Untersuchungen zur Biogenese von Eisen-Schwefel Proteinen und zur Eisenhomeostase am Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation

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

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität-Marburg

vorgelegt von

Anja Hausmann
aus Herne

Marburg, August 2006

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am

Erstgutachter: Prof. Dr. Roland Lill
Zweitgutachter: Prof. Dr. Uwe Maier

Tag der mündlichen Prüfung: 8.11.2006

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe. Die Versicherung schließt Zeichnungen und Skizzen mit ein.
Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient. Teile dieser Arbeit sind bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht.

Marburg, 28. August 2006

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis 6
2. Zusammenfassung 8
3. Einleitung 11
3.1. Eisen und seine physiologische Relevanz 11
3.2. Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von Eisen in *Saccaromyces cerevisiae* 11
3.2.1. Die Aufnahme von freiem Eisen 11
3.2.2. Siderophor-vermittelte Eisenaufnahme 12
3.3. Struktur und intrazelluläre Lokalisierung von Fe/S Proteinen 14
3.4. Funktionen von Fe/S Proteinen 15
3.4.1. Fe/S Cluster in Redoxprozessen 15
3.4.2. Die Rolle der Fe/S Cluster bei der Katalyse chemischer Reaktionen 16
3.4.3. Fe/S Cluster als Regulatoren der Genexpression 16
3.5. Die Biogenese von Fe/S Proteinen in Bakterien 18
3.6. Die Biogenese von Fe/S Proteinen in *S. cerevisiae* 21
3.6.1. Die Biogenese extra-mitochondrialer Fe/S Proteine 25
3.7. Die Regulation der Eisenhomeostase in *S. cerevisiae* 28
3.8. Aufgabenstellung und Zielsetzung 29
4. Material und Methoden 31
4.1. *Escherichia coli* Stämme 31
4.2. *Saccharomyces cerevisiae* Stämme 31
4.3. Kultivierung von *E. coli* 32
4.4. Kultivierung von *S. cerevisiae* 32
4.5. Puffer 33
4.6. Oligonukleotide 33
4.7. Verwendete Vektoren 34
4.7.1. *E. coli* Plasmide 34
4.8. *S. cerevisiae* Plasmide 35
4.9. Konstruktion verschiedener Stämme und Plasmide 36
4.9.1. Gal-NBP35 Zellen 36
4.9.2. Gal-HEM15 Zellen 36
4.9.3. Disruption des Hefe-Gens *HMX1* 37

4.9.4. Plasmid p426NBP35-TAP zur Expression eines TAP-markierten Nbp35p 37
4.9.5. Plasmid p426Δ1-52NBP35-TAP 37
4.9.6. Plasmid p426NBP35-Strep 37
4.9.7. Plasmid pET15B-HIS-NBP35 38
4.10. Rekombinante DNA-Techniken 38
4.10.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* 38
4.10.2. Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae* 38
4.11. Reinigung und Analyse von DNA 39
4.11.1. Phenol-Chloroform Extraktion 39
4.11.2. Ethanol-Fällung 39
4.11.3. Agarose-Gelelektrophorese 40
4.11.4. DNA Extraktion aus Agarose-Gelen 40
4.11.5. Polymerasekettenreaktion (PCR) 40
4.11.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 41
4.11.7. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen 41
4.11.8. Ligation von DNA-Fragmenten 42
4.11.9. Transformation von *E. coli* mit rekombinanter DNA 42
4.11.10. Transformation von Hefe mit rekombinanter DNA 42
4.12. RNA-Techniken 43
4.12.1. Herstellung RNase-freier Geräte und Lösungen 43
4.12.2. Extraktion von Gesamt-RNA aus *S. cerevisiae* 43
4.12.3. RNA Konzentrierung mit Natriumacetat 43
4.13. Northern Blot Analyse 44
4.13.1. Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarose-Gelen 44
4.13.2. RNA Transfer auf Nylonmembranen 44
4.13.3. Methylenblau-Färbung von RNA 45
4.13.4. Herstellung von ^{32}P markierten DNA Sonden 45
4.13.5. RNA/DNA Hybridisierung 45
4.13.6. Entfernung hybridisierter Sonden 46
4.14. Bearbeitung von *S. cerevisiae* cDNA-Microarrays 46
4.14.1. Herstellung Cy3- und Cy5 markierter cDNA 46
4.14.2. Hybridisierung der Microarrays 46
4.14.3. Microarray Daten-Analyse 47
4.15. Zellbiologische und biochemische Methoden 48

4.15.1. Fluoreszenzmikroskopie 48
4.15.2. Isolierung von intakten Mitochondrien und post-mitochondrialen Überstand (PMS) aus *S. cerevisiae* 50
4.15.3. Enzymaktivitäten mitochondrialer Proteine 51
4.15.4. Enzymaktivitäten cytosolischer Proteine 54
4.15.5. Bestimmung des Eisengehalts in Mitochondrien 55
4.15.6. Bestimmung der Eisenaufnahme und der de novo Fe/S Cluster-Biosynthese mittels ^{55}Fe-Eisenchlorid Markierung 56
4.15.7. Messung des Häm-Gehalts mittels ^{55}Fe-Eisenchlorid Markierung 57
4.16. Proteinbiochemische Methoden 57
4.16.1. Überexpression und Reinigung von Nbp35p-His 57
4.16.2. Bestimmung der Proteinkonzentration 58
4.16.3. TCA-Fällung von Proteinen 59
4.16.4. SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 59
4.16.5. Färben von Proteinen mit Coomassie Brilliant-Blue 59
4.16.6. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western Blot) 60
4.16.7. Immundetektion 60
4.16.8. Kopplung des Antiserums an Protein-A-Sepharose 61
4.17. Promotorstudien 61
4.17.1. GFP-Reporter Assay 61
4.17.2. Luciferase-Reporter Assay 62
4.18. Laborgeräte 62
4.19. Chemikalien 63
5. Ergebnisse 65
5.1. Nbp35p bindet einen Fe/S Cluster *in vivo* 65
5.1.1. Nbp35-TAP bindet Eisen *in vivo* 65
5.1.2. Die mitochondriale ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie ist für die Reifung von Nbp35p essentiell 67
5.1.3. Analyse des rekombinanten Nbp35p 71
5.2. Nbp35p ist an der Reifung cytosolischer und nukleärer Fe/S Proteine beteiligt 73
5.2.1. Die Depletion von Nbp35p führt zu einem Wachstumsdefekt 73
5.2.2. Nbp35p ist im Cytosol und Kern lokalisiert 75
5.2.3. Nbp35p kann Cfd1p nicht funktionell ersetzen 77

5.2.4. Nbp35p wird für die Reifung des cytosolischen Fe/S Proteins Leu1p benötigt 79
5.2.5. Nbp35p ist an der Reifung kernlokalisierter Fe/S Proteine beteiligt 82
5.2.6. Nbp35p ist nicht an der Reifung mitochondrialer Fe/S Proteine beteiligt 83
5.3. Transkriptom-Analysen in *S. cerevisiae* 85
5.3.1. Die Depletion von Nbp35p resultiert in einer schwachen Veränderung der Genexpression 86
5.3.2. Veränderte Genexpression durch Depletion von Atm1p und Yah1p ... 90
5.3.3. Der Einfluss des Wachstumsmediums auf die Genexpression Atm1p-depletierter Zellen 97
5.3.4. Die Reprimierung von Genen der Atmungskette in Yah1p- und Atm1p-depletierten Zellen wird durch einen Defekt der Atmung und durch Eisenmangel hervorgerufen 100
5.3.5. Die Induktion von *FET3* in Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen ist auf einen Eisenmangel zurückzuführen 104
5.3.6. Eisenmangel und die Depletion von Yah1p und Atm1p resultieren in ähnlichen Expressionsmustern 105
5.4. Atm1p- und Yah1p-depletierte Zellen besitzen einen Häm-Synthesedefekt 108
5.4.1. Die Depletion von Atm1p und Yah1p führt zu einem Aktivitätsverlust von Proteinen mit Häm-Cofaktoren 108
5.4.2. Atm1p- und Yah1p-depletierte Zellen besitzen weniger Häm 110
5.4.3. Atm1p- und Yah1p-depletierte Zellen besitzen eine verminderte Ferrochelatase Aktivität 111
5.4.4. Die Verminderung der Ferrochelatase Aktivität etabliert den geringeren zellulären Gehalt an Häm 111
5.4.5. Der reduzierte Häm-Gehalt ist nicht auf die Aktivität der Häm-Oxygenase Hmx1p zurückzuführen 113
6. Diskussion 117
6.1. Die CIA-Maschinerie wird für die Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen benötigt 117
6.1.1. Nbp35p ist ein Fe/S Protein 117
6.1.2. Nbp35p ist eine Komponente der CIA-Maschinerie 118
6.1.3. Die Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen 119

6.1.4. Die Biogenese nukleärer Fe/S Proteine 122
6.1.5. Die Biogenese cytosolischer Fe/S Proteine als essentielle Funktion der Mitochondrien 124
6.2. Transkriptom-Analysen in *Saccharomyces cerevisiae* 126
6.2.1. Die Regulation der Eisenhomeostase wird nicht durch ein cytosolisches Fe/S Protein vermittelt 126
6.2.2. *ISC* Mutanten besitzen ein charakteristisches Expressionsmuster ... 128
6.2.3. Der Status der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie ist zentral an der Regulation der zellulären Eisenhomeostase beteiligt 129
6.2.4. Mechanismen der Genregulation in Yah1p- und Atm1p-depletierten Zellen 131
6.2.5. Aktivierung des „retrograde response“ in Yah1p-depletierten Zellen 134
6.2.6. Yah1p und Atm1p-depletierte Zellen besitzen eine eingeschränkte Ferrochelatase Aktivität 137
6.2.7. Die ISC-Assemblierungsmaschinerie ist auch in höheren Eukaryoten an der Regulation der Eisenhomeostase beteiligt 138
7. Literatur 140
8. Publikationen 151
9. Lebenslauf 152

1. Abkürzungsverzeichnis

ε	Molarer Extinktionskoeffizient
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Codierende DNA
CIA	Cytosolic iron-sulfur protein assembly
Cpm	Counts per minute
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DAF	5´ Deazaflavin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
FAD/FMN	Flavin-Adenin-Dinucleotid/Flavin-Mononucleotid
Fe/S	Eisen-Schwefel
GSH	Glutathion, reduziert
HA	Hämagglutinin
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactosid
ISC	Eisen-Schwefel Cluster
MCS	Multiple cloning site
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert
N-Terminus	Aminoterminus
OD_{600}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ= 600 nm
p.a.	pro analysi = analysenrein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol

PMS	Post-mitochondrialer Überstand
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPIX	Protoporphyrin IX
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SC	Minimalmedium („synthetic complete medium“)
SDS	Natriumdodecylsufat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSC	Salin sodium citrat
TAP	Tandem affinity purification
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	*N,N,N´,N´,*-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
w.E.	willkürliche Einheiten
X*g*	x-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
ZNG	Zellnassgewicht

2. Zusammenfassung

Eisen-Schwefel- (Fe/S) Cluster sind anorganische Cofaktoren zahlreicher Proteine und ubiquitär in allen Organismen zu finden. Fe/S Proteine übernehmen wichtige Aufgaben beim Elektronentransport, in der Genregulation und in Enzymkatalysen. In Eukaryoten wird die Reifung dieser Proteine von drei komplexen Maschinerien übernommen. Die in der mitochondrialen Matrix lokalisierte ISC- (iron-sulfur cluster) Assemblierungsmaschinerie ist an der Reifung mitochondrialer, cytosolischer und nukleärer Fe/S Proteine beteiligt. Demgegenüber übernehmen die mitochondriale ISC-Export- und die cytosolische CIA- (cytosolic iron-sulfur protein assembly) Maschinerie eine spezifische Funktion in der Reifung cytosolischer und nukleärer Fe/S Proteine. In den letzten vier Jahren wurden insgesamt sechs Proteine (Nbp35p, Cfd1p, Nar1p, Cia1p, Cia2p und Met18) der CIA-Maschinerie identifiziert. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte die essentielle P-Loop NTPase Nbp35p aus *Saccharomyces cerevisiae* als zweite Komponente der CIA-Maschinerie nachgewiesen werden. Nbp35p ist hauptsächlich im Cytosol, aber in geringer Menge auch im Zellkern lokalisiert. Die Depletion von Nbp35p durch regulierte Genexpression in einer Hefemutante führte zur verminderten Aktivität des cytosolischen Fe/S Proteins Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p), während mitochondriale Fe/S Proteine (z.B. Aconitase) nicht beeinflusst wurden. Starke Defekte in der *de novo* Reifung von cytosolischen und nukleären Fe/S Proteinen belegten die spezifische Beteiligung von Nbp35p an der Biogenese von cytosolischen und nukleären, nicht aber von mitochondrialen Fe/S Proteinen. Nbp35p besitzt eine hohe Sequenzhomologie zu Cfd1p, mit dem es *in vivo* und *in vitro* einen Komplex bildet, der aus je zwei Nbp35p und Cfd1p Dimeren besteht. Nbp35p bindet am N-Terminus einen [4Fe-4S] Cluster, der durch vier essentielle und konservierte Cysteinreste koordiniert wird und zu dessen Assemblierung die ISC- und CIA-Maschinerien benötigt werden. Demzufolge ist Nbp35p auch an seiner eigenen Reifung beteiligt. Die Identifizierung einer Rolle des Nbp35p in der Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen eröffnet jetzt weitere biochemische Untersuchungen zur Bestimmung seiner molekularen Funktion.

Die gestörte Biogenese von Fe/S Proteinen hat eine erhöhte Eisenakkumulation in den Mitochondrien sowie die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Aft1p/Aft2p, den Hauptregulatoren der Eisenhomeostase in Hefe zur Folge. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sind diese Auswirkungen auf Defekte in den beiden

mitochondrialen ISC-Maschinerien, nicht aber in der cytosolischen CIA-Maschinerie, zurückzuführen. Im zweiten Teil der Arbeit wurden deshalb die genom-weiten Auswirkungen von Depletionen der drei Fe/S Protein-Assemblierungsmaschinerien durch Transkriptom-Analysen untersucht, um vergleichende Einblicke in die Konsequenzen funktioneller Defekte der Fe/S Protein-Biogenese zu erhalten. Dazu wurden konditionale Hefe-Mutanten verwendet, in denen das Ferredoxin Yah1p (ISC-Assemblierung), der ABC-Transporter Atm1p (ISC-Export) oder die P-Loop NTPase Nbp35p (CIA) als repräsentative Mitglieder der drei Biogenese-Maschinerien depletiert wurden. Die Transkriptionsprofile von Nbp35p-depletierten Zellen zeigten nur wenige differentiell exprimierte Gene. Keines dieser Gene weist auf eine Verbindung zur Eisenhomeostase hin. Aus diesen Daten wird erkennbar, dass die CIA-Maschinerie überraschenderweise keinen Einfluss auf die Eisenhomeostase ausübt. Somit wurde eine frühere Hypothese widerlegt, nach der die Eisenhomeostase über ein cytosolisches Fe/S Protein vermittelt wird.

Die Depletion von Atm1p und Yah1p ist dagegen mit einer umfassenden sowie weitgehend überlappenden Änderung des Genexpressionsmusters verbunden, welches u.a. die Induktion Aft1p/Aft2p-abhängiger Gene und die Reprimierung von Genen, die für Komponenten der mitochondrialen Atmungskette kodieren, beinhaltet. Weitere transkriptionelle Veränderungen betrafen die Ergosterol- und Biotin-Synthese, den Aminosäurestoffwechsel sowie Gene, die für Proteine der Synthese oder des Abbaus von Häm oder für Häm-haltige Proteine kodieren. Insgesamt ähneln die Transkriptionsprofile Atm1p- und Yah1p-depletierter Zellen dem einer Eisen-depletierten Zelle. Unterstützt wurden diese Beobachtungen durch Promotoranalysen und Northern Blots an ausgewählten Eisen-abhängigen Genen, wie beispielsweise *ERG3* (Ergosterol-Biosynthese), *BIO2* (Biotin-Synthese) und *HEM15* (Häm-Biosynthese). Demnach signalisiert die Depletion von Yah1p und Atm1p und damit die reduzierte Synthese von zellulären Fe/S Proteinen offensichtlich der Zelle einen Eisenmangel. Die Daten legen nahe, dass die Mitochondrien als Orte der Fe/S Cluster- und Häm-Biogenese entscheidend an der Regulation der zellulären Eisenhomeostase beteiligt sind. Interessanterweise besitzt die Häm-Biosynthese in Hefe keinen vergleichbaren Einfluss auf die Eisenhomeostase. Nach einer vorläufigen Modellvorstellung könnte die ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie an der Synthese und dem Export einer (noch unbekannten) Komponente beteiligt sein, die neben einer Funktion in der Reifung extra-mitochondrialer Fe/S Proteine auch an der Inhibierung von Aft1p als

Transkriptionsaktivator beteiligt ist. Zusätzlich könnte diese Komponente weitere Stoffwechselwege (z.B. Respiration, Häm-Synthese), in denen Eisen benötigt wird, regulieren.

Bereits aus früheren Arbeiten war bekannt, dass ein Funktionsverlust der mitochondrialen ISC-Maschinerien zusätzlich mit einem Häm-Defekt einhergeht, der den Aktivitätsverlust Häm-haltiger Proteine in Yah1p- und Atm1p-depletierten Zellen erklärt. Der Häm-Mangel basiert zum einen auf der reversiblen Inhibierung der Ferrochelatase (Hem15p). In dieser Arbeit konnte des Weiteren gezeigt werden, dass das *HEM15* Gen in Yah1p-, Atm1p- sowie in Eisen-depletierten Zellen transkriptionell reprimiert wird. Folglich ist der Häm-Mangel sowohl durch Regulation der Ferrochelatase auf Protein- als auch auf Genebene zu erklären. Diese Beobachtungen erläutern zwanglos, wie die Hefezelle die Eisenverteilung zwischen Fe/S Clustern und Häm reguliert.

Die vorgelegte Arbeit konnte damit zum einen eine neue Komponente der CIA-Maschinerie für die Biogenese von Fe/S Proteinen identifizieren und charakterisieren. Zum anderen wurde eine vergleichende Analyse der drei Biogenese-Maschinerien hinsichtlich der transkriptionellen Auswirkungen von Defekten auf die regulatorischen Effekte in der Zelle durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten grundsätzliche funktionelle und regulatorische Unterschiede der mitochondrialen ISC- und cytosolischen CIA-Maschinerien auf. Die Arbeit trägt damit zu einem tieferen Verständnis der Fe/S Protein-Biogenese und deren Einfluss auf die zelluläre Homeostase, insbesondere des Eisens, bei.

3. Einleitung

3.1. Eisen und seine physiologische Relevanz

Eisen ist eines der häufigsten chemischen Elemente der Erdkruste. Darüber hinaus ist Eisen für alle Organismen essentiell, da es eine wichtige Rolle als Cofaktor einnimmt. Dabei wird Eisen mononuklear, als Teil eines Eisen-Schwefel (Fe/S) Clusters oder als Häm-Gruppe in Proteine eingebaut. Eisen-abhängige Proteine übernehmen zentrale Aufgaben beim Elektronentransport in der bakteriellen oder mitochondrialen Atmungskette, der Katalyse biochemischer Reaktionen, bei regulatorischen Vorgängen, dem Sauerstofftransport im Blut (Hämoglobin) sowie in der Biosynthese verschiedener Aminosäuren (Hefe) und Sterole. Außerdem sind Eisen-abhängige Proteine an der Biosynthese von Ribosomen und tRNA beteiligt und fungieren als Sensoren von Eisen, Sauerstoff und Stickoxiden.

Unter anaeroben Bedingungen liegt Eisen in Form von Eisen(II)-Ionen vor, deren Verbindungen in Wasser sehr gut löslich sind. Unter aeroben Bedingungen hingegen ist die Bioverfügbarkeit von Eisen gering und die Konzentration der Eisenionen wird für Organismen zum wachstums-limitierenden Faktor. Bei neutralem pH liegt es als nahezu unlöslicher Eisen(III)-Hydroxid-Komplex vor. Um Eisen dennoch verfügbar zu machen, besitzen die Organismen verschiedene Systeme zur Aufnahme.

3.2. Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von Eisen in *Saccaromyces cerevisiae*

3.2.1. Die Aufnahme von freiem Eisen

In Hefe erfolgt die Aufnahme von freiem Eisen über hoch- und niedrigaffine Eisenaufnahmesysteme. Unter Laborbedingungen hat allein das hochaffine Aufnahmesystem eine Bedeutung. Dieses besteht aus einem in der Plasmamembran lokalisierten Proteinkomplex, der Ferroxidase Fet3p und der Permease Ftr1p. Die Cu^{2+}-abhängige Ferroxidase Fet3p oxidiert Fe^{2+} zu Fe^{3+}, um dieses anschließend über die Permease Ftr1p ins Zellinnere zu transportieren. Die Kupferabhängigkeit von Ferroxidasen ist die molekulare Ursache der Vernetzung von Kupfer- und Eisenstoffwechsel in Eukaryoten (Dancis, 1998). Ftr1p gehört zusammen mit Fth1p, einem vakuolären Eisentransporter, zu einer Familie von Oxidase-abhängigen Transportern, deren Mechanismus und Energieabhängigkeit noch völlig unklar ist.

Das hochaffine Aufnahmesystem beinhaltet außerdem die Aktivität von Metalloreduktasen, hauptsächlich Fre1p und Fre2p, zwei Flavocytochrome. Diese reduzieren Fe^{3+} zu Fe^{2+}, welches dann als Substrat für Fet3p/Ftr1p dient. Fet4p hingegen ist ein Transporter des niedrigaffinen Eisenaufnahmesystems, der direkt Fe^{2+} transportieren kann (Kosman, 2003). Die Fet4p-vermittelte Eisenaufnahme spielt allerdings nur eine untergeordnete Rolle, da der K_m-Wert von 35 µM relativ hoch ist (Dix *et al.*, 1997; Dix *et al.*, 1994).

Die Eisenaufnahme erfolgt streng reguliert, da reduziertes Eisen (Fe^{2+}) über die Fenton-Reaktion zur Bildung von zellschädigenden Hydroxylradikalen führt. Nicht nur die intrazelluläre Eisenaufnahme, sondern auch die Verteilung und Speicherung des Eisens muss genau koordiniert sein. Das Eisen wird hauptsächlich in den Mitochondrien zur Synthese von Fe/S Clustern und Häm-Cofaktoren benötigt. Daher nehmen diese Organellen im intrazellulären Eisenstoffwechsel eine zentrale Rolle ein. Unter physiologischen Bedingungen wird überschüssiges Eisen in der Vakuole gespeichert (Raguzzi *et al.*, 1988). Dabei erfolgt die Eisenakkumulation über den vakuolären Transporter Ccc1p (Li & Kaplan, 2004). Bei Bedarf kann das gespeicherte Eisen re-mobilisiert werden, wobei der Export aus der Vakuole durch die Proteine Smf3p, Fth1p und Fet5p vermittelt wird. Smf3p weist Sequenzähnlichkeiten zum zweiwertigen Metallionentransporter Nramp (Säuger) auf (Portnoy *et al.*, 2000). Dieser transportiert neben Eisen auch andere zweiwertige Metallionen. Fth1p und Ftr1p gehören zur Klasse der Oxidase-abhängigen Transporter. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Proteine, die in *S. cerevisiae* an der Eisenaufnahme und der intrazellulären Verteilung beteiligt sind.

3.2.2. Siderophor-vermittelte Eisenaufnahme

Die Eisenaufnahme über Siderophore (Eisenträger) spielt unter Laborbedingungen nur eine untergeordnete Rolle. *S. cerevisiae* kann selbst keine Siderophore synthetisieren, exprimiert aber zahlreiche Gene, die mit einer Siderophor-vermittelten Eisenaufnahme assoziiert sind. Siderophore sind niedermolekulare Substanzen (300-2.000 Da), die in die Umgebung ausgeschieden werden und der Aufnahme sowie der Speicherung von Eisen dienen. Insgesamt unterscheidet man drei verschiedene Klassen: die Catecholamate (z.B. Enterobactin), Hydroxamate (z.B. Ferrioxamin) und die α-Hydroxy/Keto-Carboxylate (z.B. Citrat). Siderophore besitzen eine hohe Affinität zu dreiwertigem Eisen (Boukhalfa & Crumbliss, 2002; Neilands,

1995). Nach Reduktion zu zweiwertigem Eisen (Fe^{2+}) nimmt die Affinität der Siderophore zum Eisen ab. Wie viele Bakterienarten kann auch die Hefe *S. cerevisiae* das an unterschiedliche Siderophor-Klassen gebundene Eisen für sich nutzbar machen. Dieses kann sowohl an der Zelloberfläche, als auch im Zellinneren freigesetzt werden (De Luca & Wood, 2000; Haas, 2003; Yun *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2001). Eine Familie von Transportern (Arn1-4p) vermittelt die Eisenaufnahme über Siderophore, indem sie diese binden und zwischen Zelloberfläche und Vakuole hin und her wandern. Zusätzlich exprimiert *S. cerevisiae* eine Gruppe von Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen (Fit1-3p), die vermutlich die Siderophor-vermittelte Eisenaufnahme erleichtern, indem sie Siderophore in der Zellwand anreichern.

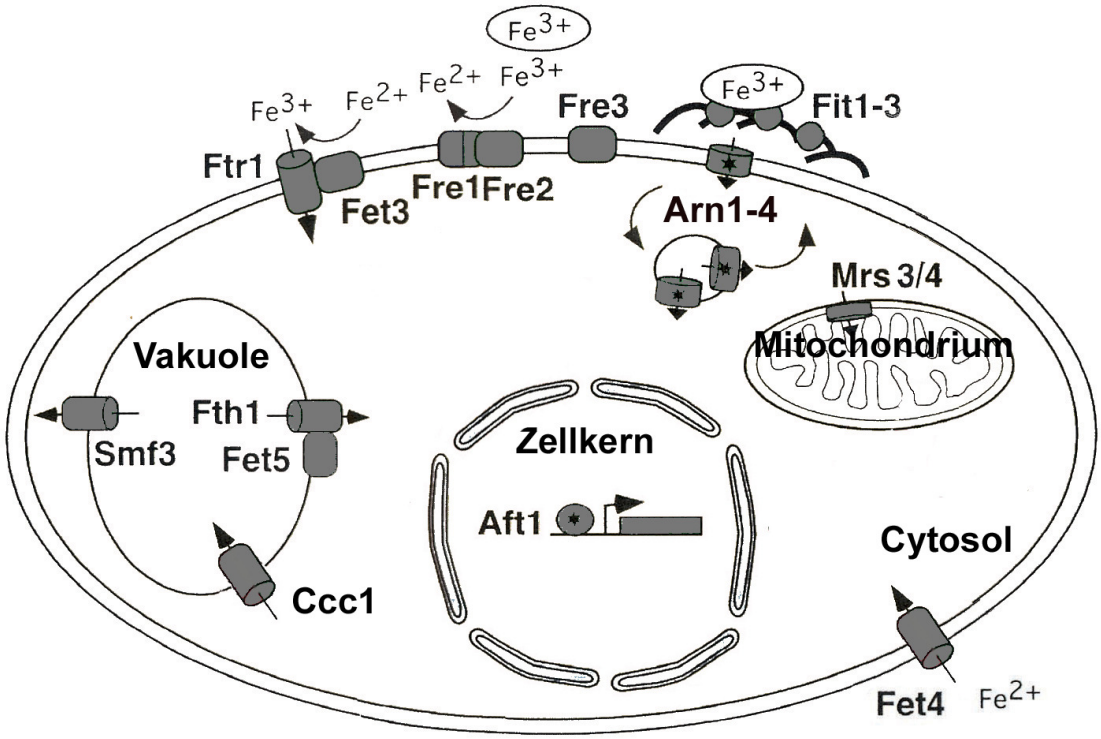

Abb. 1: Eisenaufnahme und Verteilung in *S. cerevisiae*. Freies Eisen wird über die in der Plasmamembran lokalisierten hoch- und niedrigaffinen Eisenaufnahmesysteme, bestehend aus Fet3p/Ftr1p und Fet4p, aufgenommen. Fet3p/Ftr1p ist ein Proteinkomplex, der zunächst reduziertes Eisen oxidiert und dann über die Permease Ftr1p ins Zellinnere abgibt. Fet4p kann direkt reduziertes Eisen transportieren. Zwei Metalloreduktasen, Fre1-2p, reduzieren Fe^{3+} zu Fe^{2+} und liefern damit das Substrat für den Fet3p/Ftr1p vermittelten Eisentransport. Die Fit1-3p Proteine dienen vermutlich der Anreicherung von Siderophoren in der Zellwand. Arn1-4p sind eine Familie von Siderophor-Transportern, die zwischen der Plasmamembran und der Vakuole hin und her pendeln. Aufgenommenes Eisen wird aus dem Cytosol über den Transporter Ccc1p in die Vakuole transportiert und gespeichert. Bei Bedarf wird das Eisen über die vakuolären Transporter Smf3p und Fet5p/Fth1p re-mobilisiert und in reduzierter Form über die Transporter Mrs3/4p in die mitochondriale Matrix transportiert, wo es zur Fe/S Cluster und Häm-Biosynthese benötigt wird. Aft1p ist ein Eisen-abhängiger Transkriptionsaktivator, der bei Eisenmangel Gene exprimiert, deren Produkte der Eisenaufnahme und der Re-Mobilisierung von intrazellulär vorhandenem Eisen dienen. (Modifiziert nach J. C. Rutherford, 2004)

3.3. Struktur und intrazelluläre Lokalisierung von Fe/S Proteinen

Fe/S Proteine enthalten Fe/S Cluster als anorganische Cofaktoren. Sie werden aus Fe^{2+} und/oder Fe^{3+} Ionen sowie anorganischem Sulfid (S^{2-}) zusammengesetzt. In der Regel sind die Eisenionen mit den Schwefelatomen der Cysteinreste einer Polypeptidkette verknüpft, können aber auch mit Histidinresten und sehr selten mit Serin oder Arginin koordiniert werden. Die einfachste Form ist der rhombische [2Fe-2S] Cluster. Dieser findet sich in Proteinen vom Ferredoxin-Typ, der Biotin-Synthase oder der Ferrochelatase (Enzym der Häm-Biosynthese). Proteine vom Rieske-Typ besitzen einen [2Fe-2S] Cluster, bei dem eines der beiden Eisenionen mit zwei Histidinresten koordiniert ist. Durch diese Koordination erfolgt eine Stabilisierung des Fe/S Zentrums in seiner reduzierten Form und eine Erhöhung des Reduktionspotentials. Häufiger sind kubische [4Fe-4S] Cluster, bei denen mindestens drei der vier Eisenionen über Cysteinreste mit dem Protein koordiniert sind. [4Fe-4S] Cluster finden sich im respiratorischen Komplex I und II und in bakteriellen Ferredoxinen. Bei der Aconitase sind drei der vier Eisenionen mit Cysteinresten koordiniert. Das vierte Eisenion dient der Substratbindung. Die Aconitase katalysiert die reversible Reaktion von Citrat zu Isocitrat. Weitere Liganden von [4Fe-4S] Clustern sind beispielsweise CO und CN^-. Seltener zu finden sind [3Fe-4S] Cluster, Varianten des [4Fe-4S] Clusters. Darüber hinaus gibt es weitaus komplexere Fe/S Cluster. Die Sulfit-Reduktase aus *Escherichia coli* enthält einen [4Fe-4S] Cluster, der über ein Cystein mit dem zentralen Eisenatom eines Sirohäm-Moleküls verbunden ist. In seltenen Fällen sind Fe/S Cluster mit Metallen wie z.B. Molybdän, Nickel oder Vanadium koordiniert. Die Nitrogenase beispielsweise besitzt einen Molybdän-Eisen Cluster (Rees & Howard, 2000; Rees, 2002).

In der bakteriellen oder mitochondrialen Atmungskette sind Fe/S Cluster besonders zahlreich. Allein der Komplex I der Atmungskette enthält insgesamt acht (Eukaryoten) bzw. neun (Bakterien) Fe/S Cluster (Hinchliffe & Sazanov, 2005). Der Komplex II besitzt beispielsweise [2Fe-2S], [3Fe-4S] und [4Fe-4S] Cluster (Sun *et al.*, 2005). Im Cytosol der Hefe kennt man die [4Fe-4S] Cluster Proteine Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p), Glutamat-Synthase (Glt1p) und eine Untereinheit der Sulfit-Reduktase (Ecm17p). Diese sind am Aminosäurestoffwechsel von Leucin, Glutamat bzw. Methionin beteiligt. Darüber hinaus sind Ilv3p und Lip5p in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Diese [4Fe4S] Cluster-tragenden Proteine sind an der Biosynthese von verzweigtkettigen Aminosäuren bzw. der Liponsäure-Synthese beteiligt. Das in

der mitochondrialen Matrix lokalisierte Bio2p übernimmt eine Funktion in der Biotin-Biosynthese und bindet sowohl einen [2Fe-2S] als auch [4Fe-4S] Cluster. Rli1p befindet sich vorwiegend im Cytosol und hat eine essentielle Funktion in der Ribosomen-Biogenese (Kispal *et al.*, 2005). Mindestens ein Fe/S Protein, die DNA-N-Glycosylase Ntg2p, befindet sich im Zellkern. Diese ist an DNA-Reparaturvorgängen beteiligt. Übersicht über die Vielfalt der Fe/S Cluster: (Beinert *et al.*, 1997; Beinert, 2000; Cammack, 1992). Die Abbildung 2 gibt einen Überblick über die subzelluläre Lokalisierung von Fe/S Proteinen in *S. cerevisiae*.

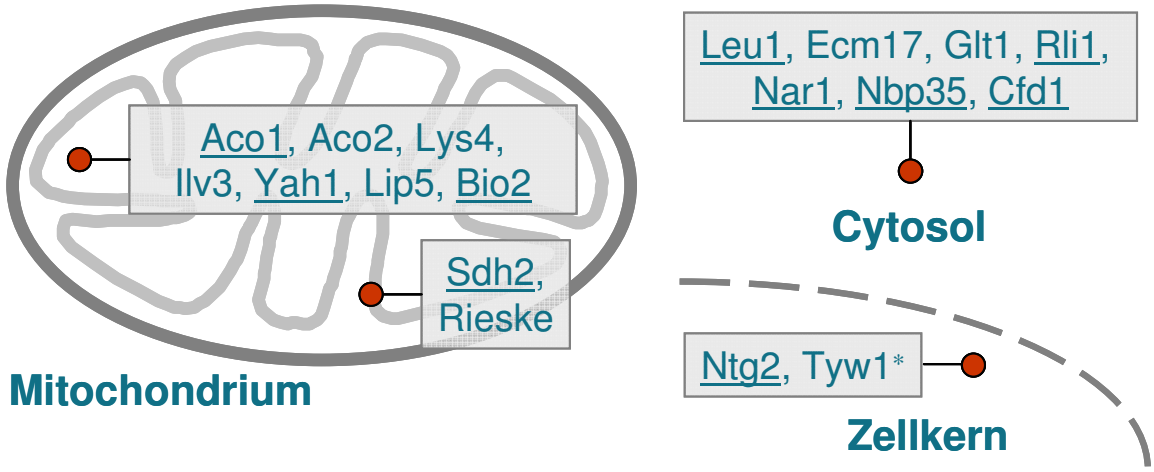

Abb. 2: Subzelluläre Lokalisierung von Fe/S Proteinen in *S. cerevisiae*. Fe/S Proteine befinden sich im Zellkern, Cytosol und in den Mitochondrien. Für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind alle unterstrichenen Proteine. ∗Die subzelluläre Lokalisierung von Tyw1p, einem tRNA modifizierenden Enzym, wurde noch nicht bestätigt.

3.4. Funktionen von Fe/S Proteinen

3.4.1. Fe/S Cluster in Redoxprozessen

Die wohl bekannteste Funktion von Fe/S Proteinen ist ihre Beteiligung an unterschiedlichen Redox-Reaktionen. Die Funktion basiert auf der Eigenschaft von Eisen, zwischen der reduzierten (Fe^{2+}) und der oxidierten Form (Fe^{3+}) zu wechseln. Fe/S Cluster übertragen in der Regel nur ein Elektron (Beinert *et al.*, 1997; Beinert, 2000; Johnson & Brown, 1998; Johnson *et al.*, 2005). Das Redoxpotential von Fe/S Clustern hängt größtenteils von der Struktur des umgebenden Proteins ab. Im Allgemeinen liegen die Redoxpotentiale von Fe/S Clustern zwischen –500 mV und +100 mV. Zu den am weitesten verbreiteten redoxaktiven Fe/S Proteinen gehören die [2Fe-2S] oder [4Fe4S] Cluster-tragenden Ferredoxine. Das Zusammenspiel von Fe/S Clustern und verschiedenen anderen Elektronenüberträgern ermöglicht die schrittweise Übertragung von Elektronen. Beispielsweise können in der

mitochondrialen Atmungskette zwei Elektronen von $NADH+H^+$ zuerst auf FAD/FMN bzw. Ubichinon und von dort nacheinander über Fe/S- und Häm-haltige Redoxzentren auf den Ein-Elektron-Akzeptor Cytochrom *c* übertragen werden.

3.4.2. Die Rolle der Fe/S Cluster bei der Katalyse chemischer Reaktionen

Als klassisches Beispiel für eine Enzymkatalyse durch einen Fe/S Cluster gilt die Aconitase, ein essentielles Enzym im Zitronensäurezyklus. Das in der mitochondrialen Matrix lokalisierte Protein enthält einen [4Fe-4S] Cluster, der Teil des aktiven Zentrums ist. Drei der vier Eisenionen des Clusters sind über Cysteinreste mit dem Protein koordiniert. Das vierte Eisenatom dient der Substratbindung. Die Aconitase setzt Citrat zu Isocitrat um. Diese Isomerisierung wird durch eine Verschiebung der Hydroxygruppe innerhalb des Substrats erreicht (Beinert, 2000). Funktionell ähnliche Proteine sind das [4Fe-4S] Cluster-tragende Protein Lys4p, welches in der Lysin-Biosynthese involviert ist, und ein putatives mitochondriales Aconitase-Isozym (Aco2p).

In manchen Enzymen, die homolytische Spaltungen über radikalische Zwischenprodukte katalysieren, wie die Lysin 2,3-Aminomutase, interagiert ein Schwefelatom eines [4Fe-4S] Clusters mit Adenosylmethionin. Dadurch wird dieses homolytisch in ein Adenosylradikal und Methionin gespalten. Das Adenosylradikal wird seinerseits zur radikalischen Spaltungen von C-C oder C-H Verbindungen verwendet (Cheek & Broderick, 2001). Die Ribonukleotid-Reduktase/Aktivase aus *Escherichia coli,* die Biotin-Synthase und die Isopropylmalat-Isomerase sind weitere Beispiele für Fe/S Proteine, deren Cluster direkt an katalytischen Prozessen beteiligt sind.

3.4.3. Fe/S Cluster als Regulatoren der Genexpression

Fe/S Cluster-tragende Proteine erlauben der Zelle sich an verschiedene Umweltbedingungen anzupassen, indem sie auf Transkriptionsebene in die Genregulation eingreifen. Dabei wird die Empfindlichkeit, von Fe/S Clustern gegenüber Sauerstoff und Stickoxiden, ausgenutzt. Die folgenden Beispiele demonstrieren wie Fe/S Cluster u.a. als Sensoren für Superoxide und Stickoxide funktionieren oder in höheren Eukaryoten auf Translationsebene die zelluläre Eisenhomeostase regulieren.

Das Sensorprotein SoxR

SoxR dient in *E. coli* als Sensor für Superoxide und Stickoxide. Das SoxR Protein ist ein Homodimer mit einem [2Fe-2S] Cluster pro Untereinheit. Diese Cluster existieren unter aeroben Bedingungen zu 95% in der reduzierten Form ($[2Fe\text{-}2S]^{1+}$). In diesem Zustand ist das SoxR Protein inaktiv, bindet aber an die Promotorregion des SoxS Transkriptionsfaktors. SoxS ist ein Aktivator von Genen, deren Produkte an der Beseitigung von Superoxiden beteiligt sind (z.B. Superoxid-Dismutase). Die Akkumulation von Superoxiden bewirkt eine Oxidation der SoxR Cluster ($[2Fe\text{-}2S]^{2+}$). Das Protein wird in die aktive Form überführt und bewirkt eine Modulierung des SoxS Promotors. Dies induziert die Transkription des Transkriptionsfaktors SoxS. Die Induktion von SoxR durch NO erfolgt durch die Bildung eines Dinitrosyl-Eisen-Dithiol Addukts. Obwohl SoxS induziert wird, konnten in einer Microarray-Analyse keine durch SoxS regulierten Gene gefunden werden (Green & Paget, 2004; Spiro, 2006).

Der O_2-Sensor FNR

Bei einem O_2-Mangel aktiviert das FNR Protein aus *E. coli* die Transkription von Genen, welche für alternative Produkte der Atmungskette kodieren. Außerdem werden unter anaeroben Wachstumsbedingungen solche Gene reprimiert, deren Produkte unter aeroben Bedingungen eine Funktion ausüben. Die aktive Form des FNR ist ein Homodimer mit einem $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ Cluster pro Untereinheit, welches an DNA bindet. Eine O_2-Exposition wandelt den $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ Cluster in einen $[2Fe\text{-}2S]^{2+}$ Cluster um und beschleunigt den Übergang in die monomere Form des Proteins (Crack *et al.*, 2006). Das FNR Protein aus *Bacillus subtilis* hingegen existiert stets als Homodimer unabhängig von der Integrität der $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ Cluster und der O_2-Exposition. Das FNR Protein aus *B. subtilis* bindet in Anwesenheit eines intakten $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ Cluster pro Untereinheit an die Promotoren von Zielgenen und aktiviert diese (Reents *et al.*, 2006).

Der Transkriptionsrepressor IscR

Ein regulatorisches Fe/S Protein mit einer Bedeutung für die Biosynthese und/oder Reparatur von Fe/S Clustern ist der Transkriptionsrepressor IscR in *E. coli*. Das IscR Protein besitzt in der aktiven Form einen [2Fe-2S] Cluster und agiert als Repressor des *isc* Operons. Bei Exposition zu Wasserstoffperoxid wird das Protein inaktiviert, was die Neusynthese und/oder die Reparatur von Fe/S Clustern erlaubt (Green & Paget, 2004).

Das IRP1/2 System

Der Transferrin-Rezeptor und Ferroportin, zwei Proteine, die der Eisenaufnahme dienen, die Speicherproteine H- und L-Ferritin, 5-Aminolävulinsynthase (Schlüsselenzym der Häm-Biosynthese) sowie Aconitase werden in Abhängigkeit von Eisenbedarf und Angebot post-transkriptionell durch die Proteine IRP1 und IRP2 reguliert.

Bei Eisenmangel liegen die „iron regulatory proteins“ (IRPs) in der Apoform vor und binden an sog. „iron responsive elements“ (IREs). Das sind Sequenzen in den 5´- oder 3´- nicht-translatierten Abschnitten bestimmter mRNAs, die Haarnadelstrukturen ausbilden. Die Ausbildung eines IRE/IRP Komplexes im 5´-nicht-translatierten Bereich führt zu einer Inhibierung der Translation, während die Komplexbildung im 3´-nicht-translatierten Bereich zu einer Stabilisierung der mRNA führt und diese vor vorzeitigem Abbau schützt.

Ferritin und der Transferrin-Rezeptor werden in entgegengesetzter Weise durch die IRP Proteine reguliert. Bei Eisenmangel bindet IRP1 an den 3´-nicht-translatierten Abschnitt der Transferrin-Rezeptor mRNA. Dies führt zu einer Stabilisierung und zur Translation des Transferrin-Rezeptors. Ungebundene Transferrin-Rezeptor mRNA wird hingegen sehr schnell abgebaut. Die Ferritin mRNA besitzt ein IRE im 5´-nicht-translatierten Abschnitt. Durch die Ausbildung eines IRE/IRP Komplexes wird die Translation der Ferritin mRNA verhindert. Bei einem Eisenüberangebot koordiniert IRP1 einen [4Fe-4S] Cluster und funktioniert als cytosolische Aconitase, ein Enzym, das Citrat in Isocitrat überführt. IRP2 hingegen kann Häm binden und wird bei einem Eisenüberschuss im Proteasom abgebaut. Die IRP Proteine werden auch durch andere Effektoren kontrolliert. IRP1 wird beispielsweise durch Wasserstoffperoxid aktiviert, indem es den Fe/S Cluster destabilisiert (Hentze *et al.*, 2004).

3.5. Die Biogenese von Fe/S Proteinen in Bakterien

Anfänglich glaubte man, dass Fe/S Cluster sich spontan zusammensetzen und in Apoproteine inserieren. Diese Vorstellung basierte auf *in vitro* Experimenten, in denen die Rekonstitution eines Fe/S Holoproteins mit reduziertem Eisen (Fe^{2+}) und einer Schwefelquelle gelungen war (Malkin & Rabinowitz, 1966). Diese Beobachtung wurde auch für weitere gereinigte Proteine gemacht, allerdings sind hierzu sauerstofffreie Bedingungen und unphysiologisch hohe Eisen- und Sulfidkonzentrationen nötig, die in der Zelle toxisch wären. Daher verfügen sowohl

Eubakterien, als auch Eukaryoten über einen komplexen Apparat zur Assemblierung von Fe/S Proteinen (Frazzon *et al.*, 2002; Gerber & Lill, 2002; Kispal *et al.*, 1999; Muhlenhoff & Lill, 2000; Zheng *et al.*, 1998). In Eubakterien existieren mindestens drei unterschiedliche Systeme, die der Synthese von Fe/S Proteinen dienen und deren Gene in Operons organisiert sind. Als erstes wurde das *nif* (nitrogen fixation) System aus dem Stickstofffixierer *Azotobacter vinelandii* identifiziert (Frazzon & Dean, 2003; Zheng *et al.*, 1993). Das *nif* Operon kodiert einen Nitrogenase-Komplex, der atmosphärischen Stickstoff (N_2) zu Ammoniak reduzieren kann. Der Enzymkomplex besteht aus zwei Komponenten, der Nitrogenase (MoFe-Protein) und der Dinitrogenase-Reduktase. Die Nitrogenase, kodiert durch *nifD* und *nifK*, ist ein $\alpha 2\beta 2$ Heterodimer und besitzt sowohl einen Eisen-Molybdän-Cofaktor als auch einen P-Cluster [8Fe-7S]. Dieser ist wahrscheinlich am Elektronentransport beteiligt. Die Reduktase (Eisen-Protein), kodiert durch *nifH*, besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die durch einen [4Fe-4S] Cluster verknüpft sind. Die meisten Gene im *nif* Operon kodieren keine strukturellen Bestandteile des Nitrogenase-Komplexes (z.B. NifS und NifU). Allerdings führen Deletionen in den entsprechenden Genen zu einem Aktivitätsverlust des MoFe-Proteins und der Reduktase. Daraus resultiert eine generelle Bedeutung dieser Genprodukte bei der Synthese des Nitrogenase-Komplexes (Jacobson *et al.*, 1989). NifS war das erste Enzym, welches mit der Biosynthese von Fe/S Clustern in Verbindung gebracht wurde. Es katalysiert die Umsetzung von Cystein zu Alanin und Enzym-gebundenem Schwefel, welcher für die Assemblierung eines Fe/S Clusters benötigt wird (Zheng *et al.*, 1993; Zheng & Dean, 1994; Zheng *et al.*, 1994). NifU besteht aus drei funktionellen Domänen. Das N-terminale und das C-terminale Drittel des Proteins enthält drei bzw. zwei konservierte Cysteinreste, auf denen *in vitro* ein transienter Fe/S Cluster assembliert werden kann (Smith *et al.*, 2005; Yuvaniyama *et al.*, 2000). Das mittlere Drittel bindet über vier Cysteine einen permanenten [2Fe-2S] Cluster (Agar *et al.*, 2000b). Da dieser Cluster dem eines Ferredoxins ähnelt, wird vermutet, dass dieser Teil des Proteins Elektronen übertragen kann. Deletionen von *nifS* oder *nifU* haben jedoch keinen Einfluss auf die Aktivitäten anderer Fe/S Proteine in *A. vinelandii*. Biochemische Untersuchungen in *E. coli* und aerob kultivierten *A. vinelandii* führten zur Identifizierung einer weiteren Cystein-Desulfurase (IscS), die im sog. *isc* (iron-sulfur-cluster) Operon von *A. vinelandii* und *E. coli* kodiert ist (Flint, 1996; Zheng *et al.*, 1998). Die im *isc* Operon kodierten Gene sind in den meisten Eubakterien konserviert. Daher wurde schon früh postuliert und in den vergangenen Jahren

bestätigt, dass die entsprechenden Proteine für die generelle Biogenese bakterieller Fe/S Proteine benötigt werden (Tokumoto & Takahashi, 2001; Zheng *et al.*, 1998).

IscS und NifS sind homologe Proteine mit ähnlichen katalytischen Eigenschaften. IscU ist homolog zum N-terminalen Drittel von NifU und dient ebenfalls als Gerüst für die Assemblierung von Fe/S Clustern, die dann auf Apoproteine übertragen werden (Agar *et al.*, 2000a; Mansy *et al.*, 2002). NifU und IscU sind daher als Fe/S Cluster Assemblierungsproteine für die Biogenese von Fe/S Proteinen von zentraler Bedeutung.

Das *A. vinelandii isc* Operon kodiert neben IscS und IscU noch IscA (ein Homolog zu orf6 bzw. ^{NIF}IscA des *nif* Operons), Hsc66 und Hsc20 (zwei Chaperone der DnaK/Hsp70 und DnaJ/Hsp40 Familie) (Seaton & Vickery, 1994) sowie Fdx (ein [2Fe-2S] Ferredoxin) (Ta *et al.*, 1992; Ta & Vickery, 1992).

Die Beobachtung, dass *iscS* in *E. coli* nicht essentiell ist, führte zur Identifizierung eines dritten Systems, dem *suf* (sulfur mobilization) Operon (Patzer & Hantke, 1999; Takahashi & Tokumoto, 2002). Homologe *suf* Gene wurden in manchen Bakterien, Archaea, Plastiden und deren bakteriellen Vorläufern, den Cyanobakterien sowie den Apicoplasten von Parasiten identifiziert. Wie die beiden anderen bakteriellen Systeme, so kodiert auch das *suf* Operon für eine Cystein-Desulfurase (SufS) (Loiseau *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2003) und ein Homolog zu IscA (SufA) (Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2003). Interessanterweise enthält es jedoch keine homologen Proteine zu IscU oder den Chaperonen Hsc66 und Hsc20. Stattdessen kodiert das *suf* Operon diverse Proteine, die nicht Bestandteil der NIF oder ISC-Maschinerie sind. SufC ist eine lösliche ABC-(ATP binding cassette) ATPase, die im Cytoplasma zusammen mit SufBD an der Assemblierung und/oder Reparatur von Fe/S Clustern beteiligt ist (Nachin *et al.*, 2001; Nachin *et al.*, 2003; Rangachari *et al.*, 2002). Der SufBCD Komplex und SufE stimulieren synergistisch die Cystein-Desulfurase Aktivität von SufS (Loiseau *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2003). Obwohl sich die *isc* und *suf* Systeme signifikant unterscheiden, können die Suf Proteine nach Überproduktion die Funktion der Isc Proteine in *E. coli* ersetzen (Takahashi & Tokumoto, 2002). Es wird vermutet, dass die Suf Proteine eine alternative Maschinerie für die Assemblierung von Fe/S Clustern darstellen, die unter bestimmten Bedingungen (z.B. oxidativem Stress und Eisenmangel) genutzt wird (Outten *et al.*, 2004).

Die Systeme lassen sich untereinander austauschen. Dies beruht auf der Tatsache, dass das NIF System aus *Entamoeba histolytica* sowohl das ISC als auch das SUF System aus *E. coli* unter anaeroben Bedingungen ersetzen kann (Ali *et al.*, 2004).

3.6. Die Biogenese von Fe/S Proteinen in *S. cerevisiae*

In Eukaryoten werden Fe/S Cluster in den Mitochondrien synthetisiert und in mitochondriale Apoproteine eingebaut. Mittlerweile sind in der mitochondrialen Matrix 14 Proteine identifiziert worden, die in ihrer Gesamtheit als ISC-Assemblierungsmaschinerie bezeichnet werden (Abb. 3). Viele dieser Proteine sind in ihrer Primärstruktur sehr ähnlich zu den bakteriellen Proteinen, die in den *nif* und *isc* Operonen kodiert sind (Zheng *et al.*, 1998). Daher ist es wahrscheinlich, dass die ISC-Komponenten von prokaryotischen Vorfahren der Mitochondrien geerbt wurden (Endosymbionten-Theorie) (Muller & Martin, 1999). Die ISC-Komponenten werden ausnahmslos im Kern kodiert und enthalten Signalsequenzen zur Translokation ins Mitochondrium.

Die Abbildung 3 fasst die Biosynthese von Fe/S Proteinen in *S. cerevisiae* zusammen. Die wenigen Untersuchungen an eukaryotischen ISC-Komponenten erlauben nur eine grobe Darstellung der Synthese von Fe/S Proteinen. Die funktionellen Details wurden teilweise aus Experimenten mit den bakteriellen Homologen abgeleitet und ergänzt.

In *S. cerevisiae* stellen die Isu Proteine (Isu1p/Isu2p) die zentralen Komponenten der Fe/S Cluster-Biogenese dar. An ihnen erfolgt die Zusammensetzung des Fe/S Clusters. Diese Proteine sind homolog zum bakteriellen IscU und dem N-terminalen Drittel von NifU (Garland *et al.*, 1999; Mühlenhoff *et al.*, 2003; Schilke *et al.*, 1999). Die Mitglieder dieser sog. IscU/Isu Proteinfamilie gehören zu den evolutionär am stärksten konservierten Proteinen.

Die Synthese des Clusters beginnt mit der Freisetzung eines Schwefelatoms aus Cystein durch die Cystein-Desulfurase Nfs1p. Nfs1p ist ein Homolog von NifS bzw. Ortholog von IscS (Kispal *et al.*, 1999; Strain *et al.*, 1998). Die Proteine dieser IscS/Nfs1 Familie katalysieren die Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängige Umsetzung von Cystein zu Alanin unter Freisetzung von Schwefel. Der Reaktionsmechanismus wurde für NifS aus *A. vinelandii* detailliert untersucht. Der Schwefel wird transient auf einen konservierten Cysteinrest des Nfs1p unter Bildung eines Persulfids übertragen (Kaiser *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 1993) und von dort auf die Isu Proteine überführt

(Smith *et al.*, 2001; Urbina *et al.*, 2001). Kürzlich wurde eine weitere Isc-Komponente identifiziert, das essentielle Protein Isd11p. Überraschenderweise ist das Protein nur in Eukaryoten, nicht aber in Eubakterien konserviert. Das Protein wird für die Biogenese mitochondrialer und extra-mitochondrialer Fe/S Proteine benötigt. Nfs1p und Isd11p bilden *in vivo* einen stabilen Komplex, der die Schwefelübertragung auf die Isu Proteine ermöglicht. (Adam *et al.*, 2006; Wiedemann *et al.*, 2006). Die genaue Funktion von Isd11p ist allerdings unklar.

Das zur Synthese eines Fe/S Clusters benötigte Eisen wird in reduzierter Form mit Hilfe eines Membranpotentials (Lange *et al.*, 1999) und den in der mitochondrialen Innenmembran lokalisierten Transportern Mrs3p und Mrs4p aufgenommen (Foury & Roganti, 2002; Muhlenhoff *et al.*, 2003). Da die Doppelmutante *Δmrs3/4* noch lebensfähig ist, müssen noch zusätzliche Transporter existieren (Zhang *et al.*, 2005). In welcher Form Eisen bis zum Gebrauch in der Fe/S Cluster Biogenese in der mitochondrialen Matrix gespeichert wird, ist bislang unbekannt.

Von einigen Arbeitsgruppen wird vorgeschlagen, dass das importierte Eisen mittels Yfh1p (Yeast frataxin homolog) zu den Isu Proteinen transportiert wird. Gereinigtes Yfh1p kann Eisen binden und oxidieren, wobei allerdings unklar ist, ob diese Bindung spezifisch ist (Aloria *et al.*, 2004; Isaya *et al.*, 2004; Nair *et al.*, 2004; Yoon & Cowan, 2003). Es wurde eine durch Eisen stimulierte Interaktion zwischen Isu1p und Yfh1p gefunden (Gerber *et al.*, 2003). Diese Komplexbildung könnte den Transfer des Eisens zu den Isu Proteinen möglicherweise erleichtern. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Yfh1p zur Assemblierung eines Fe/S Clusters auf Isu1p benötigt wird (Mühlenhoff *et al.*, 2003).

Für Frataxin wurden allerdings auch andere Funktionen vorgeschlagen, beispielsweise in der Häm-Biosynthese, bei der Eisenspeicherung und in der Prävention von oxidativem Stress. Viele der Auswirkungen, die durch einen Mangel an Frataxin entstehen sind sekundär und können auf eine gestörte Fe/S Protein-Biogenese sowie auf die begleitende Eisenanreicherung in den Mitochondrien zurückgeführt werden.

Beim Menschen führt ein Mangel an Frataxin zur Entstehung der neurodegenerativen Erkrankung Friedreichs Ataxie. Die Krankheit hat neurologische Störungen im Gehirn und Rückenmark zur Folge. Darüber hinaus kommt es zu Eisenablagerungen im Gehirn und Herzen. Die erkrankten Personen entwickeln schließlich eine Kardiomyophatie, die in einem Herzinfarkt enden kann. Als Ursache

wird eine Störung in der Biosynthese von Fe/S Clustern vorgeschlagen, da die Zellen von erkrankten Personen auch einen Aktivitätsverlust von mitochondrialen Fe/S Proteinen zeigen (Puccio & Koenig, 2000).

Zur Assemblierung eines Fe/S Clusters auf den Isu Proteinen werden zusätzlich Elektronen benötigt, die höchstwahrscheinlich zur Reduktion des Sulfanschwefels (S^0) zu Sulfid (S^{2-}) dienen, der durch den Komplex Nfs1p/Isd11p bereitgestellt wurde (Mühlenhoff *et al.*, 2003; Wiedemann *et al.*, 2006). Die benötigten Elektronen werden vermutlich durch eine Elektronentransportkette geliefert, bestehend aus einem [2Fe-2S]-Ferredoxin (Yah1p) (Barros & Nobrega, 1999) und der NADH-abhängigen Ferredoxin-Reduktase (Arh1p) (Lange *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Manzella *et al.*, 1998). Darüber hinaus wäre es auch denkbar, dass die Elektronentransportkette eine weitere Funktion in der Dissoziation des Fe/S Clusters von den Isu Proteinen übernimmt.

Es ist schon lange bekannt, dass an der Fe/S Cluster Biogenese ein Chaperon-System, bestehend aus Ssq1p (Hsp70p), dem Co-chaperon Jac1p (Hsp40p) und dem Nukleotid-Austauschfaktor Mge1p, beteiligt ist (Dutkiewicz *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2001; Lutz *et al.*, 2001; Schilke *et al.*, 1999; Voisine *et al.*, 2001). Kürzlich konnte sowohl durch *in vitro* als auch *in vivo* Experimente gezeigt werden, dass diese nicht zur *de novo* Synthese eines Fe/S Clusters auf den Isu Proteinen benötigt werden. Denn die Depletion der Proteine führte zu einer 5-fach erhöhten Akkumulation von Fe/S Clustern auf Isu1p (Dutkiewicz *et al.*, 2006). Daher wird vorgeschlagen, dass dieses Chaperon-System eine Funktion ausübt, die zeitlich zwischen der transienten Bindung eines Fe/S Clusters auf den Isu Proteinen und dem Einbau dieser Fe/S Cluster in die jeweiligen Apoproteine liegt. Man könnte vermuten, dass die Chaperone ausschließlich mit der Apoform dieser Proteine interagieren, um deren Konformation zu stabilisieren und somit befähigt sind, die Fe/S Cluster von den Isu Proteinen zu übernehmen. Allerdings fehlt bislang der Beweis einer spezifischen Interaktion zwischen diesen Proteinklassen.

Das Chaperon Ssq1p wird ausschließlich mit Hilfe seines Co-chaperons Jac1p zu seinem Substrat Isu1p transportiert, wo es an einem konservierten Motiv des Isu1p Proteins bindet (Dutkiewicz *et al.*, 2003; Dutkiewicz *et al.*, 2004; Hoff *et al.*, 2000; Hoff *et al.*, 2003). Die Bindung von Ssq1p an Isu1p wird durch das Co-chaperon Jac1p erleichtert, welches *in vitro* ebenfalls mit Isu1p interagiert. Obwohl die Komplexformation weder für die Apo- noch für die Holoform von Isu1p spezifisch ist,

wird deutlich, dass das Chaperon-System eine Funktion in unmittelbarer Umgebung der Isu Proteine ausübt. Deshalb wird für dieses eine Rolle in der Fe/S Cluster Übertragung vorgeschlagen, bei der es entweder die Konformation der Isu Proteine stabilisiert, die Fe/S Cluster Dissoziation erleichtert oder die Isu Proteine für eine neue Runde der Fe/S Cluster Assemblierung regeneriert.

Eine weitere Komponente, die erst spät in der Biogenese von Fe/S Proteinen eine Funktion einnimmt, ist das Monothiol-Glutaredoxin Grx5p. Die Depletion von Grx5p führt ebenso wie ein Frataxin-Mangel zur Akkumulation von Fe/S Clustern auf den Isu Proteinen (Mühlenhoff *et al.*, 2003). Allerdings konnte bislang die genaue Funktion von Grx5p nicht bestimmt werden.

Darüber hinaus gibt es drei weitere Proteine (Isa1p, Isa2p und Nfu1p) für die eine Beteiligung an der Fe/S Cluster Biogenese gezeigt wurde, aber deren genaue Funktion noch unklar ist.

Die Isa Proteine sind Homologe von IscA und SufA Proteinen in Bakterien. In Hefe bilden die beiden Isa Proteine ein Heterodimer, während in den meisten Eukaryoten ein Sequenzhomolog zu Isa1p vorkommt. Die Deletion dieser Gene hat ähnliche Auswirkungen, nämlich einen Wachstumsdefekt auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen, einen Verlust mitochondrialer DNA und einen generellen Respirations-Defekt (Jensen & Culotta, 2000; Kaut *et al.*, 2000; Pelzer *et al.*, 2000). Erste Experimente zeigten, dass es nach Depletion der Isa1p und/oder Isa2p Proteine zu einem Defekt von Fe/S Proteinen kommt. Demgegenüber wurde durch detaillierte Studien demonstriert, dass die Isa Proteine in den Mitochondrien besonders für Fe/S Proteine vom Aconitase-Typ benötigt werden, während die Reifung anderer Fe/S Proteine (Yah1p, Biotin-Synthase) unbeeinträchtigt ist. (U. Mühlenhoff, persönliche Mitteilung). Um die genaue Funktion der Isa Proteine zu bestimmen, bedarf es allerdings weiterer *in vitro* Experimente.

Nfu1p besitzt Sequenzhomologie zum C-Terminus von NifU aus *A. vinelandii* und ist sowohl in Bakterien als auch in Eukaryoten konserviert (Leon *et al.*, 2003; Lorain *et al.*, 2001; Schilke *et al.*, 1999; Tong *et al.*, 2003). Die Deletion von *NFU1* hat keinen Phänotyp, allerdings ist die Doppeldeletion Δ*isu1*Δ*nfu1* synthetisch letal (Schilke *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu übernehmen Nfu1p-ähnliche Proteine in Mitochondrien von Pflanzen, in Chloroplasten und in Cyanobakterien eine zentrale Rolle in der Assemblierung von Fe/S Clustern (Leon *et al.*, 2003; Nishio & Nakai, 2000; Yabe *et al.*, 2004).

3.6.1. Die Biogenese extra-mitochondrialer Fe/S Proteine

Die Biogenese extra-mitochondrialer Fe/S Proteine erfordert die Anwesenheit der ISC-Assemblierungsmaschinerie. Dies wird dadurch deutlich, dass die Depletion mitochondrialer ISC-Proteine zu signifikanten Defekten in der Biogenese cytosolischer Fe/S Proteine führt (Kaut *et al.*, 2000; Kispal *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Pelzer *et al.*, 2000). Für zwei der ISC-Komponenten (Nfs1p, Isu1p) konnte gezeigt werden, dass diese unbedingt im Mitochondrium lokalisiert sein müssen, um ihre Funktion in der cytosolischen Fe/S Cluster Biogenese ausüben zu können (Gerber *et al.*, 2004; Mühlenhoff *et al.*, 2004). Ins Cytosol fehllokalisiertes Isu1p war nicht funktionell und führte zu Defekten von cytosolischen Fe/S Proteinen. Es wird daher postuliert, dass die ISC-Assemblierungsmaschinerie ein noch unbekanntes Substrat produziert, das für die Fe/S Cluster Synthese im Cytosol und für die Insertion in Apoproteine benötigt wird (Abb. 3).

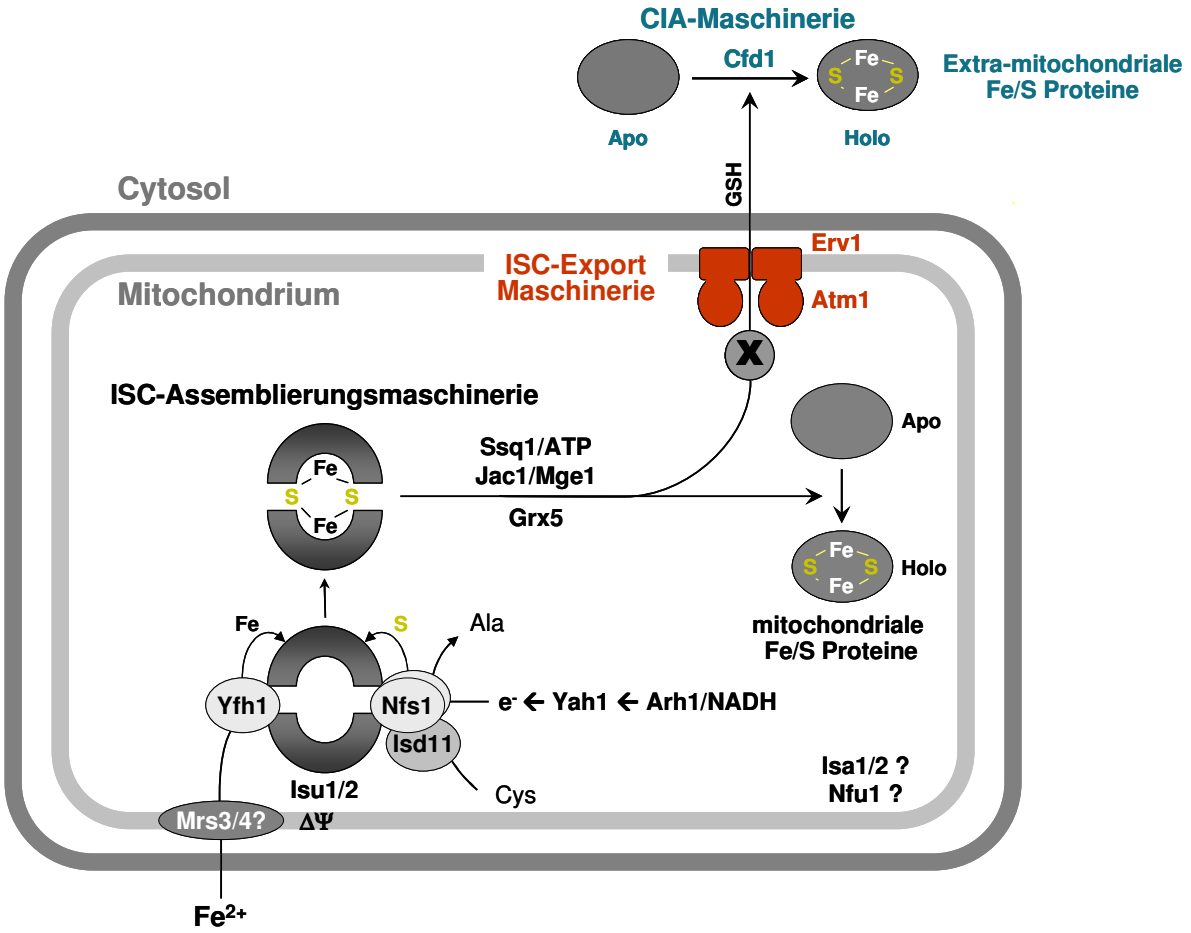

Abb. 3: Arbeitsmodell zur Synthese von zellulären Fe/S Proteinen. Die Zusammensetzung eines transienten Fe/S Clusters erfolgt auf den Isu1/2p Proteinen. Die Cystein-Desulfurase Nfs1p im Komplex mit Isd11p liefert den Schwefel und überträgt diesen auf die Isu Proteine. Der gebundene Schwefel wird zu Sulfid reduziert, die dazu benötigten Elektronen entstammen einer Elektronentransportkette, bestehend aus dem Ferredoxin Yah1p und der NADH-abhängigen Ferredoxin-Reduktase Arh1p. Reduziertes Eisen wird unter Ausnutzung eines Membranpotentials

über Mrs3/4p oder andere Transporter (?) ins Mitochondrium aufgenommen und möglicherweise mittels Yfh1p zu den Isu Proteinen transportiert. Nach der Assemblierung des Clusters wird dieser vermutlich mit Hilfe des Chaperonsystems Ssq1p, Jac1p und Mge1p sowie dem Glutaredoxin Grx5 in mitochondriale Fe/S Proteine inseriert. Darüber hinaus synthetisiert die ISC-Assemblierungsmaschinerie eine noch unbekannte Komponente X, die im Cytosol von der CIA-Maschinerie zur Reifung extra-mitochondrialer Fe/S Proteine benötigt wird. Die Translokation von X erfolgt über die ISC-Exportmaschinerie, bestehend aus dem ABC-Transporter Atm1p in der inneren Mitochondrienmembran, der Sulfhydryloxidase Erv1p im Intermembranraum und Glutathion. Die Proteine der CIA-Maschinerie waren zu Beginn dieser Arbeit unbekannt, abgesehen von Cfd1p.

Die Translokation des Substrats ins Cytosol wird durch eine sog. ISC-Exportmaschinerie vermittelt, von der gegenwärtig drei Komponenten bekannt sind. Die Depletion dieser Komponenten führt zu einer gestörten Biogenese von cytosolischen und nukleären Fe/S Proteinen, während mitochondriale unbeeinflusst bleiben. Zu dieser ISC-Exportmaschinerie gehört der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte ABC-Transporter Atm1p. Die Orientierung des Proteins mit der ATPase-Domäne in der mitochondrialen Matrix, lässt auf eine Exportfunktion schließen. Die Erniedrigung der Menge an Atm1p führt ausschließlich zu Defekten in der Reifung extra-mitochondrialer Fe/S Proteine und darüber hinaus zu einer dramatischen Eisenakkumulation in den Mitochondrien (Kispal *et al.*, 1997). Das spezifische Substrat von Atm1p ist bislang unbekannt. Zur weiteren Charakterisierung wurde das Protein bereits aufgereinigt und in Proteoliposomen rekonstituiert. Es zeigte sich, dass die ATPase Aktivität des Proteins durch Komponenten, die freie Sulfhydryl (-SH)-Gruppen enthalten, stimuliert wird (Kuhnke *et al.*, 2006). Daher könnte man vermuten, dass der ABC-Transporter Atm1p eine Schwefelkomponente transportiert. Mutationen im menschlichen Ortholog hABC7 resultieren in einer Eisenspeichererkrankung, der X-Chromosom-gekoppelten sideroblastischen Anämie und Ataxie (XLSA/A). Sideroblasten sind rote Blutzellen, die mit Eisen angereicherte Mitochondrien besitzen. Dies verdeutlicht, wie wichtig eine intakte Fe/S Protein-Biogenese für das Funktionieren einer Zelle ist.

Ein zweites Protein mit einer spezifischen Funktion in der Biogenese extra-mitochondrialer Fe/S Proteine wurde ausschließlich im Intermembranraum der Mitochondrien identifiziert (Lange *et al.*, 2001; Lisowsky, 1992). Es handelt sich um die FAD-abhängige Sulfhydryloxidase Erv1p (Essential for respiration and vegetative growth 1). Diese katalysiert unter Sauerstoffverbrauch die Einführung von Disulfidbrücken in Proteine. Darüber hinaus ist Erv1p am Import von Präproteinen in den Intermembranraum beteiligt (Mesecke *et al.*, 2005). Die Funktion von Erv1p in der Biogenese von Fe/S Proteinen ist noch völlig unklar.

Das Tripeptid Glutathion (GSH) ist eine dritte Komponente der ISC-Exportmaschinerie und normalerweise an der Beseitigung von oxidativem Stress beteiligt (Sipos *et al.*, 2002). Zellen mit geringem Gehalt an Glutathion und deren Redoxpotential durch Zugabe von Dithiotreitol aufrechterhalten wurde, konnten keine cytosolischen Fe/S Proteine assemblieren. Dies demonstriert, dass Glutathion spezifisch an der Fe/S Cluster Biogenese im Cytosol beteiligt ist. Nahezu alle Proteine der ISC-Assemblierungsmaschinerie wurden bisher ausschließlich in den Mitochondrien detektiert, abgesehen von Nfs1p. Dieses befindet sich zusätzlich im Zellkern. Kernlokalisiertes Nfs1p ist dort allerdings nicht an der Biogenese von Fe/S Proteinen beteiligt, sondern möglicherweise an der Thiouridin-Modifikation bestimmter tRNAs (Nakai *et al.*, 2001). Auch das bakterielle Ortholog IscS aus *E. coli* hat eine solche Doppelfunktion. Die Cystein-Desulfurase stellt den Schwefel für die Fe/S Cluster-Biosynthese und die Biosynthese von Thionukleosiden bereit (Kambampati & Lauhon, 1999; Kambampati & Lauhon, 2000; Lauhon, 2002).

In humanen Zellen wurden die Homologen von Nfs1p, Isu1p und Nfu1p überwiegend in den Mitochondrien detektiert. Geringe Mengen dieser Proteine wurden jedoch auch im Cytosol gefunden (Land & Rouault, 1998; Tong & Rouault, 2000; Tong *et al.*, 2003). Es wurde daher postuliert, dass im Cytosol eine Kopie der mitochondrialen ISC-Assemblierungsmaschinerie existiert, die für die Reifung cytosolischer Fe/S Proteine verantwortlich ist. Allerdings wurde die physiologische Relevanz einer cytosolischen ISC-Assemblierungsmaschinerie bisher nicht gezeigt. Im Gegenteil wurde nachgewiesen, dass im humanen System die mitochondrialen ISC-Proteine für die Biogenese cytosolischer Fe/S Proteine benötigt werden (Biederbick *et al.*, 2006; Tong & Rouault, 2006).

Im Jahre 2003 wurde das erste cytosolisch lokalisierte Protein mit einer spezifischen Funktion in der Biogenese von cytosolischen Fe/S Proteinen identifiziert. Dabei handelt es sich um die essentielle P-Loop NTPase Cfd1p (cytosolic Fe/S deficient) (Roy *et al.*, 2003). Cfd1p übernimmt keine Funktion in der Reifung mitochondrialer Fe/S Proteine. Das Protein weist eine entfernte Homologie zu einer großen Familie von löslichen P-Loop ATPasen auf und zeigt eine nähere Verwandtschaft zu den bakteriellen ApbC Proteinen, für die ebenfalls eine Funktion in der Fe/S Cluster Biogenese beschrieben wurde (Skovran & Downs, 2003). Die erste in unserem Arbeitskreis gefundene Komponente war Nar1p (Balk *et al.*, 2004), gefolgt von Nbp35p, dessen Charakterisierung ein Teil dieser Arbeit war.

3.7. Die Regulation der Eisenhomeostase in *S. cerevisiae*

Säuger und Hefen besitzen unterschiedliche Regulationssysteme zur Erhaltung der intrazellulären Eisenhomeostase. Während in Hefe der Eisenhaushalt auf Transkriptionsebene reguliert wird, findet die Regulation bei Säugern auf Translationsebene statt (3.4.3).

In *S. cerevisiae* wird die Eisenhomeostase größtenteils durch zwei homologe Eisen-abhängige Transkriptionsfaktoren (Aft1p und Aft2p) reguliert. Diese induzieren bei einem Eisenmangel das sog. Eisen-Regulon, welches mindestens 30 Gene umfasst (Abb. 1). Deren Produkte sind an der Eisenaufnahme über die Zellwand (Fit1-3p), die Plasmamembran (Fet3p, Ftr1p, Fre1-3p, Arn1-4p) (Blaiseau *et al.*, 2001; Rutherford *et al.*, 2001), am Eisenexport über die Vakuolenmembran (Fth1p, Fet5p, Smf3p) und am Eisenimport ins Mitochondrium (Mrs3p, Mrs4p) (Foury & Roganti, 2002), beteiligt. Darüber hinaus wird ein RNA bindendes Protein (Cth2p) kodiert, das die Stabilität von Eisen-abhängigen Genen reguliert (Puig *et al.*, 2005). Der Transkriptionsfaktor Aft1p erkennt eine bestimmte DNA-Sequenz im 5´-nicht-translatierten Abschnitt von Zielgenen, das sog. „Aft1p response element“ (ARE) (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002). Aft2p aktiviert ebenso die Transkription durch die Bindung an „iron response elements“, allerdings ist Aft2p ein schwächerer Transkriptionsaktivator als Aft1p (Rutherford *et al.*, 2003).

Aft1p und Aft2p sind in ihrer Funktion teilweise überlappend. Die Überexpression von *AFT2*, kann den Eisenaufnahmedefekt einer Δ*AFT1* Mutante teilweise aufheben. Wodurch Aft1p und Aft2p letztendlich inhibiert bzw. aktiviert werden, ist bislang unbekannt. Die zelluläre Lokalisierung von Aft1p wird durch den zellulären Eisenspiegel beeinflusst. Aft1p befindet sich bei einem Eisenüberschuss im Cytosol (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002) und wandert bei Eisenmangel in den Kern, um dort Zielgene zu aktivieren.

Neben einem Eisenmangel führen auch Inaktivierungen von Komponenten der ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie zur konstitutiven Induktion der Gene des Eisen-Regulons und zu einer Eisenakkumulation in den Mitochondrien. Demgegenüber bleibt die cytosolische Eisenmenge nahezu konstant (Chen *et al.*, 2004; Foury, 1999; Kispal *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1999; Rutherford *et al.*, 2005). Seit längerem ist bekannt, dass Störungen in der Funktion der beiden mitochondrialen ISC-Maschinerien zusätzlich einen Defekt der Häm-Biosynthese hervorrufen (Lange *et al.*, 2004). Dieser wird durch die Akkumulation eines Inhibitors

verursacht, der die Ferrochelatase (Enzym der Häm-Biosynthese) reversibel hemmt (Lange *et al.*, 2004).

Inaktivierungen von Komponenten der CIA-Maschinerie führen dagegen nicht zur Induktion der Gene des Eisen-Regulons und auch nicht zu einer Eisenakkumulation in den Mitochondrien (Rutherford *et al.*, 2005). Folglich muss es einen Zusammenhang geben, zwischen der mitochondrialen Eisenaufnahme und den beiden mitochondrialen ISC-Maschinerien. Demnach übernehmen die Mitochondrien eine entscheidende Funktion in der Regulation der zellulären Eisenhomeostase. Gegenwärtig wird angenommen, dass die ISC-Assemblierungsmaschinerie eine oder mehrere Komponenten synthetisiert, die über die mitochondriale Exportmaschinerie ins Cytosol transportiert werden. Die Komponente könnte den Eisenstatus in den Mitochondrien reflektieren und in Abhängigkeit von diesem die Lokalisierung des Transkriptionsfaktors Aft1p beeinflussen. Möglicherweise ist dies derselbe Faktor, der von der CIA-Maschinerie zur Reifung von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen benötigt wird.

3.8. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Diese Arbeit hatte zwei unterschiedliche Zielsetzungen. Im ersten Teil sollten neue CIA-Komponenten identifiziert und charakterisiert werden um die Biogenese extra-mitochondrialer Fe/S Proteine besser zu verstehen. Man wusste, dass die Reifung dieser Fe/S Proteine in Abhängigkeit der ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie erfolgt. Demgegenüber waren cytosolische Komponenten in diesem Prozess unbekannt, abgesehen von Cfd1p. In dieser Arbeit wurde die cytosolische P-Loop NTPase Nbp35p (nucleotide binding protein of 35 kDa) identifiziert und charakterisiert. Das für Hefe essentielle Protein war bereits 1996 entdeckt worden (Vitale *et al.*, 1996), dennoch war die physiologische Rolle von Nbp35p zu Beginn dieser Arbeit unbekannt. Nbp35p und Cfd1p gehören der Mrp/MinD Familie an, deren besonderes Merkmal ein konservierter Bereich (KGG) im Walker A Motiv ist, welches der Bindung eines Nukleotids dient (Leipe *et al.*, 2002). Es wurde bereits gezeigt, dass die Integrität der Nukleotid-Bindedomäne für die Funktion des Proteins essentiell ist (Vitale *et al.*, 1996). Es ist möglich, dass Nbp35p ATP oder GTP binden und hydrolysieren kann. Allerdings war die mögliche ATPase Aktivität von Nbp35p nicht Gegenstand dieser Arbeit. Ein weiteres Charakteristikum von Nbp35p ist ein cysteinreicher N-terminaler Abschnitt, der in allen eukaryotischen

Nbp35p-Homologen, nicht aber in Eubakterien und Archaea präsent ist und ein Bindemotiv für Metalle oder einen Fe/S Cluster darstellen könnte. Es galt die Funktion dieses Sequenzmotivs zu klären. Darüber hinaus weist Nbp35p eine erhebliche Homologie zu Cfd1p auf (Abb. 4). Auf Grund dessen stellte sich die Frage, ob Nbp35p ebenfalls an der Biogenese von Fe/S Clustern beteiligt ist. Im Folgenden werden Daten präsentiert, die zeigen, dass Nbp35p ein Fe/S Protein ist, dessen Reifung von Komponenten der ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie abhängt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Nbp35p an der Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen mitwirkt. Inzwischen wurden von Kollegen des Arbeitskreises zwei weitere Komponenten in diesem Prozess (Nar1p, Cia1p) identifiziert (Balk *et al.*, 2004; Balk *et al.*, 2005) und weitere Komponenten (Met18p, Cia2p) werden gegenwärtig bearbeitet. Diese Proteine werden im Verlauf dieser Arbeit als CIA-(cytosolic Fe/S cluster assembly) Maschinerie zusammengefasst.

Die Entdeckung der ersten Komponente der CIA-Maschinerie erlaubte eine umfassende und vergleichende Analyse der drei Fe/S Protein-Biogenese Maschinerien anzustellen und den Einfluss von Störungen in diesen Maschinerien auf andere zelluläre Funktionen zu testen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte daher die Bedeutung der zellulären Fe/S Protein-Biogenese für die Regulation der Eisenhomeostase in der Zelle näher untersucht werden. Wie oben beschrieben verursachen Störungen in den beiden mitochondrialen ISC-Maschinerien die Induktion der Gene des Eisen-Regulons, eine zusätzliche Eisenakkumulation in den Mitochondrien und einen Häm-Defekt. Um diese Zusammenhänge besser verstehen zu können, wurden repräsentative Mutanten der ISC-Assemblierungs- (*YAH1*), Export- (*ATM1*) und CIA- (*NBP35*) Maschinerie einer genom-weiten DNA-Microarray-Analyse unterzogen. Die einzelnen Expressionsprofile der Mutanten wurden untereinander verglichen um gemeinsam und unterschiedlich regulierte Gene zu identifizieren. Darüber hinaus sollte dieser Versuchsansatz zu einem besseren Verständnis der Zusammenhänge zwischen Fe/S Cluster- und Häm-Biogenese führen.

4. Material und Methoden

4.1. *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_{K^-}, m_{K+}) supE44 relA1 deoR ΔlacU169(ϕ80 lacZ DM15)*	Promega, Mannheim
BL21 (DE3)		Novagen, Madison, WI, USA

4.2. *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
W303-1A	*MATa ade2-1 ura3-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3, 112 can1-100 GAL*$^+$	DSMZ [1)]
W303-1B	*MATα ade2-1 ura3-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3, 112 can1-100 GAL*$^+$	DSMZ [1)]
NBP35TAP	*MATa ade2 arg4 leu2-3, 112 trp1-289 ura3-52, NBP35* mit fusioniertem *TAP* tag am C-Terminus	Euroscarf [2)]
Gal-NBP35	W303-1A, endogener *NBP35* Promotor durch *GAL1-10* Promotor und *HIS3* ersetzt	diese Arbeit
Gal-NFS1	W303-1A, endogener *NFS1* Promotor durch *GAL1-10* Promotor und *LEU2* ersetzt	(Kispal *et al.*, 1999)
Gal-SSQ1	W303-1A, endogener *SSQ1* Promotor durch *GAL1-10* Promotor und *HIS3* ersetzt	(Mühlenhoff *et al.*, 2003)
Gal-YAH1	W303-1B, endogener *YAH1* Promotor durch *GAL1-10* Promotor und *LEU2* ersetzt	(Lange *et al.*, 2000)
W303-1A *Δaco1*	W303-1A, *aco1::LEU2*	(Hausmann *et al.*, 2006) [3)]
W303-1A *Δsod1*	W303-1A, *sod1::LEU2*	(Hausmann *et al.*, 2006) [3)]
W303-1A *Δcyt2*	W303-1A, *cyt2::LEU2*	(Steiner *et al.*, 1995)
Gal-HEM15	W303-1A, endogener *HEM15* Promotor durch *GAL1-10* Promotor und *HIS3* ersetzt	(Hausmann *et al.*, 2006) [3)]
Gal-ATM1	W303-1B, endogener *ATM1* Promotor durch *GAL1-10* Promotor und *LEU2* ersetzt	(Kispal *et al.*, 1999)
W303-1A *Δhmx1*	W303-1A, *hmx1::HIS3*	diese Arbeit
Gal-ATM1 *Δhmx1*	W303-1B, *hmx1::HIS3*	diese Arbeit
Gal-YAH1 *Δhmx1*	W303-1B, *hmx1::HIS3*	diese Arbeit

[1)] DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
[2)] Hergestellt durch CellZome AG, Heidelberg, Genfusionskassette komplementiert *URA3* Auxotrophie, Accession Number: SC0234. [3)]Manuskript in Bearbeitung.

4.3. Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium (1% (v/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt und 1% (w/v) NaCl) und wurde je nach Bedarf mit Antibiotika (100 µg/ml Ampicillin), versetzt (Sambrook & Russel, 2001). Die Anzucht von *E. coli* erfolgte aerob bei 37°C. Flüssigkulturen wurden für eine ausreichende Belüftung auf einem Schüttelinkubator (250 Upm) inkubiert. Festmedien enthielten 2% (w/v) Bacto-Agar.

4.4. Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefen wurden in Vollmedium (YP) oder unter Berücksichtigung der Auxotrophie-Marker auf Minimalmedium (SC) bei 30°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei 150 Upm auf einem Schüttelinkubator angezogen. Festmedien enthielten 2% (w/v) Bacto-Agar.

Vollmedium (YP)	1% (w/v)	Hefeextrakt
	2% (w/v)	Bacto-Pepton
	2% (w/v)	Glukose oder Galaktose (Kohlenstoffquelle)
Vollmedium (YP) mit Laktat	0,3% (w/v)	Hefeextrakt
	0,1% (w/v)	Glukose
	0,05% (w/v)	$CaCl_2 \times H_2O$
	0,05% (w/v)	NaCl
	0,06% (w/v)	$MgCl_2$
	0,1% (w/v)	KH_2PO_4
	0,1% (w/v)	NH_4Cl
	2% (w/v)	90% Laktat
		mit NaOH auf pH 5,5 eingestellt
Minimalmedium (SC)	0,17% (w/v)	Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren
	0,5% (w/v)	Ammoniumsulfat
	2% (w/v)	Glukose, Galaktose oder Glycerin als Kohlenstoffquelle
Eisenarmes SC-Medium	50 ml/l	20x Salze
	5 ml/l	200x Vitamine
	1 ml/l	1000x Spurenelemente
	2% (w/v)	Glukose oder Galaktose als Kohlenstoffquelle
20x Salze	17 g/l	KH_2PO_4
	3 g/l	K_2HPO_4
	2 g/l	NaCl
	100 g/l	NH_2SO_4
	10 g/l	$MgSO_4$
	2 g/l	$CaCl_2$
200x Vitamine	400 mg/l	Pantothenat
	400 mg/l	Thiamin
	400 mg/l	Pyridoxin
	4 mg/l	Biotin
	4 g/l	Inositol

1.000x Spurenelemente	500 mg/l	H_3BO_3
	40 mg/l	$CuSO_4$
	100 mg/l	KJ
	500 mg/l	$MnCl_2$
	200 mg/l	$NaMoO_4$
	200 mg/l	$ZnSO_4$
Je nach Auxotrophie-Marker der kultivierten Stämme wurden folgende Aminosäuren und Supplemente den SC-Medien zugesetzt		
Aminosäuren/Supplemente	80 mg/l	Adenin
	20 mg/l	Uracil
	20 mg/l	Methionin
	40 mg/l	Tryptophan
	20 mg/l	Histidin
	60 mg/l	Leucin
	30 mg/l	Lysin

4.5. Puffer

20x SSC	0,4 M	Natrium-Citrat, pH 7,0
	4 M	NaCl
TNETG-Puffer	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
	2,5 mM	EDTA
	10% (v/v)	Glycerin
	0,5% (v/v)	Triton X-100

4.6. Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Bezeichnung	**Sequenz (5´ – 3´Richtung)**
Promotoraustausch für Gal-NBP35 Zellen	
NBP35 Prom	CGTAGGCTAGGCTAAACGTGAAGTCTTTCTGTTTTGAGAACAACAGTA TCGATGAATTCGAGCTC
NBP35 ORF	TACTCTGCTGGTAGCACTTCGTCGTTTACATGTGGTAGTATCTCAGTC ATCGAATTCCTTGAATTTTC
Promotoraustausch für Gal-Hem15 Zellen	
Gal-Hem15 Prom	CAGTAAAATAATTACAAATATGTAGCATGTGTAGGATGCCTTGAAACAT CGATG
Gal-Hem15 ORF	TTAGGAAGGAACCTTGTGTACGGATTGTTCTGGAAAGCATTCTTTAAA CGA
Amplifizierung von *Nbp35-TAP*	
Nbp35-HindIII	CCCC**AAGCTT**ATGACTGAGATACTACCACA
TAP-XhoI	TATA**CTCGAG**TCAGGTTGACTTCCCCGCGG

Bezeichnung	Sequenz (5´ – 3´Richtung)
Überprüfung: *NBP35* Promotor Austausch durch *GAL1-10*	
Gal10 forw	AAACTTCTTTGCGTCCATCC
BamHI-Nbp35 rev	CC**GGATCC**TACATCCCCCACAGC
Amplifizierung von *Δ1-52Nbp35-TAP*	
HindIII-ΔN forw	CACCC**AAGCTT**ATGCTTCCGAAAGGCCCTGATCC
TAP-XhoI	TATA**CTCGAG**TCAGGTTGACTTCCCCGCGG
Klonierung von *NBP35-HIS* in pET15b	
Nbp35-VspI	CAACAG**ATTAAT**ATGACTGAGATACTACCAC
Nbp35-XhoI	CG**CTCGAG**CTATACATCCCCCACAGC
Amplifizierung von *NBP35-strep*	
Nbp35-cStrep-Xho1	CG**CTCGAG**TTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGTTTACATCCCCC ACAGCATCTC
Amplifizierung von *HMX1*	
HMX1-HindIII_forw	GGAAA**AAGCTT**ATGGAGGACAGTAGCAATAC
HMX1-XhoI_rev	CAGAG**CTCGAG**TTATACTATGCTAAGAAAACTC
***HMX1* Deletion**	
S1HMX1_N-term	ATGGAGGACAGTAGCAATACAATCATACCCTCACCCACTGACGTGCGT ACGCTGCAGGTCGAC
S1HMX1_C-term	TTATACTATGCTAAGAAAACTCTTTACCAAGAAGTAAAGAACCCAATCG ATGAATTCGAGCTCG
Überprüfung der *HMX1* Deletion	
5up-HMX1 forw	CTCATACTCTCTTGCTTAGTC
HIS5/Pst1 rev	TGCAGTGTGATGATCATCGATG
cDNA Synthese	
Oligo T20/VN	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN

Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind fett gedruckt.

4.7. Verwendete Vektoren

4.7.1. E. coli Plasmide

Bezeichnung	Marker	Beschreibung	Referenz
pBluescript II KS+	*Amp*^{R}	leerer Vektor	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pFA6a-HIS3 [1)]	*Amp*^{R}	*S. pombe HIS5* / *GAL1-10* Promotor	(Muhlenhoff *et al.*, 2002)
PΔFA6a-HIS3 [1)]	*Amp*^{R}	*S. pombe HIS5*	(Muhlenhoff *et al.*, 2002)
pET15b	*Amp*^{R}	leerer Vektor	Novagen, Madison, WI, USA

Bezeichnung	Marker	Beschreibung	Referenz
pET15b-NBP35-His	*Amp*^{R}	*NBP35*	D. Aguilar-Netz

[1)] *S. pombe HIS5* (Ortholog von *S. cerevisiae HIS3*)

4.8. *S. cerevisiae* Plasmide

Bezeichnung (Marker, ARS/CEN bzw. 2µ)	Beschreibung	Referenz
pHK252	enthält 2 Kopien von GFP	(Rutherford *et al.*, 2005)
p*FET3*-GFP	basiert auf pHK12, GFP unter Kontrolle des *FET3* Promotors	(Rutherford *et al.*, 2005)
p*CYC1*-GFP	basiert auf pHK12, GFP unter Kontrolle des *CYC1* Promotors	U. Mühlenhoff
P416 Met25 (*Amp*^{R}*, URA3,* ARS/CEN)	leerer Vektor	(Mumberg *et al.*, 1995)
p416 Met-hRluc (*Amp*^{R}*, URA3,* ARS/CEN)	*Renilla reniformis* Gen *hRluc* (HindIII/SalI) aus dem Vektor pGL4.70 (Promega, Mannheim)	U. Mühlenhoff
p416 *ERG3*-hRluc (*Amp*^{R}*, URA3,* ARS/CEN)	*hRluc* unter Kontrolle des *ERG3* Promotors (SacI/HindIII)	U. Mühlenhoff
p416 *BIO2*-hRluc (*Amp*^{R}*, URA3,* ARS/CEN)	*hRluc* unter Kontrolle des *BIO2* Promotors (SacI/HindIII)	U. Mühlenhoff
p416 *GLT1*-hRluc (*Amp*^{R}*, URA3,* ARS/CEN)	*hRluc* unter Kontrolle des *GLT1* Promotors (SacI/HindIII)	U. Mühlenhoff
p424 GPD (*Amp*^{R}*, TRP1,* 2µ)	leerer Vektor	(Mumberg *et al.*, 1995)
P426 GPD (*Amp*^{R}*, URA3,* 2µ)	leerer Vektor	(Mumberg *et al.*, 1995)

Plasmide zur Überexpression von Proteinen

p426 NBP35-TAP (*Amp*^{R}*, URA3*)	*NBP35-TAP* unter Kontrolle des *TDH3* Promotors	Diese Arbeit
p426 ∆1-52 NBP35-TAP (*Amp*^{R}*, URA3*)	*∆1-52 NBP35-TAP* unter Kontrolle des *TDH3* Promotors	Diese Arbeit
p426 BIO2 (*Amp*^{R}*, URA3*)	*BIO2* unter Kontrolle des *TDH3* Promotors	K. Siegmund
p426 RLI1-HA (*Amp*^{R}*, URA3*)	*RLI1-HA* unter Kontrolle des *TDH3* Promotors	(Lange *et al.*, 2001)
p426 CFD1 (*Amp*^{R}*, URA3*)	*CFD1* unter Kontrolle des *TDH3* Promotors	(Hausmann *et al.*, 2005)
p424 NBP35 (*Amp*^{R}*, TRP1*)	*NBP35* unter Kontrolle des *TDH3* Promotors	(Hausmann *et al.*, 2005)
p424 NAR1 (*Amp*^{R}*, TRP1*)	*NAR1* unter Kontrolle des *TDH3* Promotors	(Hausmann *et al.*, 2005)
p424 NTG2 (*Amp*^{R}*, TRP1*)	*NTG2* unter Kontrolle des *TDH3* Promotors	(Hausmann *et al.*, 2005)

Bezeichnung (Marker, ARS/CEN bzw. 2µ)	**Beschreibung**	**Referenz**
p426 NTG2-HA (*Amp^R, URA3*)	*NTG2 mit HA-tag* unter Kontrolle des *TDH3* Promotors	(Balk *et al*., 2004)
p426 NAR1-HA (*Amp^R, URA3*)	*NAR1 mit HA-tag* unter Kontrolle des *TDH3* Promotors	(Balk *et al*., 2004)
p426 NFS1 (*Amp^R, URA3*)	*NFS1* unter Kontrolle des *TDH3* Promotors	(Kispal *et al*., 1999)
p426 HMX1 (*Amp^R, URA3*)	*HMX1* (HindIII/XhoI) unter Kontrolle des *TDH3* Promotors	diese Arbeit

4.9. Konstruktion verschiedener Stämme und Plasmide

4.9.1. Gal-NBP35 Zellen

In Wildtypzellen (W303-1A) wurde der endogene Promotor des Gens *NBP35* durch den regulierbaren Promotor *GAL1-10* ersetzt. Das Plasmid pFA6a-HIS3 (4.7.1) enthielt bereits den *GAL1-10* Promotor und den Marker *HIS5* von *S. pombe*. Mit den Oligonukleotiden NBP35Prom, NBP35ORF und Plasmid-DNA (pFA6a-HIS3) wurde ein PCR Produkt amplifiziert. Das resultierende Fragment bestand aus dem *HIS5* Gen und dem *GAL1-10* Promotor, eingerahmt von 48 bp bzw. 50 bp langen Bereichen mit Homologie zum endogenen Promotor bzw. zum unmittelbaren N-Terminus von *NBP35*. Das Fragment wurde nach Analyse auf einem Agarose-Gel aus diesem aufgereinigt und in Wildtypzellen transformiert. Das Fragment ersetzte über homologe Rekombination die Region -69 bis -1. Die korrekte Insertion wurde mit einer PCR unter Verwendung der Oligonukleotide Gal10 for und BamHI Nbp35 rev überprüft. Die Zellen ließen sich auf Minimalmedium ohne Histidin selektionieren.

4.9.2. Gal-HEM15 Zellen

In Wildtypzellen (W303-1A) wurde der endogene *HEM15* Promoter durch einen *GAL1-10* Promotor ersetzt. Zur Amplifikation des Fragments wurden die Oligonukleotide Gal-Hem15 Prom, Gal-Hem15 ORF und Plasmid-DNA (pFA6a-HIS3) verwendet (4.9.1). Die Zellen ließen sich anschließend auf Minimalmedium ohne Histidin selektionieren. Die Funktionalität der Zellen wurde mit einer Western Blot Analyse überprüft.

4.9.3. Disruption des Hefe-Gens HMX1

Das endogene *HMX1* Gen wurde in den Stämmen W303-1A, Gal-ATM1 und Gal-YAH1 disruptiert. Dazu wurde aus Plasmid-DNA (pΔFA6a-HIS3) und den Oligonukleotiden S1HMX1_N-term und S1HMX1_C-term ein PCR Produkt generiert. Das resultierende Fragment besaß den *HIS5* Marker, flankiert von 50 bp langen homologen Bereichen zum 5´ und 3´ Bereich des *HMX1* Gens. Das PCR Produkt wurde in die genannten Stämme transformiert und inserierte über homologe Rekombination. Die korrekte Insertion wurde mit den Oligonukleotiden 5up-HMX1 forw und HIS5/Pst1 rev überprüft. Die Zellen ließen sich auf Minimalmedium ohne Histidin selektionieren.

4.9.4. Plasmid p426NBP35-TAP zur Expression eines TAP-markierten Nbp35p

Der vollständige *NBP35* ORF mit einer am C-Terminus fusionierten *TAP* Sequenz wurde durch PCR mit den Primern Nbp35-HindIII und TAP-XhoI aus genomischer DNA (NBP35TAP-Stamm, 4.2) amplifiziert. Das Fragment wurde auf einem Agarose-Gel analysiert und aus diesem aufgereinigt. Durch die Wahl der Oligonukleotide wurde eine 5´ *Hind*III und eine 3´ *Xho*I Erkennungssequenz an das Fragment angefügt. Das Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Xho*I geschnitten und in den Vektor p426GPD (4.8), der ebenfalls mit *Hind*III und *Xho*I geschnitten wurde, ligiert.

4.9.5. Plasmid p426Δ1-52NBP35-TAP

Die Sequenz *Δ1-52NBP35-TAP* wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden HindIII-ΔN forw und TAP-XhoI aus der p426*NBP35TAP* Vektor-DNA amplifiziert. Das resultierende Fragment ist am 5´ Abschnitt, gegenüber der Originalsequenz, um 52 Codons verkürzt. Der Vektor p426GPD und das Fragment *Δ1-52NBP35-TAP* wurden mit *Hind*III und *Xho*I geschnitten, auf einem Agarose-Gel analysiert, und aus diesem aufgereinigt und miteinander ligiert.

4.9.6. Plasmid p426NBP35-Strep

Der offene Leserahmen von *NBP35* wurde durch PCR mit den Primern Nbp35-HindIII und Nbp35-cStrep-Xho1 aus genomischer DNA (W303-1A, 4.2) amplifiziert. Das 3´ Oligonukleotid wurde so gewählt, dass am 3´ Abschnitt von *NBP35* eine

Strep-*tag* Sequenz angefügt wurde. Das resultierende Fragment und der Vektor p426GPD wurden mit *Hind*III und *Xho*I geschnitten, auf einem Agarose-Gel analysiert, aus diesem aufgereinigt und miteinander ligiert.

4.9.7. Plasmid pET15B-HIS-NBP35

Der offene Leserahmen von *NBP35* wurde durch PCR mit den Primern Nbp35-VspI und NBP35-XhoI aus genomischer DNA (W303-1A, 4.2) amplifiziert. Durch die Konstruktion der Oligonukleotide wurde eine 5´ *Vsp*I und eine 3´ *Xho*I Erkennungssequenz an das Fragment angefügt. Der Vektor (pET15b) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Xho*I geschnitten, während das Fragment mit *Vsp*I und *Xho*I geschnitten wurde. Restriktionsendonukleasen, die *Vsp*I und *Nde*I Schnittstellen erkennen, erzeugen kompatible Enden. Vektor und Fragment wurden miteinander ligiert. Das Fragment wurde hinter eine HexaHistidin-Sequenz des Vektors eingefügt (Klonierung hergestellt von D. Aguilar-Netz).

4.9.7.1. Überprüfung der Vektoren

Die Integration der Gene in die Vektoren wurde durch eine Restriktionsanalyse bestätigt. Die entstandenen Vektoren wurden durch eine DNA-Sequenzierung überprüft.

4.10. Rekombinante DNA-Techniken

4.10.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse (Maniatis *et al.*, 1982). Die Bakterien wurden in 5 ml LB-Amp über Nacht kultiviert.
Für DNA-Sequenzierungen wurden die Plasmide mit dem NucleoSpin Plasmid-Kit von Macherey-Nagel (Düren) nach Angabe des Herstellers isoliert.

4.10.2. Isolierung genomischer DNA aus S. cerevisiae

Für die Präparation von genomischer DNA aus Hefe wurden 5 – 20 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur verwendet (Hoffman & Winston, 1987). Die Zellen wurde durch Zentrifugation (3.000 Upm, 3 min) sedimentiert und in 200 µl TEST-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Phenol-Chloroform (Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol = 25:24:1) und 0,3 g Glasperlen (Ø 0,45 mm) wurde die Probe kräftig gemischt und anschließend mit 200 µl TE-Puffer versetzt. Die Suspension wurde

5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert, die wässrige (obere) Phase wurde einer erneuten Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Nach der DNA-Fällung aus der wässrigen Phase mit Ethanol (4.11) wurde diese in 50 µl TE-Puffer + RNase (20 µg/ml) aufgenommen und ca. 30 min bei 37°C inkubiert. Durch eine weitere Ethanol-Fällung wurde die DNA wieder aufgereinigt und in 50 – 500 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

TEST-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA
	100 mM	NaCl
	2% (v/v)	Triton X-100
	1% (v/v)	SDS
TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA

4.11. Reinigung und Analyse von DNA

4.11.1. Phenol-Chloroform Extraktion

Um restliche Proteine aus DNA-Lösungen zu entfernen, wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt (Sambrook & Russel, 2001). Diese Methode beruht auf der Aggregation von Proteinen an der Phasengrenze zwischen organischer und wässriger Phase, während Nukleinsäuren in der wässrigen Phase gelöst bleiben. Zunächst wurde die DNA-Lösung mit Phenol-Chloroform (Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol = 25:24:1) im Verhältnis 1:1 versetzt und kräftig gemischt. Die DNA-haltige wässrige (obere) Phase wurde nach Zentrifugation (5 min, 13.000 Upm) abgenommen und zur Entfernung von Phenolresten mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde die DNA aus der wässrigen Phase durch eine Ethanol-Fällung präzipitiert.

4.11.2. Ethanol-Fällung

Die Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 3 Volumen absolutem Ethanol (p. a.) bei -20°C (über Nacht) oder bei -80°C (ca. 1 h) (Shaprio, 1981). Die DNA wurde durch Zentrifugation (30 min, 13.000 Upm, 4°C) sedimentiert, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in H_2O aufgenommen.

4.11.3. Agarose-Gelelektrophorese

Für analytische und präparative Zwecke wurden Plasmide und lineare DNA-Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese getrennt (Sambrook & Russel, 2001). Die Gel-Matrix bestand aus 1–2% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer und Ethidiumbromid (1 µg/ml). Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10x Probenpuffer versetzt, und die Elektrophorese erfolgte bei 80–120 V in 1x TAE Puffer. Als Größenstandard diente die 1 kb DNA Leiter von MBI Fermentas (Leon-Rot). Mittels UV-Licht (302 nm) ließ sich die DNA visualisieren und mit einem Thermoprinter dokumentieren.

4.11.4. DNA Extraktion aus Agarose-Gelen

Zur Extraktion und Reinigung der DNA aus Agarose-Gelen wurde das NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

4.11.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Reaktionen zur Amplifizierung definierter DNA-Fragmente wurden in einem 50 µl PCR Reaktionsvolumen angesetzt. Als Original-DNA Vorlage dienten genomische und Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*. Für die PCR wurde die Combi*Zyme* DNA Polymerase (Invitek, Berlin) verwendet. Die mittlere Schmelztemperatur T_m der Oligonukleotide wurde mit folgender Formel berechnet: $T_m = 69{,}3 + 0{,}41 \times (\%GC) - 650 \times n^{-1}$ (n = Anzahl der Nukleotide).

50 µl PCR-Ansatz	variabel ≤1 µg	Original-DNA
	5 µl	10x OptiPerform Puffer III ohne Mg^{2+}
	1 µl	50x $MgCl_2$ (Endkonzentration 2,5 mM)
	1 µl	dNTPs (Endkonzentration 0,25 mM pro dNTP)
	0,25–1 µl	Primer 1 und 2 (Endkonzentration je 0,2–1 µM)
	variabel	Combi-Polymerase (1–4 Units)
	variabel	H_2O

Die Amplifikation wurde nach folgendem Schema im Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt:

Zeit	Temperatur	Reaktion
5 min	95°C	Initialschmelzung
30 Zyklen		
30 sec	93°C	Denaturierung
30 sec	52–56°C	Annealing
1 min pro 1 kb	72°C	Elongation
10 min	72°C	Vervollständigung der PCR Produkte

4.11.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurekonzentrationen in Lösungen konnten mit Hilfe eines UV/VIS Spektralphotometers V-550 (Jasco, Groß-Umstadt) bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, bestimmt werden. Für DNA entspricht eine Absorption von A_{260} = 1 einer Konzentration von 50 µg/ml (Maniatis *et al.*, 1982). Für RNA entspricht eine Absorption von A_{260} = 1 einer Konzentration von 40 µg/ml. Der Quotient aus einer Absorption bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) stellt ein Maß für die Reinheit der Präparation dar. Für RNA sollte der Quotient zwischen 1,9–2,1 liegen.

4.11.7. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen der Firmen New England Biolabs und Fermentas gemäß den Angaben der Hersteller in den entsprechenden mitgelieferten Puffern bei einer Enzymkonzentration von ca. 2-3 U pro µg DNA für 1,5 h gespalten. Anschließend erfolgte die Analyse der Proben durch Agarose-Gelelektrophorese.

4.11.8. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde die T4 DNA-Ligase (Promega, Mannheim) verwendet. Dieses Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung durch die Verknüpfung einer freien 3'-Hydroxygruppe mit einer freien 5'-Phosphatgruppe des DNA-Rückgrats unter Verbrauch von ATP. Die Ligation erfolgte in einem Endvolumen von 20 µl mit 1 µl T4 DNA-Ligase (3 Units) und 2 µl T4 DNA 10x Ligase-Puffer (Promega, Mannheim). Vektor und DNA-Fragment wurden im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

4.11.9. Transformation von E. coli mit rekombinanter DNA

Die Transformation von *E. coli* erfolgte mittels Elektroporation (Dower *et al.*, 1988). Um *E. coli* für diese Transformationstechnik kompetent zu machen, wurden die Zellen in LB-Medium bis zu einer OD_{600nm} = 0,5 – 0,7 kultiviert und dann 30 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 3.000 Upm) geerntet, zweimal mit 1 l eiskaltem H_2O und einmal in ca. 20 ml 10% (v/v) Glycerin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10% (v/v) Glycerin resuspendiert, so dass die Suspension eine Zellzahl von ca. 3×10^{10} Zellen/ml aufwies. Die Lagerung der elektrokompetenten Zellen erfolgte in Aliquots bei –80°C. Für die Transformation wurden die Zellen und die zu transformierende DNA in einer 0,2 cm Elektroporationsküvette gemischt und einem elektrischen Puls von 2,25 kV für 4,5 ms bei 200 W und 25 µF ausgesetzt. Die Erholungsphase erfolgte für 1/2 h bei 37°C in LB-Medium. Danach wurde der Transformationsansatz auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.11.10. Transformation von Hefe mit rekombinanter DNA

Die Hefe *S. cerevisiae* wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der Lithiumacetat-Methode transformiert (Ito *et al.*, 1983). Diese Methode kam bei der Transformation von Hefe mit Plasmid-DNA und mit linearen DNA-Fragmenten zur homologen Rekombination ins Genom zum Einsatz. Dazu wurden die Zellen in Flüssigkultur bis zu einer OD_{600nm} = 0,6 – 1 inkubiert und durch Zentrifugation (5 min, 3.000 Upm) geerntet. Der Zellniederschlag wurde jeweils einmal mit H_2O und mit Lithiumacetat-Lösung gewaschen. Anschließend wurde dieser in 1 ml Lithiumacetat-Lösung aufgenommen. 100 µl dieser Zellsuspension wurden mit 2,5 µl denaturierter Träger-DNA (aus

Lachssperma) und 5 – 10 µg zu transformierender DNA versetzt und 30 min bei 30°C geschüttelt. Zu der Probe wurden 700 µl PEG-Lösung gegeben, es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 15 min. Anschließend wurden die Zellen in H_2O gewaschen und auf Selektionsplatten (SC-Medium) ausgestrichen. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert, Transformanden konnten nach 2 – 5 Tagen isoliert werden.

Lithiumacetat-Lösung	100 mM	Lithiumacetat
	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 mM	EDTA
PEG-Lösung	40%	PEG 4.000
	100 mM	Lithiumacetat
	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 mM	EDTA

4.12. RNA-Techniken

4.12.1. Herstellung RNase-freier Geräte und Lösungen

Glas und Metallgeräte wurden in Alufolie eingeschlagen und durch 6-stündiges Erhitzen auf 160°C vorbereitet. Plastikgeräte wurden 20 min in 3%ige H_2O_2 Lösung gelegt und anschließend mit DEPC-behandeltem H_2O ausgespült. Wasser wurde mit DEPC in einer Endkonzentration von 0,1% versetzt, bei 37°C über Nacht geschüttelt und anschließend autoklaviert. Lösungen, die nicht mit DEPC behandelt werden konnten, wurden mit Chemikalien aus original verschlossenen Behältern hergestellt.

4.12.2. Extraktion von Gesamt-RNA aus S. cerevisiae

Gesamt-RNA wurde aus exponentiell wachsenden Zellen (OD_{600} = 0,5–0,6) mit dem RNeasy Kit von Qiagen (Hilden) nach Anleitung des Herstellers isoliert und durch DNase I Behandlung von unerwünschter DNA gereinigt. Nach Zugabe von 20 Units RNasin (Promega, Mannheim) wurde die RNA bei -80°C gelagert.

4.12.3. RNA Konzentrierung mit Natriumacetat

Zur Konzentrierung von RNA Proben wurden diese mit 0,3 M Natriumacetat pH 5,2 (Endkonzentration) und 2,5–3,0 Volumen Ethanol (p. a.) vermischt und 2 h bei -80°C gefällt (Sambrook & Russel, 2001). Die RNA wurde anschließend bei 10.000 *xg* für 30 min bei 0°C abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 70%igen Ethanol gewaschen und erneut bei 10.000 *xg* für 10 min zentrifugiert. Die gefällte RNA wurde getrocknet und in H_2O gelöst.

4.13. Northern Blot Analyse

4.13.1. Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarose-Gelen

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA wurde ein 1,5%iges Agarose-Gel unter RNase-freien Bedingungen gegossen. Zu diesem Zweck wurden 1,5 g Agarose in 72 ml DEPC-behandelten H_2O durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf 55°C wurden 10 ml 10x MOPS und 18 ml Formaldehyd hinzugegeben. Das Gel wurde möglichst dünn gegossen und nach Erkalten mit 1x MOPS Puffer als Laufpuffer überschichtet.

Die Gelkammer sowie Gelträger und Kamm wurden zuvor mit 3%iger H_2O_2 Lösung für 20 min vorbehandelt und anschließend mit DEPC-behandeltem H_2O abgespült. Nach einem 5-minütigen Vorlauf, bei 5 V/cm, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der RNA bei gleicher Spannung. Es wurden 20 µg Gesamt-RNA/Spur eingesetzt. Die RNA wurde mit 2 µl 10x MOPS Puffer, 4 µl Formaldehyd, 10 µl Formamid und 1 µl Ethidiumbromid (200 µg/ml) vermischt. Die Proben wurden vor dem Auftragen bei 85°C für 10 min denaturiert und anschließend sofort auf Eis gegeben. Zum Ansatz wurden 2 µl 10x Ladepuffer (50% Glycerin, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylen Cyanol FF) pipettiert. Nach dem Lauf wurde die RNA unter UV-Licht sichtbar gemacht, mit einer Kamera fotografiert und mit einem Thermoprinter dokumentiert.

10x MOPS Puffer	0,2 M	MOPS, pH 7,0
	20 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA

4.13.2. RNA Transfer auf Nylonmembranen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNA in einem Agarose-Gel wurde dieses durch 10 min waschen in 20x SSC (4.5) vom Formaldehyd befreit (Sambrook & Russel, 2001). Die RNA wurde dann durch einen sog. „upward capillary transfer“ auf eine in 10x SSC equilibrierte Nylonmembran (Hybond N+, GE Healthcare, Freiburg) übertragen. Als Transferpuffer diente 10x SSC. Der Transfer erfolgte bei RT und dauerte 8 h. Anschließend wurde die RNA mittels UV Licht unter Verwendung des Stratalinker UV Crosslinker (245 nm, 50 s, bei 120 mJ/cm^2) mit der Nylonmembran quervernetzt.

4.13.3. Methylenblau-Färbung von RNA

Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurde die Nylonmembran nach der UV-Behandlung bei RT 10 min mit einer Methylenblau-Lösung (0,04% Methylenblau in 0,5 M Natriumacetat) gefärbt und in DEPC-behandeltes H_2O entfärbt, bis die Banden der 18S und 26S rRNA sichtbar wurden. Bis zur weiteren Anwendung wurde die Nylonmembran in Alufolie bei RT gelagert.

4.13.4. Herstellung von ^{32}P markierten DNA Sonden

Die Markierung der DNA Sonden erfolgte mit dem HexaLabel DNA Labelling Kit von MBI Fermentas (Leon-Rot) nach Anleitung des Herstellers. Die Template DNA wird dabei zunächst denaturiert, es lagern sich Hexanukleotide an, diese werden von dem Klenow-Fragment (exo$^-$) als Oligonukleotide verwendet. Als Original-DNA wurden ein Restriktionsfragment (*HEM15*) und PCR Produkte (*HMX1, ACT1*) verwendet. Jeder Ansatz wurde mit 5 µl α-^{32}P-dATP (3.000 Ci/mmol, 10 µCi/µl, Hartmann Analytic, Braunschweig) markiert. Die Entfernung freier Nukleotide erfolgte über MicroSpin^{TM} G-50 Säulchen (GE Healthcare) nach Anleitung des Herstellers. Die Einbaurate von α-^{32}P-dATP wurde in einem Szintillationszähler bestimmt (Sambrook & Russel, 2001).

4.13.5. RNA/DNA Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde in einer Hybridisierungsröhre, mit einem auf 42°C vorgewärmten Hybridisierungspuffer 30 min (ULTRAhyb, Ambion), vorinkubiert. Anschließend wurde der Puffer verworfen und durch eine ^{32}P-markierte DNA Sonde in 10 ml vorgewärmten Hybridisierungspuffer ersetzt. Die DNA Sonde wurde kurz vorher durch Erhitzen auf 100°C für 5 min denaturiert. Die RNA/DNA Hybridisierung erfolgte bei einer Temperatur von 42°C in einem Hybridisierungsofen und dauerte 20 h. Unspezifisch gebundene Sonden wurden durch 2x Waschen mit 2x SSC, 0,1% SDS für 5 min und 2x Waschen mit 0,1x SSC, 0,1% SDS für 15 min bei 42°C entfernt. Die noch feuchte Membran wurde in Klarsichtfolie eingeschlagen und in eine Filmkassette mit Verstärkerfolie gelegt. Zur Signaldetektion wurde ein Röntgenfilm (Kodak Bio Max MS Film, MS-1, Sigma-Aldrich) aufgelegt, die Exposition fand bei -80°C statt.

4.13.6. Entfernung hybridisierter Sonden

Auf Nylonmembranen hybridisierte Sonden wurden bei Bedarf unter Rotation in einem Hybridisierungsofen entfernt (Sambrook & Russel, 2001). Dies erfolgte in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,2% SDS bei 70–75°C für die Dauer von 2 h.

4.14. Bearbeitung von *S. cerevisiae* cDNA-Microarrays

4.14.1. Herstellung Cy3- und Cy5 markierter cDNA

Die Isolierung der RNA erfolgte wie unter 4.12.2 beschrieben. Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde diese auf einem denaturierendem Agarose-Gel analysiert. Es wurden 12–15 µg Gesamt-RNA mit dem CyScribe Post-Labelling Kit (GE Healthcare, München) nach Anleitung des Herstellers, in cDNA umgeschrieben. Anstelle von dATPs wurden Aminoallyl-dUTPs in die Erststrang cDNA eingebaut. Nach erfolgter Synthese wurde der Ansatz kurz abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Es wurden 4 µl 50 mM EDTA (pH 8,0), 2 µl 10 N NaOH hinzugegeben und der Ansatz wurde für 20 min bei 65°C inkubiert. Mit diesem Schritt wurde die RNA hydrolysiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 4 µl 5 M Essigsäure neutralisiert. Die Aminoallyl-modifizierte cDNA wurde durch eine Ethanol-Fällung (4.11.2) gereinigt.

An die Aminogruppe konnten anschließend, durch eine Veresterung, die Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 gekoppelt werden. Zum Schutz der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgten alle Arbeiten bei verminderter Lichtintensität. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltration, unter Verwendung von Micro-Spin™ G-50 Säulchen (GE Healthcare, München), entfernt. Die Effizienz der cDNA Synthese und die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen wurde mit einem Spektralphotometer bei einer Absorption von 260 nm (cDNA), 550 nm (Cy3) und 650 nm (Cy5) detektiert.

4.14.2. Hybridisierung der Microarrays

Hefe Microarrays (Glasträger, Yeast Y6.4k6) wurden vom University Health Network Centre (Toronto, Ontario, Kanada) bezogen. Die Microarrays bestehen aus 48 Blöcken mit jeweils 272 Spots. Jeder Block enthält neben den doppelt aufgetragenen Hefe ORFs (6240) zusätzliche Kontrollen. Weitere Angaben zu den Microarrays können unter folgender Internetseite bezogen werden: www.microarrays.ca. Die

Arrays wurden in 5x SSC Puffer mit 0,1% SDS und 1% BSA 2 h bei 37°C prä-hybridisiert, dann durch 5x Eintauchen in H_2O gewaschen und durch 1x Eintauchen in Isopropanol getrocknet. Die zuvor markierte cDNA wurde in einer Speed-vac auf ein Volumen von ca. 3 µl reduziert. Die cDNA der Mutante und des Wildtyps wurden gemischt und in 54 µl DIG Easy Hyb Puffer (Roche, Mannheim) mit 3 µl Hefe tRNA (10 mg/ml, Invitrogen, Karlsruhe) und 3 µl denaturierter Lachssperma DNA (10 mg/ml, Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen. Der Ansatz wurde 2 min bei 65°C inkubiert, wieder auf RT abgekühlt und auf den Array gegeben. Die Array-Oberfläche wurde mit einem Deckgläschen (24 x 60 mm, Kobe, Marburg) abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte in Hybridisierungskammern (Corning) für 18 h bei 37°C unter Lichtausschluss, um die Fluoreszenzfarbstoffe vor dem Ausbleichen zu schützen. Nach der Hybridisierung konnten die Deckgläschen durch Schwenken in 1x SSC Puffer bei Raumtemperatur entfernt werden. Die Glasträger wurden in 50 ml Falcon Röhrchen überführt und 3x 15 min in 1x SSC/0,2% SDS (bei 50°C) unter ständiger Bewegung gewaschen. Anschließend wurden die Glasträger bei Raumtemperatur 2x in 1x SSC, dann in 0,1x SSC getaucht, und in einem 50 ml Falcon Röhrchen durch Zentrifugation bei 1.500 Upm für 5 min getrocknet. Die Arrays wurden sofort oder innerhalb der nächsten Stunden gescannt (ScanArray Express, PerkinElmer, Wellesley, MA, USA). Die kurzfristige Lagerung fand unter Lichtschutz bei Raumtemperatur statt. Die gescannten Arrays wurden zur weiteren Bearbeitung als TIF Bild abgespeichert.

4.14.3. Microarray Daten-Analyse

Die Intensitäten einzelner DNA-haltiger Punkte (im Folgenden „Spot“ genannt) wurden mit dem Programm ImaGene 3.0 (BioDiscovery, Inc., El Segundo, CA, USA) bestimmt. Zur maximalen Reproduzierbarkeit der Daten wurden vorab verschiedene Software Parameter optimiert (Details im ImaGene Benutzerhandbuch). Der Median (Zentralwert) der Signalintensität (I_{Cy5_i} und I_{Cy3_i}) und die Intensität des lokalen Hintergrundes (Bg_{Cy5_i} oder Bg_{Cy3_i}) wurde von jedem Spot im Cy3 und im Cy5 Kanal gemessen, und voneinander subtrahiert:

$$R_i = I_{Cy5_i} - Bg_{Cy5_i} \text{ und } G_i = I_{Cy3_i} - Bg_{Cy3_i}$$

Anschließend wurde für jeden Spot der Logarithmus zur Basis 2 des Quotienten der Intensitätsverhältnisse nach folgender Formel berechnet (Yang *et al.*, 2002):

$$M_i = \log_2 \frac{R_i}{G_i}$$

Die Berechnung der mittleren Signalintensität A_i eines Spots erfolgte durch die Formel:

$$A_i = \log_2 \sqrt{R_i \times G_i}$$

Zur Normalisierung der Daten wurde die Lowess-Funktion verwendet (Yang *et al.*, 2002). Dies war nötig, um intensitätsabhängige Verzerrungen der M-Werte (log-Verhältnis) zu kompensieren, die durch die Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe entstehen. In einem zweiten Schritt wurde eine umfassende Standardisierung vorgenommen, bei der die log-Verhältnisse auf Null gesetzt wurden:

$$M' = M - c$$

Da jedes Gen auf dem Array zweimal vorhanden ist, wurde der Mittelwert des log-Verhältnisses bestimmt. Die log-Verhältnisse der Replikate wurden ebenfalls gemittelt. Um unterschiedlich regulierte Gene herauszufiltern, wurden diese nach der relativen Änderung sortiert. Interessante Gene wurden unter Einbeziehung der Intensität A und des log-Verhältnisses M manuell auf die Glaubwürdigkeit der Daten überprüft. War die durchschnittliche Intensität dabei zu gering oder die Differenz der beiden Gen-Replikate zu groß wurde das Gen nicht weiter inspiziert.

4.15. Zellbiologische und biochemische Methoden

4.15.1. Fluoreszenzmikroskopie

Die Zellen einer über Nacht gewachsenen Kultur wurden auf eine OD_{600} = 0,1 verdünnt und bis zu einer OD_{600} = 0,5 weiter kultiviert. 5 ml dieser Kultur wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und durch Zugabe von 3,7% Formaldehyd (Endkonzentration) für 45 min bei ständiger Rotation fixiert. Dann wurden die fixierten Zellen für 5 min bei 3.000 Upm abzentrifugiert und 2x in 1 ml 0,1 M Hepes (pH 7,4) gewaschen. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, abzentrifugiert (2 min, 6.000 Upm) und in 1 ml SP-Puffer gewaschen, abzentrifugiert (2 min, 6.000 Upm) und in 200 µl SP-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden sofort weiterbehandelt oder bei 4°C gelagert (maximal 4 Wochen). Zunächst wurden die Zellen mit 1 µl DTT für 10 min bei RT inkubiert, dann durch Zugabe von 5 µl einer gesättigten Zymolyase-Lösung (Spatelspitze Zymolyase in 1 ml SP-Puffer, vor Zugabe kurz abzentrifugiert) bei RT für 10 min sphäroblastiert. Parallel erfolgte die

Präparation der Objektträger. Diese waren durch eine Teflonbeschichtung in mehrere Reaktionsfelder unterteilt, so konnten mehrere Experimente parallel durchgeführt werden. Die einzelnen Felder wurden mit jeweils 20 µl 0,3% poly-L-Lysin (Sigma, >150 kDa) für 5 min inkubiert, anschließend mit H_2O gewaschen und an der Luft getrocknet. Durch diese Behandlung haften die Zellen über elektrostatische Kräfte an der Oberfläche des Objektträgers. Die Sphäroblastenbildung wurde durch Vergleich mit unbehandelten Zellen unter dem Mikroskop verfolgt. Im Verlauf dieser Behandlung verschwand die dunkle Zellwand und die Zellen bekamen eine unregelmäßige Form. Dann wurden die Zellen sofort abzentrifugiert (2 min, 6.000 Upm) und in 300 µl SP-Puffer resuspendiert. Jeweils 20 µl dieser Zellsuspension wurden auf die Reaktionsfelder des Objektträgers pipettiert. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurden diese mit 20 µl 0,5% (v/v) Triton X-100 in SP-Puffer für 5 min inkubiert. Der Puffer wurde später mit einer Pasteurpipette vorsichtig vom Rand her entfernt. Die Zellen wurden anschließend für 1 h mit 20 µl Blockpuffer inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer, die das Antrocknen der Zellen verhinderte. Nach Entfernung des Blockpuffers erfolgte die Inkubation mit dem in Blockpuffer verdünntem Primärantikörper für 1 h bei RT. Jeweils 20 µl pro Reaktionsfeld wurden auf den Objektträger pipettiert. Nach der Inkubation wurde der Antikörper mit einer Pasteurpipette entfernt. Der Objektträger wurde kurz in Waschpuffer 1 getaucht, dann 10 min und 30 min in Waschpuffer 1, dann 10 min, anschließend 30 min in Waschpuffer 2 gewaschen. Alle Waschschritte wurden bei RT durchgeführt. Der Objektträger wurde dazu für die angegebene Zeit in ein mit Waschpuffer gefülltes Becherglas gestellt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in Blockpuffer verdünntem Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Um die Fluoreszenz vor dem Ausbleichen zu schützen, fanden alle nachfolgenden Schritte bei reduzierter Lichtintensität statt. Nach erfolgter Inkubation wurde der Sekundärantikörper entfernt. Die Zellen wurden nach dem oben angegebenen Schema gewaschen und anschließend bei RT oder wahlweise bei 37°C getrocknet. Die Zellen wurden mit einem kleinen Tropfen „Vectashield“ Befestigungslösung (Vector Laboratories Inc., Burlingame) immobilisiert und mit einem Deckgläschen verschlossen. Die Befestigungslösung enthielt bereits DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) und einen Ausbleichschutz. Das Präparat wurde mit Nagellack versiegelt. Die Zellen konnten nach einer Inkubation von 5 min (das DAPI interkaliert während dieser Zeit in die kleine Furche der DNA) unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

SP-Puffer	1,2 M	Sorbitol
	150 mM	NaCl
	100 mM	Hepes, pH 7,4
Blockpuffer	5%	BSA
	0,3%	Triton x-100
	100 mM	Tris, pH 9,0
	150 mM	NaCl
Waschpuffer 1	100 mM	Tris, pH 9,0
	150 mM	NaCl
Waschpuffer 2	100 mM	Tris, pH 9,5
	150 mM	NaCl

4.15.2. Isolierung von intakten Mitochondrien und post-mitochondrialen Überstand (PMS) aus S. cerevisiae

Die Hefezellen wurden in Vollmedium mit Galaktose, Laktatmedium oder Minimalmedium mit Glukose bei 30°C und 150 Upm bis zu einer OD_{600nm} = 1,0–1,5 inkubiert und dann durch Zentrifugation sedimentiert (Daum *et al.*, 1982; Diekert *et al.*, 2001). Die Zellen wurden in H_2O und Tris-SO_4-Puffer gewaschen, anschließend wurde das Zellnassgewicht bestimmt. Nach dem Waschen in 1,2 M Sorbitol-Puffer wurden die Zellen im gleichen Puffer resuspendiert (4 ml/g Zellen). Um die Zellwand der Hefe aufzulösen (Sphäroblastenbildung), wurde die Zellsuspension mit Zymolyase T100 (1,5 mg/g Zellen) versetzt und 30 bis 60 min bei 30°C und 150 Upm inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Sphäroblasten wurden sedimentiert (5 min, 3.000 Upm, 4°C) und 2x mit 1,2 M Sorbitol-Puffer gewaschen, um die Zymolyase aus der Probe zu entfernen. Anschließend wurden die Sphäroblasten in 2x BB-Puffer mit 1 mM PMSF (2 ml/g Zellen) aufgenommen, das Volumen bestimmt und mit H_2O auf das doppelte Volumen verdünnt (Endkonzentration 0,6 M Sorbitol). Mit Hilfe eines Glas-Homogenisators wurden die Sphäroblasten aufgeschlossen, die Sedimentation der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation (JA-20 Rotor, 5 min, 4.000 Upm, 4°C). Die im Überstand enthaltenen Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (12 min, 10.000 Upm, 4°C) pelletiert. Ein Teil des Überstandes wurde als post-mitochondrialer Überstand (PMS) aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Mitochondrien wurden 1x oder 2x in 1x BB gewaschen, um restliches PMSF und Verunreinigungen durch PMS zu entfernen. Nach vorsichtiger Resuspension der Mitochondrien in 1x BB wurden diese aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung von PMS und Mitochondrien erfolgte bei –80°C.

Tris-SO_4-Puffer	100 mM	Tris-SO_4, pH 9,4
	10 mM	Dithiothreitol (DTT)
1,2 M Sorbitol-Puffer	1,2 M	Sorbitol
	20 mM	Kaliumphosphat, pH 7,4
2x BB	1,2 M	Sorbitol
	40 mM	Hepes-KOH, pH 7,4
	1 mM	PMSF
1x BB	0,6 M	Sorbitol
	20 mM	Hepes-KOH, pH 7,4

4.15.3. Enzymaktivitäten mitochondrialer Proteine

4.15.3.1. Aconitase

Die Aconitase katalysiert die reversible Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat über das Zwischenprodukt *cis*-Aconitat (Fansler & Lowenstein, 1969). Der photometrische Nachweis der Enzymaktivität beruht auf der Absorption der Doppelbindung von *cis*-Aconitat bei λ = 235 nm. ε_{235nm} = 4.950 M^{-1} cm^{-1}

Puffer	100 mM	Kaliumphosphat, pH 7,4
	0,5%	Triton X-100
Lösungen	10 mM	*cis*-Aconitat
	1 mg/ml	Mitochondrien

Probenküvette	435 µl	Puffer
	10 µl	Mitochondrien
	5 µl	*cis*-Aconitat
Referenzküvette	440 µl	Puffer
	10 µl	Mitochondrien

4.15.3.2. Malat-Dehydrogenase

Die Malat-Dehydrogenase katalysiert die Umwandlung von Oxalacetat zu Malat unter Verbrauch von NADH (Englard & Siegel, 1969). Die Oxidation von NADH kann bei einer Wellenlänge von λ = 340 nm gemessen werden. ε_{340nm} = 6.220 x 10^3 M^{-1} cm^{-1}

Puffer	50 mM	Tris-SO_4, pH 7,4
	100 mM	NaCl
	0,5%	Triton X-100
Lösungen	10 mg/ml	NADH
	5 mg/ml	Oxalacetat in Tris-SO_4, pH 7,4

Probenküvette	970-x µl	Puffer
	x µl	Mitochondrien (10 µg)
	20 µl	NADH
	10 µl	Oxalacetat
Referenzküvette	980-x µl	Puffer
	x µl	Mitochondrien (10 µg)
	20 µl	NADH

4.15.3.3. Succinat-Dehydrogenase (SDH)

Der verwendete Aktivitätstest misst die Übertragung der Elektronen von Succinat auf den farbigen Elektronenakzeptor DCPIP (2,6-Dichlorphenolindophenol) bei 600 nm. Die Referenzküvette enthält den SDH-Inhibitor Malonat (Robinson & Lemire, 1995). ε_{600nm} = 21.000 M^{-1} cm^{-1}

Puffer	100 mM	Tris-SO_4, pH 7,4
	0,5%	Triton X-100
	1 mM	KCN (frisch)
Lösungen	20%	Succinat
	20%	Malonat
	1,4 mM	DCPIP
	12 mg/ml	PM (Phenazin-Methosulfat)
	10 mg/ml	Mitochondrien

Probenküvette	880 µl	Puffer
	12 µl	Succinat
	50 µl	DCPIP
	42 µl	PM
	15 µl	Mitochondrien
Referenzküvette	870 µl	Puffer
	12 µl	Succinat
	50 µl	DCPIP
	42 µl	PM
	15 µl	Mitochondrien
	12 µl	Malonat

4.15.3.4. Cytochrom c Oxidase

In diesem Test wurde die Oxidation von reduziertem Cytochrom *c* durch Komplex IV gemessen. Zur Präparation von reduziertem Cytochrom *c* wurden 2,5 ml einer 20 mg/ml Cytochrom *c* Lösung (in Puffer) durch die Zugabe von 10 mM Dithionit reduziert (auf Eis). Der Ansatz wurde 2-5 min inkubiert und im Anschluss über eine mit Puffer equilibrierte PD10 Säule gereinigt. ε_{550nm} = 20.000 M^{-1} cm^{-1}

Puffer	50 mM	Mes, pH 6,5
	50 mM	NaCl
Lösungen	1 M	Dithionit (frisch)

Probenküvette	900-x µl	Puffer
	100 µl	reduziertes Cytochrom *c*
	5 µg	Mitochondrien
Referenzküvette	890-x µl	Puffer
	100 µl	reduziertes Cytochrom *c*
	5 µg	Mitochondrien
	10 µl	KCN (frisch)

4.15.3.5. Citrat-Synthase

Citrat-Synthase katalysiert die Kondensation von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat. Der Enzymtest weist die freie Sulfhydrylgruppe des dabei entstehenden Coenzyms A anhand der Reaktion mit dem Thiolreagenz 5,5´-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure: DTNB) nach (Srere, 1963). ε_{412nm} = 13.600 M^{-1} cm^{-1}

Puffer	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	100 mM	NaCl
	0,5 mM	DTNB
Lösungen	10 mg/ml	Acetyl-CoA
	5 mg/ml	Oxalacetat
	1 mg/ml	Mitochondrien

Probenküvette	965 µl	Puffer
	10 µl	Acetyl-CoA
	5 µl	Mitochondrien
	20 µl	Oxalacetat
Referenzküvette	985 µl	Puffer
	10 µl	Acetyl-CoA
	5 µl	Mitochondrien

4.15.3.6. Zn-Protoporphyrin IX Bildung (Ferrochelatase Aktivität)

Die Ferrochelatase katalysiert den letzten Schritt der Häm-Biosynthese, die Einlagerung von reduziertem Eisen in Protoporphyrin IX. Der Test nutzt die fluoreszierenden Eigenschaften von Zn-Porphyrin aus (Anregung 418 nm, Emission 588 nm). Zur Messung der Aktivität wurden isolierte Mitochondrien (4.15.2) verwendet.

Puffer	0,1 M	Tris, pH 7,5
Lösungen	0,1 mM	(PPIX) Protoporphyrin IX (in Tris-Puffer)
	1%	Tween 80
	3%	Tween 80

Probenküvette	2,95-x ml	Puffer
	30 µl	PPIX
	20 µl	Tween 80
	x µl	Protein (50 µg Mito)

4.15.4. Enzymaktivitäten cytosolischer Proteine

4.15.4.1. Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p)

Isopropylmalat-Isomerase ist ein cytosolisches Enzym und wurde im Zellextrakt gemessen (Kohlhaw, 1988). Da das Protein sehr empfindlich ist, wurden die Zellen schnell in eiskaltem TNTEG-Puffer mechanisch aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde sofort verwendet. Das Enzym katalysiert die reversible Umsetzung von α- zu β-Isopropylmalat über das Zwischenprodukt Dimethylcitraconat. Die photometrische Aktivitätsbestimmung beruht auf der Absorption der Doppelbindung von Dimethylcitraconat bei 235 nm. ε_{235nm} = 4.530 M^{-1} cm^{-1}

Puffer	100 mM	K_2HPO_4/KH_2PO_4, pH 7,0
Lösungen	10 mg/ml	β-Isopropylmalat
	5 mg/ml	Protein

Probenküvette	440 µl	Puffer
	10 µl	Zellextrakt
	50 µl	β-Isopropylmalat
Referenzküvette	490 µl	Puffer
	10 µl	Zellextrakt

4.15.4.2. Alkohol-Dehydrogenase

Zur Messung der Alkohol-Dehydrogenase wurde PMS (4.15.2) verwendet. ε_{340nm} = 6.220 M^{-1} cm^{-1}

Puffer	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	50 mM	NaCl
Lösungen	100%	Ethanol
	0,1 M	NAD

Probenküvette	930 µl	Puffer
	30 µl	Ethanol
	30 µl	NAD
	10 µl	PMS
Referenzküvette	940 µl	Puffer
	30 µl	Ethanol
	30 µl	NAD

4.15.4.3. Katalase

In *S. cerevisiae* ist die Katalase sowohl ein cytosolisches als auch peroxisomal lokalisiertes Protein. Das Häm-haltige Enzym katalysiert die Umsetzung von Wasserstoffperoxid in Wasser und molekularen Sauerstoff. Die Katalase wurde aus dem PMS (4.15.2) bestimmt. ε_{240nm} = 9.500 M^{-1} cm^{-1}

Puffer	50 mM	MES, pH 6,5
	50 mM	NaCl
Lösungen	3%	H_2O_2

Probenküvette	975-x µl	Puffer
	25 µl	H_2O_2
	x µl	Protein (50 µg)
Referenzküvette	975 µl	Puffer
	25 µl	H_2O_2

4.15.5. Bestimmung des Eisengehalts in Mitochondrien

Die Menge an freiem Eisen (nicht Häm-gebunden, nicht in Fe/S Clustern koordiniert) in den Mitochondrien wurde photometrisch mit Bathophenantrolin-Disulfonsäure (als Natrium-Salz) bestimmt (Li *et al.*, 1999). Dieser Chelator bildet mit Eisen einen roten Komplex. ε_{540nm} = 23.500 M^{-1} cm^{-1}

Puffer	1 M	Tris-HCl, pH 7,4
Lösungen	10 mM	Bathophenantrolin-Disulfonsäure
	1 M	Natrium-Dithionit
	10%	SDS

Probenküvette	720-x µl	H_2O
	100 µl	Puffer
	60 µl	SDS
	20 µl	Natrium-Dithionit
	100 µl	Bathophenantrolin-Disulfonsäure
	x µl	Mitochondrien (0,2 mg)
Referenzküvette	720 µl	H_2O
	100 µl	Puffer
	60 µl	SDS
	20 µl	Natrium-Dithionit
	100 µl	Bathophenantrolin-Disulfonsäure

4.15.6. Bestimmung der Eisenaufnahme und der de novo Fe/S Cluster-Biosynthese mittels ^{55}Fe-Eisenchlorid Markierung

Die Zellen wurden in 300 ml SC-Medium kultiviert, durch Zentrifugation (5 min, 3.000 Upm) geerntet und in H_2O gewaschen. 0,5 g Zellen (Zellnassgewicht) wurden in 10 ml eisenarmen Minimalmedium aufgenommen und für 2–4 h bei 30°C und 150 Upm mit $^{55}FeCl_3$ (10 µCi) in 1 mM Ascorbat (in H_2O) inkubiert. Die radioaktiv markierten Zellen wurden in ein 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt, sedimentiert (Zentrifugation für 5 min, 3.000 Upm) und je 1x mit 10 ml Citrat-Puffer (50 mM Citrat, 1 mM EDTA, pH 7,0) und 500 µl Hepes-KOH (20 mM, pH 7,0) gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden in 0,5 ml TNETG-Puffer mit 2 mM PMSF resuspendiert und mit 1/3 Volumen Glasperlen (Ø 0,45 mm) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Vortexen der Suspension (3x 1 min), die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 3.000 Upm, 4°C). Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 15.000 Upm, 4°C) von Schwebstoffen befreit. Durch Szintillationszählung von 5 µl dieses Zelllysats in 1 ml Szintillationscocktail wurde die Eisenaufnahme der Zellen quantifiziert.

Dieses ^{55}Fe-markierte Zelllysat diente gleichzeitig zur Untersuchung der *de novo* Biosynthese von Fe/S Clustern. Dazu wurden 250 µl des Zelllysats 1 h bei 4°C mit 10 – 40 µl einer 50%igen Suspension von Protein-A-Sepharose mit gekoppelten Antiseren inkubiert (4.16.8). Je nach Fragestellung wurden gekoppelte Antiseren gegen Leu1p und Bio2p verwendet. Um den Eiseneinbau in Markerproteine mit fusioniertem HA- oder TAP-*tag* nachzuweisen wurden die Zelllysate mit 10 µl anti-HA-Agarose (HA-*tag*) bzw. 20 µl IgG-Sepharose (TAP-*tag*) wie oben beschrieben inkubiert. Als Kontrolle diente Prä-Immunserum. Die Protein-A-Sepharose, IgG-Sepharose oder anti-HA-Agarose wurden durch Zentrifugation (5 min, 3.000 Upm, 4°C) sedimentiert, 3x mit TNETG-Puffer gewaschen, in 50 µl H_2O resuspendiert und

mit 1 ml Szintillationscocktail versetzt. Co-präzipitiertes radioaktives ^{55}Fe wurde durch Szintillationszählung quantifiziert und als direktes Maß für dessen Einbau in die Fe/S Cluster der Markerproteine und damit der *de novo* Synthese der Cluster verwendet.

4.15.7. Messung des Häm-Gehalts mittels ^{55}Fe-Eisenchlorid Markierung

Mit dieser Methode wurde der Häm-Gehalt *in vivo* erfasst. Dazu wurden die Zellen über Nacht in eisenarmen Minimalmedium mit $^{55}FeCl_3$ (10 µCi) in 1 mM Ascorbat kultiviert. Die über Nacht Kultur wurde geerntet und mit 10 ml Citrat-Puffer (50 mM Citrat, 1 mM EDTA, pH 7,0) gewaschen und erneut sedimentiert. Die Zellen wurden der Bestimmung des Zellnassgewichts in 500 µl Hepes-KOH (20 mM, pH 7,0) aufgenommen. 500 µl Zellsuspension wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 25 µl Stopplösung (100 mM $FeCl_3$, 5 N HCl) wurde der Einbau von ^{55}Fe in Häm gestoppt. Nach Zugabe von 500 µl Butylacetat und 1/2 Volumen Glasperlen (Ø 0,45 mm) wurden die Zellen durch Vortexen bei höchster Stufe (3x 1 min, zwischendurch 1 min auf Eis) aufgeschlossen. *In vivo* synthetisiertes ^{55}Fe-Häm wurde in die organische Phase extrahiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt (12 min, 7.500 Upm, 4°C) und 250 µl der oberen organischen Phase wurden mit 1 ml Szintillationscocktail vermischt. Es erfolgte die Quantifizierung von ^{55}Fe-Häm durch Szintillationszählung.

4.16. Proteinbiochemische Methoden

4.16.1. Überexpression und Reinigung von Nbp35p-His

Das Plasmid pET15b-NBP35-His wurde in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen transformiert (4.11.9). 50 ml LB Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 Upm schüttelnd inkubiert. Die über Nacht Kultur wurde in 1 l frisches Medium überimpft (Endkonzentration 1,5%) und bis zu einer OD_{600} = 0,5-0,7 weiter kultiviert. Anschließend wurde die Temperatur auf 30°C gesenkt und die Zellen wurden durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. 3 h nach der Induktion wurden die Zellen geerntet (5.000 Upm, 10 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde 1x in 50 ml Lysierungspuffer gewaschen. Der Zellaufschluss erfolgte im Hochdruck Homogenisator bei 4°C, bei einem Druck von 1,0x 10^8 Nm^{-2}. Nicht aufgeschlossene Zellen und Membranbestandteile wurden durch Zentrifugation (100.000 *xg*, 45 min,

4°C) sedimentiert. Die Ni-NTA Agarose wurde zweimal mit Lysierungspuffer gewaschen. Der lösliche Überstand (Rohextrakt) wurde auf die vorbereitete Ni-NTA Agarose pipettiert und 1 h bei 4°C rotierend inkubiert. Im Anschluss wurde die Ni-NTA Agarose mit 5 Bettvolumen Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Da das Fusionsprotein nur mäßig an die Ni-Agarose gebunden hatte wurde das Imidazol durch Histidin ersetzt. Das Protein wurde mit 5 ml Elutionspuffer eluiert. Das gereinigte Protein wurde direkt im Anschluss mittels einer PD-10 Säule entsalzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Es wurden Proben vor und nach der Induktion (jeweils 1 ml Kultur sedimentiert), jeweils 5 µl der einzelnen Reinigungsschritte und die Sedimentfraktion in 1x Lämmli aufgenommen, bei 95°C für 5 min inkubiert und dann zur Analyse auf einem SDS-Gel aufgetragen (durchgeführt von D. Aguilar-Netz).

Lysierungspuffer	50 mM	NaH_2PO_4 pH 8,0
	300 mM	NaCl
	1 mM	Histidin
	10% (v/v)	Glycerin
Waschpuffer	25 mM	Tris/HCl pH 8,0
	300 mM	NaCl
	5 mM	Histidin
	10%(v/v)	Glycerin
Elutionspuffer	25 mM	Tris/HCl pH 8,0
	300 mM	NaCl
	150 mM	Histidin
	10%(v/v)	Glycerin
PD-10 Puffer	25 mM	Tris pH 8,0
	150 mM	NaCl
	10% (v/v)	Glycerin

4.16.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinmengenbestimmung wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Dazu wurde die zu bestimmende Probe in Tris-Puffer gelöst und mit Bio-Rad Protein-Assay (Bio-Rad, München) im Verhältnis 1:4 versetzt. Die Extinktion der Probe wurde bei 595 nm in einem Spektralphotometer gemessen. Als Leerwert diente ein Ansatz der nur Tris-Puffer enthielt. Die Eichung erfolgte mit BSA V in einem linearen Bereich von 0,2 bis 12 µg Protein. Die Proteinproben wurden bis in den entsprechenden Bereich verdünnt.

4.16.3. TCA-Fällung von Proteinen

Proteine wurden mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dazu wurde die Proteinlösung mit TCA (25% bzw. 72% (w/v) Stammlösung) gemischt (Endkonzentration 12,5%) und 5 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (20 min, 20.000 Upm, 4°C) sedimentiert, zweimal mit kaltem Aceton gewaschen, bei RT getrocknet und in 20 µl 1x Lämmli-Puffer aufgenommen.

2x Lämmli-Puffer	120 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	4% (w/v)	SDS
	0,01% (w/v)	Bromphenolblau
	20% (w/v)	Glycerin
1x Lämmli-Puffer mit ß-ME	100µl	2x Lämmli
	90µl	H_2O
	5% (v/v)	ß-Mercaptoethanol

4.16.4. SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Auftrennung der Proteine gemäß ihrer Masse erfolgte nach einer Methode von Lämmli (Laemmli, 1970) in einer vertikalen Gelapparatur. Die Acrylamid-Lösung wurde in Form einer 30% igen (w/v) Acrylamid-Stammlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1 verwendet. Das Trenngel setzte sich aus 10-12%tiger (w/v) Acrylamid-Lösung, 375 M Tris-HCl (pH 8,8) und 0,1% SDS zusammen. Die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 0,001% (v/v) TEMED und 0,05% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS). Das Trenngel wurde bis zur gewünschten Höhe in die Apparatur gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Das Sammelgel setzte sich aus 5% (w/v) Acrylamid, 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% (w/v) SDS, 0,003% (v/v) TEMED und 0,007% APS zusammen. Die Proben wurden in Lämmli Probenpuffer aufgenommen, 5 min erhitzt (95°C) und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Elektrodenpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,8) bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA für 2,5–3 h. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Coomassie Brilliant-Blue gefärbt oder auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Es wurde jeweils ein Proteingrößenstandard aufgetragen.

4.16.5. Färben von Proteinen mit Coomassie Brilliant-Blue

Diese Methode der Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid Gelen erlaubt die Anfärbung der Proteine im Gel entsprechend ihrer Konzentration. Dazu wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant-Blue R-

250 in 45% (v/v) Ethanol und 10% (v/v) Essigsäure über Nacht gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in 30% (v/v) Ethanol und 10% (v/v) Essigsäure. Durch mehrfaches Austauschen dieser Lösung wurde das Gel transparent und die Proteine traten als blaue Banden hervor.

4.16.6. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western Blot)

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch mit dem sogenannten „Semidry" Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Kyshe-Andersen, 1984). Für den Transfer in einer Blot Apparatur (PeqLab) wurden die benötigten Filterpapiere (Whatman-3-MM Filterpapier) auf die entsprechende Gelgröße zurechtgeschnitten. Es wurden zwei Filterpapiere in Transferpuffer getränkt und auf die Anodenplatte gelegt. Die in Transferpuffer befeuchtete Nitrozellulosemembran und das Gel wurden auf die Filterpapiere gelegt. Zum Abschluß wurden zwei in Transferpuffer getränkte Filterpapiere auf das Gel gelegt und letzte Luftblasen mit einem Glasstab entfernt. Die Apparatur wurde dann mit der Kathodenplatte verschlossen. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm^2 für 60 min. Die auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine wurden mit Ponceau S angefärbt und anschließend solange mit H_2O entfärbt bis deutliche Proteinbanden hervortraten. Die reversible Proteinanfärbung diente zur Kontrolle der Vollständigkeit des Proteintransfers auf die Nitrozellulosemembran und zur Abschätzung der Proteinmenge. Der Proteingrößenstandard wurde markiert, spezifische Proteine konnten im Anschluss immundetektiert werden.

Transferpuffer	25 mM	Tris-Base
	200 mM	Glycin
	0,02% (w/v)	SDS
	20% (w/v)	Methanol
Ponceau S	0,2% (w/v)	Ponceau S
	3% (w/v)	TCA

4.16.7. Immundetektion

Der Nachweis definierter Proteine eines Proteingemisches, auf Nitrozellulosemembranen, erfolgte durch Immundekoration mit spezifischen Antiseren und anschließender Detektion durch Chemilumineszenz mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (Enhanced Chemiluminescence System = ECL, GE Healthcare). Zunächst wurden die freien Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran durch 30 min Inkubation in Blocklösung (5% (w/v) Milchpulver

in TBST-Puffer) abgesättigt. Das jeweilige Antiserum wurde in Blocklösung verdünnt (1:500 – 1:1.000) und die Membran wurde 1 h bei RT schüttelnd inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 10 min in TBS-Puffer mit 0,1% Tween 20) erfolgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern (1 h bei RT). Als Sekundärantikörper wurde entweder ein Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen oder ein anti-Maus Antikörper (1:1.000 in Blocklösung) eingesetzt. Im Anschluss wurde die Membran wie oben beschrieben 3x gewaschen. Nun konnten die an die Proteine gebundenen Antikörper mit dem ECL-Detektionssystem sichtbar gemacht werden. Sollten Proteine mit HA-*tag* oder Strep-*tag* nachgewiesen werden, wurde die Membran in 1% BSA in TBST-Puffer geblockt. Zum Strep-*tag* Nachweis wurden die Membranen zusätzlich 20 min mit Avidin (5 µg/ml) in TBST-Puffer inkubiert und anschließend mit Streptavidin-Peroxidase Konjugat (1:2.000 in TBST) behandelt. Proteine mit fusioniertem TAP-*tag* wurden mit einem Peroxidase-anti-Peroxidase Antikörper aus Kaninchen (Verd. 1:500, in Blocklösung) nachgewiesen.

TBST-Puffer	50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	0,9% (w/v)	NaCl
	0,1% (w/v)	Tween 20

4.16.8. Kopplung des Antiserums an Protein-A-Sepharose

Um Proteine mit Antikörpern zu fällen, wurden die entsprechenden Antiseren an Protein-A-Sepharose gekoppelt. Protein-A bindet spezifisch an die schweren Ketten des Antikörpers. Es wurden 50 mg Protein-A-Sepharose in 500 µl TNETG-Puffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Die Sepharose-Kügelchen wurden sedimentiert (10 s, 13.000 Upm) und mit 500 µl Antiserum versetzt. Die Kopplung erfolgte bei 4°C für 1 h unter Rotation. Anschließend wurden die an Protein-A-Sepharose gekoppelten Antiseren 5x mit 500 µl TNETG-Puffer gewaschen, in 500 µl bzw. in 250 µl (α-Leu1p Antikörper) TNETG-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

4.17. Promotorstudien

4.17.1. GFP-Reporter Assay

Zellen, die das Plasmid HK252-Fet3-GFP bzw. HK252-Cyc1-GFP enthielten, wurden in Minimalmedium mit Glukose und mit 200 µM (Endkonzentration) Eisenammoniumcitrat inkubiert. Über Nacht Kulturen wurden in frischem Medium auf

eine OD_{600} = 0,2 verdünnt und weiter kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (5 min, 3.000 Upm) bei OD_{600} = 0,5. Die Zellen wurden in 3 ml H_2O resuspendiert, so dass diese einer Zelldichte von OD_{600} = 1 entsprachen. Nach Anregung bei 480 nm wurde die GFP-spezifische Fluoreszenzemission bei 513 nm in einem Fluoreszenz Spektrophotometer bestimmt.

4.17.2. Luciferase-Reporter Assay

Zellen, die das Reporterkonstrukt p416Prom-*hRluc* enthielten, wurden über Nacht in Minimalmedium mit Glukose, ohne Uracil und mit bzw. ohne 50 µM Bathophenantrolin kultiviert. Die über Nacht Kulturen wurden in frischem Medium auf eine OD_{600} = 0,2 verdünnt und weiter kultiviert. Die Zellen wurden bei OD_{600} = 0,5-0,8 durch Zentrifugation geerntet (5 min, 3.000 Upm) und auf eine OD_{600} = 0,1 in 1 ml H_2O verdünnt. Das *Renilla reniformis* Luciferase Substrat ViviRen (Promega, Mannheim) wurde bereits eine Woche vor dem eigentlichen Experiment in 95 µl DMSO (60 mM Substrat) angesetzt. Dadurch ließ sich zum einen der Hintergrund reduzieren und zum anderen konnte die Luciferase Aktivität verstärkt werden. Zur Bestimmung des Hintergrunds wurden 2 µl Substrat in H_2O verdünnt und sorgfältig gemischt. Das Endvolumen der Reaktion betrug 100 µl. Der Ansatz wurde für 1 min im Szintillationszähler quantifiziert (Hintergrund). Dann wurde die zu bestimmende Probe hinzugegeben und der Ansatz wurde erneut sorgfältig gemischt. Die Probe wurde, über einen Zeitraum von insgesamt 2 min quantifiziert. Messdaten wurden nach 1 und 2 Minuten aufgenommen und anschließend gemittelt. Es empfahl sich, mit einem Probenvolumen von 5 µl zu beginnen. Dadurch sollte verhindert werden, dass das Detektionslimit des Gerätes überschritten wurde.

Reaktionsansatz	100-x µl H_2O 2 µl Substrat x µl Probe

4.18. Laborgeräte

Gerät	**Modell, Hersteller**
Agarose-Gelkammern	Owl Separation Systems
Anaerobenkammer	COY, Laboratory Products Inc.
Autoklav	Systek V-150
Blot Kammer	PeqLab Biotechnologie GmbH
Elektroporator	Gene Pulser, Bio Rad Laboratories GmbH

Gerät	Modell, Hersteller
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX61
Fluoreszenz Spektrophotometer	FP-6300, Jasco, Groß-Umstadt
Hochdruck Homogenisator	EmulsiFlex-C3, Avestin
Inkubatoren	Function line, Heraeus instruments Steri Cult, Forma Scientific
Netzgerät	EPS600, Pharmacia Biotech
Peristaltik Pumpe	P-1, Pharmacia Fine Chemicals
pH-Meter	CG 840, Schott
Spektralphotometer	V-550, Jasco, Groß-Umstadt
Pipettierhilfen	Pipetman, Gilson
Schüttelinkubatoren	Multitron, HT INFORS
Sterilbank	NU-437-600E, Nuaire
Sterilisator	Modell 700, Memmert
Thermocycler	UNO Thermoblock, Biometra
Thermomixer	Thermomixer 5436, Eppendorf
UV-Transilluminator/Kamera	CN6 1.4 Raytest, Isotopenmessgeräte GmbH
Ultrazentrifuge	Combi Plus, OPTIMA TL, Sorvall,Beckman
Ultrazentrifugen-Rotor	SW-41 Ti, TLA 45, Beckman
Waagen	SBC 22, PT 1500, SCALTEC, SARTORIUS
Zentrifugen	Biofuge pico, Heraeus instruments 3K30, Sigma Megafuge 1.0R, Heraeus instruments J2-HS, Beckman Avanti^{TM} J-20 XP, Beckman
Zentrifugen-Rotoren	JA-10, JA-20, JLA 8.1000, JLA 16.250, Beckman

4.19. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien waren, sofern nicht anders angegeben, vom Reinheitsgrad p. a. oder für biochemische Zwecke.

Chemikalien	Hersteller
1 kb Marker	MBI Fermentas
^{55}Fe-Eisenchlorid, 10 mCi/ml, 30 mCi/mg	NEN
Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese Gel 30)	Roth
Aminosäuren	Merck, Sigma
Bacto Pepton, Bacto Trypton	DIFCO
Blocking Reagent	Roche Diagnostics GmbH

Chemikalien	Hersteller
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas
Dithiothreitol (DTT)	GERBU
HA-Antikörper, HA-Sepharose	Santa Cruz
Hefe Stickstoff Base	Formedium
Hefe Stickstoff Base ohne Eisen	Formedium
Hefe-Extrakt	ICN
HEPES	GERBU
ICN Pharmacia X-Gal	GERBU
IgG-Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare
IPTG	Roth
Lachssperma-DNA-Lösung	Gibco
Lambda-DANN	MBI Fermentas
Luciferase	Promega
NADH	GERBU
Ni-NTA Agarose	Quiagen
NucleoSpin Plasmid-Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel
Peroxidase anti-Peroxidase Antikörper	Sigma
Peroxidase-gekoppelte Antikörper	Bio-Rad Laboratories GmbH
Phenol	ICN
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Polymerase (Combi-Pol)	Invitek
Protein A-Sepharose^{TM} CL-4B	GE Healthcare
Proteingrößenstandard: DALTON MARK VII-L	Sigma
Proteinkonzentrationsbestimmungsreagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH
Restriktionsenzyme und dazugehörige Puffer	Gibco, Boehringer Mannheim, MBI Fermentas
RNase A	Calbiochem
T4 DNA-Ligase	Promega
Zymolyase 100T	WAK-Chemie

Weitere, nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (München), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

5. Ergebnisse

5.1. Nbp35p bindet einen Fe/S Cluster *in vivo*

5.1.1. Nbp35-TAP bindet Eisen in vivo

In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Cfd1p Protein aus *S. cerevisiae* eine Funktion in der Biogenese cytosolischer Fe/S Proteine einnimmt (Roy *et al.*, 2003). Da Nbp35p eine hohe Homologie zum mittleren und C-terminalen Bereich von Cfd1p aufweist, ist die Ausübung ähnlicher zellulärer Funktionen denkbar (Abb. 4). Durch den Vergleich verschiedener eukaryotischer Cfd1p und Nbp35p Sequenzen konnte C-terminal ein Bereich identifiziert werden, der vier konservierte Cysteinreste enthält (Abb. 4). Die Sequenzen von Cfd1p und Nbp35p weisen zusätzlich ein Walker A und B Motiv auf, welche der Bindung eines Nukleotids bzw. eines Magnesiumions dienen (Leipe *et al.*, 2002). Nbp35p Sequenzen besitzen am N-Terminus eine Ferredoxin-ähnliche Domäne, mit vier weiteren konservierten Cysteinresten, die möglicherweise ein Metall oder einen Fe/S Cluster binden (Abb. 4).

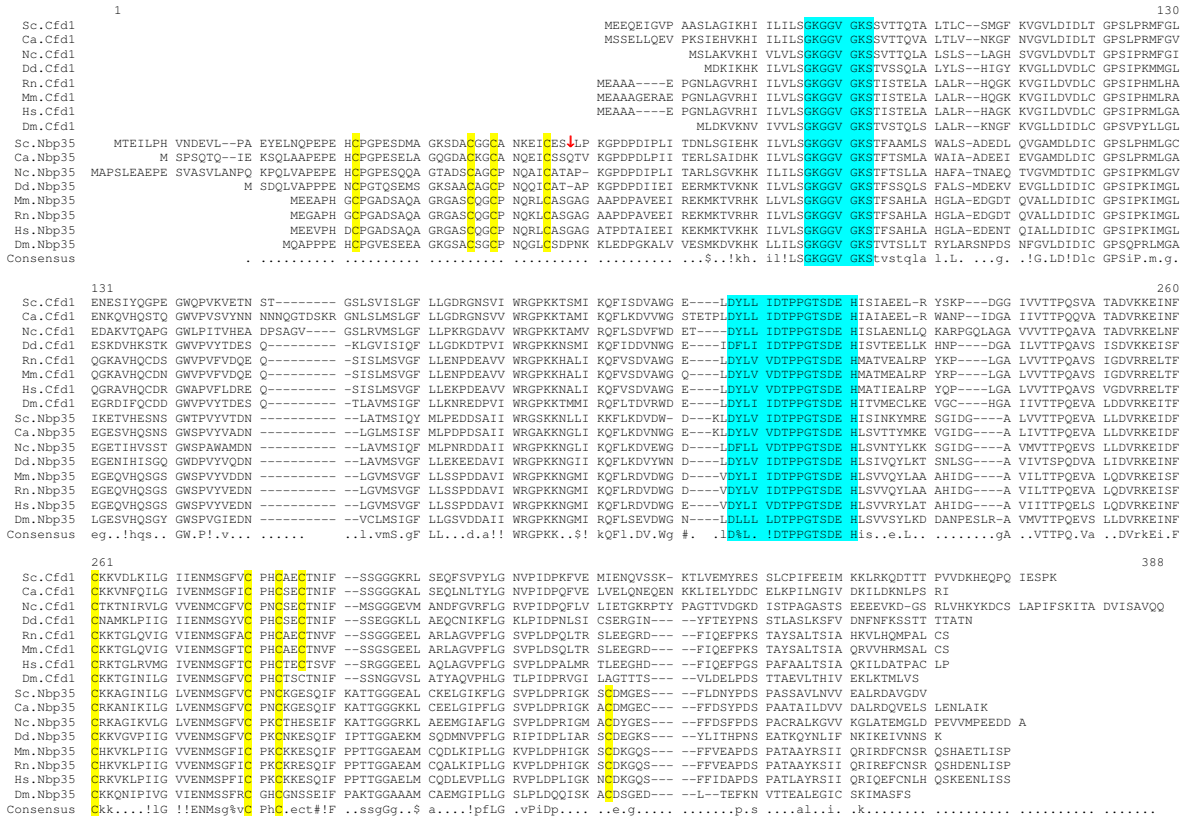

Abb. 4: Alignment von Nbp35p und Cfd1p Sequenzen. Das Multisequenz Alignment wurde mit dem Programm MULTALIN angefertigt (Corpet, 1988). Konservierte Cysteinreste sind gelb und das

Walker A und B Motiv sind blau unterlegt. Der Ausgangspunkt der am N-Terminus verkürzten Nbp35p Variante (Δ1-52 Nbp35p-TAP) ist durch einen roten Pfeil dargestellt. *Sc, Saccharomyces cerevisiae; Ca, Candida albicans; Nc, Neurospora crassa; Dd, Dictyostelium discoideum; Rn, Rattus norvegicus; Mm, Mus musculus; Hs, Homo sapiens; Dm, Drosophila melanogaster*.

Zunächst wurde untersucht, ob Nbp35p Eisen *in vivo* binden kann, und hierfür die konservierten Cysteinreste am N-Terminus des Proteins als Liganden fungieren. Zu diesem Zweck wurden Wildtypzellen mit Plasmiden transformiert, welche die vollständige *NBP35* Sequenz mit einer am 3´-Ende angefügten TAP-*tag* Sequenz oder eine am 5´-Ende um 52 Codons verkürzte Variante von *NBP35* mit einer am 3´-Ende angefügten TAP-*tag* Sequenz enthielten. Unter der Kontrolle des konstitutiven *TDH3* Promotors wurden ausreichende Proteinmengen für weitere Analysen synthetisiert. Die Proteine konnten mit immobilisierten IgG-Antikörpern (IgG-Sepharose) gefällt werden, da diese die Protein-A-Domäne des TAP-*tag* erkennen (Rigaut *et al*., 1999). Als Kontrolle wurden Wildtypzellen zusätzlich mit dem leeren Vektor transformiert. Die transformierten Zellen wurden 16 h in eisenarmen Minimalmedium mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert, in eisenarmen Minimalmedium resuspendiert und für 4 h mit ^{55}Fe markiert. Nach Sedimentation der Zellen und mechanischem Zellaufschluss (4.15.6) wurden die Extrakte mit IgG-Sepharose für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde Nbp35p-TAP bzw. die um 52 Aminosäurereste verkürzte Variante immunpräzipitiert. Die mit den Proteinen co-präzipitierte Menge an ^{55}Fe wurde im Szintillationszähler quantifiziert. Wildtypzellen, die das Fusionsprotein Nbp35p-TAP überproduzierten, bauten 18-mal mehr radioaktives Eisen ein, als Kontrollzellen, die den leeren Vektor enthielten (Abb. 5) Dies ist signifikant, da die Menge an co-präzipitiertem ^{55}Fe im Bereich dessen liegt, was für ein Fe/S Protein erwartet wird (z.B. Isu1p 12.000 cpm/g Zellen). Schwankungen können sich durch Variationen des Zellaufschlusses ergeben. Zellen die eine am N-Terminus verkürzte Nbp35p Variante synthetisierten, konnten ähnlich wenig ^{55}Fe co-präzipitieren, wie Kontrollzellen die kein Nbp35-TAP synthetisierten (Abb. 5). Die Expression der Proteine wurde durch Western Blot Analysen von Zellextrakten untersucht. Der Nachweis erfolgte über einen gegen den TAP-*tag* gerichteten Antikörper. Nbp35p-TAP und die verkürzte Variante wurden in vergleichbaren Mengen synthetisiert (Abb. 5). In Kontrollzellen, die den leeren Vektor enthielten konnte kein Nbp35p-TAP Protein nachgewiesen werden. Diese Daten belegen, dass Nbp35p-TAP Eisen *in vivo* bindet, und dass die Eisenbindung am N-Terminus des Proteins erfolgt.

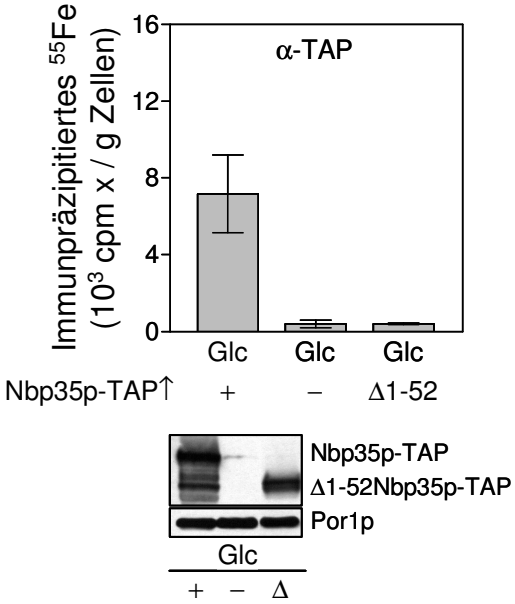

Abb. 5: Nbp35p bindet Eisen *in vivo*. Wildtypzellen, die eine TAP-*tag* Version von Nbp35p (+), eine um 52 Aminosäurereste verkürzte Form von Nbp35p-TAP↑ (Δ1-52) überproduzierten oder den leeren Vektor (-) enthielten wurden 16 h in eisenarmen Minimalmedium mit Glukose (Glc) kultiviert. Die Zellen wurden für 4 h mit ^{55}Fe markiert, geerntet und anschließend mit Glasperlen mechanisch aufgeschlossen. Die Zellextrakte wurden für 1 h bei 4°C mit IgG-Sepharose inkubiert und Nbp35p-TAP (+) bzw. die verkürzte Variante (Δ1-52) wurden anschließend bei 4°C immunpräzipitiert. Die Menge an co-präzipitiertem ^{55}Fe wurde durch Szintillationszählung quantifiziert und diente als direktes Maß für den Einbau von Eisen in Nbp35p-TAP (+) bzw. dessen verkürzte Variante (Δ1-52). Die gemessene Radioaktivität wurde pro g Zellen (Zellnassgewicht) angegeben. Durch SDS-PAGE und anschließender Immunfärbung wurden die Zellen auf ihren Gehalt an Nbp35p-TAP (+) bzw. Δ1-52Nbp35p-TAP (Δ) überprüft. Porin (Por1) diente als Ladungskontrolle. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier unabhängigen Messungen an.

Die Eisenbindung an Nbp35p war stabil, auch gegen die Behandlung mit EDTA und Triton X-100 in den verwendeten Zell-Aufschlusspuffern. Eine Eisenbindung an Nbp35p wurde auch beobachtet, wenn die Immunfällung unter aeroben Bedingungen stattfand.

5.1.2. Die mitochondriale ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie ist für die Reifung von Nbp35p essentiell

Komponenten der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie sind für die Reifung aller zellulären Fe/S Proteine essentiell (3.6). Der Nachweis einer Abhängigkeit der Eisenbindung an Nbp35p von Komponenten der ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie kann daher als indirekter Beweis dafür dienen, dass Nbp35p einen Fe/S Cluster bindet.

Das Reporterkonstrukt p426NBP35-TAP wurde in die konditionalen ISC-Assemblierungsmutanten, Gal-NFS1 (Mühlenhoff *et al.*, 2003); Gal-YAH1 (Lange *et al.*, 2001) und der ISC-Exportmutante Gal-ATM1 (Kispal *et al.*, 1999) sowie in

Wildtypzellen, transformiert. Detaillierte Angaben zur Funktion von Nfs1p, Yah1p (ISC-Assemblierungsmaschinerie) und Atm1p (ISC-ExportMaschinerie) sind in der Einleitung beschrieben. Bei diesen Stämmen wurde der endogene Promotor durch einen Galaktose induzierbaren *GAL1-10* Promotor ersetzt. In diesen Promotoraustauschmutanten wird das entsprechende Gen bei Kultivierung der Zellen in Gegenwart von Galaktose induziert, während die Kultivierung in Gegenwart von Glukose das Gen reprimiert. Um die Synthese der ISC-Assemblierungs- und Exportkomponenten unter die Nachweisgrenze (Western Blot) herabzusetzen, wurden die Zellen insgesamt 48 h (Gal-YAH1) bzw. 40 h (Gal-ATM1) in Gegenwart von Glukose in Flüssigmedium kultiviert. Gal-NFS1 Zellen wurden zunächst 3 Tage auf Festmedium mit Glukose inkubiert und dann in Flüssigmedium überführt. Alle Zellen wurden aus einer in Minimalmedium mit Glukose und Galaktose gewachsenen Vorkultur in eisenarmes Minimalmedium mit Galaktose oder Glukose überimpft, nach 16 h geerntet und in frisches eisenarmes Minimalmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 4 h mit ^{55}Fe markiert, geerntet und mechanisch aufgeschlossen. Die Zellextrakte wurden mit IgG-Sepharose und mit an Protein-A gekoppelten anti-Leu1p Antikörpern (Gal-ATM1) für 1 h bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden Nbp35p-TAP bzw. Leu1p immunpräzipitiert, gewaschen und die co-präzipitierte Radioaktivität im Szintillationszähler quantifiziert. Gal-NFS1, Gal-YAH1 und Gal-ATM1 Zellen bauten unter reprimierenden Wachstumsbedingungen im Vergleich zu den entsprechenden induzierten Zellen 4-mal (Gal-NFS1 und Gal-YAH1) bzw. 2-mal (Gal-ATM1) weniger radioaktives Eisen in Nbp35p-TAP ein (Abb. 6B und C). Die reduzierte Einbaurate von ^{55}Fe in Nbp35p-TAP war spezifisch auf die verminderte Synthese der ISC-Assemblierungs- bzw. Exportkomponenten zurückzuführen, da Gal-YAH1 und Gal-ATM1 Zellen unabhängig von der Kohlenstoffquelle das Nbp35p-TAP Protein in vergleichbaren Mengen synthetisierten. In Gal-NFS1 Zellen wurde unter reprimierenden Bedingungen deutlich weniger Nbp35p Protein nachgewiesen, eine Beobachtung die früher schon für andere Fe/S Proteine in diesem Stammhintergrund gemacht wurde (Abb. 6B). Möglicherweise ist Nbp35p-TAP in der Apoform instabil und wird schneller proteolytisch abgebaut. Die Kohlenstoffquelle hatte einen vernachlässigbaren Einfluss auf den Eiseneinbau in Nbp35p-TAP, da Wildtypzellen, die in Gegenwart von Glukose kultiviert wurden, maximal 10% weniger Eisen in Nbp35p-TAP einbauten als in Gegenwart von Galaktose (Abb. 6A). Zum Vergleich wurde die Eisenbindung an das cytosolische Fe/S Protein Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p)

parallel zu Nbp35p-TAP in Gal-ATM1 Zellen untersucht. Leu1p wird in der Leucin-Biosynthese benötigt und katalysiert die Umwandlung von α- zu β-Isopropylmalat. Zur Analyse der Eisenbindung an Leu1p sind die endogen produzierten Mengen des Proteins ausreichend. Aus einer früheren Arbeit war bekannt, dass die Reifung von Leu1p von der Funktion des Atm1p und Komponenten der mitochondrialen ISC-Assemblierungsmaschinerie abhängig ist (Kispal *et al.*, 1999). Die Eisenbindung von Leu1p und Nbp35p-TAP verhielt sich in Gal-ATM1 Zellen vergleichbar. Unter reprimierenden Bedingungen wurden 2-mal (Nbp35p-TAP) bzw. 2,5-mal (Leu1p) weniger radioaktives Eisen in die jeweiligen Proteine eingebaut (Abb. 6C). Die verminderte Synthese von Atm1p in Gal-ATM1 Zellen konnte nicht durch eine Immunfärbung gezeigt werden, da Nbp35p-TAP und Atm1p im SDS-Gel auf gleicher Höhe laufen. Allerdings wurde die verminderte Synthese von Atm1p unter reprimierenden Bedingungen in Zellen ohne Nbp35p-TAP bereits durch Immunfärbung nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Daten belegen, dass der radioaktive Eiseneinbau in Nbp35p-TAP von Komponenten der ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie abhängt. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass Nbp35p ein Fe/S Protein ist.

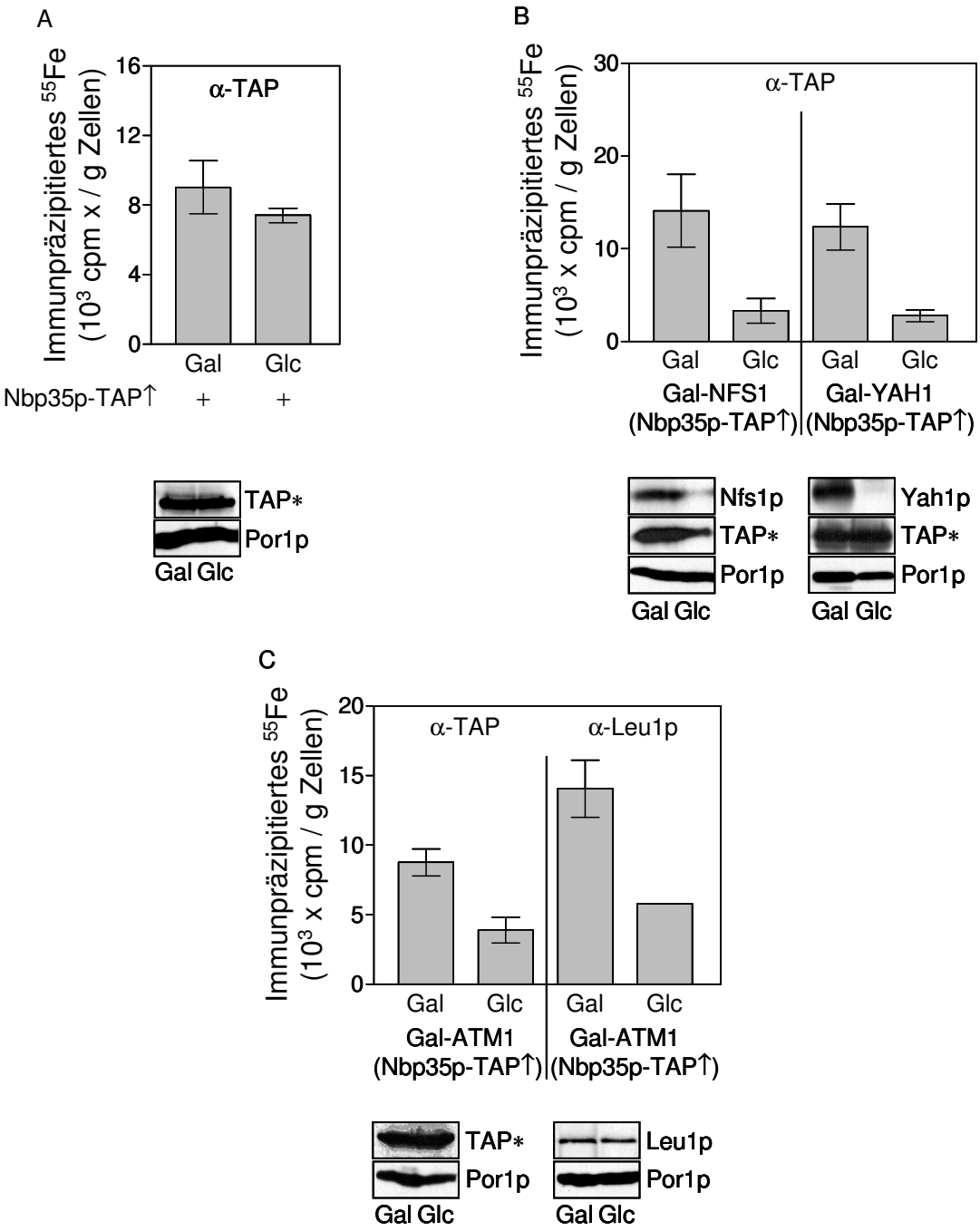

Abb. 6: Die Eisenbindung an Nbp35p-TAP hängt von Komponenten der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie ab. A) Wildtyp-, **(B)** Gal-NFS1, Gal-YAH1 und **(C)** Gal-ATM1 Zellen, die *NBP35-TAP* (Nbp35p-TAP↑) überexprimierten wurden 16 h in eisenarmen Minimalmedium mit Galaktose (Gal) oder Glukose (Glc) als Kohlenstoffquelle kultiviert. Die Zellen wurden 4 h mit ^{55}Fe markiert und anschließend mit Glasperlen aufgeschlossen. Die Zellextrakte wurden mit IgG-Sepharose bzw. **(C, rechts)** mit an Protein-A-Sepharose gekoppelten Antikörpern gegen Leu1p für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend wurde Nbp35p-TAP bzw. Leu1p bei 4°C immunpräzipitiert. Die Menge an co-präzipitiertem ^{55}Fe wurde durch Szintillationszählung quantifiziert und diente als direktes Maß für den Einbau von Eisen in den Fe/S Cluster von Nbp35p-TAP bzw. Leu1p. Die gemessene Radioaktivität wurde pro g Zellen (Zellnassgewicht) angegeben. Die Anwesenheit der Proteine wurde durch eine Western Blot Analyse unter Verwendung spezifischer Antiseren gegen Leu1p bzw. Antikörpern gegen den TAP-*tag* von Nbp35p überprüft (TAP∗: Nbp35p-TAP). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier unabhängigen Messungen an.

5.1.3. Analyse des rekombinanten Nbp35p

Zur weiteren Unterstützung der Befunde *in vivo* wurde Nbp35p in *E. coli* heterolog überproduziert und über einen am N-Terminus fusionierten His-*tag* durch Metall-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Reinigung des Proteins fand unter aeroben Bedingungen statt und ist in Abbildung 7A gezeigt. Nbp35p konnte bis zur apparenten Homogenität gereinigt werden. Im UV/Vis zeigte sich ein Spektrum, dass sowohl auf ein [2Fe-2S] als auch auf ein [4Fe-4S] Cluster-tragendes Protein hindeutet (Absorptionsmaxima bei 320 nm und 420 nm) (Abb. 7B). Die Präparation enthielt 0,8 Mol säurelabilen Schwefel und 0,8 Mol Eisen pro Mol Polypeptidkette (Abb. 7B, Säulendiagramm). Auch wenn die Fe/S Cluster Zusammensetzung am rekombinanten Nbp35p unvollständig ist, so zeigen die Daten eindeutig, dass das rekombinante Nbp35p ein Fe/S Protein ist. Dies wurde zusätzlich durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie bei niedriger Temperatur mit reduziertem Nbp35p bestätigt. Das Spektrum zeigt ein Signal mit einem *g* Wert von 1,94, welcher typisch für ein [4Fe-4S] Cluster-tragendes Protein ist (Abb. 7C, von A. Pierik). Die Analysen *in vivo* und des rekombinanten Proteins *in vitro* belegen eindeutig, dass Nbp35p ein Fe/S Protein ist.

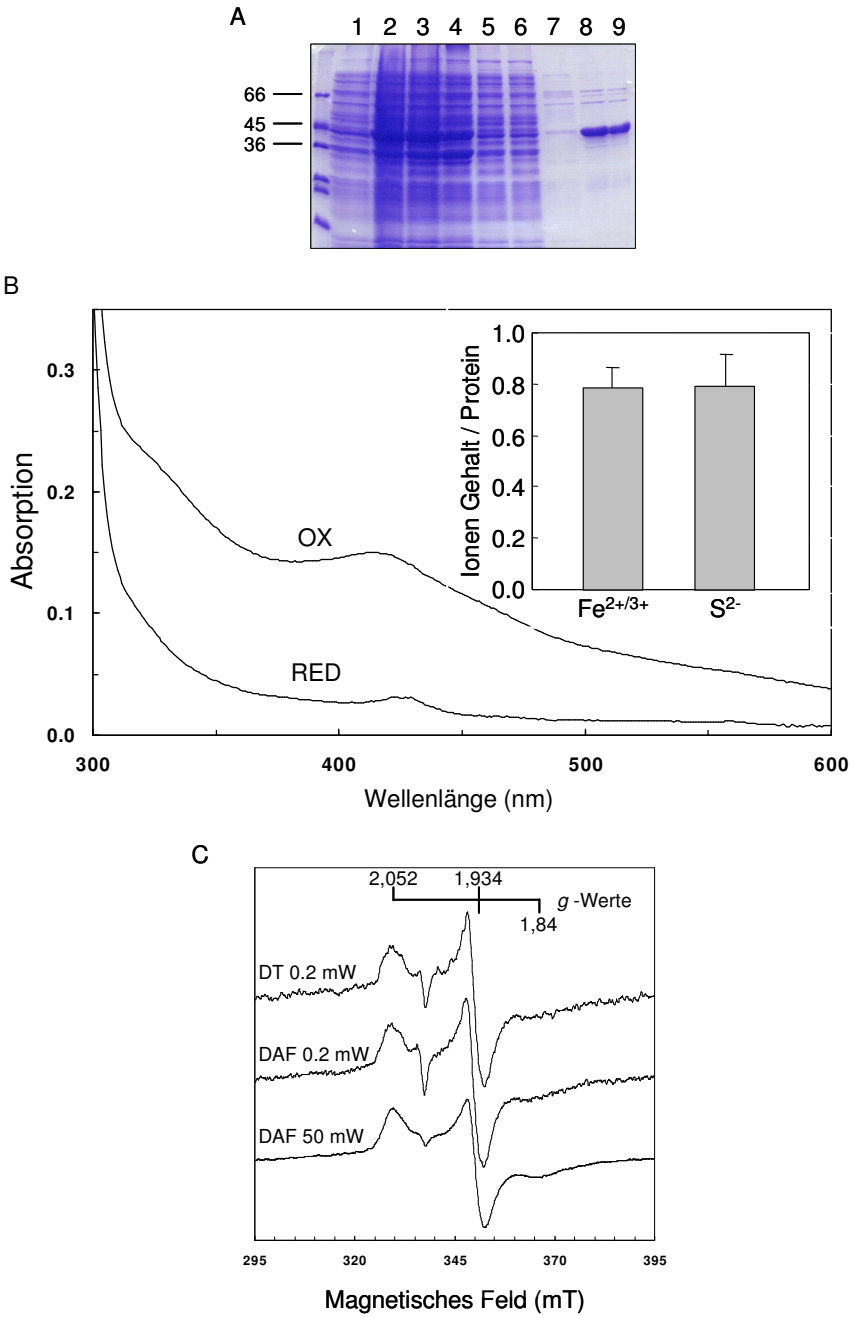

Abb. 7: Gereinigtes Nbp35p ist ein Fe/S Protein. A) Fraktionen der Reinigungsschritte von Nbp35p wurden durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Spur 1: vor Induktion, Spur 2: 3 h nach Induktion mit IPTG, Spur 3: Pellet, Spur 4: Überstand, Spur 5: Durchfluss, Spur 6: Waschfraktion, Spur 7: Eluat 2 der Affinitätsreinigung, Spur 8: Eluat 3, Spur 9: die Hälfte der unter Spur 8 aufgetragenen Menge. **B)** UV/Vis Spektrum von gereinigtem Nbp35p mit N-terminal fusioniertem His-*tag* (1.9 mg/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0/1 µM 5`-Deazaflavin). Gezeigt sind die Spektren vor (OX) und nach 5`-Deazaflavin (RED) Photoreduktion durch 3 min Bestrahlung mit einem herkömmlichen Dia-Projektor. Der Beitrag an oxidiertem 5`-Deazaflavin zum Spektrum vor der Photoreduktion wurde subtrahiert. Das Säulendiagramm zeigt die kolorimetrische Bestimmung von Eisen und säurelabilen Schwefel. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von 5 unabhängigen Messungen an (durchgeführt von D. Aguilar-Netz). **C)** ESR Spektren von reduziertem Nbp35p mit N-terminal fusioniertem His-*tag* (10,3 mg/ml in 100 mM Tris/Cl, pH8). Die Reduktion erfolgte durch Zugabe von 0,2 mM (Endkonzentration) Natrium-Dithionit (DT) oder durch Photoreduktion mit 5`-Deazaflavin (DAF). ESR Bedingungen: Temperatur 10 K; Mikrowellenleistung (mW) wie angegeben; Modulationsamplitude 1,25 mT; Modulationsfrequenz 100 kHz; Mikrowellenfrequenz 9,456 ± 0,002 GHz (durchgeführt von A. Pierik).

5.2. Nbp35p ist an der Reifung cytosolischer und nukleärer Fe/S Proteine beteiligt

5.2.1. Die Depletion von Nbp35p führt zu einem Wachstumsdefekt

Wie eingangs erwähnt, übt das Cfd1p Protein aus *S. cerevisiae* eine Funktion in der Biogenese cytosolischer Fe/S Proteine aus (Roy *et al.*, 2003). Da Nbp35p eine hohe Homologie zu Cfd1p aufweist, ist die Ausübung ähnlicher zellulärer Funktionen denkbar. Im Folgenden wurde die Funktion von Nbp35p ausführlicher untersucht. Da Nbp35p für das Überleben der Zelle essentiell ist (Vitale *et al.*, 1996), wurde eine regulierbare Mutante erzeugt (4.9.1), in welcher der endogene *NBP35* Promotor im Genom durch einen *GAL1-10* Promotor ersetzt wurde. In dieser Gal-NBP35 Mutante lässt sich *NBP35* in Gegenwart von Galaktose induzieren und in Gegenwart von Glukose reprimieren. Die Gal-NBP35 Zellen wurden zunächst auf ihr Wachstumsverhalten in Abhängigkeit von der angebotenen Kohlenstoffquelle untersucht. Die Abbildung 8 zeigt, dass Gal-NBP35 Zellen auf Minimalmedium mit Galaktose wie Wildtypzellen wachsen. Die verminderte Synthese von Nbp35p unter reprimierenden Wachstumsbedingungen führte im Vergleich zu Wildtypzellen zu einer Wachstumsverzögerung und zur Ausbildung kleinerer Kolonien. Die verminderte Nbp35p Synthese in Gegenwart von Glukose war nicht letal, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass der *GAL1-10* Promotor durch Glukose nicht vollständig reprimiert werden konnte und eine basale Expression von *NBP35* weiter bestand. Nbp35p-depletierte Zellen wuchsen auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (wie z.B. Glycerin) wie Wildtypzellen, was auf eine unbeeinträchtigte Mitochondrienfunktion schließen lässt (Abb. 8).

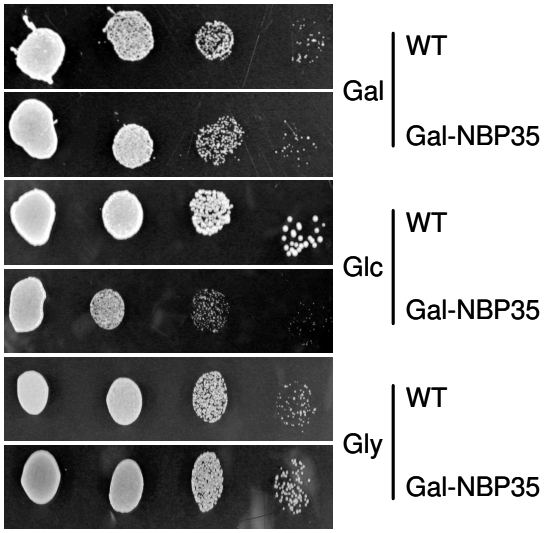

Abb. 8: Gal-NBP35 Zellen zeigen unter reprimierenden Kultivierungsbedingungen einen Wachstumsdefekt. Wildtyp- (WT) und Gal-NBP35 Zellen wurden in flüssigem Minimalmedium mit Galaktose (Gal), Glukose (Glc) oder Glycerin (Gly) für 2 Tage bei 30°C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf eine OD_{600} von 0,5 eingestellt, jeweils 5 µl einer 1:10 Verdünnungsreihe wurden auf Minimalmedium Agarplatten mit der angegebenen Kohlenstoffquelle aufgetropft. Die Zellen wurden 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Zur Demonstration, dass die Wachstumsverzögerung von Gal-NBP35 Zellen in Gegenwart von Glukose allein auf die verminderte Synthese von Nbp35p zurückzuführen ist, wurden die Zellen mit den Plasmiden p426NBP35-TAP oder p426NBP35-Strep transformiert, die eine konstitutive Expression von *NBP35* unter der Kontrolle des *TDH3* Promotors ermöglichten. Zunächst wurde das endogene *NBP35* durch Kultivierung in Gegenwart von Glukose reprimiert. Anschließend wurden die Zellen auf eine Agarplatte mit Glukose als Kohlenstoffquelle ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Gal-NBP35 Zellen, die *NBP35* von einem Plasmid exprimierten, entwickelten sich wie Wildtypzellen (Abb. 9). Gal-NBP35 Zellen, die den leeren Vektor enthielten, zeigten weiterhin eine Wachstumsverzögerung. Diese Daten zeigen, dass die Wachstumsverzögerung ausschließlich auf die geringere Synthese von Nbp35p zurückzuführen ist.

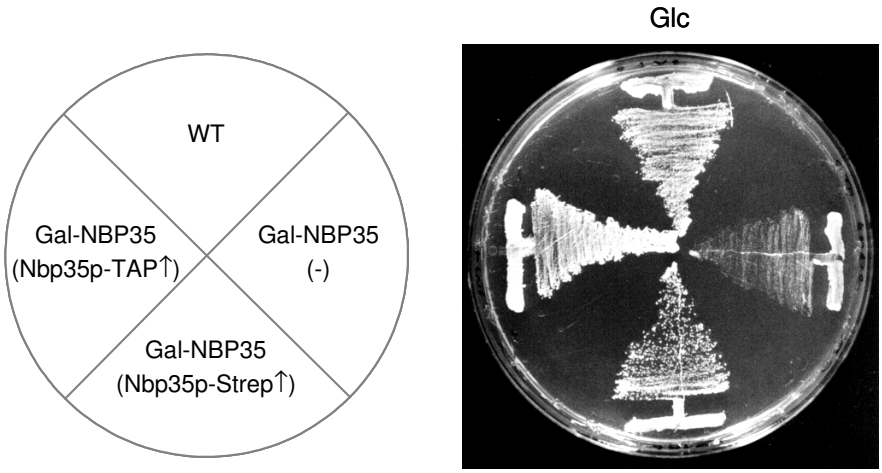

Abb. 9: Der Wachstumsdefekt von Gal-NBP35 Zellen unter reprimierenden Bedingungen wird durch plasmidgestützte Expression von *NBP35* aufgehoben. Wildtyp- (WT) und Gal-NBP35 Zellen, die *NBP35* konstitutiv von dem Plasmid p426Nbp35-TAP (Nbp35-TAP↑) oder p426Nbp35-Strep (Nbp35-Strep↑) exprimierten, oder den leeren Vektor (-) enthielten, wurden nach Verminderung des endogenen Nbp35p Proteins, nochmals auf Festmedium mit Glukose (Glc) ausplattiert und 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

5.2.2. Nbp35p ist im Cytosol und Kern lokalisiert

Nbp35p wurde zunächst als ein im Zellkern lokalisiertes Protein beschrieben (Vitale *et al.*, 1996). Nachfolgende systematische Lokalisierungsstudien detektierten das Protein auch im Cytosol (Huh *et al.*, 2003). Zur Klärung der intrazellulären Lokalisierung von Nbp35p in Hefezellen wurde eine *in situ* Immunfluoreszenz (4.15.1) und eine Zellfraktionierung durchgeführt.

***In situ* Immunfluoreszenz**

Wildtyp- und Gal-NBP35 Zellen wurden nach Fixierung in 3,7% Formaldehyd durch Triton X-100 permeabilisiert, mit einem α-Nbp35p Antikörper (Kaninchen) inkubiert und anschließend mit einem Alexa-488 gekoppelten Antikörper (anti-Kaninchen) markiert (Abb. 10A). Parallel dazu wurden Wildtypzellen, die Ntg2p-HA (kernlokalisiertes Markerprotein) mit einem C-terminal fusionierten HA-*tag* überproduzierten, mit einem α-HA Antikörper (Maus) inkubiert und im Anschluss mit einem Alexa-488 gekoppelten Antikörper (anti-Maus) markiert. Ntg2p ist eine DNA-N-Glycosylase, die an DNA-Reparaturvorgängen beteiligt ist. Zusätzlich erfolgte eine Anfärbung der DNA mit DAPI zur Darstellung des Zellkerns und der Mitochondrien.

Unter induzierenden Bedingungen zeigten Gal-NBP35 und Wildtypzellen eine uniforme Fluoreszenz des Cytosols (Abb. 10A). Diese war in Gal-NBP35 Zellen deutlich stärker, da *NBP35* unter Kontrolle des *GAL1-10* Promotors überexprimiert wurde. Das Fluoreszenzsignal war spezifisch, da Gal-NBP35 Zellen unter

reprimierenden Bedingungen keine Fluoreszenz zeigten. Unter induzierenden Bedingungen war auch im Bereich des Kerns eine signifikante Fluoreszenz zu beobachten.

Zellfraktionierung

Alternativ wurde die Lokalisierung von Nbp35p durch eine Zellfraktionierung mit nachfolgender Immunfärbung überprüft (Abb. 10B). Aus Wildtypzellen, die das Fusionsprotein Nbp35p-Strep synthetisieren wurden Mitochondrien, post-mitochondrialer Überstand (PMS) und Cytosol (Cyt) präpariert. Letzteres wurde durch Ultrazentrifugation aus dem PMS gewonnen und ist überwiegend frei von Membranbestandteilen. Nbp35p-Strep ließ sich wie das cytosolische Markerprotein Pgk1p (Phosphoglycerin-Kinase) ausschließlich im PMS und Cytosol nachweisen. Da gleiche Mengen an Nbp35p im PMS und Cytosol nachweisbar waren, scheint Nbp35p nicht mit Membranen assoziiert zu sein. In der Mitochondrienfraktion wurde kein Nbp35p detektiert. Diese Daten belegen, dass Nbp35p vorwiegend als lösliches Protein im Cytosol existiert, und eine geringere Menge im Kern lokalisiert ist. Die Daten zeigen außerdem, dass eine Überproduktion von Nbp35p nicht zur Fehllokalisierung führt.

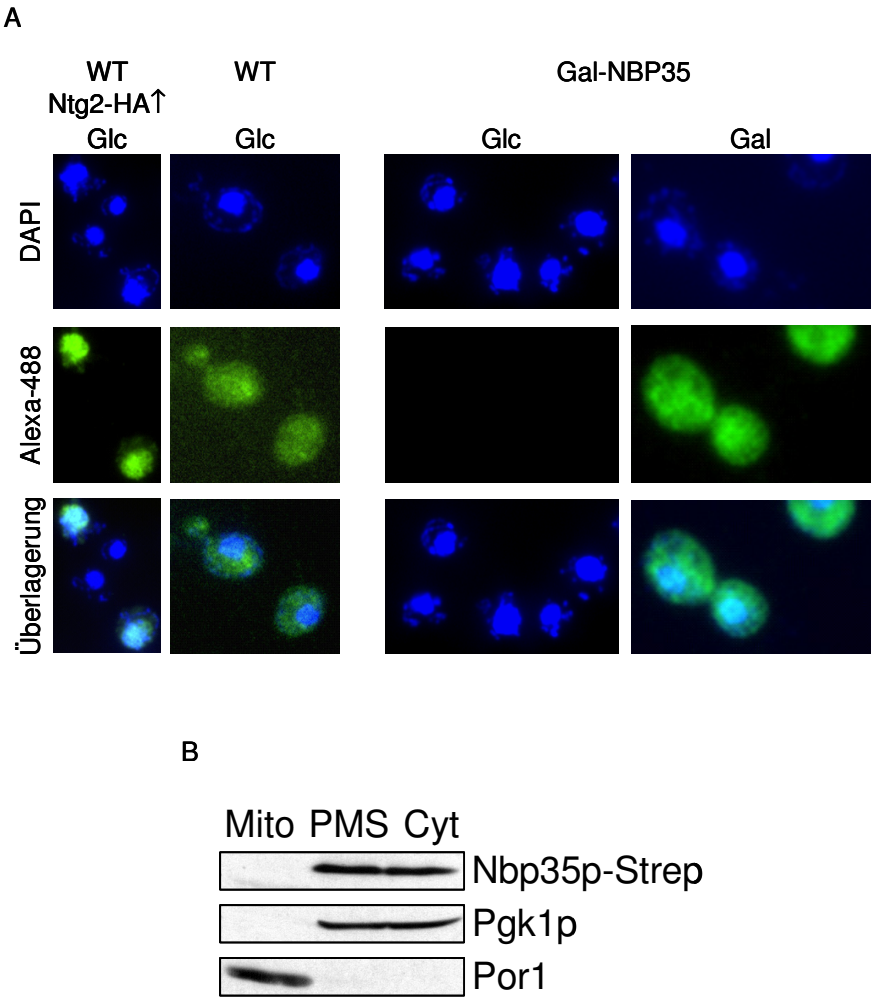

Abb. 10: Nbp35p ist im Cytosol und Kern lokalisiert. A) *In situ* Lokalisierung von Nbp35p in Wildtyp- (WT) und Gal-NBP35 Zellen, die unter reprimierenden (Glc) oder induzierenden Bedingungen (Gal) kultiviert wurden und *in situ* Lokalisierung von Ntg2p-HA in Wildtypzellen, die Ntg2p-HA überproduzierten (WT Ntg2p-HA↑). Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, in Formaldehyd fixiert und nach Permeabilisierung mit einem anti-Nbp35p Antiserum (Kaninchen) bzw. einem monoklonalen anti-HA Antikörper (Maus) inkubiert und anschließend mit einem Alexa-488 gekoppelten anti-Kaninchen bzw. anti-Maus IgG Antikörper markiert (Absorption: 495 nm, Emission: 519 nm, Verd. 1:500). Parallel dazu erfolgte eine Markierung der DNA mit DAPI. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop. **B)** Je 50 µg isolierte Mitochondrien (Mito), post-mitochondrialer Überstand (PMS) und Cytosol (Cyt) wurden in einem 12,5% SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Die subzelluläre Lokalisierung von Nbp35p erfolgte durch Immunfärbung des Strep-*tag* mit einem Streptavidin-Peroxidase Antikörper (Verd. 1:2.000). Als Markerproteine dienten die cytosolische Phosphoglycerin-Kinase (Pgk1p) und das mitochondriale Porin (Por1p).

5.2.3. Nbp35p kann Cfd1p nicht funktionell ersetzen

Das Protein Cfd1p aus *S. cerevisiae* ist an der Biogenese cytosolischer Fe/S Proteine beteiligt (Roy *et al.*, 2003). Eine verminderte Synthese von Cfd1p führt zu Aktivitätsverlusten von cytosolischen Fe/S Proteinen. Da Nbp35p eine hohe Homologie zu Cfd1p aufweist, ist die Ausübung ähnlicher zellulärer Funktionen denkbar. Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob Nbp35p und Cfd1p sich funktionell ersetzen können. Zu diesem Zweck wurden die regulierbaren Mutanten Gal-NBP35 und Gal-CFD1 (Hausmann *et al.*, 2005) mit den Plasmiden p424NBP35,

p426CFD1, oder dem leeren Vektor transformiert. Die Plasmide ermöglichten eine konstitutive Expression von *NBP35* bzw. *CFD1* in Hefe. Die transformierten Zellen wurden in Minimalmedium mit Galaktose oder Glukose kultiviert, um das endogene *NBP35* und *CFD1* im entsprechenden Stamm zu induzieren bzw. zu reprimieren. Anschließend wurden die Zellen auf Festmedium mit Glukose oder Galaktose aufgetropft und auf ihr Wachstumsverhalten überprüft.

Sowohl Gal-NBP35 als auch Gal-CFD1 Zellen zeigten unter induzierenden Bedingungen keinen Wachstumsdefekt, unabhängig davon, ob *NBP35* und/oder *CFD1* von einem Plasmid überexprimiert wurden oder ob die Zellen den leeren Vektor enthielten (Abb. 11A, oben). Unter reprimierenden Bedingungen konnte der Wachstumsdefekt von Gal-NBP35 Zellen durch die gemeinsame Überexpression von *NBP35* und *CFD1* oder durch die alleinige Überexpression von *NBP35*, nicht aber durch die alleinige Überexpression von *CFD1* aufgehoben werden (Abb. 11A, oben). Gal-CFD1 Zellen verhielten sich analog. Der Wachstumsdefekt von Gal-CFD1 Zellen in Gegenwart von Glukose ließ sich nur durch Überexpression von *CFD1*, nicht aber durch die Überexpression von *NBP35* aufheben (Abb. 11A, unten). Ferner wurden Gal-CFD1 Zellen mit Plasmiden transformiert, die eine Überexpression von *NBP35*, *NAR1* oder *NTG2* ermöglichten. Nar1p ist ein Fe/S Protein, weches vorwiegend im Cytosol lokalisiert ist und eine Funktion in der Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen einnimmt. Ntg2p ist ein kernlokalisiertes Fe/S Protein, mit einer Funktion in der DNA-Reparatur. Gal-CFD1 Zellen wurden in Gegenwart von Galaktose und Glukose auf Festmedium aufgetropft und hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens analysiert. Gal-CFD1 Zellen zeigten unter induzierenden Bedingungen keinen Wachstumsdefekt, unabhängig davon, ob sie Nbp35p, Nar1p oder Ntg2p überproduzierten oder den leeren Vektor enthielten (Abb. 11B). Unter reprimierenden Wachstumsbedingungen entwickelten Gal-CFD1 Zellen einen Wachstumsdefekt. Dieser wurde durch die Überexpression von Nbp35p oder Nar1p gleichermaßen verstärkt (Abb. 11B), während die Überexpression von Ntg2p keinen Einfluss auf das Wachstum ausübte. In Wildtypzellen zeigte die Überproduktion von Nbp35p und Nar1p keine schädlichen Auswirkungen (Daten nicht gezeigt). Diese Daten demonstrieren, dass Nbp35p und Cfd1p sich nicht funktionell ersetzen können. Zudem hängt die Funktionalität von Nbp35p, Cfd1p und Nar1p von ausgewogenen Proteinmengen ab. Ein Überschuss an Nbp35p und Nar1p beeinträchtigt die Lebensfähigkeit der Zellen.

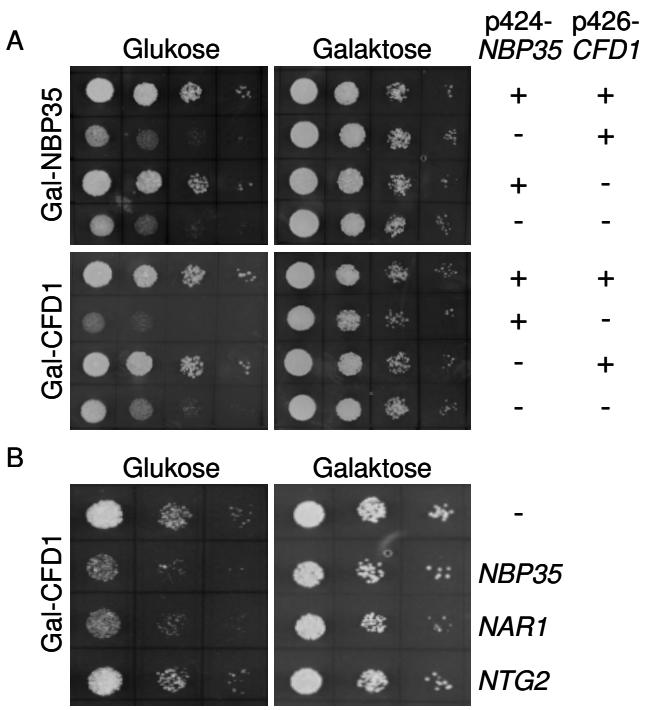

Abb. 11: Nbp35p kann Cfd1p nicht funktionell ersetzen. A) Gal-NBP35 und Gal-CFD1 Zellen wurden mit den high-copy Plasmiden p424NBP35 (+) und / oder p426CFD1-HA (+), oder dem leeren Vektor (-) transformiert, um *NBP35* und / oder *CFD1-HA* unter der Kontrolle des *TDH3* Promotors zu überexprimieren. **B)** Gal-CFD1 Zellen wurden mit den high-copy Plasmiden p424NBP35, p424NAR1 und p424NTG2, oder dem leeren Vektor (-) transformiert. Diese überexprimierten *NBP35*, *NAR1* und *NTG2* konstitutiv unter der Kontrolle des *TDH3* Promotors. Die Zellen wurden in Gegenwart von Galaktose oder Glukose kultiviert, um das endogene *NBP35* oder *CFD1* in der entsprechenden Zelle zu induzieren (Galaktose) oder zu reprimieren (Glukose). Die Zellen wurden anschließend auf eine OD_{600} von 0,5 eingestellt, jeweils 5 µl einer 1:10 Verdünnungsreihe auf Minimalmedium Agarplatten mit der angegebenen Kohlenstoffquelle aufgetropft und 3 Tage bei 30°C inkubiert. (von D. Aguilar-Netz)

5.2.4. Nbp35p wird für die Reifung des cytosolischen Fe/S Proteins Leu1p benötigt

Um eine mögliche Funktion von Nbp35p in der Biogenese zellulärer Fe/S Proteine näher beurteilen zu können, wurden die Enzymaktivitäten verschiedener Fe/S Proteine gemessen. Bereits für das Cfd1p Homolog wurde gezeigt, dass dieses für die Aktivität der cytosolischen Proteine IRP1 (einer Aconitase) und dem cytosolischen Leu1p benötigt wird (Roy *et al.*, 2003). Wildtyp- und Gal-NBP35 Zellen wurden in Minimalmedium mit Galaktose oder Glukose kultiviert, um die Synthese von Nbp35p in Gal-NBP35 Zellen zu induzieren bzw. zu reprimieren. Aus diesen Zellen wurden Mitochondrien und post-mitochondrialer Überstand isoliert. Unter reprimierenden Bedingungen sank die Leu1p Aktivität im post-mitochondrialen Überstand im Vergleich zu Wildtypzellen um den Faktor 7 (Tab. 1). Zellen, die in Gegenwart von Galaktose kultiviert wurden, zeigten keine Abnahme der Leu1p Aktivität. In Wildtypzellen hatte die Kohlenstoffquelle keinen Einfluss auf die Leu1p Aktivität im post-mitochondrialen Überstand (Tab. 1). Zur Kontrolle wurde die Aktivität

der Alkohol-Dehydrogenase bestimmt, welche die Umsetzung von Ethanol zu Acetaldehyd katalysiert. Dieses Enzym besitzt keinen Fe/S Cofaktor. Gal-NBP35 Zellen zeigten weder unter induzierenden noch unter reprimierenden Wachstumsbedingungen einen Aktivitätsverlust der Alkohol-Dehydrogenase. Die Aktivitäten mitochondrialer Proteine blieben durch die Depletion von Nbp35p unbeeinflusst, unabhängig davon, ob es sich um Fe/S Proteine (Aconitase, Succinat-Dehydrogenase) oder um Proteine ohne Fe/S Cofaktor (Malat-Dehydrogenase, Citrat-Synthase) handelte (Tab. 1). Diese Daten zeigen, dass Nbp35p spezifisch für die Enzymaktivität von Leu1p, einem cytosolischen Fe/S Protein, nicht jedoch für mitochondriale Fe/S Proteine benötigt wird.

Tab. 1: Enzymaktivitäten in NBP35p-depletierten Gal-NBP35 Zellen

	Wildtyp		**Gal-NBP35**	
Kompartiment	**Gal**	**Glc**	**Gal**	**Glc**
Enzym				
Cytosol				
Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p)	0,30 ± 0,01	0,31 ± 0,05	0,40 ± 0,09	<0,04
Alkohol-Dehydrogenase	1,8 ± 0,3	2,0 ± 0,3	1,6 ± 0,2	2,4 ± 0,6
Mitochondrien				
Aconitase (Aco1p)	3,5 ± 0,9	3,2 ± 0,4	2,9 ± 0,5	3,7 ± 0,6
Succinat-Dehydrogenase	0,30 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,30 ± 0,01
Malat-Dehydrogenase	2,0 ± 0,1	1,5 ±0,1	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1
Citrat-Synthase	2,8 ± 0,4	2,9 ± 0,3	3,1 ± 0,6	3,7 ± 0,5

Wildtyp- und Gal-NBP35 Zellen wurden auf Minimalmedium mit Galaktose (Gal) oder Glukose (Glc) kultiviert. Mitochondrien und post-mitochondrialer Überstand wurden isoliert und anschließend die Enzymaktivitäten mitochondrialer und cytosolischer Proteine bestimmt. Aktivitäten sind in Units/mg Protein angegeben.

Mit dem folgenden Experiment sollte die Ursache gefunden werden, die zur Leu1p Aktivitätsabnahme führte. Diese könnte auf einen beschädigten Fe/S Cluster, eine verminderte Expression oder auf eine gestörte Fe/S Cluster Biogenese zurückzuführen sein.

Um dies zu klären, wurde die *de novo* Synthese mehrerer Fe/S Proteine durch Markierung mit radioaktivem Eisen und anschließender Immunpräzipitation verfolgt. Zunächst wurde die Biogenese cytosolischer Fe/S Proteine untersucht. Gal-NBP35 Zellen wurden mit Plasmiden transformiert, die eine konstitutive Überexpression der

cytosolischen Fe/S Proteine Rli1p-HA oder Nar1p-HA mit einem C-terminalen HA-*tag* ermöglichen. Die de novo Synthese des Fe/S Clusters von Leu1p konnte hingegen am endogenen Protein ohne Überexpression beobachtet werden. Die resultierenden Zellen wurden zunächst in Minimalmedium mit Galaktose oder Glukose und anschließend 16 h in eisenarmen Minimalmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in frischem eisenarmen Minimalmedium überimpft und 4 h mit ^{55}Fe markiert. Nach der Zellernte wurden diese aufgeschlossen, die Zellextrakte wurden mit gekoppelten α-Leu1 oder α-HA Antikörpern für 1 h bei 4°C inkubiert und immunpräzipitiert. Die Quantifizierung von co-präzipitiertem ^{55}Fe erfolgte durch Szintillationszählung der gewaschenen und an Protein-A-Kügelchen gekoppelten Antikörper. Unter reprimierenden Bedingungen wurde aus Zellextrakten von Gal-NBP35 Zellen 23-mal weniger ^{55}Fe mit Rli1p-HA, 12-mal weniger Leu1p und 4-mal weniger Nar1p-HA co-präzipitiert als unter induzierenden Bedingungen (Abb. 12). Die Analyse der Zellextrakte mittels Western Blot zeigte, dass die untersuchten Proteine unter induzierenden und reprimierenden Bedingungen in vergleichbaren Mengen in Gal-NBP35 Zellen synthetisiert wurden. Diese Daten demonstrieren, dass Nbp35p an der Reifung von cytosolischen Fe/S Proteinen beteiligt ist.

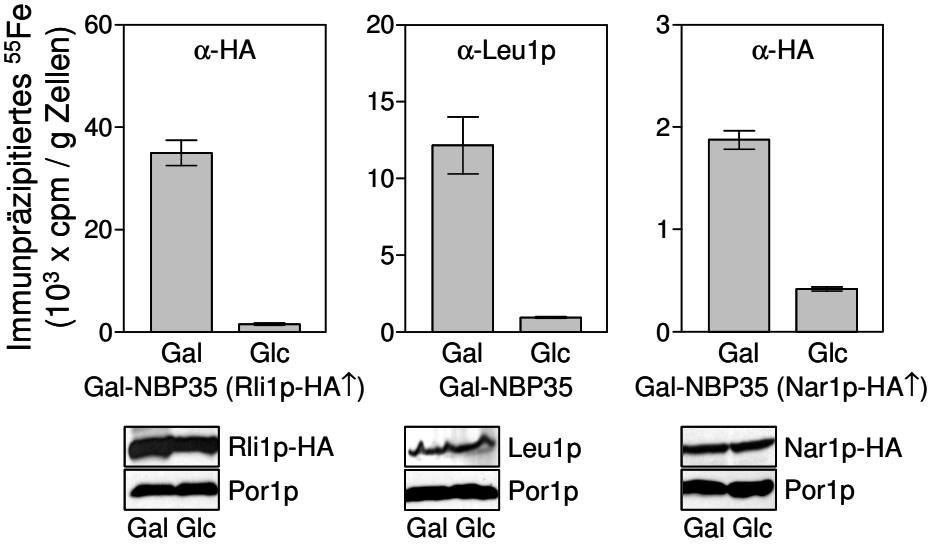

Abb. 12: Nbp35 ist an der Reifung von cytosolischen Fe/S Proteinen beteiligt. Gal-NBP35 und Gal-NBP35 Zellen, die Rli1p-HA↑ oder Nar1p-HA↑ überproduzierten wurden 16 h in eisenarmen Minimalmedium mit Galaktose (Gal) oder Glukose (Glc) kultiviert. Die Zellen wurden für 4 h mit Fe^{55} markiert und die Bindung von ^{55}Fe an Rli1p-HA, Nar1p-HA sowie Leu1p wurde durch Immunpräzipitation mit anti-HA Agarose bzw. mit an Protein A-Sepharose gekoppelten Antikörpern gegen Leu1p und anschließender Szintillationszählung bestimmt. Die gemessene Radioaktivität wurde pro Zellnassgewicht angegeben. Die Anwesenheit der Proteine wurde in einer Western Blot Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen den HA-*tag* bzw. mit Antiseren gegen Leu1p und Por1p nachgewiesen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier unabhängigen Messungen an.

5.2.5. Nbp35p ist an der Reifung kernlokalisierter *Fe/S Proteine beteiligt*

Um zu untersuchen, ob Nbp35p zur Reifung von nukleären Fe/S Proteinen benötigt wird, wurde als nächstes die *in vivo* Biogenese von Ntg2p verfolgt. Das Protein ist eine im Kern lokalisierte DNA-N-Glycosylase und übt dort eine Funktion in der DNA-Reparatur aus. Wildtyp- und Gal-NBP35 Zellen wurden mit high-copy Plasmiden transformiert, die eine Überexpression von Ntg2p-HA erlauben. Die Zellen wurden wie unter 5.2.4 beschrieben kultiviert, markiert und aufgeschlossen. Die Zellextrakte wurden mit α-HA-Agarose für 1 h bei 4°C inkubiert und immunpräzipitiert. Die Quantifizierung von mit Ntg2p-HA co-präzipitiertem ^{55}Fe erfolgte durch Szintillationszählung. Aus Extrakten von unter reprimierenden Bedingungen kultivierten Gal-NBP35 Zellen wurde 37-mal weniger ^{55}Fe mit Ntg2-HA co-präzipitiert als unter induzierenden Bedingungen (Abb. 13, Mitte). Die Menge an co-präzipitiertem Eisen entsprach dem von Wildtypzellen, die nur den leeren Vektor enthielten (Abb. 13, rechts). Im Gegensatz dazu wurden aus Wildtypzellen, die Ntg2p-HA überproduzierten, unabhängig von der Kohlenstoffquelle signifikante Mengen ^{55}Fe mit Ntg2-HA co-präzipitiert (Abb. 13, links). Durch Immunfärbung konnte bestätigt werden, dass Gal-NBP35 Zellen in Gegenwart von Galaktose und Glukose ähnliche Mengen Ntg2p-HA synthetisierten.

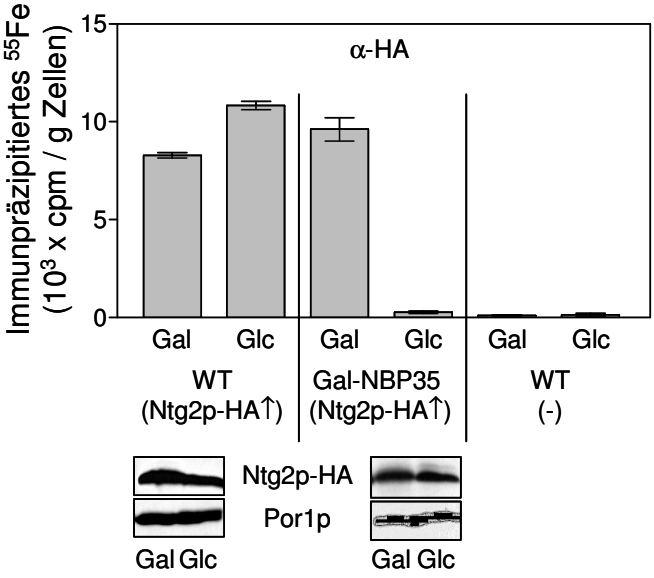

Abb. 13: Nbp35p ist an der Reifung nukleär lokalisierter Fe/S Proteine beteiligt. Wildtyp- (WT) und Gal-NBP35 Zellen die Ntg2p-HA↑ überproduzierten oder den leeren Vektor (-) enthielten wurden in eisenarmen Minimalmedium mit Galaktose (Gal) oder Glukose (Glc) für 16 h kultiviert. Die Zellen wurden für 4 h mit $^{55}FeCl_3$ markiert und die Bindung von ^{55}Fe an Ntg2-HA durch Immunpräzipitation mit anti-HA-Agarose und Szintillationszählung bestimmt. Die gemessene Radioaktivität wurde pro g Zellen (Zellnassgewicht) angegeben. Die Anwesenheit der Proteine wurde in einer Western Blot Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen den HA-*tag* bzw. mit Antiseren gegen Por1p nachgewiesen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von fünf unabhängigen Messungen an.

5.2.6. Nbp35p ist nicht an der Reifung mitochondrialer Fe/S Proteine beteiligt

Abschließend wurde die *de novo* Synthese des mitochondrialen Markerproteins Bio2p untersucht. Bio2p ist ein Fe/S Protein der mitochondrialen Matrix, das den letzten Schritt der Biotin-Synthese, den Einbau von Schwefel in Desthiobiotin, katalysiert. Gal-NBP35 Zellen, die Bio2p überproduzierten, wurden wie in 5.2.4 beschrieben kultiviert und markiert (2 h). Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen, Zellextrakte wurden mit α-Bio2p Protein-A-Sepharose für 1 h bei 4°C inkubiert und immunpräzipitiert. Die Quantifizierung des mit Bio2p co-präzipitierten ^{55}Fe erfolgte durch Szintillationszählung. Im Gegensatz zu den Fe/S Proteinen im Cytosol wurden aus Gal-NBP35 Zellen, die Bio2p überproduzierten, unabhängig von der Kohlenstoffquelle signifikante und vergleichbare Mengen ^{55}Fe mit Bio2p co-präzipitiert. (Abb. 14A). Die Zellen synthetisierten sowohl in Gegenwart von Galaktose, als auch Glukose vergleichbare Mengen Bio2p (Abb. 14A). Dies zeigt, dass die Reifung des Bio2p Proteins von Nbp35p unabhängig ist. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass Gal-NBP35 Zellen auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsen können, also weitestgehend intakte Mitochondrien besitzen müssen (Abb. 8).

Als weiteres Indiz dafür, dass Nbp35p nicht an der Reifung mitochondrialer Fe/S Proteine beteiligt ist, wurde der Eisengehalt in den Mitochondrien bestimmt (4.15.5). Es ist bekannt, dass Defekte der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie eine Akkumulation von Eisen in den Mitochondrien hervorrufen (Kispal *et al.*, 1997). Wildtypzellen und Gal-NBP35 Zellen wurden in Vollmedium mit Galaktose oder Laktat kultiviert. Nach ausreichender Verminderung von Nbp35p durch reprimierende Wachstumsbedingungen (Lak) wurden Mitochondrien isoliert. Die Bestimmung des Eisengehalts der Mitochondrien erfolgte photometrisch durch Verwendung von Bathophenantrolin. Diese Substanz bildet mit Eisen einen farbigen Komplex. Wie zu erwarten, enthielten Mitochondrien aus Gal-NBP35 Zellen auch unter reprimierenden Bedingungen keine höheren Eisenmengen als Mitochondrien aus Wildtypzellen (Abb. 14B). Nbp35p greift also offensichtlich nicht in die Regulation der Eisenhomeostase ein. Die Funktion von Nbp35p beschränkt sich allein auf die Reifung extra-mitochondrialer Fe/S Proteine.

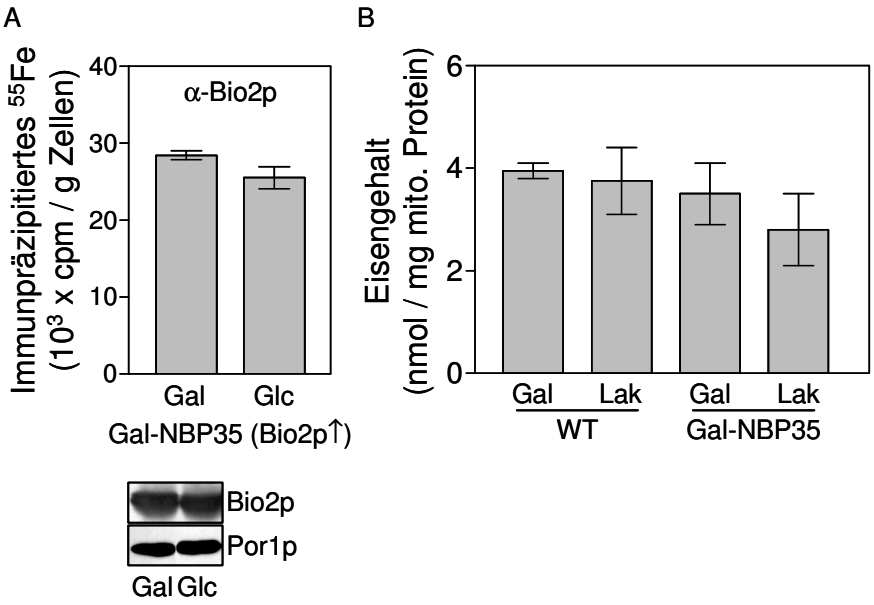

Abb. 14: Nbp35p wird nicht für die Reifung mitochondrialer Fe/S Proteine benötigt. A) Gal-NBP35 Zellen die Bio2p↑ überexprimierten wurden 16 h in eisenarmen Minimalmedium mit Galaktose (Gal) oder Glukose (Glc) kultiviert. Die Zellen wurden 2 h mit $^{55}FeCl_3$ markiert und die Bindung von ^{55}Fe an Bio2p wurde durch Immunpräzipitation mit an Protein A-Sepharose gekoppelten anti-Bio2p Antikörpern und Szintillationszählung bestimmt. Die Anwesenheit der Proteine konnte in einer Western Blot Analyse unter Verwendung spezifischer Antiseren gegen Bio2p und Por1p nachgewiesen werden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an. **B)** Wildtyp- (WT) und Gal-NBP35 Zellen wurden in Vollmedium mit Galaktose (Gal) oder Laktat (Lak) kultiviert, anschließend wurden Mitochondrien isoliert und der Gehalt an freiem reduziertem Eisen (d.h. nicht Häm, nicht Fe/S) wurde photometrisch durch die Bathophenantrolin-Methode bestimmt. Die Fehlerbalken geben den mittleren Fehler von drei unabhängigen Messungen an.

Zusammenfassung der Nbp35p Experimente

Die essentielle P-Loop NTPase Nbp35p bindet am N-Terminus einen Fe/S Cluster. Die Bindung des Clusters hängt von Komponenten der ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie ab. Das Protein ist hauptsächlich im Cytosol, aber auch im Zellkern lokalisiert. Für Nbp35p wurde eine Funktion in der Biogenese von cytosolischen und nukleären Fe/S Proteinen nachgewiesen. Die Funktion von Nbp35p konnte nicht durch das homologe Cfd1p Protein ersetzt werden. Nbp35p hat keinen Einfluss auf die Reifung von mitochondrialen Fe/S Proteinen und eine verminderte Synthese von Nbp35p führt auch nicht zu einer Eisenanreicherung in den Mitochondrien. Zusammenfassend zeigen die hier erhaltenen Daten, dass Nbp35p ein essentielles Mitglied der „cytosolic iron-sulfur protein-assembly“ (CIA)-Maschinerie ist. Die genaue Funktion von Nbp35p bei der Reifung von Fe/S Proteinen im Cytosol bedarf weiterer Untersuchungen.

5.3. Transkriptom-Analysen in *S. cerevisiae*

In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass Defekte in der Reifung von mitochondrialen Fe/S Proteinen in der Regel eine Fehlregulierung der zellulären Eisenaufnahme, eine Akkumulation von Eisen in den Mitochondrien und einen generellen Häm-Defekt auslösen. Diese Auswirkungen sind allerdings nicht durch einen Funktionsausfall von Fe/S Proteinen zu erklären, wie z.B. Defekte in der Respiration oder in der Biosynthese von Aminosäuren wie Glutamat und Lysin. Es ist wahrscheinlicher, dass die Reifung von zellulären Fe/S Proteinen regulatorisch auf die zelluläre Eisenhomeostase und auf andere Eisen-abhängige zelluläre Stoffwechselprozesse einwirkt, wie z.B. die Synthese von Häm. Zum besseren Verständnis dieser Wechselwirkungen war ein Schwerpunkt dieser Dissertation eine vollständige Übersicht über die durch Defekte in der Fe/S Protein-Biogenese ausgelösten transkriptionellen Veränderungen aller Gene von *S. cerevisiae* zu erhalten. Anschließend wurden Promotorstudien und Enzymmessungen zur Verifizierung und Erklärung der Transkriptom-Analysen durchgeführt. Die Entwicklung der cDNA-Microarray-Technologie ermöglicht die simultane Analyse einer großen Anzahl von Genen hinsichtlich ihrer Expression unter bestimmten experimentellen Bedingungen. Brown und Mitarbeiter dokumentierten 1995 als Erste die Verwendung eines Microarrays zur Quantifizierung differentieller Genexpression zwischen Blatt- und Wurzelgewebe in *Arabidopsis thaliana* (Schena *et al.*, 1995). Seit dieser Zeit hat sich das Anwendungsgebiet der Microarray-Technologie auch auf andere Organismen ausgedehnt, so dass DNA-Microarrays zur Untersuchung des Hefegenoms kommerziell erhältlich sind.

Zur Untersuchung transkriptioneller Veränderungen durch Defekte in der Biogenese von Fe/S Proteinen in *S. cerevisiae* wurden drei regulierbare Mutanten (Gal-NBP35, Gal-ATM1 und Gal-YAH1) verwendet, in denen Beeinträchtigungen in der Biogenese von Fe/S Proteinen induziert werden können. In diesen Mutanten wurde jeweils der endogene Promotor der Gene *YAH1*, *ATM1* und *NBP35* durch einen Galaktose-induzierbaren Promotor (*GAL1-10*) ersetzt. Das Protein Yah1p (Yeast Adrenodoxin Homolog) ist eine Komponente der mitochondrialen ISC-Assemblierungsmaschinerie und an der Reifung aller zellulären Fe/S Proteine beteiligt. Demgegenüber sind der ABC-Transporter Atm1p, eine Komponente der mitochondrialen ISC-Exportmaschinerie und die P-Loop NTPase Nbp35p, eine Komponente der CIA-Maschinerie, spezifisch in der Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen involviert. Die Transkriptom-Analysen erfolgten unter Verwendung von cDNA-

Microarrays, die 6240 Gene des *S. cerevisiae* Genoms enthalten. Gal-YAH1, Gal-ATM1 und Gal-NBP35 Zellen wurden in Minimalmedium mit Glukose kultiviert, um die zellulären Konzentrationen von Yah1p, Atm1p bzw. Nbp35p zu depletieren. Das Minimalmedium enthielt als weitere Komponenten die Aminosäuren Histidin, Leucin, Tryptophan und Lysin sowie die Basen Adenin und Uracil. Wildtypzellen wurden parallel im gleichen Medium angezogen. Aus Zellen der exponentiellen Wachstumsphase wurde Gesamt-RNA isoliert (4.12.2) und zur Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA Sonden eingesetzt (4.14.1). Die cDNAs aller Ansätze wurden jeweils mit dem gelb-fluoreszierenden Cy3 und dem orange-fluoreszierenden Cy5 Farbstoff markiert („flip-flop“ Markierung). Zum Vergleich der cDNAs aus Wildtypzellen und Mutante wurden unterschiedlich markierte Sonden gemischt und an DNA-Microarrays hybridisiert (4.14.2). Anschließend wurde die Fluoreszenz der Microarrays mit einem Array-Scanner analysiert und dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImaGene 3.0 (4.14.3). Für die Gesamt-Auswertung wurden die Ergebnisse aus zwei biologischen Replikaten (d.h. zwei unterschiedliche RNA-Präparationen) miteinander kombiniert. Jedes biologische Replikat wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den folgenden zwei Kapiteln zusammengestellt.

5.3.1. Die Depletion von Nbp35p resultiert in einer schwachen Veränderung der Genexpression

Das Transkriptionsprofil einer Nbp35p-depletierten Zelle unterscheidet sich nur wenig gegenüber Wildtypzellen. Insgesamt wurden 117 Gene mit einem 1,5- bis maximal 2,6-fachen Expressionsunterschied identifiziert. Daruter wurden auffällig viele Y-Elemente induziert, die im subtelomeren Bereich der Chromosomen lokalisiert sind und deren Produkte teilweise Helikase Aktivität besitzen (Tab. 2). Möglicherweise übernehmen diese eine Funktion bei der Erhaltung der Telomeren in Telomerase-defizienten Zellen. Y-Elemente werden außerdem bei Stickstoffmangel, während der stationären Phase oder in alternden Zellen induziert (Lesur & Campbell, 2004). In Nbp35p-depletierten Zellen ist dieses Expressionsverhalten möglicherweise die Reaktion einer sterbenden Zelle, da das Protein zum Überleben der Hefe benötigt wird.

Die schwache, aber gehäufte Reprimierung von Genen, die für Untereinheiten mitochondrialer Ribosomen und der F_1F_O-ATP-Synthase kodieren, deutet auf eine mitochondriale Reaktion hin. Ähnliche Beobachtungen wurden in Zellen gemacht, die

ihren Stoffwechsel von Respiration auf Fermentation umstellen. Neben zahlreichen Genen, die für Hexose-Transporter kodieren, wurde auch das *CIT2* Gen induziert, dessen Produkt eine peroxisomale Citrat-Synthase ist. Dieses Gen wird auch in Zellen exprimiert, die einen respiratorischen Defekt aufweisen (Butow & Avadhani, 2004). Die Ursache für dieses Expressionsverhalten ist unklar, denn Nbp35p-depletierte Zellen besitzen keine signifikanten Beeinträchtigungen mitochondrialer Enzymaktivitäten (Tab. 1). Eine einfache Methode, die Funktionalität der Mitochondrien zu testen, besteht darin, das Wachstum von Zellen auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (z.B. Glycerin) zu beobachten. Nbp35p-depletierte Zellen entwickelten auf Glycerin keinen Wachstums-Phänotyp und besitzen daher funktionstüchtige Mitochondrien (Abb. 8).

In Nbp35p-depletierten Zellen wurde erstaunlicherweise trotz massiver Störungen in der Reifung von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen lediglich das Gen *ISU2* induziert, dessen Produkt eine zentrale Komponente der ISC-Assemblierungsmaschinerie ist (Abb. 3).

Die Induktion von *SUL1*, welches für eine Sulfat-Permease in der Plasmamembran kodiert, könnte auf ein Problem in der Sulfat-Assimilierung hindeuten. An diesem Prozess ist ein cytosolisches Fe/S Cluster-tragendes Protein beteiligt, die Sulfit-Reduktase, deren Funktion in Zellen mit einem Defekt in der Reifung von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen beeinträchtigt ist. Auch die für Permeasen kodierenden *BAP2* und *BAP3* Gene wurden induziert. Die Permeasen sind u.a. an der Aufnahme von verzweigtkettigen Aminosäuren (Leucin, Isoleucin und Valin) beteiligt (Regenberg *et al.*, 1999). Möglicherweise ist dieses Transkriptionsverhalten auf den Aktivitätsverlust des cytosolischen Fe/S Proteins Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p) zurückzuführen. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass bei Funktionsstörungen der CIA-Maschinerie in *S. cerevisiae* das Expressionsmuster nur geringfügig von dem einer Wildtypzelle abweicht.

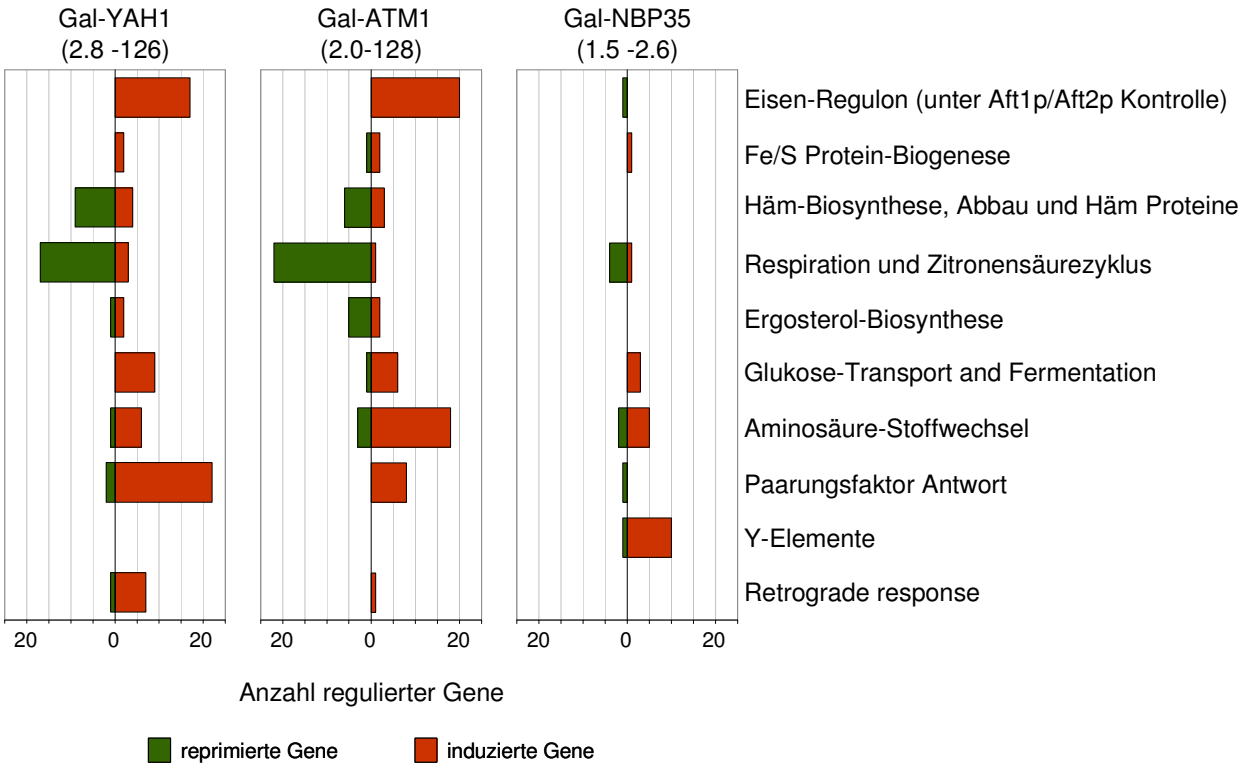

Abb. 15: Veränderung des Expressionsmusters bei Störungen in der Biogenese von Fe/S Proteinen. Gene wurden in Funktionsklassen eingeteilt. Angegeben ist die Anzahl regulierter Gene pro Funktionsklasse und das Vielfache der Veränderung der Genexpression im Vergleich zu Wildtypzellen (angegeben in Klammern). Detailiertere Angaben zur Genexpression einzelner Gene sind in den Tabellen 2-4 nachzulesen. Repräsentative Vertreter der drei Fe/S Protein-Biogenese-Maschinerien wurden depletiert und die Auswirkungen auf die Genexpression analysiert. Hierzu wurden drei regulierbare Mutanten (Gal-YAH1, Gal-ATM und Gal-NBP35) verwendet, in denen Beeinträchtigungen in der Biogenese von Fe/S Proteinen induziert werden können.

Tab. 2: Auswahl induzierter und reprimierter Gene in Nbp35p-depletierten Zellen

			Durchschnittliche Expressions-veränderung
ORF	**Gen**	**Annotation**	**Gal-NBP35**
Y-Elemente			
YEL075C		Similar to other subtelomerically-encoded proteins	1,72
YGR296W		Similar to other subtelomerically-encoded proteins	1,67
YHL050C		Similar to other subtelomerically-encoded proteins	2,00
YIL177C		Similar to other subtelomerically-encoded proteins	-1,56
YLR464W		Similar to other subtelomerically-encoded proteins	1,98
YLR466W	*YRF1*	Y helicase (subtelomerically-encoded)	2,00
YML133C		Similar to other subtelomerically-encoded proteins	1,92
YNR075W	*COS10*	Similar to other subtelomerically-encoded proteins	1,63
YPR202W		Similar to other subtelomerically-encoded proteins	1,89
YPR203W		Similar to other subtelomerically-encoded proteins	1,78
YPR204W		Similar to other subtelomerically-encoded proteins	2,01

ORF	Gen	Annotation	Durchschnittliche Expressions-veränderung Gal-NBP35
Mitochondriale ribosomale Untereinheiten			
YDR041W	*RSM10*	Ribosomal protein; mitochondrial	-1,73
YGL068W	*MNP1*	Similar to ribosomal proteins	-1,79
YBR282W	*MRPL27*	Ribosomal protein; mitochondrial L27	-1,74
YBR268W	*MRPL37*	Ribosomal protein; mitochondrial L37	-1,54
YKL170W	*MRPL38*	Ribosomal protein; mitochondrial L38	-1,61
YJL096W	*MRPl49*	Ribosomal protein; mitochondrial large subunit	-1,62
Glukose-Transport und Fermentation			
YHR096C	*HXT5*	Hexose permease	1,65
YNR072W	*HXT17*	Hexose permease	1,58
YPL061W	*ALD6*	Aldehyde dehydrogenase	1,93
Respiration			
YIL070C	*MAM33*	Mitochondrial acidic matrix protein	-1,71
YNL315C	*ATP11*	F_1F_0-ATPase complex assembly protein	-1,62
YJL180C	*ATP12*	F_1F_0-ATPase complex assembly (molecular chaperone)	-1,59
YKL141W	*SDH3*	Succinate dehydrogenase cytochrome b	-1,66
Zitronensäurezyklus			
YCR005C	*CIT2*	Peroxisomal citrate synthase	1,88
Eisen-abhängige Proteine			
YMR319C	*FET4*	Iron transporter	-1,63
Fe/S Protein-Biogenese			
YOR226C	*ISU2*	Scaffold protein	1,52
Sulfat-Aufnahme			
YJR010W	*MET3*	ATP sulfurylase	1,57
YBR294W	*SUL1*	Sulfate permease	2,67
Aminosäure-Stoffwechsel			
YKL029C	*MAE1*	Precursor for synthesis of several amino acids	1,56
YDR368W	*YPR1*	2-methylbutyraldehyde reductase	-1,98
YBR068C	*BAP2*	Branched-chain amino acid Permease	1,56
YDR046C	*BAP3*	Branched-chain amino acid Permease	1,61
YDR508C	*GNP1*	Glutamine permease	1,66
YNL268W	*LYP1*	Lysine permease	1,61
YER081W	*SER3*	3-phosphoglycerate dehydrogenase	-1,72
Paarungsfaktor Antwort			
YDR461W	*MFA1*	A-factor precursor	-1,98
Protein Modifikation			
YBR093C	*PHO5*	Repressible acid phosphatases	-2,10
YBR097W	*VPS15*	Serine/threonine protein kinase	-1,73
Purin/Pyrimidin-Biosynthese			
YAR015W	*ADE1*	SAICAR-synthetase	-1,77
YLR359W	*ADE13*	Adenylosuccinate lyase	-1,52
YMR120C	*ADE17*	AICAR-transformylase	-1,94
YMR271C	*URA10*	Orotate phosphoribosyltransferase	-1,79

ORF	Gen	Annotation	Durchschnittliche Expressions-veränderung Gal-NBP35
Multidrug Resistenz Transporter			
YOR153W	*PDR5*	Multidrug resistance transporter	2,19

Die Genexpressionsdaten der Mutanten sind relativ zur Expression in Wildtypzellen angegeben. Der Mittelwert basiert auf zwei biologischen Replikaten (insgesamt vier Arrays). Differentiell regulierte Gene wurden in Funktionsklassen eingeteilt. Eine im Vergleich zu Wildtypzellen reprimierte Genexpression wurde mit einem (-) Zeichen angegeben.

5.3.2. Veränderte Genexpression durch Depletion von Atm1p und Yah1p

In Yah1p- und Atm1p-depletierten Zellen wurden jeweils über 200 Gene identifiziert, die mindestens eine 2-fach veränderte Expression gegenüber Wildtypzellen aufwiesen (Tab. 3). Im Gegensatz zu Nbp35p-depletierten Zellen, zeigten Yah1p- und Atm1p-depletierte Zellen ein weitgehend übereinstimmendes Expressionsmuster (Abb. 15). Erwartungsgemäß wurden zahlreiche Gene des Eisen-Regulons induziert, welche durch die Eisen-abhängigen Transkriptionsfaktoren Aft1p/Aft2p reguliert werden. Die Gene des Eisen-Regulons werden sowohl bei einem Eisenmangel als auch bei Störungen in der Funktion der mitochondrialen ISC-Maschinerien induziert (Chen *et al.*, 2004; Rutherford *et al.*, 2005). Das Eisen-Regulon beinhaltet überwiegend Gene, deren Produkte eine Funktion in der Eisen-, aber auch Kupfer- und Biotinaufnahme ausüben (Rutherford *et al.*, 2003). Auch die Depletion weiterer Komponenten der mitochondrialen ISC-Assemblierungsmaschinerie (Grx5p, Nfs1p und Yfh1p) führte zur Induktion dieser Gene (Belli *et al.*, 2004; Foury & Talibi, 2001; Li *et al.*, 1999). Darüber hinaus induzierten Atm1p- und Yah1p-depletierte Zellen weitere Gene, deren Produkte an der Eisenaufnahme beteiligt sind, die jedoch bis jetzt noch nicht als Aft1p/Aft2p-abhängige Gene identifiziert wurden.

Zahlreiche Gene, die für Untereinheiten der Komplexe II, III, IV, der ATP-Synthase und der Cytochrom *c* Isoformen kodieren, wurden reprimiert (Tab. 3). In Yah1p-depletierten Zellen könnte die Ursache ein respiratorischer Defekt sein, da das Protein neben einer Funktion in der Fe/S Protein-Biogenese auch essentiell an der Synthese von Häm A (Cofaktor der Cytochrom *c* Oxidase) beteiligt ist. Die Ursache warum Atm1p-depletierte Zellen zahlreiche Gene der Respiration reprimieren ist weniger offensichtlich, da keine signifikanten Veränderungen in der Reifung mitochondrialer Fe/S Proteine auftreten. Zudem sind diese Zellen auf Vollmedium respiratorisch kompetent (Kispal *et al.*, 1999). Demgegenüber wurden *Δatm1* Zellen

bei einer genetischen Suche nach Mutanten mit einem Cytochrom-Defekt isoliert. Dieser Cytochrom-Defekt ist vermutlich sekundär und die Folge eines Atm1p Mangels (Kispal *et al.*, 1997; Kispal *et al.*, 1999). Offensichtlich deutet sich in Atm1p-depletierten Zellen bereits auf Transkriptionsebene ein Atmungsdefekt an, welcher sich auf Proteinebene aber noch nicht manifestiert hat (Vollmedium-Bedingungen). Zahlreiche Gene, die für Hexose-Transporter und für Glukose-Stoffwechselproteine kodieren, wurden in beiden Mutanten gleichermaßen induziert. Dies könnte bedeuten, dass die Zelle auf fermentativen Stoffwechsel umschaltet. In diesem Kontext passt auch die differentielle Expression von Genen, deren Produkte im Zitronensäurezyklus eine Funktion ausüben.

Yah1p-depletierte Zellen exprimierten einen Satz von Genen (sog. „retrograde response“), ähnlich dem einer respiratorisch defizienten Zelle (Tab. 3) (Epstein *et al.*, 2001). Dieses Expressionsverhalten ist nicht verwunderlich, da Yah1p, wie oben beschrieben, an der Biogenese von Fe/S Clustern und Häm A (Cytochrom *c* Oxidase) beteiligt ist. Demzufolge könnten auch Yah1p-depletierte Zellen eine respiratorische Defizienz entwickeln, die auf einen Mangel an Cofaktoren in der Atmungskette zurüchzuführen ist. Yah1p-depletierte und respiratorisch defiziente Zellen induzieren u.a. *CIT2, DIP5 und PYC1*, welche für eine peroxisomale Citrat-Synthase, einen Glutamat/Aspartat-Transporter in der Plasmamembran bzw. eine Pyruvat-Carboxylase kodieren. Diese Produkte sind mit peroxisomalen Aktivitäten und anaplerotischen Reaktionswegen assoziiert.

Ähnlich wie in Nbp35p-depletierte Zellen zeigten auch Yah1p- und Atm1p-depletierte Zellen kaum differentiell exprimierte Gene der Fe/S Protein-Biogenese. Diese induzierten nur die Gene *ISU1* und *ISU2*, deren Produkte zentrale Komponenten in der Biogenese von Fe/S Proteinen darstellen. Die Reprimierung von *LEU1*, dessen Produkt ein Fe/S Protein ist, könnte in Atm1p-depletierten Zellen auf eine gestörte extra-mitochondriale Fe/S Protein-Biogenese zurückzuführen sein.

Sowohl in Atm1p- als auch in Yah1p-depletierten Zellen wurden auffällig viele Gene reprimiert, die für Häm-haltige Proteine kodieren. Neben den Genen der Respiration war dies *CTT1* (cytosolische Katalase), *YHB1* (mitochondriales Flavohämoglobin) und *CYB5* (Cytochrom der Ergosterol-Biosynthese). Dagegen wurden *NCP1* und *HAP1* induziert. *NCP1* kodiert für ein Cytochrom P_{450} mit einer Funktion in der Ergosterol-Biosynthese und *HAP1* für einen Häm-abhängigen Transkriptionsfaktor. Trotz der transkriptionellen Veränderungen von Genen, die für Häm-haltige Proteine

kodieren, wurde nur das *HEM15* Gen 5-fach (in Gal-YAH1) und 2,8-fach (in Gal-ATM1) reprimiert. *HEM15* kodiert für eine Ferrochelatase, welche den letzten Schritt der Häm-Biosynthese katalysiert, die Einlagerung von reduzierten Eisen in Protoporphyrin IX. Demgegenüber wurden Gene deren Produkte an der Synthese von Porphyrinen beteiligt sind nicht differentiell exprimiert, abgesehen von *HEM13*, welches für eine Coproporphyrinogen-III-Oxidase kodiert und in Yah1p-depletierten Zellen 2-fach reprimiert wurde. Das *HMX1* Gen, dessen Produkt eine putative Häm-Oxygenase ist, wurde stark induziert (7,8-fach in Yah1p- und 7-fach in Atm1p-depletierten Zellen), (Protchenko & Philpott, 2003). Die Reprimierung von *HEM15* (Häm-Synthese) in Kombination mit der Induktion von *HMX1* (Häm-Abbau) deutet darauf hin, dass es bei Funktionsstörungen der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerien zu beachtlichen intrazellulären Veränderungen in Bezug auf die Menge und Verteilung von Häm kommt.

Die Depletion von Atm1p und Yah1p führte außerdem zu differentiell exprimierten Genen mit Funktionen in der Biosynthese von Ergosterol, Biotin und im Metabolismus diverser Aminosäuren. In *S. cerevisiae* werden die Gene der Ergosterol-Biosynthese durch Eisen reguliert (Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004), so dass das veränderte Expressionsverhalten in Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen primär auf eine gestörte Eisenhomeostase zurückzuführen sein könnte. Das Gen *VHT1* kodiert für einen Biotin-Transporter in der Plasmamembran und das Produkt des Gens *BIO5* ist an der Synthese einer Biotin-Vorstufe beteiligt. Beide Gene werden durch den Eisen-abhängigen Transkriptionsfaktor Aft1p reguliert. Alternativ könnten die transkriptionellen Veränderungen in der Biotin-Synthese auf einen Defekt in der Fe/S Protein-Biogenese zurückzuführen sein, da an der Biosynthese von Biotin ein Fe/S Protein (Bio2p) beteiligt ist. Dies ist aber wenig wahrscheinlich, da Bio2p ein mitochondriales Protein ist, dessen Reifung in Atm1p-depletierten Zellen nicht beeinträchtigt sein sollte. Die veränderte Genregulation ist daher wahrscheinlich primär auf eine Störung in der Eisenhomeostase zurückzuführen. Diverse Gene, die am Metabolismus der Aminosäuren beteiligt sind, zeigten ein zu Wildtypzellen verändertes Transkriptionsprofil. Diesbezüglich war der Effekt in Atm1p-depletierten Zellen in der Regel deutlicher als in Yah1p-depletierten Zellen. Es waren vorwiegend Gene betroffen, die für Proteine der Aufnahme und Biosynthese von verzweigtkettigen Aminosäuren kodieren. Hier sind die Gene *BAP2*, *BAT2* und *LEU1* zu nennen. Die Ursache könnte ein Defekt in der Biosynthese des Fe/S Proteins Leu1p sein. In Atm1p-depletierten Zellen wurden die Gene des Lysin-,

Arginin- und Glycinstoffwechsels differentiell exprimiert. Die Ursache hierfür ist unklar, könnte aber auf die Induktion des Transkriptionsfaktor *GCN4* zurückzuführen sein, welcher die Genexpression bei einem generellen Aminosäuremangel zentral steuert. Gene die bei der Assimilierung von Schwefel eine Rolle spielen wurden in Atm1p-, Yah1p- und auch in Nbp35p-depletierten Zellen differentiell zu Wildtypzellen exprimiert. Möglicherweise ist dieses Transkriptionsverhalten auf einen Defekt in der Reifung des cytosolischen Fe/S Proteins Sulfit-Reduktase zurückzuführen. Die in der Tabelle 3 unter der funktionellen Kategorie „Paarungsfaktor Antwort" zusammengefassten Gene wurden weitaus zahlreicher in Yah1p-depletierten Zellen differentiell exprimiert. Bei diesen handelt es sich um Gene, die für transponierende Elemente kodieren und die gewöhnlich durch hohe Konzentrationen eines der beiden Paarungsfaktoren induziert werden können. Die physiologische Bedeutung in diesem Zusammenhang bedarf weiterer Untersuchungen. Die Tabellen 2, 3 und 4 zeigen nur eine Auswahl der in Yah1p-, Atm1p- und Nbp35p-depletierten Zellen differentiell exprimierten Gene. Die vollständigen Datensätze befinden sich auf der Internetseite des Instituts für Zytobiologie und Zytopathologie (www.uni-marburg.de/cyto/).

Tab. 3: Auswahl induzierter oder reprimierter Gene in Yah1p- und Atm1p-depletierten Zellen

			Durchschnittliche Expressions-Veränderung	
ORF	**Gen**	**Annotation**	**Gal-YAH1**	**Gal-ATM1**
Eisen-Regulon (unter Aft1p/Aft2p Kontrolle)				
YHL040C	*ARN1*	Siderophore transporter	33,22	17,36
YHL047C	*ARN2*	Siderophore transporter	52,52	30,11
YEL065W	*SIT1/ARN3*	Ferrioxamine B permease	5,97	4,06
YOL158C	*ENB1/ARN4*	Enterobactin transporter	14,61	14,52
YNL259C	*ATX1*	Copper metallochaperone		2,05
YDR270W**	*CCC2*	Cu(2+)-transporting ATPase	4,51	2,49
YMR058W	*FET3*	Cell surface ferroxidase	31,62	13,39
YMR319C	*FET4*	Iron transporter	3,49	
YFL041W	*FET5*	Multicopper oxidase	3,22	2,72
YDR534C	*FIT1*	Retension of siderophore iron	126,92	128,55
YOR382W	*FIT2*	Retension of siderophore iron	111,26	94,05
YOR383C	*FIT3*	Retension of siderophore iron	14,95	17,64
YLR214W	*FRE1*	Ferric (and cupric) reductase	5,10	5,44
YKL220C	*FRE2*	Ferric (and cupric) reductase	5,80	4,92
YOR381W	*FRE3*	Ferric reductase	6,30	4,73
YOR384W	*FRE5*	Putative ferric reductase	4,47	3,25
YBR207W	*FTH1*	Iron transporter		2,68
YER145C	*FTR1*	Iron permease	15,40	9,83
YLR136C	*CTH2/TIS11*	Downregulation of mRNAs		2,93
YDR264C	*AKR1*	Palmitoyl transferase	2,86	3,12
YDR271C		Unknown		2,31

ORF	Gen	Annotation	Durchschnittliche Expressions-Veränderung Gal-YAH1	Gal-ATM1
YNR056C	*BIO5*	Biotin synthesis	4,33	3,06
YOR387C		Unknown		-3,32
YBR012C		Unknown	7,07	
YBR072W	*HSP26*	Small heat shock protein	26,19	3,90
YGR146C		Unknown	4,76	
YMR041C		Unknown	2,95	
YGR065C	*VHT1*	Biotin transporter		4,79
Fe/S Protein-Biogenese				
YPL059W	*GRX5*	Glutathione-dependent oxidoreduktase		-2,01
YPL135W	*ISU1*	Scaffold protein	3,91	3,64
YOR226C	*ISU2*	Scaffold protein	4,81	2,55
Respiration				
YKL148C	*SDH1*	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	-5,04	-3,49
YKL141W	*SDH3*	Succinate dehydrogenase cytochrome b	-3,43	-2,49
YDR178W	*SDH4*	Succinate dehydrogenase anchor subunit	-3,46	-2,50
YBL045C**	*COR1*	Ubiquinol cyt.-*c* reductase	-3,36	-2,35
YEL024W	*RIP1*	Ubiquinol cyt.-*c* reductase / rieske iron-sulfur protein	-6,17	-3,83
YPR191W**	*QCR2*	Ubiquinol cyt.-*c* reductase core protein 2	-4,32	-2,83
YFR033C	*QCR6*	Ubiquinol cyt.-*c* reductase subunit		-2,12
YDR529C	*QCR7*	Ubiquinol cyt.-*c* reductase subunit	-4,52	-2,74
YJL166W	*QCR8*	Ubiquinol cyt.-*c* reductase subunit VIII	-4,09	-2,23
YGR183C	*QCR9*	Ubiquinol cyt.-*c* reductase subunit 9		-2,27
YHR001W-A	*QCR10*	Ubiqunol cyt. *c* oxidoreductase complex subunit	-2,83	-2,26
YJR048W**	*CYC1*	Cytochrome-*c* isoform 1	-11,41	-7,76
YEL039C**	*CYC7*	Iso-2-cytochrome-*c*	-3,11	-2,58
YOR065W**	*CYT1*	Cytochrome *c*1	-6,07	-3,89
YGL187C	*COX4*	Cytochrome-*c* oxidase subunit IV	-3,53	-2,38
YNL052W	*COX5A*	Cytochrome-*c* oxidase subunit Va	-3,60	-2,20
YHR051W	*COX6*	Cytochrome-*c* oxidase subunit VI	-3,14	-2,38
YMR256C	*COX7*	Cytochrome-*c* oxidase subunit VII	-4,53	-2,10
YER141W	*COX15*	Cytochrome oxidase assembly factor		-2,03
YLL009C	*COX17*	Copper metallochaperone		-2,01
YJL116C	*NCA3*	Regulates expression of F_0F_1 ATPase subunits	3,11	
YPR020W	*ATP20*	Mitochondrial ATP synthase subunit	-3,05	
Glukose-Transport und Fermentation				
YHR094C	*HXT1*	Hexose permease	3,79	2,17
YDR345C	*HXT3*	Hexose permease	4,28	2,38
YHR092C	*HXT4*	Hexose permease	4,04	2,09
YHR096C	*HXT5*	Hexose permease	5,33	2,00
YDR343C	*HXT6*	Hexose permease	4,01	2,20
YDR342C	*HXT7*	Hexose permease	3,95	2,20
YEL069C	*HXT13*	Hexose permease	3,44	
YPL026C	*SKS1*	Serine / threonine protein kinase	2,93	
YOR374W	*ALD4*	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	3,54	
YPL061W	*ALD6*	Acetaldehyde dehydrogenase		-2,50
Zitronensäurezyklus				
YLR304C	*ACO1*	Aconitase		-2,68
YNL037C	*IDH1*	Isocitrate dehydrogenase	8,71	2,33

ORF	Gen	Annotation	Durchschnittliche Expressions-Veränderung Gal-YAH1	Gal-ATM1
YOR136W	*IDH2*	Isocitrate dehydrogenase	4,67	
YNR001C	*CIT1*	Citrate synthase		-2,07
YCR005C	*CIT2*	Peroxisomal citrate synthase	2,89	
Retrograde response				
YOR374W	*ALD4*	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	3,54	
YML042W	*CAT2*	Carnitine O-acetyltransferase	3,1	
YCR005C	*CIT2*	Peroxisomal citrate synthase	2,89	
YPL265W	*DIP5*	Glutamate/aspartate permease	5,30	
YNL037C	*IDH1*	Isocitrate dehydrogenase	8,71	2,33
YOR136W	*IDH2*	Isocitrate dehydrogenase	4,67	
YOR222w	*ODC2*	Mitochondrial inner membrane transporter (2-oxoglutarate)	-4,57	
YGL026w	*PYC1*	Pyruvate carboxylase isoform	1,9	
Häm-Biosynthese, Abbau und Häm-haltige Proteine				
YDR044W	*HEM13*	Coproporphyrinogen III oxidase	-1,96	
YOR176W	*HEM15*	Ferrochelatase (protoheme ferrolyase)	-5,25	-2,87
YLR205C	*HMX1*	Heme oxygenase	7,83	7,27
YGR088W**	*CTT1*	Catalase T (cytosolic)	-3,18	
YGR234W**	*YHB1*	Flavohemoglobin	-5,68	-10,72
YNL111C	*CYB5*	Cytochrome b5	-3,47	-2,66
YHR042W	*NCP1/CPR1*	NADP-cytochrome P450 reductase	4,11	2,47
YJR048W**	*CYC1*	Cytochrome-*c* isoform 1	-11,41	-7,76
YEL039C**	*CYC7*	Iso-2-cytochrome-*c*	-3,11	-2,58
YPR191W**	*QCR2*	Ubiquinol cyt.-*c* reductase core protein 2	-4,32	-2,83
YOR065W**	*CYT1*	Cytochrome *c*1	-6,07	-3,89
YLR256W	*HAP1*	Heme-responsive zinc finger transcription factor	4,44	
YPR065W	*ROX1*	Transcriptional repressor	3,11	2,39
Ergosterol-Biosynthese				
YNL111C	*CYB5*	Cytochrome b5	-3,47	-2,66
YMR202W	*ERG2*	C-8 sterol isomerase		-2,19
YLR056W	*ERG3*	C-5 sterol desaturase	6,80	2,88
YML126C	*ERG13*	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase		-2,11
YJL167W	*ERG20*	Farnesyl-pyrophosphate synthetase		-2,23
YER044C	*ERG28*	ER membrane protein		-2,31
YHR042W	*NCP1/CPR1*	NADP-cytochrome P450 reductase	4,11	2,47
Metalle				
YHR053C	*CUP1*	Metallothionein	3,00	
YLR220W	*CCC1*	Putative vacuolar Fe^{2+}/Mn^{2+} transporter	-3,43	-2,37
Aminosäure-Stoffwechsel				
YFL055W	*AGP3*	General amino acid permease	2,83	
YHR018C	*ARG4*	Argininosuccinate lyase		2,29
YPR145W	*ASN1*	Asparagine synthetase		3,23
YBR068C	*BAP2*	Branched-chain amino acid Permease		2,31
YOR303W	*CPA1*	Carbamoyl phosphate synthetase; arginine specific		3,28
YJR109C	*CPA2*	Carbamoyl phosphate synthetase		2,50
YEL009C	*GCN4*	Transcriptional activator		2,05
YDR019C	*GCV1*	Glycine decarboxylase T subunit		2,73
YMR189W	*GCV2*	Glycine decarboxylase P subunit		2,22

			Durchschnittliche Expressions-Veränderung	
ORF	**Gen**	**Annotation**	**Gal-YAH1**	**Gal-ATM1**
YAL062W	*GDH3*	NADP-glutamate dehydrogenase	3,07	
YEL046C	*GLY1*	L-threonine aldolase		2,00
YOR202W	*HIS3*	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase		2,60
YGL009C	*LEU1*	3-isopropylmalate isomerase		-10,88
YCL018W∗	*LEU2*	Beta-isopropyl-malate dehydrogenase	8,76	4,20
YNL268W	*LYP1*	Lysine permease	2,88	2,24
YIR034C	*LYS1*	Saccharopine dehydrogenase		2,79
YNR050C	*LYS9*	Saccharopine dehydrogenase		2,02
YIL094C	*LYS12*	Homo-isocitrate dehydrogenase		2,62
YDL182W	*LYS20*	Homocitrate synthase		2,53
YOR348C	*PUT4*	Proline specific-permease		-2,78
YJR148W	*BAT2*	Branched-chain amino acid aminotransferase		2,03
YJL130C	*URA2*	Carbamoyl-phosphate synthetase	3,56	
YKR069W	*MET1*	SAM-uroporphyrinogen III transmethylase	3,94	
YJR010W	*MET3*	ATP sulfurylase		-2,15
YKL001C	*MET14*	Adenylylsulfate kinase	-5,30	-3,22
Paarungsfaktor Antwort				
YDL223C	*HBT1*	Mating projection	2,96	
YGL032C	*AGA2*	A-agglutinin binding subunit	-2,99	
YNL145W	*MFA2*	A-factor precursor	-4,36	
YPL156C	*PRM4*	Pheromone-Regulated Membrane protein	3,22	
YPL187W		Mating factor alpha	4,16	
YAR009C		Transposable element gene	9,13	
YAR010C		Transposable element gene	9,81	2,51
YBL005W-A		Transposable element gene	6,01	2,65
YBL005W-B		Transposable element gene	4,47	
YBL101W-A		Transposable element gene	6,82	
YBR012W-A		Transposable element gene	9,18	2,59
YCL020W		Transposable element gene	7,34	
YER138C		Transposable element gene	7,55	
YER160C		Transposable element gene	2,86	
YHR214C-B		Transposable element gene	4,17	
YJR026W		Transposable element gene	10,58	2,50
YJR027W		Transposable element gene	3,60	
YML039W		Transposable element gene	3,98	
YML040W		Transposable element gene	5,87	2,72
YML045W		Transposable element gene	4,31	2,77
YMR045C		Transposable element gene	5,48	
YMR046C		Transposable element gene	5,83	2,54
YMR050C		Transposable element gene	6,53	
YMR051C		Transposable element gene	6,84	2,52

Die Genexpressionsdaten der Mutanten sind relativ zur Expression in Wildtypzellen angegeben. Der Mittelwert basiert auf zwei biologischen Replikaten (insgesamt 4 Arrays). Die regulierten Gene wurden in Funktionsklassen eingeteilt. Reprimierte Gene sind mit einem (-) Zeichen versehen, Aft1p-abhängige sind fett, Aft2p-abhängige sind unterstrichen und Hap1p-abhängige Gene sind mit zwei ∗∗ angegeben. ∗ Marker für genetische Integration des *GAL1-10* Promotors.

5.3.3. Der Einfluss des Wachstumsmediums auf die Genexpression Atm1p-depletierter Zellen

Die bereits beschriebenen Transkriptom-Analysen zeigen, dass Atm1p-depletierte Zellen zahlreiche Gene reprimieren, die für Produkte der Atmungskette kodieren. Dies lässt auf eine respiratorische Beeinträchtigung schließen, die aus früheren Studien nicht bekannt war, die allerdings ausschließlich an in Vollmedium kultivierten Zellen durchgeführt wurden. Es sei vorweggenommen, dass in Minimalmedium kultivierte Atm1p-depletierte Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen eine 2-fach reduzierte Cytochrom *c* Oxidase Aktivität besitzen (Abb. 21A), während in Vollmedium kultivierte Atm1p-depletierte Zellen keinen Aktivitätsverlust aufweisen (Abb. 21A). Zusätzlich wurden Transkriptom-Analysen an Atm1p-depletierten Zellen durchgeführt, die in Voll- oder Minimalmedium kultiviert wurden. Eine Gegenüberstellung dieser Transkriptionsprofile zeigt ein relativ ähnliches Expressionsmuster, wenn auch grundsätzlich weniger Gene in Vollmedium kultivierten Zellen differentiell exprimiert wurden (Tab. 4). Bei Betrachtung der funktionellen Kategorie „Respiration“ fällt auf, dass in Vollmedium nur noch 11 Gene reprimiert werden gegenüber 20 auf Minimalmedium. Dies zeigt, dass Atm1p-depletierte Zellen bereits in Vollmedium einen respiratorischen Defekt andeuten, der sich allerdings auf Proteinebene noch nicht manifestiert.

Tab. 4: Auswahl induzierter und reprimierter Gene in Atm1p-depletierten Gal-ATM Zellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen.

			Durchschnittliche Expressions-änderung	
ORF	**Gen**	**Annotation**	**Gal-ATM1**	
			SD	**YPD**
Eisen-Regulon (unter Aft1p/Aft2p Kontrolle)				
YHL040C	*ARN1*	Siderophore transporter	17,36	10,19
YHL047C	*ARN2*	Siderophore transporter	30,11	18,29
YEL065W	*SIT1/ARN3*	Ferrioxamine B permease	4,06	
YOL158C	*ENB1/ARN4*	Enterobactin transporter	14,52	4,46
YNL259C	*ATX1*	Copper metallochaperone	2,05	
YDR270W**	*CCC2*	Cu(2+)-transporting ATPase	2,49	
YMR058W	*FET3*	Cell surface ferroxidase	13,39	9,91
YMR319C	*FET4*	Iron transporter		2,62
YFL041W	*FET5*	Multicopper oxidase	2,72	2,00
YDR534C	*FIT1*	Retension of siderophore iron	128,55	143,09
YOR382W	*FIT2*	Retension of siderophore iron	94,05	79,46
YOR383C	*FIT3*	Retension of siderophore iron	17,64	181,76
YLR214W	*FRE1*	Ferric (and cupric) reductase	5,44	

ORF	Gen	Annotation	Durchschnittliche Expressions-änderung Gal-ATM1 SD	YPD
YKL220C	*FRE2*	Ferric (and cupric) reductase	4,92	
YOR381W	*FRE3*	Ferric reductase	4,73	
YOR384W	*FRE5*	Putative ferric reductase	3,25	
YBR207W	*FTH1*	Iron transporter	2,68	
YER145C	*FTR1*	Iron permease	9,83	4,38
YLR136C	*CTH2/TIS11*	Downregulation of mRNAs	2,93	
YDR264C	*AKR1*	Palmitoyl transferase	3,12	
YDR271C		Unknown	2,31	
YNR056C	*BIO5*	Biotin synthesis	3,06	
YOR387C		Unknown	-3,32	
YBR012C		Unknown		
YBR072W	*HSP26*	Small heat shock protein	3,90	
YGR065C	*VHT1*	Biotin transporter	4,79	
Fe/S Protein-Biogenese				
YPL059W	*GRX5*	Glutathione-dependent oxidoreduktase	-2,01	
YPL135W	*ISU1*	Scaffold protein	3,64	
YOR226C	*ISU2*	Fe/S protein biogenesis	2,55	2,74
Respiration				
YKL148C	*SDH1*	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	-3,49	
YKL141W	*SDH3*	Succinate dehydrogenase cytochrome b	-2,49	
YDR178W	*SDH4*	Succinate dehydrogenase anchor subunit	-2,50	
YBL045C	*COR1*	Ubiquinol cyt.-*c* reductase	-2,35	
YEL024W	*RIP1*	Ubiquinol cyt.-*c* reductase / rieske iron-sulfur protein	-3,83	-2,56
YPR191W**	*QCR2*	Ubiquinol cyt.-*c* reductase core protein 2	-2,83	
YFR033C	*QCR6*	Ubiquinol cyt.-*c* reductase subunit	-2,12	-2,58
YDR529C	*QCR7*	Ubiquinol cyt.-*c* reductase subunit	-2,74	-6,11
YJL166W	*QCR8*	Ubiquinol cyt.-*c* reductase subunit VIII	-2,23	-3,76
YGR183C	*QCR9*	Ubiquinol cyt.-*c* reductase subunit 9	-2,27	
YHR001W-A	*QCR10*	Ubiqunol cyt.-*c* oxidoreductase complex subunit	-2,26	
YGL187C	*COX4*	Cytochrome-*c* oxidase subunit IV	-2,38	
YNL052W	*COX5A*	Cytochrome-*c* oxidase subunit Va	-2,20	
YHR051W	*COX6*	Cytochrome-*c* oxidase subunit VI	-2,38	-3,05
YMR256C	*COX7*	Cytochrome-*c* oxidase; subunit VII	-2,10	-2,50
YGL191W	*COX13*	Cytochrome-*c* oxidase; subunit Via		-2,76
YER141W	*COX15*	Cytochrome oxidase assembly factor	-2,03	
YLL009C	*COX17*	Copper metallochaperone	-2,01	
YJR048W**	*CYC1*	Cytochrome-*c* isoform 1	-7,76	-9,97
YEL039C**	*CYC7*	Iso-2-cytochrome-c	-2,58	-6,98
YOR065W**	*CYT1*	Cytochrome-*c*1	-3,89	-4,28
YKR066C	*CCP1*	Cytochrome-*c* peroxidase		-2,18
Glukose-Transport und Fermentation				
YGL256W	*ADH4*	Alcohol dehydrogenase IV	-9,71	
YER073W	*ALD5*	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase	2,03	
YPL061W	*ALD6*	Acetaldehyde dehydrogenase	-2,50	
YHR094C	*HXT1*	Hexose permease	2,17	
YDR345C	*HXT3*	Hexose permease	2,38	
YHR092C	*HXT4*	Hexose permease	2,09	

ORF	Gen	Annotation	Durchschnittliche Expressions-änderung Gal-ATM1 SD	YPD
YHR096C	*HXT5*	Hexose permease	2,00	
YDR343C	*HXT6*	Hexose permease	2,20	
YDR342C	*HXT7*	Hexose permease	2,20	
YCL040W	*GLK1*	Glucokinase		2,24
Zitronensäurezyklus				
YNL037C	*IDH1*	Isocitrate dehydrogenase	2,33	
YLR304C	*ACO1*	Aconitase	-2,68	
YNR001C	*CIT1*	Citrate synthase	-2,07	
Häm-Biosynthese, Abbau und Häm-haltige Proteine				
YOR176W	*HEM15*	Ferrochelatase (protoheme ferrolyase)	-2,87	-1,76
YLR205C	*HMX1*	Heme-binding peroxidase	7,27	4,11
YGR234W**	*YHB1*	Flavohemoglobin	-10,72	-2,18
YNL111C	*CYB5*	Cytochrome b5	-2,66	
YHR042W	*NCP1/CPR1*	NADP-cytochrome P450 reductase	2,47	
YJR048W**	*CYC1*	Cytochrome-*c* isoform 1	-7,76	-9,97
YEL039C**	*CYC7*	Iso-2-cytochrome-*c*	-2,58	-6,98
YPR191W**	*QCR2*	Ubiquinol cytochrome-*c* reductase core protein 2	-2,83	
YOR065W**	*CYT1*	Cytochrome *c*1	-3,89	-4,28
YLR256W	*HAP1*	Heme-dependent transcription factor		2,56
YPR065W	*ROX1*	Transcriptional repressor	2,39	
Ergosterol-Biosynthese				
YNL111C	*CYB5*	Cytochrome b5	-2,66	
YMR202W	*ERG2*	C-8 sterol isomerase	-2,19	
YLR056W	*ERG3*	C-5 sterol desaturase	2,88	
YJL167W	*ERG20*	Farnesyl-pyrophosphate synthetase	-2,23	-2,50
YER044C	*ERG28*	ER membrane protein	-2,31	
YHR042W	*NCP1/CPR1*	NADP-cytochrome P450 reductase	2,47	
Metalle				
YHR055C	*CUP1-2*	Metallothionein		-2,00
YLR220W	*CCC1*	Transmembrane transporter; putative	-2,37	
YOR316C	*COT1*	Vacuolar transporter		2,61
YHR175W	*CTR2*	Copper transporter		2,87
YOR079C	*ATX2*	Manganese-trafficking protein		2,04
Aminosäure-Stoffwechsel				
YHR018C	*ARG4*	Argininosuccinate lyase	2,29	
YPR145W	*ASN1*	Asparagine synthetase	3,23	
YBR068C	*BAP2*	Branched-chain amino acid Permease	2,31	
YOR303W	*CPA1*	Carbamoyl phosphate synthetase; arginine specific	3,28	
YJR109C	*CPA2*	Carbamoyl phosphate synthetase	2,50	
YEL009C	*GCN4*	Transcriptional activator	2,05	
YDR019C	*GCV1*	Glycine decarboxylase T subunit	2,73	
YMR189W	*GCV2*	Glycine decarboxylase P subunit	2,22	
YOR375C	*GDH1*	Glutamate dehydrogenase		-2,33
YEL046C	*GLY1*	L-threonine aldolase	2,00	
YOR202W	*HIS3*	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	2,60	

ORF	Gen	Annotation	Durchschnittliche Expressions-änderung Gal-ATM1 SD	YPD
YGL009C	*LEU1*	3-isopropylmalate isomerase	-10,88	-8,08
YCL018W∗	*LEU2*	Beta-isopropyl-malate dehydrogenase	4,20	
YNL268W	*LYP1*	Lysine permease	2,24	
YIR034C	*LYS1*	Saccharopine dehydrogenase	2,79	
YNR050C	*LYS9*	Saccharopine dehydrogenase	2,02	
YIL094C	*LYS12*	Homo-isocitrate dehydrogenase	2,62	3,25
YDL182W	*LYS20*	Homocitrate synthase	2,53	2,82
YOR348C	*PUT4*	Proline specific-permease	-2,78	
YHR208W	*BAT1*	Transaminase		-2,41
YJR148W	*BAT2*	Branched-chain amino acid aminotransferase	2,03	
Yer175C	*TMT1*	Trans-aconitate methyltransferase	5,84	4,60
YJR010W	*MET3*	ATP sulfurylase	-2,15	
YKL001C	*MET14*	Adenylylsulfate kinase	-3,22	
Paarungsfaktor Antwort				
YAR010C		Transposable element gene	2,51	
YBL005W-A		Transposable element gene	2,65	
YBR012W-A		Transposable element gene	2,59	
YJR026W		Transposable element gene	2,50	
YML040W		Transposable element gene	2,72	
YML045W		Transposable element gene	2,77	
YMR046C		Transposable element gene	2,54	
YMR051C		Transposable element gene	2,52	

Die Genexpressionsdaten der Mutanten sind relativ zur Expression in Wildtypzellen angegeben. Der Mittelwert basiert auf zwei biologischen Replikaten (insgesamt 4 Arrays). Die regulierten Gene wurden in Funktionsklassen eingeteilt. Reprimierte Gene sind mit einem (-) Zeichen versehen, Aft1p-abhängige sind fett, Aft2p-abhängige sind unterstrichen und Hap1p-abhängige Gene sind mit zwei ∗∗ angegeben. ∗ Marker für genetische Integration des *GAL1-10* Promotors.

5.3.4. Die Reprimierung von Genen der Atmungskette in Yah1p- und Atm1p-depletierten Zellen wird durch einen Defekt der Atmung und durch Eisenmangel hervorgerufen

Die Induktion des Eisen-Regulons in Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen ist auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Aft1p zurückzuführen. Der Grund für die Reprimierung so vieler Gene mit einer Funktion in der Respiration ist hingegen noch ungeklärt. Ob Eisenmangel, ein Defekt in der Atmung oder in der Häm-Biosynthese für die Reprimierung dieser Gene verantwortlich ist, wird im Folgenden dargestellt. Die transkriptionelle Aktivität respiratorischer Gene unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen erfolgte durch Messung der Promoteraktivität des Gens *CYC1*, welches für ein Cytochrom *c* kodiert und das in allen durchgeführten Transkriptom-Analysen deutlich reprimiert wurde (Tab. 3). Zunächst wurde ein Reporterplasmid erzeugt, mit dem das grün-fluoreszierende Protein (GFP) unter der

Kontrolle des *CYC1* Promotors in Hefe exprimiert werden konnte. Durch PCR wurden 1 kb der *CYC1* Promotorregion amplifiziert und in das Plasmid pHK252 ligiert. Dieses enthielt bereits die kodierende *GFP* Sequenz (4.8). Im Folgenden wird das so entstandene Reporterplasmid als pCYC1-GFP bezeichnet. Neben Gal-ATM1 und Gal-YAH1 wurde eine weitere *ISC* Mutante (Gal-SSQ1) mit diesem Plasmid transformiert und in Minimalmedium unter reprimierenden Bedingungen kultiviert. *SSQ1* kodiert für ein in der mitochondrialen Matrix lokalisiertes Hsp70 Chaperon mit einer Funktion in der Fe/S Cluster Biogenese. Die Promotoraktivität des *CYC1* Gens konnte durch GFP-spezifische Fluoreszenzemission der Zellen detektiert werden (4.17.1). Die *CYC1* Promotoraktivität in Yah1p- und Atm1p-depletierten Zellen reduzierte sich im Vergleich zu Wildtypzellen um das 3-fache und in Ssq1p-depletierten Zellen um das 4-fache (16A). Offensichtlich ist die Reprimierung von Genen, die für Komponenten der Atmungskette kodieren ein Merkmal aller *ISC* Mutanten. Um zu untersuchen, ob das Verhalten der Zellen durch einen Defekt in der Atmung hervorgerufen wird, wurde das pCYC1-GFP Reporterplasmid zusätzlich in die Deletionsstämme *Δaco1*, *Δcyt2* und *Δsod1* transformiert. Allen Stämmen ist ein Defekt der Atmung gemeinsam, der allerdings unterschiedliche Ursachen hat. In *Δaco1* Zellen ist der Zitronensäurezyklus gestört, da diese keine mitochondriale Aconitase synthetisieren können. Der *Δcyt2* Stamm kann keinen funktionellen respiratorischen Komplex III mehr zusammensetzen, da das kodierende Gen der Cytochrom c_1 Häm-Lyase fehlt. Im *Δsod1* Stamm wurde das Gen der mitochondrialen Superoxid-Dismutase deletiert, welche die Zelle vor oxidativen Stress bewahrt. Alle untersuchten Stämme zeigten ein ähnliches Expressionsmuster, d.h. eine im Vergleich zu Wildtypzellen verringerte *CYC1* Promotoraktivität (Abb. 16B). Daraus lässt sich ableiten, dass alle Zellen mit einem Defekt der Atmung diesen Phänotyp hervorrufen. Dieser lässt sich auch durch mitochondriale DNA Schäden verursachen (Butow & Avadhani, 2004). Allerdings zeigten die untersuchten respiratorischen Defektmutanten mit einer im Vergleich zu Wildtypzellen 2,2 bis 2,6-fachen Abnahme der GFP-spezifischen Fluoreszenzemission einen geringeren Effekt als Mutanten mit Defekten in der Fe/S Protein-Biogenese (Abb. 16B). Es ist daher wahrscheinlich, dass ein Atmungsdefekt nicht der einzige Grund für den Phänotyp in Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen sein kann.

Es wurde bereits gezeigt, dass auch ein Eisenmangel in *S. cerevisiae* die Gene, welche Komponenten der Atmungskette kodieren, reprimiert (Puig *et al.*, 2005). Dies

erscheint sinnvoll, da Eisen als Teil eines Fe/S Clusters oder Häm-Moleküls ein wichtiger Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette ist und Eisenmangel folglich mit einer Abnahme der respiratorischen Leistung einhergeht. Die Reprimierung der Gene *ACO1* (Aconitase) und *RIP1* (Rieske Fe/S Protein) könnte folglich durch einen Defekt in der Atmung erklärt werden.

Um zu untersuchen, ob Eisenmangel auch die Aktivität des *CYC1* Promotors beeinflusst, wurden Wildtypzellen, die das pCYC1-GFP Reporterplasmid enthielten in Gegenwart von Eisen oder des Eisenchelators Bathophenantrolin kultiviert und hinsichtlich ihrer *CYC1* Promotoraktivität analysiert. Eisenmangel resultierte in einer 6-fachen Verminderung der *CYC1* Promotoraktivität (Abb.16C). Somit hat Eisenmangel einen weitaus größeren Einfluss auf die Regulation von Genen, welche für Produkte der Atmungskette kodieren als z.B. ein Funktionsverlust der Aconitase. Der durch Defekte von ISC-Assemblierungs- oder Exportkomponenten hervorgerufene artifizielle Eisenmangel, der sich durch die massive Induktion des Eisen-Regulons andeutet, könnte somit ebenfalls für die Reprimierung respiratorischer Gene in Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen verantwortlich sein. In wie weit dieser Effekt in *ISC* Mutanten durch transkriptionelle Regulation oder durch Defekte der respiratorischen Aktivität der Mitochondrien hervorgerufen wird, bleibt offen. Vermutlich tragen beide Ursachen zur Reprimierung dieser Gene bei.

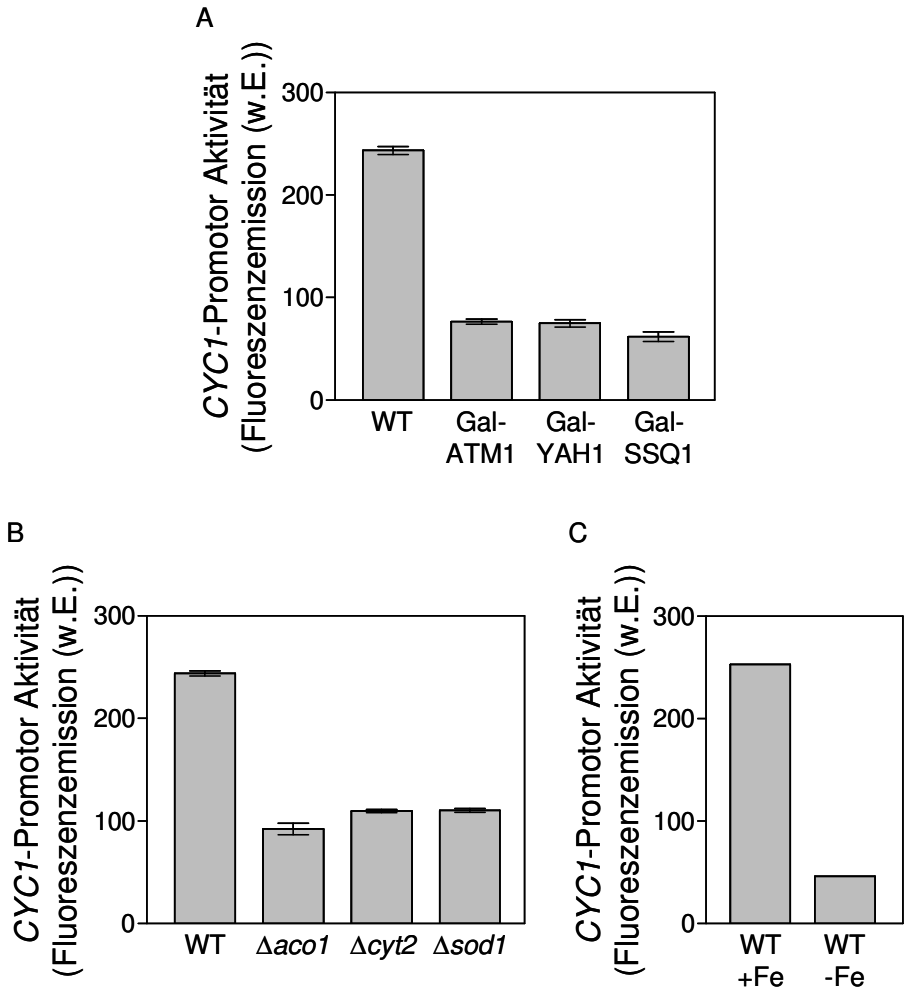

Abb. 16: Die Depletion von Proteinen der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie verursacht die Reprimierung von Genen der Atmungskette. A) Wildtypzellen (WT), die regulierbaren Stämme Gal-ATM1, Gal-YAH1, Gal-SSQ1 und **(B)** *Δaco1*, *Δcyt2*, *Δsod1* Zellen wurden mit dem Reporterplasmid pCYC1-GFP transformiert, welches die Expression von GFP unter der Kontrolle des *CYC1* Promotors ermöglicht. Die Stämme wurden in Minimalmedium mit Glukose kultiviert, um Atm1p, Yah1p und Ssq1p im korrespondierenden Stamm zu depletieren. **C)** Wildtypzellen, die das Reporterplasmid pCYC1-GFP enthielten, wurden in Minimalmedium mit Glukose und in Abwesenheit (WT+Fe) oder mit 50 µM des Eisenchelators Bathophenantrolin kultiviert. Promotoraktivitäten wurden durch Messung der GFP-spezifischen Fluoreszenzemission bei 513 nm ermittelt (Anregung bei 480 nm). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier unabhängigen Messungen an. (w.E., willkürliche Einheiten)

Um zu zeigen, wie stark ein Eisenmangel die Aktivität mitochondrialer Proteine beeinflusst, wurden Wildtyp-Mitochondrien untersucht, die in Vollmedium mit oder ohne Eisenchelator Bathophenantrolin kultiviert wurden. In den isolierten Mitochondrien wurden die Aktivitäten verschiedener Eisen-abhängiger Enzyme (Aconitase, Komplex II, Komplex IV und Ferrochelatase) sowie die Aktivität der Eisen-unabhängigen Malat-Dehydrogenase (Kontrolle) bestimmt. Eisenmangel führte gegenüber Wildtypzellen ohne Eisenmangel zu einem Aktivitätsverlust der Aconitase (99%), der Succinat-Dehydrogenase (95%), der Cytochrom *c* Oxidase (90%) und der

Ferrochelatase (77%), (Abb. 17). Die Aktivität der Malat-Dehydrogenase reduzierte sich hingegen nur um 25%.

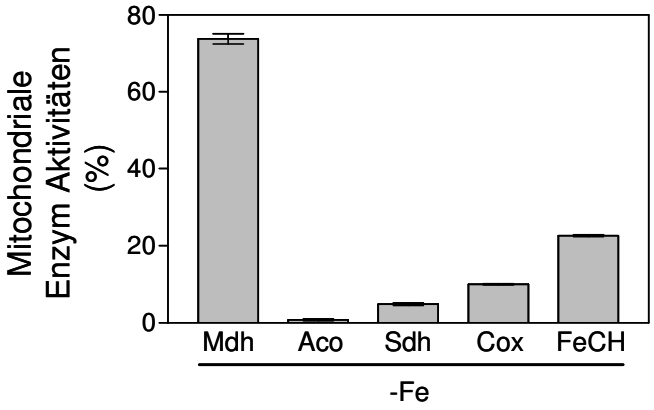

Abb. 17 Eisenmangel führt zu Aktivitätsverlusten Eisen-abhängiger Enzyme. Mitochondrien wurden aus Wildtypzellen isoliert, die auf Vollmedium mit (-Fe) oder ohne 80 µM Bathophenantrolin kultiviert wurden. Die Enzymaktivitäten der angezeigten Proteine wurden bestimmt. Die Angaben beziehen sich auf die gemessenen Werte in Abwesenheit des Chelators Bathophenantrolin. Mdh: Malat-Dehydrogenase, Aco: Aconitase, Sdh: Succinat-Dehydrogenase, Cox: Cytochrom *c* Oxidase, FeCH: Ferrochelatase. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an.

5.3.5. Die Induktion von FET3 in Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen ist auf einen Eisenmangel zurückzuführen

Die Transkriptom-Analysen Yah1p- und Atm1p-depletierter Zellen zeigten die Reprimierung zahlreicher Gene, die für Komponenten der Atmungskette und für Häm-haltige Proteine kodieren. Daher sollte untersucht werden, ob die Induktion des Eisen-Regulons in Yah1p- und Atm1p-depletierten Zellen, durch eine gestörte Häm-Biosynthese oder einen Atmungsdefekt ausgelöst wird. Die Induktion der Gene des Eisen-Regulons wurde in *Δaco1* (Atmungsdefekt) und Hem15p-depletierten Zellen (Häm-Biosynthesedefekt) detaillierter untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein Reporterplasmid (pFET3-GFP) verwendet, welches die Expression von GFP unter der Kontrolle des *FET3* Promotors in *S. cerevisiae* ermöglichte (Rutherford *et al.*, 2005). *FET3* kodiert eine Ferroxidase des hochaffinen Eisenaufnahmesystems und wird als Teil des Eisen-Regulons durch den Transkriptionsfaktor Aft1p reguliert. Der *FET3* Promotor eignete sich für die folgenden Untersuchungen besonders gut, da die Transkriptom-Analysen eine starke Induktion des Gens zeigten (13-fach in Atm1p- und 31-fach in Yah1p-depletierten Zellen). Das pFET3-GFP Konstrukt wurde in Wildtyp-, Gal-HEM15, und *Δaco1* Zellen transformiert. Gal-HEM15 Zellen exprimierten *HEM15* (Häm-Biosynthese) unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors (*GAL1-10*). Anhand der GFP-spezifischen

Fluoreszenzemission konnte die Induktion von *FET3* in diesen Mutanten bestimmt werden. Wildtyp-, Gal-Hem15 und *Δaco1* Zellen wurden in Glukose-haltigem Minimalmedium mit oder ohne Bathophenantrolin kultiviert. Eisenmangel führte in Wildtypzellen gegenüber jenen ohne Eisenmangel zu einer ca. 5-fachen Induktion von *FET3* (Abb. 18). In Gegenwart von Eisen wurde *FET3* weder in Hem15p-depletierten Zellen noch in *Δaco1* Zellen induziert. Folglich können Defekte in der Respiration oder der Synthese von Häm keine Induktion des Eisen-Regulons auslösen. Somit ist allein die verminderte Synthese von Yah1p und Atm1p für die Induktion des Eisen-Regulons verantwortlich.

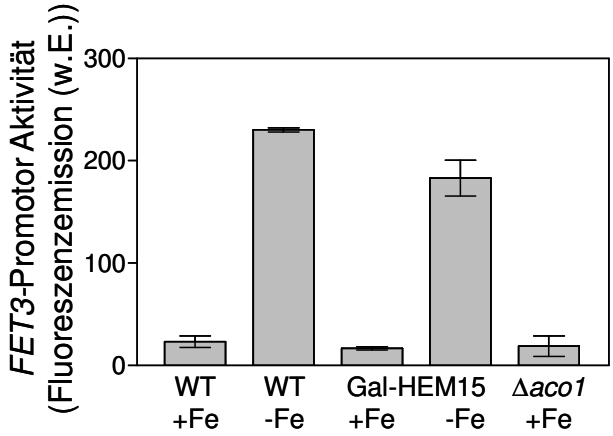

Abb. 18 Die Induktion von *FET3* in Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen ist auf einen Eisenmangel zurückzuführen. Wildtyp- (WT), Gal-HEM15 und *Δaco1* Zellen, die das Reporterplasmid pFET3-GFP enthielten, wurden unter reprimierenden Bedingungen in Minimalmedium mit (-Fe) und ohne (+Fe) Bathophenantrolin kultiviert. Die *FET3* Promotoraktivität von exponentiell wachsenden Zellen wurde durch die Messung der GFP-spezifischen Fluoreszenzemission bei 513 nm bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an. (w.E., willkürliche Einheiten)

5.3.6. Eisenmangel und die Depletion von Yah1p und Atm1p resultieren in ähnlichen Expressionsmustern

Die folgenden Experimente sollten zeigen, in wie weit die Expressionsmuster von ISC-Assemblierungs- und Exportmutanten mit denen unter Eisenmangel kultivierten Zellen übereinstimmen. Zu diesem Zweck wurden Reporterplasmide hergestellt, welche die Expression der Luziferase unter der Kontrolle diverser Eisen-regulierter Promotoren in *S. cerevisiae* ermöglichten. Als Beispiele Eisen-regulierter Gene wurden *BIO2*, *ERG3*, *GLT1* und *YHB1* gewählt. *BIO2* und *GLT1* kodieren für die Fe/S Proteine Biotin-Synthase und Glutamat-Synthase, *YHB1* für ein Flavohämoglobin mit noch unbekannter Funktion und *ERG3* kodiert eine C-5 Sterol-Desaturase mit einer Funktion in der Ergosterol-Biosynthese. Ihre Eisen-abhängige Expression in *S. cerevisiae* wurde bereits dokumentiert (Puig *et al.*, 2005; Shakoury-

Elizeh *et al.*, 2004). Diese verschiedenen Reporterplasmide zur Promotoranalyse von *BIO2*, *ERG3*, *GLT1* oder *YHB1* wurden in Wildtypzellen und in die *ISC* Mutanten *ATM1*, *YAH1* und *SSQ1* transformiert. Die Zellen wurden unter reprimierenden Bedingungen, d.h. auf Minimalmedium mit Glukose kultiviert. Die Promotoraktivitäten wurden durch Messung der Luciferase-spezifischen Lichtemission in einem Szintillationszähler ermittelt und mit denen von Eisen-depletierten Wildtypzellen verglichen, die parallel im gleichen Medium, jedoch in Gegenwart des Eisenchelators Bathophenantrolin kultiviert wurden. Die Promotoraktivität des *ERG3* Gens stieg im Vergleich zu Wildtypzellen ohne Eisenmangel 1,8-fach (Gal-ATM1), 2,4-fach (Gal-YAH1) und 3,6-fach (Gal-SSQ1), (Abb. 19A). Unter Eisenmangel wurde *ERG3* auch in Wildtypzellen 2,2-fach induziert. Sowohl ein Eisenmangel als auch eine verminderte Synthese der ISC-Komponenten löste eine vergleichbar starke Induktion des *ERG3* Gens aus. Die Analysen der anderen Eisen-regulierten Promotoren (*BIO2, GLT1* und *YHB1*) ergaben ähnliche Resultate (Abb. 19B-D). Im Vergleich zu Wildtypzellen ohne Eisenmangel wurde *BIO2* 4-fach (Gal-ATM1), 2,3-fach (Gal-YAH1) und 7-fach (Gal-SSQ1) reprimiert. Unter Eisenmangel zeigten auch Wildtypzellen eine 3-fache Reprimierung der Promotoraktivität des *BIO2* Gens (Abb. 19B). *GLT1* und *YHB1* verhielten sich analog (Abb. 19C-D). In Wildtypzellen unter Eisenmangel und in Atm1p, Yah1p sowie in Ssq1p-depletierten Zellen reduzierte sich ebenfalls die Promotoraktivität der Gene *GLT1* und *YHB1*. Einige *ISC* Mutanten zeigten eine stärkere Reprimierung als Wildtypzellen unter Eisenmangel, da vermutlich noch andere Faktoren an der Regulation dieser Gene beteiligt sind. Prinzipiell bestätigen diese Ergebnisse die Daten der Transkriptom-Analysen von Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen. *BIO2* und *GLT1* werden zwar in den Tabellen 2 und 3 nicht aufgeführt, da die Veränderungen der Genexpression unter dem gewählten Schwellenwert lagen (Gal-YAH1*: BIO2* [-1,86] und *GLT1* [-1,81]; Gal-ATM1: *GLT1* [-1,56]). Allerdings passen diese systematischen Genexpressionsdaten gut zu den individuellen Ergebnissen der Promotorstudien. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Daten folgern, dass *ISC* Mutanten größtenteils die selben Gene reprimieren oder induzieren wie Wildtypzellen unter Eisenmangel.

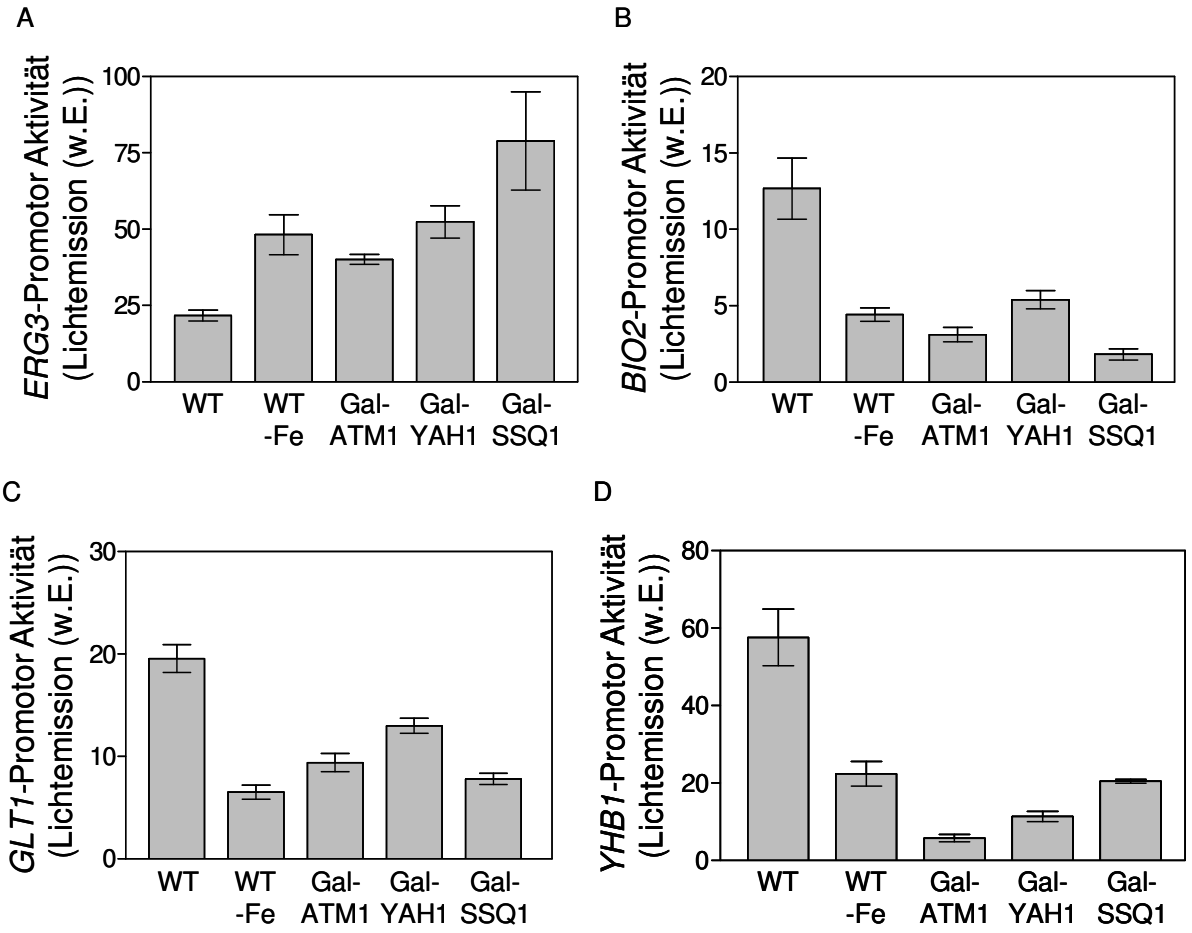

Abb. 19: Die Depletion von Proteinen der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie verändert die Expression von Eisen-regulierten Genen. Wildtypzellen (WT) und die regulierbaren Stämme Gal-ATM1, Gal-YAH1, Gal-SSQ1 wurden mit dem Reporterplasmid p416ERG3-hRluc **(A)**, p416BIO2-hRluc **(B)**, p416GLT1-hRluc **(C)**, p416YHB1-hRluc **(D)** transformiert. Die Stämme wurden in Minimalmedium mit Glukose kultiviert, um Atm1p, Yah1p und Ssq1p im korrespondierenden Stamm zu depletieren. Parallel wurden Wildtypzellen in Minimalmedium mit (WT-Fe) und ohne 50 µM Bathophenantrolin (WT) kultiviert. Promotoraktivitäten wurden in exponentiell wachsenden Zellen durch Messung der Luziferase-spezifischen Lichtemission bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier unabhängigen Messungen an. (w.E., willkürliche Einheiten) (von U. Mühlenhoff).

Die Transkriptom-Analysen zeigten, wie bereits erwähnt, eine Reprimierung des Gens *HEM15*, welches u.a. durch Eisen reguliert wird (Puig *et al.*, 2005). Zur Bestätigung der Reprimierung von *HEM15* wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt (4.13). Dazu wurde RNA aus Wildtyp-, Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen in einem denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer ^{32}P-Sonde gegen *HEM15* hybridisiert. In Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen wurde ca. 10-mal weniger Transkript detektiert als in Wildtypzellen (Abb. 20). In Wildtypzellen, die unter Eisenmangel kultiviert wurden, war die Menge des Transkripts noch geringer (Abb. 20). Zur Normalisierung der Hybridiserungsbedingungen wurde eine zweite Sonde gegen das konstitutiv exprimierte Gen *ACT1* verwendet. Da in allen Stämmen

vergleichbare Mengen *ACT1* Transkript detektiert wurden, konnte die Reprimierung von *HEM15* in Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen durch die Northern Blot Analyse bestätigt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch Eisenmangel die Transkription von *HEM15* inhibiert (Abb. 20).

Aus den Ergebnissen der Transkriptom-Analysen und den Promotorstudien Eisen-abhängiger Gene lässt sich schließen, dass sowohl Eisenmangel als auch Störungen der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerien zu einem ähnlichen Expressionsverhalten führen (Abb. 19).

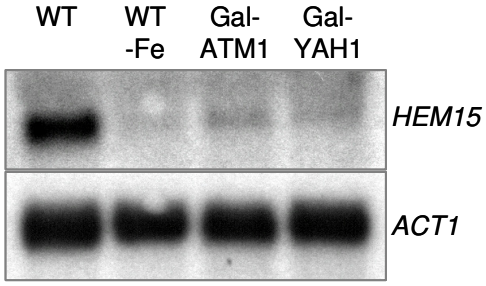

Abb. 20: Northern Blot Analyse von *HEM15* in Eisen-, Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen. Gal-ATM1 und Gal-YAH1 Zellen wurden unter reprimierenden Bedingungen in Minimalmedium und Wildtypzellen wurden in Minimalmedium mit Glukose und mit (WT-Fe) oder ohne (WT) 50 µM Bathophenantrolin kultiviert. Gesamt-RNA wurde aus exponentiell wachsenden Zellen isoliert, in einem Agarosegel aufgetrennt, anschließend auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer ^{32}P-markierten *HEM15* und *ACT1* Sonde hybridisiert.

5.4. Atm1p- und Yah1p-depletierte Zellen besitzen einen Häm-Synthesedefekt

5.4.1. Die Depletion von Atm1p und Yah1p führt zu einem Aktivitätsverlust von Proteinen mit Häm-Cofaktoren

Das nächste Experiment sollte klären, ob die Reprimierung von Genen, die für Proteine mit Häm-Cofaktoren kodieren, auch einen physiologischen Effekt auf die Menge an zellulärem Häm bzw. auf die Aktivität Häm-abhängiger Enzyme ausübt. Daher wurden zunächst die Enzymaktivitäten der Häm-haltigen Cytochrom *c* Oxidase und Katalase sowie der Häm-unabhängigen Alkohol-Dehydrogenase als Kontrolle gemessen (s 4.15.3.4, 4.15.4.3, 4.15.4.2). Wildtyp-, Gal-ATM1 und Gal-YAH1 Zellen wurden in Minimal- und Vollmedium (nur Wildtyp- und Gal-ATM1 Zellen) mit Glukose kultiviert (reprimierende Bedingungen), um Mitochondrien und post-mitochondrialen Überstand zu isolieren. Die Aktivität der mitochondrialen Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV), einem Häm-haltigen, aber nicht Fe/S Cluster-tragenden Protein, verminderte sich im Vergleich zu Wildtypzellen 2-fach (Gal-ATM1) bzw. 4-fach (Gal-YAH1) (Abb. 21A). Der Aktivitätsverlust korrelierte mit der

reduzierten Cox4p (Untereinheit 4 der Cytochrom *c* Oxidase) Proteinmenge sowohl in Atm1p- als auch in Yah1p-depletierten Zellen (Abb. 21D). In Vollmedium hatte die Aktivität der Cytochrom *c* Oxidase Wildtyp Niveau (Abb. 21A). Der Häm-Defekt Atm1p-depletierter Zellen ist daher offensichtlich sekundär, da er nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen auftrat. Als nächstes wurde die Aktivität der Katalase bestimmt. Dieses Häm-haltige Protein ist in *S. cerevisiae* sowohl im Cytosol als auch in den Peroxisomen lokalisiert und beseitigt übermäßig anfallendes Wasserstoffperoxid. Die Aktivität der Katalase reduzierte sich 4-fach (in Gal-ATM1) und 11-fach (in Gal-YAH1) gegenüber Wildtypzellen (Abb. 21B). Als Kontrolle wurde die Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase bestimmt. In Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen war die Aktivität um den Faktor 4 bzw. 2 höher als im PMS von Wildtypzellen (Abb. 21C). Die Western Blot Analyse zeigte, dass der Aktivitätsverlust der Cytochrom *c* Oxidase und der Katalase in Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen mit einer verminderten Synthese der Ferrochelatase (Hem15p) korrelierte. (Abb. 21D).

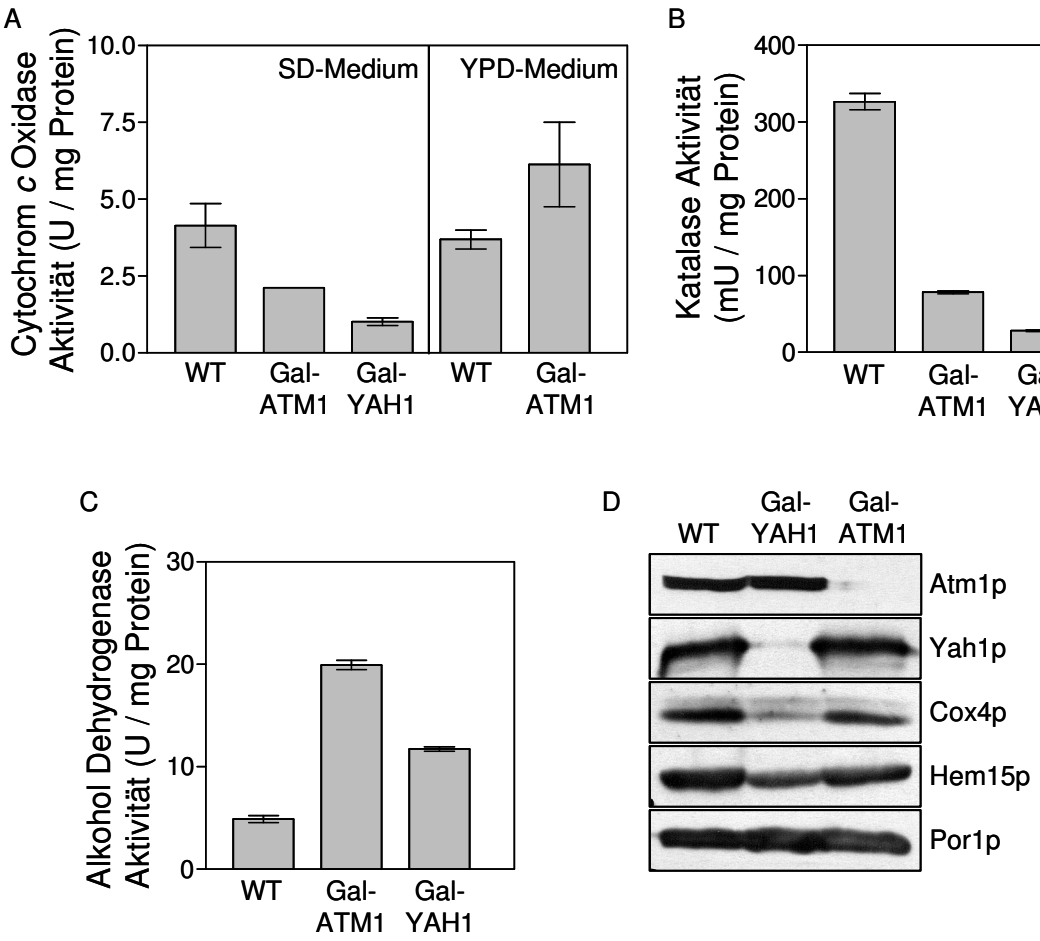

Abb. 21: Die Depletion von Atm1p und Yah1p führt zu einem Aktivitätsverlust von Proteinen mit Häm-Cofaktoren. Wildtyp- (WT), Gal-ATM1 und Gal-YAH1 Zellen wurden in Minimal- oder Vollmedium mit Glukose kultiviert, um die zellulären Proteine Atm1p und Yah1p zu depletieren. Aus diesen Zellen wurden Mitochondrien und PMS isoliert. Die Aktivität der **(A)** Cytochrom *c* Oxidase wurde in isolierten Mitochondrien, die **(B)** der Katalase und **(C)** Alkohol-Dehydrogenase im post-

mitochondrialen Überstand ermittelt. **D)** Mitochondriale Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit spezifischen Antiseren immundetektiert. Die Western Blot Analyse zeigt die Depletion von Atm1p und Yah1p sowie die verminderte Synthese der Untereinheit 4 der Cytochrom *c* Oxidase (Cox4p) und der Ferrochelatase (Hem15p). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an.

5.4.2. Atm1p- und Yah1p-depletierte Zellen besitzen weniger Häm

Ob die oben beschriebene Aktivitätsabnahme der Häm-haltigen Proteine auf einen Mangel an Häm-Cofaktoren zurückzuführen ist, sollte durch das nächste Experiment geklärt werden. Dazu wurde der Häm-Gehalt in Wildtyp-, Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen *in vivo* gemessen (4.15.7). Die Zellen wurden unter reprimierenden Bedingungen über Nacht in eisenarmen Minimalmedium mit ^{55}Fe kultiviert und markiert, anschließend sedimentiert und in Butylacetat mit Glasperlen mechanisch aufgeschlossen. *In vivo* synthetisiertes ^{55}Fe-haltiges Häm wurde in die organische Phase extrahiert und durch Szintillationszählung quantifiziert. Atm1p-depletierte Zellen enthielten 42% und Yah1p-depletierte Zellen 80% weniger Häm als Wildtypzellen (Abb. 22). Der reduzierte Häm-Gehalt korrelierte mit den reduzierten Aktivitäten der Cytochrom *c* Oxidase und der Katalase (Abb. 21A und B). Diese Daten demonstrieren, dass neben der transkriptionellen Reprimierung von Genen, die für Häm-haltige Proteine kodieren, auch die Verminderung des Häm-Gehalts zum Aktivitätsverlust beiträgt. Möglicherweise ist die beobachtete transkriptionelle Reprimierung von *HEM15* für die verringerten zellulären Häm-Mengen verantwortlich.

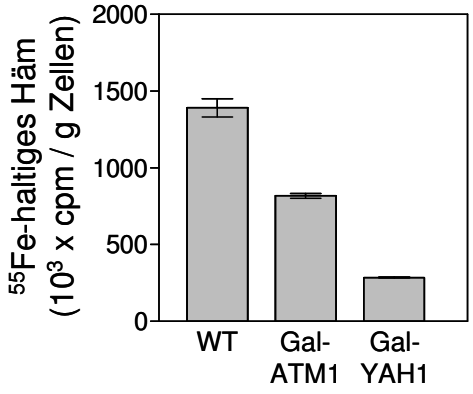

Abb. 22: Atm1p- und Yah1p-depletierte Zellen besitzen weniger Häm. Wildtyp- (WT), Gal-ATM1 und Gal-YAH1 Zellen wurden für 16 h in eisenarmen Minimalmedium mit Glukose kultiviert, um Atm1p und Yahp1 im korrespondierenden Stamm zu depletieren. Die Zellen wurden gleichzeitig mit ^{55}Fe markiert. Anschließend wurden die Zellen in Anwesenheit von *n*-Butylacetat mechanisch aufgeschlossen. Das in die organische Phase extrahierte ^{55}Fe-haltige Häm wurde durch Szintillationszählung quantifiziert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an.

5.4.3. Atm1p- und Yah1p-depletierte Zellen besitzen eine verminderte Ferrochelatase Aktivität

Der reduzierte Häm-Gehalt in Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen basiert entweder auf einer verminderten Häm-Biosynthese oder auf einem erhöhten Häm-Abbau. Eine verminderte Synthese wurde bereits erkennbar durch die transkriptionelle Reprimierung von *HEM15* (Abb. 20). Andererseits zeigte die Transkriptom-Analyse eine Induktion des Gens *HMX1*. Dieses Gen kodiert für ein Enzym mit Häm-Oxygenase Aktivität, welches möglicherweise für den Häm-Abbau in *S. cerevisiae* verantwortlich ist (Tab. 3). Zunächst wurde die Aktivität der Ferrochelatase in isolierten Mitochondrien bestimmt (4.15.3.6). Im Vergleich mit Wildtypzellen war die Ferrochelatase Aktivität in Atm1p- um 30% und in Yah1p-depletierten Zellen um 58% reduziert (Abb. 23). Die Aktivitätsabnahme der Ferrochelatase korrelierte mit dem reduzierten Häm-Gehalt der entsprechenden Mutanten, wobei Yah1p-depletierte Zellen stets stärker betroffen waren als Atm1p-depletierte Zellen (Abb. 22).

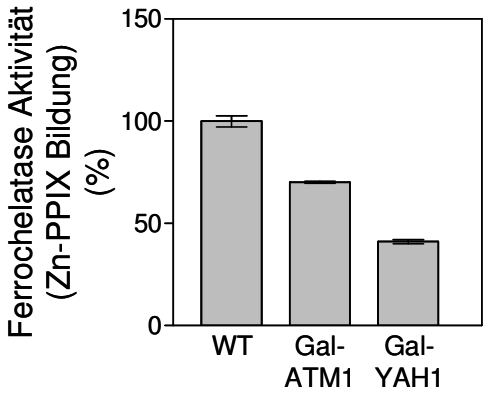

Abb. 23: In Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen ist die Aktivität der Ferrochelatase vermindert. Die Ferrochelatase Aktivität in isolierten Mitochondrien aus Wildtyp-, Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen wurde anhand der Insertion von endogenem Zn^{2+} in Protoporphyrin IX (PPIX) bestimmt. Die Angaben beziehen sich auf den Wert für Wildtypzellen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier unabhängigen Messungen an.

5.4.4. Die Verminderung der Ferrochelatase Aktivität etabliert den geringeren zellulären Gehalt an Häm

Die transkriptionelle Reprimierung von *HEM15* spiegelte sich in einer reduzierten Aktivität der Ferrochelatase wider (Abb. 23). Ob die Aktivität der Ferrochelatase auch allein für den reduzierten Häm-Gehalt und den Aktivitätsverlust von Häm-haltigen Proteinen verantwortlich sein kann, sollte mit dem folgenden Experiment untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden regulierbare Gal-Hem15 Zellen als Modell

erzeugt, welche die Ferrochelatase in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle synthetisierten. Zuerst wurde der Häm-Gehalt in Hem15p-depletierten Zellen *in vivo* gemessen. Dazu wurden Wildtyp- und Gal-HEM15 Zellen unter reprimierenden Bedingungen und in Gegenwart von Galaktose in eisenarmen Minimalmedium kultiviert und gleichzeitig mit ^{55}Fe markiert. Die Kulturen wurden über Nacht angezogen, geerntet und die Zellen anschließend in Butylacetat mit Glasperlen mechanisch aufgeschlossen. *In vivo* synthetisiertes ^{55}Fe-haltiges Häm wurde in die organische Phase extrahiert und durch Szintillationszählung quantifiziert. Hem15p-depletierte Zellen synthetisierten 3,5-mal weniger Häm als Wildtypzellen (Abb. 24A). In Gegenwart von Galaktose synthetisierten Wildtyp- und Gal-HEM15 Zellen nahezu identische Mengen an Häm.

Wirkt sich ein verminderter Häm-Gehalt direkt auf die Enzymaktivität von Häm-haltigen Proteinen aus? Zu diesem Zweck wurde die Cytochrom *c* Oxidase Aktivität in isolierten Mitochondrien bestimmt. Die Messung der Katalase und Alkohol-Dehydrogenase erfolgte im PMS. Unter reprimierenden Wachstumsbedingungen sank in Gal-HEM15 Zellen die Katalase Aktivität im Vergleich zu Wildtypzellen um 92%, die der Cytochrom Oxidase um 75%, während die Alkohol-Dehydrogenase Aktivität um 50% anstieg (Abb. 24B-D). Die Depletion der Ferrochelatase unter reprimierenden Wachstumsbedingungen konnte in einer Western Blot Analyse bestätigt werden (Abb. 24E). Die hier gezeigten Ergebnisse entsprachen denen der Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen, mit der Ausnahme, dass diese unter reprimierenden Bedingungen weniger Cox4p synthetisierten als Hem15p-depletierte Zellen, bei denen die Synthese von Cox4p Apoprotein unverändert blieb (Abb. 21D, Abb. 24E). Daraus lässt sich schließen, dass eine reduzierte Ferrochelatase Aktivität allein die Aktivitätsabnahme von Häm-haltigen Proteinen *in vivo* verursachen kann, jedoch nicht zu einer Verminderung in der Synthese der Apoproteine führt. Die Aktivitätszunahme der Alkohol-Dehydrogenase ist erklärbar durch ein umschalten der Zellen auf Fermentation. Häm ist ein wichtiger Cofaktor von Proteinen der Atmungskette und ein Häm-Mangel vermindert die respiratorische Kompetenz. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Atm1p- und Yah1p-depletierte Zellen einen Häm-Synthesedefekt aufweisen, der u.a. durch die verminderte Aktivität der Ferrochelatase verursacht wird.

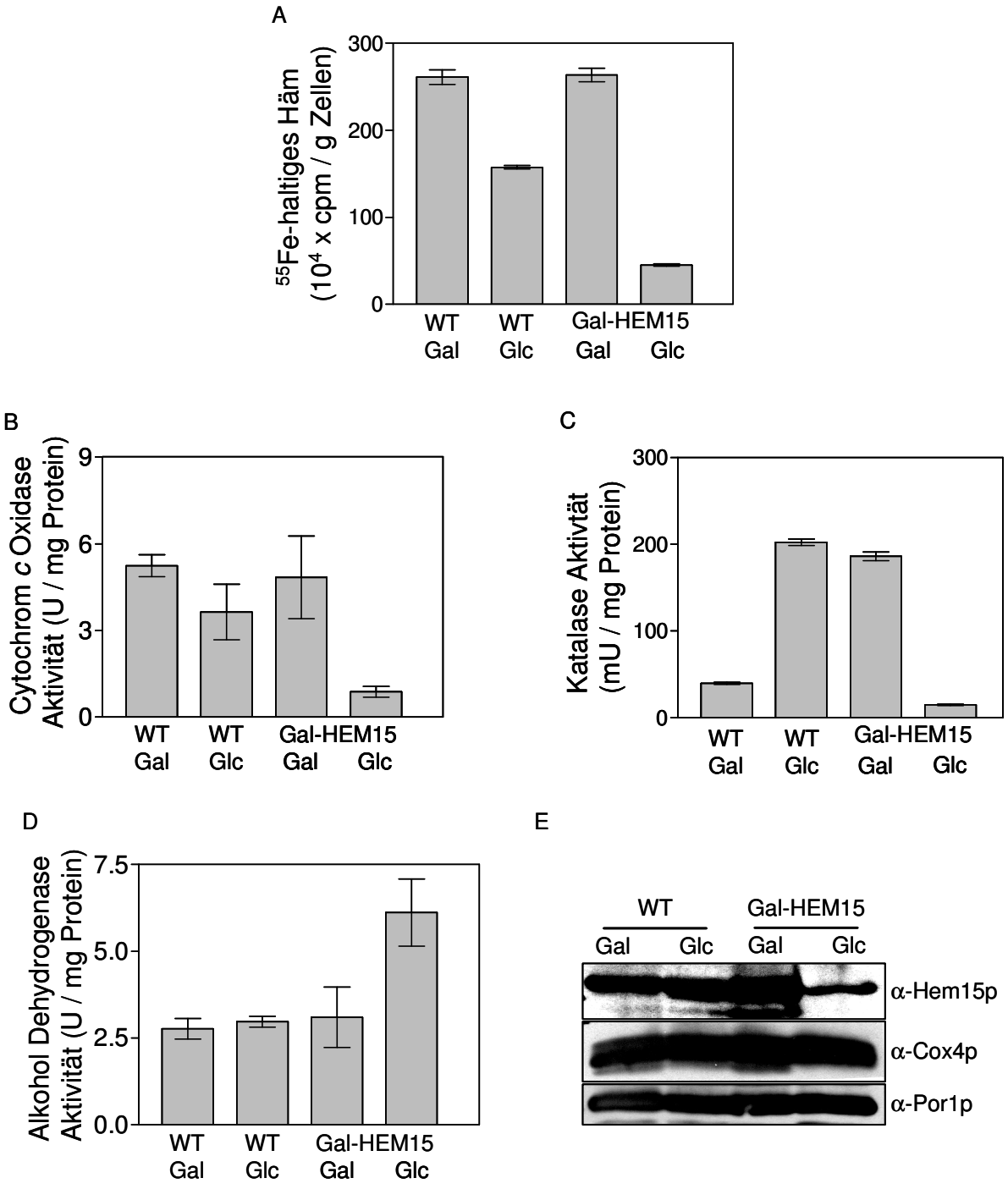

Abb. 24: Zellen mit einer verminderten Ferrochelatase Aktivität besitzen weniger Häm. Wildtyp- und Gal-HEM15 Zellen wurden in Minimalmedium unter reprimierenden (Glc) oder induzierenden (Gal) Bedingungen kultiviert. **A)** Die Zellen wurden weitere 16 h in eisenarmen Minimalmedium kultiviert und gleichzeitig mit ^{55}Fe markiert. Die Häm-Bestimmung erfolgte wie in Abb. 22 beschrieben. **B)** Die Cytochrom *c* Oxidase Aktivität wurde in isolierten Mitochondrien und **(C und D)** die Katalase sowie Alkohol-Dehydrogenase Aktivitäten wurden im PMS gemessen. **E)** Western Blot Analyse von Hem15p, Cox4p und Por1p unter Verwendung spezifischer Antiseren. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an.

5.4.5. Der reduzierte Häm-Gehalt ist nicht auf die Aktivität der Häm-Oxygenase Hmx1p zurückzuführen

Die Transkriptom-Analysen zeigten neben der Reprimierung von *HEM15* die signifikante Induktion des Gens *HMX1* (Tab. 3). *HMX1* kodiert für eine putative Häm-

Oxygenase, die in Hefe für den Häm-Abbau verantwortlich ist (Protchenko & Philpott, 2003). Durch die Aktivität des Enzyms wird Fe^{2+} freigesetzt. Die folgenden Experimente sollten klären, ob Hmx1p am reduzierten Häm-Gehalt der Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen mitverantwortlich sein könnte. Zunächst wurde die Induktion von *HMX1* in einer Northern Blot Analyse bestätigt (Abb. 25A). RNA aus Wildtypzellen, die mit und ohne Eisenchelator Bathophenantrolin kultiviert wurden sowie aus Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen, wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit ^{32}P-markierten Sonden gegen *HMX1* und *ACT1* hybridisiert. Wildtyp-, Yah1p- und Atm1p-depletierte Zellen unter Eisenmangel synthetisierten ca. 20-mal mehr *HMX1* Transkript als Wildtypzellen ohne Eisenmangel (Abb. 25A). Um zu klären, ob die Überexpression von *HMX1* tatsächlich den Häm-Gehalt der Zelle beeinflusst, wurde dieser in Wildtypzellen bestimmt, welche ein plasmidlokalisiertes *HMX1* überexprimierten (Abb. 25B). Zusätzlich wurde eine *Δhmx1* Deletionsmutante untersucht, die entweder ein plasmidlokalisiertes *HMX1* oder den leeren Vektor enthielt. Die Überexpression von *HMX1* senkte den Häm-Gehalt um 24% (Abb. 25B). Dagegen hatten *Δhmx1* Zellen 27% mehr Häm als Vergleichszellen. Der Häm-Gehalt der Deletionsmutante ließ sich durch die plasmidlokalisierte Expression von *HMX1* erneut auf Wildtyp Niveau senken (Abb. 25B).

Zur Untersuchung, ob die reduzierten Häm-Mengen in Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen ebenfalls durch eine erhöhte Häm-Oxygenase Aktivität bedingt sind, wurde der Häm-Gehalt von Wildtyp-, Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen, mit jenen verglichen, in denen zusätzlich *HMX1* deletiert war (*Δ*hmx1, *ATM1Δhmx1*, *YAH1Δ*hmx1). Unter reprimierenden Wachstumsbedingungen besaßen Atm1p-depletierte Zellen 41% und Yah1p-depletierte Zellen 80% weniger Häm als Wildtypzellen (Abb. 25C). Der Häm-Gehalt der isogenen Mutanten (*ATM1* und *YAH1*) war mit dem der Doppelmutanten (*ATM1Δhmx1* und *YAH1Δhmx1*) vergleichbar (Abb. 25C). Zusammenfassend zeigt dies, dass die Häm-Oxygenase *HMX1* in Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen keinen Einfluss auf den Häm-Gehalt hat. Dies bedeutet, dass die verminderte Synthese und nicht der erhöhte Abbau von Häm für die Häm-Defizienz von Mutanten mit Defekten in der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie verantwortlich ist. In Wildtypzellen scheint, in Übereinstimmung mit den Daten einer anderen Arbeitsgruppe, die Häm-

Oxygenase einen wenn auch geringen Einfluss auf die Häm-Menge auszuüben (Protchenko & Philpott, 2003).

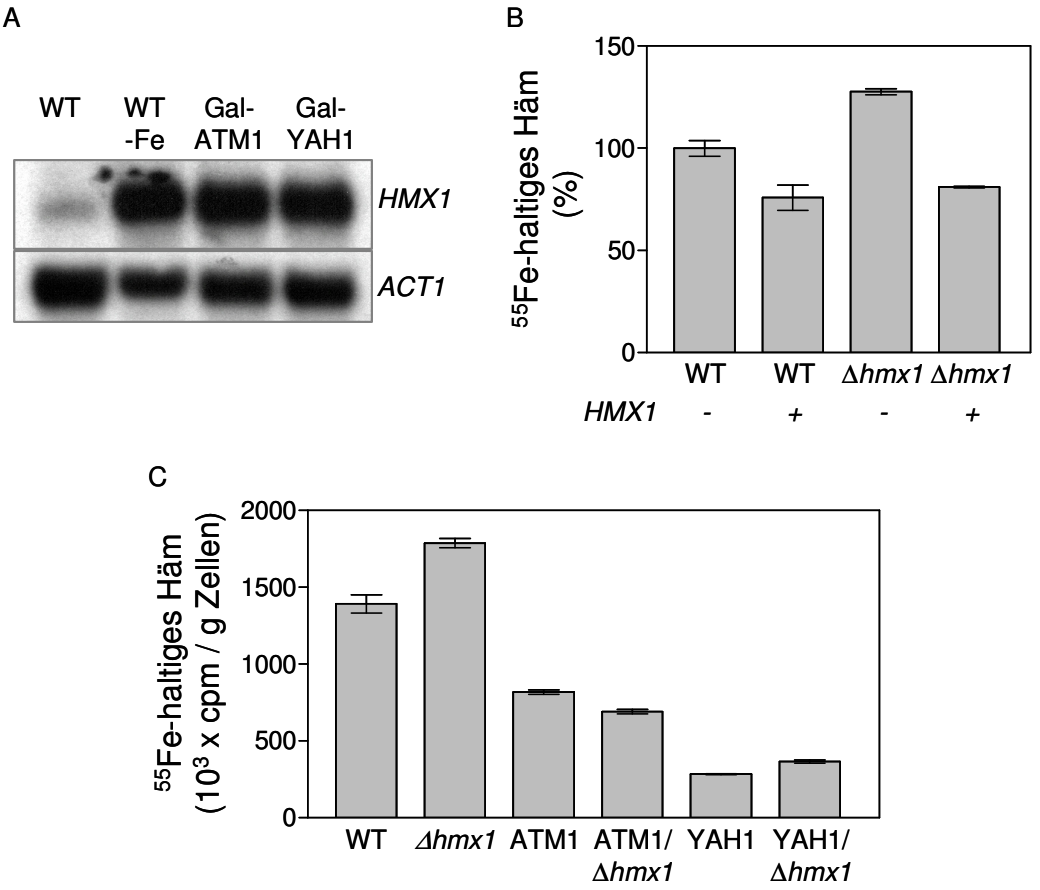

Abb. 25: Die Häm-Oxygenase Hmx1p ist nicht verantwortlich für den reduzierten Häm-Gehalt in Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen. A) Northern Blot Analyse von RNA aus Wildtypzellen (WT), die mit (WT-Fe) und ohne (WT) den Chelator Bathophenantrolin kultiviert wurden sowie RNA aus Atm1p- und Yah1p-depletierten Zellen, wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer ^{32}P-markierten Sonde gegen *HMX1* und *ACT1* hybridisiert. Die in **(B und C)** untersuchten Stämme wurden unter reprimierenden Bedingungen in eisenarmen Minimalmedium kultiviert und über Nacht mit ^{55}Fe markiert. Die Bestimmung des Häm-Gehaltes erfolgte wie in Abb. 22 beschrieben. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen an.

Zusammenfassung der Transkriptom-Analysen

Störungen in der Funktion der ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie führen zu gravierenden Veränderungen der Genexpression. Diese beobachteten Veränderungen in beiden Situationen überlappen weitgehend. Sie umfassen die Induktion des Eisen-Regulons und die Reprimierung von Genen, die für Komponenten der Atmungskette kodieren. Daneben sind die Ergosterol-, Biotin-, und Häm-Synthese betroffen sowie Gene, die für Häm-haltige Proteine kodieren oder am Häm-Abbau beteiligt sind. Veränderungen der CIA-Maschinerie ziehen dagegen keine drastischen Veränderungen der Genexpression nach sich.

Anhand von Promotorstudien Eisen-regulierter Gene konnte gezeigt werden, dass sich das Expressionsmuster von *ISC* Mutanten mit dem von Zellen unter Eisenmangel größtenteils deckt. Der Aktivitätsverlust von Häm-haltigen Proteinen in *ISC* Mutanten beruht auf einem Häm-Mangel, der im Wesentlichen auf eine reduzierte Ferrochelatase Aktivität, nicht aber auf den Häm-Abbau durch die Häm-Oxygenase Hmx1p, zurückzuführen ist. Die Ferrochelatase wird sowohl transkriptionell reprimiert als auch biochemisch inhibiert (Lange *et al.*, 2004).

6. Diskussion

6.1. Die CIA-Maschinerie wird für die Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen benötigt

6.1.1. Nbp35p ist ein Fe/S Protein

In dieser Arbeit wurde die essentielle P-Loop NTPase Nbp35p als ein neues Fe/S Protein identifiziert (Hausmann *et al.*, 2005). Durch Immunfluoreszenz und Zellfraktionierung konnte gezeigt werden, dass Nbp35p hauptsächlich im Cytosol, aber auch im Kern lokalisiert ist. Durch Markierung mit radioaktivem Eisen *in vivo* und anschließender Immunpräzipitation wurde eine spezifische, nicht chelatierbare Eisenbindung an Nbp35p demonstriert. Die Eisenbindung an Nbp35p war von der Funktionsfähigkeit der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie abhängig. Die Depletion der Cystein-Desulfurase Nfs1p und des Ferredoxins Yah1p (ISC-Assemblierung) sowie des ABC-Transporters Atm1p (ISC-Export) durch regulierte Genexpression führte zu einem stark verminderten Eiseneinbau in Nbp35p. Somit verhält sich Nbp35p in Bezug auf seine Reifung wie das cytosolische Fe/S Protein Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p), was darauf hindeutet, dass das an Nbp35p gebundene Eisen Bestandteil eines Fe/S Clusters ist. Der Fe/S Cluster ist am N-Terminus von Nbp35p assoziiert, da eine N-terminal verkürzte Variante des Proteins *in vivo* kein Eisen binden kann.

Die Fe/S Cluster-Bindung wurde *in vitro* durch spektroskopische Analysen an einem rekombinanten Nbp35p aus *Escherichia coli* unabhängig bestätigt. Sowohl ein UV/Vis als auch ein ESR-Spektrum deuteten auf einen [4Fe-4S] Cluster hin (Hausmann *et al.*, 2005), (A. Pierik, persönliche Mitteilung). Das ESR-Signal ergab *g*-Werte von 2,052; 1,934 und 1,84. Erstere sind typisch für einen [4Fe-4S] Cluster. Der Cluster wird wahrscheinlich durch vier konservierte Cysteine am N-Terminus von Nbp35p koordiniert. Der N-terminale Fe/S Cluster stellt einen essentiellen Teil des Proteins dar, da eine gerichtete Mutagenese der beiden zentralen Cysteine zum Tod der Zelle führt (Vitale *et al.*, 1996). Weitere hochkonservierte Cysteine am C-Terminus von Nbp35p können einen zusätzlichen Fe/S Cluster koordinieren (D. Aguilar-Netz, persönliche Mitteilung).

6.1.2. Nbp35p ist eine Komponente der CIA-Maschinerie

Diese Arbeit identifiziert Nbp35p als eine Komponente der bislang wenig charakterisierten CIA-Maschinerie, die spezifisch zur Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen benötigt wird (Hausmann *et al.*, 2005). Die Biogenese mitochondrialer Fe/S Proteine (z.B. Biotin-Synthase) erfolgte nach Depletion des Nbp35p mit Wildtyp-Effizienz. Im ersten Jahr dieser Arbeit wurde zudem die P-Loop NTPase Cfd1p identifiziert (Roy *et al.*, 2003), die eine hohe Sequenzhomologie zu Nbp35p aufweist. Mutationen in Cfd1p verursachen in *Saccharomyces cerevisiae* einen spezifischen Defekt in der Reifung extra-mitochondrialer Fe/S Proteine (Roy *et al.*, 2003). Nbp35p und das homologe Cfd1p besitzen außerdem Sequenzhomologie zu einer Unterfamilie von bakteriellen P-Loop ATPasen (Leipe *et al.*, 2002). Zu diesen gehört u.a. die Reduktase NifH des Nitrogenase-Komplexes (Dean *et al.*, 1993). NifH ist selbst ein Fe/S Cluster-tragendes Protein. Die den Fe/S Cluster koordinierenden Reste sind in Nbp35p allerdings nicht konserviert. Eine enge Verwandtschaft besteht zu dem aus *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium stammenden Protein ApbC (Mrp). Der Funktionsverlust von ApbC oder von Isc Proteinen in *S. enterica* geht mit einer Thiaminauxotrophie einher (Skovran & Downs, 2003). Auf Grund des ähnlichen Phänotyps von *isc* und *apbC* Mutanten wurde auch für das ApbC Protein aus *S. enterica* eine Funktion in der Assemblierung und/oder Reparatur von Fe/S Clustern vorgeschlagen. Weitere Untersuchungen ergaben, dass der Funktionsverlust von ApbC in einem Aktivitätsverlust Fe/S Cluster-tragender Proteine (Aconitase, Succinat-Dehydrogenase) resultierte, während Proteine ohne Fe/S Cluster von der Mutation unbeeinflusst blieben. Im Unterschied zu *isc* Mutanten konnte der Aktivitätsverlust der Aconitase in *apbC* Mutanten durch einen $FeCl_3$ Überschuss aufgehoben werden. Die in *S. enterica* bestehende Thiaminauxotrophie ist vermutlich eine sekundäre Folge des Aktivitätsverlustes von ThiH, einem in der Thiamin-Biosynthese beteiligten putativen Fe/S Protein.

Auf Grund der Sequenzhomologie zu Cfd1p (Roy *et al.*, 2003) und ApbC war auch für Nbp35p eine Rolle in der Assemblierung von Fe/S Clustern wahrscheinlich. Um die Funktion von Nbp35p in der Biogenese von Fe/S Proteinen *in vivo* zu untersuchen, wurde zunächst eine konditionale Hefemutante hergestellt, in der die Expression von *NBP35* durch einen Galaktose-regulierbaren Promotor kontrolliert wurde. Durch Kultivierung dieser Zellen in Abwesenheit von Galaktose konnte

Nbp35p spezifisch depletiert werden. Die Depletion führte zu einem signifikanten Aktivitätsverlust des cytosolischen Fe/S Proteins Isopropylmalat-Isomerase (Leu1p) und zu einem stark verminderten Einbau von radioaktivem Eisen in die cytosolischen Fe/S Proteine Leu1p, Rli1p, Nar1p und das nukleäre Fe/S Protein Ntg2p (Hausmann *et al.*, 2005). Dies zeigt, dass Nbp35p nicht nur zur Erhaltung der Aktivität, sondern auch zur *de novo* Synthese von Fe/S Proteinen benötigt wird.

Nbp35p-depletierte Zellen konnten uneingeschränkt auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsen. Dies zeigt, dass diese Zellen funktionstüchtige Mitochondrien besitzen. Daher ist es nicht überraschend, dass Nbp35p keinen Einfluss auf die Aktivitäten (Aconitase, Succinat-Dehydrogenase) und die *de novo* Synthese mitochondrialer Fe/S Proteine (Biotin-Synthase) ausübt. Auch Cfd1p besitzt keine erkennbare Funktion in den Mitochondrien (Roy *et al.*, 2003). In Übereinstimmung mit der cytosolischen Lokalisierung von Cfd1p ist es wie Nbp35p spezifisch an der Reifung cytosolischer Fe/S Proteine beteiligt (Roy *et al.*, 2003). Folglich verhält sich Nbp35p wie sein Homolog Cfd1p.

Basierend auf der hohen Sequenzhomologie von Nbp35p zu Cfd1p wurde untersucht, ob diese sich funktionell ersetzen könnten. Die Überexpression von *NBP35* konnte den Wachstumsdefekt Cfd1p-depletierter Zellen allerdings nicht kompensieren (Hausmann *et al.*, 2005). Nbp35p und Cfd1p übernehmen trotz phänotypischer Ähnlichkeiten ihrer Depletionsmutanten unterschiedliche Funktionen in der Biogenese extra-mitochondrialer Fe/S Proteine. Möglicherweise ist der Unterschied auf den konservierten Fe/S Cluster-tragenden N-Terminus in Nbp35p zurückzuführen, der in Cfd1p Proteinen fehlt (Abb. 4). Die Überexpression von *NBP35* in Cfd1p-depletierten Zellen führte zu einer Verstärkung des bestehenden Wachstumsdefekts. Ungleiche Konzentrationen an Cfd1p und Nbp35p in der Zelle scheinen demnach toxisch für die Lebensfähigkeit von Hefe zu sein. In der Zwischenzeit wurde gezeigt, dass Nbp35p und Cfd1p *in vitro* und *in vivo* interagieren (D. Aguilar-Netz, persönliche Mitteilung). Die Proteine bilden einen stabilen, heterotetrameren Komplex, der aus je zwei Nbp35p und Cfd1p Dimeren besteht.

6.1.3. Die Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen

Parallel zu dieser Arbeit wurden weitere Komponenten der CIA-Maschinerie identifiziert, wie z.B. das Fe/S Protein Nar1p, welches homolog zu bakteriellen Hydrogenasen ist (Balk *et al.*, 2004). Die Depletion von Nar1p zeigte einen ähnlichen

Phänotyp wie für Nbp35p- und Cfd1p-depletierte Zellen. Eine Überproduktion von Nar1p oder Nbp35p in Cfd1p-depletierten Zellen wirkte sich negativ auf das Wachstumsverhalten dieser Zellen aus (Hausmann *et al.*, 2005). Das vor kurzem identifizierte Protein Cia1p wird für den Einbau von Fe/S Clustern in cytosolische und nukleäre Proteine, wie Leu1p, Rli1p und Ntg2p, benötigt (Balk *et al.*, 2005). Cia1p ist allerdings nicht an der Biogenese aller cytosolischen Fe/S Proteine beteiligt. In Abwesenheit von Cia1p können z.B. Nbp35p und Nar1p ihre Fe/S Cluster mit normaler Effizienz assemblieren. Im Unterschied zu Nbp35p und Nar1p besitzt Cia1p keinen Fe/S Cluster und ist spezifisch an der Reifung von Fe/S Proteinen beteiligt, die selbst keine Funktion in der Biogenese von Fe/S Proteinen (z.B. Leu1p, Rli1p oder Ntg2p) ausüben (Balk *et al.*, 2005). Gegenwärtig werden zwei weitere CIA-Komponenten (Cia2p und Met18p) untersucht, die ähnlich dem Cia1p erst nach der Assemblierung eines Fe/S Clusters auf Nbp35p und Nar1p benötigt werden (J. Mascarenhas, persönliche Mitteilung). Durch die Identifizierung diverser CIA-Komponenten stellte sich heraus, dass sich die CIA-Maschinerie aus zwei funktionellen Proteingruppen zusammensetzt, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen benötigt werden. Den früh in der Biogenese genutzten Proteinen Nbp35p, Cfd1p und Nar1p sowie den erst später notwendigen Proteinen Cia1p, Cia2p und Met18p (Balk *et al.*, 2005, J. Mascarenhas, persönliche Mitteilung), (Abb. 26).

Auf der Basis der hier vorgestellten Daten ist es möglich, dass die Fe/S Cluster Bindung an Nbp35p und Nar1p einen transienten Charakter besitzt und diese Proteine eine Art Gerüstfunktion („scaffold“) übernehmen. Die neu-synthetisierten Fe/S Cluster könnten anschließend mit Hilfe von Cia1p und weiteren Proteinen in Apoproteine eingebaut werden (Balk *et al.*, 2005). Diese Hypothese wird u.a. durch *in vivo* Experimente unterstützt, die zeigen, dass die Fe/S Cluster Bindung an Nbp35p im Vergleich mit Leu1p, weitaus weniger stabil ist (P. Smith, persönliche Mitteilung). Dieses Modell setzt eine Proteininteraktion von Nbp35p und Nar1p mit Cia1p voraus. In der Tat konnte eine Interaktion zwischen Cia1p und Nar1p, nicht aber mit Nbp35p nachgewiesen werden (Balk *et al.*, 2005). Weitere Untersuchungen zu diesem mechanistischen Problem und allgemein zur Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen werden gegenwärtig durchgeführt. Es wird nötig sein, ein *in vitro* System zu etablieren, das die Rekonstitution eines cytosolischen Fe/S Proteins mit definierten Komponenten erlaubt.

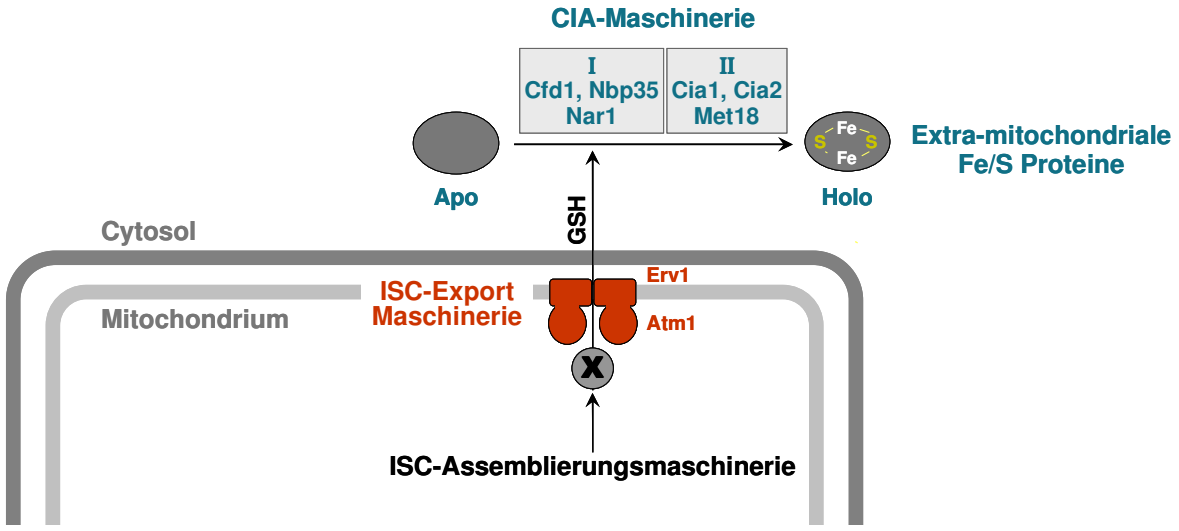

Abb. 26: Modell zur Biogenese extra-mitochondrialer Fe/S Proteine. Die im Mitochondrium lokalisierte ISC-Assemblierungsmaschinerie synthetisiert eine bislang unbekannte Komponente X, die im Cytosol zur Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen benötigt wird. Der Transport von X erfolgt über den ABC-Transporter Atm1p. Da die ATPase Aktivität von Atm1p durch freie Sulfhydrylgruppen stimuliert wird, könnte Atm1p eine Schwefel-haltige Komponente ins Cytosol exportieren. Eine im Cytosol lokalisierte CIA-Maschinerie setzt sich aus zwei unterschiedlichen Proteingruppen zusammen: (I) Cfd1p, Nbp35p und Nar1p sowie (II) Cia1p, Cia2p und Met18p. Zunächst werden Fe/S Cluster (unabhängig von Proteingruppe II) auf Nbp35p und Nar1p assembliert. Möglicherweise binden diese Fe/S Cluster nur transient an Nbp35p und Nar1p. Nbp35p und Nar1p könnten als Gerüst dienen, an dem die neuen Fe/S Cluster zusammengesetzt werden. Mit Hilfe von Cia1p und weiterer Komponenten könnten die Fe/S Cluster in extra-mitochondriale Apoproteine, wie z.B. Leu1p, eingebaut werden.

Unter physiologischen Bedingungen werden Nbp35p, Cfd1p und Nar1p nur in geringen Mengen synthetisiert (Balk *et al.*, 2004). Im Unterschied dazu wird *CIA1* in wesentlich höheren Mengen exprimiert und das kodierte Protein ist vorwiegend im Zellkern lokalisiert (Balk *et al.*, 2005). Daher ist es möglich, dass Cia1p und die gegenwärtig untersuchten Proteine Cia2p und Met18p noch eine zusätzliche Funktion im Zellkern ausüben. Auf Grund der hier gezeigten Daten wird deutlich, dass die Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen durch ein komplexes System vermittelt wird, in dem mindestens zwei funktionell zu unterscheidende Gruppen von Proteinen beteiligt sind.

Nbp35p, Cfd1p, Nar1p und Cia1p werden sowohl zur Reifung cytosolischer als auch nukleärer Fe/S Proteine benötigt (Balk *et al.*, 2004; Balk *et al.*, 2005; Hausmann *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2003, D. Aguilar-Netz, persönliche Mitteilung). Demzufolge werden alle extra-mitochondrialen Fe/S Proteine von derselben Maschinerie synthetisiert. Nbp35p, Cfd1p, Nar1p und Cia1p übernehmen dabei eine entscheidende Rolle in der Reifung dieser Fe/S Proteine (Balk *et al.*, 2004; Balk *et al.*, 2005; Hausmann *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2003, D. Aguilar-Netz, persönliche Mitteilung). Die Proteine existieren in allen bislang sequenzierten Eukaryoten

(Säuger, Pflanzen, Pilzen, Parasiten) und werden in moderaten Mengen im Cytosol und Kern exprimiert. In *S. cerevisiae* geht bereits die Depletion dieser Proteine mit einem deutlichen Wachstumsdefekt einher. Nbp35p, Cfd1p Nar1p und Cia1p sind spezifisch an der Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen beteiligt. Überraschenderweise führt ein Mangel an Nbp35p, Cfd1p, Nar1p und Cia1p nicht zu einer zusätzlichen Akkumulation von Eisen in den Mitochondrien und zur Induktion des Eisen-Regulons, wie im Falle von mitochondrialen *ISC* Mutanten (Balk *et al.*, 2004; Balk *et al.*, 2005; Hausmann *et al.*, 2005; Rutherford *et al.*, 2005). Der zuvor beschriebene Phänotyp bei Depletion der bislang identifizierten CIA-Komponenten lässt sich zur Identifizierung neuer Komponenten in der Biogenese extra-mitochondrialer Fe/S Proteine verwenden.

Die Reifung von Nbp35p und Nar1p hängt, wie auch für andere extra-mitochondriale Fe/S Proteine beschrieben, von den Komponenten der beiden mitochondrialen ISC-Maschinerien ab (Balk *et al.*, 2004; Hausmann *et al.*, 2005). Vermutlich ist die ISC-Assemblierungsmaschinerie direkt oder mit Hilfe eines mitochondrialen Fe/S Proteins an der Synthese einer noch unbekannten Komponente (X in Abb. 26) beteiligt, die im Cytosol zur Biogenese von extra-mitochondrialen Fe/S Proteinen benötigt wird. Anschließend erfolgt der Transport dieser Komponente X mit Hilfe der ISC-Exportmaschinerie. Die Translokation dieser Komponente X ins Cytosol erfolgt über den in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten ABC-Transporter Atm1p, der einen zentralen Teil der ISC-Exportmaschinerie darstellt. Die ATPase Aktivität von ABC-Transportern wird generell durch ihr natürliches Substrat stimuliert. Diese Eigenschaft wurde ausgenutzt, um die Natur des von Atm1p transportierten Substrats zu definieren. Für den ABC-Transporter Atm1p konnte gezeigt werden, dass die ATPase Aktivität durch freie Sulfhydrylgruppen stimuliert wird, insbesondere wenn diese Teile von Peptiden waren, was auf den Transport einer Schwefel-haltigen Komponente aus dem Mitochondrium hindeutet, die für die Biosynthese cytosolischer Fe/S Proteine benötigt wird (Kuhnke *et al.*, 2006). Die transportierte Komponente X könnte einerseits Proteine der CIA-Maschinerie aktivieren oder aber direkt zur Reifung der Fe/S Proteine verwendet werden.

6.1.4. Die Biogenese nukleärer Fe/S Proteine

Die Reifung nukleärer Fe/S Proteine ist bislang ein wenig charakterisierter Prozess. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die Komponenten der CIA-Maschinerie zur Reifung nukleärer Fe/S Proteine benötigt werden (Balk *et al.*, 2004;

Balk *et al.*, 2005; Hausmann *et al.*, 2005). Allerdings bleibt hier die Frage offen, in welchem zellulären Kompartiment die Insertion der Fe/S Cluster in die jeweiligen Apoproteine erfolgt. Zwei Modelle werden vorgeschlagen (Abb. 27): A) Die Fe/S Cluster Insertion in die jeweiligen nukleären Apoproteine erfolgt im Cytosol. Anschließend werden die Holoproteine in den Zellkern transportiert. B) Die nukleären Apoproteine werden direkt in den Zellkern transportiert und erhalten erst dort ihre Fe/S Cluster. Dies erfolgt möglicherweise durch die dort in geringen Konzentrationen vorhandenen Proteine der CIA-Maschinerie. Allerdings könnten diese Proteine im Zellkern noch eine zusätzliche Funktion besitzen, wie schon für die ISC-Komponente Nfs1p beschrieben. In den Mitochondrien lokalisiertes Nfs1p besitzt eine Funktion in der Fe/S Cluster Biogenese, während kernlokalisiertes Nfs1p eine weitere essentielle Funktion ausübt, z.B. in der Biogenese eines Thiouridins zur Modifikation von cytosolischen und mitochondrialen tRNAs (Kispal *et al.*, 1999; Mühlenhoff *et al.*, 2004; Nakai *et al.*, 2001; Nakai *et al.*, 2004). Es werden weitere Untersuchungen nötig sein, um die genaue Funktion der CIA-Komponenten im Zellkern zu bestimmen und den molekularen Mechanismus der Reifung von nukleären Fe/S Proteinen zu klären.

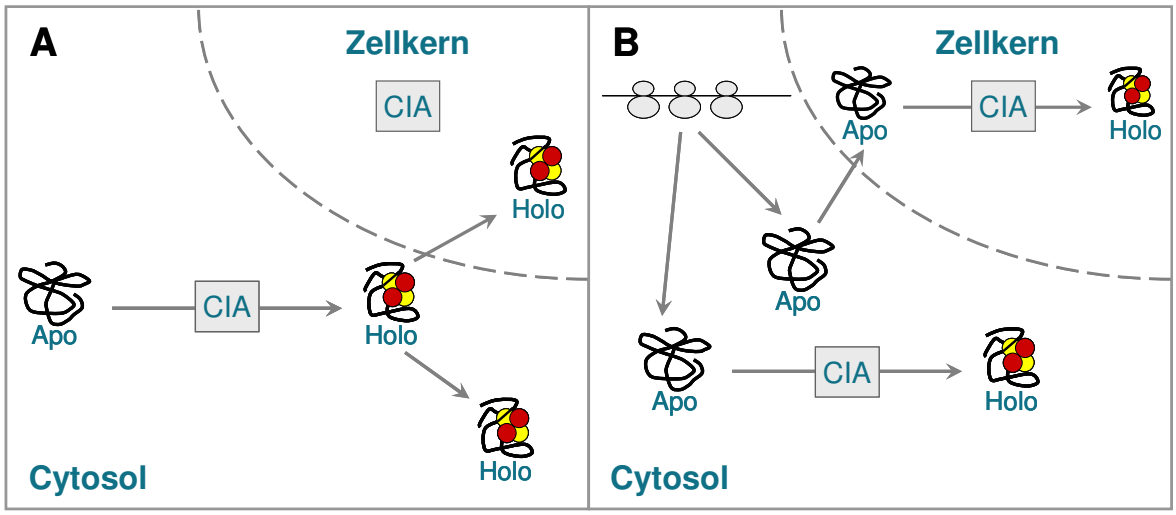

Abb. 27: Zwei mögliche Modelle zur Assemblierung nukleärer Fe/S Proteine. A) Durch eine im Cytosol lokalisierte CIA-Maschinerie erfolgt die Reifung cytosolischer und nukleärer Fe/S Proteine. Die nukleären Fe/S Holoproteine werden anschließend in den Zellkern transportiert. Die im Zellkern lokalisierte geringe Menge an CIA-Komponenten könnte demnach an der Reparatur der Fe/S Proteine beteiligt sein oder eine gänzlich andere Funktion ausüben. **B)** Die nukleären Fe/S Proteine werden in der Apoform in den Zellkern transportiert. Dort ermöglicht die nukleäre CIA-Maschinerie die Insertion der Fe/S Cluster in die nukleären Apoproteine. Die im Cytosol lokalisierte CIA-Maschinerie ist spezifisch an der Reifung cytosolischer Fe/S Proteine beteiligt.

In Säugerzellen wurden einige der ISC-Komponenten in geringen Mengen auch im Cytosol und Zellkern detektiert (Land & Rouault, 1998; Tong & Rouault, 2000; Tong

et al., 2003). Daher wurde angenommen, dass es eine cytosolische Kopie der ISC-Assemblierungsmaschinerie gibt, die bei der Zusammensetzung extra-mitochondrialer Fe/S Proteine eine Funktion ausübt. Bisher konnte allerdings nicht gezeigt werden, dass diese Proteine im Cytosol auch funktionell sind. Im Gegenteil, es konnte sowohl für das humane Isu1p als auch für das humane Nfs1p gezeigt werden, dass nur mitochondrial lokalisierte Proteine eine Funktion in der *de novo* Biogenese cytosolischer Fe/S Proteine ausüben (Biederbick *et al.*, 2006; Tong & Rouault, 2006). Für *S. cerevisiae* war eine solche Duplikation der Funktion der ISC-Assemblierungsmaschinerie im Cytosol schon früher ausgeschlossen worden. Es zeigte sich, dass ein Funktionsverlust von Isu1p und Isu2p nur dann durch bakterielle oder humane Isu Homologe komplementiert werden konnte, wenn diese ins Mitochondrium dirigiert wurden (Gerber *et al.*, 2004). Desgleichen erfordert die Assemblierung eines Fe/S Clusters auf den Isu Proteinen eine mitochondriale Lokalisierung. Zum anderen übernimmt cytosolisch lokalisiertes Nfs1p keine Funktion in der Reifung cytosolischer Fe/S Proteine (Kispal *et al.*, 1999). Folglich ist es unwahrscheinlich, dass die ISC-Komponenten auch außerhalb der Mitochondrien eine Funktion in der Biogenese von Fe/S Clustern ausüben (Gerber *et al.*, 2004). Stattdessen scheinen die CIA-Komponenten eine im Cytosol lokalisierte Maschinerie zu repräsentieren, die zur Reifung extra-mitochondrialer Fe/S Proteine essentiell notwendig ist.

6.1.5. Die Biogenese cytosolischer Fe/S Proteine als essentielle Funktion der Mitochondrien

Die Biogenese von Fe/S Proteinen ist die bislang einzige Funktion der Mitochondrien, die den essentiellen Charakter dieser Organellen erklärt. Dies lässt sich besonders gut am Modellorganismus *S. cerevisiae* erkennen, bei dem ungefähr die Hälfte der ISC-Komponenten unverzichtbar für die Lebensfähigkeit dieser Hefe sind. Dazu gehören die Cystein-Desulfurase Nfs1p, das mit Nfs1p interagierende Isd11p, das Ferredoxin Yah1p, die NADH-abhängige Ferredoxin-Reduktase Arh1p, das Chaperon Jac1p und die Sulfhydryl-Oxidase Erv1p (Lill *et al.*, 1999). Die simultane Deletion der *ISU* Gene ist ebenfalls letal (Garland *et al.*, 1999; Schilke *et al.*, 1999). Demgegenüber kann die Hefe auf so bedeutende Reaktionswege wie den Zitronensäurezyklus und die oxidative Phosphorylierung verzichten. Hefe als fakultativer Anaerobier kann seine Energie vollständig aus der Glykolyse mit anschließender Alkoholgärung beziehen. Selbst Säugerembryonen können die

ersten acht bis zehn Tage ohne eine funktionelle oxidative Phosphorylierung, nicht aber ohne intakte Fe/S Protein-Biogenese überleben (Larsson *et al.*, 1998; Pondarre *et al.*, 2006). Scheinbar wird bei höheren Eukaryoten erst relativ spät in ihrer Embryonalentwicklung die Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung essentiell. Eukaryoten sind jedoch frühzeitig von einer funktionellen Fe/S Protein-Biogenese abhängig. Im Mitochondrium selbst wurde bislang kein essentielles Fe/S Protein identifiziert, abgesehen von Yah1p. Dieses Protein ist allerdings an seiner eigenen Biogenese beteiligt und erklärt damit nicht, warum Mitochondrien essentiell sind.

Die vorwiegend im Cytosol lokalisierten Fe/S Proteine Nbp35p und Nar1p werden ebenfalls zum Überleben der Zelle benötigt und könnten daher den essentiellen Charakter der Mitochondrien erklären (Balk *et al.*, 2004; Hausmann *et al.*, 2005). Allerdings werden auch diese Komponenten für ihre eigene Biogenese benötigt und geben daher keine befriedigende Erklärung für den essentiellen Charakter dieser Organellen bzw. der Fe/S Cluster Biogenese ab. Schon vor längerem wurde im Cytosol das lebensnotwendige Fe/S Protein Rli1p lokalisiert, dessen Reifung von den beiden mitochondrialen ISC-Maschinerien und der cytosolischen CIA-Maschinerie abhängt (Balk *et al.*, 2004; Balk *et al.*, 2005; Hausmann *et al.*, 2005). Kürzlich wurde gezeigt, dass Rli1p eine Funktion in der Ribosomen-Biogenese und am Export der ribosomalen Untereinheiten ins Cytosol besitzt. Der N-terminale Fe/S Cluster ist für die Funktion des Proteins unverzichtbar (Kispal *et al.*, 2005; Yarunin *et al.*, 2005). Damit ist die Rolle des Fe/S Proteins Rli1p bei der Ribosomen-Biogenese die erste bekannte Funktion, die Mitochondrien in einer Hefezelle unverzichtbar macht. Bei einem Defekt in der Biogenese von Rli1p kommt es zu einer Akkumulation von ribosomalen Untereinheiten im Kern. Auch die Depletion der CIA-Komponenten Cfd1p, Nbp35p, Nar1p und Cia1p bewirken diesen Phänotyp. Allerdings sind diese Auswirkungen höchstwahrscheinlich sekundäre Folgen und auf den Funktionsverlust von Rli1p zurückzuführen (Kispal *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse demonstrieren eindrucksvoll eine Verbindung von zwei zentralen zellulären Prozessen, nämlich der Fe/S Cluster- und der Ribosomen-Biogenese. Rli1p gehört zu den am stärksten konservierten Proteinen in der Evolution. Homologe Proteine existieren in Eukaryoten und Archaea, nicht aber in Eubakterien.

6.2. Transkriptom-Analysen in *Saccharomyces cerevisiae*

6.2.1. Die Regulation der Eisenhomeostase wird nicht durch ein cytosolisches Fe/S Protein vermittelt

In *S. cerevisiae* erfolgt die Regulation der Eisenaufnahme durch die beiden Eisen-abhängigen Transkriptionsfaktoren Aft1p und Aft2p. In Eisen-angereicherten Zellen befindet sich Aft1p im Cytosol, bei einem Eisenmangel hingegen wandert Aft1p in den Zellkern und aktiviert die Gene des Eisen-Regulons (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002). Auch Funktionsverluste der beiden mitochondrialen ISC-Maschinerien bewirken die Induktion des Eisen-Regulons und zusätzlich eine drastische Erhöhung der mitochondrialen Eisenmenge (Kispal *et al.*, 1997; Rutherford *et al.*, 2005). Die beschriebene Anreicherung von Eisen in den Mitochondrien geht nicht wie angenommen auf Kosten der cytosolischen Eisenmenge (Chen *et al.*, 2004). Offensichtlich verursachen Defekte der Fe/S Protein-Biogenese die Induktion des Eisen-Regulons unabhängig von der cytosolischen Eisenmenge.

Diese Befunde weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Biogenese von Fe/S Proteinen, der Eisenaufnahme (Eisen-Regulon) und der Eisenhomeostase hin. Da die ISC-Exportmaschinerie gegenüber der ISC-Assemblierungsmaschinerie spezifisch an der Reifung cytosolischer Fe/S Proteine beteiligt ist, wurde anfangs angenommen, dass die Detektion der mitochondrialen Eisenmenge über ein cytosolisches Fe/S Protein vermittelt wird. Ähnlich dem IRP1 System in höheren Eukaryoten (Hentze *et al.*, 2004) könnte das Verhältnis der Apo- zur Holoform dieses Fe/S Proteins die Eisenaufnahme und die adequate Verteilung des Eisens zwischen Mitochondrium und Cytosol gewährleisten.

Eine defekte Biogenese cytosolischer Fe/S Proteine in Folge einer Depletion von CIA-Komponenten kann weder die Induktion des Eisen-Regulons noch die Akkumulation von Eisen in den Mitochondrien auslösen. So konnte in Nbp35p-depletierten Zellen und in anderen CIA-Mutanten wie *NAR1* und *CIA1* keine zusätzliche Eisenanreicherung in den Mitochondrien nachgewiesen werden (Balk *et al.*, 2004; Balk *et al.*, 2005; Hausmann *et al.*, 2005). Eine andere Arbeitsgruppe konnte zusätzlich zeigen, dass die Induktion des Eisen-Regulons in Nbp35p-, Cfd1p- und Nar1p-depletierten Zellen unterbleibt (Rutherford *et al.*, 2005). Diesbezüglich unterscheidet sich die CIA- von der ISC-Exportmaschinerie. Folglich wird die zelluläre Eisenmenge nicht durch ein cytosolisches Fe/S Protein reguliert.

Zum besseren Verständnis der funktionellen Bedeutung der CIA-Maschinerie wurden Nbp35p-depletierte Zellen mit DNA-Microarrays analysiert. In der Tat zeigte das Transkriptionsprofil Nbp35p-depletierter Zellen keine Verbindung zu Genen, deren Produkte in der Eisenhomeostase eine Funktion ausüben. Es wurden überraschend wenig Gene differentiell exprimiert, obwohl *NBP35* essentiell ist. Vorläufige Microarray-Analysen, bei denen die CIA-Komponenten Cia1p und Nar1p depletiert wurden, zeigten ähnliche Ergebnisse (J. Mascarenhas, persönliche Mitteilung). Aus den Transkriptionsprofilen von CIA Protein-depletierten Zellen kann man schließen, dass Defekte in der Funktion der CIA-Maschinerie grundsätzlich keinen Phänotyp verursachen, der auf eine Beteiligung in der Eisenhomeostase hindeutet. Mit großer Wahrscheinlichkeit beschränkt sich die Funktion der CIA-Maschinerie auf die Reifung extra-mitochondrialer Fe/S Proteine.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen mit Daten der Literatur verdeutlichen, dass allein der Status der beiden mitochondrialen ISC-Maschinerien, nicht aber der Status der CIA-Maschinerie, die Eisenhomeostase in *S. cerevisiae* beeinflusst (Rutherford *et al.*, 2005). Ein Funktionsverlust der beiden mitochondrialen ISC-Maschinerien durch regulierte Genexpression bewirkt eine durch Aft1p/Aft2p vermittelte Induktion der Gene des Eisen-Regulons (Abb. 28). Offensichtlich verhält sich der Transkriptionsfaktor Aft1p in ISC-depletierten Zellen wie bei einem Eisenmangel. Nach dem derzeitigen Wissensstand könnte die ISC-Assemblierungsmaschinerie neben ihrer Funktion in der Biogenese zellulärer Fe/S Proteine zusätzlich an der Synthese einer Komponente Y beteiligt sein, welche Aft1p den Eisenstatus der Mitochondrien anzeigt. Ein Mangel an dieser Komponente im Cytosol würde demnach einem Eisenmangel gleichkommen. Der ähnliche Phänotyp von ISC-Assemblierungs- und Exportmutanten erklärt sich aus der Tatsache, dass die ISC-Exportkomponenten an der Translokation der Komponente Y ins Cytosol beteiligt sind. Es ist bislang unklar, ob die aus den Mitochondrien exportierte Komponente Y mit derjenigen identisch ist, die zur Fe/S Protein-Biogenese im Cytosol benötigt wird (X in Abb. 26).

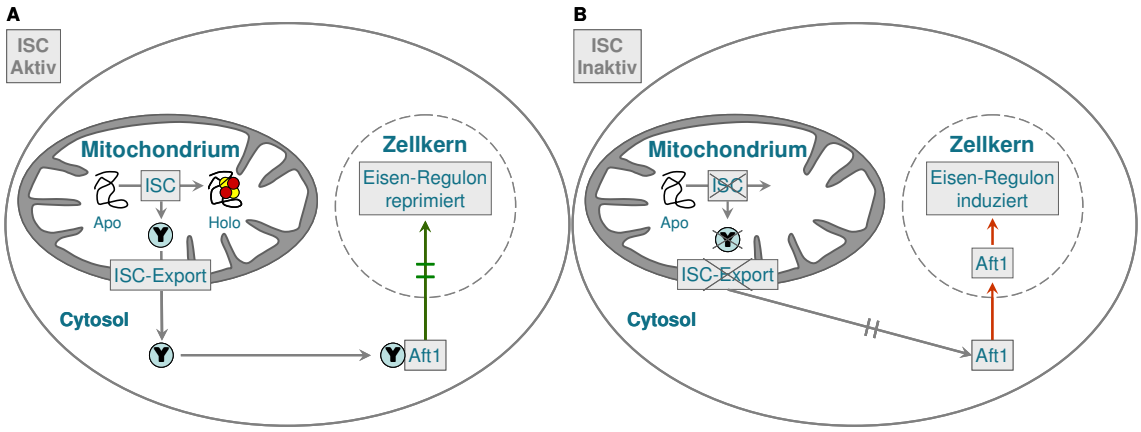

Abb. 28: Modell zur Regulation der zellulären Eisenhomeostase in *S. cerevisiae.* A) Die ISC-Assemblierungsmaschinerie assembliert und inseriert Fe/S Custer in mitochondriale Apoproteine. Zusätzlich synthetisiert sie eine noch unbekannte Komponente Y, die über die ISC-Exportmaschinerie ins Cytosol transportiert wird. Diese verhindert direkt oder indirekt, dass Aft1p in den Zellkern translociert. Bei einer intakten mitochondrialen Fe/S Protein-Biogenese und in Eisen-angereicherten Zellen befindet sich Aft1p grundsätzlich im Cytosol. **B)** Kommt es zu einem Defekt in der mitochondrialen Fe/S Protein-Biogenese oder der ISC-Exportmaschinerie, können keine Fe/S Proteine mehr assembliert werden. Gleichzeitig wird die Synthese der Komponente Y eingestellt. Dies signalisiert dem im Cytosol lokalisierten Transkriptionsfaktor Aft1p einen Eisenmangel, worauf dieser in den Zellkern translociert und die Gene des Eisen-Regulons induziert. Möglicherweise wird dieselbe Komponente von der CIA-Maschinerie zur Reifung extra-mitochondrialer Fe/S Proteine verwendet (X in Abb. 26).

6.2.2. ISC Mutanten besitzen ein charakteristisches Expressionsmuster

Sowohl die Microarray- als auch Promotoranalysen von Yah1p- und Atm1p-depletierten Zellen zeigten gegenüber Nbp35p-depletierten Zellen ein ähnlich starkes und größtenteils übereinstimmendes Transkriptionsprofil. Entsprechend früherer Arbeiten wurden erwartungsgemäß sowohl in Atm1p- als auch in Yah1p-depletierten Zellen zahlreiche Gene des Eisen-Regulons induziert (Rutherford *et al.*, 2005). Demgegenüber wurden Gene, deren Produkte Komponenten der Atmungskette sind, reprimiert. Parallel dazu erfolgte eine Induktion solcher Gene, die eine Funktion in der Glukose-Aufnahme besitzen. Darüber hinaus wurden verschiedene Gene welche, für Proteine des Zitronensäurezyklus, der Biotin-Synthese bzw. Aufnahme und der Ergosterol-Biosynthese kodieren differentiell reguliert. Auffällig viele Gene, die für Proteine mit Fe/S- (z.B. *LEU1*, *GLT1*) oder Häm-Cofaktoren (z.B. *YHB1*, *CTT1*, Gene der Atmungskette) kodieren, wurden reprimiert. Zusätzlich zeigten die Transkriptionsprofile von Yah1p- und Atm1p-depletierten Zellen eine beachtliche Übereinstimmung mit denen von Grx5p- und Nfs1p-depletierten Zellen, zwei weiteren ISC-Komponenten. Die Kongruenz zu den *GRX5* und *NFS1* Profilen legt nahe, dass dieses Transkriptionsverhalten bei Störungen in der Funktion der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerien charakteristisch ist (Belli *et al.*, 2004).

Dieser Befund wurde weiter gestützt durch Promotorstudien an Ssq1p-depletierten Zellen.

6.2.3. Der Status der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie ist zentral an der Regulation der zellulären Eisenhomeostase beteiligt

Insgesamt zeigen die Transkriptionsprofile von Yah1p- und Atm1p-depletierten Zellen eine beachtliche Übereinstimmung mit denen von Zellen, die unter Eisenmangel kultiviert wurden (Lan *et al.*, 2004; Puig *et al.*, 2005; Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004). Wie bereits oben erwähnt induziert *S. cerevisiae*, bei einem Eisenmangel und in diversen *ISC* Mutanten, die unter Aft1p Kontrolle stehenden Gene des Eisen-Regulons. Zu diesen Aft1p-abhängigen Genen zählen u.a. solche, deren Produkte an der Biotin-Synthese und Aufnahme beteiligt sind (Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004). Bei einem Eisenmangel und in Yah1p- und Atm1p-depletierten Zellen werden die für Produkte der Biotin-Aufnahme kodierenden Gene induziert, während die Gene welche für Produkte der Biotin-Synthese kodieren reprimiert werden. Dies ist sinnvoll, da an der Biotin-Synthese das Fe/S Protein Bio2p beteiligt ist, welches bei einem Eisenmangel und in *ISC* Mutanten als Folge einer eingeschränkten Fe/S Cluster Biogenese seine Funktion verliert. Durch diesen reziproken Regulationsmechanismus soll sichergestellt werden, dass der Zelle genügend Biotin zur Verfügung steht. Dieses ist ein wichtiger Cofaktor von Enzymen wie beispielsweise der Pyruvat-Carboxylase oder Acetyl-CoA-Carboxylase.

Durch die Induktion eines Gens, dessen Produkt eine putative Häm-Oxygenase ist, kann zusätzlich zur Eisenaufnahme über die Plasmamembran Eisen aus Häm freigesetzt werden (Protchenko & Philpott, 2003). Dieses Eisen könnte erneut essentiellen Eisen-abhängigen Prozessen zur Verfügung gestellt werden.

Die weitgehende Übereinstimmung der Transkriptionsprofile ISC-depletierter Zellen mit denen von Zellen unter Eisenmangel bestätigt eine Beteiligung der beiden ISC-Maschinerien an der Regulation der zellulären Eisenhomeostase. Defekte in der Funktion der mitochondrialen ISC-Maschinerien lösen demnach zumindest einen Großteil der transkriptionellen Antwort von Hefe auf einen Eisenmangel aus.

Dies bedeutet, dass der Status der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerien maßgeblich an der Regulation der zellulären Eisenhomeostase auf Transkriptionsebene beteiligt ist. Die beiden mitochondrialen ISC-Maschinerien

sind demnach nicht nur an der Biogenese von Fe/S Proteinen und der Aktivierung von Aft1p beteiligt, sondern zusätzlich an der Regulation zahlreicher Gene, deren Produkte Eisen benötigen wie z.B. die Komponenten der Atmungskette und Häm-haltige Proteine, im Folgenden als ISC-abhängige Gene zusammengefasst (Abb. 29).

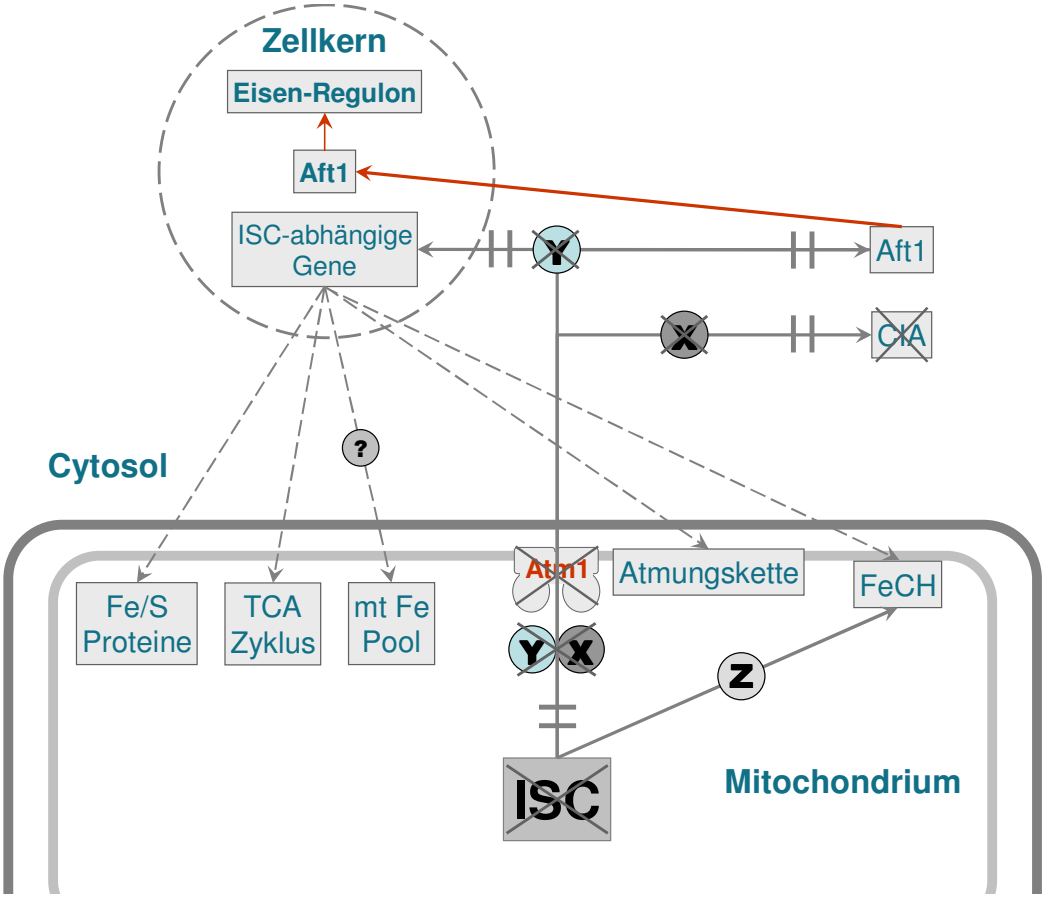

Abb. 29: Zelluläre Effekte bei Störungen in der Funktion der ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie. Störungen in der Funktion der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerien verursachen: (1) einen Ausfall der CIA-Maschinerie, (2) die Translokation (Aktivierung) des Transkriptionsfaktors Aft1p in den Zellkern (roter Pfeil), (3) eine differentielle Expression ISC-abhängiger Gene (graue unterbrochene Pfeile) und (4) die Akkumulation einer Komponente Z, welche die Ferrochelatase reversibel hemmt. Der Transkriptionsfaktor Aft1p induziert die Gene des Eisen-Regulons, deren Produkte der Eisenaufnahme über die Plasmamembran sowie der Mobilisierung von Eisen aus intrazellulären Speichern (Vakuole) dienen. Das durch Defekte in der ISC-Maschinerie hervorgerufene Transkriptionsmuster entspricht im Wesentlichen dem einer Eisen-depletierten Hefezelle. Atm1p repräsentiert in diesem Modell die ISC-Exportmaschinerie. Es ist bislang unbekannt, welche Proteine zur beobachteten Eisenakkumulation in den Mitochondrien (mt Fe-Pool) beitragen und ob die Komponenten X und Y identisch sind.

Somit könnte die aus den Mitochondrien stammende Komponente Y außerdem als Indikator dienen, der den Status Eisen-verbrauchender Reaktionswege in der Zelle anzeigt. Diese Prozesse könnten über die Konzentration dieser Komponente im Cytosol detektiert werden. Y könnte entsprechend seiner Konzentration die Genexpression im Zellkern beeinflussen. Dadurch wäre es möglich, ein

Gleichgewicht zwischen dem intrazellulären Eisenbedarf und der Eisenaufnahme über die Plasmamembran zu schaffen. Die Herkunft der Komponente Y aus den Mitochondrien erscheint sinnvoll, da zelluläres Eisen hauptsächlich in diesen Organellen zur Synthese von Fe/S Clustern und Häm benötigt wird.

6.2.4. Mechanismen der Genregulation in Yah1p- und Atm1p-depletierten Zellen

Neben der Induktion von Genen des Eisen-Regulons wurden in Yah1p- und Atm1p-depletierten Zellen zahlreiche ISC-abhängige Gene reprimiert. Wie bereits erwähnt, handelt es sich u.a. um Gene, deren Produkte Komponenten der Atmungskette sind. Bislang gibt es keinen Hinweis darauf, dass die Transkriptionsfaktoren Aft1p/Aft2p neben der Induktion des Eisen-Regulons auch direkt an der Regulation dieser Gene beteiligt sind. Es ist allerdings möglich, dass diese Isc-abhängigen Gene indirekt durch die Produkte Aft1p/Aft2p-abhängiger Gene beeinflusst werden.

Das Eisen-Regulon beinhaltet beispielsweise ein Gen, dessen Produkt das RNA-bindende Protein Cth2p ist (Puig *et al.*, 2005). Dieses kann an 5´-UUAUUUAUU-3´-Nonamere im 3´-nicht-translatierten Bereich bestimmter mRNAs binden und bewirkt dadurch einen vorzeitigen Abbau. Die Produkte dieser mRNAs nehmen an verschiedenen Eisen-abhängigen Prozessen teil, beispielsweise am Zitronensäurezyklus, der Häm-Biosynthese oder der Respiration. Ein mögliches Ziel des Transkriptabbaus könnte die Anpassung des zellulären Stoffwechsels an einen Eisenmangel sein. Da das Transkriptionsprofil einer *CTH2*-deletierten Zelle gegenüber Wildtypzellen moderat verändert ist, kann die gehäufte Reprimierung von Genen, die für Produkte der Atmungskette kodieren, nur teilweise auf die Wirkung von Cth2p zurückgeführt werden (Puig *et al.*, 2005). Demnach scheinen zusätzliche Faktoren an der Regulation dieser Gene beteiligt zu sein. Die Expression von Genen, die für Produkte der Atmungskette kodieren, werden durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst, wie z.B. der Kohlenstoffquelle im Medium, dem Sauerstoffangebot und durch den zellulären Häm-Gehalt. Zusätzlich wurde gezeigt, dass auch ein respiratorischer Defekt unabhängig von der Ursache die Reprimierung von Genen der Atmungskette bewirkt. Daher ist es schwierig abzuleiten, wodurch diese Gene bei einem Eisenmangel bzw. bei einem Defekt der ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerien reprimiert werden. Eisen als Bestandteil von Fe/S Clustern und Häm findet sich gehäuft in Enzymen der Atmungskette. Die Reprimierung dieser

Gene bei einem Eisenmangel dient vermutlich der Adaption an den aktuellen intrazellulären Status und der Eisenkonservierung.

Ferner wurde postuliert, dass Defekte in der Fe/S Cluster Biogenese mit oxidativem Stress einhergehen (Belli *et al.*, 2004; Rodriguez-Manzaneque *et al.*, 2002). Diese Feststellung kann durch die hier präsentierten Daten nicht bestätigt werden. Die Transkriptionsprofile der beiden mitochondrialen *ISC* Mutanten weisen lediglich eine geringe Übereinstimmung mit Zellen auf, die unter oxidativem Stress leiden. Reaktive Sauerstoffspezies reichern sich normalerweise unter aeroben Wachstumsbedingungen an. Da die respiratorische Kompetenz in Atm1p- (in Minimalmedium) und Yah1p-depletierten Zellen eingeschränkt zu sein scheint, werden vermutlich nur wenig Gene exprimiert, deren Produkte der oxidativen Stressbeseitigung dienen.

Fermentierende Zellen zeigen eine ähnliche Reprimierung von Genen der Atmungskette, da diese unter fermentierenden Bedingungen nicht benötigt werden (Gancedo, 1998; Schüller, 2003). Die gehäufte Induktion von Genen, deren Produkte in der Glukose-Aufnahme und der Fermentation eine Funktion ausüben, deutet auf einen Wechsel zur Fermentation hin. In Hefe sorgt der Hap2-5p Komplex für ein optimales Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Schüller, 2003). Daher könnte man vermuten, dass dieser Komplex und ihn regulierende Faktoren eine wichtige Funktion in der Reprimierung von Genen der Atmungskette bei *ISC* Mutanten bzw. bei einem Eisenmangel ausüben.

Gene, deren Produkte Komponenten der Atmungskette sind, und solche, die an der oxidativen Stressbeseitigung beteiligt sind, werden durch Sauerstoffmangel reprimiert. Die Erfassung der Sauerstoffkonzentration wird in *S. cerevisiae* über Häm vemittelt, da die letzten zwei Schritte der Porphyrinsynthese molekularen Sauerstoff als Substrat benötigen (Hon *et al.*, 2003). Selbst die Funktionalität der Ferrochelatase scheint sauerstoffabhängig zu sein (Hon *et al.*, 2003). Somit besteht in *S. cerevisiae* eine direkte Verbindung zwischen der intrazellulären Sauerstoffkonzentration und der Funktionalität der Häm-Biosynthese. Zu den Häm-abhängigen Genen zählen beispielsweise *CYC1* (Cytochrom *c* Isoform 1), *CYC7* (Cytochrom *c* Isoform 2), *CYT1* (Cytochrom c_1) sowie *CTT1* (Katalase) und *YHB1* (Flavohämoglobin). Diese werden über den Häm-abhängigen Transkriptionsfaktor Hap1p (heme activator protein 1) in Anwesenheit von Häm induziert und bei einem

Häm-Mangel reprimiert (Kwast *et al.*, 1999; Zhang & Hach, 1999; Zitomer & Lowry, 1992).

Studien zur Hap1p-abhängigen Genregulation und dem Hap2-5p Komplex wurden hauptsächlich am *CYC1* Gen durchgeführt. Analysen der Kontrollregionen (*UAS*) des *CYC1* Gens enthüllten zwei unterschiedliche regulatorische Elemente: *UAS1* und *UAS2* („upstream activating sequence“ 1 bzw. 2), (Guarente & Hoar, 1984). An *UAS1* erfolgt die Bindung des Transkriptionsaktivators Hap1, während *UAS2* eine Bindesequenz des Hap2-5p Komplexes darstellt (Schüller, 2003). Letztere vermittelt die Kohlenstoffquellen-abhängige Genexpression. Zu *UAS2* verwandte Sequenzmotive treten in weiteren kernkodierten Genen auf, deren Produkte eine Funktion in den Mitochondrien besitzen, z.B. in der Cytochrom *c* Oxidase (*COX6*), Cytochrom c_1 (*CYT1*), Ubiquinol-Cytochrom *c* Oxidoreduktase (*QCR8*) und der Citrat-Synthase (*CIT1*) (Schüller, 2003).

Die Funktion des Transkriptionsfaktors Hap1p und somit des Häms bei der Regulation respiratorischer Gene in Abhängigkeit von Eisen oder der beiden ISC-Maschinerien wird kompliziert durch eine Transposon-Insertion im C-Terminus des *HAP1* Gens im verwendeten Hefe-Stamm W303, wodurch Hap1p funktionslos wird. Hap1p würde auch unter den Bedingungen der Atm1p- und Yah1p Depletion induziert. Daher würde man eine Induktion Hap1p-regulierter Gene vermuten. Da das Gegenteil der Fall ist, scheint Hap1p im Stamm W303 tatsächlich keine Rolle in der Eisenregulation zu spielen.

Da Yah1p- und Atm1p-depletierte Zellen kein funktionelles Hap1p Protein synthetisieren, erfolgt die Regulation des *CYC1* Gens möglicherweise hauptsächlich durch den Hap2-5p Komplex. Es lässt sich daher vermuten, dass bei *ISC* Mutanten oder Eisenmangel die Beeinträchtigung des Status der respiratorischen Kompetenz wichtiger sein könnte als der Status von Häm, obwohl sowohl Eisenmangel als auch Defekte der ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie mit einer Häm-Defizienz einhergehen. Dies entspricht der Expression des Eisen-Regulons, das auch unter normalen Bedingungen unabhängig vom zellulären Häm-Spiegel reguliert wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte letztendlich nur darüber spekuliert werden, wodurch die Gene, deren Produkte Komponenten der Atmungskette sind, in *ISC* Mutanten reprimiert werden. Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um die zu Grunde liegenden Regulationsmechanismen zu erklären.

6.2.5. Aktivierung des „retrograde response“ in Yah1p-depletierten Zellen

Eine Fehlfunktion der Mitochondrien kann durch verschiedene Ursachen ausgelöst werden, beispielsweise durch den Verlust mitochondrialer DNA (sog. *rho*^{0} Zellen) oder durch inaktive Enzyme des Zitronensäurezyklus. Diese Fehlfunktionen lösen eine veränderte Genexpression im Zellkern aus, den sog „retrograde response“ (Liu & Butow, 2006). Die transkriptionellen Veränderungen sind ein Versuch der Zelle den zellulären Stoffwechsel an einen in den Mitochondrien aufgetretenen Defekt zu adaptieren (Abb. 30). Der „retrograde response“ beinhaltet hauptsächlich die Aktivierung von Genen, deren Produkte in anaplerotischen Reaktionen eine Rolle spielen. In *rho^0* Zellen wird beispielsweise *CIT2* dramatisch induziert (Liu & Butow, 2006), welches für eine in den Peroxisomen lokalisierte Citrat-Synthase kodiert (Liao *et al.*, 1991). Auch Yah1p-depletierte Zellen induzierten *CIT2*. Die Überproduktion von Cit2p könnte mit dem Ziel verbunden sein einen Substratmangel im Zitronensäurezyklus auszugleichen. Das durch den Glyoxylatzyklus hergestellte Citrat könnte über einen Citrat-Transporter ins Mitochondrium eingeschleust werden. Citrat wird zur Synthese von α-Ketoglutarat benötigt, eine Vorstufe von Glutamat, welches seinerseits für zahlreiche Biosynthesen benötigt wird (z.B. Purine und Aminosäuren). Allerdings ist die Induktion von *CIT2* in Yah1p-depletierten Zellen im Vergleich zu *rho*^{0} Zellen eher moderat. Es wird postuliert, dass der „retrograde response“ durch ein Absinken des Glutamatspiegels induziert wird (Liu & Butow, 2006). Auf Grund der Induktion von *DIP5*, einer „hochaffinen“ Glutamat/Aspartat-Permease, könnte man annehmen, dass auch Yah1p-depletierte Zellen unter einem Glutamatmangel leiden. Yah1p-depletierte Zellen zeigten weitere transkriptionelle Veränderungen, die teilweise mit den Transkriptionsprofilen von *rho*^{0} Zellen übereinstimmten (Epstein *et al.*, 2001). So wurde beispielsweise das *IDH1* Gen, welches für die Isocitrat-Dehydrogenase des Zitronensäurezyklus kodiert, differentiell zu Wildtypzellen exprimiert. Dieses Produkt wird neben der Aconitase und Citrat-Synthase zur Synthese von α-Ketoglutarat im Mitochondrium benötigt. Darüber hinaus induzierten Yah1p-depletierte Zellen *PYC1*, dessen Produkt eine Pyruvat-Carboxylase ist. Diese katalysiert die Synthese von Oxalacetat aus Pyruvat und CO_2 (anaplerotische Reaktion), eine Vorstufe von Aspartat. Da respiratorisch defekte Zellen durch den Zitronensäurezyklus kein Oxalacetat nachliefern können, muss dieses zur Erhaltung des Kreislaufs extern eingeschleust werden (Abb. 30). Sowohl Atm1p- als auch Yah1p-depletierte Zellen induzierten zahlreiche Gene, deren

Produkte Hexose-Transporter sind. Auch der Hexose-Transporter Hxt2p ist mit dem „retrograde response“ assoziiert. Dies könnte bedeuten, dass beide Mutanten unter einem generellen Mangel an Vorstufen für Biosynthesen leiden, die durch einen verlangsamten Fluss durch den Zitronensäurezyklus gehemmt sind. Insgesamt zeigten Yah1p-depletierte Zellen einen eher gemäßigten „retrograde response“. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm W303 ist allerdings grundsätzlich mit einem schwachen „retrograde response“ assoziiert (Kirchman *et al.*, 1999). Dennoch wiesen die Transkriptionsprofile von Yah1p-depletierten einige Übereinstimmungen zu denen von *rho*^{0} Zellen auf. Es ist möglich, dass in Yah1p-depletierten Zellen der „retrograde response“ durch den Aktivitätsverlust des Fe/S Proteins Aconitase ausgelöst wird. Yah1p übernimmt auch eine Funktion in der Häm A Synthese (Barros *et al.*, 2002), einem wichtigen Cofaktor der Cytochrom *c* Oxidase. Daher könnte der „retrograde response“ auch spezifisch durch einen Funktionsverlust dieses Enzyms bedingt sein.

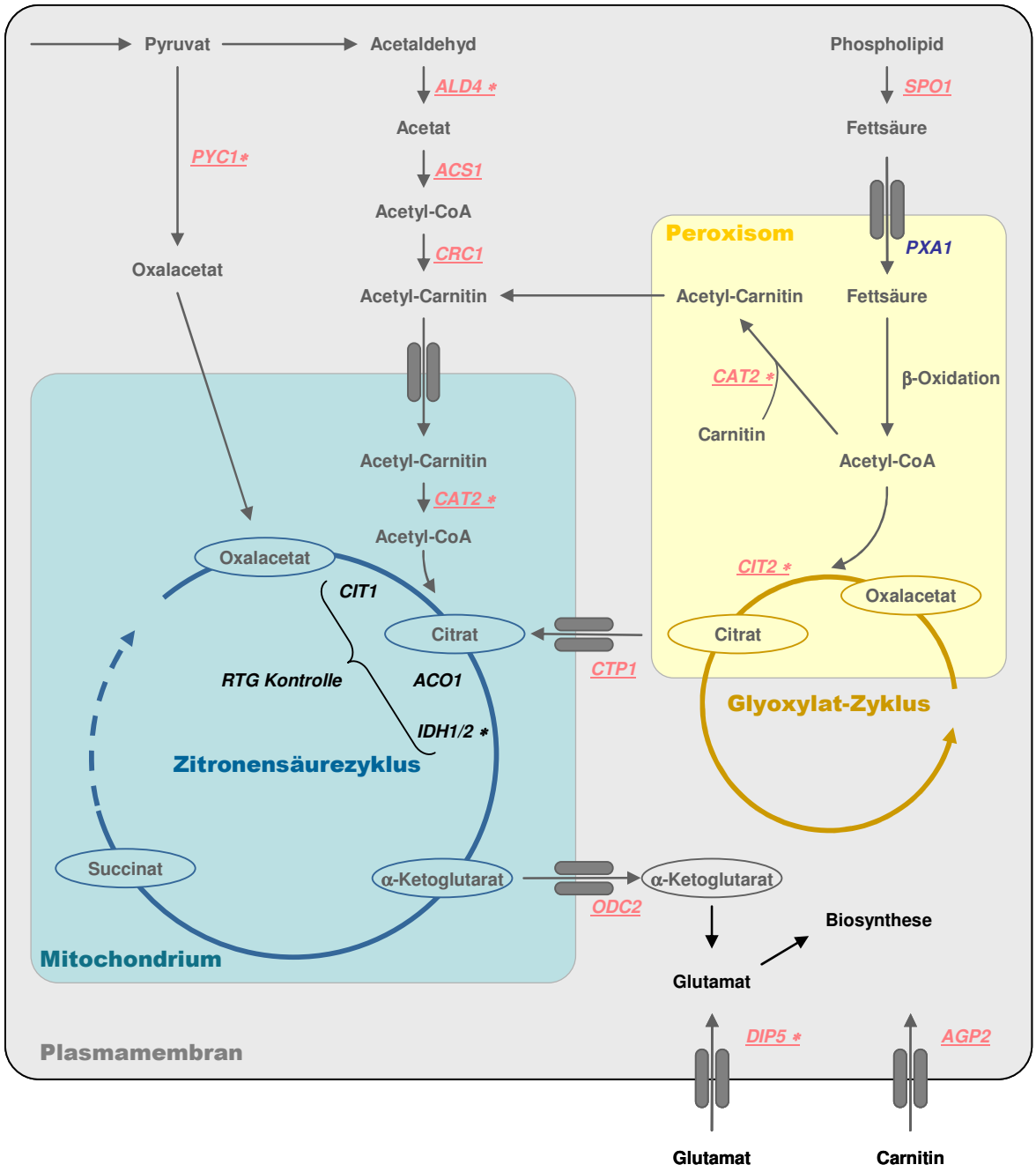

Abb. 30: Stoffwechselveränderungen in Zellen mit einem respiratorischen Defekt. Ein respiratorischer Defekt führt zu diversen Stoffwechselveränderungen, die das Resultat einer veränderten Genexpression im Zellkern sind („retrograde response“). Dadurch wird eine ausreichende Synthese von α-Ketoglutarat gewährleistet, welches eine Vorstufe von Glutamat ist und seinerseits für diverse Biosynthesen benötigt wird. Die Abbildung beschränkt sich auf die Darstellung von Genen, deren Produkte in der Glutamat-Biosynthese sowie in anaplerotischen Stoffwechselwegen eine Funktion ausüben. Die unterbrochene Linie im Zitronensäurezyklus weist darauf hin, dass die Umsetzung von Succinat zu Oxalacetat in Zellen mit einem respiratorischen Defekt unterbrochen ist. Gene die in Zellen mit einem respiratorischen Defekt oder in Yah1p-depletierten Zellen induziert wurden sind unterstrichen bzw. mit einem Sternchen (∗) markiert. (Modifiziert nach Liu und Butow, 2006)

6.2.6. Yah1p und Atm1p-depletierte Zellen besitzen eine eingeschränkte Ferrochelatase Aktivität

Eisen wird zur Synthese von Häm und Fe/S Clustern benötigt, zwei zentrale Prozesse, von denen angenommen wurde, dass diese unabhängig voneinander ablaufen. In *S. cerevisiae* sind Störungen in der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie jedoch fast grundsätzlich mit einem Häm-Mangel und einem Cytochrom-Defekt assoziiert (Lange *et al.*, 2004; Lesuisse *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). In Zellen, die einen Defekt in der Biosynthese von mitochondrialen Fe/S Proteinen aufweisen, ist die Aktivität der Ferrochelatase (Hem15p) inhibiert. Diese Beobachtung wurde zuerst in Zellen gemacht, denen das Protein Frataxin (Yfh1p) fehlt. Daher wurde vermutet, dass es eine funktionelle Beziehung zwischen Yfh1p und der Ferrochelatase geben muss (Lesuisse *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Diese Hypothese wurde scheinbar durch Beobachtungen gefestigt, die eine direkte Interaktion zwischen Yfh1p und der Ferrochelatase *in vitro* zeigen. Diese Protein-Interaktion konnte *in vivo* jedoch nicht reproduziert werden (Lange *et al.*, 2004). Vielmehr wurde gezeigt, dass Mitochondrien mit gestörter Fe/S Cluster Biogenese eine Substanz anreichern, die die Ferrochelatase reversibel hemmt (Lange *et al.*, 2004). In dieser Arbeit konnte zusätzlich belegt werden, dass das *HEM15* Transkript in ISC-Assemblierungs- und Exportmutanten reprimiert wird. An der Reprimierung des Transkripts könnte teilweise das RNA-bindende Protein Cth2p beteiligt sein. *CTH2* wird bei einem Eisenmangel und in *ISC* Mutanten durch den Transkriptionsfaktor Aft1p induziert. Die *HEM15* mRNA besitzt im 3´-nicht-translatierten Bereich mehrere überlappende 5´-UUAUUUAUU-3´-Nonamere, die als Bindestellen von Cth2p fungieren. Es wurde bereits gezeigt, dass *HEM15* mRNA bei einem Eisenmangel in Anwesenheit von Cth2p abgebaut wird (Puig *et al.*, 2005). Die Regulation der Ferrochelatase erfolgt demzufolge nach zwei unterschiedlichen, parallelen Mechanismen, einerseits auf Transkriptionsebene und andererseits biochemisch durch Blockierung der Ferrochelatase mit einem Inhibitor (Lange *et al.*, 2004). Diese Inhibierung ist allerdings reversibel, da ihre Aktivität nach Reinigung aus mitochondrialen Extrakten von *ISC* Mutanten wieder Wildtyp Niveau aufwies. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Inhibitor um eine Substanz mit regulatorischer Funktion.

Nach den hier vorgelegten Daten beeinflusst die gestörte Eisenhomeostase in Zellen mit einer inaktivierten ISC-Assemblierungs- und Exportmaschinerie den zellulären

Häm-Spiegel. Folglich ist die mitochondriale ISC-Assemblierungmaschinerie maßgeblich an der Regulation des zellulären Häm-Spiegels in *S. cerevisiae* beteiligt.

6.2.7. Die ISC-Assemblierungsmaschinerie ist auch in höheren Eukaryoten an der Regulation der Eisenhomeostase beteiligt

Die Hefe *S. cerevisiae* und höhere Eukaryoten nutzen unterschiedliche Strategien, um ihren Eisenhaushalt zu regulieren. Trotz dieser Unterschiede können Untersuchungen in Hefe einen gewissen Aufschluss über die Situation in höheren Eukaryonten geben. Die folgenden Beispiele demonstrieren, dass Mutationen in ISC-Komponenten der Hefe und in höheren Eukaryoten trotz unterschiedlicher Regulationsmechanismen teilweise ähnliche phänotypische Konsequenzen nach sich ziehen:

1) Eine Mutation im Gen *GRX5* führt sowohl in Hefe als auch im Modellsystem Zebrafisch zu einer Beeinträchtigung der Fe/S Cluster- und Häm-Biogenese. Allerdings unterscheiden sich die zu Grunde liegenden Mechanismen deutlich (Wingert *et al.*, 2005). Eine *GRX5* Mutation im Zebrafisch bedingt eine reduzierte Reifung des IRP1 Fe/S Proteins (Hentze *et al.*, 2004). Dadurch wird der Zelle ein Eisenmangel signalisiert. IRP1 bindet an den 5´-nicht-translatierten Bereich einer mRNA, die für δ-Aminolävulinsäure-Synthase 2 kodiert (Schlüsselenzym der Häm-Biosynthese) und blockiert deren Translation. Als Folge entwickelt sich eine hypochromatische Anämie.

2) Das in Säugern synthetisierte Protein Abcb7 ist ein funktionelles Ortholog des Hefe ABC-Transporters Atm1p (Csere *et al.*, 1998). Ein Funktionsverlust des Hefe-Proteins verursacht einen starken Wachstumsdefekt, eine Akkumulation von Eisen in den Mitochondrien sowie eine Beeinträchtigung in der Assemblierung von cytosolischen Fe/S Proteinen (Kispal *et al.*, 1997; Kispal *et al.*, 1999). Dieser Phänotyp kann durch die Expression von humanem *ABCB7* aufgehoben werden (Csere *et al.*, 1998). Eine Mutation im menschlichen Ortholog hABCB7 resultiert in einer Eisenspeichererkrankung, der X-Chromosom-gekoppelten sideroblastischen Anämie und Ataxie (XLSA/A) (Allikmets *et al.*, 1999; Bekri *et al.*, 2000).

In Mäusen ist die Deletion von *ABCB7* letal. Eine Gewebs-spezifische Deletion von *ABCB7* in der Leber führt dagegen zu lebensfähigen Tieren, die allerdings eine reduzierte Reifung cytosolischer Fe/S Proteine zur Folge hat (z.B. Xanthin-Oxidase). Die Abcb7 Inaktivierung bedingt zusätzlich eine reduzierte Umwandlung von IRP1 in

die cytosolische Aconitaseform und führt schließlich zu einer weitreichenden Fehlregulation des Eisenstoffwechsels (Pondarre *et al.*, 2006).

3) Die gezielte Depletion von Frataxin und Nfs1 mittels RNAi Technologie verursacht in HeLa Zellen einen Aktivitätsverlust mitochondrialer und cytosolischer Fe/S Proteine, während Proteine ohne Fe/S Cluster unbeeinflusst bleiben (Stehling *et al.*, 2004). Im Menschen manifestiert sich ein Mangel an Frataxin in einer degenerativen Erkrankung des zentralen Nervensystems (Friedreich Ataxie). Die betroffenen Personen besitzen in der Regel eine GAA-Triplett Wiederholung im ersten Intron des FRDA Gens, wodurch sich eine ungewöhnlich stabile mRNA-DNA Überstruktur ausbildet, die die Transkription verlangsamt (Bidichandani *et al.*, 1998; Vetcher *et al.*, 2002). Als Folge akkumulieren humane Zellen verstärkt Eisen in den Mitochondrien (Biederbick *et al.*, 2006; Stehling *et al.*, 2004).

Obwohl die der Eisenregulation zu Grunde liegenden Mechanismen in Hefe und höheren Eukaryoten völlig anders sind, wird auch in jenem Organismus, wie oben diskutiert, Eisen in den Mitochondrien als Folge von Defekten in der Fe/S Protein-Biogenese akkumuliert. Die biologische Bedeutung dieser offensichtlich allgemein gültigen Konsequenzen liegt in der universellen Steuerung der Eisenaufnahme und Verteilung in der eukaryotischen Zelle durch die mitochondriale Fe/S Protein-Biogenese.

7. Literatur

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

Agar, J. N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B. H., Dean, D. R. & 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., Yuvaniyama, P., Jack, R. F., Cash, V. L., Smith, A. D., Dean, D. R. & Johnson, M. K. (2000b). Modular organization and identification of a mononuclear iron-binding site within the NifU protein. *J Biol Inorg Chem* **5**, 167-177.

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

Allikmets, R., Raskind, W. H., Hutchinson, A., Schueck, N. D., Dean, M. & Koeller, D. M. (1999). Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (*ABC7*) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet* **8**, 743-749.

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

Balk, J., Pierik, A. J., Netz, D. J., Mühlenhoff, U. & Lill, R. (2004). The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *Embo J* **23**, 2105-2115.

Balk, J., Aguilar Netz, D. J., Tepper, K., Pierik, A. J. & Lill, R. (2005). The essential WD40 protein Cia1 is involved in a late step of cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly. *Mol Cell Biol* **25**, 10833-10841.

Barros, M. H. & Nobrega, F. G. (1999). *YAH1* of *Saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that codes for a protein homologous to human adrenodoxin. *Gene* **233**, 197-203.

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

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

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

Bekri, S., Kispal, G., Lange, H., Fitzsimons, E., Tolmie, J., Lill, R. & Bishop, D. F. (2000). Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood* **96**, 3256-3264.

Belli, G., Molina, M. M., Garcia-Martinez, J., Perez-Ortin, J. E. & Herrero, E. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 5-deficient cells subjected to continuous oxidizing conditions are affected in the expression of specific sets of genes. *J Biol Chem* **279**, 12386-12395.

Bidichandani, S. I., Ashizawa, T. & Patel, P. I. (1998). The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am J Hum Genet* **62**, 111-121.

Biederbick, A., Stehling, O., Rosser, R., Niggemeyer, B., Nakai, Y., Elsasser, H. P. & Lill, R. (2006). Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Mol Cell Biol* **26**, 5675-5687.

Blaiseau, P. L., Lesuisse, E. & Camadro, J. M. (2001). Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J Biol Chem* **276**, 34221-34226.

Boukhalfa, H. & Crumbliss, A. L. (2002). Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals* **15**, 325-339.

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

Butow, R. A. & Avadhani, N. G. (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* **14**, 1-15.

Cammack, R. (1992). Iron-sulfur clustersin enzymes: Themes and variations. In *Iron-sulfur proteins*, pp. 281-322. Edited by R. Cammack. San Diego: Academic Press.

Cheek, J. & Broderick, J. B. (2001). Adenosylmethionine-dependent iron-sulfur enzymes: versatile clusters in a radical new role. *J Biol Inorg Chem* **6**, 209-226.

Chen, O. S., Crisp, R. J., Valachovic, M., Bard, M., Winge, D. R. & Kaplan, J. (2004). Transcription of the yeast iron regulon does not respond directly to iron but rather to iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Biol Chem* **279**, 29513-29518.

Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierachial clustering. *Nucleic Acids Research* **16**, 10881-10890.

Crack, J. C., Green, J., Le Brun, N. E. & Thomson, A. J. (2006). Detection of sulfide release from the oxygen-sensing [4Fe-4S] cluster of FNR. *J Biol Chem*.

Csere, P., Lill, R. & Kispal, G. (1998). Identification of a human mitochondrial ABC transporter, the functional orthologue of yeast Atm1p. *FEBS Lett* **441**, 266-270.

Dancis, A. (1998). Genetic analysis of iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Pediatr* **132**, S24-29.

Daum, G., Gasser, S. M. & Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria: Energy-dependent, two step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome b_2 by isolated yeast mitochondria. *J Biol Chem* **257**, 13075-13080.

De Luca, N. G. & Wood, P. M. (2000). Iron uptake by fungi: contrasted mechanisms with internal or external reduction. *Adv Microb Physiol* **43**, 39-74.

Dean, D. R., Bolin, J. T. & Zheng, L. (1993). Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. *J Bacteriol* **175**, 6737-6744.

Diekert, K., de Kroon, A. I., Kispal, G. & Lill, R. (2001). Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol* **65**, 37-51.

Dix, D., Bridgham, J., Broderius, M. & Eide, D. (1997). Characterization of the Fet4p protein of yeast. Evidence for a direct role in the transport of iron. *J Biol Chem* **272**, 11770-11777.

Dix, D. R., Bridgham, J. T., Broderius, M. A., Byersdorfer, C. A. & Eide, D. J. (1994). The *FET4* gene encodes the low affinity Fe (II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 26092-26099.

Dower, W., Miller, J. & Ragsdale, C. (1988). High efficiency transformation of *Erischia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145.

Dutkiewicz, R., Schilke, B., Knieszner, H., Walter, W., Craig, E. A. & Marszalek, J. (2003). Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis. Similarities to and differences from its bacterial counterpart. *J Biol Chem* **278**, 29719-29727.

Dutkiewicz, R., Schilke, B., Cheng, S., Knieszner, H., Craig, E. A. & Marszalek, J. (2004). Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their *in vivo* function. *J Biol Chem* **279**, 29167-29174.

Dutkiewicz, R., Marszalek, J., Schilke, B., Craig, E. A., Lill, R. & Muhlenhoff, U. (2006). The hsp70 chaperone ssq1p is dispensable for iron-sulfur cluster formation on the scaffold protein isu1p. *J Biol Chem* **281**, 7801-7808.

Englard, S. & Siegel, L. (1969). Mitochondrial L-malate dehydrogenase of beef heart. *Methods in Enzymology* **13**.

Epstein, C. B., Waddle, J. A., Hale, W. t., Dave, V., Thornton, J., Macatee, T. L., Garner, H. R. & Butow, R. A. (2001). Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol Biol Cell* **12**, 297-308.

Fansler, B. & Lowenstein, J. M. (1969). Aconitase from pig heart. *Methods in Enzymology* **13**, 26-30.

Flint, D. H. (1996). *Escherichia coli* contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the *nifS* gene of *Azotobacter vinelandii* and that can participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase. *J Biol Chem* **271**, 16068-16074.

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

Foury, F. & Talibi, D. (2001). Mitochondrial control of iron homeostasis. A genome wide analysis of gene expression in a yeast frataxin-deficient strain. *J Biol Chem* **276**, 7762-7768.

Foury, F. & 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.

Frazzon, J., Fick, J. R. & Dean, D. R. (2002). Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process. *Biochem Soc Trans* **30**, 680-685.

Frazzon, J. & Dean, D. R. (2003). Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry. *Curr Opin Chem Biol* **7**, 166-173.

Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 334-361.

Garland, S. A., Hoff, K., Vickery, L. E. & Culotta, V. C. (1999). *Saccharomyces cerevisiae ISU1* and *ISU2*: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *J Mol Biol* **294**, 897-907.

Gerber, J. & Lill, R. (2002). Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology. *Mitochondrion* **2**, 71-86.

Gerber, J., Muhlenhoff, U. & 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.

Gerber, J., Neumann, K., Prohl, C., Muhlenhoff, U. & Lill, R. (2004). The yeast scaffold proteins Isu1p and Isu2p are required inside mitochondria for maturation of cytosolic Fe/S proteins. *Mol Cell Biol* **24**, 4848-4857.

Green, J. & Paget, M. S. (2004). Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol* **2**, 954-966.

Guarente, L. & Hoar, E. (1984). Upstream activation sites of the *CYC1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* are active when inverted but not when placed downstream of the "TATA box". *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7860-7864.

Haas, H. (2003). Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**, 316-330.

Hausmann, A., Aguilar Netz, D. J., Balk, J., Pierik, A. J., Mühlenhoff, U. & Lill, R. (2005). The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: an essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3266-3271.

Hausmann, A., Samans, B., Urzica, E., Lill, R. & Mühlenhoff, U. (2006). Analysis of genome-wide transcriptional responses to defects in cellular Fe/S biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *in preparation*.

Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U. & Andrews, N. C. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **117**, 285-297.

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

Hoff, K. G., Silberg, J. J. & Vickery, L. E. (2000). Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7790-7795.

Hoff, K. G., Cupp-Vickery, J. R. & 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.

Hoffman, C. & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plamids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.

Hon, T., Dodd, A., Dirmeier, R., Gorman, N., Sinclair, P. R., Zhang, L. & Poyton, R. O. (2003). A mechanism of oxygen sensing in yeast. Multiple oxygen-responsive steps in the heme biosynthetic pathway affect Hap1 activity. *J Biol Chem* **278**, 50771-50780.

Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. & O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686-691.

Isaya, G., O'Neill, H. A., Gakh, O., Park, S., Mantcheva, R. & Mooney, S. M. (2004). Functional studies of frataxin. *Acta Paediatr Suppl* **93**, 68-71; discussion 72-63.

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

Jacobson, M. R., Cash, V. L., Weiss, M. C., Laird, N. F., Newton, W. E. & Dean, D. R. (1989). Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol Gen Genet* **219**, 49-57.

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

Johnson, A. E. & Brown, R. C. (1998). Measurement of the performance of air cleaners against the particulate element of rosin-based solder flux fume. *Ann Occup Hyg* **42**, 511-519.

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

Kaiser, J. T., Clausen, T., Bourenkow, G. P., Bartunik, H. D., Steinbacher, S. & Huber, R. (2000). Crystal structure of a NifS-like protein from *Thermotoga maritima*: implications for iron sulphur cluster assembly. *J Mol Biol* **297**, 451-464.

Kambampati, R. & Lauhon, C. T. (1999). IscS is a sulfurtransferase for the *in vitro* biosynthesis of 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. *Biochemistry* **38**, 16561-16568.

Kambampati, R. & Lauhon, C. T. (2000). Evidence for the transfer of sulfane sulfur from IscS to ThiI during the *in vitro* biosynthesis of 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. *J Biol Chem* **275**, 10727-10730.

Kaut, A., Lange, H., Diekert, K., Kispal, G. & 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, R., Saxena, S., Gordon, D. M., Pain, D. & Dancis, A. (2001). J-domain protein, Jac1p, of yeast mitochondria required for iron homeostasis and activity of Fe-S cluster proteins. *J Biol Chem* **276**, 17524-17532.

Kirchman, P. A., Kim, S., Lai, C. Y. & Jazwinski, S. M. (1999). Interorganelle signaling is a determinant of longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**, 179-190.

Kispal, G., Csere, P., Guiard, B. & Lill, R. (1997). The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett* **418**, 346-350.

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

Kispal, G., Sipos, K., Lange, H. & other authors (2005). Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *Embo J* **24**, 589-598.

Kohlhaw, G. B. (1988). Isopropylmalate dehydratase from yeast. *Methods Enzymol* **166**, 423-429.

Kosman, D. J. (2003). Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol Microbiol* **47**, 1185-1197.

Kuhnke, G., Neumann, K., Muhlenhoff, U. & Lill, R. (2006). Stimulation of the ATPase activity of the yeast mitochondrial ABC transporter Atm1p by thiol compounds. *Mol Membr Biol* **23**, 173-184.

Kwast, K. E., Burke, P. V., Staahl, B. T. & Poyton, R. O. (1999). Oxygen sensing in yeast: evidence for the involvement of the respiratory chain in regulating the transcription of a subset of hypoxic genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5446-5451.

Kyshe-Andersen, J. (1984). Electroblotting of multiple geles: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Bioch?* **10**, 203-207.

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

Lan, C., Lee, H. C., Tang, S. & Zhang, L. (2004). A novel mode of chaperone action: heme activation of Hap1 by enhanced association of Hsp90 with the repressed Hsp70-Hap1 complex. *J Biol Chem* **279**, 27607-27612.

Land, T. & Rouault, T. A. (1998). Targeting of a human iron-sulfur cluster assembly enzyme, nifs, to different subcellular compartments is regulated through alternative AUG utilization. *Mol Cell* **2**, 807-815.

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

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

Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Muhlenhoff, U., Kispal, G. & Lill, R. (2001). An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep* **2**, 715-720.

Lange, H., Muhlenhoff, U., Denzel, M., Kispal, G. & Lill, R. (2004). The heme synthesis defect of mutants impaired in mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis is caused by reversible inhibition of ferrochelatase. *J Biol Chem* **279**, 29101-29108.

Larsson, N. G., Wang, J., Wilhelmsson, H., Oldfors, A., Rustin, P., Lewandoski, M., Barsh, G. S. & Clayton, D. A. (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* **18**, 231-236.

Lauhon, C. T. (2002). Requirement for IscS in biosynthesis of all thionucleosides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 6820-6829.

Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. & Aravind, L. (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol* **317**, 41-72.

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

Lesuisse, E., Santos, R., Matzanke, B. F., Knight, S. A., Camadro, J. M. & Dancis, A. (2003). Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Hum Mol Genet* **12**, 879-889.

Lesur, I. & Campbell, J. L. (2004). The transcriptome of prematurely aging yeast cells is similar to that of telomerase-deficient cells. *Mol Biol Cell* **15**, 1297-1312.

Li, J., Kogan, M., Knight, S. A., Pain, D. & Dancis, A. (1999). Yeast mitochondrial protein, Nfs1p, coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake, and iron distribution. *J Biol Chem* **274**, 33025-33034.

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

Li, L. & Kaplan, J. (2004). A mitochondrial-vacuolar signaling pathway in yeast that affects iron and copper metabolism. *J Biol Chem* **279**, 33653-33661.

Liao, X. S., Small, W. C., Srere, P. A. & Butow, R. A. (1991). Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (CIT2) expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**, 38-46.

Lill, R., Diekert, K., Kaut, A., Lange, H., Pelzer, W., Prohl, C. & Kispal, G. (1999). The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol Chem* **380**, 1157-1166.

Lisowsky, T. (1992). Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol Gen Genet* **232**, 58-64.

Liu, Z. & Butow, R. A. (2006). Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet*.

Loiseau, L., Ollagnier-de-Choudens, S., Nachin, L., Fontecave, M. & Barras, F. (2003). Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system: SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *J Biol Chem* **278**, 38352-38359.

Lorain, S., Lecluse, Y., Scamps, C., Mattei, M. G. & Lipinski, M. (2001). Identification of human and mouse HIRA-interacting protein-5 (HIRIP5), two mammalian representatives in a family of phylogenetically conserved proteins with a role in the biogenesis of Fe/S proteins. *Biochim Biophys Acta* **1517**, 376-383.

Lutz, T., Westermann, B., Neupert, W. & Herrmann, J. M. (2001). The mitochondrial proteins Ssq1 and Jac1 are required for the assembly of iron sulfur clusters in mitochondria. *J Mol Biol* **307**, 815-825.

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

Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Mansy, S. S., Wu, G., Surerus, K. K. & Cowan, J. A. (2002). Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Thermatoga maritima* IscU is a structured iron-sulfur cluster assembly protein. *J Biol Chem* **277**, 21397-21404.

Manzella, L., Barros, M. H. & Nobrega, F. G. (1998). *ARH1* of *Saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that codes for a protein homologous to the human adrenodoxin reductase. *Yeast* **14**, 839-846.

Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K. & Herrmann, J. M. (2005). A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* **121**, 1059-1069.

Mühlenhoff, U. & Lill, R. (2000). Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1459**, 370-382.

Mühlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G. & Lill, R. (2002). The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum Mol Genet* **11**, 2025-2036.

Mühlenhoff, U., Stadler, J. A., Richhardt, N., Seubert, A., Eickhorst, T., Schweyen, R. J., Lill, R. & Wiesenberger, G. (2003). A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions. *J Biol Chem* **278**, 40612-40620.

Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N. & Lill, R. (2003). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *Embo J* **22**, 4815-4825.

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

Muller, M. & Martin, W. (1999). The genome of *Rickettsia prowazekii* and some thoughts on the origin of mitochondria and hydrogenosomes. *Bioessays* **21**, 377-381.

Mumberg, D., Muller, R. & Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**, 119-122.

Nachin, L., El Hassouni, M., Loiseau, L., Expert, D. & Barras, F. (2001). SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. *Mol Microbiol* **39**, 960-972.

Nachin, L., Loiseau, L., Expert, D. & Barras, F. (2003). SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *Embo J* **22**, 427-437.

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

Nakai, Y., Nakai, M., Hayashi, H. & Kagamiyama, H. (2001). Nuclear localization of yeast Nfs1p is required for cell survival. *J Biol Chem* **276**, 8314-8320.

Nakai, Y., Umeda, N., Suzuki, T., Nakai, M., Hayashi, H., Watanabe, K. & Kagamiyama, H. (2004). Yeast Nfs1p is involved in thio-modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs. *J Biol Chem* **279**, 12363-12368.

Neilands, J. B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* **270**, 26723-26726.

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

Ollagnier-de Choudens, S., Nachin, L., Sanakis, Y., Loiseau, L., Barras, F. & Fontecave, M. (2003). SufA from *Erwinia chrysanthemi*. Characterization of a scaffold protein required for iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem* **278**, 17993-18001.

Outten, F. W., Wood, M. J., Munoz, F. M. & Storz, G. (2003). The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**, 45713-45719.

Outten, F. W., Djaman, O. & Storz, G. (2004). A *suf* operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **52**, 861-872.

Patzer, S. I. & Hantke, K. (1999). SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 3307-3309.

Pelzer, W., Muhlenhoff, U., Diekert, K., Siegmund, K., Kispal, G. & Lill, R. (2000). Mitochondrial Isa2p plays a crucial role in the maturation of cellular iron-sulfur proteins. *FEBS Lett* **476**, 134-139.

Pondarre, C., Antiochos, B. B., Campagna, D. R. & other authors (2006). The mitochondrial ATP-binding cassette transporter Abcb7 is essential in mice and participates in cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis. *Hum Mol Genet* **15**, 953-964.

Portnoy, M. E., Liu, X. F. & Culotta, V. C. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. *Mol Cell Biol* **20**, 7893-7902.

Protchenko, O. & Philpott, C. C. (2003). Regulation of intracellular heme levels by *HMX1*, a homologue of heme oxygenase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**, 36582-36587.

Puccio, H. & Koenig, M. (2000). Recent advances in the molecular pathogenesis of Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* **9**, 887-892.

Puig, S., Askeland, E. & Thiele, D. J. (2005). Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* **120**, 99-110.

Raguzzi, F., Lesuisse, E. & Crichton, R. R. (1988). Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **231**, 253-258.

Rangachari, K., Davis, C. T., Eccleston, J. F., Hirst, E. M., Saldanha, J. W., Strath, M. & Wilson, R. J. (2002). SufC hydrolyzes ATP and interacts with SufB from *Thermotoga maritima*. *FEBS Lett* **514**, 225-228.

Reents, H., Gruner, I., Harmening, U., Bottger, L. H., Layer, G., Heathcote, P., Trautwein, A. X., Jahn, D. & Hartig, E. (2006). *Bacillus subtilis* Fnr senses oxygen via a [4Fe-4S] cluster coordinated by three cysteine residues without change in the oligomeric state. *Mol Microbiol* **60**, 1432-1445.

Rees, D. C. & Howard, J. B. (2000). Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 559-566.

Rees, D. C. (2002). Great metalloclusters in enzymology. *Annu Rev Biochem* **71**, 221-246.

Regenberg, B., During-Olsen, L., Kielland-Brandt, M. C. & Holmberg, S. (1999). Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **36**, 317-328.

Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. & Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**, 1030-1032.

Robinson, K. M. & Lemire, B. D. (1995). Flavinylation of succinate: ubiquinone oxidoreductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology* **260**, 34-51.

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

Roy, A., Solodovnikova, N., Nicholson, T., Antholine, W. & Walden, W. E. (2003). A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. *Embo J* **22**, 4826-4835.

Rutherford, J. C., Jaron, S., Ray, E., Brown, P. O. & Winge, D. R. (2001). A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14322-14327.

Rutherford, J. C., Jaron, S. & Winge, D. R. (2003). Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *J Biol Chem* **278**, 27636-27643.

Rutherford, J. C., Ojeda, L., Balk, J., Muhlenhoff, U., Lill, R. & Winge, D. R. (2005). Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem* **280**, 10135-10140.

Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning - A laboratory manual*, 3rd edn. ColdSpring Harbour, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos, R., Buisson, N., Knight, S. A., Dancis, A., Camadro, J. M. & Lesuisse, E. (2004). Candida albicans lacking the frataxin homologue: a relevant yeast model for studying the role of frataxin. *Mol Microbiol* **54**, 507-519.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.

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

Schüller, H. J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **43**, 139-160.

Seaton, B. L. & Vickery, L. E. (1994). A gene encoding a DnaK/hsp70 homolog in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2066-2070.

Shakoury-Elizeh, M., Tiedeman, J., Rashford, J. & other authors (2004). Transcriptional remodeling in response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15**, 1233-1243.

Shaprio, D. (1981). Quantitative ethanol precipitation of nanogram quantites of DNA and RNA. *Analytical Biochemistry* **110**, 229-231.

Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Ullmann, P., Lill, R. & Kispal, G. (2002). Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J Biol Chem* **277**, 26944-26949.

Skovran, E. & Downs, D. M. (2003). Lack of the ApbC or ApbE protein results in a defect in Fe-S cluster metabolism in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **185**, 98-106.

Smith, A. D., Agar, J. N., Johnson, K. A., Frazzon, J., Amster, I. J., Dean, D. R. & Johnson, M. K. (2001). Sulfur transfer from IscS to IscU: the first step in iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Am Chem Soc* **123**, 11103-11104.

Smith, A. D., Jameson, G. N., Dos Santos, P. C. & other authors (2005). NifS-mediated assembly of [4Fe-4S] clusters in the N- and C-terminal domains of the NifU scaffold protein. *Biochemistry* **44**, 12955-12969.

Spiro, S. (2006). Nitric oxide-sensing mechanisms in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* **34**, 200-202.

Srere, P. A. (1963). Citryl-CoA. A substrate for the citrate-cleavage enzyme. *Biochim Biophys Acta* **73**, 523-525.

Stehling, O., Elsasser, H. P., Bruckel, B., Muhlenhoff, U. & Lill, R. (2004). Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Hum Mol Genet* **13**, 3007-3015.

Steiner, H., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W. & Lill, R. (1995). Biogenesis of mitochondrial heme lyases in yeast. Import and folding in the intermembrane space. *J Biol Chem* **270**, 22842-22849.

Strain, J., Lorenz, C. R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G. A., Ta, D. T., Vickery, L. E. & Culotta, V. C. (1998). Suppressors of superoxide dismutase (SOD1) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem* **273**, 31138-31144.

Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M. & Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* **121**, 1043-1057.

Ta, D. T., Seaton, B. L. & Vickery, L. E. (1992). Localization of the ferredoxin (fdx) gene on the physical map of the *Escherichia coli* chromosome. *J Bacteriol* **174**, 5760-5761.

Ta, D. T. & Vickery, L. E. (1992). Cloning, sequencing, and overexpression of a [2Fe-2S] ferredoxin gene from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**, 11120-11125.

Takahashi, Y. & Tokumoto, U. (2002). A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J Biol Chem* **277**, 28380-28383.

Tokumoto, U. & Takahashi, Y. (2001). Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *J Biochem (Tokyo)* **130**, 63-71.

Tong, W. H. & Rouault, T. (2000). Distinct iron-sulfur cluster assembly complexes exist in the cytosol and mitochondria of human cells. *Embo J* **19**, 5692-5700.

Tong, W. H., Jameson, G. N., Huynh, B. H. & 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.

Tong, W. H. & Rouault, T. A. (2006). Functions of mitochondrial ISCU and cytosolic ISCU in mammalian iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Cell Metab* **3**, 199-210.

Urbina, H. D., Silberg, J. J., Hoff, K. G. & Vickery, L. E. (2001). Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly. *J Biol Chem* **276**, 44521-44526.

Vetcher, A. A., Napierala, M., Iyer, R. R., Chastain, P. D., Griffith, J. D. & Wells, R. D. (2002). Sticky DNA, a long GAA.GAA.TTC triplex that is formed intramolecularly, in the sequence of intron 1 of the frataxin gene. *J Biol Chem* **277**, 39217-39227.

Vitale, G., Fabre, E. & Hurt, E. C. (1996). *NBP35* encodes an essential and evolutionary conserved protein in *Saccharomyces cerevisiae* with homology to a superfamily of bacterial ATPases. *Gene* **178**, 97-106.

Voisine, C., Cheng, Y. C., Ohlson, M., Schilke, B., Hoff, K., Beinert, H., Marszalek, J. & Craig, E. A. (2001). Jac1, a mitochondrial J-type chaperone, is involved in the biogenesis of Fe/S clusters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1483-1488.

Wiedemann, N., Urzica, E., Guiard, B. & other authors (2006). Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *Embo J* **25**, 184-195.

Wingert, R. A., Galloway, J. L., Barut, B. & other authors (2005). Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* **436**, 1035-1039.

Yabe, T., Morimoto, K., Kikuchi, S., Nishio, K., Terashima, I. & 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.

Yamaguchi-Iwai, Y., Ueta, R., Fukunaka, A. & Sasaki, R. (2002). Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**, 18914-18918.

Yang, Y. H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D. M., Peng, V., Ngai, J. & Speed, T. P. (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**, e15.

Yarunin, A., Panse, V. G., Petfalski, E., Dez, C., Tollervey, D. & Hurt, E. C. (2005). Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *Embo J* **24**, 580-588. Epub 2005 Jan 2020.

Yoon, T. & 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.

Yun, C. W., Ferea, T., Rashford, J., Ardon, O., Brown, P. O., Botstein, D., Kaplan, J. & Philpott, C. C. (2000). Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for two pathways of iron uptake. *J Biol Chem* **275**, 10709-10715.

Yun, C. W., Bauler, M., Moore, R. E., Klebba, P. E. & Philpott, C. C. (2001). The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**, 10218-10223.

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

Zhang, L. & Hach, A. (1999). Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. *Cell Mol Life Sci* **56**, 415-426.

Zhang, Y., Lyver, E. R., Knight, S. A., Lesuisse, E. & Dancis, A. (2005). Frataxin and mitochondrial carrier proteins, Mrs3p and Mrs4p, cooperate in providing iron for heme synthesis. *J Biol Chem* **280**, 19794-19807.

Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F. & Dean, D. R. (1993). Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2754-2758.

Zheng, L. & Dean, D. R. (1994). Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster. *J Biol Chem* **269**, 18723-18726.

Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L. & Dean, D. R. (1994). Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product. *Biochemistry* **33**, 4714-4720.

Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H. & 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.

Zitomer, R. S. & Lowry, C. V. (1992). Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **56**, 1-11.

8. Publikationen

Hausmann, A., Aguilar Netz, D. J., Balk, J., Pierik, A. J., Mühlenhoff, U. & Lill, R. (2005). The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: an essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3266-3271.

Lill, R., Dutkiewicz, R., Elsasser, H. P., Hausmann, A., Netz, D. J., Pierik, A. J., Stehling, O., Urzica, E., Mühlenhoff, U. (2006). Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* **7**, 652-667

Hausmann, A., Samans, B., Urzica, E., Lill, R. & Muhlenhoff, U. (2006). Analysis of genome-wide transcriptional responses to defects in cellular Fe/S biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *in preparation*.

9. Lebenslauf

Name:	Hausmann
Vorname:	Anja
Geburtsdatum:	22.04.1969
Geburtsort:	Herne
Schulausbildung	
1975-1979	Grundschule, Waltrop
1979-1985	Hauptschule, Waltrop
1985-1987	Berufsfachschule für Ernährungs- und Hauswirtschaft
1992-1995	Abendgymnasium, Dortmund
1995	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Berufsausbildung	
1987-1988	Pflegevorschule, Datteln
1988-1991	Krankenpflegeschule, Datteln
Berufsausübung	
1991-1996	Anstellung als Krankenschwester
Studium	
09/1996-02/2001	Studium der Biologie, Philipps-Universität Marburg
04/2001-02/2002	Diplomarbeit in der Abt. Genetik der Philipps-Universität Marburg bei Herrn Prof. Dr. A. Klein mit dem Thema: Einfluss der DNA-Struktur auf die Transkriptionsregulation der Gengruppe der selenfreien [NiFe]-Hydrogenase *frc* aus *Methanococcus voltae*
03/2002-09/2002	Wissenschaftliche Angestellte in der Abt. Genetik an der Philipps-Universität Marburg bei Herrn Prof. Dr. A. Klein
Promotion	
Seit 09/2002	Dissertation im Institut für Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg bei Herrn Prof. Dr. R. Lill

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. R. Lill für die sehr gute Betreuung während der Arbeit, für seine wertvollen Ratschläge und für seine ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. U. Maier danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. U. Mühlenhoff danke ich für die stete Unterstützung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ein großer Dank geht an B. Samans für die konstruktive Zusammenarbeit bei der Datenanalyse der Microarrays am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg.

Herrn Dr. M. Krause danke ich für wertvolle Tips zum Umgang mit Microarrays.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das sehr gute Arbeitsklima und für die ständige Hilfsbereitschaft. Besonders bedanken möchte ich mich bei Karina, Nadine, Daili, Antonio, Martin und Holger.

Allen Mitgliedern des Instituts danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und für die gute Stimmung im Haus.

Ganz besonders möchte ich mich bei Ulf Grunwald bedanken, einfach für alles.