine BOLA1 sowohl als BOLA1-Einzelmutante (H102A, H67A, H58A) als auch BOLA1-Dreifachmutante (H102/67/58A) nach Korekonstitution mit GLRX5 einen holoGLRX5-BOLA1-Komplex bildet, der einen [2Fe-2S]-Cluster koordiniert. Der Fe/S-Cluster ist allerdings nur im holoGLRX5-BOLA1H102A-Komplex gegenüber Reduktion geschützt. Dies könnte darauf hindeuten, dass H67 und H58 *in vitro* einen Einfluss auf die Koordination des im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters haben. In der nachfolgenden Tabelle 4 (Seite 84) sind die in Kapitel 3.3 erhaltenen *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse zusammengefasst dargestellt. Eine essentielle Funktion der Histidine H67 und H58 bei der Fe/S-Clusterkoordination war *in vivo* allerdings nicht nachzuweisen. Die *in vitro* Beobachtungen deuten hingegen darauf hin, dass diese beiden Reste eine Funktion bei der Stabilisierung des im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters wahrnehmen. Eine alleinige Alaninsubstitution einer Fe/S-Cluster-koordinierenden Aminosäure führte noch nicht zu einem Fe/S-Clusterbindungsverlust. Dies kann daran liegen, dass die strukturell naheliegenden Histidine H102, H67 und H58 sich nach einer Alaninsubstitution gegenseitig bei der Koordination eines Fe/S-Clusters ersetzen können oder der Fe/S-Cluster durch ein zusätzliches Glutathion stabilisiert wird, was kürzlich in *in vitro* Experimenten des humanen GLRX5 gezeigt werden konnte (Sen *et al.*, 2018).

**Tabelle 4: Zusammenfassung der *in vitro* und *in vivo* GLRX5-BOLA1mut-Komplexdaten.**

<i>In vitro</i> Methode	G5B1	G5B1H102A	G5B1H67A	G5B1H58A	G5B1H102/67/58A
Elutionsvol. HPLC [mL]	9,55	9,45	9,52	9,33	9,33
$\epsilon_{420}$ UV/Vis-Spektr.	1,011	0,979	0,974	1,078	1,113
$\epsilon_{320}$ UV/Vis-Spektr.	2,09	2,056	2,007	2,138	2,207
Fe <sup>2+</sup> -Ionenbestimmung [Fe <sup>2+</sup> /Monomer]	~0,85	~0,75	~0,78	~0,67	~0,63
S <sup>2-</sup> -Ionenbestimmung [S <sup>2-</sup> /Monomer]	~0,81	~0,70	~0,69	~0,78	~0,6
Max CD-Spektrum	472	469	466	465	473
Max CD-Spektrum	397	396	400	400	/
Min CD-Spektrum [nm]	342	341	345	354	378
Dithionitstabilität	+	+	-	-	-
<i>In vivo</i> Relevanz	+	+	-	-	-

## 4 Diskussion

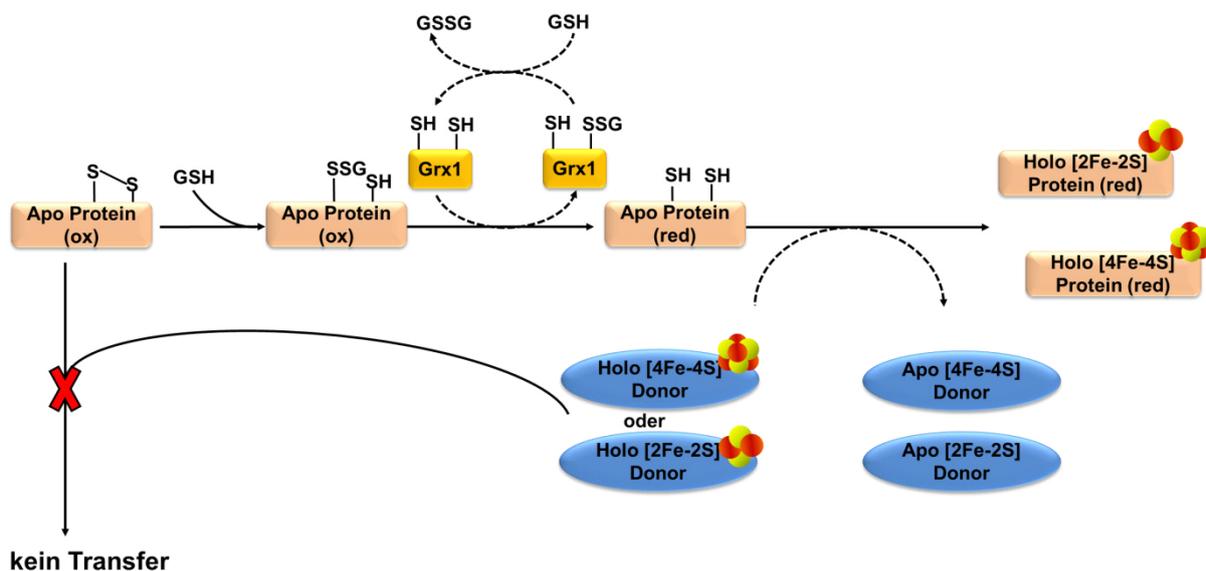
### 4.1 Mechanismus und Spezifität von Fe/S-Clustertransfersystemen

Der Transfer eines Fe/S-Clusters von Fe/S-Assemblierungsfaktoren auf Fe/S-Apoproteine (Fe/S-Akzeptoren) stellt den letzten kritischen Schritt der Biogenese aller zellulären Fe/S-Proteine dar. Bisher ist der Transfer eines Fe/S-Clusters und die anschließende Insertion in Apozielproteine unzureichend charakterisiert worden und daher mechanistisch wenig verstanden. In *vitro* können Fe/S-Cluster relativ einfach auf Fe/S-Akzeptoren transferiert werden, in dem Fe/S-Akzeptoren unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart eines chemisch rekonstituierten Holoproteins (Fe/S-Donor) und des Reduktionsmittels DTT gemischt werden (Brancaccio *et al.*, 2014). Viele in der Literatur bekannte Studien benutzen genau solche Fe/S-Clustertransfersysteme, um die Fe/S-Donor- und Fe/S-Akzeptorproteine zu charakterisieren, ohne dabei auf physiologisch relevante Details der Reaktion einzugehen (Bandyopadhyay *et al.*, 2008b; Brancaccio *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2013; Mapolelo *et al.*, 2013; Nishio und Nakai, 2000). Welche Funktion die bisher eingesetzten artifiziellen thiol-spezifischen Reduktionsmittel bei einem Fe/S-Clustertransfer übernehmen, und welche physiologischen Substanzen sie *in vitro* ersetzen, ist bislang unklar.

#### 4.1.1 Das Dithiol-Glutaredoxin-Reduktionssystem Grx1/GSH kann das artifizielle DTT in Fe/S-Clustertransferreaktionen ersetzen

Die in dieser Arbeit verwendeten Fe/S-Clustertransfersysteme wurden ohne das artifizielle, thiol-spezifische Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) durchgeführt. Stattdessen wurde das physiologisch vorkommende Dithiol-Reduktionssystem, bestehend aus einem Dithiol-Glutaredoxin (Grx1) und reduziertem Glutathion (GSH), verwendet. Es wurden systematisch verschiedene Fe/S-Clustertransferreaktionen unter Einbeziehungen von [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Donoren und [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Akzeptoren untersucht (Diskussion, Kapitel 4.1.2, Seite 87). Bei Verwendung der Fe/S-Akzeptoren zeigte sich zunächst, dass ein Fe/S-Clustertransfer *in vitro* in Abwesenheit von Reduktionsmitteln (DTT, ME, TCEP) ineffizient war, obwohl die verwendeten Fe/S-Akzeptorproteine (*S. el. Fd*, FDX1, Leu1, ACO2) im letzten Schritt der Aufreinigung sowohl mit einem Überschuss an TCEP, das Disulfidbrücken entfernt, als auch KCN, das Polysulfane von Proteinen entfernt, behandelt wurden. Die Ineffizienz der Übertragung eines Fe/S-Clustertransfers von einem Donorprotein auf ein Akzeptorprotein in Abwesenheit von Reduktionsmitteln zeigte, dass für einen erfolgreichen Fe/S-Clustertransfer die Fe/S-Cluster-koordinierenden Cysteine vollständig reduziert vorliegen müssen. Die Reduktion der Cysteine ist offensichtlich einer der Gründe, warum die in der Literatur verwendeten Protokolle für Fe/S-Clustertransferreaktionen oft das artifizielle thiol-spezifische

Reduktionsmittel DTT verwenden. Die Fe/S-Cluster-kordinierenden Cysteine, die oft in räumlicher Nähe liegen, neigen offenbar -trotz Reduktion während der Aufreinigung- zur raschen Bildung von Disulfidbrücken (CysS-SCys) oder anderen oxidierenden Modifikationen wie Polysulfanen (CysSS<sub>n</sub>H). Die Oxidation von Fe/S-Apoproteinen ist aber nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* ein Problem. *In vivo* sind das Thioredoxin- als auch das Glutaredoxinsystem für eine physiologische Redoxbalance der thiolhaltigen Proteine verantwortlich (Einleitung, Abbildung 7, Seite 11). Wie in dieser Arbeit mehrfach gezeigt (Kapitel 3.1), konnte das physiologische Grx1/GSH-Reduktionssystem *in vitro* die Rolle von DTT übernehmen und erlaubte dadurch überraschend schnelle Fe/S-Clustertransferaten. Der Fe/S-Clustertransfer von humanem GLRX5 auf humanes FDX1 war sogar schneller (< 15 Sekunden) und effizienter als in Gegenwart von DTT oder anderen artifiziellen Reduktionsmitteln (Diskussion, Kapitel 4.1.2, Seite 87). Dies zeigt, dass ein Fe/S-Clustertransfer in physiologisch relevanten Reaktionen viel schneller ablaufen kann als die vergleichsweise langsame Reduktion von Disulfidbrücken durch Reduktionsmittel. Wenn die Akzeptorproteine wirklich vollständig reduziert vorlagen und keine Polysulfane oder Disulfidbrücken mehr am Akzeptorprotein gebunden waren, dann konnte das artifizielle thiol-spezifische Reduktionsmittel DTT durch das in den Zellen vorzufindende Dithiol-Reduktionssystem Grx1/GSH ersetzt werden (Abbildung 48).



**Abbildung 48: Das Dithiol-Glutaredoxin-Reduktionssystem kann das artifizielle thiol-spezifische Reduktionsmittel DTT in *in vitro* Fe/S-Clustertransferreaktionen ersetzen.** Auf oxidierte Akzeptorproteine (hellorange) kann ein Fe/S-Donorprotein (blau) keinen [2Fe-2S]- oder [4Fe-4S]-Cluster übertragen. Mit Hilfe des natürlichen Dithiol-Glutaredoxin-Reduktionssystems bestehend aus Grx1 (orange) und GSH können Disulfidbrücken (S-S) auf oxidierten Akzeptorproteinen reduziert werden, wodurch eine Fe/S-Clusterübertragung ermöglicht wird. Die Thiolgruppen des Glutaredoxins (Grx1) werden benutzt, um das Glutathionylierungsaddukt (SSG) am Akzeptorprotein zu reduzieren, wobei sich auf Grx1 selbst ein Glutathionylierungsaddukt (SSG) ausbildet, welches schließlich mit Reduktionsäquivalenten an reduziertem Glutathion wieder zu Thiolen reduziert wird.

### 4.1.2 Substratspezifischer Transfer eines GLRX5 gebundenen [2Fe-2S]-Clusters

Für einen [2Fe-2S]-Clustertransfer wurden zwei verschiedene Fe/S-Clustertransfersysteme, die jeweils chemisch rekonstituiertes humanes GLRX5 als [2Fe-2S]-Donor einsetzen, verwendet (Abbildung 49, Seite 89). Das erste Transfersystem basierte auf einer *A. thaliana* Ferredoxin-NADPH-Reduktase (FNR) und dem bakteriellen *Synechococcus elongatus* (*S. el.*) Ferredoxin als Akzeptorprotein. Das zweite [2Fe-2S]-Transfersystem basierte auf der humanen Ferredoxin-NADPH-Reduktase (FDXR) und dem humanen Ferredoxin (FDX1, Fe/S-Akzeptor). In beiden Transfersystemen wurde die Menge an gebildeten holo-Ferredoxin an Hand der Reduktion von Cytochrom *c* verfolgt (Ergebnisse, Kapitel 3.1.1, Seite 26).

Zusätzlich zu den Reduktionseigenschaften des natürlichen Grx1/GSH-Reduktionssystems (Ergebnisse, Kapitel 3.1.2, Seite 28) zeigte sich in Gegenwart von Grx1/GSH eine bisher in dem Maße nicht beobachtete Substratspezifität zwischen Fe/S-Clusterdonor und Fe/S-Akzeptor. Der Fe/S-Clustertransfer von humanem GLRX5 auf humanes apoFDX1 war schneller (< 15 Sekunden) und effizienter als in Gegenwart von DTT oder anderen artifiziellen Reduktionsmitteln. Ein Fe/S-Clustertransfer von weiteren Fe/S-Proteinen, wie beispielsweise ISCU2, ISCA1 und ISCA2, auf apoFDX1 war in Gegenwart von Grx1/GSH hingegen ineffizient (Abbildung 49A). Dieses Ergebnis passt zur *in vivo* Situation. ISCU2 dient als Gerüstprotein zur Synthese eines [2Fe-2S]-Clusters, der dann mit Hilfe eines Chaperonsystems auf GLRX5 übertragen wird (Bonomi *et al.*, 2011; Majewska *et al.*, 2013; Mapolelo *et al.*, 2013; Uzarska *et al.*, 2013). Die A-Typ-ISC-Proteine sind im Zusammenspiel mit weiteren ISC-Faktoren an der Maturierung von [4Fe-4S]-Clustern und nicht an der Bildung von [2Fe-2S]-Clustern beteiligt (Mühlenhoff *et al.*, 2011; Sheftel *et al.*, 2012b). Auch der Fe/S-Clustertransfer von humanem GLRX5 auf das heterologe *S. el.* Fd war ineffizienter und langsamer als der auf das homologe FDX1. Offensichtlich führt die Verwendung von Grx1/GSH zur Reduktion von Akzeptorproteinen und zu *in vitro* Fe/S-Transferreaktionen, die die *in vivo* Situation des Fe/S-Clustertransfers zuverlässig nachbilden kann.

Viele Fe/S-Clustertransfergeschwindigkeiten lagen bisher im Bereich von mehreren Minuten bis hin zu Stunden (Brancaccio *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2013). Bei solchen Transfergeschwindigkeiten kann nicht von physiologisch relevanten Reaktionen ausgegangen werden. Die in dieser Arbeit erreichte Geschwindigkeit (< 15 Sekunden) lässt allerdings darauf schließen, dass der auf GLRX5 gebundene [2Fe-2S]-Cluster tatsächlich transient gebunden ist und auf [2Fe-2S]-Akzeptoren direkt übertragen werden kann oder für die Konversion eines [4Fe-4S]-Clusters mit Hilfe der A-Typ-ISC-Proteine und IBA57 weiterverwendet wird. Dieses Ergebnis deckte sich mit der in der Literatur beschriebenen Funktion von GLRX5 als Fe/S-Donorprotein (Shakamuri *et al.*, 2012). Weiterhin deutet der schnelle Transfer darauf hin, dass Monothiol-Glutaredoxine sich speziell auf den Fe/S-Clustertransfer in der GSH-reichen

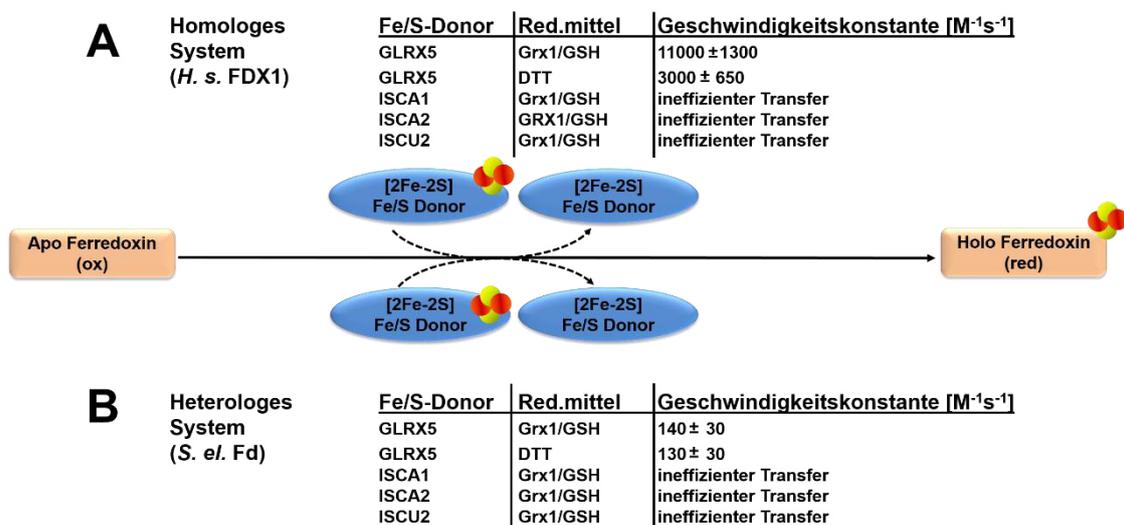
Zellumgebung angepasst haben könnten. Diese Schlussfolgerung wird durch Daten der Gruppe um Prof. Michael Johnson gestützt (Mapolelo *et al.*, 2013). Bereits für den Fe/S-Clustertransfer des bakteriellen IscU auf Grx5 konnten mit Hilfe eines HscA/B-Chaperonsystems in Gegenwart eines Überschusses an GSH erhöhte Transfergeschwindigkeiten beobachtet werden (Shakamuri *et al.*, 2012).

Humanes holoGLRX5 zeigte einen schnellen [2Fe-2S]-Clustertransfer auf apoFDX1, einem Zielprotein *in vivo*. Bei Verwendung der humanen ACO2, einem [4Fe-4S]-Akzeptor, konnte kein spontaner Fe/S-Clustertransfer beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass Monothiol-Glutaredoxine einen [2Fe-2S]-Cluster direkt auf [2Fe-2S]-Zielproteine wie Ferredoxine transferieren, aber nicht direkt an der Insertion eines Fe/S-Clusters in [4Fe-4S]-Proteinen beteiligt sind (Diskussion, Kapitel 4.1.3, Seite 90). Die Idee einer Fe/S-Clusterdonorfunktion des GLRX5 für weitere ISC-Komponenten stammte aus Studien der plastidären Monothiol-Glutaredoxine (Bandyopadhyay *et al.*, 2008b; Rouhier, 2010). Es gab allerdings bisher immer nur die Annahme, nie den Beweis für eine wirkliche Fe/S-Donorfunktion der Glutaredoxine, da die Transferreaktionen immer in Gegenwart von artifiziellen Reduktionsmitteln wie DTT durchgeführt wurden. Die physiologische Relevanz dieser Transfersysteme blieb weitestgehend unklar. Die in dieser Arbeit *in vitro* unter physiologischen Bedingungen erhaltene Geschwindigkeit unterstützt stark die These, dass GLRX5 als Fe/S-Donor in der mitochondrialen ISC-Maschinerie fungiert. Darüber hinaus passen die *in vitro* Daten zu den bisherigen *in vivo* Daten, nach denen für die Maturation eines [4Fe-4S]-Clusters weitere Faktoren der ISC-Maschinerie (ISCA1, ISCA2, IBA57) benötigt werden (Mühlenhoff *et al.*, 2011; Sheftel *et al.*, 2012b). Die hier beschriebene *in vitro* Studie steht in vollem Einklang mit bisherigen *in vivo* Studien in Hefe und humanen Zellen.

Weiterhin wurde eingehend der späte ISC-Faktor NFU1 auf eine Fe/S-Clusterdonorfunktion hin untersucht. Mößbauer-Spektroskopie des chemisch rekonstituierten Fe/S-Clusters auf dem humanen NFU1 deutete hauptsächlich auf einen [4Fe-4S]-Cluster (80%) hin, was bereits für das bakterielle NfuA und pflanzliche Nfu2-Proteine (Angelini *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2003), die alle eine ähnliche C-terminale Domäne besitzen (Einleitung, Abbildung 15, Seite 22), gezeigt werden konnte. Zusätzlich zum [4Fe-4S]-Cluster (80%) hatte NFU1 auch geringe Menge eines [2Fe-2S]-Clusters (20%) gebunden. NFU1 zeigte im Vergleich zu GLRX5 eine gegenläufige Substratspezifität, der auf NFU1 chemisch rekonstituierte [4Fe-4S]-Cluster konnte effizient auf [4Fe-4S]-Akzeptoren (ACO2, Leu1), aber nur ineffizient auf das [2Fe-2S]-Zielprotein FDX1 übertragen werden. Die ineffiziente Übertragung eines [2Fe-2S]-Clusters war nur möglich, da zusätzlich zu dem [4Fe-4S]-Cluster (80%) noch ein [2Fe-2S]-Cluster (20%) auf NFU1 chemisch rekonstituiert wurde (Ergebnisse, Abbildung 19, Seite 33). Dieser [2Fe-2S]-Cluster wurde auf apoFDX1 übertragen. Die aus dem Fe/S-Transfersystem erhaltenen NFU1-Daten sind mit *in vivo* Studien an Hefe und kultivierten humanen Zellen konsistent, in

denen NFU1 keine Rolle bei der Assemblierung von [2Fe-2S]-Clustern zukommt (Cameron *et al.*, 2011; Navarro-Sastre *et al.*, 2011). Humanes NFU1 transferierte nach Ergebnissen dieser Arbeit unter physiologischen Bedingungen *in vitro* sowohl zur humanen Aconitase (ACO2) als auch zum zytosolischen Leu1 aus *S. cerevisiae*, welches in Mitochondrien exprimiert werden kann und als Akzeptor für mitochondriale Proteine fungiert (Lange *et al.*, 2000), einen Fe/S-Cluster. Im Gegensatz zu GLRX5, das seinen Fe/S-Cluster nur im homologen Transfersystem effizient auf FDX1 transferierte, war der Fe/S-Clustertransfer von humanen NFU1 im homologen Transfersystem auf die humane mitochondriale Aconitase nicht schneller als der [4Fe-4S]-Clustertransfer auf das zytosolische Leu1 aus *S. cerevisiae* (Abbildung 50, Seite 92). Eine Depletion von *NFU1* hatte allerdings keinen Effekt auf die Aktivität von mitochondrial exprimiertes Leu1. Dies deutet daher darauf hin, dass NFU1 nicht direkt als Fe/S-Clusterdonor für mitochondriale [4Fe-4S]-Proteine fungiert. Eine weitere Möglichkeit wäre auch, dass noch weitere ISC-Komponenten fehlen, die den Fe/S-Clustertransfer von NFU1 auf die ACO2 unterstützen.

Zusammenfassend lassen die *in vitro* Daten an Hand der Substratspezifität darauf schließen, dass apo-Ferredoxine natürliche Zielproteine von humanen GLRX5 (Abbildung 49) sind und NFU1 eine Rolle bei der Fe/S-Clusterinsertion in die Aconitase wahrnimmt (Abbildung 50A, Seite 92).



**Abbildung 49: Substratspezifischer [2Fe-2S]-Clustertransfer von [2Fe-2S]-Proteinen auf apo-Ferredoxine.**

(A) Im homologen Fe/S-Transfersystem bestehend aus humanem apoFDX1 (orange, Fe/S-Akzeptor) und humanem GLRX5 ([2Fe-2S]-Donor, blau) wird in Gegenwart des Dithiol-Glutaredoxin-Reduktionssystems Grx1/GSH der [2Fe-2S]-Cluster schnell und effizient auf das apoFDX1 transferiert. In Gegenwart des physiologischen Reduktionssystems Grx1/GSH war der Fe/S-Clustertransfer schneller und effizienter als in Gegenwart des artifiziellen Reduktionsmittels DTT. Die chemisch rekonstituierten Fe/S-Proteine ISCA1, ISCA2 oder ISCU2 können keinen [2Fe-2S]-Cluster auf apoFDX1 transferieren. (B) Im heterologen Transfersystem bestehend aus apo *S. el.* Fd (orange) und humanem chemisch rekonstituiertem GLRX5 (Fe/S-Donor, blau) konnte sowohl in Gegenwart von Grx1/GSH als auch DTT ein Fe/S-Cluster nur ineffizient auf apoFd transferiert werden. Die chemisch rekonstituierten Fe/S-Proteine ISCA1, ISCA2 oder ISCU1 können auch keinen [2Fe-2S]-Cluster auf apoFd transferieren.

### 4.1.3 Für die Maturierung von [4Fe-4S]-Clustern sind die *in vivo* ISC-Komponenten auch *in vitro* essentiell

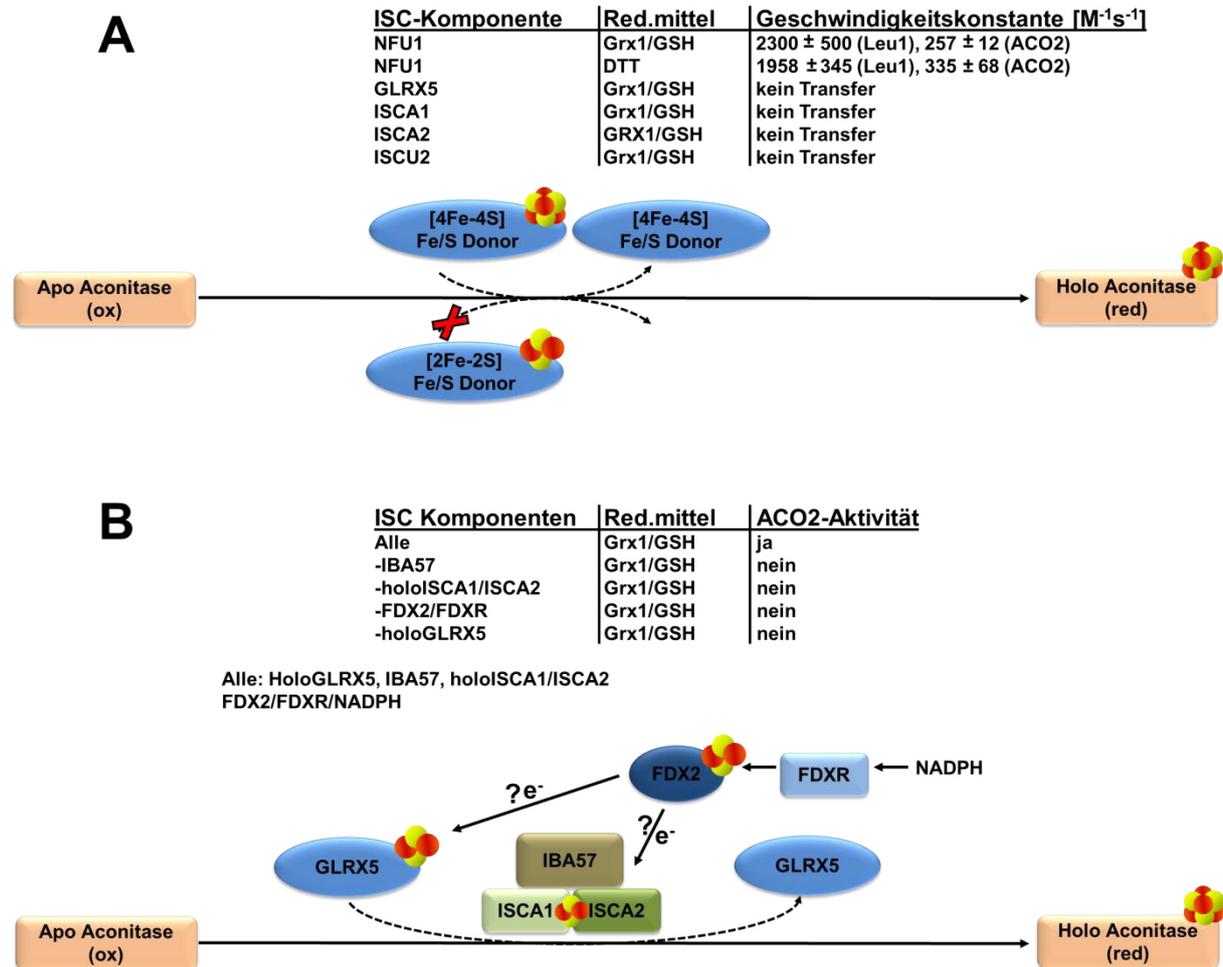
In *E. coli* gibt es verschiedene A-Typ-Proteine, die an der Maturierung von [4Fe-4S]-Clustern beteiligt sind (Ayala-Castro *et al.*, 2008) (Einleitung, Abbildung 4, Seite 5). Auch für die mitochondrialen A-Typ-ISC-Proteine (ISCA1/ISCA2) und IBA57 wird eine Rolle als spezifische ISC-Faktoren für die Maturierung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine angenommen, da eine Deletion sowohl in Hefe als auch humanen Zellen einen charakteristischen Phänotyp zur Folge hat (Mühlenhoff *et al.*, 2011; Sheftel *et al.*, 2012b). Depletionsexperimente von *isa/iba57*-Hefezellen zeigten, dass die Assemblierung aller [4Fe-4S]-Proteine gehemmt ist, wodurch Defekte auf beispielsweise der mitochondrialen Aconitase, Liponsäuresynthase oder dem Komplexen II der Atmungskette auftraten (Mühlenhoff *et al.*, 2011). Als Folge davon wurde die mitochondriale DNA verloren oder es wurden morphologische Veränderungen wie der Verlust der Cristae Membranen oder eine Erweiterung der Organellen in humanen Zellen beobachtet (Sheftel *et al.*, 2012a).

Bisher konnte die Maturierung von [4Fe-4S]-Clustern *in vitro* nicht wirklichkeitsgetreu nachgebildet werden. Die in der Literatur beschriebenen Transfersysteme verwendeten alle ausnahmslos das artifizielle thiol-spezifische Reduktionsmittel DTT und postulieren einen direkten Transfer der A-Typ-ISC-Proteine auf die Aconitase (Brancaccio *et al.*, 2014; Mapolelo *et al.*, 2013). Für die reduktive Kopplung von oxidierten [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Clustern zu einem [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster werden Elektronen benötigt. Ein oxidiertes [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Cluster besteht formell aus 2 Fe<sup>3+</sup>- und 2 S<sup>2-</sup>-Ionen. Der [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster hingegen aus 2 Fe<sup>2+</sup>-, 2 Fe<sup>3+</sup>- und 4 S<sup>2-</sup>-Ionen. Die Elektronen reduzieren das Fe<sup>3+</sup>- zu einem Fe<sup>2+</sup>-Ion. Offensichtlich kann das artifizielle Reduktionsmittel DTT eine reduktive Kopplung vornehmen, was erklärt, warum dieses Reduktionsmittel in allen bisher publizierten Transferreaktionen, in denen [2Fe-2S]-Donoren mit einem [4Fe-4S]-Akzeptor eingesetzt werden, verwendet wurde. Das physiologische Dithiol-Glutaredoxin-Reduktionssystem Grx1/GSH kann keine reduktive Kopplung oxidiertes [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Cluster von GLRX5 vornehmen, was darauf hindeutet, dass die Konversion eines [2Fe-2S]-Clusters zu einem [4Fe-4S]-Cluster tatsächlich kein spontaner Prozess im natürlichen reduzierenden Milieu der Zelle ist. Auch ISCA1 und ISCA2 können alleine nicht die Umwandlung von [2Fe-2S]-Clustern zu [4Fe-4S]-Clustern vornehmen, was konsistent mit Untersuchungen *in vivo* ist. *In vivo* ist eine Interaktion der A-Typ-ISC-Proteine zusammen mit dem zusätzlichen ISC-Assemblierungsfaktor IBA57 nötig. Die Interaktion der A-Typ-ISC-Proteine mit IBA57 ist essentiell für die Maturierung und Insertion von [4Fe-4S]-Clustern in beispielsweise die Aconitase (Sheftel *et al.*, 2012b). Die *in vitro* Daten ohne Berücksichtigung des für die [4Fe-4S]-Synthese essentiellen IBA57 wurden als Beweis für eine Fe/S-Clusterdonorfunktion der A-Typ-Proteine verwendet (Brancaccio *et al.*, 2014).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Transfer bzw. die Konversion eines auf ISCA1, ISCA2 oder GLRX5 gebundenen  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Clusters in einen  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster, wie er auf der Aconitase vorhanden ist, *in vitro* in Abwesenheit von DTT nicht stattfindet. Um die benötigten Elektronen für die Konversion eines oxidierten  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Clustern zu einem  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster physiologisch bereitzustellen, wurde die mitochondriale Elektronentransferkette, die bereits an der *de novo* Synthese eines  $[2\text{Fe-2S}]$ -Clusters auf ISCU beteiligt ist, eingesetzt (Shi *et al.*, 2012; Webert *et al.*, 2014). Hierbei handelt es sich um Elektronentransferkette bestehend aus FDX2, FDXR und NADPH. Die Abhängigkeit einer  $[4\text{Fe-4S}]$ -Maturierung von IBA57, der Elektronentransferkette (FDX2/FDXR/NADPH) und den holo-A-Typ-ISC-Proteinen konnte unter physiologischen Bedingungen in dieser Arbeit studiert werden. Unter physiologischen Bedingungen waren auch *in vitro* für die Maturierung eines  $[4\text{Fe-4S}]$ -Clusters die A-Typ-ISC-Proteine, IBA57 und die Elektronentransferkette essentiell, da das Fehlen von einer Komponente (ISCA1/ISCA2, IBA57, FDX2/FDXR/NADPH) durch einen Rückgang der ACO2-Aktivität gekennzeichnet war. Die genaue Funktion dieser drei Komponenten, als auch die zelluläre Elektronenquelle, die für die Konversion des  $[2\text{Fe-2S}]$ -Clusters benötigt wird, ist *in vivo* allerdings noch unbekannt.

Zum ersten Mal konnte in einem Mehrkomponentensystem bestehend aus holoGLRX5, den holo-A-Typ-ISC-Proteinen ISCA1/ISCA2, IBA57 und der Elektronentransferkette (FDX2/FDXR/NADPH) ohne artifizielle Reduktionsmittel die Maturierung eines  $[4\text{Fe-4S}]$ -Clusters auf der ACO2 mechanistisch untersucht werden. GLRX5 fungiert in diesem Mehrkomponentensystem als Fe/S-Clusterdonor. Die *in vivo* essentiellen ISC-Faktoren waren auch *in vitro* essentiell für die Bildung eines  $[4\text{Fe-4S}]$ -Clusters auf der Aconitase notwendig (Abbildung 50B, Seite 92). Da bei einem  $[2\text{Fe-2S}]$ -Clustertransfer keine Reduktion von Fe/S-Clustern nötig ist, ist das zelluläre Redoxsystem hier lediglich für die Reduktion der Fe/S-Clusterkoordinierenden Cysteinliganden der Akzeptorproteine zuständig. Darüber hinaus könnte GSH eine stabilisierende Funktion auf die labil gebundenen  $[2\text{Fe-2S}]$ - und  $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster haben. Das in der Literatur häufig benutzte artifizielle, thiol-spezifische Reduktionsmittel DTT hingegen könnte Fe/S-Cluster angreifen und den Fe/S-Cluster beim Übergang vom Donor auf den Akzeptor stabilisieren, was zur Folge hätte, dass der Fe/S-Cluster in einer unspezifischen Reaktion in Akzeptorproteine eingebunden wird. Hinzu kommt, dass DTT eine reduktive Kopplung von  $[2\text{Fe-2S}]$ - zu  $[4\text{Fe-4S}]$ -Clustern vornehmen kann, wodurch *in vitro* Fe/S-Clustertransferreaktionen beobachtet werden, die eventuell *in vivo* keinerlei Relevanz besitzen. Im Gegensatz zu DTT kann Grx1/GSH keinen Fe/S-Clustertransfer von einem  $[2\text{Fe-2S}]$ -Donorprotein auf ein  $[4\text{Fe-4S}]$ -Akzeptorprotein vermitteln (Abbildung 50A), was bedeutet, dass GSH/Grx1 keine reduktive Kopplung von  $[2\text{Fe-2S}]$ - zu  $[4\text{Fe-4S}]$ -Clustern katalysiert und es sich bei der Konversion eines  $[2\text{Fe-2S}]$ -Clusters zu einem  $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster um keinen spontanen zellulären Prozess handelt.

Für die *in vitro* Maturierung eines [4Fe-4S]-Clusters auf der humanen ACO2 konnte unter physiologischen Bedingungen gezeigt werden, dass sowohl GLRX5 als Fe/S-Donor, als auch die A-Typ-ISC-Proteine ISCA1/ISCA2, IBA57 und eine Elektronentransferkette (FDX2/FDXR/NADPH) essentiell notwendig sind, da die Abwesenheit von einer der genannten ISC-Komponenten zu einem signifikanten Rückgang der ACO2-Aktivität führte (Abbildung 50B).



**Abbildung 50: Transfer eines [4Fe-4S]-Clusters auf [4Fe-4S]-Proteine. (A)** Im Fe/S-Transfersystem bestehend aus einem [4Fe-4S]-Akzeptor (ACO2 oder Leu1, orange) kann chemisch rekonstituiertes humanes NFU1 einen [4Fe-4S]-Cluster auf [4Fe-4S]-Zielproteine übertragen. Im homologen Fe/S-Transfersystem überträgt NFU1 in Gegenwart von DTT oder Grx1/GSH mit nahezu gleicher Transfargeschwindigkeit einen [4Fe-4S]-Cluster auf humane apoACO2. In einem heterologen Fe/S-Transfersystem mit apoLeu1 war die Geschwindigkeitskonstante zehnfach höher als im homologen Fe/S-System. Eine spontane Konversion von einem auf GLRX5, ISCA1, ISCA2 oder ISCU2 gebundenen [2Fe-2S]-Cluster ist nicht möglich. **(B)** Die *in vitro* Konversion eines [2Fe-2S]-Clusters in einen [4Fe-4S]-Cluster beginnt konsistent zu *in vivo* Erkenntnissen bei dem [2Fe-2S]-Donor holoGLRX5. In einem noch unbekanntem Mechanismus wird der [2Fe-2S]-Cluster des GLRX5, von den holo-A-Typ-ISC-Proteinen holoISCA1/ISCA2, IBA57 und der Elektronentransferkette (FDX2/FDXR/NADPH) in einen [4Fe-4S]-Cluster in Gegenwart des Dithiol-Glutaredoxin-Reduktionssystems Grx1/GSH konvertiert. In Abwesenheit der holo-A-Typ-ISC-Proteine, IBA57, holoGLRX5 oder der Elektronentransferkette findet *in vitro* keine Fe/S-Clusterkonversion statt. Der Interaktionspartner der Elektronentransferkette ist noch unbekannt. Zwei mögliche Elektronenakzeptoren sind indiziert, weitere bleiben offen.

Ohne holoGLRX5, aber in Gegenwart der anderen Komponenten (ISCA1/ISCA2/IBA57/FDX2/FDXR/NADPH) konnte kein [4Fe-4S]-Cluster auf ACO2 gebildet werden, was nahe legt, dass der auf GLRX5 transient gebundenen [2FeFe-2S]-Cluster in einem noch unbekanntem biochemischen Mechanismus zu einem [4Fe-4S]-Cluster konvertiert wird. Die Elektronen für die reduktive Kopplung der oxidierten GLRX5-[2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Cluster stammen von der Elektronentransferkette FDX2/FDXR/NADPH, da ohne diese auch kein [4Fe-4S]-Cluster auf der ACO2 gebildet wurde. Des Weiteren waren für die Konversion des [2Fe-2S]-Clusters zu einem [4Fe-4S]-Cluster die Proteine ISCA1/ISCA2 als auch IBA57 essentiell, da die Abwesenheit einer dieser Komponenten auch zu einer verringerten ACO2-Aktivität führte.

Die zum Fe/S-Clustertransfer in Gegenwart des physiologischen, thiol-spezifischen Grx1/GSH-Redoxsystems *in vitro* erhaltenen Erkenntnisse bildeten die zelluläre Situation wirklichkeitsgetreu nach und zeigten zum ersten Mal, dass physiologisch relevante Transferreaktionen auch *in vitro* schnell (innerhalb weniger Sekunden) ablaufen. Dieses Erkenntnis über Geschwindigkeit und Spezifität könnte für zukünftige Studien als Entscheidungskriterium dafür gelten, ob ein *in vitro* beobachteter Fe/S-Clustertransfer auch tatsächlich physiologische Relevanz hat.

## 4.2 Die Rolle der mitochondrialen Bol-Proteine in der ISC-Assemblierungsmaschinerie

*In vivo* Studien in Hefe zeigten, dass die mitochondrialen Bol-Proteine (mBol) als spezifische ISC-Assemblierungsfaktoren in einem späten Schritt der ISC-Maschinerie bei der Insertion von [4Fe-4S]-Clustern auf der Lipoatsynthase (LIAS) mitwirken (Melber *et al.*, 2016; Uzarska *et al.*, 2016). Die mBol-Proteine übernehmen hierbei überlappende Funktionen, da nur eine *bol1/3Δ*-Doppeldeletion in Hefe einen klaren Effekt auf Liponsäure-abhängigen Proteinen, wie Pyruvatdehydrogenase (PDH) und  $\alpha$ -Ketoglutaratdehydrogenase (KGDH), hatte. Es gibt keine Evidenz, dass mBols für die Assemblierung mitochondrialer [2Fe-2S]-Cluster Proteine, wie Ferredoxine, oder zytosolischer Fe/S-Proteine gebraucht werden (Uzarska *et al.*, 2016).

Eine Deletion von frühen ISC-Komponenten bis hin zur Fe/S-Clusterübertragung auf Grx5 würde das Fe-Regulon stimulieren (Lill *et al.*, 2012). Das Fe-Regulon zeigte bei *bol1/3*-Deletionen allerdings keinerlei Auffälligkeit. Daraus ist zu schließen, dass die mBols ihre Funktion nach Grx5 ausüben. Des Weiteren sind die mBol-Proteine auch nach *Isa-Iba57* im späten Teil der ISC-Maschinerie zu platzieren, da sie im Gegensatz zu einer *isa/iba57*-Deletion in Hefe nicht alle [4Fe-4S]-Proteine maturieren (Mühlenhoff *et al.*, 2007; Mühlenhoff *et al.*, 2011), sondern nur spezifisch die LIAS und Komplex II bei der Clusterinsertion unterstützen (Uzarska *et al.*, 2016).

Die *in vivo* Daten deuteten darauf hin, dass die mBols ähnlich zu NFU1 in einem späten Schritt der ISC-Assemblierungsmaschinerie agieren, auch wenn sie NFU1 in einer *nfu1Δ*-Hefezelle

nicht komplementieren können (Uzarska *et al.*, 2016). Die Einordnung der mBols zum späten Teil der ISC-Maschinerie passt auch zu Fe/S-Erkrankungen, in denen Patienten mit einem funktionellen Verlust des BOLA3-Proteins einen vergleichbaren Phänotyp (MMDS2) wie Patienten mit Mutationen im NFU1-Protein (MMDS1) aufweisen (Stehling *et al.*, 2014). In der Literatur wurden bereits Interaktionen von Bol-Proteinen mit Glutaredoxinen beobachtet (Li *et al.*, 2011; Roret *et al.*, 2014). Humanem BOLA1 wird beispielsweise zusammen mit Monothiol-Glutaredoxinen eine Rolle als Reduktase zugeschrieben (Huynen *et al.*, 2005). Biochemische Beweise für die genaue physiologische und biochemische Rolle von BOLA1 bzw. eines GLRX5-BOLA1-Komplexes fehlen jedoch. Grx5-Bol-Komplexe könnten im hinteren Teil der ISC Maschinerie eine Rolle spielen. Der starke Phänotyp einer *grx5*-Deletion, der zu Fe/S-Clusterdefekten in so gut wie allen mitochondrialen und zytosolischen Fe/S-Proteinen (Camaschella *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2010) und einer Desregulierung der Fe-Homöostase führt (Wingert *et al.*, 2005), würde den vergleichbar relativ schwachen Phänotyp einer *bol1/3Δ*-Deletion überdecken. Daher wäre es möglich, dass ein Grx5-Bol-Komplex in einem späten Schritt der ISC-Maschinerie eine Rolle spielen könnte.

Da nur eine *bol1/3Δ*-Doppeldelation in Hefe einen Effekt auf wenige [4Fe-4S]-Proteine hatte, wurden in dieser Arbeit die humanen mBols (BOLA1, BOLA3) *in vitro* im Zusammenspiel mit dem humanen mitochondrialen Monothiol-Glutaredoxin GLRX5 mit den *in vitro* Methoden der MicroScale Thermophorese, analytischen Gelfiltration, spektroskopischen Methoden (UV/Vis- und CD-Spektroskopie) und mit dem in dieser Arbeit entwickeltem Fe/S-Clustertransfersystem (Ergebnisse, Kapitel 3.1.1, Seite 26) charakterisiert. Es wurde mit *in vitro* Methoden insbesondere die Interaktion, die zur Bildung eines GLRX5-BOLA1-Komplexes führte, als auch die Koordination des im GLRX5-BOLA1-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters näher bestimmt (Ergebnisse, Kapitel 3.2, Seite 44). Zusätzlich wurde von unserem italienischen Kooperationspartner, der Gruppe um Prof. Lucia Banci (CERM, Florenz), NMR-Spektroskopie verwendet, um die Interaktionsstellen der BOLA-Proteine mit GLRX5 näher definieren zu können.

#### **4.2.1 Humanes GLRX5 bildet mit BOLA1 einen holoGLRX5-BOLA1-Komplex, der einen [2Fe-2S]-Cluster koordiniert**

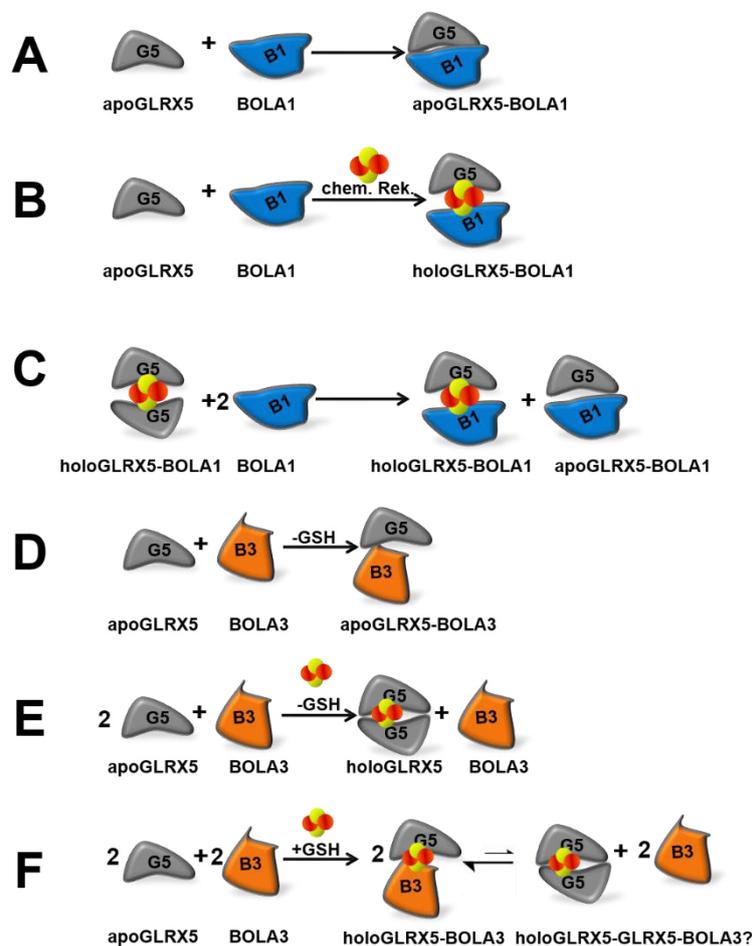
In der Literatur sind bereits Studien veröffentlicht, in denen BOLA-Homologe aus *E. coli* mit dem bakteriellen Glutaredoxin homolog GrxD interagieren (Yeung *et al.*, 2011). Auch im humanem System konnte bereits eine BOLA-GLRX5 Interaktion beobachtet werden (Huynen *et al.*, 2005). Die MicroScale Thermophorese, eine Gleichgewichtsmethode, zur Ermittlung von Dissoziationskonstanten, zeigte, dass BOLA1 sowohl mit der Holo- als auch der Apoform des GLRX5 interagiert. BOLA3 hingegen interagiert nur mit der Apoform von GLRX5, zeigte jedoch zusätzlich noch eine Interaktion mit der Holoform des späten ISC-Faktors NFU1. Die

Interaktion von BOLA3 mit apoGLRX5 war vergleichbar zur apoGLRX5-BOLA1-Interaktion. Dlouhy *et al.* (2016) beschrieben für das Protein IbaG, ein BOLA-Homolog aus *E. coli*, einen stöchiometrischen heterodimeren Grx4-IbaG-Komplex, der einen verbrückten [2Fe-2S]-Cluster bindet und spektroskopisch sich von einem Grx4-Grx4-Homodimer unterscheidet (Dlouhy *et al.*, 2016). Die physiologische und funktionelle Rolle von Grx4-IbaG ist aber bisher unbekannt.

In dieser Arbeit konnte mittels analytischer Gelfiltration gezeigt werden, dass sowohl humanes BOLA1 als auch humanes BOLA3 einen stöchiometrischen heterodimeren apoGLRX5-BOLA-Komplex mit humanem apoGLRX5 bilden, da das Elutionsvolumen dieser Komplexe sich signifikant von dem Elutionsvolumen der Einzelproteine (BOLA1, BOLA3, GLRX5) als auch des homodimeren holoGLRX5-GLRX5-Komplexes unterschieden. Um die Bildung eines holoGLRX5-BOLA-Komplexes zu analysieren, wurden sowohl BOLA1 als auch BOLA3 mit apoGLRX5 korekonstituiert. Eine Fe/S-Clusterrekonstitution ist eine *in vitro* Methode, bei der unter anaeroben Bedingungen unter Zugabe von Eisen- und Sulfidionen ein Fe/S-Cluster auf Apoproteinen gebildet wird. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Korekonstitution wurde sowohl das GLRX5- als auch BOLA-Protein stöchiometrisch eingesetzt und mit Eisen- und Sulfidionen zusammen rekonstituiert. Nach chemischer Korekonstitution von apoGLRX5 und BOLA1 konnte auch die Bildung eines stöchiometrischen heterodimeren holoGLRX5-BOLA1-Komplexes mittels analytischer Gelfiltration beobachtet werden. Dieser Komplex hatte ein zum holoGLRX5-GLRX5-Komplex und den Apoproteinen (BOLA1, BOLA3, GLRX5) unterschiedliches Elutionsvolumen. Nach Korekonstitution von GLRX5 mit BOLA3 hingegen bildete sich unter Standardpufferbedingungen (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5% Glycerin) kein holoGLRX5-BOLA3-Komplex aus. Mit einer Immunofärbung der holoGLRX5-BOLA3-Probe gegen BOLA3 wurde festgestellt, dass nach Korekonstitution von GLRX5 und BOLA3 ausschließlich ungebundenes BOLA3 vorlag. Die holoGLRX5-BOLA3-Mischung wies auch ein identisches Elutionsvolumen wie der holoGLRX5-GLRX5-Komplex auf. Aus den Interaktionsergebnissen der analytischen Gelfiltration von apoGLRX5 mit BOLA3 war allerdings bekannt, dass ein apoGLRX5-BOLA3-Komplex ein zum holoGLRX5-GLRX5-Komplex unterschiedliches Elutionsverhalten aufweist. Da die holoGLRX5-BOLA3-Probe bei einem identischen Elutionsvolumen wie der holoGLRX5-GLRX5-Komplex eluierte, deutete es darauf hin, dass unter Standardpufferbedingungen kein holoGLRX5-BOLA3-Komplex gebildet wurde und nur der homodimere holoGLRX5-GLRX5-Komplex vorlag. Ein holoGLRX5-BOLA1-Komplex hingegen wurde auch gebildet, wenn bereits chemisch rekonstituiertes holoGLRX5 mit einer stöchiometrischen Konzentration BOLA1-Protein gemischt wurde.

Die von unseren Kooperationspartnern in Italien durchgeführten NMR-Experimente (Uzarska *et al.*, 2016) zeigten allerdings, dass BOLA3 eine Affinität zu GLRX5 aufweist und ein holoGLRX5-BOLA3-Komplex gebildet wird. Dies konnte mittels der eingesetzten MicroScale

Thermophorese und analytischen Gelfiltration in dem verwendeten Standardpuffer nicht verifiziert werden. Die Pufferbedingungen bei den durchgeführten NMR-Experimenten unterschieden sich allerdings im Puffersystem, Ionenstärke, GSH-Gehalt als auch im pH-Wert von den bei der Rekonstitution verwendeten Standardpuffer. Eine analytische Gelfiltration der korekonstituierten holoGLRX5-BOLA3-Probe in Gegenwart von GSH legte nahe, dass ein nicht genau definierter holoGLRX5-BOLA3+GSH-Komplex gebildet wird. Die Interaktion von GLRX5 mit BOLA3 nach Korekonstitution war allerdings schwach und abhängig von der Gegenwart an GSH, was mit einer Interaktionsstudie von BOLA3 und holoGLRX5 in Gegenwart und Abwesenheit von GSH mit der MicroScale Thermophorese verifiziert werden konnte. Nachfolgend ist eine Zusammenfassung der *in vitro* Interaktionsdaten dargestellt (Abbildung 51).



**Abbildung 51: Interaktion der BOLA-Proteine mit dem GLRX5-Protein.** (A-C) BOLA1 bildet einen stöchiometrischen apo- oder holoGLRX5-BOLA1-Komplex sowohl mit (A) apoGLRX5, (B) nach chemischer Korekonstitution mit apoGLRX5 und (C) mit bereits chemisch rekonstituiertem holoGLRX5. (D-F) BOLA3 hingegen bildet nur unter bestimmten Pufferbedingungen einen stöchiometrischen GLRX5-BOLA3-Komplex. (D) Ein BOLA3-GLRX5-Komplex wird mit apoGLRX5 gebildet. (E) Chemische Rekonstitution in Abwesenheit von GSH führt nicht zur Bildung eines holoGLRX5-BOLA3-Komplexes. (F) Chemische Rekonstitution in Gegenwart von einer konstanten Konzentration an GSH im Puffer hingegen führt zur Bildung eines labilen holoGLRX5-BOLA3-Komplexes, der nur in Gegenwart von GSH stabil bleibt.

Eine NMR-Spektroskopiemessung kann oft mehrere Tage in Anspruch nehmen. Innerhalb dieser Zeit könnte der Fe/S-Cluster des GLRX5-BOLA3-Komplexes labilisiert werden oder sogar zerfallen und Apoproteine würden entstehen, die eine Interaktion unter NMR-Pufferbedingungen (Abwesenheit der Ionenstärke, Gegenwart von GSH) eingehen könnten. Die in der NMR-Spektroskopie beobachteten chemischen Verschiebungen des GLRX5-BOLA3-Komplexes könnten daher auch aus der Interaktion von apoGLRX5 mit BOLA3, dessen Komplexbildung in dieser Arbeit auch mittels MicroScale Thermophorese und analytischer Gelfiltration beobachtet wurde, stammen. Ob dieser in der NMR-Spektroskopie beobachtete holoGLRX5-BOLA3-Komplex eine physiologische Relevanz besitzt, bleibt daher unklar. In der NMR-Spektroskopie wurden die Regionen um das im (*beta*)  $\beta$ -Faltblatt  $\beta$ 3 sitzende hochkonservierte Histidin102 (H102, BOLA1) und Histidin96 (H96, BOLA3) als potentielle Fe/S-Clusterliganden identifiziert (Uzarska *et al.*, 2016). Das konservierte Histidin (H102) wurde bereits in der Literatur als Fe/S-Clusterliganden für das zytosolische Grx4-Bol2-System (H103 in Bol2) beschrieben (Li *et al.*, 2011). Zusätzlich zum H102 des BOLA1 zeigten sich zwei weitere potentielle Histidine, die in  $\beta$ 2 (H67), wie auch zwischen  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 (H58) in der Schleife sitzen und als potentielle Fe/S-Clusterliganden für BOLA1 fungieren könnten (Ergebnisse, Abbildung 38, Seite 68). Humanes BOLA3 besitzt zusätzlich zum H96 eine weitere konservierte Aminosäure, Cystein59 (C59), welche in der Schleife zwischen  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 lokalisiert ist.

#### 4.2.2 Die holoGLRX5-BOLA3-Komplexbildung ist GSH-abhängig

Fe/S-Cluster absorbieren Licht fast im gesamten Wellenbereich des nahen UV und des sichtbaren Lichts (Vis), wodurch sie durch charakteristische Banden gekennzeichnet sind. Die CD-Spektroskopie eignet sich daher zur Untersuchung der möglichen Fe/S-Clusterbindung sowie einer Charakterisierung des Fe/S-Clustertypus. Diese Eigenschaft kann sowohl für kinetische Studien als auch zum Detektieren einer Änderung des Fe/S-Cluster-umgebenden Umfelds –ausgelöst beispielsweise durch einen Ligandenaustausch– ausgenutzt werden. Voraussetzung dafür ist, dass der Fe/S-Cluster CD-spektroskopisch aktiv ist. Der [2Fe-2S]-Cluster des humanen GLRX5 zeigte im Gegensatz zu dem des Hefehomologs Grx5 ein CD-Spektrum.

Die CD-Spektroskopie zeigte eindeutige Unterschiede in der Fe/S-Clusterkoordination eines chemisch korekonstituierten GLRX5-BOLA-Komplexes im Vergleich zu einem homodimeren holoGLRX5-GLRX5-Spektrum. Im Gegensatz zum homodimeren holoGLRX5-GLRX5-Komplex zeigte das CD-Spektrum des holoGLRX5-BOLA1-Heterodimers neue signifikante und eindeutige spektrale Charakteristika, wie beispielsweise ein neues Extrema bei ~400 nm. Der GLRX5-BOLA1-[2Fe-2S]-Cluster war stabil gebunden und geschützt. Die hohe Stabilität des gebundenen [2Fe-2S]-Clusters gegenüber einer Reduktion mit Dithionit war

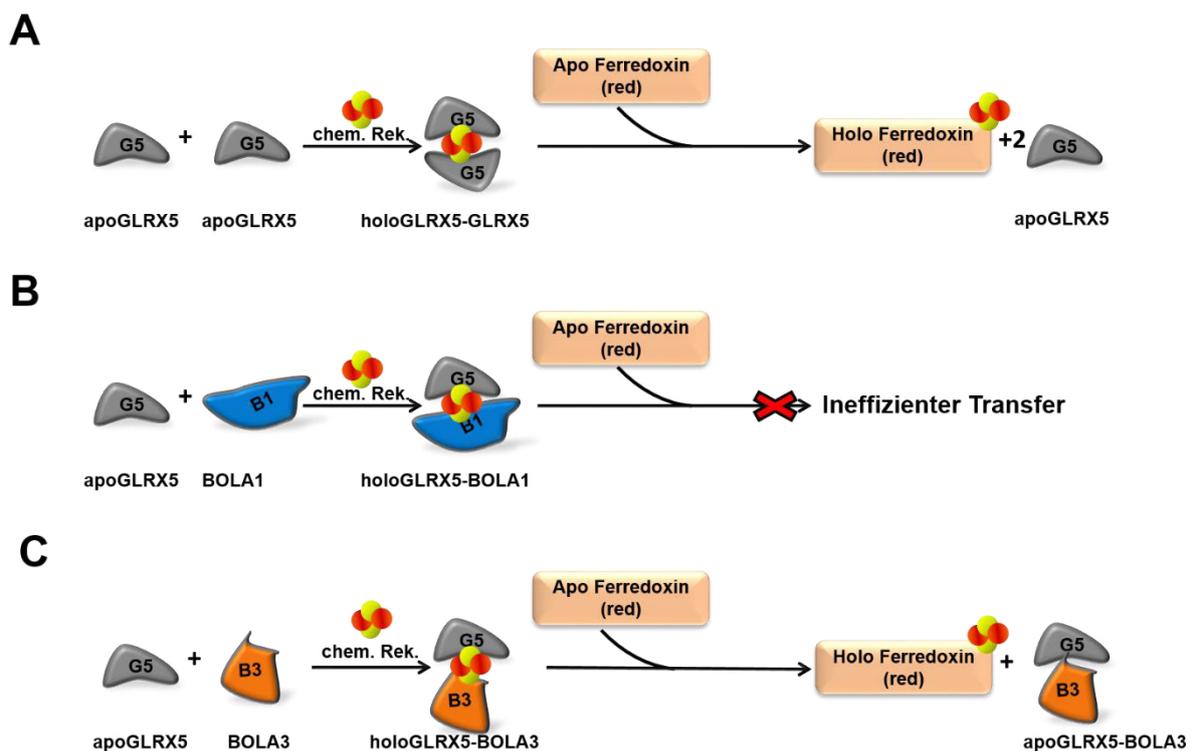
charakteristisch für eine holoGLRX5-BOLA1-Komplexbildung. Die genannten Kriterien waren unterschiedlich zum GLRX5-BOLA3-Komplex. Eine holoGLRX5-BOLA3-Probe zeigte abhängig von der Gegenwart von GSH CD-spektroskopische Änderungen. In Abwesenheit von GSH verhielt sich eine holoGLRX5-BOLA3-Probe CD-spektroskopisch wie ein homodimerer holoGLRX5-GLRX5-Komplex. Die holoGLRX5-BOLA3-Probe zeigte keine Änderung im CD-spektroskopischen Verlauf und der Fe/S-Cluster war gegen Reduktion mit Dithionit nicht geschützt. Dieses Kriterium wurde auch für den homodimeren holoGLRX5-GLRX5-Komplex beobachtet. Dies passt zur Vorstellung, dass entweder kein homologer Holokomplex (-GSH) gebildet wurde oder der homologe Holokomplex in Gegenwart von GSH labil ist. In Gegenwart von reduziertem Glutathion (GSH) war jedoch eine Änderung der Signalintensität, die Bildung eines Wendepunktes bei ~400 nm im Gegensatz zu einem Extrema im holoGLRX5-GLRX5-Spektrum und eine Blauverschiebung des Maximums bei ~460 nm von ~10 nm erkennbar, was darauf hindeutet, dass der Fe/S-Cluster in Anwesenheit von GSH mit BOLA3 geteilt wird. Die spektralen Änderungen in Gegenwart von GSH deuten darauf hin, dass BOLA3 eine Affinität zu holoGLRX5 besitzt. Zusätzlich ist der GLRX5-BOLA3-Fe/S-Cluster gegenüber Reduktion mit Dithionit nicht geschützt und verhält sich spektral gesehen genauso wie der homodimere holoGLRX5-GLRX5-Komplex, was auf eine schwache GLRX5-BOLA3-Interaktion schließen lässt. Die CD-spektroskopischen Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der MicroScale Thermophorese und analytischen Gelfiltration, die auf keinen Komplex unter Standardbedingungen bzw. einen kinetisch labilen holoGLRX5-BOLA3+GSH-Komplex in Gegenwart von GSH hindeuten. In der nachfolgenden Diskussion wird daher nur noch der GLRX5-BOLA3-Komplex betrachtet, der sich nach Korekonstitution von GLRX5 und BOLA3 in Gegenwart von GSH gebildet hatte.

#### **4.2.3 BOLA3 labilisiert, BOLA1 stabilisiert einen im heterologen Komplex gebundenen Fe/S-Cluster**

Ein Fe/S-Clustertransfer hängt u.a. von der Transferfähigkeit eines auf einem Donorprotein gebundenen Fe/S-Clusters ab (Diskussion, Kapitel 4.1.2, Seite 87). Für den Transfer eines Fe/S-Clusters auf ein Akzeptorprotein spielt die Stabilität der Fe/S-Clusterbindung auf dem Donorprotein eine Rolle. Um den Einfluss der BOLA-Proteine auf die Stabilität des im holoGLRX5-BOLA-Komplex gebundenen [2Fe-2S]-Clusters zu untersuchen, wurde das in dieser Arbeit entwickelte Fe/S-Transfersystem (Diskussion, Kapitel 4.1.2, Seite 87) zur Verfolgung eines Fe/S-Clustertransfers auf [2Fe-2S]-Akzeptoren (*S. el*/Fd, FDX1) verwendet. HoloGLRX5, sowie die holoGLRX5-BOLA-Komplexe wurden als Fe/S-Donoren, apo *S. el*/Fd und humanes apoFDX1 wurden als Fe/S-Akzeptoren im Fe/S-Transfersystem eingesetzt. Die Menge an holo-Ferredoxin wurde an Hand der Reduktion von Cytochrom *c* verfolgt.

Die holoGLRX5-BOLA3- und holoGLRX5-GLRX5-Komplexe haben nahezu identische Transfargeschwindigkeiten, wobei der Fe/S-Cluster jeweils sehr effizient und schnell übertragen wurde. Humanes BOLA3 schien den Fe/S-Cluster des humanen holoGLRX5-BOLA3+GSH-Komplexes sogar im Transfersystem mit dem heterologem Apozielprotein *S. el.* Fd zu labilisieren. Auch im homologen System mit apoFDX1 als Apozielprotein wurde eine zum Transfer des holoGLRX5-Fe/S-Clusters vergleichbare Menge holoFDX1 in Gegenwart des GLRX5-BOLA3-Komplexes gebildet, was bestätigt, dass BOLA3 den im holoGLRX5-BOLA3-Komplex gebundenen Fe/S-Cluster labilisiert. Die erhaltenen Fe/S-Clustertransferdaten waren konsistent mit den zuvor durchgeführten Experimenten der MicroScale Thermophorese, analytischen Gelfiltration und CD-Spektroskopie, in denen eine geringe Affinität des BOLA3 zu GLRX5 und ein labilisiertes Fe/S-Cluster im holoGLRX5-BOLA3-Komplex beobachtet wurde.

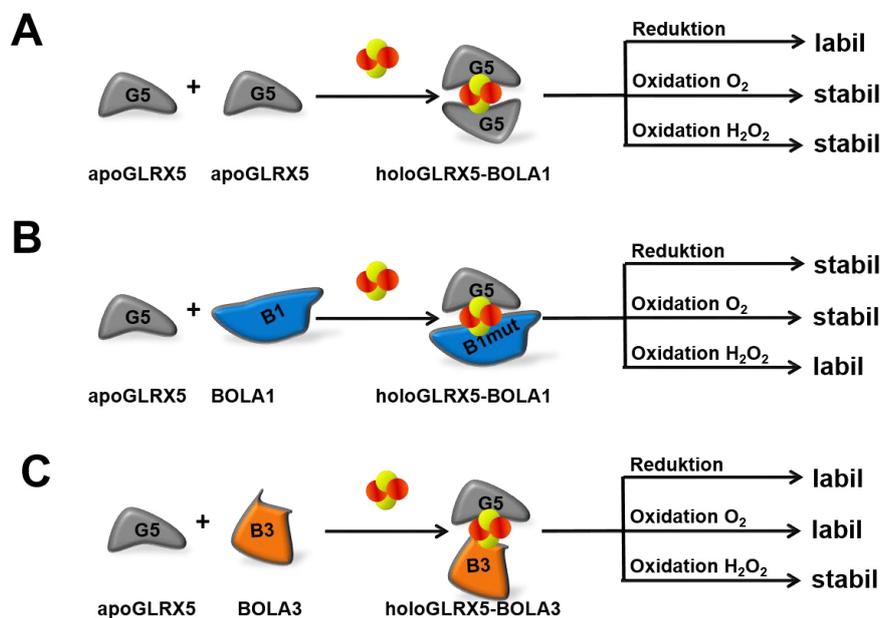
Der holoGLRX5-BOLA1-Komplex hingegen übertrug als im Fe/S-Transfersystem eingesetzter Fe/S-Donor keinen Fe/S-Cluster auf ein [2Fe-2S]-Zielprotein (*S. el.* Fd, apoFDX1) (Abbildung 52).



**Abbildung 52: Der Fe/S-Cluster des GLRX5-BOLA1-Komplexes kann nicht transferiert werden, die Fe/S-Cluster des holoGLRX5-GLRX5 und holoGLRX5-BOLA3-Komplexes hingegen schon.** Fe/S-Akzeptoren (Ferredoxine, orange) des Fe/S-Clustertransfers waren *S. el.* Fd und humanes FDX1. Als Fe/S-Clusterdonoren wurde der (A) chemisch rekonstituierte GLRX5-, der chemisch korekonstituierte (B) GLRX5-BOLA1- oder (C) GLRX5-BOLA3-Komplex verwendet. Sowohl der im holoGLRX5-, als auch holoGLRX5-BOLA3-Komplex gebundene Fe/S-Cluster konnte auf ein apo-Ferredoxin transferiert werden. Der holoGLRX5-BOLA1-Komplex konnte seinen gebundenen [2Fe-2S]-Cluster hingegen nicht in ein apo-Ferredoxin insertieren.

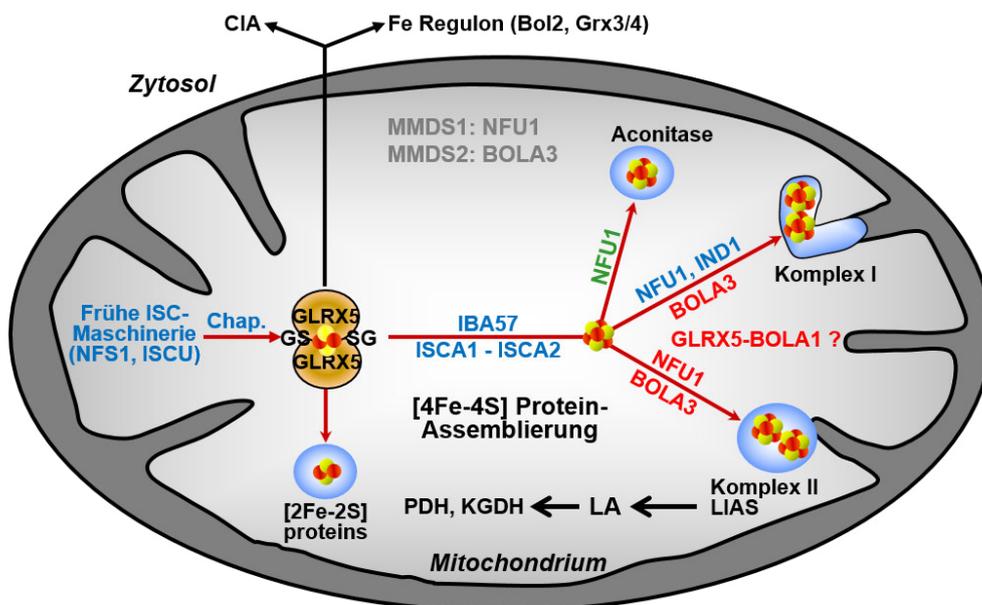
Der im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundene Fe/S-Cluster ist nicht nur gegenüber Reduktion stabil, sondern auch gegenüber Dissoziation und Transfer auf ein Akzeptorprotein abgeschirmt. Eine physiologische Funktion des GLRX5-BOLA1 Komplexes in Mitochondrien konnte bisher nicht gefunden werden, da eine alleinige Deletion von Hefe *BOL1 in vivo* keinerlei Phänotyp zeigt (Uzarska *et al.*, 2016). Der GLRX5-BOLA1 Komplex könnte deshalb eine enzymatische Funktion haben oder eine Rolle für Proteine spielen, die bisher nicht untersucht wurden.

*E. coli* besitzt zusätzlich zum BolA-Protein noch weitere BolA-Homologe. Eines dieser BolA-Homologen, das Protein IbaG könnte eine Funktion bei der Zellwandbiosynthese haben (Dlouhy *et al.*, 2016). BOLA1 wurde auch an membrangebundenen Proteinen gefunden, eine Rolle des BOLA1 auf membrangebundene Proteine wäre ebenso denkbar, ebenso wie eine Funktion als Fe/S-Clusterspeicher, der nur unter bestimmten Bedingungen den stabil gebunden Fe/S-Cluster des holoGLRX5-BOLA1-Komplexes transferiert. In Experimenten, in denen die holoGLRX5-BOLA-Komplexe unterschiedliches Verhalten gegenüber der Zugabe der Oxidationsmitteln  $O_2$ ,  $H_2O_2$  und des Reduktionsmittels Dithionit zeigten (Abbildung 53), deuteten auf eine mögliche redoxsensitive Rolle hin. Der Fe/S-Cluster der holoGLRX5-BOLA-Komplexe war gegen Oxidation mit Luftsauerstoff, aber nicht gegen die stärkere  $H_2O_2$ -Oxidation geschützt. Nach Reduktion mit Dithionit war nur der im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundene Fe/S-Cluster stabil und geschützt, der des holoGLRX5-BOLA3-Komplexes hingegen nicht.



**Abbildung 53: Die holoGLRX5-GLRX5- und holoGLRX5-BOLA-Komplexe verhalten sich unterschiedlich nach Zugabe von Oxidations- oder Reduktionsmitteln. (A)** Der chemisch rekonstituierte Fe/S-Cluster des holoGLRX5-GLRX5-Komplexes ist gegen Dithionitreduktion labil, aber gegen die Oxidationsmittel Sauerstoff ( $O_2$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) stabil. **(B)** Der Fe/S-Cluster im holoGLRX5-BOLA1-Komplex hingegen ist stabil gegen Reduktion und Sauerstoff, aber nicht gegen  $H_2O_2$ . **(C)** Im holoGLRX5-BOLA3-Komplex ist der Fe/S-Cluster labil gegen Reduktion mit Dithionit und Oxidation mit  $H_2O_2$ , und nur gegen Sauerstoff geschützt.

Der Stabilitätsunterschied des im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters im Vergleich zum Fe/S-Cluster des holoGLRX5-GLRX5-Komplexes könnte darauf hindeuten, dass GLRX5-BOLA1 unter oxidativem Stress eine Rolle spielen könnte, in dem der sonst stabil gebundene Fe/S-Cluster auf bislang unbekannte Zielproteine übertragen wird. Der holoGLRX5-BOLA1-Komplex könnte somit einen Fe/S-Clusterspeicher darstellen, der nur unter bestimmten Redoxbedingungen einen Fe/S-Cluster freisetzt und auf stressgeschädigten Fe/S-Proteinen einen neuen Fe/S-Cluster insertieren könnte. Die erhaltenen Daten deuten auf unterschiedliche Funktionen der BOLA-Proteine in der Fe/S-Clusterbindung der holoGLRX5-BOLA-Komplexe hin, BOLA1 stabilisiert und BOLA3 labilisiert einen Fe/S-Cluster. Für BOLA3 wurde eine präferierte Interaktion mit der Holoform von NFU1 mittels Thermophorese festgestellt. Diese könnte auf eine Fe/S-Cluster stabilisierende Rolle von BOLA3 mit dem auf NFU1 gebundenen [4Fe-4S]-Cluster hindeuten. An Hand der erhaltenen *in vivo* und *in vitro* Daten werden die mitochondrialen BOLA-Proteine dem späten Teil der ISC-Maschinerie zugeordnet (Abbildung 54).



**Abbildung 54: Die Rolle der mitochondrialen BOLA-Proteine als spezifische ISC-Assemblierungsfaktoren im späten Teil der mitochondrialen Fe/S-Protein-Biogenese.** Die Proteine NFS1 (Schwefeldonor), ISCU (Gerüstprotein) und bestimmte Chaperone führen zur Assemblierung des transient gebundenen, Glutathion (GS)-koordinierten [2Fe-2S]-Clusters auf dem Monothiol-Glutaredoxin GLRX5. GLRX5 ist essentiell für die [2Fe-2S]-Proteinassemblierung, zytosolische Fe/S-Proteinassemblierung (CIA-Maschinerie) und die zelluläre Eisenregulation in Hefe (Herrero *et al.*, 2010). Mit der Hilfe der A-Typ Proteine ISCA1 und ISCA2, sowie IBA57 wird der [2Fe-2S]-Cluster in einen [4Fe-4S]-Cluster konvertiert. Die BOLA-Proteine, BOLA1 und BOLA3 sind spezifisch an der Assemblierung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine wie der LIAS beteiligt. Die von dem Fe/S-Protein Liponsäuresynthase (LIAS) gebildete Liponsäure (LA) wird für fünf mitochondriale Enzyme, u.a. die Pyruvatdehydrogenase (PDH) und 2-Ketoglutaratdehydrogenase (KGDH), verwendet. Aus *in vivo* Daten (Uzarska *et al.*, 2016) und den *in vitro* Daten dieser Arbeit ist es möglich, für BOLA3 im späten Schritt der ISC-Maschinerie eine Rolle bei der Fe/S-Clusterinsertion in ausgewählte [4Fe-4S]-Proteine zuzuordnen. Für den *in vitro* beobachteten GLRX5-BOLA1-Komplex ist bisher noch keine genaue Zuordnung möglich. Nach Uzarska *et al.* 2016.

Die biochemischen Ergebnisse wurden unterstützt durch spezifische genetische Interaktion von *Nfu1* und *Bol3*. Doppeldeletion von *Nfu1* und *Bol3* verstärken den Fe/S-Defekt auf LIAS und auch auf SDH. Gleichzeitige Deletion von *Nfu1* und *Bol1* hingegen beeinflussen gegenüber *nfu1Δ* weder die LIAS noch die SDH. Diese Ergebnisse unterstützen die *in vitro* Daten und deuten auf eine gemeinsame Rolle in der Fe/S-Clusterassemblierung der SDH und LIAS hin. Die genaue physiologische Funktion der Stabilisierung oder Destabilisierung des Fe/S-Clusters im holoGLRX5-BOLA-Komplex erfordert noch weitere Untersuchungen (Ausblick, Kapitel 5, Seite 106).

### 4.3 Die Fe/S-Clusterkoordination im holoGLRX5-BOLA1-Komplex

Die BOLA-Proteine besitzen eine ähnliche Faltung, die vergleichbar mit anderen eukaryotischen Homologen ist. Die NMR-Experimente der Gruppe um Prof. Lucia Banci identifizierten für den holoGLRX5-BOLA-Komplex das konservierte Histidin H102 (in BOLA1) bzw. H96 (in BOLA3) als potentiellen Fe/S-Clusterliganden (Uzarska *et al.*, 2016). Weitere konservierte Histidine H67 und H58 sind im BOLA1 zu finden (Ergebnisse, Abbildung 38, Seite 68). BOLA3 besitzt im Gegensatz zu BOLA1 nur das Cystein C59. Dies könnte den Stabilitätsunterschied in der Fe/S-Clusterbindung in den holoGLRX5-BOLA-Komplexen erklären (Diskussion, Kapitel 4.2.3, Seite 98). Für ein biochemisches Verständnis der Funktion und zur Analyse der Unterschiede in der Stabilität des im holoGLRX5-BOLA-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters ist es wichtig die an der Fe/S-Clusterbindung beteiligten Liganden zu charakterisieren. Im homodimeren holoGLRX5-GLRX5-Komplex wird der [2Fe-2S]-Cluster jeweils durch den Schwefel eines Cysteins des konservierten CGF-Motivs und einem Glutathion pro GLRX5-Monomer gebunden, so dass ein vierfach koordinierter Fe/S-Cluster im homodimeren GLRX5-GLRX5-Komplex vorliegt (Johansson *et al.*, 2011). In der heterodimeren holoGLRX5-BOLA-Komplexsituation ersetzt ein BOLA-Protein ein GLRX5-Protein des homodimeren GLRX5-GLRX5-Komplexes (Diskussion, Kapitel 4.2.1, Seite 94). Durch die Dissoziation eines GLRX5 aus dem holoGLRX5-GLRX5-Komplex müssen zwei freie Koordinationsstellen, die des GLRX5-Cysteins (CGF-Motiv) als auch die des Glutathions, durch das BOLA1-Protein für die Koordination eines [2Fe-2S]-Clusters im holoGLRX5-BOLA1-Komplex ersetzt werden. Fe/S-Cluster werden hauptsächlich durch Cysteine koordiniert, jedoch können auch Histidine als Fe/S-Clusterliganden fungieren können (Bak und Elliott, 2014). Primärsequenzvergleiche von BOLA1- und BOLA3 verwandten Proteinen (Ergebnisse, Kapitel 3.3, Seite 67) zeigen, dass BOLA1 keine konservierten Cysteine, dafür aber mehrere konservierte Histidine (H58, H67, H86 und H102) besitzt (Ergebnisse, Abbildung 38, Seite 68).

### 4.3.1 Das Histidin H102 ist im GLRX5-BOLA1-Komplex *in vivo* funktionell essentiell, aber nicht essentiell für die Fe/S-Clusterkoordination

Für den zytosolischen Grx4-Bol2-Komplex wird das konservierte Histidin H103 in der Literatur als Fe/S-Clusterligand beschrieben (Li *et al.*, 2011). An Hand der publizierten Daten für den Grx4-Bol2-Komplex wurde bisher angenommen, dass eine ähnliche Situation der Fe/S-Clusterkoordination für den Fe/S-Cluster eines mitochondrialen holoGLRX5-BOLA-Komplexes vorliegt. Das humane BOLA1 besitzt mehrere konservierte Histidine (H102, H86, H67, H58), die als potentielle Fe/S-Clusterliganden fungieren könnten, wobei die Histidine H102, H67 und H58 nahe beieinander liegen (Ergebnisse, Kapitel 3.3, Abbildung 38, Seite 68). Um potentielle Fe/S-Clusterliganden zu identifizieren wurden in dieser Arbeit die Histidine zu Alanin mutiert und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Die Alaninsubstitution eines Fe/S-Cluster-koordinierenden Histidins müsste in den eingesetzten *in vitro* Methoden (analytische Gelfiltration, UV/Vis-, CD-Spektroskopie, Fe/S-Transfersystem) Stabilitätsveränderungen des im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters zeigen, wodurch sie als Fe/S-Cluster-koordinierend identifiziert würde.

Die Koordination eines Fe/S-Clusters durch ein Histidin bewirkt bei unterschiedlichen pH-Werten, bedingt durch Protonierung und Deprotonierung des Stickstoffs am Imidazolring des Histidins, eine charakteristische Verschiebung im sichtbaren Bereich des UV/Vis-Spektrums (Kuila *et al.*, 1992). Um zu überprüfen, ob eine Koordination des im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundenen Fe/S-Clusters durch ein BOLA1-Histidin vorliegt, wurde daher UV/Vis-Spektroskopie des korekonstituierten GLRX5-BOLA1-Komplexes unter anaeroben Bedingungen in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Durch UV/Vis-Spektroskopie konnte nahegelegt werden, dass im holoGLRX5-BOLA1-Komplex der Fe/S-Cluster durch ein Histidin koordiniert werden könnte, da eine Verschiebung des Absorptionsmaximums ins Blau um ~9 nm zu beobachten war. Diese Verschiebung kann charakteristisch für einen Histidin-koordinierten Fe/S-Cluster sein (Kuila *et al.*, 1992). Mittels UV/Vis-Spektroskopie konnte allerdings nicht das koordinierende Histidin identifiziert werden. Bisher wurde das H102 auf Basis spektroskopischer Messungen als Fe/S-Clusterliganden für Bol2 im zytosolischen Grx4-Bol2-Komplex beschrieben (Li *et al.*, 2011). Auf Grund dieses Erkenntnis wurde auch für den holoGLRX5-BOLA1-Komplex das H102 als Clusterligand vermutet. Allerdings wurde mit den *in vitro* Methoden der CD-Spektroskopie und analytischen Gelfiltration festgestellt, dass alle BOLA1 Proteine mit Alaninsubstitutionen (H102A, H67A, H58A, H102/67/58A) im holoGLRX5-BOLA1mut-Komplex (mut: H012A, H67A, H58A, H102/67/58A) einen [2Fe-2S]-Cluster binden konnten. Der Fe/S-Cluster der holoGLRX5-BOLA1mut-Komplexe (mut: H012A, H86A) war gegen Reduktion mit Dithionit genauso stabil, wie der Fe/S-Cluster des holoGLRX5-BOLA1-Komplexes, was darauf hindeutet, dass diese

Histidine nicht an der Fe/S-Clusterkoordinierung beteiligt sind. Weitere Einzelmutanten zeigten im holoGLRX5-BOLA1mut-Komplex (mut: H58A, H67A) spektroskopische Unterschiede zum CD-Spektrum eines holoGLRX5-BOLA1-Komplexes. Die Maxima bei ~460 nm waren jeweils um ~6 nm Blau-verschoben. Der Fe/S-Cluster der holoGLRX5-BOLA1mut-Komplexe (mut: H67A, H58A) war gegen Dithionitreduktion nicht stabil, was auf eine Labilisierung des Fe/S-Clusters und somit auf eine Fe/S-Cluster-koordinierende Funktion dieser Histidine (H67, H58) im holoGLRX5-BOLA1-Komplex hindeuten könnte.

Mittels des beschriebenen Fe/S-Clustertransfersystems (Diskussion, Kapitel 4.1.2, Seite 87) wurde überprüft, ob der im holoGLRX5-BOLA1-Komplex (Fe/S-Donor) gebundene [2Fe-2S]-Cluster auf ein [2Fe-2S]-Akzeptorprotein (apo *S. el. Fd*, apoFDX1) übertragen werden kann. Bis auf die BOLA1H102/67/58A-Dreifachmutante, die den Fe/S-Cluster transferieren konnte, war interessanterweise der [2Fe-2S]-Cluster in allen holoGLRX5-BOLA1mut-Komplexen (H102A, H67A, H58A) stabil gebunden und gegen einen Fe/S-Transfer geschützt. Diese Beobachtung legt nahe, dass die strukturell naheliegenden Histidine H102, H67 und H58 sich nach einer Alaninsubstitution gegenseitig bei der Koordination eines Fe/S-Clusters ersetzen könnten und daher den Fe/S-Cluster nach wie vor koordinieren. Allerdings könnte der Fe/S-Cluster im holoGLRX5-BOLA1-Komplex so stabil zwischen GLRX5 und BOLA1 eingebunden sein, dass eine Alaninsubstitution einer Fe/S-Cluster koordinierenden Aminosäure nicht zu einem Fe/S-Clusterbindungsverlust führt.

Eine gut etablierte Methode zur Identifizierung von Fe/S-Clusterliganden ist die radioaktive <sup>55</sup>Fe-Markierung in Hefe. Hierfür werden zur Bestimmung der *de novo* Fe/S-Proteinreifung kultivierte Hefezellen unter Eisenmangel mit radioaktiven <sup>55</sup>Fe versetzt und anschließend der Einbau des radioaktiven Eisenisotops <sup>55</sup>Fe durch Immunopräzipitation des Fe/S-Zielproteins untersucht. Eine messbare <sup>55</sup>Fe-Konzentration deutet auf eine erfolgreiche Fe/S-Clusterassemblierung hin. Für BOLA1 zeigte sich allerdings durch in der Vergangenheit durchgeführte *in vivo* Experimente, dass sowohl das Hefe Grx5 als auch der Hefe Grx5-Bol1- sowie der humane GLRX5-BOLA1-Komplex in Hefe nicht radioaktiv mit <sup>55</sup>Fe markiert werden konnten. Allerdings besitzen auch andere Bol-Klassen, wie z.B. das zytosolische Bol2 konservierte Histidine. Bol2 besitzt ein zum konservierten Histidin H102 des BOLA1 konserviertes Histidin H103. Für den Grx4-Bol2-Fe/S-Cluster wird auf Basis spektroskopischer Daten postuliert, dass dieser von jeweils einem Cystein (C66) und einem Histidin (H103) des Bol2-Proteins koordiniert wird (Li *et al.*, 2011). Für das Bol2 im Grx4-Bol-Komplex bestand die Möglichkeit *in vivo* den Fe/S-Cluster mittels einer <sup>55</sup>Fe-Markierung in Hefe zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde für die <sup>55</sup>Fe-Markierung das zytosolische Bol2, welches mit zytosolischen Hefe Grx4 interagiert (Li *et al.*, 2009), verwendet. Auch der Grx4-Bol2-Komplex zeigte nur bei einer Bol2H103A/C66A-Doppelmutation einen kompletten Verlust des im Grx4-Bol2 gebundenen Fe/S-Clusters. Nach Alaninsubstitution des Histidins H103 oder des

Cysteins C66 waren noch mehr als 50% Fe/S-Cluster im Grx4-Bol2-Komplex gebunden. Das in der Literatur beschriebene Histidin H102 konnte mittels *in vitro* und *in vivo* Methoden nicht als wichtiger Fe/S-Clusterligand identifiziert werden. Allerdings verursacht eine Substitution des Histidins H102 durch Alanin im Hefe Bol1-Protein einen Wachstumsdefekt einer *bol1/bol3*Δ-Hefezelle in acetathaltigem Medium, was auf eine essentielle Funktion, die aber nicht in der Fe/S-Clusterkoordination liegt, hinweist.

Zusammenfassend deuten die *in vitro* und *in vivo* Daten darauf hin, dass das Histidin H102 des BOLA1-Proteins zwar essentiell für die Funktion, aber nicht essentiell für die Fe/S-Clusterkoordination ist. Da sogar die Substitution aller drei konservierten BOLA1 Histidinreste keinen vollständigen Fe/S-Clusterverlust im holoGLRX5-BOLA1H102/H67/H58A-Komplex zur Folge hatte, lassen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse darauf schließen, dass der im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundene [2Fe-2S]-Cluster auf andere Art stabilisiert wird. Hierzu könnte im holoGLRX5-BOLA1-Komplex gebundenes GSH beitragen, wie dies für GLRX5 kürzlich in *in vitro* Experimenten nahegelegt wurde (Sen *et al.*, 2018). Aus den in dieser Arbeit erhaltenen *in vitro* Daten geht außerdem die unterschiedliche biochemische Rolle der beiden humanen holoGLRX5-BOLA-Komplexe hervor. Diese Unterschiede müssen physiologisch durch weitere eingehende *in vivo* Studien aufgeklärt werden.

## 5 Ausblick

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lieferten grundlegende neue Erkenntnisse über die Funktion von Proteinen der späten ISC-Assemblierungsmaschinerie in Fe/S-Transferreaktionen. Die aus dem Fe/S-Transfersystem gewonnene Erkenntnis über Geschwindigkeit und Spezifität könnte für zukünftige Studien als Entscheidungskriterium gelten, ob ein *in vitro* beobachteter Fe/S-Transfer physiologische Relevanz besitzt. Viele ISC-Assemblierungsfaktoren, die bisher nur unzureichend charakterisiert wurden, könnten wirklichkeitsgetreu studiert werden. Das Dithiol-Reduktionssystem Grx1/GSH konnte *in vitro* artifizielle, thioispezifische Reduktionsmittel wie Dithiothreitol (DTT) ersetzen. Unter physiologischen Bedingungen konnte ein Fe/S-Clustertransfersystem entwickelt werden, um einen der wichtigsten Schritte der Fe/S-Assemblierung, die Insertion des Fe/S-Clusters in Zielproteine, wirklichkeitsgetreu nachzubilden und zu studieren. Hierbei zeigte sich auch *in vitro* die essentielle Rolle der A-Typ-ISC-Proteine, IBA57, als auch der Elektronentransferkette (FDX2/FDXR/NADPH) für die Konversion eines [2Fe-2S]-Clusters zu einem [4Fe-4S]-Cluster. Die *in vitro* Daten waren konsistent mit *in vivo* Studien. Die genaue biochemische Funktion sowohl von IBA57 als auch der A-Typ-ISC-Proteine während des Prozesses der Fe/S-Clusterkonversion ist allerdings noch unklar. Strukturelle Informationen eines A-Typ-ISC-Komplexes als auch von IBA57 könnten zum Verständnis der biochemischen Funktion beitragen. Strukturelle Informationen würden zusätzlich zu einem besseren Grundverständnis von Patientenkrankheiten mit Fe/S-Phänotypen verhelfen.

IBA57 ist über verschiedene Organismen nur in der „Folatbindungsdomäne“ (Einleitung, Abbildung 13, Seite 19) konserviert. Nicht gezeigte Daten legen nahe, dass ein konserviertes Cystein funktionell essentiell für IBA57 ist. Mutationen dieses Cysteins zu Serin könnten Aufschluss darüber geben, ob das Cystein eine Funktion bei der Fe/S-Clusterstabilisierung im ISCA1/2-IBA57-Komplex wahrnimmt oder für Thiolchemie notwendig ist.

Für die Konversion eines [2Fe-2S]-Clusters zu einem [4Fe-4S]-Cluster sind Elektronen notwendig. Die *in vitro* Aktivierung der apoACO2 war von einer funktionierenden Elektronentransferkette aus einem Ferredoxin (FDX2), einer Ferredoxinreduktase (FDXR) und NADPH abhängig. Dies zeigt, dass diese Elektronentransferkette *in vitro* die reduktive Kopplung von zwei oxidierten [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Clustern in einen [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster katalysieren kann. Ob dies *in vivo* ebenfalls der Fall ist, muss offen bleiben, da das Fehlen von FDX2 zu einem Zusammenbruch der Funktion der frühen ISC-Maschine führt, und daher eine weitere Rolle für FDX2 in der späten Phase der Maturierung mitochondrialer Proteine *in vivo* nicht untersucht werden kann. Unklar bleibt daher in welchem Schritt der Fe/S-Clusterkonversion die von der Elektronentransferkette bereitgestellten Elektronen benötigt werden (Diskussion, Abbildung 50, Seite 92). *In vitro* Interaktionsstudien der Elektronentransferkette unter Verwendung von MicroScale Thermophoresis oder CD-Spektroskopie mit dem Fe/S-Donorprotein GLRX5, dem

ISCA1/2-IBA57-Komplex oder dem Zielprotein, der mitochondrialen Aconitase (ACO2), könnten Hinweise auf den möglichen Interaktionspartner liefern.

Die Geschwindigkeit des hier gezeigten und entwickelten Transfersystems war schneller als alle mit artifiziellen Reduktionsmittel verwendeten Transfersysteme in der bisherigen Literatur. Dennoch war das [4Fe-4S]-Transfersystem im Vergleich zum [2Fe-2S]-Transfersystem langsamer. Die Erkenntnisse aus dem [2Fe-2S]-Transfersystem deuten allerdings daraufhin, dass in einem spezifischen, homologen Fe/S-Clustertransfersystem binnen weniger Sekunden eine vollständige Fe/S-Clusterübertragung möglich ist. Essentiell für die Geschwindigkeit und Effizienz der Konversion von einem [2Fe-2S]-Cluster zu einem [4Fe-4S]-Cluster ist womöglich hierbei die Bildung eines ISCA1/ISCA2-Komplexes. Koexpression von ISCA1/ISCA2 in *E. coli* war bisher für die humanen Proteine nicht erfolgreich, weshalb für die Bildung des ISCA1/2-Komplexes Experimente mit einem anderen Expressionsorganismus durchgeführt werden sollten.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte die biochemische Funktion der humanen BOLA-Proteine, BOLA1 und BOLA3, näher studiert werden. Die Interaktion von GLRX5 mit BOLA1 konnte mit verschiedenen *in vitro* Methoden unabhängig voneinander verifiziert werden. Die an der Koordination des Fe/S-Clusters beteiligten Histidine im heterodimeren holoGLRX5-BOLA1-Komplex sind allerdings noch unklar. Auch hier würden strukturelle Informationen oder weitergehende spektroskopische Analysen wie beispielsweise Raman- oder Mößbauer-spektroskopie von holoGLRX5-BOLA1mut-Komplexen (mut: H58A, H67A, H102A, oder H58/H67/H102A) wichtige Erkenntnisse liefern. Der [2Fe-2S]-Cluster im homodimeren holoGLRX5-GLRX5-Komplex wird durch jeweils ein Cystein und ein Glutathion pro monomeren GLRX5 koordiniert. Durch Dissoziation eines GLRX5 in Gegenwart von BOLA1 würden zwei freie Koordinationsstellen entstehen. Ein Histidin des BOLA1 könnte beispielsweise das Cystein oder Glutathion ersetzen. Eine weitere Koordinationsstelle wäre allerdings noch unbesetzt. Der Ligand der freien Koordinationsstelle ist noch nicht bekannt. Eine Kristallstruktur könnte über die genaue Koordination des Fe/S-Clusters im GLRX5-BOLA1-Komplex Hinweise liefern. *In vivo* Daten zeigten eine überlappende Funktion von Hefe Bol1 und Bol3 (Uzarska *et al.* 2016). Bol1 zeigte auf den „klassischen“ Fe/S-Proteinen (Aconitase, Succinatdehydrogenase, Pyruvatdehydrogenase, Ketoglutaratdehydrogenase uvm.) keinerlei Auffälligkeiten bezüglich der Aktivität. Für ein genaues biochemisches Verständnis der Funktion des *in vitro* stabilen holoGLRX5-BOLA1-Komplexes wäre es wichtig ein entsprechendes Zielprotein *in vivo* vorzufinden bzw. die genaue Rolle eines holoGLRX5-BOLA-Komplexes *in vivo* zu studieren. In dieser Arbeit konnten die BOLA-Proteine biochemisch charakterisiert werden, die genaue *in vivo* Funktion des stabilen holoGLRX5-BOLA1-Komplexes sowie die Koordination des Fe/S-Clusters ist allerdings weiterhin noch unklar und erfordert weitere *in vivo* Studien.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

A <sub>550nm</sub>	Absorption bei 550 nm
Amp	Ampicillin
Cam	Chloramphenicol
Da	Dalton
dH <sub>2</sub> O	einfach destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
Fe/S	Eisen-Schwefel
g	Gramm
GSH	reduziertes Glutathion
His <sub>6</sub>	Hexahistidinyl
HPLC	high performance/pressure liquid chromatography
ISC	iron sulfur cluster assembly
kb	Kilobasenpaar
LB	Luria-Bertan
M	molar (mol/L)
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat, reduziert
ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

## 7 Material und Methoden

### 7.1 Materialien

#### 7.1.1 Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte.

Gerät	Modell, Hersteller
Agarosegelelektrophorese	Gel iX Imager, <i>Intas</i>
Agarose-Gelkammern	<i>VWR</i>
Anaerobenkammer	<i>COY, Laboratory Products Inc.</i>
Autoklaven	<i>Systec V-150, Systec GmbH</i> <i>Tuttnauer 2540 EL, Tuttnauer Europe B.V.</i>
Blotapparatur	<i>Semidry-Blotter Sedec M, Peqlab Mini Trans-Blot®</i> <i>Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad</i>
CD-Spektrometer	<i>J-850, Jasco</i>
Chemilumineszenz-Messungen	<i>Chemostar Professional, Intas</i>
Chromatographiesäulen	<i>Äkta (Superdex 16/60 200)</i> <i>HPLC (Shodex HW 802.5)</i>
Fluoreszenzspektrophotometer	<i>FP-6300, Jasco</i>
FPLC-Systeme	
Äkta	<i>GE Healthcare</i>
HPLC	<i>Waters</i>
Inkubatoren	<i>Function line, Heraeus instruments</i> <i>Mini-Brutschrank, neoLab</i>
Netzgerät	<i>EPS600, Pharmacia Biotech</i>
pH-Meter	<i>Lab 850, Schott Instruments</i>
Plattenlesegerät	<i>Infinite R M200, Tecan</i>
Spektrophotometer	<i>Genesys 20, Thermo Scientific</i>
Pipettierhilfen	<i>Pipetman, Gilson</i>
Reinstwasseranlage	<i>Elix 5, Millipore</i>
Schüttelinkubatoren	<i>Multitron, HT INFORS</i>
SDS-PAGE System	<i>Minigel-Twin, Biometra</i>
Sterilbank	<i>Labgard Class II, IBS Integra Biosciences</i>
Sterilisator	<i>Modell 700, Memmert</i>
Szintillationszähler	<i>LS 6500 Scintillation Counter, Beckmann</i>
Thermocycler	<i>Advanced primus 25, Peqlab</i>
Thermomixer	<i>Thermomixer 5436, Eppendorf</i>
Ultrazentrifuge	<i>Beckman Coulter Ultracentrifuge XL-100K</i>
UV/VIS-Spektralphotometer	<i>U-550, Jasco</i>
Vortex	<i>Vortex-Genie 2, Scientific Industries</i>
Waagen	<i>PT 1500, Sartorius, SBC22, Scaltec, PCB, Kern</i>
Wippschüttler	<i>ST5, Ingenieurbüro CAT</i>
Zentrifugen	<i>Biofuge pico, Heraeus</i> <i>3K30, Sigma</i> <i>Megafuge 1.OR, Heraeus</i> <i>Avanti J20 XP, Beckmann</i>

## 7.1.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad *pro analysis* (p.a) oder der höchsten verfügbaren Qualität.

**Tabelle 6: Verwendete Chemikalien.**

Chemikalie	Hersteller
<sup>55</sup> Fe-Eisenchlorid, 10 mCi / ml, 30 mCi / mg, <sup>57</sup> Fe	Perkin Elmer
Aceton	Roth
Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese Gel 30)	Roth
Agar	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma Aldrich
Ascorbinsäure	Aldrich
Bacto Pepton, Bacto Trypton	Roth
Bradford-Reagenz	BioRad
Bromphenolblau	Roth
Calciumchlorid	Merck
Casein Pepton MP	Biomedical
Cycloheximid Sigma	Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Roth
DMSO	AppliChem
Doxycyclin	Sigma Aldrich
EDTA	Fluka
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
<u>Eisen-Quellen</u>	
Eisen(II)ammoniumcitrat	Roth
Eisen(II)chlorid	Aesar Alfar
Galactose	AppliChem
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium
Glucose Monohydrat	Roth
GSH	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Roth
Hepes	Roth
3-Isopropylmalat	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth
LE Agarose	Biozym
Lithiumsulfid	Sigma
Magnesiumchlorid	Fluka
Mercaptoethanol	Roth

Chemikalie	Hersteller
Methanol	Roth
NADPH, NADP+	Roth
Natrium-Citrat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxid	AppliChem
Natriumdithionit	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem
Polyethylenglycol (PEG) 4000	Roth
Salzsäure	Roth
Szintillationscocktail Ultima Gold	Perkin Elmer
TEMED	Sigma Aldrich
Trichloressigsäure (TCA)	Roth
Tris	Roth
Triton-X100	Sigma Aldrich
Trypton	AppliChem
Tween 20	Sigma Aldrich
Yeast Nitrogen Base	Formedium
Yeast Nitrogen Base (-Fe)	Formedium

### 7.1.3 Komplettsysteme

Tabelle 7: Komplettsysteme.

Komplettsysteme	Hersteller
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel

### 7.1.4 Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma *New England Biolabs (NEB)* bezogen. Die Verwendung der Enzymkonzentrationen und Pufferbedingungen entsprach den Herstellerangaben. Weitere verwendete Enzyme sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 8: Enzyme.

Enzym	Hersteller
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes
RNaseA	Roth
T4 DNA-Ligase	NEB

## 7.1.5 Antikörper

Tabelle 9: Antikörper.

Primärantikörper	Hersteller
αHA	NEB
αMyc	NEB

Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper wurden von der Firma *BioRad* verwendet.

## 7.1.6 Größenstandards

Für DNA-Agarosegele wurde der GeneRuler™ 1kb DNA Ladder von *Fermentas* verwendet.

Als Größenstandard bei den SDS-PAGE Gelen diente der PageRuler™ *Prestained Protein Ladder* der Firma *Fermentas*.

## 7.1.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden entsalzt und lyophilisiert von der Firma *Metabion* bezogen.

Tabelle 10: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer. Markiert sind die Schnittstellen (dunkelgrau) bzw. die jeweilige Mutationsstelle (hellgrau).

Gen	Oligonukleotid	Sequenz(5'→3')
<b>Hs GLRX5</b>	GLRX5_NcoI_fwd	ATGGTACCATGGCGGGCTCGGGCGCGGG
	GLRX5_Sall_rev	TGGTAGTCGACTCACTTGGAGTCTTGGTCTTTC
	GLRX5_EcoRI_fwd	ATGGTAGAATTCGGCGGGCTCGGGCGCGGG
	GLRX5_EcoRI_kurz_fwd	ATGGTAGAATTCATCGGCGGAGCAGTTGGACGCGC
	GLRX5_K59A_fwd	CCTCGCGGGGACGCCGAGCAGCCC
	GLRX5_K59A_rev	TCCCCGCGAGGAAGACCACCACCTT
	GLRX5_R97K_fwd	GCTCAAACAAGGCATTAAGACTAT
	GLRX5_R97K_rev	CTTGTTGAGCTCCGGTCTGCCAG
	GLRX5_R97Q_fwd	GCTCCAGCAAGGCATTAAGACTATTCCAA
	GLRX5_R97Q_rev	CTTGCTGGAGCTCCGGTCTGCCAGCACGT
	GLRX5_C122S_fwd	GGGCTCTGACATTCTTCTGCAGATGCACCA
	GLRX5_C122S_rev	TGTCAGAGCCCCCTACAACTCGCCATTGA
<b>Hs ISCA1</b>	ISCA1_BamHI_fwd	ATGGTAGGATCCGCAGCCCACCCGGGCAGCCC
	ISCA1_Sall_rev	GGTAGTCGACTCAAATATTAAGCTTTCTCCAC
<b>Hs ISCA2</b>	ISCA2_BamHI_fwd	ATGGTAGGATCCAGCGTCGTCCTCCAGCCCCGA
	ISCA2_Sall_rev	GGTAGTCGACTCAAAGTTTGATAGAGAAAGATG
	ISCA2_NdeI_fwd	ATGGTACATATGGCGTCGTCCTCCAGCCCCGAG
	ISCA2_XhoI_rev	GGTACTCGAGTCAAAGTTTGATAGAGAAAGATG
<b>Hs IBA57</b>	IBA57_EcoRI_fwd	ATGGTAGAATTCGGCCCCAAGGTGCCGCCTGG
	IBA57_EcoRI_kurz_fwd	ATGGTAGAATTCAGCCTGGGCCTGCTTCCGGCT
	IBA57_Sall_rev	ATGGTAGTCGACTACTTGGAGACTGTAGGCC
	IBA57_NcoI_fwd	ATGGTACCATGGCCCCAAGGTGCCGCCTGG

Gen	Oligonukleotid	Sequenz(5'→3')
<b><i>Ct Iba57</i></b>	<i>CtIba57_EcoRI_fwd</i>	ATGGTAGAATTCACCCAGTGGCATCTCCCATCT
	<i>CtIba57_NotI_rev</i>	ATGGTAGCGGCCGCTTACATCTCTTCTTCGCT
<b><i>Sc Iba57</i></b>	<i>Iba57_K355A_fwd</i>	AAACGCAGGATGTTATGTAGGACAAGAGCT
	<i>Iba57_K355A_rev</i>	ATCCTGCGTTTGTGCTTATAGTGTGGAA
	<i>Iba57_C357A_fwd</i>	AGGAGCTTATGTAGGACAAGAGCTGACAGC
	<i>Iba57_C357A_rev</i>	CATAAGCTCCTTTGTTTGTGCTTATAGTGT
	<i>Iba57_C357S_fwd</i>	AGGATCTTATGTAGGACAAGAGCTGACAGC
	<i>Iba57_C357S_rev</i>	CATAAGATCCTTTGTTTGTGCTTATAGTGT
	<i>Iba57_E362A_fwd</i>	ACAAGCGCTGACAGCCAGGACATATGCTAC
	<i>Iba57_E362A_rev</i>	TCAGCGCTTGTCTACATAACATCCTTTGT
	<i>Iba57_R366A_fwd</i>	AGCCGCGACATATGCTACAGGCATTCTACG
	<i>Iba57_R366A_rev</i>	ATGTCGCGGCTGTCAGCTCTTGTCTACAT
	<i>Iba57_R366C_fwd</i>	AGCCTGCACATATGCTACAGGCATTCTACG
	<i>Iba57_R366C_rev</i>	ATGTGCAGGCTGTCAGCTCTTGTCTACAT
	<i>Iba57_R372A_fwd</i>	TCTAGCGAAACGTTTGGTCCCAGTTAAGCT
	<i>Iba57_R372A_rev</i>	TCTAGCGAAACGTTTGGTCCCAGTTAAGCT
	<i>Iba57_R372A_fwd</i>	TCTAGCGAAACGTTTGGTCCCAGTTAAGCT
	<i>Iba57_R372_rev</i>	GTTTCGCTAGAATGCCTGTAGCATATGTCC
	<i>Iba57_R372C_fwd</i>	TCTATGCAAACGTTTGGTCCCAGTTAAGCT
	<i>Iba57_R372C_rev</i>	GTTTGCATAGAATGCCTGTAGCATATGTCC
<b><i>Hs BOLA1</i></b>	<i>BOLA1_BamHI-fwd</i>	ATGGTAGGATCCAGGTCCGGTGGAGGCCGCCATT
	<i>BOLA1_Sall_rev</i>	ATGGTAGTCGACTCAGGGGGTTCTAGAGTTTT
	<i>BOLA1_H58A_fwd</i>	TGGCGCCGCGGTCCCGCCTGGCAGTGAGACT
	<i>BOLA1_H58A_rev</i>	CCGCGGCCGCCACCGCTCTCGTTGCGAAGCTC
	<i>BOLA1_H67A_fwd</i>	GACTGCCTTCCGCGTGGCTGTGGTGAGTTCTCGTT
	<i>BOLA1_H67A_rev</i>	GGAAGGCAGTCTCACTGCCAGGCGGGACCGCGTGG
	<i>BOLA1_H86A_fwd</i>	ACGAGCCCAGGCTGGTCCACGCAGCGCTGGCCGAGG
	<i>BOLA1_H86A_rev</i>	GCCGGGCTCGTTGTAGGGGGCTCAGTCCCTCGAAA
	<i>BOLA1_H90A_fwd</i>	GGTCCGCGCAGCGCTGGCCGAGGAGCTGGG
	<i>BOLA1_H90A_rev</i>	CTGCGGCGACCAGCCGGTGTCTGTTGTAGGG
	<i>BOLA1_H102A_fwd</i>	GGTCCGCGCGCTGGCCATCCAGGCACGGAC
	<i>BOLA1_H102A_rev</i>	GCGCGGCGACCAGGACCTCCAGCTCCTCGG
	<i>BOLA1_H102A/H90A_fwd</i>	GGTCCGCGCAGCGCTGGCCGAGGAGCTGGGAGGTC
	<i>BOLA1_H102A/H90A_rev</i>	CTGCGGCGACCAGCCGGGCTCGTTGTAGGGGGCTC
	<i>BOLA1_kurzesEnde_fwd</i>	CTCTTACTGGACACTAGCCCCCATGCCTGGGTG
	<i>BOLA1_kurzesEnde_rev</i>	CCAGTCAAGAGTTCTCTCTCCACTGGGCGGGGGTC
	<i>BOLA1_BamHI_416_fwd</i>	ATGGTAGGATCCGGTCCGGTGGAGGCCGCCATTCCG
	<i>BOLA1_XhoI_416_rev</i>	ATGGTACTCGAGTCAGGGGGTTCTAGAGTTTTCTT
	<i>BOLA1_EcoRI_416_rev</i>	ATGGTAGAATTCAGGGGGTTCTAGAGTTTTCTT
	<i>BOLA1_BamHI_426_fwd</i>	ATGGTAGGATCCGGTCCGGTGGAGGCCGCCATTCCG
<i>BOLA1_EcoRI_426_rev</i>	ATGGTAGAATTCGGGGTTCTAGAGTTTTCTT	
<b><i>Sc Yal044w</i></b>	<i>Yal044w_H39A_fwd</i>	TTCTGCCAAGCATAAGGGCCATGCTGGTGTACA
	<i>Yal044w_H39A_rev</i>	GCTTGGCAGAATCGTTGTAGAGGCCAAACGCAA
	<i>Yal044w_H41A_fwd</i>	CAAGGCCAAGGGCCATGCTGGTGTACAGGGAAA

Gen	Oligonukleotid	Sequenz(5'→3')
<b>Sc Yal044w</b>	Yal044w_H41A_rev	CCTTGGCCTTGTGAGAATCGTTGTAGAGGCCAA
	Yal044w_H44A_fwd	TTCTGCCAAGCATAAGGGCCATGCTGGTGTACA
	Yal044w_H44A_rev	CAGCGGCGCCCTTATGCTTGTGAGAATCGTTGT
	Yal044w_H41A/H44A_fwd	CAAGGCCAAGGGCGCCGCTGGTGTACAGGGAAA
	Yal044w_H41A/H44A_rev	CAGCGGCGCCCTTGGCCTTGTGAGAATCGT
	Yal044w_H39A/H41AH/	TTCTGCCAAGGCCAAGGGCGCCGCTGGTGTACA
	Yal044w_H39A/H41A/	CAGCGGCGCCCTTGGCCTTGGCAGAATCGT
<b>Sc Fra2</b>	Fra2_H103A_fwd	GATTGCTGCCTTTAGCTGCAAGTGCTACACTG
	Fra2_H103A_rev	AGGCAGCAATCTCCTGCAGCTCTTCTTTCACA
	Fra2_C66A_fwd	CGGTGCTGGTCAGTCGTTTGATATTGTGGTGG
	Fra2_C66A_rev	GACCAGCACCGTACGAAAGATCCGTCACAATGA
<b>Hs BOLA3</b>	BOLA3_BamHI_fwd	ATGGTAGGATCCAATGTTTGCCACTCAGACTGA
	BOLA3_Sall_rev	ATGGTAGTCGACTCAGCGTTTGGGGACAGAGGT
<b>Hs mACO2</b>	mACO2_SacI	ATGGTAGAGCTCACAAACGGGCCAAGGTGGCAC
<b>Hs mACO2</b>	mACO2_HindIII	ATGGTAAAGCTTTCAGTGTGCAGTTCCTTC

## 7.2 Plasmide

### 7.2.1 Ausgangsplasmide für die Expression in *E. coli*

Die Korrektheit aller Sequenzen der Plasmide wurde durch Sequenzierung von der Firma *Seqlab* in Göttingen überprüft.

#### 7.2.1.1 pET-Duet-1

Der pET-Duet™-1 Vektor wurde für die heterologe Koexpression von zwei rekombinanten Proteinen entwickelt. Der Vektor enthält zwei multiple Klonierungsstellen (*multiple cloning sites*, MCS). Vor jeder MCS befindet sich ein T7 Promotor/lac Operator und eine ribosomale Bindungsseite (rbs). Des Weiteren besitzt der Vektor das pBR322-abgeleitete ColE1-Replicon, lacI Gen und ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Am Anfang der MCS1 befindet sich die kodierende Sequenz für einen Hexahistidyl-Tag (His<sub>6</sub>-tag) (Studier *et al.*, 1990).

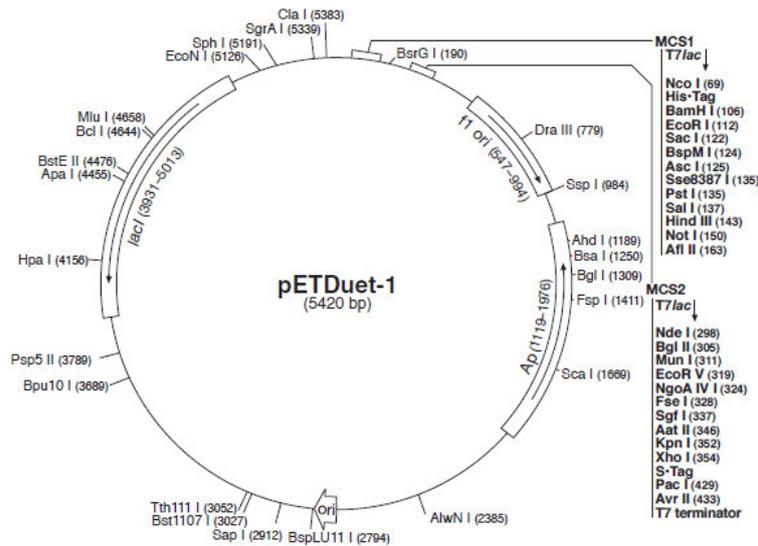


Abbildung 55: pET-Duet-1 Vektor. Abbildung von Novagen.

### 7.2.1.2 pRSF-Duet-1

Der pRSF-Duet™-1 Vektor wurde für die Koexpression von zwei ORFs entwickelt. Der Vektor enthält zwei multiple Klonierstellen (*multiple cloning sites*, MCS). Vor jeder MCS befindet sich ein T7 Promotor/lac Operator und eine ribosomale Bindungsseite (rbs). Des Weiteren besitzt der Vektor das RSF1030-abgeleitete RSF- Replicon, lacI Gen und ein Kanamycin-Resistenz-Gen. Am Anfang der MCS1 befindet sich die kodierende Sequenz für einen Hexahistidyl-Tag (His<sub>6</sub>-tag).

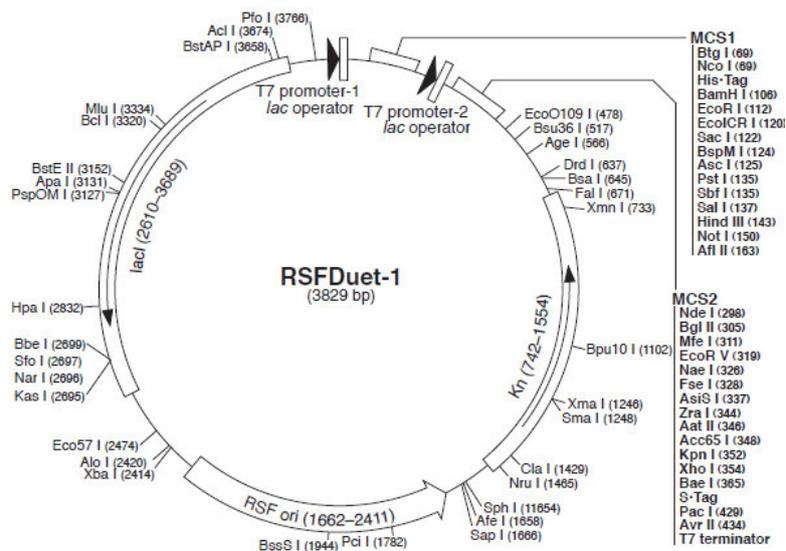


Abbildung 56: pRSF Vektor. Abbildung von Novagen.

7.2.2 Plasmide zur Expression in *E. coli*Tabelle 11: Verwendete Konstrukte zur Expression in *E. coli*.

Plasmid	Gen	MCS	Tag	Referenz
pET-Duet-1	<i>GLRX5</i>	1	-	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>GLRX5</i>	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>GLRX5</i> K59A	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>GLRX5</i> R97K	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>GLRX5</i> R97A	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>GLRX5</i> R97Q	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>GLRX5</i> C122S	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>ISCA1</i>	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>ISCA2</i>	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	ISCA1/ISCA2	1/2	N-His <sub>6</sub> /-	diese Arbeit
pET-Duet-1	ISCA2/ISCA1	1/2	N-His <sub>6</sub> /-	diese Arbeit
pCOLA-Duet-1	<i>IBA57</i>	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pCOLA-Duet-1	<i>IBA57</i>	1	-	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>IBA57</i>	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pRSF-Duet-1	<i>Ctlba57</i>	1	-	diese Arbeit
pRSF-Duet-1	<i>Ctlba57</i>	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>Ctlsa1</i>	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>Ctlsa2</i>	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>Ctlsa1/Ctlsa2</i>	1/2	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>BOLA1</i>	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>BOLA1</i>	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>BOLA1</i> H58A	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>BOLA1</i> H67A	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>BOLA1</i> H86A	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>BOLA1</i> H90A	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>BOLA1</i> H102A	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>BOLA1</i> H102A/H58A	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>BOLA1</i> H102A/H67A	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>BOLA1</i> H102A/H86A	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>BOLA1</i> H102A/H90A	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>BOLA1</i> H102A/H86A/H58A	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>BOLA1</i> H102A/H86A/H67A	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	<i>BOLA1</i> H102A/H67A/H58A	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	BOLA3	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-Duet-1	mACO2	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pET-15b	Leu1	1	N-His <sub>6</sub>	diese Arbeit

### 7.2.3 Ausgangsplasmide für die Expression in *S. cerevisiae*

Tabelle 12: Verwendete Ausgangsplasmide zur Expression in *S. cerevisiae*.

Plasmid	Eigenschaften	Gen	Promotor	Tag	Marker	Referenz
p416-MET25	ARS/CEN, Amp <sup>R</sup>	-	MET25	C-Myc	URA3	Mumberg <i>et al.</i> , 1995
p426-TDH3	2 $\mu$ , Amp <sup>R</sup>	-	TDH3	-	URA3	Mumberg <i>et al.</i> , 1995

### 7.2.4 Plasmide zur Expression in *S. cerevisiae*

Tabelle 13: Verwendete Konstrukte zur Expression in *S. cerevisiae*.

Plasmid	Gen	Tag	Promotor	Marker	Referenz
p416-lba57-Myc	<i>lba57</i>	Myc, C-terminal	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-lba57 K355A-Myc	<i>lba57</i>	Myc, C-terminal	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-lba57 C357A-Myc	<i>lba57</i>	Myc, C-terminal	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-lba57 C357S-Myc	<i>lba57</i>	Myc, C-terminal	MET25	URA3	diese Arbeit
p426-lba57 C357S-Myc	<i>lba57</i>	Myc, C-terminal	TDH3	URA3	diese Arbeit
p416-lba57 E362A-Myc	<i>lba57</i>	Myc, C-terminal	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-lba57 R366A-Myc	<i>lba57</i>	Myc, C-terminal	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-lba57 R366C-Myc	<i>lba57</i>	Myc, C-terminal	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-lba57 R372A-Myc	<i>lba57</i>	Myc, C-terminal	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-lba57 R372C-Myc	<i>lba57</i>	Myc, C-terminal	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-BOLA1	<i>BOLA1</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-BOLA1 H58A	<i>BOLA1</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-BOLA1 H67A	<i>BOLA1</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-BOLA1 H102A	<i>BOLA1</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-BOLA1 H67A/H58A	<i>BOLA1</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-BOLA1 H102A/H67A/H58A	<i>BOLA1</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-BOLA3	<i>BOLA3</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-Yal044w H39A	<i>Yal044w</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-Yal044w H41A	<i>Yal044w</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-Yal044w H44A	<i>Yal044w</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-Yal044w H56A	<i>Yal044w</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-Yal044w H75A	<i>Yal044w</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-Yal044w H93A	<i>Yal044w</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-Yal044w H39A/H56A	<i>Yal044w</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-Yal044w H41A/H56A	<i>Yal044w</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-Yal044w H44A/H56A	<i>Yal044w</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-Yal044w H41A/H44A	<i>Yal044w</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-Yal044w H75A/H93A	<i>Yal044w</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit
p416-Yal044w H39A/H41A/H44A	<i>Yal044w</i>	-	MET25	URA3	diese Arbeit

## 7.3 *E. coli*-Stämme

### 7.3.1 *E. coli* DH5 $\alpha$

Die Deletion der Endonuklease A verhindert, dass die Plasmid-DNA abgebaut wird. Der *E. coli*-Stamm zeichnet sich daher durch hohe Plasmidstabilität aus. Ein weiterer Vorteil der DH5 $\alpha$ -Zellen liegt darin, dass sie gut transformierbar sind. Aus diesem Grund wurden alle Klonierungen in dieser Arbeit mit diesem Stamm durchgeführt.

**Genotyp:** *F- $\phi$ 80lacZ $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17( r $\kappa$ <sup>-</sup> , m $\kappa$ <sup>+</sup> ) phoA supE44 thi-1gyrA96 relA1  $\lambda$ <sup>-</sup>*

### 7.3.2 *E. coli* BL21(DE3)

Durch die Deletion der OmpT-Protease ist dieser Stamm hervorragend für die Expression von Genen geeignet. Das Genom enthält ein Teil des Bakteriophagen  $\lambda$  (DE3), welches für die T7-RNA-Polymerase kodiert. Daher kann der Stamm für eine IPTG-induzierte Genexpression eines Plasmides mit T7-Promotor verwendet werden (Studier *et al.*, 1990).

**Genotyp:** *F- ompT, hsdSB (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>), dcm<sup>+</sup> Tetr<sup>r</sup> gall(DE3) endA Hte*

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

Dieser Stamm ist vom BL21-Stamm abgeleitet, enthält aber zusätzlich eine Mutation, die vor Zelltod durch rekombinante Expression toxischer Proteine, schützt. Zusätzlich ist dieser Stamm auch für die Expression von Membranproteinen geeignet (Miroux und Walker, 1996).

**Genotyp:** *F- ompT gal dcm hsdSB(r $\beta$ <sup>-</sup> m $\beta$ <sup>-</sup>)*

## 7.4 *S. cerevisiae*-Stamm

Hefestamm	Genotyp	Referenz
W303-1a	<i>MATa ura3-1 ade2-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 can1-100</i>	Euroscarf

## 7.5 Medien

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden gemäß den Verordnungen des Gentechnikgesetzes durchgeführt und unterlagen der Sicherheitsstufe S1. Die gentechnisch veränderten Organismen wurden für 20 Minuten bei einem Überdruck von einem Bar und 121°C durch Autoklavieren inaktiviert.

### 7.5.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* Zellen in Flüssigmedium erfolgte in LB-Medium (Bertani, 1951). Das Medium wurde in dH<sub>2</sub>O gelöst und für 20 min bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert. Zur Selektion wurde das Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/mL, Chloramphenicol 34 µg/mL, Kanamycin 50 µg/mL) versetzt. Die Kulturen wurden bei 37°C inkubiert. Zur Herstellung von festen Nährböden wurde das Medium zusätzlich mit 20 g/L Agar versetzt und Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf 60°C hinzugegeben.

Tabelle 14: Zusammensetzung des LB-Mediums.

<b>LB-Medium</b>	
Natriumchlorid	10 g/L
Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L

### 7.5.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von Hefezellen in Flüssigmedium erfolgte in Vollmedium (YP) oder synthetischen Kompletmedium (SC). Das Medium wurde in dH<sub>2</sub>O gelöst und für 20 min bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert. Die Kulturen wurden bei 30°C inkubiert. Zum Medium hinzugefügt wurden sowohl eine Kohlenstoffquelle (Galaktose oder Glukose) und abhängig von der Auxotrophie verschiedener Aminosäuren oder Antibiotika zur Selektion. Zur Herstellung eines festen Nährbodens wurde das Medium mit 20 g/L Agar versetzt.

Tabelle 15: Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae*.

<b>YP-Medium</b>	
Hefeextrakt	10 g/L
Glukose/Galaktose	2%
Casein Pepton	20 g/L
Aminosäuren + Supplemente	

<b>SC-Medium (+/- Fe)</b>	
Ammoniumsulfat	5 g/L
Glukose/ Galaktose	2%
Yeast Nitrogen Base (+/- Fe)	1,9 g/L
Aminosäuren + Supplemente	

## 7.6 Molekularbiologische Methoden

### 7.6.1 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mithilfe des *NucleoSpin*<sup>®</sup> Plasmid Kit der Firma *Macherey-Nagel* durchgeführt. Das Prinzip der Isolierung basiert auf der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

### 7.6.2 Agarose Gelelektrophorese

Zur größenspezifischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1%-ige (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden mit einem Agarosegelauftragspuffer und mit GelRed<sup>™</sup> versetzt. Zusätzlich zu den Proben wurde noch der Größenstandard *GeneRuler*<sup>™</sup> 1 kb Plus DNA Ladder von der Firma *Fermentas* zur Abschätzung der jeweiligen Fragmentgröße als auch der Konzentration auf das Agarosegel aufgetragen. Die Visualisierung der DNA erfolgte mit Hilfe des GDS-Systems von *Intas* oder eines UV-Schirms.

Tabelle 16: Pufferzusammensetzung für die Agarose Gelelektrophorese.

Laufpuffer	
Tris-HCl pH 8,0	40 mM
EDTA	1 mM
Essigsäure	0,01% (v/v)

Ladepuffer	
Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	10 mM
Glycerin	65% (w/v)
Bromphenolblau	0,3% (w/v)

### 7.6.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Für die in vitro Amplifizierung von DNA wurde die von Kary Mullis Mitte der 1980er Jahre entwickelte Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) angewendet (Mullis *et al.*, 1986). Die PCR wurde in dieser Arbeit für präparative Zwecke (Herstellung der DNA Fragmente für Klonierungen und Mutagenesen) genutzt. Dem Reaktionsansatz wurden zusätzlich zum Templat vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), HF-/ oder GC-Puffer, ein Oligonukleotidpaar (Primer), das mit den flankierenden Sequenzen hybridisiert, und die thermostabile Phusion DNA-Polymerase (*Finnzymes*)

hinzugegeben. Die PCR besteht aus drei wesentlichen Schritten: Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation, die zyklisch wiederholt werden.

**Tabelle 17: Ansatzgröße PCR.**

<b>Ansatzgröße</b>	
1 µL	1:10 verdünntes Plasmid oder 1:20 verdünnte genomische DNA
10 µL	10x HF- oder 10x GC-Puffer
1 µL	dNTPs (10 mM Stocklösung)
1 µL	5´-Primer (10 pmol/µL Stocklösung)
1 µL	3´-Primer (10 pmol/µL Stocklösung)
1-3 µL	DMSO
0,5 µL	Phusion Polymerase ( <i>Finnzymes</i> )
ad 50 µL	bdH <sub>2</sub> O

Nachfolgendes Standardprogramm wurde für die Amplifizierung von DNA verwendet.

**Tabelle 18: Verwendetes PCR-Standardprogramm.**

<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
98°C	2 min
98°C	30 s
X°C	30 s
72°C	30s/1kb
72°C	10 min

Lagerung bei 4°C.

Die Temperatur X der Primerhybridisierung wurde so gewählt, dass sie 3°C – 5°C unter der von *Metabion* angegebenen Schmelztemperatur des Primerpaares lag.

#### **7.6.4 Reinigung von DNA aus PCR-Reaktionen und Agarosegelen**

Für die Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen oder Agarosegelen wurde das Kit NucleoSpin® PCR clean-up Gel extraction der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Es wurde nach den Herstellerangaben gearbeitet und die Fragmente mit 15 µL-25 µL 70°C vorgewärmten Elutionspuffer eluiert.

## 7.7 Modifikation von DNA

### 7.7.1 Restriktionsverdau von DNA

Ein Restriktionsenzym ist eine Nuklease, die die Hydrolyse des Zuckers des Phosphat-Rückgrats der DNA katalysiert. Für die sequenzspezifische hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindung wurden kommerzielle Restriktionsendonukleasen des Typs II der Firma *New England Biolabs* verwendet. Die Verwendung der Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Herstellerangaben. Präparative Spaltungen wurden in 100 µL, analytische Spaltungen in einem Reaktionsvolumen von 10 µL durchgeführt. Pro 1 µg DNA wurden 1-3 U Enzym eingesetzt.

### 7.7.2 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 für 1 h bei RT inkubiert. Die eingesetzte Menge [ng] des für die Ligation benötigten Inserts berechnete sich folgt:

$$\text{Insert} = \frac{30 \times (\text{Größe des Inserts in kb})}{(\text{Größe des Vektors in kb})} \text{ [in ng]}$$

## 7.8 Zellbiologische Methoden

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

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgt nach der Calciumchloridmethode (Dagert und Ehrlich, 1979). Dabei wurden 100 mL LB-Medium mit 1 mL Übernachtskultur inokuliert (OD<sub>600</sub> von 0,1) und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert (37°C, 150 rpm). Die Kultur wurde dann 5 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 25 mL eiskalter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut 5 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 mL eiskalter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 15% (w/v) Glycerin resuspendiert. Je 100 µL der kompetenten Zellen wurden in vorgekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

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

Zu 100  $\mu\text{L}$  chemisch kompetenter Zellen wurden 25-100 ng Plasmid-DNA oder der gesamte Ligationsansatz (20  $\mu\text{L}$ ) gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach dem 90-sekündigen Hitzeschock erfolgte eine 2 minütige Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden mit 1 mL LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C (700 rpm) inkubiert. Der Inkubation folgte ein 3 minütiger Zentrifugationsschritt bei 11000 rpm. Nach Zentrifugation wurden 900  $\mu\text{L}$  des Überstandes verworfen. Im verbleibenden Medium wurden die Zellen resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit entsprechenden Selektionsmarker ausgestrichen und bei 37°C ü.N. inkubiert.

## 7.8.3 Transformation chemisch kompetenter *S. cerevisiae* Zellen

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode (Gietz und Woods, 2002; Ito *et al.*, 1983). Dabei wurden Übernachtskulturen (YP-Medium) der Hefezellen in 50 mL frischem YP-Medium auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,2 verdünnt und die Kultur bei 30°C und 150 rpm inkubiert, bis eine  $\text{OD}_{600}$  von 1 erreicht wurde. Die Zellen wurden geerntet (3 min, 3500 rpm), mit 10 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  und anschließend mit 1 mL Lithiumacetat-Lösung gewaschen. Das Pellet wurde in 1 mL Lithiumacetat-Lösung resuspendiert und 100  $\mu\text{L}$  Zellsuspension mit 2,5  $\mu\text{L}$  Träger-DNA (Lachssperma-DNA, 5 min bei 95°C denaturiert) und 1-5  $\mu\text{g}$  der zu transformierenden DNA gemischt. Der Ansatz wurde 30 min bei 30°C und 600 rpm geschüttelt. Anschließend wurde er mit 700  $\mu\text{L}$  PEG-Lösung versetzt, gemischt und 30 min bei 42°C geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  gewaschen und wieder pelletiert. Das Pellet wurde in 100  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$  resuspendiert und die transformierten Zellen auf SC-Platten mit entsprechenden Markern ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für 3-4 Tage bei 30°C. Einzelkolonien wurden auf neue Selektivplatten überstrichen.

**Tabelle 19: Pufferzusammensetzung für die Transformation von chemisch kompetenten *S. cerevisiae*-Zellen.**

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

## 7.9 Proteinbiochemische Methoden

### 7.9.1 Messung der Absorption bei 280 nm

Eine Messung der Absorption bei 280 nm (Kirschenbaum, 1975, 1977) dient der schnellen Abschätzung der Proteinkonzentration. Als Faustregel ist die Proteinkonzentration in mg/mL gleich der Absorption bei 280 nm. In Abwesenheit von Chromophoren wird das UV-Spektrum von Proteinen durch die aromatischen Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan) bestimmt. Der

Extinktionskoeffizient ist abhängig von der Aminosäurezusammensetzung und kann aus dieser kalkuliert werden (Gill und von Hippel, 1989; Mach *et al.*, 1992).

Eine wichtige Anwendung der Messung der Absorption ist die Messung des BSA-Standards für Proteinbestimmungen. Hierfür wird die Absorption bei 279 nm gemessen. Eine Absorption von 0,667 bei einer verwendeten Küvettenlänge von 1 cm entspricht einer BSA-Konzentration von 1 mg/mL. Der BSA-Standard ist Voraussetzung für die anschließende Proteinbestimmung. Allerdings können Metallzentren oder prosthetische Gruppen zusätzlich das UV-Spektrum beeinflussen.

### 7.9.2 Proteinbestimmungen nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Die von *BioRad* verwendete Bradfordlösung wurde zunächst 1:5 verdünnt. Dabei wurden zu 100 µL Probenlösung 900 µL der Bradfordlösung gegeben und nach 15 minütiger Inkubation bei RT die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Eichkurve mit Hilfe eines Proteinstandards (2 mg/mL) erstellt.

### 7.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteingemischen wurde das diskontinuierliche Laemmli-System (Laemmli, 1970) verwendet. Sammelgele wurden mit 5%, Trenngele abhängig von der Proteingröße mit 12,5%-15% Acrylamid gegossen. Zur Polymerisierung des Trenngels (12,5%-15% [w/v] Acrylamid; 0,11% [w/v] Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% [w/v] SDS) und des Sammelgels (5 % [w/v] Acrylamid; 0,033% [w/v] Bisacrylamid; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% [w/v] SDS) wurden 0,05 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 0,05% [v/v] TEMED (Endkonzentrationen) hinzugegeben. Die zu analysierenden Proben wurden in Laemmli-Puffer aufgenommen, 5 min geschüttelt, 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend kurz zentrifugiert (30 sec, 5000 rpm), um sie im Anschluss auf das Gel aufzutragen. Die Elektrophorese erfolgte 3 – 4 h bei 30 mA (große Gele) oder 1,5 h bei 20 mA (Minigele) in SDS-Laufpuffer (0,1% [w/v] SDS; 200 mM Glycerin; 50 mM Tris).

Tabelle 20: Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Sammelgel	Trenngel	Laemmli-Laufpuffer
125 mM Tris-HCl pH 6,8	375 mM Tris-HCl pH 8,8	25 mM Tris
0,1% (w/v) SDS	0,1% (w/v) SDS	0,1% (w/v) SDS
5% Acrylamid	12,5% (w/v) Acrylamid	
(Acrylamid:Bisacrylamid 37; 5:1)	(Acrylamid:Bisacrylamid 37; 5:1)	192 mM Glycerin

### 7.9.4 Färben von Proteinen mit *Coomassie Brilliant-Blue*

Die SDS-PAGE Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese mit Hilfe von *Coomassie* angefärbt (Bennett und Scott, 1971). Diese Methode kann sowohl zur Größenbestimmung der Proteine als auch zur Überprüfung der Reinheit nach Proteinaufreinigung herangezogen werden.

### 7.9.5 MicroScale Thermophorese (MST)

Die von der Firma *NanoTemper Technologies* entwickelte Methode der MicroScale Thermophorese (MST) basiert auf dem Ludwig-Soret-Effekt, ein Phänomen bei dem Teilchen entlang eines Temperaturgradienten diffundieren (Thermophorese), wobei die Thermophorese abhängig von der Größe, Ladung und Solvatationsentropie der Moleküle ist. Alle MicroScale Thermophorese-Messungen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt (Wienken *et al.*, 2010). Das Zielprotein wurde mit Fluoreszenzmarker NT-647 (*Nano Temper Technologies*) markiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. MST-Messungen wurden mit einer konstanten Endkonzentration von 200 nM des fluoreszenzmarkierten Proteins durchgeführt. Das zu überprüfende Protein wurde in einer 16-fachen Titrationsreihe 16 mal 1:2 verdünnt. Die Starkkonzentration lag bei 200 µM, die Endkonzentration bei 6,1 nM. Das Probenvolumen war 30 µL in MST-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05 mg/mL BSA, 0,05% Tween20, 5% Glycerin). Anschließend wurde das fluoreszenzmarkierte Protein mit einer konstanten Endkonzentration von 200 nM hinzugegeben, und die Probe gemischt. Mit einer Kapillare wurde die Probe aufgenommen und in einem initialen Scan der Kapillaren wurde überprüft, dass die in den Kapillaren vorhandene Menge an fluoreszenzmarkierten Protein nicht um mehr als 10% abweicht. Alle Messreihen beinhalteten mindestens drei unabhängige Messreihen, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Für anaerobe MST-Messungen wurde die Fluoreszenzmarkierung, Titration und das Überführen in die Kapillaren in einer Anaerobenkammer der Firma *Coy Lab Products* vorgenommen. Die anaerob vorbereiteten Kapillaren wurden beidseitig mit *SealingWax* von *NanoTemper Technologies* versiegelt.

### 7.9.6 Western Blot

Zum Transfer von gelelektrophoretisch getrennten Proteinen wurde das *semi dry blot*-Verfahren auf Nitrocellulose-Membranen verwendet. Hierzu wurde die Membran zusammen mit dem Chromatographiepapier in Transferpuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 20 % (v/v) Ethanol, 0,02% (w/v) SDS) äquilibriert. Die Blotkammer wurde von unten (Pluspol) nach oben (Minuspol) wie folgt beschichtet: 2 Lagen Chromatographiepapier, Nitrocellulose-Membran, Gel und 2 Lagen Chromatographiepapier. Der Transfer wurde bei 250 mA (entspricht ca. 2 mA/cm<sup>2</sup>) und für 1 h durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau S

Lösung (0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) TCA) für 2 min gefärbt und überschüssiges Ponceau S durch Waschen der Membran in H<sub>2</sub>O entfernt.

### 7.9.7 Immundetektion von Proteinen

Die transferierte Nitrocellulose-Membran wurde zur Blockierung von unspezifischen Bindestellen für 1 h mit 5 % Milchpulver in TBST-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20) geschwenkt. Nach einmaligem kurzem Waschen in TBST-Puffer wurde die Membran für 1,5 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Primäantikörperlösung inkubiert. Nach der ersten Inkubation wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST-Puffer gewaschen und im Anschluss mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundäantikörper, verdünnt 1:10000 in TBST-Puffer mit 5% (w/v) Milchpulver, für eine weitere Stunde inkubiert. Nachdem die Membran erneut dreimal gewaschen wurde, wurde das an die Membran gebundene HRP-Konjugat mittels Chemilumineszenz (ECL) und dem Chemostar professional System (*Intas*) visualisiert. Verwendet wurden die in Tabelle 21 aufgeführten Antikörper.

Tabelle 21: Verwendete Antikörper.

Primäantikörper	Hersteller
$\alpha$ -HA	NEB
$\alpha$ -Myc	NEB
BOLA3	AG Lill

### 7.10 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen

Die Überexpression der rekombinanten Proteine erfolgte in Zellen des *E. coli* Stammes BI21(DE3) oder C41(DE3). Als Medium wurde LB-Vollmedium (Bertani, 1951, Kapitel 7.5.1) verwendet. Nach Transformation wurde eine Vorkultur in LB-Medium mit ca. 2 mL pro 2 L Hauptkultur angesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Vorkultur wurde schließlich abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm) und das Zellpellet in Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl) gewaschen und nochmals pelletiert. Das Pellet wurde im Anschluss in entsprechendem Medium aufgenommen und in 2 L Hauptkultur in einem 5 L Erlenmayerkolben überführt. Die Hauptkultur wurde bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,6 und 0,8 inkubiert und anschließend mittels Zugabe von IPTG induziert. Die Zellkultur wurde schließlich 16 h bei 28°C-30°C inkubiert und anschließend geerntet (Studier *et al.*, 1990).

Tabelle 22: Konstrukte und *E. coli* Expressionsbedingungen der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine.

Protein	<i>E. coli</i> -Stamm	Expressionsbedingungen
GLRX5	BL21(DE3)	50 $\mu$ M FAC, 30°C ü.N.
IBA57	BL21(DE3)	30°C ü.N.
ISCA1	BL21(DE3)	50 $\mu$ M FAC, 30°C ü.N.
ISCA2	BL21(DE3)	50 $\mu$ M FAC, 30°C ü.N.
BOLA1	BL21(DE3)	30°C ü.N.
BOLA1-Mutanten	BL21(DE3)	30°C ü.N.
BOLA3	BL21(DE3)	30°C ü.N.
ACO2	C41(DE3) GroEL	50 $\mu$ M FAC, 27°C ü.N.
CtGrx5	C41(DE3)	50 $\mu$ M FAC, 30°C ü.N.
CtIsa1	C41(DE3)	50 $\mu$ M FAC, 30°C ü.N.
CtIsa2	C41(DE3)	50 $\mu$ M FAC, 30°C ü.N.
CtIsa1/CtIsa2	C41(DE3)	50 $\mu$ M FAC, 30°C ü.N.
Leu1	C41(DE3) GroEL	50 $\mu$ M FAC, 27°C ü.N.
Grx1	C41	28°C ü.N.

### 7.10.1 Zellaufschluss von *E. coli*

Für den Aufschluss der Zellen wurde das eingefrorene Pellet zunächst in Lysepuffer (50 mM  $\text{KPi}$  pH 8,0, 150 mM NaCl, 5% Glycerin, 10 mM Imidazol) resuspendiert. Das Volumen des Lysepuffers in mL für das Resuspendieren der Pellets betrug das Vierfache des Pelletgewichts. Für eine anaerobe Aufreinigung der Proteine wurden die Zellen in der Anaerobkammer aufgeschlossen. Das aufgetaute Pellet wurde mit 1 mg/mL Lysozym aus Hühnereiweiß versetzt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Dies führte zu einer beginnenden Lyse der Zellen. Mit Hilfe eines Protease Inhibitors (Complete Protease Inhibitor, *Roche*) sollten die Proteine vor einem vorzeitigen Abbau geschützt werden. Anschließend erfolgte der Aufschluss mittels Ultraschall für 20 min (90% Ultraschallstärke, 2 sec Ultraschall, 1 sec Pause). Durch anschließende Zentrifugation (20000 rpm, 1 h) erfolgte die Entfernung unlöslicher Membran- und Zellwandbestandteile, wodurch das zellfreie Rohextrakt, ein klarer Überstand im Lysepuffer, erhalten wurde.

### 7.10.2 Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA

Der Überstand nach Zentrifugation des Zellaufschlusses im Lysepuffer (50 mM  $\text{KPi}$  pH 8,0, 150 mM NaCl, 5% Glycerin, 10 mM Imidazol) wurde bei einer Flussrate von 1 mL/min über eine Säule mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Sephacrose (*GE Healthcare*) gegeben. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit geringen Imidazolkonzentrationen (Waschpuffer: 50 mM  $\text{KPi}$  pH

8,0, 150 mM NaCl, 5%Glycerin, 20-30 mM Imidazol) entfernt. Die Elution des an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix gebundenen Proteins erfolgte durch kompetitives Verdrängen mit Elutionspuffer (50 mM KP<sub>i</sub> pH 8,0, 150 mM NaCl, 5% Glycerin, 250-350 mM Imidazol).

### 7.10.3 Gelfiltrationschromatographie

Bei der Gelfiltrationschromatographie, auch Größenausschlusschromatographie genannt, werden Proteine nach ihrer Größe getrennt (Porath und Flodin, 1959). Basierend auf einer Gelmatrix mit Poren definierter Größe, diffundieren Proteine in erster Näherung proportional zum Logarithmus der molekularen Masse. Die Gelfiltration wurde sowohl präparativ zur Proteinreinigung (Äkta-System) als auch analytisch (HPLC) -nach Kalibration der Säule mit Standardproteinen- zur Bestimmung des Molekulargewichts eingesetzt. Die vorgefertigten Säulen wurden jeweils unter Beachtung der vom Hersteller (*GE Healthcare*) angegebenen Spezifikationen verwendet. Im Einzelnen waren dies folgende Säulen: High Load Superdex 16/60 200, Flussrate 1 mL/min zur präparativen Proteinaufreinigung (Puffer: 50 mM Tris.HCl pH 8,0, 150 mM NaCl; 5% Glycerin) sowie für die HPLC: Shodex HW 802.5, Flussrate 0,5 mL/min (Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl, 5% Glycerin) für qualitative Analysen.

### 7.10.4 Umpuffern von Proteinen

Entsalzungssäulen, bestehend aus Gelfiltrationsmaterial erlauben die Trennung hochmolekularer Spezies (>5000 Da) wie Proteinen von niedermolekularen Substanzen (<1000 Da). Des Weiteren können mit ihnen Proteine in Puffer (standardmäßig: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl, 5% Glycerin) gewünschter Zusammensetzung überführt werden. Es wurden PD-10 Entsalzungssäulen (*GE Healthcare*) mit Probenvolumen von 2,5 mL bzw. 200 µL nach Herstellerangaben verwendet.

### 7.10.5 Konzentrierung von Proteinen

Die Aufkonzentrierung von Proteinlösungen erfolgte durch Ultrafiltration in Amicon Ultra-Zentrifugalgefäßen (*Millipore*) mit einem Fassungsvermögen von 15 ml und einem Ausschlussvolumen von 3, 10, 50 oder 100 kDa. Konzentriert wurde bei maximal 4000 rpm in einer Kühlzentrifuge bei 4°C. Die Zentrifugation wurde nach kurzen Zeitintervallen (~5 -10 min) unterbrochen und die Lösung durch Schwenken durchmischt, um einer Ausfällung des Proteins an der Membran vorzubeugen.

### 7.10.6 UV/Vis-Spektroskopie

Bei dieser Spektroskopiemethode werden Wellenlängen im Bereich des ultravioletten (UV) und des sichtbaren Lichtes (*visible*, VIS) verwendet. Fe/S-Cluster zeigen charakteristische

Absorptionsmuster im UV/VIS-Spektrum (siehe Tabelle 23).

**Tabelle 23: Absorptionsmaxima von Fe/S-Clustern.**

<b>Fe/S-Cluster</b>	<b>Charakteristika</b>
[2Fe-2S]	rötlich 320 nm, 420 nm, 550 nm, 650 nm (Peaks)
[4Fe-4S]	braun/beige 400 nm (Schulter)
Mischung aus [2Fe-2S] und [4Fe-4S]	braun/rot 320 nm, 400 nm, 420 nm, 550 nm, 650 nm (weniger ausgeprägte Peaks als [2Fe-2S])

Das UV/VIS-Spektrum eines Fe/S-Proteins liefert einfach und schnell erste Informationen über die im Protein enthaltenen Fe/S-Cluster, sodass die Aufnahme eines UV/VIS-Spektrums neben der visuellen Beobachtung der Farbe, der Bestimmung des Eisenionen- und Sulfidionengehaltes und des ESR-Spektrums eine wichtige Analysemethode gereinigter Fe/S-Proteine darstellt. Für ein geeignetes Spektrum wurde die entsalzte Probe so verdünnt, dass die Absorption bei 280 nm zwischen 0,7 und 1,0 lag. Das Spektrum wurde in einem Bereich zwischen 260 nm und 700 nm mit einer Geschwindigkeit von 100 nm/min aufgenommen. Zunächst wurde ein Hintergrundspektrum des Puffers aufgezeichnet, um später aus der Differenz das Spektrum des Proteins zu berechnen.

### 7.10.7 CD-Spektroskopie

Bei der CD-Spektroskopie handelt es sich um eine nicht invasive Methode, bei der die Wechselwirkung von optisch aktiven Substanzen mit zirkular polarisiertem Licht zu analytischen Zwecken ausgenutzt wird. Die Messungen sind schnell und es kann mit geringen Proteinmengen gearbeitet werden. Zirkular polarisiertes Licht setzt sich aus zwei Wellenfunktionen linear polarisierten Lichts zusammen, deren Phasen um  $\lambda/4$  gegeneinander verschoben sind. Aus CD-Spektren im Wellenlängenbereich von 160 nm - 250 nm können Informationen über Sekundärstrukturen von Proteinen oder Makromolekülen erhalten werden. Des Weiteren kann das CD-Spektrum im Bereich von 250 – 700 nm auch über Kofaktoren oder auch Disulfidbrücken Informationen liefern.

### 7.10.8 Chemische Rekonstitution von Fe/S-Proteinen

Zur Rekonstitution des Fe/S-Clusters wurden 200  $\mu\text{M}$  des gereinigten Proteins in Tris-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl) zuerst mit 5 mM DTT zwei Stunden lang auf Eis reduziert. Anschließend wurde für die Rekonstitution abhängig von der Art des Fe/S-Clusters 2-6 Äquivalente Eisen(III)ammoniumcitrat ( $\text{Fe}^{3+}$ ) bei RT hinzugegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit und der Entstehung einer rötlichen-rosa Farbe, wurde der Ansatz mit einer zu Eisen äquivalenten Menge Lithiumsulfid ( $\text{S}^{2-}$ ) versetzt. Die Änderung der Farbe zu rötlich-

braun wurde innerhalb eines Zeitraumes von 30 Minuten beobachtet. Zur Entfernung von überschüssigen Salzen, die mit der Zeit ausfallen könnten, wurde die Probe über eine PD-10 Säule entsalzt und durch Ultrafiltration (Amicon) aufkonzentriert.

### 7.10.9 Bestimmung des Eisenionengehaltes mit Feren

Zur Bestimmung von Metallionen ist eine Reihe von Chelatoren bekannt, die mit den Metallionen im nanomolaren Bereich farbige Komplexe bilden (Beinert, 1978; Hennessy *et al.*, 1984). Nachfolgend sind die für die Eisenbestimmung benötigten Reagenzien aufgeführt.

**Tabelle 24: Reagenzien für die Bestimmung des Eisenionengehaltes.**

Reagenzien	Konzentration
Salzsäurelösung (HCl)	1%
Ammoniumacetatlösung	7,5%
Natriumdodecylsulfatlösung (SDS)	2,5%
Ascorbinsäure	4%
Feren	1,5%
Mohr'sches Salz	0,2 mM

Für den Testansatz (Hennessy *et al.*, 1984) wurde abhängig von der Proteinkonzentration eine 1:10 Verdünnung des Proteins oder direkt 100  $\mu\text{L}$  der Proteinprobe eingesetzt. Des Weiteren wurden unterschiedliche Mengen des Eisenstandards (0, 1, 2, 4, 10 und 20 nmol Eisenionen) ebenfalls auf ein Endvolumen von 100  $\mu\text{L}$  mit  $\text{bdH}_2\text{O}$  gebracht. Zu der Probe sowie des Standards wurden 100  $\mu\text{L}$  1%-ige (w/v) Salzsäure (HCl) gegeben und durch leichtes Schütteln gemischt. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei 80°C und anschließender Abkühlungsphase wurden nacheinander 500  $\mu\text{L}$  7.5% (w/v) Ammoniumacetat, 100  $\mu\text{L}$  4% (w/v, frisch zubereitet) Ascorbinsäure, 100  $\mu\text{L}$  2.5% (w/v) SDS sowie 100  $\mu\text{L}$  1.5% (w/v) Feren (3-(2-(2-Pyridyl)-5,6-di(2-furyl)-1,2,4-Triazin-5',5''-Disulfonsäure, Eisenchelator) hinzugegeben. Nach der Zugabe der Lösungen wurde stets gevortext. Bei enthaltenen Eisenionen wurden die Proben blau und nach Zentrifugation (9000 U/min, 7 min) wurde die Absorption bei 593 nm gegen Wasser gemessen. Die Kalibrierkurve verläuft bis zu einer Absorption von 2-2,5 linear und besitzt eine durchschnittliche Steigung von  $0,03 \pm 0,001$  Abs/nmol.

### 7.10.10 Bestimmung des Sulfidionengehaltes

Der säurelabile-Sulfidionengehalt von Fe/S-Proteinen wird kolorimetrisch durch die Reaktion von Sulfidionen mit N,N'-dimethyl-1,4-phenylendiamin (DMPD) unter sauren und oxidierenden Bedingungen ( $\text{FeCl}_3$ ) durch die Bildung von Methylenblau detektiert. Für den Testansatz wurde

abhängig von der Proteinkonzentration eine 1:10 Verdünnung des Proteins oder direkt 200  $\mu\text{L}$  der Proteinprobe eingesetzt. Der Lithiumsulfidstandard wurde in 10 mM NaOH gelöst (Endkonzentration von 2 mM). Anschließend wurden jeweils 0, 2,5, 5, 10, 15, 25 und 50  $\mu\text{L}$  mit  $\text{bdH}_2\text{O}$  auf 200  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Nacheinander wurden die Proben mit 600  $\mu\text{L}$  1% (w/v) Zinkacetat und 50  $\mu\text{L}$  7% (w/v) NaOH versetzt. Die Proben wurden kurz invertiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das weiße Präzipitat wurde bei 7000 rpm für 20 Sekunden pelletiert und durch langsames Zutropfen von 150  $\mu\text{L}$  einer DMPD-Lösung wieder gelöst. Anschließend wurde 150  $\mu\text{L}$  Eisen(III)-chloridlösung hinzugegeben und 20 Sekunden gevortext. Die Proben wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption des gebildeten Methylenblaus bei 670 nm gegen Wasser gemessen. Die Eichgerade besaß eine durchschnittliche Steigung von  $0,02 \pm 0,001 \text{ Abs/nmol}$ .

**Tabelle 25: Reagenzien für die Bestimmung der säurelabilen Sulfidionen.**

Reagenzien	Konzentration
Zinkacetat	1% (w/v)
Natriumhydroxidlösung (NaOH)	7% w/v
DMPD	0,1% w/v in 5 M HCl
Eisen(III)chlorid	10 mM in 1 M HCl
Sulfidstandard	2 mM in 10 mM NaOH

## 7.11 Fe/S-Cluster Transfer

Für den Fe/S-Clustertransfer wurden verschiedene mit einem Fe/S-Cluster rekonstituierte Donorproteine (holoGLRX5, holoNFU1 oder holoNifU2) verwendet, die mit einem Akzeptorprotein (*S. el.* Ferredoxin, ADX1, Leu1 oder ACO2) unter Zugabe von weiteren Komponenten (Tabelle 26) im Transferpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5% Glycerin) miteinander gemischt wurden. Alle Arbeiten wurden in einer anaeroben Kammer durchgeführt. Nachfolgend sind die in einem 30  $\mu\text{L}$  Reaktionsansatz verwendeten Endkonzentrationen aufgeführt.

**Tabelle 26: Konzentrationen der im Fe/S-Cluster Transfersystem eingesetzten Komponenten.**

Protein	Endkonzentration	Komponenten	Endkonzentration
<b>Donor</b>		ATP	1 mM
GLRX5	50 $\mu\text{M}$	Citrat	1 mM
NFU1	25 $\mu\text{M}$	DTT	2 mM
NifU2	25 $\mu\text{M}$	ME	4 mM
<b>Akzeptor</b>		NADPH	1 mM
ACO2	25 $\mu\text{M}$	TCEP	4 mM
ADX1-	25 $\mu\text{M}$	GSH	4 mM

Protein	Endkonzentration	Komponenten	Endkonzentration
<b>Akzeptor</b>			
<i>S. el. Fd</i>	25 $\mu$ M	Grx1	25 $\mu$ M
Leu1	25 $\mu$ M		
<b>Hilfsproteine</b>			
ISCA1/ISCA2/IBA57	je 5 $\mu$ M		

Um einen erfolgreichen Fe/S-Clustertransfer zu analysieren wurde zu definierten Zeitpunkten ein Aliquot der Reaktionsmischung entnommen und die Fe/S-Cluster abhängige Enzymaktivitäten des Akzeptorproteins gemessen. Nachfolgend sind die verwendeten Enzymtestsysteme aufgeführt.

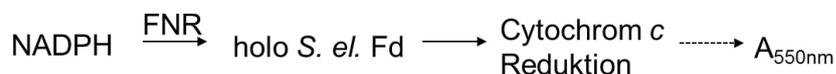
## 7.11.1 Enzymtestsysteme

### 7.11.1.1 Quantifizierung von holo-Ferredoxinen

Zur Quantifizierung der Bildung von holo-Ferredoxinen wurde die Cytochrom *c*-Reduktionsrate in einer Ferredoxin-NADPH-Reduktase (FNR/FDXR) abhängigen Reaktion gemessen (Nishio und Nakai, 2000).

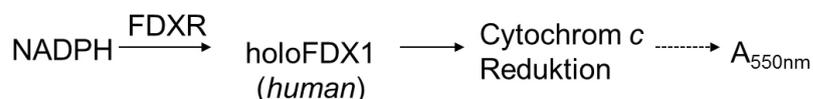
#### A

[2Fe-2S]-Transfersystem mit einer *A. thaliana* Ferredoxin-NADPH-Reduktase (FNR) und holo *S. el. Fd*:



#### B

[2Fe-2S]-Transfersystem mit einer *humanen* Ferredoxin-NADPH-Reduktase (FDXR) und holoFDX1:



Für die Aktivitätsmessungen wurden zwei unterschiedliche Puffer verwendet. Das pflanzliche System war bei pH 8,0 am effektivsten, das humane System bei pH 7,4.

Tabelle 27: Im Transfersystem verwendete Puffer.

Puffer pH 8,0 (A)		Puffer pH 7,4 (B)	
50 mM	Tris-HCl pH 8,0	50 mM	Tris-HCl pH 7,4
50 mM	NaCl	50 mM	NaCl
2 mM	MgCl <sub>2</sub>	2 mM	MgCl <sub>2</sub>

Ansatzgröße	
936 $\mu\text{L}$	Puffer
10 $\mu\text{L}$	NADPH (0,1 M)
50 $\mu\text{L}$	Cytochrom <i>c</i> (20 mg/mL)
4 $\mu\text{L}$	FNR/FDXR (0,5 $\mu\text{M}$ )
4(B)-5(A) $\mu\text{L}$	Reaktionsansatz mit Proteinen

### 7.11.1.2 Aconitase

Für die Messung der Aconitaseaktivität, die für ihre Enzymaktivität einen [4Fe-4S]-Cluster benötigt, wurde die Absorptionsänderung von *cis*-Isocitrat in einer Quartzküvette für 2 min bei 235 nm verfolgt.

**Tabelle 28: Puffer und Ansatzgröße des Aconitasetestsystems .**

14all-Puffer	
50 mM	Tris-HCl pH 8,0
50 mM	NaCl
Ansatzgröße	
946 $\mu\text{L}$	14all-Puffer
50 $\mu\text{L}$	<i>cis</i> -Isocitrat (200 mM)
4 $\mu\text{L}$	Reaktionsansatz mit Proteinen

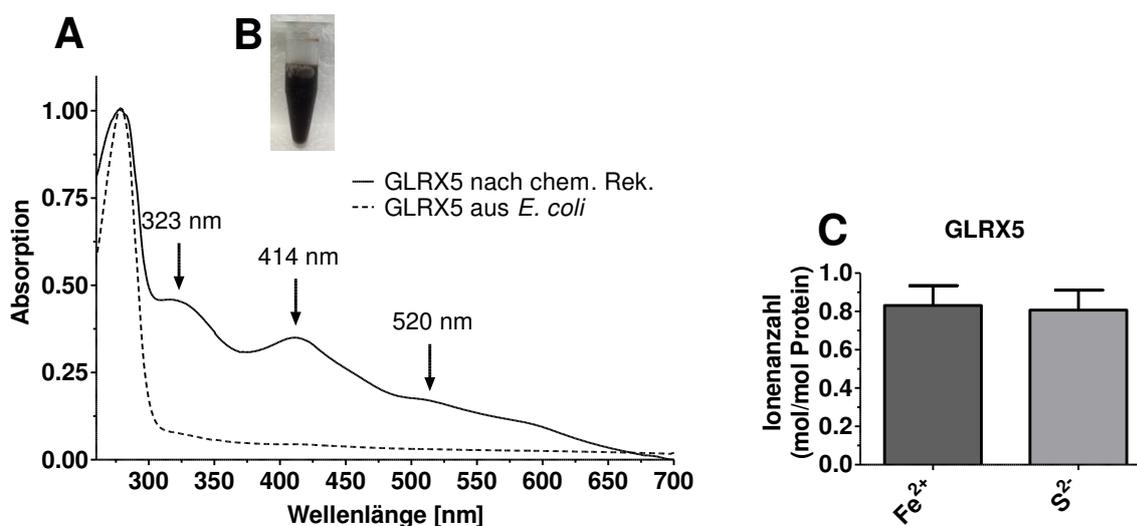
### 7.11.1.3 Leu1 (Isopropylmalat-Isomerase)

Leu1, ein Fe/S-Clusterenzym, benötigt für die Katalyse von 2-Isopropylmalat zu 3-Isopropylmalat einen [4Fe-4S]-Cluster. Die Umwandlung kann in einer Quartzküvette über 2 min bei 235 nm verfolgt werden (Pierik *et al.*, 2009).

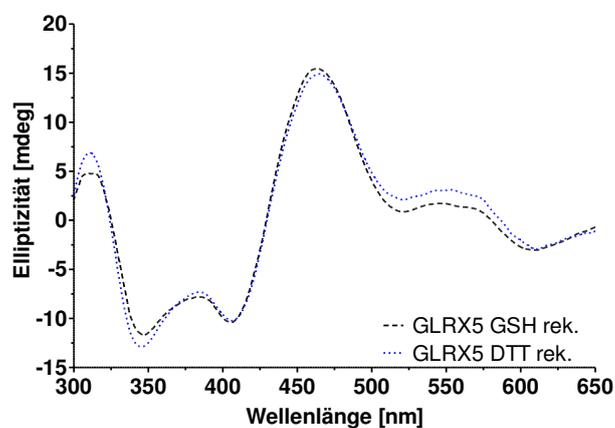
**Tabelle 29: Ansatzgröße des Leu1-Testsystems.**

Ansatzgröße	
940 $\mu\text{L}$	14all-Puffer
20 $\mu\text{L}$	Isopropylmalat (100 mM)
4 $\mu\text{L}$	Reaktionsansatz mit Proteinen

## 8 Anhang



**Abbildung 57: Nach chemischer Rekonstitution bindet GLRX5 einen [2Fe-2S]-Cluster.** (A) UV/Vis Spektrum von chemisch rekonstituiertem (—) und aus *E. coli* isolierten und mittels Ni-NTA und Größenausschlusschromatographie gereinigtem GLRX5 (---). (B) Fotografische Aufnahme von 200 µM chemisch rekonstituiertem GLRX5. (C) Eisen- und Sulfidionenbestimmung (Methoden, Kapitel 7.10.9/10, Seite 130) des chemisch rekonstituierten GLRX5. Fehlerbalken deuten die Standardabweichung SD (n=3) an. Für die Aufreinigung und die chemische Rekonstitution wurde der Standardpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl und 5% Glycerin) verwendet.

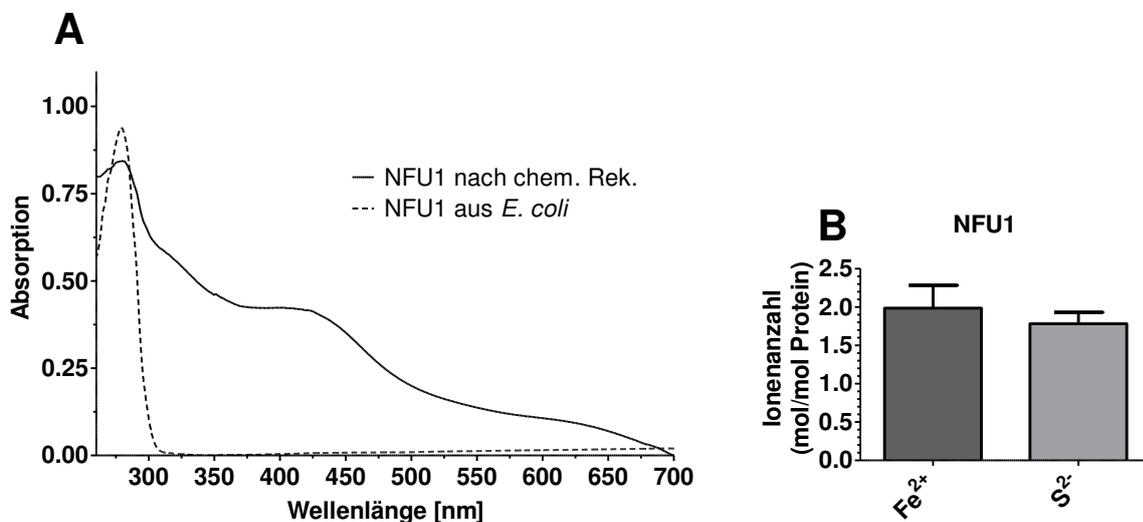


**Abbildung 58: GLRX5 kann in Gegenwart von reduziertem Glutathion (GSH) ohne DTT chemisch rekonstituiert werden.** Chemische Rekonstitution von 200 µM GLRX5 in Gegenwart von 5 mM GSH (blau ---) und in Gegenwart von 5 mM DTT (schwarz ---) liefert ein identisches CD-Spektrum im Bereich 300 nm - 650 nm in Standardpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5% Glycerin).

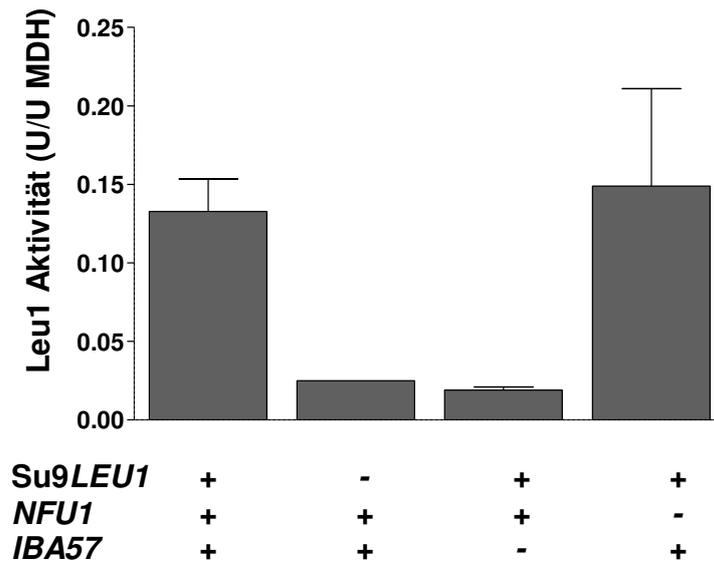


$$\begin{aligned} \frac{-d[A]}{dt} &= k[A][B] \\ \frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \ln \frac{[B][A]_0}{[B]_0[A]} &= kt \\ \text{wenn } [B]_0 &\gg [A]_0, \text{ dann ist } [B]_0 \sim [B] \\ \frac{1}{[B]_0 - [A]_0} \ln \frac{[B][A]_0}{[B]_0[A]} &\approx \frac{1}{[B]} \ln \frac{[A]_0}{[A]} = kt \\ [A] &= [A]_0 e^{-[B]kt} \\ k_{\text{obs}} &= \frac{k}{[B]} \end{aligned}$$

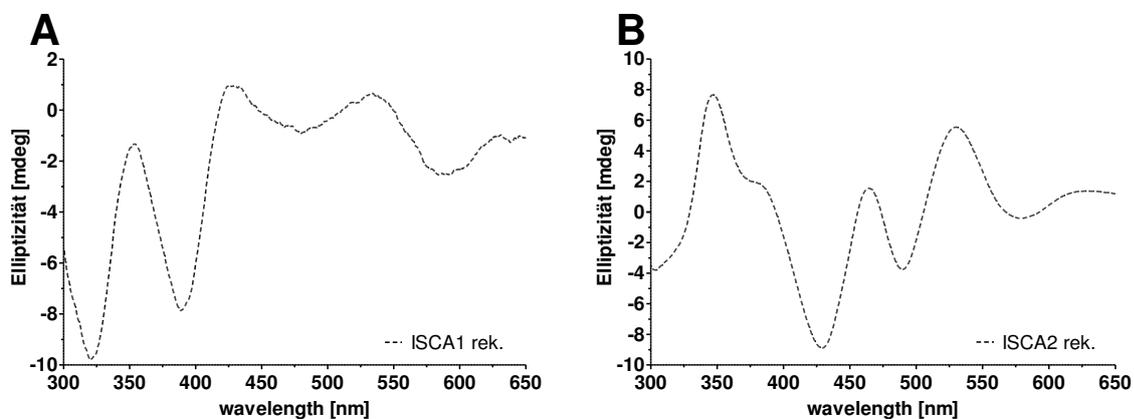
**Abbildung 59: Die bimolekulare Reaktion des Fe/S-Clustertransfers kann als Reaktion pseudo-1. Ordnung gefittet werden.** Die Konzentration an holo Fe/S-Donor ([B]) ist höher ( $[B] \gg [A]$ ) als die des apo Fe/S-Akzeptors ([A]). Vereinfacht kann daher davon ausgegangen werden, dass die Konzentration des Fe/S-Donors im Verlauf der Reaktion konstant bleibt. Die Gleichung hängt nur noch von der Konzentration [A] ab, das bedeutet, dass es sich formell um eine Reaktion 1. Ordnung handelt, allerdings handelt es sich nur um eine Reaktion pseudo-1. Ordnung, da die Reaktion nach wie vor noch bimolekular (2. Ordnung) ist. Wenn die Geschwindigkeitskonstante  $k$  der Reaktion 1. Ordnung bekannt ist, dann kann die Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$  für die bimolekulare Reaktion bestimmt werden.  $[A]_0$ : Anfangskonzentration von [A],  $[B]_0$ : Anfangskonzentration von [B],  $k$ : Geschwindigkeitskonstante Reaktion pseudo-1. Ordnung (ermittelt mit der Software GraphPad Prism5),  $k_{\text{obs}}$ : Geschwindigkeitskonstante Reaktion 2. Ordnung. [A]: Konzentration von A zum Zeitpunkt  $t$ .



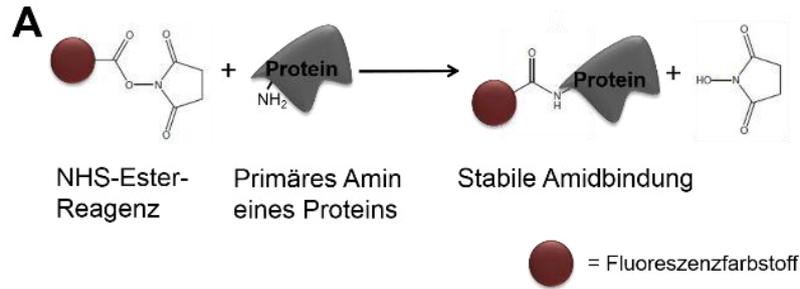
**Abbildung 60: Nach chemischer Rekonstitution bindet NFU1 einen [4Fe-4S]-Cluster.** (A) UV/Vis Spektrum von 50  $\mu\text{M}$  chemisch rekonstituiertem (—) und aus *E. coli* isoliertem und mittels Ni-NTA und Größenausschlusschromatographie gereinigtem NFU1 (- -). (B) Eisen- und Sulfidionenbestimmung (Methoden, Kapitel 7.10.9/10, Seite 130) des chemisch rekonstituierten NFU1. Fehlerbalken deuten die Standardabweichung SD ( $n=5$ ) an. Die UV/Vis-Spektren wurden in Standardpuffer (Abbildung 57) aufgenommen.



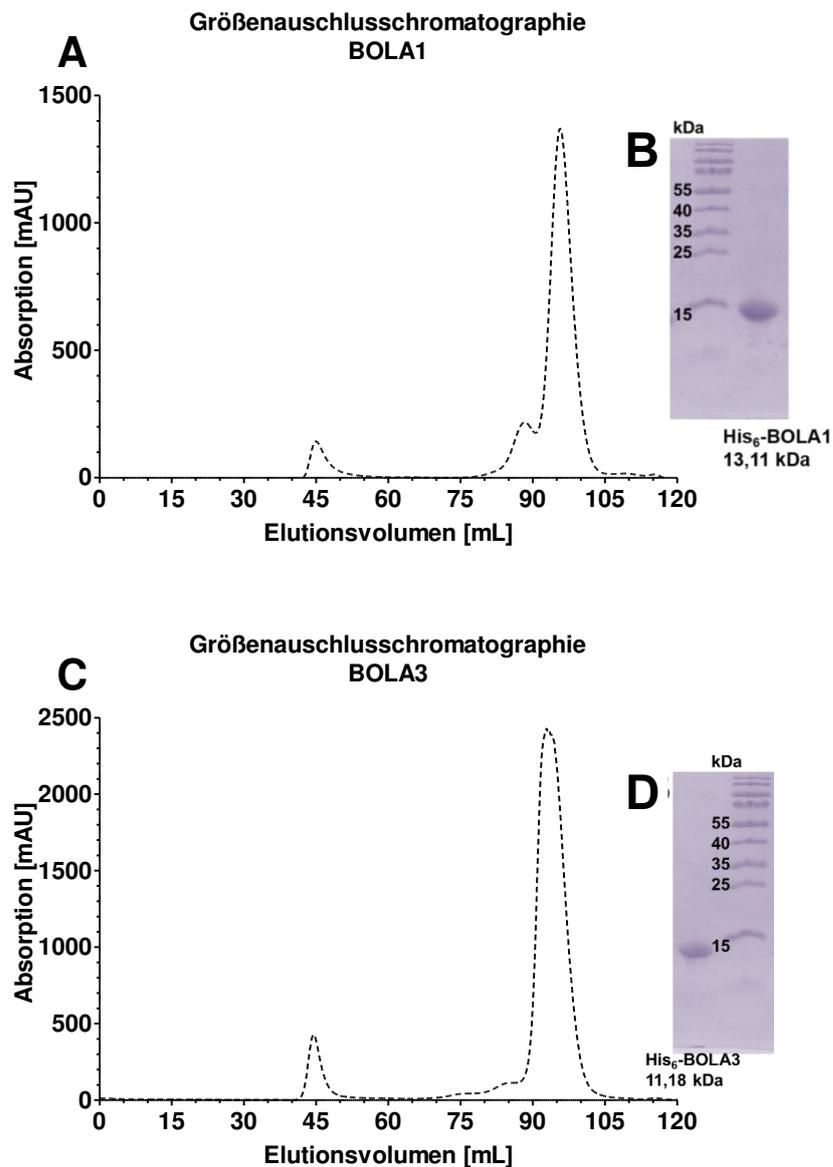
**Abbildung 61: NFU1 nimmt keine Funktion als [4Fe-4S]-Clusterdonor auf Leu1 wahr.** Aktivität von in Mitochondrien exprimierten Leu1 in *leu1Δ*-Zellen. Die *leu1Δ*-Hefezellen wurden mit mitochondrial exprimierbaren Su9LEU1 (Lange *et al.*, 2000), mit einem NFU1- oder IBA57-Plasmid transformiert. Hefezellen wurden in Minimalmedium mit 2% Galactose kultiviert. Enzymaktivitäten von Leu1 wurden auf die Enzymaktivitäten der Malatdehydrogenase normalisiert. Fehlerbalken geben die Standardabweichung SD (n = 4) wieder.



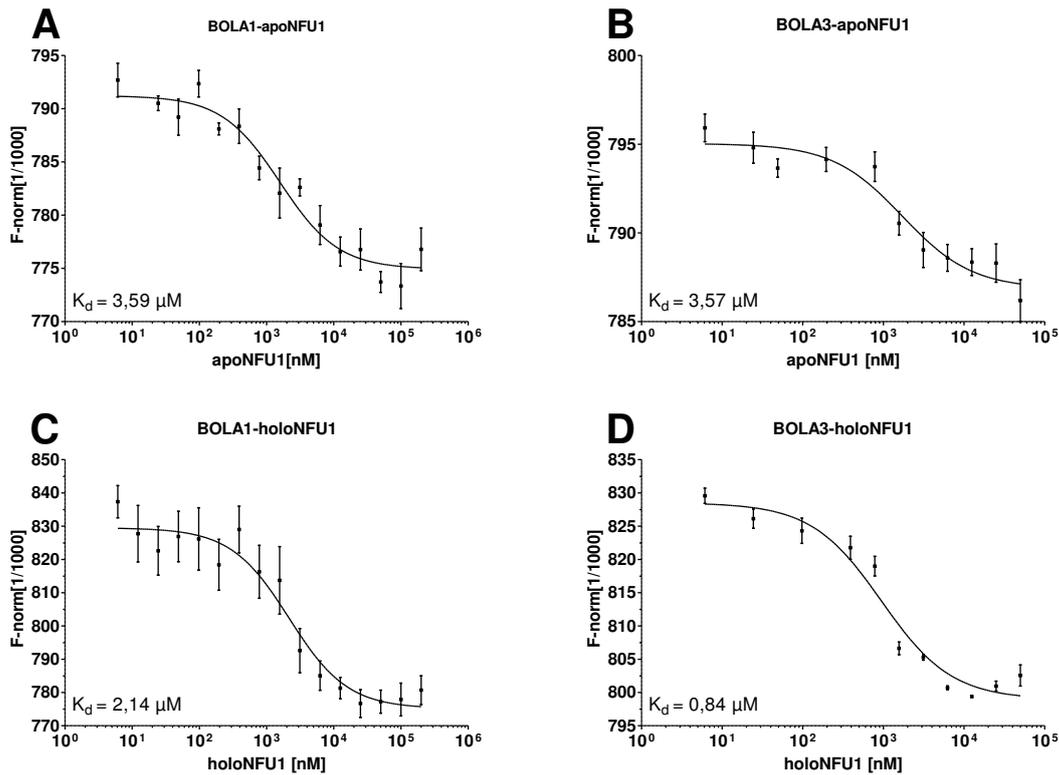
**Abbildung 62: ISCA1 und ISCA2 können chemisch mit einem Fe/S-Cluster rekonstituiert werden.** 100  $\mu$ M humanes ISCA1 (A) und ISCA2 (B) wurden in Gegenwart von 0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol chemisch rekonstituiert. CD-Spektrum im Bereich von 300 nm - 650 nm. Alle CD-Spektren wurden in Standardpuffer (Abbildung 57) mit einer Proteinkonzentration von 25  $\mu$ M aufgenommen.



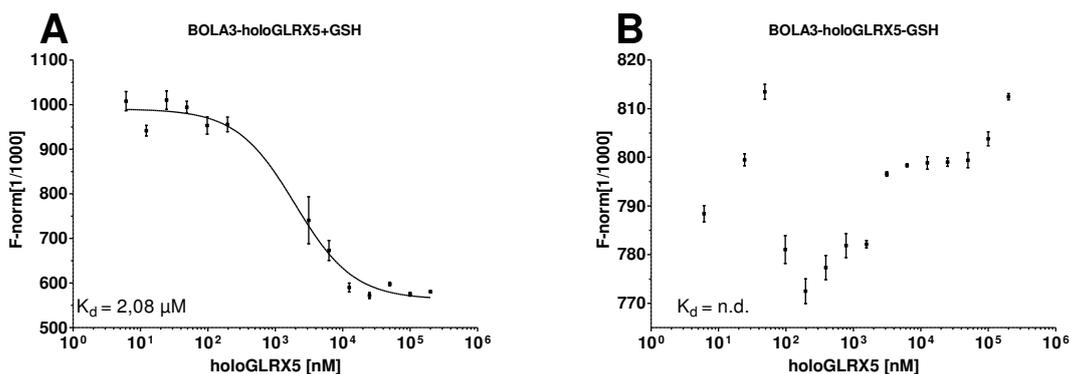
**Abbildung 63: Vereinfachte Darstellung zur Fluoreszenzmarkierung der Proteine für MST-Messungen.** Primäre Amine reagieren mit dem NHS-Ester-Reagenz, welches eine fluorophore Gruppe trägt. Zwischen fluorophorer Gruppe und freiem Amin des Proteins wird eine stabile Amidbindung ausgebildet.



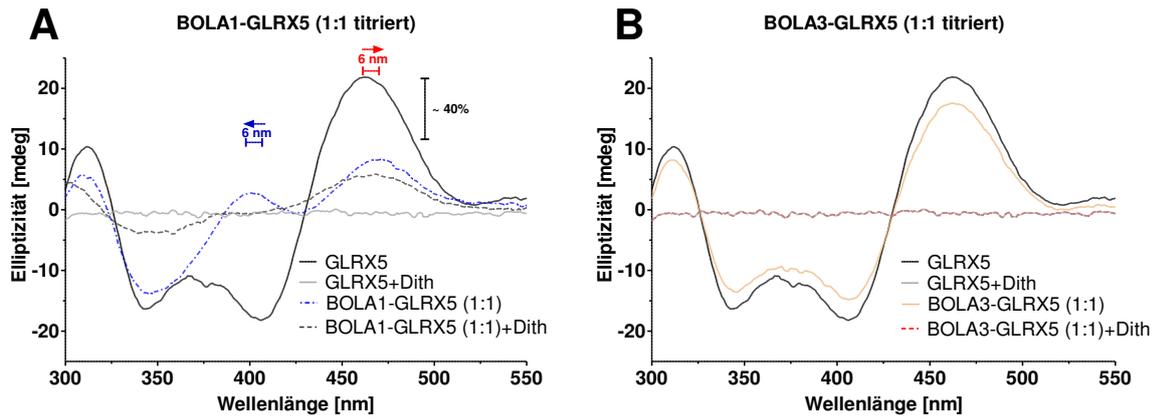
**Abbildung 64: Elutionsprofile der BOLA-Proteine nach Größenausschlusschromatographie. (A) BOLA1 und (C) BOLA3 nach Größenausschlusschromatographie im Standardpuffer (Abbildung 57). Säule: Superdex16/60 200. (B/D) SDS-PAGE-Gel (15%) des für MicroScale Thermophorese verwendeten (B) BOLA1- und (D) BOLA3-Proteins nach Größenausschlusschromatographie.**



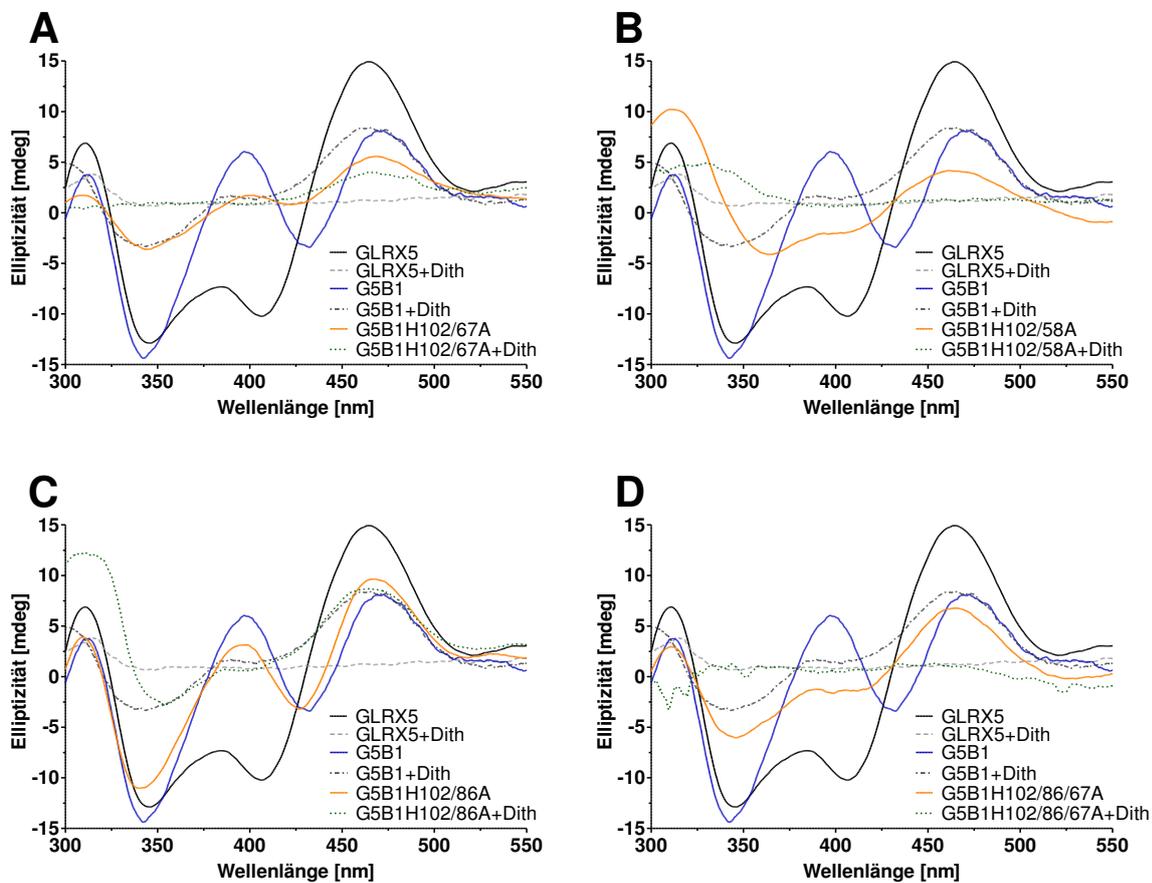
**Abbildung 65: BOLA3 interagiert mit der späten ISC-Komponente NFU1.** Graphische Darstellung der MicroScale Thermophorese Daten. Fluoreszenzmarkiertes BOLA-Protein (200 nM) wurde mit verschiedenen Konzentrationen (6,1 nM-200 µM) (A-B) apoNFU1 oder (C-D) holoNFU1 gemischt, und die Thermophorese durchgeführt. Fehlerbalken deuten die Standardabweichung SD (n=3) an. Das erst genannte Protein war mit dem Fluoreszenzmarker versehen. Für die MicroScale Thermophorese (MST)-Messungen wurde MST-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20, 0,05 mg/mL BSA, 5% Glycerin) verwendet. n.d., nicht detektierbar. Diese Daten wurden bereits in Melber et al. 2016 publiziert.

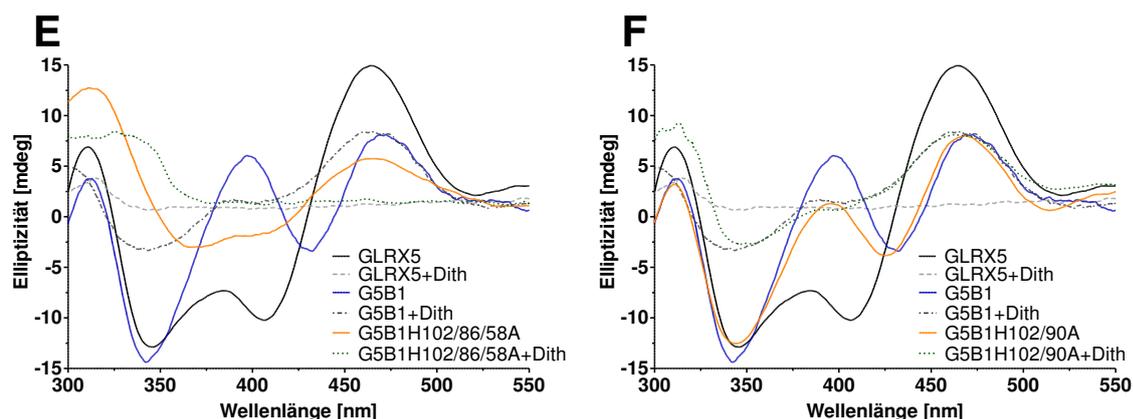


**Abbildung 66: BOLA3 interagiert mit der Holoform von GLRX5 in Gegenwart von GSH.** Graphische Darstellung der MicroScale Thermophorese Daten. Fluoreszenzmarkiertes BOLA3-Protein (200 nM) wurde mit verschiedenen Konzentrationen (6,1 nM-200 µM) holoGLRX5 (A) in Gegenwart von 5 mM GSH und (B) Abwesenheit von GSH gemischt, und die Thermophorese durchgeführt. Fehlerbalken deuten die Standardabweichung SD (n=3) an. Das erst genannte Protein war mit dem Fluoreszenzmarker versehen. Für die MicroScale Thermophorese (MST)-Messungen wurde MST-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20, 0,05 mg/mL BSA, 5% Glycerin) verwendet. n.d., nicht detektierbar.

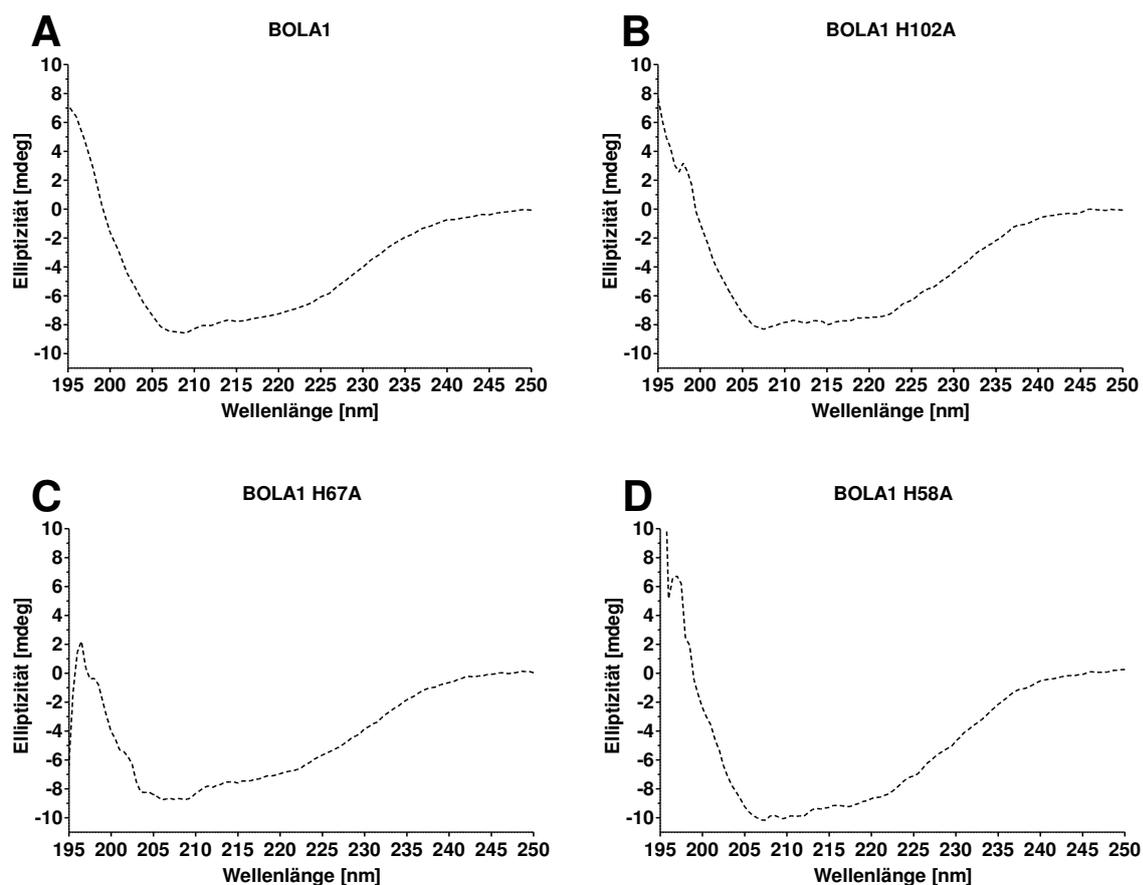


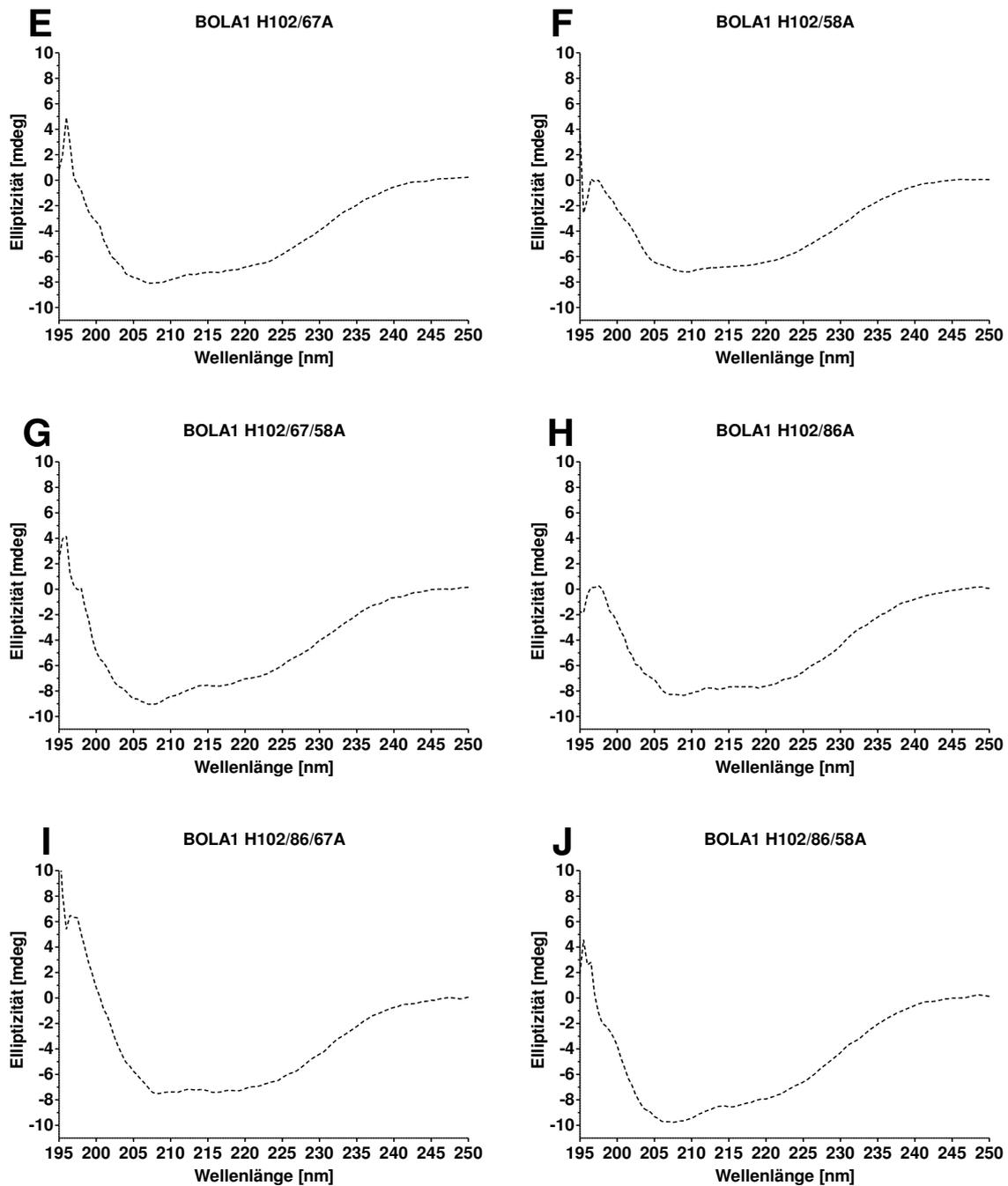
**Abbildung 67: Der Fe/S-Cluster des stöchiometrisch titrierten BOLA1-Komplexes ist im Gegensatz zum BOLA3-GLRX5-Komplex stabil gegenüber Dithionitreduktion. (A)** CD-Spektren von chemisch rekonstituiertem GLRX5 (schwarz –, 200  $\mu$ M) und stöchiometrisch (1:1) titrierten BOLA1 (BOLA1-GLRX5 (1:1), blau – –, 200  $\mu$ M, verdünnungskorrigiert). Signifikante Verschiebungen zu niedrigen Wellenlängen sind blau und Verschiebungen zu höheren Wellenlängen rot markiert. Zusätzlich wurden CD-Spektren nach der Zugabe des Reduktionsmittels Dithionit (2 mM Endkonzentration) aufgenommen (GLRX5+Dith, grau –, BOLA1-GLRX5 (1:1)+Dith, rot ●–). **(B)** Chemisch rekonstituiertes GLRX5 (schwarz –, 200  $\mu$ M) wurde mit stöchiometrischer Menge (1:1) BOLA3 titriert (BOLA3-GLRX5, braun – –, 200  $\mu$ M, verdünnungskorrigiert). Anschließend wurden GLRX5 (GLRX5+Dith, grau –) und BOLA3-GLRX5 mit 2 mM Dithionit versetzt (BOLA3-GLRX5, rot (1:1)+Dith ●–) und die CD-Spektren unter anaeroben Bedingungen in Standardpuffer aufgenommen.





**Abbildung 68: Mutationen der konservierten Histidine führt zu veränderten CD-spektroskopischen Eigenschaften und zu einer veränderten Stabilität des im holoGLRX5-BOLA1 Komplex gebundenen Fe/S-Clusters.** Unter anaeroben Bedingungen aufgenommene CD-Spektren im Bereich von 300 nm – 550 nm von chemisch rekonstituiertem GLRX5 (schwarz), korekonstituiertem GLRX5-BOLA1 (blau) und den jeweiligen in braun dargestellten korekonstituierten Proben von (A) G5B1H012/67A, (B) G5B1H102/58A, (C) G5B1H102/86A und (D) G5B1H102/86/67A (E) G5B1 H102/86/58A und (F) G5B1H102/90A . Alle CD-Spektren wurden in Standardpuffer mit einer Proteinkonzentration von 150  $\mu$ M aufgenommen.





**Abbildung 69: Mutationen der Histidine des BOLA1 haben keine Auswirkungen auf die funktionelle Faltung des Proteins.** Im Bereich von 195 nm – 250 nm aufgenommene CD-UV-Spektren von (A) BOLA1, (B) BOLA1 H102A, (C) BOLA1 H67A, (D) BOLA1 H58A, (E) BOLA1 H102/67A, (F) BOLA1 H102/58A, (G) BOLA1 H102/67/58A, (H) BOLA1 H102/86A, (I) BOLA1 H102A/86/67A und (J) BOLA1 H102/86/58A. Alle CD-Spektren wurden in Standardpuffer mit einer Proteinkonzentration von 1  $\mu$ M aufgenommen.

## 9 Literatur

Adam, A.C., Bornhövd, C., Prokisch, H., Neupert, W., and Hell, K. (2006). The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO J* 25, 174-183.

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

Agar, J.N., Zheng, L., Cash, V.L., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2000b). Role of the IscU protein in iron-sulfur cluster biosynthesis: IscS-mediated assembly of a [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>] cluster in IscU. *J Am Chem Soc* 122, 2136-2137.

Ajit Bolar, N., Vanlander, A.V., Wilbrecht, C., Van der Aa, N., Smet, J., De Paepe, B., Vandeweyer, G., Kooy, F., Eyskens, F., De Letter, E., *et al.* (2013). Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene IBA57 causes severe myopathy and encephalopathy. *Human molecular genetics* 22, 2590-2602.

Aldea, M., Garrido, T., Hernandez-Chico, C., Vicente, M., and Kushner, S.R. (1989). Induction of a growth-phase-dependent promoter triggers transcription of *bolA*, an *Escherichia coli* morphogene. *The EMBO journal* 8, 3923-3931.

Amon, F. (1958). [Biomorphosis in the light of social hygiene]. *Z Alternsforsch* 11, 188-200.

Andreini, C., Rosato, A., and Banci, L. (2017). The Relationship between Environmental Dioxygen and Iron-Sulfur Proteins Explored at the Genome Level. *PLoS One* 12, e0171279.

Angelini, S., Gerez, C., Ollagnier-de Choudens, S., Sanakis, Y., Fontecave, M., Barras, F., and Py, B. (2008). NfuA, a new factor required for maturing Fe/S proteins in *Escherichia coli* under oxidative stress and iron starvation conditions. *J Biol Chem* 283, 14084-14091.

Averill, B.A., Eldredge P., Principles of general chemistry.

Ayala-Castro, C., Saini, A., and Outten, F.W. (2008). Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 110-125.

Bak, D.W., and Elliott, S.J. (2014). Alternative FeS cluster ligands: tuning redox potentials and chemistry. *Curr Opin Chem Biol* 19, 50-58.

Balk, J., and Lobreaux, S. (2005). Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci* 10, 324-331.

Banci, L., Brancaccio, D., Ciofi-Baffoni, S., Del Conte, R., Gadepalli, R., Mikolajczyk, M., Neri, S., Piccioli, M., and Winkelmann, J. (2014). [2Fe-2S] cluster transfer in iron-sulfur protein biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 6203-6208.

Bandyopadhyay, S., Chandramouli, K., and Johnson, M.K. (2008a). Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biochem Soc Trans* 36, 1112-1119.

Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M.M., Gualberto, J.M., Claxton, R., Naik, S.G., Huynh, B.H., Herrero, E., Jacquot, J.P., Johnson, M.K., *et al.* (2008b). Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *Embo J* 27, 1122-1133.

Barras, F., Loiseau, L., and Py, B. (2005). How *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* build Fe/S proteins. *Adv Microb Physiol* 50, 41-101.

Beinert, H. (1978). Micro methods for the quantitative determination of iron and copper in biological material. *Methods Enzymol* 54, 435-445.

Beinert, H. (2000). Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J Bioinorg Chem* 5, 2-15.

Beinert, H., and Albracht, S.P.J. (1982). New insights, ideas and unanswered questions concerning iron-sulfur clusters in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 683, 245-277.

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

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

Beinert, H., Kennedy, M.C., and Stout, C.D. (1996). Aconitase as Iron-Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *Chem Rev* 96, 2335-2374.

Beinert, H., and Lee, W. (1961). Evidence for a new type of iron containing electron carrier in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 5, 40-45.

Bencze, K.Z., Kondapalli, K.C., Cook, J.D., McMahon, S., Millan-Pacheco, C., Pastor, N., and Stemmler, T.L. (2006). The structure and function of frataxin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41, 269-291.

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.

Berndt, C., Lillig, C.H., and Holmgren, A. (2008). Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim Biophys Acta* 1783, 641-650.

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

Bhan, A., Galas, D.J., and Dewey, T.G. (2002). A duplication growth model of gene expression networks. *Bioinformatics* 18, 1486-1493.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *NAR* 11, 4077-4092.

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.

Bonomi, F., Iametti, S., Morleo, A., Ta, D., and Vickery, L.E. (2011). Facilitated transfer of IscU-[2Fe2S] clusters by chaperone-mediated ligand exchange. *Biochemistry* *50*, 9641-9650.

Booker, S.J., Cicchillo, R.M., and Grove, T.L. (2007). Self-sacrifice in radical S-adenosylmethionine proteins. *Curr Opin Chem Biol* *11*, 543-552.

Boutigny, S., Saini, A., Baidoo, E.E., Yeung, N., Keasling, J.D., and Butland, G. (2013). Physical and functional interactions of a monothiol glutaredoxin and an iron sulfur cluster carrier protein with the sulfur-donating radical S-adenosyl-L-methionine enzyme MiaB. *The Journal of biological chemistry* *288*, 14200-14211.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* *72*, 248-254.

Brancaccio, D., Gallo, A., Mikolajczyk, M., Zovo, K., Palumaa, P., Novellino, E., Piccioli, M., Ciofi-Baffoni, S., and Banci, L. (2014). Formation of [4Fe-4S] clusters in the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly machinery. *Journal of the American Chemical Society* *136*, 16240-16250.

Braymer, J.J., and Lill, R. (2017). Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *J Biol Chem* *292*, 12754-12763.

Bushweller, J.H., Aslund, F., Wüthrich, K., and Holmgren, A. (1992). Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14----S) and its mixed disulfide with glutathione. *Biochemistry* *31*, 9288-9293.

Böhme, H. (1977). On the role of ferredoxin and ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase in cyclic electron transport of spinach chloroplasts. *Eur J Biochem* *72*, 283-289.

Camaschella, C., Campanella, A., De Falco, L., Boschetto, L., Merlini, R., Silvestri, L., Levi, S., and Iolascon, A. (2007). The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* *110*, 1353-1358.

Cameron, J.M., Janer, A., Levandovskiy, V., Mackay, N., Rouault, T.A., Tong, W.H., Ogilvie, I., Shoubridge, E.A., and Robinson, B.H. (2011). Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. *American journal of human genetics* *89*, 486-495.

Chandramouli, K., and Johnson, M.K. (2006). HscA and HscB stimulate [2Fe-2S] cluster transfer from IscU to apoferredoxin in an ATP-dependent reaction. *Biochemistry* *45*, 11087-11095.

Cicchillo, R.M., Lee, K.-H., Baleanu-Gogonea, C., Nesbitt, N.M., Krebs, C., and Booker, S.J. (2004). *Escherichia coli* lipoyl synthase binds two distinct [4Fe-4S] clusters per polypeptide. *Biochemistry* 43, 11770-11781.

Ciesielski, S.J., Schilke, B.A., Osipiuk, J., Bigelow, L., Mulligan, R., Majewska, J., Joachimiak, A., Marszalek, J., Craig, E.A., and Dutkiewicz, R. (2012). Interaction of J-protein co-chaperone Jac1 with Fe-S scaffold Isu is indispensable in vivo and conserved in evolution. *Journal of molecular biology* 417, 1-12.

Colin, F., Martelli, A., Clemancey, 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<sub>4</sub>S<sub>4</sub> cluster assembly. *Journal of the American Chemical Society* 135, 733-740.

Cory, S.A., Van Vranken, J.G., Brignole, E.J., Patra, S., Winge, D.R., Drennan, C.L., Rutter, J., and Barondeau, D.P. (2017). Structure of human Fe-S assembly subcomplex reveals unexpected cysteine desulfurase architecture and acyl-ACP-ISD11 interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E5325-E5334.

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.

Dagert, M., and Ehrlich, S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6, 23-28.

Debray, F.G., Stumpfig, C., Vanlander, A.V., Dideberg, V., Josse, C., Caberg, J.H., Boemer, F., Bours, V., Stevens, R., Seneca, S., *et al.* (2015). Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene IBA57 causes fatal infantile leukodystrophy. *J Inherit Metab Dis* 38, 1147-1153.

Dlouhy, A.C., Li, H., Albetel, A.N., Zhang, B., Mapolelo, D.T., Randeniya, S., Holland, A.A., Johnson, M.K., and Outten, C.E. (2016). The *Escherichia coli* BolA Protein IbaG Forms a Histidine-Ligated [2Fe-2S]-Bridged Complex with Grx4. *Biochemistry* 55, 6869-6879.

Draculic, T., Dawes, I.W., and Grant, C.M. (2000). A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 36, 1167-1174.

Fontecave, M., and Ollagnier-de-Choudens, S. (2008). Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer. *Arch Biochem Biophys* 474, 226-237.

Foury, F., and Roganti, T. (2002). Deletion of the mitochondrial carrier genes *MRS3* and *MRS4* suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain. *J Biol Chem* 277, 24475-24483.

Freibert, S.A., Weiler, B.D., Bill, E., Mühlhoff, U., Lill, R., (2017). Biochemical reconstitution and spectroscopic analysis of iron-sulfur proteins. *Methods Enzymol. Part B*, Vol. 599.

Gao, H., Subramanian, S., Couturier, J., Naik, S.G., Kim, S.K., Leustek, T., Knaff, D.B., Wu, H.C., Vignols, F., Huynh, B.H., *et al.* (2013). Arabidopsis thaliana Nfu2 accommodates [2Fe-2S] or [4Fe-4S] clusters and is competent for in vitro maturation of chloroplast [2Fe-2S] and [4Fe-4S] cluster-containing proteins. *Biochemistry* 52, 6633-6645.

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.

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.

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

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

Goldberg, A.V., Molik, S., Tsaousis, A.D., Neumann, K., Kuhnke, G., Delbac, F., Vivares, C.P., Hirt, R.P., Lill, R., and Embley, T.M. (2008). Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature* 452, 624-628.

Gupta, V., Sendra, M., Naik, S.G., Chahal, H.K., Huynh, B.H., Outten, F.W., Fontecave, M., and Ollagnier de Choudens, S. (2009). Native Escherichia coli SufA, coexpressed with SufBCDSE, purifies as a [2Fe-2S] protein and acts as an Fe-S transporter to Fe-S target enzymes. *J Am Chem Soc* 131, 6149-6153.

Hennessy, D.J., Reid, G.R., Smith, F.E., and Thompson, S.L. (1984). Ferene-a new spectrophotometric reagent for iron. *Can J Chem* 62, 721-724.

Herrero, E., Belli, G., and Casa, C. (2010). Structural and functional diversity of glutaredoxins in yeast. *Current protein & peptide science* 11, 659-668.

Hiltunen, J.K., Autio, K.J., Schonauer, M.S., Kursu, V.A., Dieckmann, C.L., and Kastaniotis, A.J. (2010). Mitochondrial fatty acid synthesis and respiration. *Biochim Biophys Acta* 1797, 1195-1202.

Hjort, K., Goldberg, A.V., Tsaousis, A.D., Hirt, R.P., and Embley, T.M. (2010). Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 365, 713-727.

Hoff, K.G., Cupp-Vickery, J.R., and Vickery, L.E. (2003). Contributions of the LPPVK motif of the iron-sulfur template protein IscU to interactions with the Hsc66-Hsc20 chaperone system. *J Biol Chem* 278, 37582-37589.

Holmgren, A., and Reichard, P. (1967). Thioredoxin 2: cleavage with cyanogen bromide. *Eur J Biochem* 2, 187-196.

Huynen, M.A., Spronk, C.A., Gabaldon, T., and Snel, B. (2005). Combining data from genomes, Y2H and 3D structure indicates that BolA is a reductase interacting with a glutaredoxin. *FEBS letters* 579, 591-596.

Häggglund, P., Bunkenborg, J., Maeda, K., and Svensson, B. (2008). Identification of thioredoxin disulfide targets using a quantitative proteomics approach based on isotope-coded affinity tags. *J Proteome Res* 7, 5270-5276.

Imlay, J.A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 77, 755-776.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-168.

Ito, T., Tashiro, K., Muta, S., Ozawa, R., Chiba, T., Nishizawa, M., Yamamoto, K., Kuhara, S., and Sakaki, Y. (2000). Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1143-1147.

Iwema, T., Picciocchi, A., Traore, D.A., Ferrer, J.L., Chauvat, F., and Jacquamet, L. (2009). Structural basis for delivery of the intact [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>] cluster by monothiol glutaredoxin. *Biochemistry* 48, 6041-6043.

Jensen, L.T., and Culotta, V.C. (2000). Role of *Saccharomyces cerevisiae* ISA1 and ISA2 in iron homeostasis. *Mol Cell Biol* 20, 3918-3927.

Johansson, C., Roos, A.K., Montano, S.J., Sengupta, R., Filippakopoulos, P., Guo, K., von Delft, F., Holmgren, A., Oppermann, U., and Kavanagh, K.L. (2011). The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity. *Biochem J* 433, 303-311.

Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., and Johnson, M.K. (2005a). Structure, function and formation of biological iron-sulfur clusters. *Ann Rev Biochem* 74, 247-281.

Johnson, D.C., Dos Santos, P.C., and Dean, D.R. (2005b). NifU and NifS are required for the maturation of nitrogenase and cannot replace the function of isc-gene products in *Azotobacter vinelandii*. *Biochem Soc Trans* 33, 90-93.

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* 135, 8117-8120.

Kim, K.D., Chung, W.H., Kim, H.J., Lee, K.C., and Roe, J.H. (2010). Monothiol glutaredoxin Grx5 interacts with Fe-S scaffold proteins Isa1 and Isa2 and supports Fe-S

assembly and DNA integrity in mitochondria of fission yeast. *Biochemical and biophysical research communications* 392, 467-472.

Kirschenbaum, D.M. (1975). Molar absorptivity and  $A_{1\%}^{1\text{ cm}}$  values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions. XI. *Anal Biochem* 68, 465-484.

Kirschenbaum, D.M. (1977). Molar absorptivity and  $A_{1\%}^{1\text{ cm}}$  values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions. XIV. *Anal Biochem* 82, 83-100.

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.

Krebs, C., Agar, J.N., Smith, A.D., Frazzon, J., Dean, D.R., Huynh, B.H., and Johnson, M.K. (2001). IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry* 40, 14069-14080.

Kuila, D., Schoonover, J.R., Dyer, R.B., Batie, C.J., Ballou, D.P., Fee, J.A., and Woodruff, W.H. (1992). Resonance Raman studies of Rieske-type proteins. *Biochim Biophys Acta* 1140, 175-183.

Kumanovics, A., Chen, O., Li, L., Bagley, D., Adkins, E., Lin, H., Dingra, N.N., Outten, C.E., Keller, G., Winge, D., *et al.* (2008). Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J Biol Chem* 283, 10276-10286.

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

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.

Lazzarini, R.A., and San Pietro, A. (1962). The reduction of cytochrome c by photosynthetic pyridine nucleotide reductase and transhydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 62, 417-420.

Leon, S., Touraine, B., Ribot, C., Briat, J.F., and Lobreaux, S. (2003). Iron-sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 371, 823-830.

Li, H., Mapolelo, D.T., Dingra, N.N., Keller, G., Riggs-Gelasco, P.J., Winge, D.R., Johnson, M.K., and Outten, C.E. (2011). Histidine 103 in Fra2 is an iron-sulfur cluster ligand in the [2Fe-2S] Fra2-Grx3 complex and is required for in vivo iron signaling in yeast. *J Biol Chem* 286, 867-876.

Li, H., Mapolelo, D.T., Dingra, N.N., Naik, S.G., Lees, N.S., Hoffman, B.M., Riggs-Gelasco, P.J., Huynh, B.H., Johnson, M.K., and Outten, C.E. (2009). The yeast iron regulatory

proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation. *Biochemistry* 48, 9569-9581.

Li, J., Saxena, S., Pain, D., and Dancis, A. (2001). Adrenodoxin reductase homolog (Arh1p) of yeast mitochondria required for iron homeostasis. *J Biol Chem* 276, 1503-1509.

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

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

Lill, R., Dutkiewicz, R., Elsässer, H.P., Hausmann, A., Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Stehling, O., Urzica, E., and Mühlenhoff, U. (2006). Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* 1763, 652-667.

Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A.J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M.A., Webert, H., Wilbrecht, C., and Mühlenhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1823, 1491-1508.

Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem* 77, 669-700.

Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2005). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 30, 133-141.

Lill, R., Nargang, F.E., and Neupert, W. (1996). Biogenesis of mitochondrial proteins. *Curr Opin Cell Biol* 8, 505-512.

Lin, C.N., Syu, W.J., Sun, W.S., Chen, J.W., Chen, T.H., Don, M.J., and Wang, S.H. (2010). A role of ygfZ in the Escherichia coli response to plumbagin challenge. *J Biomed Sci* 17, 84.

Lu, J., Bitoun, J.P., Tan, G., Wang, W., Min, W., and Ding, H. (2010). Iron-binding activity of human iron-sulfur cluster assembly protein hIscA1. *The Biochemical journal* 428, 125-131.

Lu, J., Yang, J., Tan, G., and Ding, H. (2008). Complementary roles of SufA and IscA in the biogenesis of iron-sulfur clusters in Escherichia coli. *Biochem J* 409, 535-543.

Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I.W., and Grant, C.M. (1998). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* 9, 1081-1091.

Mach, H., Middaugh, C.R., and Lewis, R.V. (1992). Detection of proteins and phenol in DNA samples with second-derivative absorption spectroscopy. *Anal Biochem* 200, 20-26.

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. *The Journal of biological chemistry* 288, 29134-29142.

Malkin, R., and Rabinowitz, J.C. (1966). The reconstitution of clostridial ferredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* *23*, 822-827.

Mapolelo, D.T., Zhang, B., Naik, S.G., Huynh, B.H., and Johnson, M.K. (2012). Spectroscopic and Functional Characterization of Iron-Bound Forms of *Azotobacter vinelandii*(Nif)IscA. *Biochemistry* *51*, 8056-8070.

Mapolelo, D.T., Zhang, B., Randeniya, S., Albetel, A.N., Li, H., Couturier, J., Outten, C.E., Rouhier, N., and Johnson, M.K. (2013). Monothiol glutaredoxins and A-type proteins: partners in Fe-S cluster trafficking. *Dalton transactions* *42*, 3107-3115.

McCarthy, E.L., and Booker, S.J. (2017). Destruction and reformation of an iron-sulfur cluster during catalysis by lipoyl synthase. *Science* *358*, 373-377.

Meinhardt, S.W., Kula, T., Yagi, T., Lillich, T., and Ohnishi, T. (1987). EPR characterization of the iron-sulfur clusters in the NADH: ubiquinone oxidoreductase segment of the respiratory chain in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem* *262*, 9147-9153.

Melber, A., Na, U., Vashisht, A., Weiler, B.D., Lill, R., Wohlschlegel, J.A., and Winge, D.R. (2016). Role of Nfu1 and Bol3 in iron-sulfur cluster transfer to mitochondrial clients. *Elife* *5*.

Meyer, J. (2008). Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *J Biol Inorg Chem* *13*, 157-170.

Meyer, Y., Buchanan, B.B., Vignols, F., and Reichheld, J.P. (2009). Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annu Rev Genet* *43*, 335-367.

Miroux, B., and Walker, J.E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of molecular biology* *260*, 289-298.

Morimoto, K., Yamashita, E., Kondou, Y., Lee, S.J., Arisaka, F., Tsukihara, T., and Nakai, M. (2006). The asymmetric IscA homodimer with an exposed [2Fe-2S] cluster suggests the structural basis of the Fe-S cluster biosynthetic scaffold. *J Mol Biol* *360*, 117-132.

Mortenson, L.E., Mower, H.F., and Carnahan, J.E. (1962). III. NITROGEN FIXATION BY ENZYME PREPARATIONS. *Bacteriol Rev* *26*, 42-50.

Moulis, J.M., Davasse, V., Golinelli, M.P., Meyer, J., and Quinkal, I. (1996). The coordination sphere of iron-sulfur clusters: lessons from site-directed mutagenesis experiments. *J Bioinorg Chem* *1*, 2-14.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *51 Pt 1*, 263-273.

Mühlenhoff, U., Balk, J., Richhardt, N., Kaiser, J.T., Sipos, K., Kispal, G., and Lill, R. (2004). Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *279*, 36906-36915.

Mühlenhoff, 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., Gerl, M.J., Flauger, B., Pirner, H.M., Balsler, S., Richhardt, N., Lill, R., and Stolz, J. (2007). The ISC proteins Isa1 and Isa2 are required for the function but not for the *de novo* synthesis of the Fe/S clusters of biotin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 6, 495-504.

Mühlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J.R., Uzarska, M.A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E., *et al.* (2010). Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab* 12, 373-385.

Mühlenhoff, U., Richhardt, N., Gerber, J., and Lill, R. (2002). Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria: A requirement for ATP, NADH and reduced iron. *J Biol Chem* 277, 29810-29816.

Mühlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A.J., and Lill, R. (2011). Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *The Journal of biological chemistry* 286, 41205-41216.

Mühlenhoff, U., Stadler, J., Richhardt, N., Seubert, A., Eickhorst, T., Schweyen, R.J., Lill, R., and Wiesenberger, G. (2003b). A specific role of the yeast mitochondrial carriers Mrs3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions. *J Biol Chem* 278, 40612-40620.

Nasta, V., Giachetti, A., Ciofi-Baffoni, S., and Banci, L. (2017). Structural insights into the molecular function of human [2Fe-2S] BOLA1-GRX5 and [2Fe-2S] BOLA3-GRX5 complexes. *Biochim Biophys Acta* 1861, 2119-2131.

Navarro-Sastre, A., Tort, F., Stehling, O., Uzarska, M.A., Arranz, J.A., Del Toro, M., Labayru, M.T., Landa, J., Font, A., Garcia-Villoria, J., *et al.* (2011). A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *American journal of human genetics* 89, 656-667.

Nishio, K., and Nakai, M. (2000). Transfer of iron-sulfur cluster from NifU to apoferredoxin. *J Biol Chem* 275, 22615-22618.

Nordin, A., Larsson, E., and Holmberg, M. (2012). The defective splicing caused by the ISCU intron mutation in patients with myopathy with lactic acidosis is repressed by PTBP1 but can be derepressed by IGF2BP1. *Human mutation* 33, 467-470.

Ojeda, L., Keller, G., Muhlenhoff, U., Rutherford, J.C., Lill, R., and Winge, D.R. (2006). Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281, 17661-17669.

Picciochi, A., Saguez, C., Boussac, A., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2007). CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry* *46*, 15018-15026.

Pierik, A.J., Netz, D.J.A., and Lill, R. (2009). Analysis of iron-sulfur protein maturation in eukaryotes. *Nat Protoc* *4*, 753-766.

Porath, J., and Flodin, P. (1959). Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature* *183*, 1657-1659.

Py, B., and Barras, F. (2010). Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nat Rev Microbiol* *8*, 436-446.

Rada, P., Smid, O., Sutak, R., Dolezal, P., Pyrih, J., Zarsky, V., Montagne, J.J., Hrdy, I., Camadro, J.M., and Tachezy, J. (2009). The monothiol single-domain glutaredoxin is conserved in the highly reduced mitochondria of *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell* *8*, 1584-1591.

Raulfs, E.C., O'Carroll, I.P., Dos Santos, P.C., Unciuleac, M.C., and Dean, D.R. (2008). In vivo iron-sulfur cluster formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 8591-8596.

Roche, B., Aussel, L., Ezraty, B., Mandin, P., Py, B., and Barras, F. (2013). Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. *Biochimica et biophysica acta* *1827*, 455-469.

Rodriguez-Manzanaque, M.T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A., and Herrero, E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *19*, 8180-8190.

Rodriguez-Manzanaque, M.T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J., and Herrero, E. (2002). Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell* *13*, 1109-1121.

Romão, M.J., Archer, M., Moura, I., Moura, J.J., LeGall, J., Engh, R., Schneider, M., Hof, P., and Huber, R. (1995). Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxidoreductase from *D. gigas*. *Science* *270*, 1170-1176.

Roret, T., Tsan, P., Couturier, J., Zhang, B., Johnson, M.K., Rouhier, N., and Didierjean, C. (2014). Structural and spectroscopic insights into BolA-glutaredoxin complexes. *The Journal of biological chemistry* *289*, 24588-24598.

Rouault, T.A. (2012). Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Disease models & mechanisms* *5*, 155-164.

Rouhier, N. (2010). Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly. *New Phytol* *186*, 365-372.

Rouhier, N., Unno, H., Bandyopadhyay, S., Masip, L., Kim, S.K., Hirasawa, M., Gualberto, J.M., Lattard, V., Kusunoki, M., Knaff, D.B., *et al.* (2007). Functional, structural, and

spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7379-7384.

Rudolf, J., Makrantonis, V., Ingledew, W.J., Stark, M.J., and White, M.F. (2006). The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Mol Cell* 23, 801-808.

Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H., and Craig, E. (1999). Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 10206-10211.

Schmucker, S., Martelli, A., Colin, F., Page, A., Wattenhofer-Donze, M., Reutenauer, L., and Puccio, H. (2011). Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PloS one* 6, e16199.

Schwartz, C.J., Giel, J.L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F.J., Beinert, H., and Kiley, P.J. (2001). IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14895-14900.

Sen, S., Bonfio, C., Mansy, S.S., and Cowan, J.A. (2018). Investigation of glutathione-derived electrostatic and hydrogen-bonding interactions and their role in defining Grx5 [2Fe-2S] cluster optical spectra and transfer chemistry. *J Biol Inorg Chem* 23, 241-252.

Shakamuri, P., Zhang, B., and Johnson, M.K. (2012). Monothiol glutaredoxins function in storing and transporting [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>] clusters assembled on IscU scaffold proteins. *Journal of the American Chemical Society* 134, 15213-15216.

Shan, Y., and Cortopassi, G. (2012). HSC20 interacts with frataxin and is involved in iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Human molecular genetics* 21, 1457-1469.

Shan, Y., Napoli, E., and Cortopassi, G. (2007). Mitochondrial frataxin interacts with ISD11 of the NFS1/ISCU complex and multiple mitochondrial chaperones. *Hum Mol Genet* 16, 929-941.

Sheftel, A.D., Wilbrecht, C., Stehling, O., Niggemeyer, B., Elsasser, H.P., Muhlenhoff, U., and Lill, R. (2012a). The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. *Mol Biol Cell* 23, 1157-1166.

Sheftel, A.D., Wilbrecht, C., Stehling, O., Niggemeyer, B., Elsasser, H.P., Mühlenhoff, U., and Lill, R. (2012b). The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. *Mol Biol Cell* 23, 1157-1166.

Shenton, D., and Grant, C.M. (2003). Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 374, 513-519.

Shi, Y., Ghosh, M., Kovtunovych, G., Crooks, D.R., and Rouault, T.A. (2012). Both human ferredoxins 1 and 2 and ferredoxin reductase are important for iron-sulfur cluster biogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 484-492.

Shiflett, A.M., and Johnson, P.J. (2010). Mitochondrion-related organelles in eukaryotic protists. *Annual review of microbiology* 64, 409-429.

Smith, A.D., Jameson, G.N., Dos Santos, P.C., Agar, J.N., Naik, S., Krebs, C., Frazzon, J., Dean, D.R., Huynh, B.H., and Johnson, M.K. (2005). NifS-mediated assembly of [4Fe-4S] clusters in the N- and C-terminal domains of the NifU scaffold protein. *Biochemistry* 44, 12955-12969.

Song, D., Tu, Z., and Lee, F.S. (2009). Human ISCA1 interacts with IOP1/NARFL and functions in both cytosolic and mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem* 284, 35297-35307.

Spiegel, R., Saada, A., Halvardson, J., Soiferman, D., Shaag, A., Edvardson, S., Horovitz, Y., Khayat, M., Shalev, S.A., Feuk, L., *et al.* (2013). Deleterious mutation in FDX1L gene is associated with a novel mitochondrial muscle myopathy. *European journal of human genetics* 22, 902-906.

Spratt, B.G. (1980). Deletion of the penicillin-binding protein 5 gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 144, 1190-1192.

Stehling, O., Wilbrecht, C., and Lill, R. (2014). Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* 100, 61-77.

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.

Takahashi, Y., and Nakamura, M. (1999). Functional assignment of the ORF2-*iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx*-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *J Biochem* 126, 917-926.

Takeda, M., Vassarotti, A., and Douglas, M.G. (1985). Nuclear genes coding for the yeast mitochondrial adenosine triphosphatase complex: primary structure analysis of the *atp2* encoding F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$ -subunit precursor. *J Biol Chem* 260, 15458-15465.

Tan, G., Lu, J., Bitoun, J.P., Huang, H., and Ding, H. (2009). IscA/SufA paralogues are required for the [4Fe-4S] cluster assembly in enzymes of multiple physiological pathways in *Escherichia coli* under aerobic growth conditions. *The Biochemical journal* 420, 463-472.

Tepljakov, A., Obmolova, G., Sarikaya, E., Pullalarevu, S., Krajewski, W., Galkin, A., Howard, A.J., Herzberg, O., and Gilliland, G.L. (2004). Crystal structure of the YgfZ protein from *Escherichia coli* suggests a folate-dependent regulatory role in one-carbon metabolism. *J Bacteriol* 186, 7134-7140.

Tong, W.H., Jameson, G.N., Huynh, B.H., and Rouault, T.A. (2003). Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9762-9767.

Touraine, B., Boutin, J.P., Marion-Poll, A., Briat, J.F., Peltier, G., and Lobreaux, S. (2004). Nfu2: a scaffold protein required for [4Fe-4S] and ferredoxin iron-sulphur cluster assembly in Arabidopsis chloroplasts. *Plant J* 40, 101-111.

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.

Tovar, J., Leon-Avila, G., Sanchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., Van Der Giezen, M., Hernandez, M., Muller, M., and Lucocq, J.M. (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426, 172-176.

Uhrigshardt, H., Singh, A., Kovtunovych, G., Ghosh, M., and Rouault, T.A. (2010). Characterization of the human HSC20, an unusual DnaJ type III protein, involved in iron-sulfur cluster biogenesis. *Human molecular genetics* 19, 3816-3834.

Uzarska, M.A., Dutkiewicz, R., Freibert, S.A., Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2013). The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Molecular biology of the cell* 24, 1830-1841.

Uzarska, M.A., Nasta, V., Weiler, B.D., Spantgar, F., Ciofi-Baffoni, S., Saviello, M.R., Gonnelli, L., Mühlenhoff, U., Banci, L., and Lill, R. (2016). Mitochondrial Bol1 and Bol3 function as assembly factors for specific iron-sulfur proteins. *Elife* 5.

Vickery, L.E., and Cupp-Vickery, J.R. (2007). Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42, 95-111.

Vinella, D., Brochier-Armanet, C., Loiseau, L., Talla, E., and Barras, F. (2009). Iron-sulfur (Fe/S) protein biogenesis: phylogenomic and genetic studies of A-type carriers. *PLoS Genet* 5, e1000497.

Wang, L., Ren, X., Li, Y., Rouhier, N., Jacquot, J.P., Jin, C., and Xia, B. (2011). <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N resonance assignments of reduced GrxS14 from *Populus tremula* × *tremuloides*. *Biomol NMR Assign* 5, 121-124.

Wang, T., and Craig, E.A. (2008). Binding of yeast frataxin to the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu. *J Biol Chem* 283, 12674-12679.

Wang, W., Huang, H., Tan, G., Si, F., Liu, M., Landry, A.P., Lu, J., and Ding, H. (2010). In vivo evidence for the iron-binding activity of an iron-sulfur cluster assembly protein IscA in *Escherichia coli*. *The Biochemical journal* 432, 429-436.

Webert, H., Freibert, S.A., Gallo, A., Heidenreich, T., Linne, U., Amlacher, S., Hurt, E., Mühlhoff, 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.

Wesley, N.A., Wachnowsky, C., Fidai, I., and Cowan, J.A. (2017). Understanding the molecular basis for multiple mitochondrial dysfunctions syndrome 1 (MMDS1): impact of a disease-causing Gly189Arg substitution on NFU1. *FEBS J* 284, 3838-3848.

Wiedemann, N., Urzica, E., Guiard, B., Muller, H., Lohaus, C., Meyer, H.E., Ryan, M.T., Meisinger, C., Muhlenhoff, 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.

Willems, P., Wanschers, B.F., Esseling, J., Szklarczyk, R., Kudla, U., Duarte, I., Forkink, M., Nootboom, M., Swarts, H., Gloerich, J., *et al.* (2013). BOLA1 is an aerobic protein that prevents mitochondrial morphology changes induced by glutathione depletion. *Antioxidants & redox signaling* 18, 129-138.

Wingert, R.A., Galloway, J.L., Barut, B., Foott, H., Fraenkel, P., Axe, J.L., Weber, G.J., Dooley, K., Davidson, A.J., Schmid, B., *et al.* (2005). Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* 436, 1035-1039.

Wollenberg, M., Berndt, C., Bill, E., Schwenn, J.D., and Seidler, A. (2003). A dimer of the FeS cluster biosynthesis protein IscA from cyanobacteria binds a [2Fe2S] cluster between two protomers and transfers it to [2Fe2S] and [4Fe4S] apo proteins. *Eur J Biochem* 270, 1662-1671.

Xia, T.H., Bushweller, J.H., Sodano, P., Billeter, M., Björnberg, O., Holmgren, A., and Wüthrich, K. (1992). NMR structure of oxidized *Escherichia coli* glutaredoxin: comparison with reduced *E. coli* glutaredoxin and functionally related proteins. *Protein Sci* 1, 310-321.

Xu, X.M., and Moller, S.G. (2008). Iron-sulfur cluster biogenesis systems and their crosstalk. *Chembiochem* 9, 2355-2362.

Yabe, T., Morimoto, K., Kikuchi, S., Nishio, K., Terashima, I., and Nakai, M. (2004). The *Arabidopsis* chloroplastic NifU-like protein CnfU, which can act as an iron-sulfur cluster scaffold protein, is required for biogenesis of ferredoxin and photosystem I. *Plant Cell* 16, 993-1007.

Ye, H., Jeong, S.Y., Ghosh, M.C., Kovtunovych, G., Silvestri, L., Ortillo, D., Uchida, N., Tisdale, J., Camaschella, C., and Rouault, T.A. (2010). Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. *J Clin Invest* 120, 1749-1761.

Yeung, N., Gold, B., Liu, N.L., Prathapam, R., Sterling, H.J., Williams, E.R., and Butland, G. (2011). The *E. coli* monothiol glutaredoxin GrxD forms homodimeric and heterodimeric FeS cluster containing complexes. *Biochemistry* 50, 8957-8969.

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.

Yuvaniyama, P., Agar, J.N., Cash, V.L., Johnson, M.K., and Dean, D.R. (2000). NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 599-604.

Zhang, Y., Lyver, E.R., Knight, S.A., Pain, D., Lesuisse, E., and Dancis, A. (2006). Mrs3p, Mrs4p, and frataxin provide iron for Fe-S cluster synthesis in mitochondria. *J Biol Chem* 281, 22493-22502.

Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H., and Dean, D.R. (1998). Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* 273, 13264-13272.

## 10 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Auel, Bröring, Dehnen, Essen, Germano, Geyer, Greiner, Hampp, Harbrecht, Hilt, Hänisch von, Kerber, Koert, Korn, Lingenfelder, Marahiel, Meggers, Miethke, Motzkus, Pilgrim, Roling, Schwee, Seubert, Sundermeyer, Tallarek, Voigt, Weitzel, Zhang

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Danken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben:

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Roland Lill, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit mit einer interessanten und herausfordernden Themenstellung in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und mich während der gesamten Zeit mit seinem Rat unterstützt hat. Für das entgegengebrachte Vertrauen möchte ich mich bedanken.

Dem Korreferenten danke ich für die Bereitschaft meine Arbeit zu begutachten.

Ein großer Dank geht an unseren Laborleiter Prof. Dr. Ulrich Mühlenhoff. Unsere vielen wissenschaftlichen Diskussionen und Gespräche haben immer wieder neue Richtungen für diese Arbeit gelegt. Er stand mir während der gesamten Zeit mit Rat und Tat zur Seite.

Besonderer Dank gilt auch dem gesamten Institut für Zytobiologie, insbesondere der AG Lill. Danke für die angenehme Zusammenarbeit im Labor, sowie die stete Hilfsbereitschaft.

Ich danke auch allen Kollaborationspartnern, insbesondere der AG Bange, die mir stets mit ihrem Fachwissen bzgl. Kristallisationen zur Seite standen.

Der DFG danke ich für die Finanzierung während der Entstehungszeit dieser Arbeit und die Möglichkeit meine Ergebnisse auf Tagungen und Konferenzen sowohl im Inland als auch Ausland zu präsentieren.

Auch meinen Freunden, insbesondere Fabian Geissler, Philipp Frey und Raphael Rechholz sowie den „Liga-Jungs“ vom Tria-Team Bruchköbel danke ich für die gute Freundschaft und für das richtige Maß an Ablenkung von der Wissenschaft.

Meiner Freundin, Elisabeth Maiwald, danke ich besonders für ihre Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit und die Unterstützung fernab vom Laboralltag. Danke, dass du immer da warst!

Abschließend möchte ich vor allem noch meinen Eltern, Oliver und Ute Weiler danken, die mich immer auf all meinen Wegen unterstützen und mir somit alles erst ermöglicht haben. Danke für alles!

