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

Rolle der cytosolischen Glutaredoxine im zellulären Eisenmetabolismus in Eukaryoten

Philipps Universität Marburg

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

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Bastian Hoffmann

aus Leverkusen

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am 26.09.2013.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Roland Lill

1. Korreferent: PD Dr. Jude Przyborski

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG **1**

SUMMARY **3**

1 EINLEITUNG **5**

1.1 Regulation des Eisenmetabolismus in *S. cerevisiae* **7**

1.2 Regulation des Eisenmetabolismus in Vertebraten **9**

1.3 Die Biogenese von Fe/S Proteinen in Eukaryoten **11**

1.4 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Eisenhomöostase **15**

1.5 Glutaredoxine und ihre Funktionen **17**

1.6 Klassifikation von Glutaredoxinen **17**

1.7 Glutaredoxine und ihre Reaktionsmechanismen **20**

1.8 Fe/S-Cluster koordinierende Glutaredoxine **22**

1.9 Die Rolle von Grx5 bei der Biogenese mitochondrialer Fe/S Proteine **23**

1.10 Die Funktion von Grx3-4 in der zellulären Eisenhomöostase **23**

1.11 Die Rolle von Grx3 und Grx4 bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine **24**

1.12 Voraussetzungen zur Fe/S Cluster Bindung von Glutaredoxinen **26**

1.13 Zielsetzung dieser Arbeit **28**

2 MATERIAL UND METHODEN **31**

2.1 Geräte **31**

2.2 Chemikalien, Enzyme und Größenstandards **31**

2.2.1 Chemikalien 31

2.2.2 Enzyme 32

2.2.3 Größenstandards 32

2.3 Oligonukleotide **32**

2.3.1 Oligonukleotide die zur Amplifikation von Genen verwendet wurden 32

2.3.2 Mutagenese-Oligonukleotide 33

2.3.3 *Oligonukleotide* zur Konstruktion chimärer Grx4 Varianten 34

2.3.4 RNA-Oligonukleotide 35

2.4 Plasmide 35

2.5 Verwendete Hefe-Stämme 39

2.6 Zellbiologische Methoden 40
2.6.1 Kultivierung von *E. coli* 40
2.6.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen 40
2.6.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen 41
2.6.4 Kultivierung von *S. cerevisiae* 41
2.6.5 Transformation von *S. cerevisiae* 43
2.6.6 Dauerkulturen von *S. cerevisiae* 44

2.7 Zellkulturmethoden 44
2.7.1 HeLa Zellen 44
2.7.2 Passagieren von HeLa Zellen 45
2.7.3 Aussäen dauerhaft gelagerter Kulturen von HeLa Zellen 45
2.7.4 Bestimmung der Zellzahl einer HeLa-Kultur 45
2.7.5 Transfektion mittels Elektroporation von HeLa Zellen 46
2.7.6 Ernten von HeLa-Zellen 46

2.8 Molekularbiologische Methoden 47
2.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* 47
2.8.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 47
2.8.3 Einführung von spezifischen Mutationen in ein Gen durch eine PCR-Reaktion 48
2.8.4 Überhang-Extension-PCR 50
2.8.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, Restriktions- oder PCR-Ansätzen 51
2.8.6 Agarose-Gelelektrophorese 52
2.8.7 Spaltung von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen 52
2.8.8 Ligation von DNA-Fragmenten 52
2.8.9 Microarray-Analysen 53

2.9 Biochemische Methoden 54
2.9.1 Präparation von Hefegesamtzellextrakt mittels Glasperlen 54
2.9.2 Isolation von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* 54
2.9.3 Präparation von HeLa-Zelllysaten für Western Blot Analysen 56
2.9.4 Fraktionierung von HeLa Zellen mittels der Digitonin Methode 56
2.9.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford 57
2.9.6 Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung) 57
2.9.7 Aktivitäts-Messungen von Enzymen in *S. cerevisiae* Zelllysaten 58
2.9.8 Messung der Enzym-Aktivitäten in HeLa-Proben 59
2.9.9 Messung der Luciferase-Aktivität 63
2.9.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 63
2.9.11 Ponceau-Färbung und Western Blot 64
2.9.12 Kolloidale Coomassie Färbung von SDS-PAGE Gelen 65
2.9.13 Immunofärbungen von Western Blot Membranen 65
2.9.14 Immunopräzipitation 66
2.9.15 Messung der *de novo* Eisen-Schwefel-Cluster Synthese in *S. cerevisiae* 67
2.9.16 Analyse der Interaktion von Aft1 und Grx4 68
2.9.17 Identifikation von ubiquitinylierten oder sumoylierten Proteinen 68

3 ERGEBNISSE 70

3.1 Analyse der Aminosäurereste im aktiven Zentrum von Grx4 in Bezug auf ihre Funktion in der Eisenbindung und der Regulation der Eisenhomöostase. 70

3.2 Die Analyse der Funktion der Thioredoxindomäne 77

3.3 Nur das *S. pombe* Grx4 ist in *S. cerevisiae* partiell funktionell 80

3.4 Chimäre *S. cerevisiae*/*S. pombe* Grx4 Proteine komplementieren partiell den Phänotyp von Gal-GRX4 Zellen 82

3.5 Identifikation der Interaktionsstelle zwischen Grx4 und dem Transkriptionsfaktor Aft1 87

3.6 Rolle des humanen Grx3 im Eisenmetabolismus 96

3.7 Depletion von Grx3 in HeLa Zellen mittels siRNA basierten Techniken 97

3.8 Microarray Analyse von Grx3 depletierten Zellen 103

3.9 Differentielle Genexpression von Eisen-depletierten HeLa Zellen 112

3.10 Charakterisierung der Ubiquitinylierung von Eisen-abhängigen Enzymen 117

3.11 Einfluss der ISC und CIA Maschinerien auf die Ubiquitinylierung von Eisen-abhängigen Enzymen 122

3.12 Der Verlust des Fe/S Kofaktors führt zur Ubiquitinylierung Eisen-abhängiger Enzyme 125

4 DISKUSSION 128

4.1 Ein Dithiol-Motiv im aktivem Zentrum von Grx4 führt zu einer reduzierten Eisenbindung und beeinträchtigt die Funktion dieses Proteins *in vivo* 132

4.2 Die Thioredoxindomäne ist essenziell für die Funktion von Grx3-4 133

4.3 Der C Terminus von Grx4 fungiert als die Bindestelle für den Eisen-regulierten Transkriptionsfaktor Aft1 134

4.4 In HeLa Zellen hat die Depletion von Grx3 einen Defekt in der Assemblierung von cytosolischen Fe/S Proteinen zur Folge 139

4.5 Die Depletion von Grx3 beeinflusst die differentielle Genexpression von Transkriptionsfaktoren 146

4.6 Eisen-abhängige Proteine werden unter Eisen-limitierten Wachstumsbedingungen ubiquitinyliert. 146

4.7 Ausblick 148

5 LITERATURVERZEICHNIS 151

6 ANHANG 164

6.1 Lebenslauf 164

6.2 Abkürzungsverzeichnis 165

6.3 Publikationen 166

6.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer 167

6.5 Danksagung 168

Zusammenfassung

Glutaredoxine kommen in allen phylogenetischen Reichen der Lebewesen vor. Zu dieser Proteinfamilie gehören Dithiol-Glutaredoxine, die ein CPYC Motiv im aktiven Zentrum aufweisen und eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des zellulären Redoxpotentials spielen. Einzeldomänen Monothiol-Glutaredoxine mit einem CGFS Motiv im aktiven Zentrum spielen eine zentrale Funktion bei der Maturierung zellulärer Eisen-Schwefel (Fe/S) Proteine und sind üblicherweise in den Mitochondrien und Chloroplasten lokalisiert. Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine sind Fusionsproteine, die aus einer N-terminalen Thioredoxindomäne und einer oder mehreren C-terminalen Monothiol Glutaredoxindomäne(n) bestehen. Diese Unterfamilie der Glutaredoxine kommt im Cytosol und Nukleus fast aller Eukaryoten vor. In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* binden die Multidomänen-Glutaredoxine Grx3 und Grx4 einen Fe/S-Kofaktor und spielen eine essenzielle Rolle bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine und der Regulation der zellulären Eisenhomöostase. Zentrales Ziel der Arbeit war die bessere funktionelle Charakterisierung der Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine. Zwei zentrale Fragen standen hierbei im Vordergrund: (1) Welche strukturellen Unterschiede befähigen die ansonsten sehr ähnlichen Glutaredoxine dazu, jeweils spezifische Funktionen zu übernehmen? (2) In wie weit ist die für *S. cerevisiae* beschriebene Funktion der Multidomänen Glutaredoxine im Eisenmetabolismus höherer Eukaryoten konserviert?

Der ersten Frage wurde durch Untersuchungen der Auswirkungen gezielter Mutationen auf die Funktionalität von Grx4 in *S. cerevisiae* nachgegangen. Diese Analyse zeigte, dass ein Dithiol-Motiv anstelle des Monothiol Motivs im aktiven Zentrum von Grx4 zu einer stark reduzierten Fe/S Clusterbindung und einem moderaten Funktionsverlust dieses Proteins *in vivo* führt. Hingegen ist ein Prolin im aktiven Zentrum von Grx4 im Gegensatz zu den Einzeldomänen Glutaredoxinen vollkommen kompatibel mit der Bindung eines Fe/S Clusters. Darüber hinaus ist die Thioredoxindomäne von Grx4 absolut essenziell für die Funktion. Wahrscheinlich fungiert diese Domäne als Bindestelle für andere Proteine. Grx3 und Grx4 interagieren direkt mit dem Eisen-regulierten Transkriptionsfaktor Aft1 und

inaktivieren Aft1 bei ausreichend verfügbarem Eisen. Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation von Aft1 inkompatibel mit einem Dithiol-Motiv im aktiven Zentrum von Grx4 ist und dass Aft1 mit dem C Terminus von Grx4 interagiert. Diese Interaktion ist nicht Eisen-abhängig und ist erhöht, wenn Grx4 keinen Fe/S Cluster gebunden hat. Somit ist nur die Inaktivierung von Aft1 direkt vom Fe/S Cluster von Grx4 abhängig. Insgesamt zeigte diese Arbeit wichtige strukturelle Voraussetzungen für die Funktion der Multidomänen Glutaredoxine im Eisenmetabolismus von *S. cerevisiae* auf.

Zur Beantwortung der zweiten Frage wurden die Auswirkungen der siRNA-vermittelten Depletion von Grx3 in HeLa Zellen untersucht. Grx3-depletierte HeLa Zellen zeigten vergleichbar mit Hefe-Zellen Defekte in der Assemblierung von Fe/S Proteinen des Cytosols und des Zellkerns. Ein Defekt in der Reifung des „Iron Regulatory Protein 1“ (IRP1) führte zum Abbau der Apo-Form dieses Proteins und entsprechenden Auswirkungen auf den Eisenmetabolismus. Im Gegensatz zu Hefe-Zellen zeigten Grx3-depletierte HeLa Zellen keinen Effekt auf die Maturierung mitochondrialer Fe/S Cluster- oder Häm-haltiger Proteine. Trotz des geänderten Eisenmetabolismus wies das Transkriptom von Grx3-depletierten HeLa Zellen keine geänderte Regulation typischer Eisen-regulierter Gene auf. Dazu gehören z.B. Gene, die eine Funktion in den Mitochondrien sowie unter hypoxischen Bedingungen ausüben. Dies und die fehlenden Effekte auf die mitochondrialen Eisen-abhängigen Proteine sind auffällige Unterschiede zu der Hefe. Zusammenfassend konnte eine in allen Eukaryoten konservierte Funktion von Grx3 hinsichtlich der Biogenese von cytosolischen, nicht aber mitochondrialen Fe/S Proteinen nachgewiesen werden.

Summary

Glutaredoxins are found in all phylogenetic kingdoms of life. This protein family includes dithiol-glutaredoxins that contain a CPYC active site and are involved in oxidative stress protection. Single domain glutaredoxins with a CGFS active site play crucial roles in the maturation of cellular iron-sulfur (Fe/S) proteins and are usually localized in mitochondria or chloroplasts. Multidomain monothiol glutaredoxins are fusion proteins that consist of an N-terminal thioredoxin domain and one or more C-terminal glutaredoxin domain(s). This subgroup of glutaredoxins is found in the cytosol and nucleus of nearly all higher eukaryotes. In baker's yeast *S. cerevisiae*, the multidomain glutaredoxins Grx3 and Grx4 bind Fe/S cofactors and play a crucial role in the maturation of all classes of iron-containing proteins and the regulation of cellular iron homeostasis. The aim of this work was a refined functional characterization of the multidomain monothiol glutaredoxins and was centered on two major questions. (1) Which structural differences enable the otherwise similar glutaredoxins to each perform a specific function? (2) Is the described function of the *S. cerevisiae* multidomain glutaredoxins in the iron metabolism conserved in higher eukaryotes?

The first question was followed by the analysis of the effects of site-directed mutations on the functionality of Grx4 in *S. cerevisiae*. The analysis showed that a dithiol, instead of the monthiol active site in Grx4 causes a strong decrease in iron binding and a moderate loss of function *in vivo*. In contrast to the single domain glutaredoxins, a prolin in the active site of Grx4 is fully compatible with the binding of a Fe/S cluster. Furthermore, the thioredoxin domain is essential for function. Most likely, this domain serves as a binding platform for other proteins. Yeast Grx3 and Grx4 interact with the iron-responsive transcription factor Aft1 and inactivate Aft1 under iron sufficiency. Here it could be shown that the regulation of Aft1 is incompatible with a dithiol active site of Grx4 and that the C terminus of Grx4 serves as the binding site for Aft1. Complex formation between Grx4 and Aft1 is not iron-dependent and increased when no Fe/S cluster is bound to Grx4. Hence, only the inactivation of Aft1, not the binding to Grx4 depends on the Fe/S cluster on Grx4.

Collectively, this work identified structural requirements for the function of the multidomain monthiol glutaredoxins in the cellular iron metabolism of *S. cerevisiae*.

To answer the second question, the effects of siRNA-mediated depletion of Grx3 in HeLa cells were analysed. Similar to yeast cells, Grx3-depleted HeLa cells showed defects in the assembly of cytosolic and nuclear Fe/S proteins. A defect in the maturation of the "Iron Regulatory Protein 1" (IRP1) caused the degradation of the apo-form of this protein and the subsequent effects on the cellular iron metabolism in Grx3-depleted HeLa cells. In contrast to yeast cells, Grx3 depletion in HeLa cells showed no effects on the assembly of mitochondrial Fe/S Cluster- or heme-depending enzymes. Furthermore, despite an altered iron metabolism, the transcriptome of Grx3-depleted HeLa cells showed no alterations in the regulation of typical iron-responsive genes that have a function in mitochondria or under hypoxic conditions. This observation and the missing effects on the mitochondrial iron-depending enzymes are conspicuous differences to yeast. Collectively, this work confirms a conserved function of Grx3 regarding the biogenesis of cytosolic Fe/S proteins, but not for mitochondrial iron-depending proteins in higher eukaryotes.

1 Einleitung

Eisen ist ein essenzieller Nährstoff für so gut wie alle Organismen, da Eisen für viele biochemische Prozesse benötigt wird. Zu diesen gehören neben vielen metabolischen Stoffwechselwegen unter anderem die zelluläre Respiration, die Stickstoff-Fixierung, die Biosynthese und Reparatur der DNA, sowie die Ribosomen-Biogenese (Lill, 2009; Lill et al., 2012; Lill and Muhlenhoff, 2008; Nemeth and Ganz, 2006; Netz et al., 2012b; Stehling et al., 2012; Xu and Moller, 2011). Eisen ist ein Übergangselement mit der Fähigkeit zwischen verschiedenen Redoxzuständen wechseln zu können. Dies erklärt den essenziellen Charakter von Eisen. Weiterhin kann Eisen als Lewis-Säure an Reaktionen teilnehmen. Allerdings kann freies Eisen auch eine toxische Wirkung innerhalb der Zelle haben, da es durch die sogenannte Fenton Chemie zur Bildung von freien Radikalen beiträgt (Chamnongpol et al., 2002). Daher muss der intrazelluläre Gehalt an freiem Eisen so niedrig wie möglich gehalten werden. Dies wird durch eine strenge Regulation der Eisenaufnahme, der intrazellulären Verteilung, sowie der Wiederverwertung von Eisen bewerkstelligt (Hentze et al., 2010; Rouault and Tong, 2005). Darüber hinaus wird im Menschen Eisen zu einem limitierenden Wachstumsfaktor für pathogene Mikroorganismen, wenn eine niedrige intrazelluläre Eisenkonzentration vorliegt (Sutak et al., 2008).

Eisen wird in der Zelle für verschiedene eisenabhängige Proteinklassen benötigt. (1) Eisen-Schwefel (Fe/S) Proteine enthalten einen anorganischen Fe/S Cluster als essenziellen Kofaktor, ohne den sie ihre Funktion nicht ausüben können. (2) Häm-abhängige Proteine enthalten in ein Porphyrinringsystem eingebautes Eisen. (3) Weiterhin gibt es Eisen-abhängige Proteine die nukleäres Eisen gebunden haben. Beispiele hierfür sind Mono- und Di-Oxygenasen, wie z.B. die Ribonukleotidreduktase, die Eisen in Oxo-Komplexen bindet. Weiterhin existieren Eisenspeicher-Proteine wie Ferritine, die hochmolekulares Eisen in ihrem Inneren z.B. als Fe^{3+} -Phosphate lagern können.

Eisen ist für viele Mikroorganismen wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ein limitierender Wachstumsfaktor (Kosman, 2003; Philpott et al., 2012). Gut lösliches Eisen (II) wird durch Luftsauerstoff zu Eisen (III) oxidiert, welches unter physiologischen Bedingungen zu unlöslichen Eisen(III)-Hydroxid Komplexen reagiert.

Daher besitzen Mikroorganismen wie die Bäckerhefe *S. cerevisiae* verschiedene Systeme, um Eisen aufzunehmen. *S. cerevisiae* verfügt über ein hochaffines und ein niederaffines System zur Eisenaufnahme (Abb. 1) (Canessa and Larrondo, 2013; Kosman, 2003; Philpott et al., 2012; Rutherford and Bird, 2004). Bei dem niederaffinen System wird Fe^{2+} direkt durch den Transporter Fet4 in die Zelle transportiert. Diese Reaktion weist aber einen relativ hohen K_m-Wert (Michaelis Konstante) auf und spielt somit nur eine untergeordnete Rolle (Philpott et al., 2012; Rutherford and Bird, 2004). Allerdings wird dieses System in *S. cerevisiae* bei Sauerstoffmangel induziert und fungiert als Haupt-Eisentransportsystem für Fe^{2+} unter anaeroben Bedingungen. Das unter aeroben Bedingungen wichtigere, hochaffine System hat dagegen einen relativ niedrigen K_m-Wert. Hierbei wird Fe^{3+} durch die membranständigen Metalloreduktasen Fre1-7 zu Fe^{2+} reduziert. Das bereitgestellte Fe^{2+} wird dann durch die Ferroxidase Fet3 wieder zu Fe^{3+} oxidiert. Dieses wird anschließend durch die an Fet3 gekoppelte Permease Ftr1 in die Zelle transportiert. Um eine zu hohe Eisenkonzentration im Cytosol zu verringern, gibt es in *S. cerevisiae* den Transporter Ccc1. Dieser translociert Eisen in die Vakuole, wo es gespeichert wird. Dabei wird die Expression von Ccc1 durch den Eisen-regulierten Transkriptionsfaktor Yap5 geregelt (Li et al., 2008; Li et al., 2011b; Li et al., 2012b; Pimentel et al., 2012). Bei Bedarf wird Eisen durch die Proteine Fet5 und Fth1 aus der Vakuole ins Cytosol rücktransportiert. Das Fet5-Fth1 System ähnelt dabei dem hoch affinen Fet3-Ftr1 System an der Plasmamembran zur zellulären Eisenaufnahme. Fe^{2+} kann aber auch durch Smf3 aus der Vakuole bzw. Endomembranen-System ins Cytosol transportiert werden. Dieses vakoläre / endosomale Transportsystem ist in Vertebraten konserviert. *S. cerevisiae* ist aber auch in der Lage an sogenannte Siderophore, wie Ferrirubin und Ferrirhodin, gebundenes Eisen aufzunehmen (Heymann et al., 2000; Yun et al., 2000). Diese Aufnahme wird durch die Transporter Arn1-4 sowie die membranständigen Proteine Fit1-3 bewerkstelligt. Allerdings kann *S. cerevisiae*, im Gegensatz zu vielen Pilzen, keine eigenen Siderophore synthetisieren. Das Fit/Arn System aus *S. cerevisiae* transportiert also Siderophore, die von anderen Mikroorganismen synthetisiert und sezerniert wurden (Heymann et al., 2000; Sutak et al., 2008; Yun et al., 2000).

Entgegen der lange angenommenen Meinung scheint es auch im Menschen ein Siderophor-gekoppeltes Aufnahmesystem von Eisen zu geben (Bao et al., 2010).

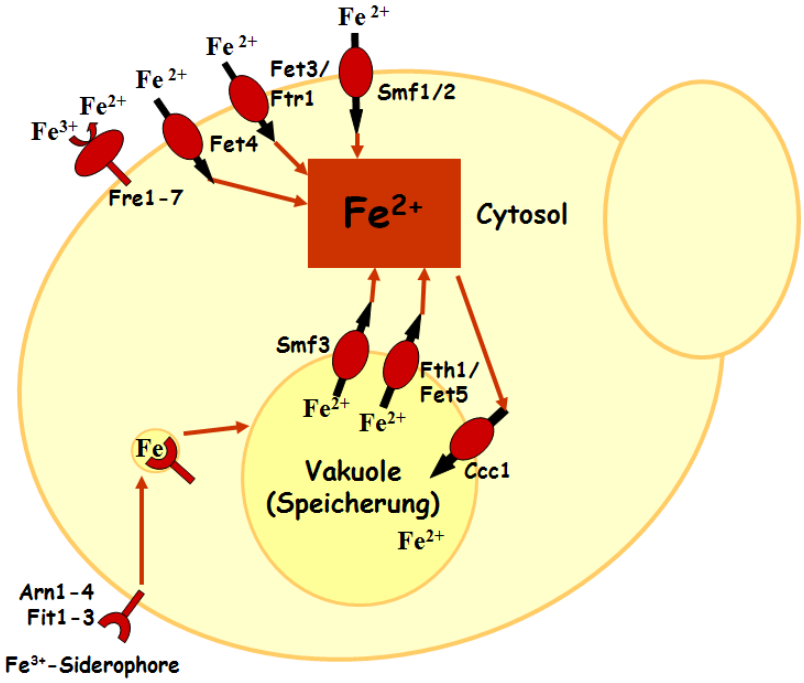

Abbildung 1. Systeme zur zellulären Eisenaufnahme von *S. cerevisiae*. Bei dem niederaffinen System wird Fe^{2+} direkt über die Transporter Fet4 in die Zelle über die Plasmamembran aufgenommen. Das hochaffine System, welches aus den Proteinen Fet3 und Ftr1 besteht, wird Fe^{2+} durch Fre1-7 bereitgestellt. Das Eisen wird dann Ebenfalls in die Zelle transportiert. Siderophore die Eisen gebunden haben werden mit der Hilfe von Arn1-4 und Fit1-3 aufgenommen. Um überschüssiges Eisen aus dem Cytosol zu entfernen kann der Transporter Ccc1 Eisen vom Cytosol in die Vakuole translozieren, wo es gespeichert wird. Liegt ein Eisenmangel vor, so kann von der Vakuole das gespeicherte Eisen durch das Fet5/Fth1 System oder Smf3 wieder ins Cytosol transportiert werden. Modifiziert nach (Kosman, 2003).

1.1 Regulation des Eisenmetabolismus in *S. cerevisiae*

Die Regulation der Eisenaufnahme in *S. cerevisiae* wird hauptsächlich durch den Eisen-regulierten Transkriptionsfaktor Aft1 gesteuert, der eine zentrale Rolle beim Wachstum unter Eisen-limitierenden Bedingungen spielt (Kaplan and Kaplan, 2009; Philpott and Protchenko, 2008; Rutherford and Bird, 2004). Ist in der Zelle genug Eisen vorhanden so befindet sich Aft1 im Cytosol und ist inaktiv. Liegt aber ein Eisenmangel vor, so transloziert Aft1 in den Nukleus und aktiviert dort die

Expression von Genen des sogenannten Eisenregulons (Abb. 2). Diese Gene haben unter anderem eine Funktion bei der Aufnahme von extrazellulärem Eisen über die Plasmamembran. Ist in der Zelle dann wieder genug Eisen vorhanden, so wird Aft1 durch die Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine Grx3 und Grx4 (siehe Kapitel 1.10) im Nukleus inaktiviert (Kaplan and Kaplan, 2009; Philpott and Protchenko, 2008; Rutherford and Bird, 2004; Ueta et al., 2012; Yamaguchi-Iwai et al., 2002). Das Exportin Msn5 soll für den Export aus dem Nukleus und eine korrekte Regulation des Eisenmetabolismus essenziell sein. Allerdings kann auch in *msn5Δ* Zellen Aft1 von der DNA dissoziieren, was in einer Studie berichtet wurde (Ueta et al., 2012). Somit ist die Lokalisation nicht entscheidend für die transkriptionelle Regulation der Eisenhomöostase (Ueta et al., 2012; Yamaguchi-Iwai et al., 2002). Darüber hinaus reagiert Aft1 auf den Status der ISC (Iron-Sulfur Cluster) Assemblierungs- und Export-Maschinerien der Mitochondrien. Diese übermitteln Aft1 ein Signal über den Zustand des mitochondrialen Eisenhaushalts (Siehe Kapitel 1.4). Der Mechanismus der Inaktivierung von Aft1 ist aber nicht aufgeklärt.

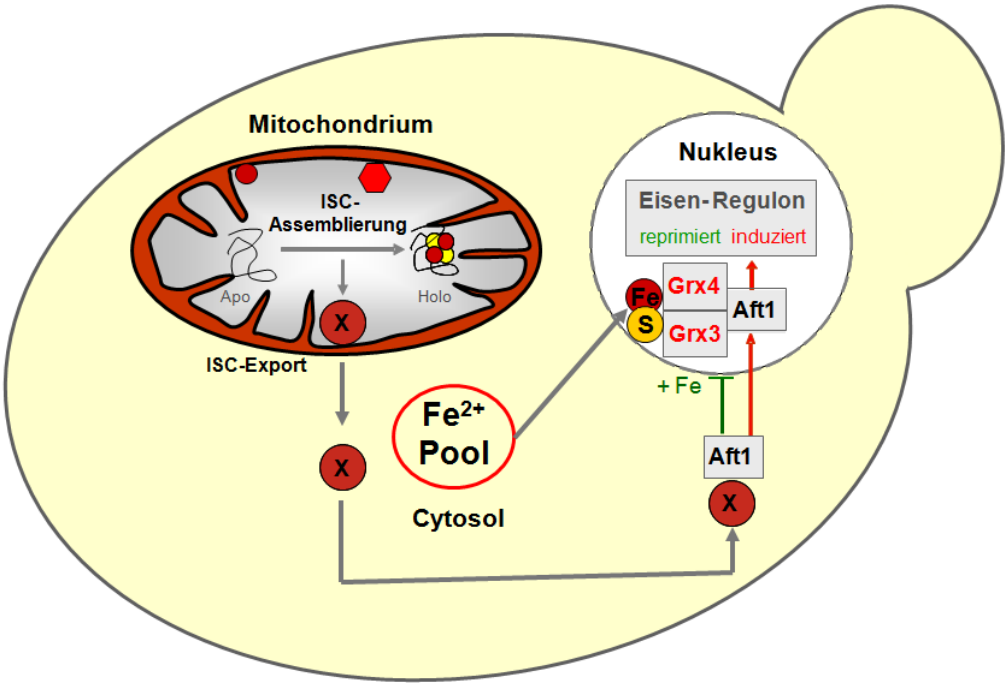

Abbildung 2. Modell der Eisenregulation durch den Transkriptionsfaktor Aft1. Liegt ausreichend Eisen in der Zelle vor so ist Aft1 im Cytosol lokalisiert. Aft1 reagiert auf den Status der mitochondrialen ISC Maschinerien die Aft1 ein Signal über den mitochondrialen Eisenstatus übermitteln. Weiterhin interagiert Aft1 mit den Glutaredoxinen Grx3-4, die in Kapitel 1.10 diskutiert werden. Leidet die Zellen aber unter Eisenmangel, so transloziert Aft1 in den Nukleus und aktiviert

dort die Expression der Gene des Eisenregulons, welche bei der zellulären Eisenaufnahme eine Rolle spielen. Modifiziert nach (Muhlenhoff et al., 2010).

1.2 Regulation des Eisenmetabolismus in Vertebraten

Im Gegensatz zur Regulation des Eisenmetabolismus in *S. cerevisiae* wird der Eisenstoffwechsel in menschlichen Zellen hauptsächlich posttranskriptionell geregelt und scheint auch bei verschiedenen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und der Friedreich-Ataxie eine Rolle zu spielen (Adlard and Bush, 2006; Bharath et al., 2002; Campuzano et al., 1996; Cossee et al., 1999; Hentze et al., 2010; Magaki et al., 2007; Pantopoulos, 2004; Rouault, 2006). Hierbei spielen die beiden Proteine IRP1 (Iron Regulatory Protein 1) und IRP2 (Iron Regulatory Protein 2) eine entscheidende Rolle (Abb. 3). IRP1 ist in der Lage einen [4Fe-4S] Cluster zu binden und fungiert dann als cytosolische Aconitase. Steht der Zelle allerdings nicht genug Eisen zur Verfügung, kann kein Fe/S Cluster auf IRP1 assembliert werden. Apo-IRP1 ist in der Lage, an so genannte IREs (Iron Responsive Elements) von mRNAs zu binden. Befindet sich das IRE am 5'Ende der mRNA, wie es bei der Ferritin mRNA der Fall ist, so wird die Translation der mRNA blockiert. Ferritin hat die Funktion, Eisen zu speichern und somit wird kein weiteres Protein mehr unter Eisenmangelbedingungen synthetisiert (Anderson et al., 2012; Hentze et al., 2010). Befindet sich das IRE am 3'Ende der mRNA, so wird diese stabilisiert. Ein Beispiel für diesen Fall ist die mRNA des Transferrinrezeptors. Dieser Rezeptor bindet das Protein Transferrin, welches Eisen bindet und die Aufgabe hat, Eisen allen Zellen im Körper über die Blutlaufbahn zur Verfügung zu stellen (Anderson et al., 2012; Hentze et al., 2010). Unter Eisenmangelbedingungen wird die mRNA des Transferrinrezeptors also stabilisiert und vermehrt translatiert, was zu einer erhöhten Eisenaufnahme der Zelle führt. Auf der anderen Seite wird bei ausreichend verfügbarem Eisen die Translation der mRNA von Ferritin nicht blockiert, da IRP1 nicht an das 5'IRE der Ferritin mRNA bindet. Ferritin bindet überschüssiges Eisen, was die Entstehung von freien Radikalen verhindert. Weiterhin wird unter diesen Bedingungen der Transferrinrezeptor nicht mehr synthetisiert, da kein IRP1 an das

3'IRE der Transferrinrezeptor mRNA bindet. Somit wird die mRNA destabilisiert und daraufhin abgebaut.

Das Protein IRP2 ist ebenfalls in der Lage an IREs von mRNAs zu binden, kann allerdings keinen Fe/S Cluster binden. Dabei hat es die gleiche Wirkung auf die Translation bzw. die Stabilität von mRNAs wie die Apo-Form von IRP1. Reguliert wird IRP2 über die E3 Ubiquitin-Ligase FBXL5 (Salahudeen et al., 2009; Vashisht et al., 2009). Dieses Protein ist in der Lage, den Eisen- sowie den Sauerstoff-Gehalt innerhalb der Zelle zu messen. Liegt genug Eisen sowie Sauerstoff in der Zelle vor, so wird IRP2 durch FBXL5 ubiquitinyliert, was zum Abbau von IRP2 über das Proteasom führt. Kommt es allerdings zu einem Eisenmangel innerhalb der Zelle, so ist IRP2 stabil und bindet an die IREs von mRNAs.

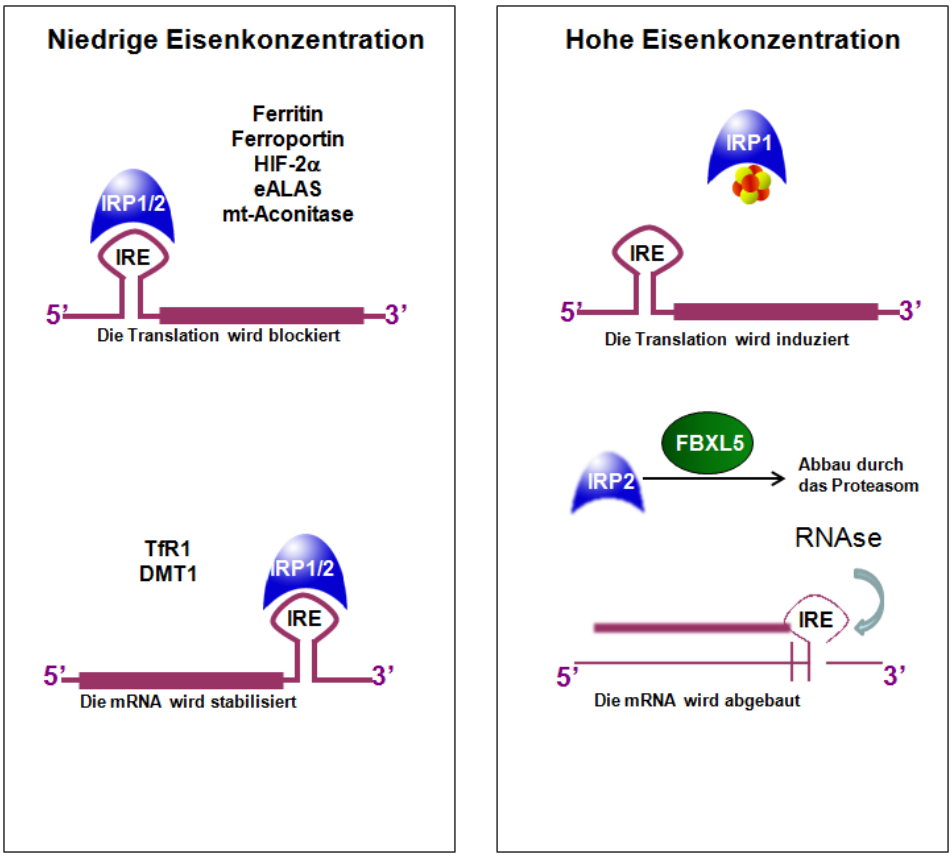

Abbildung 3. Posttranskriptionelle Regulation des Eisenmetabolismus in Vertebraten. Bei Eisenmangel binden IRP1 und IRP2 an die IREs von mRNAs und blockieren oder stabilisieren ihre Translation. Ist genug Eisen in der Zelle vorhanden, bindet IRP1 einen Fe/S Cluster und IRP2 wird abgebaut. Die beiden Proteine binden nicht mehr an die IREs und somit wird die Translation bestimmter mRNAs aktiviert, oder bestimmte mRNAs werden abgebaut. Für Details siehe Text. Modifiziert nach (Anderson et al., 2012).

1.3 Die Biogenese von Fe/S Proteinen in Eukaryoten

Die Biosynthese von Eisen-Schwefel-Cluster haltigen Proteinen ist eine essenzielle Biogenese-Leistung der Zelle. Entsprechend ihrer wichtigen Funktion spielen die zellulären Fe/S Cluster (ISC) Assemblierungssysteme auch eine wichtige Rolle bei der Regulation des zellulären Eisenhaushaltes. In Eukaryoten wird die Fe/S Biogenese von der so genannten ISC (Iron-Sulfur-Cluster) Maschinerie der Mitochondrien ausgeführt, deren Komponenten in der späten Phase des letzten Jahrhunderts entdeckt wurden. In vielen Bakterien existieren so genannte *isc*-Operons. Die darin kodierten Proteine bilden eine Maschinerie, welche dem ISC System aus höheren Eukaryoten ähnelt (Agar et al., 2000; Olson et al., 2000; Yuvaniyama et al., 2000). Aus diesem Grund hat die mitochondriale ISC Maschinerie wahrscheinlich eine bakterielle Herkunft, was im Einklang mit der Endosymbiontentheorie steht. Die Kenntnis der bakteriellen Proteine ermöglichte durch Homologie-Analysen die Identifikation der ISC Komponenten in Eukaryoten (Balk and Pilon, 2011; Bandyopadhyay et al., 2008a; Lill et al., 2012). Hierbei ähneln sich in Bakterien und Mitochondrien nicht nur die Proteine, sondern auch die Mechanismen der Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthese. Dies trifft auch auf die Art und Weise zu, wie die Fe/S Cluster in die Zielproteine inseriert werden.

Generell kann die Bildung von Fe/S Proteinen in den Mitochondrien in drei wichtige Schritte unterteilt werden (Abb. 4) (Lill, 2009). Zuerst wird ein [2Fe-2S] Cluster auf dem Gerüstprotein Isu1 *de novo* synthetisiert (Gerber et al., 2003; Gerber et al., 2004; Muhlenhoff et al., 2003a). Für diese Reaktion werden mehrere Proteine benötigt. Der Nfs1-Isd11 Komplex fungiert als Schwefeldonor, der Cystein zu Alanin umwandelt. Dadurch wird ein reaktives Persulfid auf der Seitenkette eines Cysteins bereitgestellt. Da das Persulfid allerdings im formalen Redoxzustand S^0 vorliegt, muss es in den Redoxzustand S^{2-} überführt werden, damit ein Fe/S Cluster assembliert werden kann. Die dazu notwendigen Elektronen werden durch Reduktionsäquivalente bereitgestellt, indem eine FAD abhängige Ferredoxin-Reduktase ein Ferredoxin unter NAD(P)H Verbrauch reduziert. Möglicherweise überträgt Ferredoxin seine Elektronen dann auf das Persulfid (Adam et al., 2006; Muhlenhoff et al., 2004; Muhlenhoff et al., 2003a; Sheftel et al., 2010b; Wiedemann

et al., 2006). Weiterhin ist das Protein Frataxin involviert, wobei die genaue Funktion nicht bekannt ist. Es wurde zum einen vorgeschlagen, dass Frataxin ein Eisendonor ist (Stemmler et al., 2010; Yoon and Cowan, 2003). Zum anderen weisen *in vitro* Studien auf eine Funktion von Frataxin bei der Regulation der Fe/S Biogenese hin. In Bakterien soll Frataxin die Cystein-Desulfurase IscS inhibieren, und im humanen System als allosterischer Aktivator von Nfs1 fungieren (Adinolfi et al., 2009; Bridwell-Rabb et al., 2012; Tsai and Barondeau, 2010). Im zweiten Transferschritt wird der Fe/S Cluster von Isu1 auf Apo-Fe/S Proteine übertragen. Hierbei bindet Holo-Isu1 an das J-Typ-Ko-Chaperon Jac1, das Isu1 an das ATP abhängige Hsp70 Chaperon Ssq1 führt. Hierbei interagiert Ssq1 spezifisch mit dem LPPVK Motiv von Isu1 (Dutkiewicz et al., 2004; Hoff et al., 2003; Hoff et al., 2000; Hoff et al., 2002). Für diesen Prozess wird zusätzlich noch der Nukleotid-Austauschfaktor Mge1 benötigt. Nach bisherigen Annahmen bewirkt Ssq1, unter Beteiligung von Jac1, eine Konformationsänderung von Isu1, wodurch der Cluster freigesetzt wird (Andrew et al., 2006; Bonomi et al., 2008; Chandramouli and Johnson, 2006; Dutkiewicz et al., 2003). Darauf folgend wird der Fe/S-Cluster von Isu1 transient auf das Monothiol-Glutaredoxin Grx5 übertragen und dann in seine Zielproteine inseriert (Dutkiewicz et al., 2004; Lill et al., 2012; Muhlenhoff et al., 2003a; Shakamuri et al., 2012; Uzarska et al., 2013). Dieses System ist ausreichend zur Bildung einfacher [2Fe-2S] Proteine. [4Fe-4S] Cluster Proteine des Aconitase- und Radikal SAM-Enzym-Typs, wie Aco1, Lys4 und Bio2, benötigen zusätzlich die spezialisierten ISC Assemblierungsproteine Iba57, Isa1 und Isa2 (Gelling et al., 2008; Muhlenhoff et al., 2007; Muhlenhoff et al., 2011; Sheftel et al., 2009; Sheftel et al., 2012). Für die Maturierung einiger bestimmter Zielproteine sind aber noch die Proteine Ind1, Nfu1 und Aim1 essenziell. Die P-Loop NTPase Ind1, Nfu1 und möglicherweise Aim1 assemblieren spezifisch einen Fe/S Cluster auf dem Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Nfu1 hat weiterhin eine Funktion bei der Maturierung der Lipoat-Synthase und der Succinat-Dehydrogenase (Bych et al., 2008; Navarro-Sastre et al., 2011; Sheftel et al., 2009). Zusätzlich wird für die Biogenese von Fe/S Proteinen in den Mitochondrien noch GTP gebraucht (Amutha et al., 2008). Während die Proteine des letzten Schritts nur für die Assemblierung von bestimmten mitochondrialen Proteinen gebraucht werden, sind die beiden ersten Schritte für die Generation aller Eisen-Schwefel-Cluster-

Proteine essenziell (Gerber et al., 2004; Muhlenhoff et al., 2004). Deshalb werden die an den ersten beiden Schritten beteiligten Proteinen auch als Kern-ISC-Assemblierungs-Maschinerie bezeichnet (Kispal et al., 1999; Lange et al., 2001; Netz et al., 2012b). Es wird vermutet, dass die ISC Kernmaschinerie eine Schwefel-haltige lösliche Komponente X synthetisiert, die von der ISC-Exportmaschinerie ins Cytosol transportiert, und von der so genannten CIA (**C**ytosolic **I**ron-Sulfur-Cluster **A**ssembly) Maschinerie für die Biogenese von Fe/S Proteinen des Cytosols und des Nukleus genutzt wird (Kispal et al., 1999; Lill, 2009). Die ISC Export Maschinerie ist von dem Tripeptid Glutathion (GSH) abhängig und zu ihr zählen der ABC Transporter Atm1 und die Sulfhydryl-Oxidase Erv1 (Lange et al., 2001; Lill et al., 2012; Sipos et al., 2002). Bislang konnte diese lösliche Komponente X allerdings nicht identifiziert werden. Da Nfs1 als Schwefeldonor in den Mitochondrien gebraucht wird, um die Assemblierung von Fe/S Proteinen im Cytosol und im Nukleus zu ermöglichen, enthält wahrscheinlich die lösliche Komponente den Schwefel, der von der CIA Maschinerie genutzt und in Eisen-Schwefel-Cluster Proteine des Cytosols eingebaut wird (Biederbick et al., 2006; Kispal et al., 1999; Muhlenhoff et al., 2004; Sipos et al., 2002).

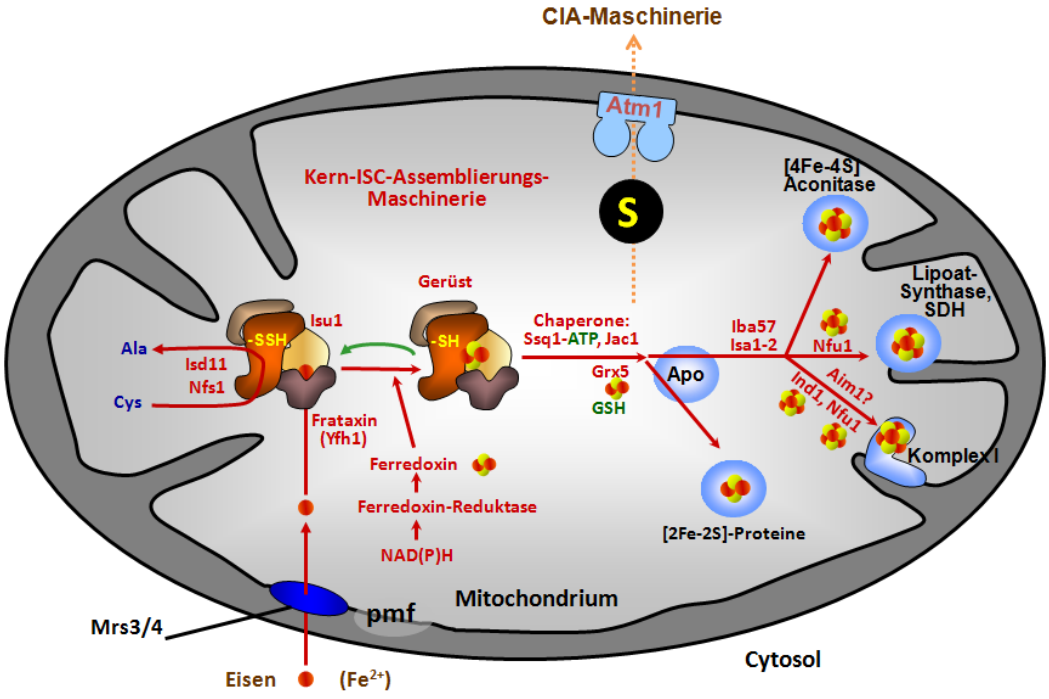

Abbildung 4. Die Biogenese von Eisen-Schwefel-Cluster-Proteinen in Hefen. Die Biogenese von mitochondrialen Fe/S Proteinen beginnt mit der *de novo* Synthese eines Fe/S Clusters auf Isu1. Das

Persulfid wird von dem Isd11-Nfs1 Komplex bereitgestellt und wahrscheinlich durch das Ferredoxin reduziert, wobei die Elektronen durch die Ferredoxin-Reduktase geliefert werden. Die Freisetzung des Clusters von Isu1 wird durch das ATP abhängige Chaperon Ssq1, dem DnaJ artigen Co-Chaperon Jac1 und dem Nukleotid-Austauschfaktor Mge1 erleichtert. Der Cluster wird dann auf Grx5 transient übertragen und in die Zielproteine inseriert. Für die Biogenese von [4Fe-4S] Cluster Proteinen werden noch zusätzlich die Proteine Iba57, Isa1 und Isa2 benötigt. Weiterhin haben die Proteine Nfu1, Aim1 und Ind1 eine Funktion bei der Maturierung des Komplexes I. Nfu1 hat darüber hinaus eine Funktion bei der Maturierung der Lipoat-Synthase und der Succinat-Dehydrogenase. Von der ISC-Kernmaschinerie wird die Komponente X synthetisiert, welche durch den Transporter Atm1 ins Cytosol transportiert wird. Von der CIA Maschinerie wird diese Komponente genutzt um Fe/S Cluster auf Zielproteine des Cytosols und des Nukleus zu assemblieren. Entnommen aus (Lill et al., 2012).

Bis zu diesem Zeitpunkt sind 8 Proteine bekannt, die zusammen die cytosolische CIA (**C**ytosolic **I**ron-Sulfur Cluster **A**ssembly) Maschinerie bilden (Lill, 2009; Netz et al., 2010). Diese Komponenten zeigen keine Sequenz-Homologie zu den Proteinen der ISC Maschinerie und ihre Depletion hat keinen Effekt auf die Assemblierung von mitochondrialen Fe/S Proteinen. Allerdings findet man ähnliche biochemische Prinzipien bei der Bildung und Insertion von Fe/S Clustern in Apo-Proteine des Cytosols und des Nukleus. Zuerst wird auf dem Heterotetramer Cfd1-Nbp35 ein [4Fe-4S] Cluster synthetisiert. Damit fungiert dieser Komplex als Gerüst für den Cluster-Aufbau (Abb. 5) (Netz et al., 2012a; Netz et al., 2007). Um einen stabilen Fe/S Cluster auf Nbp35 zu synthetisieren, wird die Diflavin-Reduktase Tah18 und das Fe/S Protein Dre2 benötigt, welche zusammen mit NADPH eine Elektrontransportkette bilden (Netz et al., 2010; Zhang et al., 2011). Im zweiten Schritt wird der Fe/S Cluster von dem Cfd1-Nbp35 Gerüst mit Hilfe der Proteine Nar1, Cia1, Mms19 und Cia2 auf Apo-Proteine transferiert, wobei der genaue molekulare Mechanismus noch nicht bekannt ist (Abb. 5) (Balk et al., 2005; Balk et al., 2004; Shakamuri et al., 2012; Stehling et al., 2012; Urzica et al., 2009). Die Komponenten der CIA Maschinerie sind in nahezu allen Eukaryoten konserviert und die meisten von ihnen sind essenziell (Lill, 2009; Netz et al., 2010).

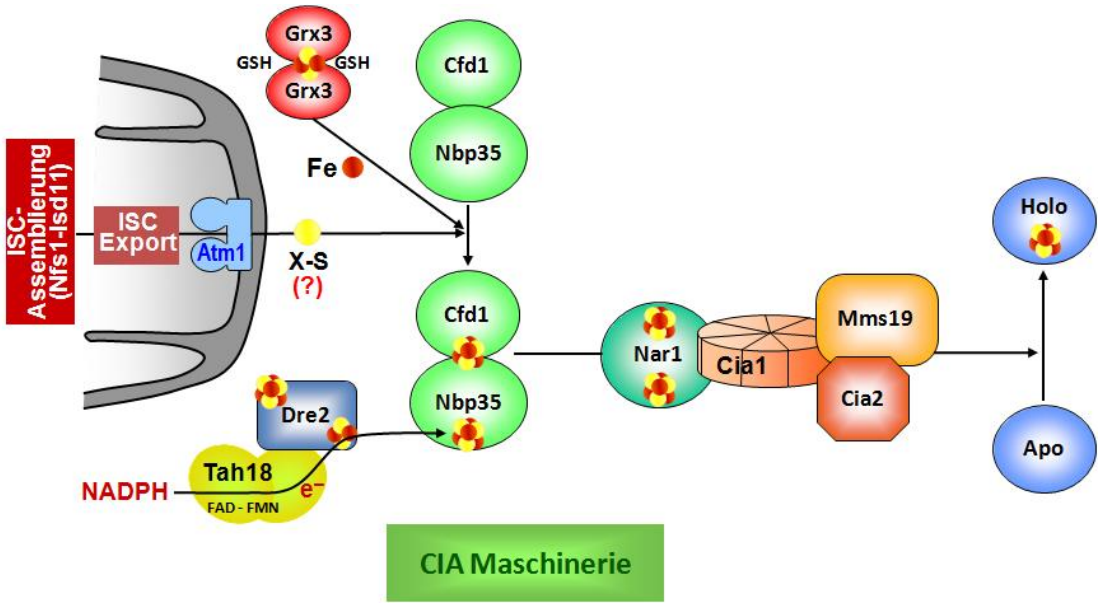

Abbildung 5. Die Funktion der Mitochondrien und der CIA Maschinerie in der Biogenese von Fe/S Proteinen des Cytosols und des Nukleus. Die ISC Kernmaschinerie synthetisiert die schwefelhaltige lösliche Komponente X, welche durch die ISC Exportmaschinerie, die aus Atm1 und Erv1 besteht, GSH abhängig ins Cytosol transportiert wird. Im Cytosol wird X verwendet um einen Fe/S Cluster auf dem Cfd1-Nbp35 Gerüstkomplex zu assemblieren. Tah18 und Dre2 bilden eine Elektronentransportkette die Elektronen für die Assemblierung auf dem Gerüstkomplex liefern. Mit Hilfe der Proteine Cia1, Cia2 und Nar1 werden die Fe/S Cluster dann in die Ziel-Apo-Proteine inseriert. Modifiziert nach (Lill, 2009).

1.4 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Eisenhomöostase

Die ISC Kernmaschinerie spielt aber auch eine wichtige Rolle für die Regulation des intrazellulären Eisengehalts. Ist einer ihrer Komponenten nicht funktionsfähig oder fehlt ganz, kommt es zu einer Akkumulation von Eisen innerhalb der Mitochondrien (Lill, 2009). Einen ähnlichen Phänotyp haben auch Hefe-Zellen, bei denen der ABC Transporter Atm1 deletiert ist. Atm1 ist in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert. Auch diese Zellen akkumulieren Eisen in den Mitochondrien, wobei kein Defekt in der Maturierung von mitochondrialen Fe/S Proteinen vorliegt (Kispal et al., 1999). Aus diesem Grund hat die Komponente X wahrscheinlich einen Einfluss auf den Eisen-regulierten Transkriptionsfaktor Aft1. Ist kein X im Cytosol vorhanden, so aktiviert Aft1 die Transkription der Gene des Eisenregulons, was zu einer erhöhten zellulären Eisenaufnahme führt. Das Eisen wird dann von den Transportern Mrs3

und Mrs4 über die innere Membran der Mitochondrien transloziert (Froschauer et al., 2009; Muhlenhoff et al., 2003b). Daher scheint die von Atm1 exportierte Komponente nicht nur eine Rolle in der cytosolischen Fe/S Cluster Assemblierung zu spielen, sondern auch als Sensormolekül zu dienen, welches die zelluläre Eisenregulation beeinflusst. Weiterhin hat in *S. cerevisiae* die Depletion der CIA Komponenten keinen Einfluss auf die Regulation des Eisenmetabolismus (Lill, 2009).

In Vertebraten wird der Eisenmetabolismus hauptsächlich posttranskriptionell durch die beiden Proteine IRP1 und IRP2, wie in Kapitel 1.2 beschrieben, geregelt. IRP2 wird unabhängig von den ISC und CIA Maschinerien reguliert (Hentze et al., 2010). IRP1 dagegen kann einen [4Fe-4S] Cluster binden und hat dann die Funktion einer cytosolischen Aconitase. Wird allerdings kein Fe/S Cluster auf IRP1 assembliert, so bindet das Protein an IREs von mRNAs (Anderson et al., 2012; Hentze et al., 2010). Die Rolle von IRP1 erklärt, warum auch Kern-ISC Komponenten einen Einfluss auf die Regulation des Eisenmetabolismus ausüben. Darüber hinaus erfordert die Maturierung von Holo-IRP1 auch die CIA Maschinerie, was einen deutlichen Unterschied zu der Regulation der Eisenhomöostase in Hefen darstellt.

Einen Einfluss auf den Eisenmetabolismus in *S. cerevisiae* haben allerdings die cytosolischen Glutaredoxine Grx3 und Grx4. Ein Fehlen dieser Proteine hat eine konstitutive Expression der Gene zur Folge, die bei der zellulären Eisenaufnahme eine Rolle spielen. Hierbei interagieren Grx3-4 mit dem Eisen-regulierten Transkriptionsfaktor Aft1 und regulieren dessen Aktivität (Ojeda et al., 2006; Philpott et al., 1998; Ueta et al., 2012; Yamaguchi-Iwai et al., 2002) (siehe Kapitel 1.10). Weiterhin haben Grx3-4 eine generelle Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine (siehe Kapitel 1.11). Da diese Funktion möglicherweise auch in Vertebraten konserviert ist, stellen Glutaredoxine eine zentrale Komponente des zellulären Eisenmetabolismus dar (Haunhorst et al., 2010; Li et al., 2012a; Li and Outten, 2012; Muhlenhoff et al., 2010).

1.5 Glutaredoxine und ihre Funktionen

Glutaredoxine gehören zu der hoch konservierten Thioredoxin Superfamilie und viele von ihnen haben eine Funktion im Eisenmetabolismus (Herrero et al., 2008; Holmgren et al., 2005; Izquierdo et al., 2008). Klassische Glutaredoxine sind kleine Glutathion (GSH): Disulfid-Oxidoreduktasen. Diese katalysieren die Glutathionylierung und Deglutathionylierung von Zielproteinen. Damit haben sie eine wichtige Funktion bei der Regulation der zellulären Redoxbalance, da GSH den zellulären Redoxstatus bestimmt. Dabei liegt GSH in der Zelle in millimolaren Konzentrationen vor. Das Redoxpotential der Zelle ist hauptsächlich von dem Verhältnis von GSH zu GSSG abhängig (Berndt et al., 2008; Herrero et al., 2006; Holmgren et al., 2005; Lillig et al., 2008; Mieyal et al., 2008; Rouhier, 2010; Shelton et al., 2005).

1.6 Klassifikation von Glutaredoxinen

Traditionell richtet sich die Nomenklatur der Glutaredoxine nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung in verschiedenen Spezies. Daher gibt der Name eines Glutaredoxins leider nicht an, zu welcher Klasse es gehört. Ein neues, auf strukturellen, biochemischen Eigenschaften und zellulären Funktionen beruhendes Klassifikations-System, wäre daher hilfreich. Basierend auf dem phylogenetischen Verwandtschaftsgrad, sowie der Sequenz- und Domänen-Struktur, können zwei Hauptgruppen von Glutaredoxinen unterschieden werden (Abb. 6).

Die erste ist die Gruppe der Dithiol-Glutaredoxine, die in ihrem aktiven Zentrum die Konsensus-Sequenz Cys-Pro-Tyr-Cys aufweisen. Die zweite Gruppe sind die Monothiol-Glutaredoxine und diese besitzen die Cys-Gly-Phe-Ser Konsensus-Sequenz in ihrem aktiven Zentrum. Die meisten Monothiol-Glutaredoxine haben aber auffälligerweise nur eine sehr geringe Oxidoreduktase-Aktivität. (Herrero and de la Torre-Ruiz, 2007; Lillig et al., 2008; Rouhier, 2010). Die Monothiol-Glutaredoxine können weiterhin in Einzeldomänen Glutaredoxine, die nur aus einer Glutaredoxindomäne bestehen, und Multidomänen Glutaredoxine, welche aus einer N-terminalen Thioredoxin-Domäne und einer (Pilze), zwei (Vertebraten) oder drei

(Pflanzen) C-terminalen Glutaredoxin-Domänen aufgebaut sind (Alves et al., 2009; Herrero and de la Torre-Ruiz, 2007; Rouhier, 2010).

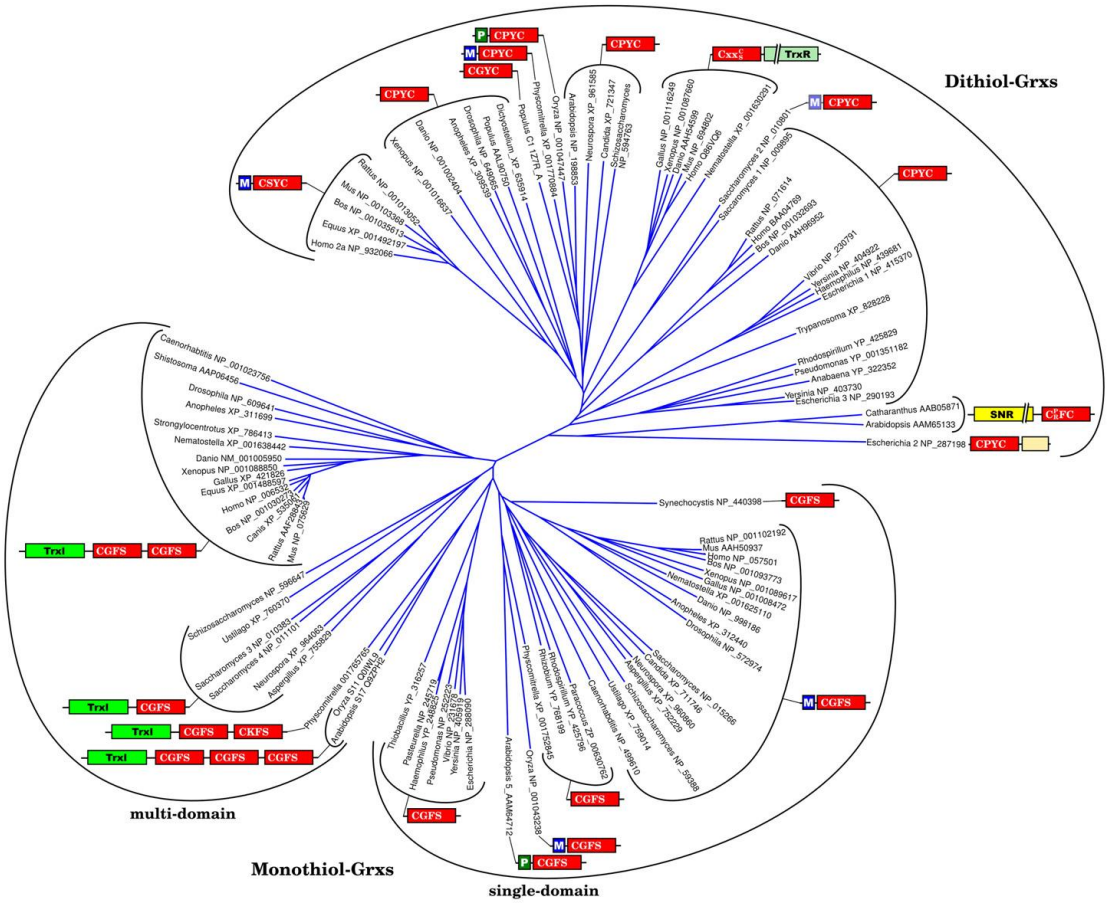

Abbildung 6. Die Klassifikation von Glutaredoxinen basierend auf der Phylogenie, der Sequenz im aktivem Zentrum und der Domänen-Struktur. Die Glutaredoxin-Domäne ist in Rot dargestellt. M: mitochondriales Signalpeptid; P: Plastid Signalpeptid; SNR: Sulfonukleotid−Reduktase; Trxl: Thioredoxin artiges; TrxR: Thioredoxin-Reduktase. Entnommen aus (Lillig et al., 2008).

Dithiol- und Einzeldomänen-Glutaredoxine kommen in allen Reichen des Lebens vor, während die Multidomänen Glutaredoxine nur in Eukaryoten vorkommen. Glutaredoxine können auch direkt mit anderen Proteinen fusioniert gefunden werden. Zum Beispiel gibt es in Pflanzen eine Gruppe von Sulfonukleotid-Reduktasen, die C-terminal mit einem Glutaredoxin fusioniert sind. Das Glutaredoxin fungiert hierbei als interner Elektronendonor, der Elektronen von GSH akzeptiert. Ein Subtyp der Thioredoxin-Reduktasen enthält eine N-terminale Glutaredoxin

Domäne, wobei in einigen Fällen das C-terminale Cystein im aktiven Zentrum während der Evolution verloren wurde (Sun et al., 2001).

Glutaredoxine repräsentieren eine eher heterogene Proteinfamilie und viele Organismen haben einzigartige Zusammenstellungen dieser Proteine (Abb. 7). *E. coli* besitzt vier Glutaredoxine: Zwei klassische Dithiol-Glutaredoxine (Grx1 und Grx3), ein ungewöhnliches Dithiol-Glutaredoxin (Grx2) und ein Monothiol-Glutaredoxin (Grx4) (Fernandes and Holmgren, 2004; Vlamis-Gardikas, 2008; Vlamis-Gardikas and Holmgren, 2002). Grx1 kann als Elektronendonor für Enzyme wie die Ribonukleotid-Reduktase (Rnr) oder die Phosphoadenylylsulfat-Reduktase dienen. Es ist aber auch in Reaktionen aktiv, die nach dem Monothiol-Mechanismus (siehe Kapitel 1.7) ablaufen. Die Funktion von Grx3 ist nicht bekannt und es kann den Verlust von Grx1 nicht kompensieren. Grx2 besteht aus einer N-terminalen Glutaredoxin-Domäne und einer C-terminalen alpha-helikalen Domäne. Dieses Protein hat eine ähnliche Struktur wie die Proteine der GSH-S-Transferase Familie.

S. cerevisiae besitzt zwei klassische Dithiol-Glutaredoxine (Grx1 und Grx2), die an der Erhaltung des korrekten Redoxpotentials der Zelle bei Oxidativem Stress beteiligt sind (Herrero et al., 2008; Herrero et al., 2006; Luikenhuis et al., 1998). Zusätzlich hat *S. cerevisiae* ein ungewöhnliches Dithiol-Glutaredoxin (Grx8) und drei Monothiol-Glutaredoxine (Grx3, Grx4 und Grx5) mit einem kanonischen CGFS Motiv im aktiven Zentrum. Zwei weitere Glutaredoxine, mit nicht kanonischen CSYS- (Grx6) und CPYS (Grx7) Motiven im aktiven Zentrum, weisen eine cis-Golgi Lokalisation auf, und können, genau wie die Dithiol Glutaredoxine, Dithioldisulfid-Redox-Reaktion katalysieren (Izquierdo et al., 2008; Mesecke et al., 2008).

Humane Zellen beinhalten vier Glutaredoxine. Das cytosolische Dithiol-Grx1 ist ein Homolog zu dem Grx1 aus *E. coli*. Das hauptsächlich mitochondrial lokalisierte Grx2 (Grx2a) ist möglicherweise ein Redoxsensor und hat ein Cys-Ser-Tyr-Cys Motiv im aktiven Zentrum (Lillig et al., 2005). Nach bisherigen Annahmen ermöglicht die Modifikation von einem Prolin zu Serin im aktiven Zentrum es dem Protein, Elektronen von der Thioredoxin-Reduktase anzunehmen und einen Eisen-Schwefel-Cluster zu komplexieren (Johansson et al., 2004; Lillig et al., 2005). Zellen der Testis und einige Krebszellen exprimieren zusätzlich noch zwei weitere Isoformen, Grx2b

und Grx2c, dieses Proteins. Diese Isoformen sind im Cytosol bzw. im Nukleus lokalisieret. Die Isoform Grx2b bindet keinen Fe/S-Cluster. Das humane Grx3 (PICOT) zeigt Homologie zu den Proteinen Grx3-4 aus *S. cerevisiae.* Das letzte Glutaredoxin in *S. cerevisiae* stellt das mitochondriale Grx5 dar. (Isakov et al., 2000; Witte et al., 2000; Ye and Rouault, 2010).

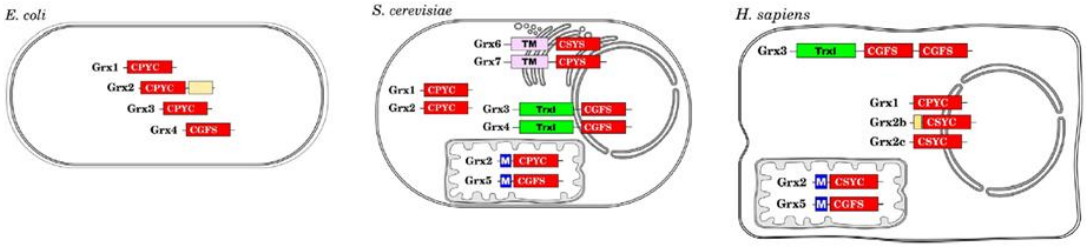

Abbildung 7. Intrazelluläre Verteilung und Domänen-Struktur von Glutaredoxinen aus *E. coli*, *S cerevisiae* und *H. sapiens*. Die Glutaredoxin-Domäne ist in Rot dargestellt. M: mitochondriales Signalpeptid; P: Plastid Signalpeptid; SNR: Sulfonukleotid−Reduktase; Trxl: Thioredoxin artig; TrxR: Thioredoxin-Reduktase. Entnommen aus (Lillig et al., 2008).

1.7 Glutaredoxine und ihre Reaktionsmechanismen

Glutaredoxine sind vielseitige Oxidoreduktasen, welche eine große Anzahl an Substraten reduzieren können, die mindestens eine Komponente mit einer Thiolgruppe aufweisen müssen. Ihre hauptsächliche Funktion besteht darin, Disulfide innerhalb von Proteinen zu reduzieren, um die Funktionsfähigkeit der Proteine zu gewährleisten. Zu der Bildung solcher Disulfidbrücken kann es kommen, wenn die Zelle unter oxidativem Stress leidet, der z.B. durch die mitochondriale Atmungskette oder externen Stimuli ausgelöst werden kann (Hanschmann et al., 2013). Im Eisenmetabolismus spielen Glutaredoxine aber auch eine wichtige Rolle bei der Biogenese von Fe/S Proteinen und der zellulären Eisenhomöostase. Während der Evolution haben sich zwei funktionell verwandte Mechanismen entwickelt; der Dithiol- und der Monothiol-Mechanismus (Abb. 8). Beide Mechanismen hängen von der Affinität eines Proteins zu GSH ab (Bushweller et al., 1992; Gravina and Mieyal, 1993; Holmgren, 1978; Lundstrom-Ljung and Holmgren, 1995; Srinivasan et al., 1997; Yang et al., 1998; Yang and Wells, 1991). Genau wie die Thioredoxine katalysieren die Dithiol-Glutaredoxine die Reduktion von Disulfiden innerhalb von Proteinen, wobei die Cysteinreste in ihrem aktiven Cys-Pro-Tyr-Cys Zentrum eine

entscheidende Rolle spielen. Im ersten Schritt führt das C-terminale Cystein des CPYC-Motivs einen nukleophilen Angriff auf das Ziel-Disulfid durch. Als nächstes wird das gemischte Disulfid, welches sich zwischen den beiden Proteinen gebildet hat, durch das zweite Thiolat ($R\text{-}S^{2-}$) im aktiven Zentrum des Glutaredoxins angegriffen. Das daraus resultierende Disulfid im aktiven Zentrum des Glutaredoxins wird dann durch ein Molekül GSH reduziert. Diese Reaktion führt zu einem gemischten Disulfid zwischen dem N-terminalen Cystein des aktiven Zentrums und GSH. Dieses gemischte Disulfid wird schließlich durch ein zweites Molekül GSH reduziert.

Die Reduktion von Disulfiden, die sich zwischen Proteinen und GSH gebildet haben, braucht prinzipiell nur das N-terminale Cystein im aktiven Zentrum des Glutaredoxins, wie es beim Monothiol-Mechanismus der Fall ist. Hierbei wird ein glutathionyliertes Protein durch ein Glutaredoxin unter NADPH Verbrauch reduziert. Bei dieser Reaktion verlässt präferiert das ursprünglich glutathionylierte Protein die Reaktion und es entsteht ein gemischtes Disulfid zwischen dem N-terminalen Cystein des aktiven Zentrums des Glutaredoxins und GSH. Wie beim Dithiol-Mechanismus wird das Disulfid durch ein zweites GSH Molekül reduziert. Das entstandene Glutathion-Disulfid wird dann durch das Enzym Glutathion-Reduktase unter NADPH Verbrauch reduziert.

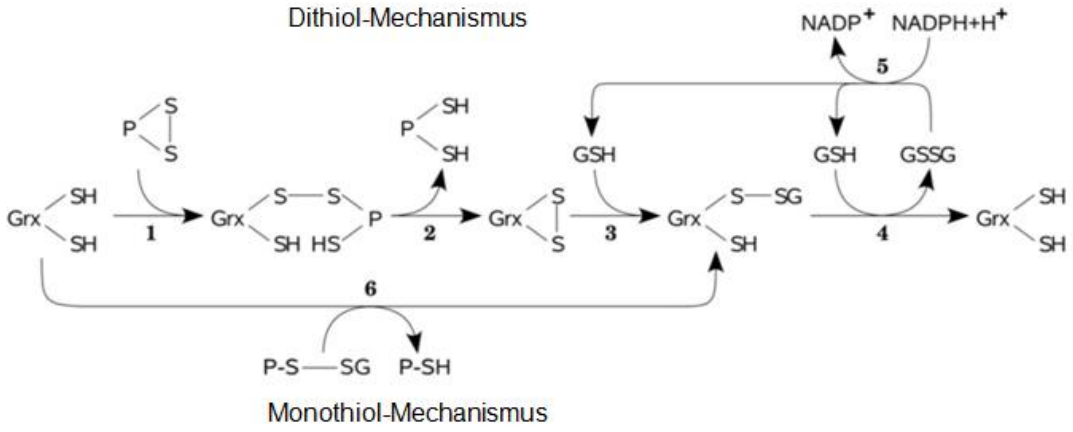

Abbildung 8. Reaktionsmechanismen der Glutaredoxine. Dithiol- und Monothiol-Mechanismus. 1 – 4: Reversible Reduktion von Disulfiden innerhalb von Proteinen über beide Cysteine im aktiven Zentrum (Dithiol-Mechanismus). 6 + 4: Reduktion von Disulfiden zwischen GSH und Grx mit dem N-terminalen Cystein im aktiven Zentrum (Monothiol-Mechanismus). 5: In beiden Fällen wird das GSH-

Disulfid (GSSG) auf Kosten von eines Moleküls NADPH durch die Glutathion-Reduktase (GR) reduziert. Entnommen aus (Lillig et al., 2008).

1.8 Fe/S-Cluster koordinierende Glutaredoxine

Das erste Glutaredoxin, welches als Fe/S Protein beschrieben wurde, war das humane Grx2 (Lillig et al., 2005). Dieses ungewöhnliche Glutaredoxin mit einem Cys-Ser-Tyr-Cys Motiv im aktiven Zentrum, koordiniert einen [2Fe-2S] Cluster, welcher 2 Glutaredoxin-Monomere verbindet. Dieser Holo-Grx2 Komplex ist enzymatisch inaktiv. Wird der Cluster allerdings abgebaut, so könnte das zu der Dissoziation des Holo-Komplexes führen (Lillig et al., 2005). Der langsame Abbau des Cluster unter aeroben Bedingungen wird effizient durch GSH verhindert. GSSG und andere redoxaktive Verbindungen begünstigen allerdings den Abbau des Kofaktors und somit die Aktivierung von Grx2. Der Fe/S Cluster wird dabei durch die Cysteine von zwei Grx2 Monomeren und 2 Molekülen GSH koordiniert, was durch biochemische Analysen gezeigt wurde (Berndt et al., 2007). Genau wie das humane Grx2 kann auch das GrxC1 der Pappel einen dimeren Fe/S Cluster-enthaltenen Holo-Komplex bilden, oder es liegt als Apo-Monomer vor. Das GrxC1 der Pappel besitzt ein Cys-Gly-Tyr-Cys Motiv im aktiven Zentrum. Hierbei ist dieser Holo-Komplex ähnlich wie der Holo-Komplex des humanen Grx2 aufgebaut und besteht aus 2 GrxC1 Monomeren und zwei GSH Molekülen, die durch den Fe/S Cluster verbunden werden (Feng et al., 2006; Rouhier et al., 2007). Bisher wurden nur zwei physiologische Funktionen von Glutaredoxinen, die einen Fe/S Cluster binden können, identifiziert. Sie spielen eine Rolle in der Biogenese von zellulären Fe/S Proteinen (Couturier et al., 2009a; Rouhier, 2010) und sie haben eine zentrale Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine (Muhlenhoff et al., 2010).

1.9 Die Rolle von Grx5 bei der Biogenese mitochondrialer Fe/S Proteine

Das mitochondriale Einzeldomänen Monothiol-Glutaredoxin Grx5 ist in allen Eukaryoten konserviert und hat wahrscheinlich einen bakteriellen Ursprung (Herrero and de la Torre-Ruiz, 2007). In *S. cerevisiae* spielt Grx5 eine entscheidende Rolle beim Schutz der Mitochondrien vor oxidativem Stress (Herrero et al., 2008; Rodriguez-Manzaneque et al., 1999). Neben der Funktion bei der Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffspezies (Reaktive Oxygen Spezies; ROS) spielt Grx5 aber auch eine Rolle in der ISC Maschinerie. Die Deletion von Grx5 hat Assemblierungsdefekte von Fe/S Proteinen zur Folge. Weiterhin kommt es zu einer Akkumulation von Fe/S Clustern auf dem Gerüstprotein Isu1. Folglich hat Grx5 eine Funktion in der Biogenese von zellulären Fe/S Proteinen. Diese Funktion ist ebenfalls in Vertebraten konserviert (Camaschella et al., 2007; Lill and Muhlenhoff, 2008; Muhlenhoff et al., 2003a; Rodriguez-Manzaneque et al., 1999; Tamarit et al., 2003; Wingert et al., 2005; Ye et al., 2010).

Grx5 ist das am besten charakterisierte Glutaredoxin, welches einen labilen [2Fe-2S] Cluster binden kann (Bandyopadhyay et al., 2008b; Iwema et al., 2009; Johansson et al., 2011; Picciocchi et al., 2007; Rouhier, 2010; Rouhier et al., 2010). I*n vitro* konnte der von ISU1 transient gebundene Fe/S Cluster auf Grx5 übertragen werden (Shakamuri et al., 2012). Dabei stammten beide Proteine aus dem Bakterium *Azotobacter vinelandii*. Da Grx5 durch andere Fe/S Cluster bindende Glutaredoxine aus anderen Spezies funktionell ersetzt werden kann, könnten die mitochondrialen Monothiol-Glutaredoxine Transferproteine sein, die für die Insertion von Fe/S Clustern in Empfänger Apo-Proteine verantwortlich sind (Bandyopadhyay et al., 2008a; Bandyopadhyay et al., 2008b; Molina-Navarro et al., 2006; Rouhier et al., 2010; Shakamuri et al., 2012).

1.10 Die Funktion von Grx3-4 in der zellulären Eisenhomöostase

In *S. cerevisiae* ist die Interaktion von Aft1 mit den cytosolischen Monothiol Glutaredoxinen Grx3-4 essenziell für eine korrekte Regulation des Eisen-regulierten Transkriptionsfaktors Aft1 (Pujol-Carrion et al., 2006; Ueta et al., 2012). Grx3-4

binden einen Fe/S Cluster, der als cytosolischer Sensor der Eisenkonzentration fungiert. Die Koordination des Clusters erfolgt dabei durch die Cysteine der aktiven Zentren von zwei Grx Monomeren und zwei Molekülen GSH. Wenn Grx3-4 keinen Fe/S Cluster gebunden haben, induziert Aft1 die Transkription der Gene des Eisenregulons. Diese bewerkstelligen die Eisenaufnahme über die Plasmamembran. Liegt aber wieder ausreichend intrazelluläres Eisen vor, so binden Grx3-4 einen Fe/S Cluster und inaktivieren Aft1 im Nukleus. (Castells-Roca et al., 2011; Ojeda et al., 2006; Pujol-Carrion et al., 2006; Rutherford et al., 2005; Ueta et al., 2012; Yamaguchi-Iwai et al., 2002). Diese regulatorische Funktion von cytosolischen Monothiol-Glutaredoxinen in der zellulären Eisenhomöostase ist unter Pilzen konserviert, obwohl nur wenige Pilze ein mit Aft1 vergleichbares Regulatorsystem haben (Haas, 2012; Jbel et al., 2009; Kim et al., 2011; Labbe et al., 2007; Mercier and Labbe, 2009; Muhlenhoff et al., 2010; Peggion et al., 2008; Vachon et al., 2012). Pilze ohne einen Aft1 artigen Transkriptionsfaktor besitzen transkriptionelle Repressoren, dessen Aktivität ebenfalls von Grx3-4 artigen Proteinen reguliert wird (Haas et al., 2008; Hortschansky et al., 2007; Mercier and Labbe, 2009; Vachon et al., 2012). Grx3-4 bilden *in vitro* mit dem Protein Fra2 ein Heterodimer, der einen überbrückten [2Fe-2S] Cluster enthält (Li et al., 2009). Bei der Koordination des Fe/S Cluster dient das Histidin 103 von Fra2 als Ligand und der gebildete Heterodimer hat eine Funktion bei der Regulation des Eisenmetabolismus *in vivo* (Kumanovics et al., 2008; Li et al., 2011a). Weiterhin können die humanen Proteine Grx3 und BolA2 ebenfalls *in vitro* ein Fe/S Cluster bindendes Heterodimer bilden (Li et al., 2012a). Da die humanen Proteine Grx3 und BolA2 Homologie zu den *S. cerevisiae* Proteinen Grx3-4 und Fra2 aufweisen, wird diskutiert, ob möglicherweise diese beiden Proteine auch im Menschen eine Funktion bei der Regulation der Eisenhomöostase haben (Li et al., 2012a).

1.11 Die Rolle von Grx3 und Grx4 bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine

Grx3-4 sind die intrazellulären Eisensensoren für den Eisen-regulierten Transkriptionsfaktor Aft1. Allerdings ist die Deletion von Aft1 in *S. cerevisiae* nicht

letal, während niedrige Mengen von Grx3-4 den Zelltod zur Folge haben (Muhlenhoff et al., 2010; Ojeda et al., 2006; Yamaguchi-Iwai et al., 2002). Der essenzielle Charakter von Grx3-4 muss also in einer anderen zellulären Funktion liegen. Daher wurde analysiert, wie sich die Depletion dieser cytosolischen Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine auf den Eisenmetabolismus auswirkt. Das Fehlen von Grx3-4 bewirkte den Verlust der Aktivitäten aller Eisen-Schwefel-Cluster Enzyme, da kein Kofaktor mehr in diese Proteine inseriert wurde (Muhlenhoff et al., 2010). Davon waren Fe/S Proteine des Cytosols (z.B. Rli1), des Nukleus (z.B. Rnr2) und der Mitochondrien (z.B. die Aconitase) betroffen. Darüber hinaus konnte Eisen nicht mehr in den essenziellen Kofaktor Häm eingebaut werden, was zu dem Funktionsverlust der Häm-abhängigen Katalase führte. Ebenso wurde auch in Eisen-abhängige Enzyme, wie z.B. Rnr2, kein dinukleäres Eisen mehr inseriert. Allerdings lag eine hohe Konzentration an cytosolischen Eisen vor, während in den Mitochondrien die Eisenkonzentration um den Faktor 2,3 bis 7,5 reduziert war (Muhlenhoff et al., 2010). Dieser Effekt war auch spezifisch für Eisen, da andere Metalle, wie Zink, korrekt in die Zielproteine inseriert wurden. Z.B. verlor die Eisen-abhängige Superoxid-Dismutase (FeSod) aus *E. coli* ihre Aktivität, wenn dieses Protein in Grx3-4 depletierten Zellen überexprimiert wurde. Dagegen war die Kupfer/Zink-Sod1 immer noch funktionsfähig, was durch Aktivitätsmessungen gezeigt wurde. Aus diesen Fakten wurde geschlossen, dass Grx3-4 eine essenzielle, generelle Funktion bei der Umwandlung von Eisen aus dem „labilen Eisenpool“ in eine bioverfügbare Form und der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine haben (Abb. 9) (Muhlenhoff et al., 2010). Weiterhin kann Grx3-4 einen ungewöhnlichen [2Fe-2S] Cluster binden, der von zwei Grx Monomeren und zwei Molekülen GSH koordiniert wird. Für die Bindung des Fe/S Kofaktors ist nur das Cystein im aktiven Zentrum des Glutaredoxins absolut essenziell. Die Destabilisierung der Cluster Bindung hat genau den gleichen letalen Phänotyp wie die Depletion von Grx3-4 (Muhlenhoff et al., 2010). Diese Tatsache macht die cytosolischen Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine Grx3-4 zu einem hervorragenden Modell um die Eisen-Schwefel-Cluster Bindung an Glutaredoxine *in vivo* zu untersuchen. Das humane Grx3, welches Homologie zu Grx3-4 aus *S. cerevisiae* aufweist, ist ebenfalls ein Fe/S bindendes Protein (Haunhorst et al., 2010).

Weiterhin stellen Grx3-4 einige der wenigen Beispiele dar, bei denen die tatsächliche physiologische Funktion aufgeklärt werden konnte.

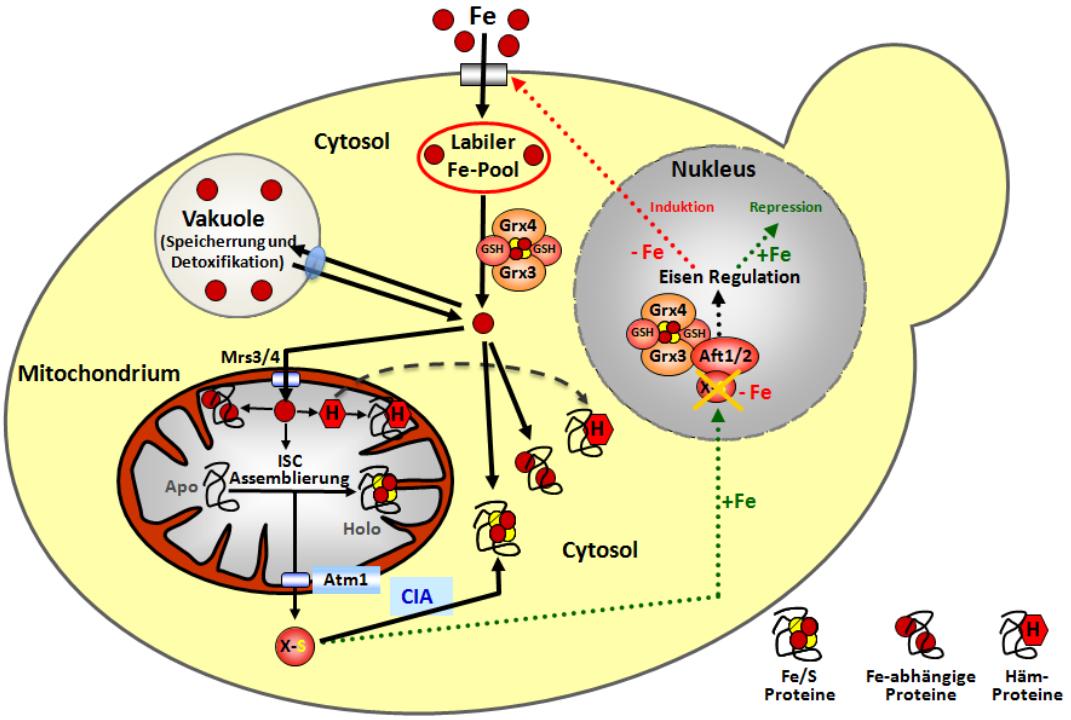

Abbildung 9. Die Funktion der Monothiol-Glutaredoxine Grx3-4 aus *S. cerevisiae* bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine. Nachdem Eisen in die Zelle aufgenommen wurde, wandeln Grx3-4 das Eisen aus dem hypothetischen labilen Eisenpool in eine bioverfügbare Form um, und transportieren es zu Eisen-abhängigen Enzymen und Zellorganelen, wie die Mitochondrien, wo die Synthese von Fe/S Clustern und dem Häm Kofaktor stattfindet (schwarze Pfeile). Der an Grx3-4 gebundene Fe/S Cluster (gelbe und rote Kreise) ist für diese Funktion essenziell. Die Regulation wird durch den Eisen-regulierten Transkriptionsfaktor Aft1, Grx3-4 und dem Signalmolekül X gesteuert. X wird dabei aus den Mitochondrien durch den ABC Transporter Atm1 exportiert. Fehlen Grx3-4 oder liegt ein Eisenmangel vor, so translociert Aft1 in den Nukleus und aktiviert dort die Transkription der Gene des Eisenregulons, die bei der Aufnahme von Eisen über die Plasmamembran eine Rolle spielen. Der an Grx3-4 gebundene Fe/S Cluster ist dabei der Sensor für den intrazellulären Eisengehalt (Kaplan and Kaplan, 2009). Entnommen aus (Muhlenhoff et al., 2010).

1.12 Voraussetzungen zur Fe/S Cluster Bindung von Glutaredoxinen

Da einige Glutaredoxine einen Eisen-Schwefel-Cluster binden können, stellt sich die Frage, was die Anforderrungen für die Stabilisierung des Kofaktors sind. Nach bisherigen Annahmen können das humane Grx2 sowie das GrxC1 aus der Pappel

einen dimeren Eisen-Schwefel Cluster enthaltenen Holo-Komplex bilden, da diese kein Prolin in ihrem Aktiven Zentrum aufweisen. Folglich hat also der Austausch von Prolin zu Serin (hGrx2) bzw. Prolin zu Glycin (Pappel-GrxC1) den Proteinen die Fähigkeit verliehen, einen Fe/S Kofaktor zu binden. Anscheinend verleiht dieser Austausch dem aktiven Zentrum eine höhere Flexibilität, so dass genug Raum zur Bindung von nicht kovalent gebundenen GSH zur Verfügung steht. Dies ermöglicht die Koordination eines Fe/S Clusters. Untermauert wird diese Annahme durch die Analysen des humanen Grx1, welches ein Cys-Pro-Tyr-Cys Motiv aufweist und keinen Fe/S Kofaktor binden kann. Wird das Prolin im aktiven Zentrum durch ein Serin ausgetauscht, so kann dieses Protein *in vitro* einen Eisen-Schwefel-Cluster komplexieren (Berndt et al., 2007). Möglicherweise sind alle Glutaredoxine in Pflanzen, welche ein Glyzin statt ein Prolin im aktiven Zentrum ausweisen, in der Lage einen Fe/S Kofaktor zu komplexieren, worauf weitere Mutagenesestudien mit Glutaredoxinen aus der Pappel hinweisen. Darüber hinaus existieren in photosynthetisch aktiven Organismen weitere Glutaredoxin Varianten, die einen Eisen-Schwefel-Cluster binden können (Couturier et al., 2009a; Rouhier, 2010; Rouhier et al., 2007). Weiterhin scheint auch das humane Grx2 *in vivo* einen Fe/S Cluster binden zu können, da in zwei Zelllinien zusammen mit Grx2 radioaktives ^{55}Fe koimmunopräzipitiert werden konnte (Lillig et al., 2005).

1.13 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine Grx3-4 spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der intrazellulären Eisenhomöostase und haben eine generelle, essenzielle Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine. Daraus ergab sich die Fragestellung, in wie weit sich die Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine von den Einzeldomänen Monothiol- und Dithiol-Glutaredoxinen strukturell und funktionell unterscheiden. Dies sollte unter anderem im Rahmen der vorgelegten Dissertation detailliert untersucht werden. Als erstes sollte analysiert werden, welche Vorrausetzungen das aktive Zentrum von Grx3-4 erfüllen muss, um einen Fe/S Cluster koordinieren zu können. Ziel war es, die Aminosäurereste des aktiven Zentrums von Grx4 durch andere natürlich vorkommende Aminosäurereste zu ersetzen und diese Grx4 Varianten auf ihre Fähigkeit zu untersuchen, Eisen *in vivo* zu binden. Weiterhin sollte auch analysiert werden, ob diese Grx4 Proteine noch funktionell in Bezug auf die Regulation der intrazellulären Eisenhomöostase sowie die generelle Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine sind. Im nächsten Schritt sollte dann die Rolle der Thioredoxindomäne von Grx3-4 untersucht werden. Dabei sollte geklärt werden ob die einzelnen Domänen von Grx3-4 noch funktionsfähig sind und ob die Multidomänen Glutaredoxine durch Einzeldomänen Glutaredoxine ersetzt werden können. Durch die Expression von chimären Proteinen sollten darüber hinaus wichtige Funktionen der einzelnen Domänen aufgezeigt werden. Bei diesen Chimären wurde entweder die Thioredoxin- oder die Glutaredoxin-Domäne durch die korrespondierende Domäne eines Multidomänen Glutaredoxins aus einer anderen Spezies ausgetauscht. Die Funktionalität der so veränderten Proteine sollten dann analysiert werden.

In Vertebraten existieren Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine, die wie das humane Grx3 einen Fe/S Cluster binden können und Homologie zu Grx3-4 aus *S. cerevisiae* aufweisen (Haunhorst et al., 2010). Daher war es naheliegend, die Funktion von Grx3 im Eisenmetabolismus humaner HeLa Zellen zu untersuchen. Über die Funktion von Grx3 in Vertebraten ist leider nur wenig bekannt. Ursprünglich wurde Grx3 als Interaktionspartner der Protein Kinase C-θ identifiziert, weshalb dieses Protein auch **P**rotein Kinase C-**I**nteracting **C**ousin of **T**hioredoxin

(PICOT) genannt wird. In T-Lymphozyten führte die Überexpression von Grx3 zu einer Aktivierung der c-Jun-terminalen Kinase und zu einer Inhibierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB. Daraus wurde gefolgert, dass Grx3 eine Funktion bei der Aktivierung von T-Zellen hat (Witte et al., 2000). Weiterhin interagiert Grx3 mit den Transkriptionsfaktoren „**S**erum **R**esponse **F**actors" (SRFs), die eine Rolle bei der Herzentwicklung spielen (Zhang et al., 2005). Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass Grx3 in Mäusen der Entwicklung einer Herzhypertrophie entgegen wirkt, indem es die Calcineurin-NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells)-Signalkaskade inhibiert (Jeong et al., 2006; Jeong et al., 2008). Zusätzlich spielt Grx3 auch eine Rolle bei der p53 abhängigen neuronalen Zelldifferenzierung (Brynczka and Merrick, 2007).

Zum einen sollten Komplementationsstudien in *S. cerevisiae* durchgeführt werden. Ziel war es zu überprüfen, ob Multidomänen Glutaredoxine aus anderen Spezies die Funktion von Grx3-4 in *S. cerevisiae* übernehmen können. Darüber hinaus sollte die Funktion von Grx3 direkt in Vertebraten untersucht werden. Durch siRNA-basierte Techniken sollte Grx3 in HeLa Zellen depletiert und die Auswirkungen auf Eisen-abhängige Proteine des Cytosols und der Mitochondrien analysiert werden. Dazu sollte im Cytosol die Aconitase-Aktivität von IRP1 bestimmt werden, da dieses Protein als cytosolische Aconitase fungiert, wenn es einen Fe/S Cluster gebunden hat. Weiterhin hat IRP1 eine Funktion bei der Regulation der intrazellulären Eisenhomöostase (Hentze et al., 2010). Von entscheidender Bedeutung war es daher auch zu untersuchen, ob die Mitochondrien mit ausreichend Eisen versorgt werden. Zu diesem Zweck sollten die Aktivitäten der mitochondrialen Fe/S Cluster- bzw. Häm-abhängigen Enzyme Aconitase, Succinat-Dehydrogenase und Cytochrom-c-Oxidase in Grx3-depletierten HeLa Zellen gemessen werden. Da das humane Grx3 möglicherweise, in Analogie zu *S. cerevisiae*, eine Rolle bei der transkriptionellen Regulation der Eisenhomöostase hat, war es darüber hinaus Ziel, dass Transkriptom von Grx3-depletierten Zellen zu untersuchen. Hierbei sollten Microarray-Analysen mit der Gesamt-RNA dieser Zellen durchgeführt werden.

Neben Transkriptionsfaktoren könnten aber auch posttranskriptionelle Prozesse bei der Regulation der Eisenhomöostase eine Rolle spielen. Eisenabhängige Proteine

scheinen in ihrer Stabilität unter Eisenmangel-Bedingungen beeinträchtigt zu sein (Muhlenhoff et al., 2004). Daher spielt vielleicht ein aktiver Abbau dieser Proteine ebenfalls eine Rolle bei der Regulation der Eisenhomöostase. Bei diesem aktiven Abbau haben die Proteine Ubiquitin und Smt3 (Hefe SUMO Homolog) eine zentrale Funktion (Finley et al., 2012; Geoffroy and Hay, 2009). Aus diesem Grund sollten im Modellorganismus *S. cerevisiae* überprüft werden, ob Eisen-abhängige Proteine bei einem induzierten Eisenmangel mit Ubiquitin oder Smt3 modifiziert werden. Hierbei galt es auch zu klären, ob der Verlust des Kofaktors von Fe/S Proteinen möglicherweise das Signal für diese Modifikationen ist. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob es möglich ist, durch Techniken der Proteomik alle Proteine zu identifizieren, die mit Ubiquitin oder Smt3 unter Eisenmangel-Bedingungen modifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Systec V-150	*Systec*
B1A Elektrophorese-System	*Owl Separations Systems*
Blot-Apparatur Sedec M	*Peqlab*
Cellometer AutoT4	*Nexcelom*
Chemostar professional Dokumentationssystem	*Intas*
Easyject Plus Equibio Electroporator	*Equibio*
Experion® Bio-Analyzer System	*Bio-Rad*
Fluoreszenzspektrometer FP-6300	*Jasco*
GDS Dokumentationssystem	*Intas*
pH-Meter UB-10	*Denver Instruments*
Plattenlesegerat Infinite® M200	*Tecan*
Sterilbank Antair BSK	*Cothech*
Thermocycler T3000	*Biometra*
UV/VIS-Spektralphotometer U-550	*Jasco*
Waage PT 1500	*Sartorius*
Waage SBC22	*Saltec*
Wasserbad Lauda m^3	*Lauda*
Zentrifuge Biofuge pico	*Heraeus*
Zentrifuge Fresco 17	*Heraeus*
Zentrifuge Avanti J20 XP	*Beckmann*

2.2 Chemikalien, Enzyme und Größenstandards

2.2.1 Chemikalien

In dieser Arbeit wurden Reagenzien und Chemikalien verwendet die mindestens eine Reinheit von 99 % oder höher aufwiesen. Bezogen wurden die Chemikalien von

Sigma-Aldrich, *Roth*, oder *Merck KGaA*. Darüber hinaus wurden folgende Enzyme von den angegebenen Herstellern verwendet: Phusion® DNA-Polymerase (*Finnzymes*), T4 DNA Ligase (*New England Biolabs*).

2.2.2 Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen *Fermentas* oder *New England Biolabs* bezogen.

2.2.3 Größenstandards

Der in dieser Arbeit verwendete Größenstandard für die Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.8.6) ist das Produkt „GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder“ (*Fermentas*). Als Größenstandard für die SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.9.10) diente das Produkt „SDS Molecular Weight Marker (2,500 – 17,000 Daltons)“ von der Firma Sigma Aldrich oder das Produkt „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ von der Firma *Fermentas*.

2.3 Oligonukleotide

Die verwendeten *Oligonukleotide* wurden von der Firma *Metabion* synthetisiert.

2.3.1 Oligonukleotide die zur Amplifikation von Genen verwendet wurden

Name	Sequenz (5' nach 3')	Zielvektor
Forward_Sc_GRX4	GGGGATCCATGACTGTGGTTG	pCM189, pCM189-pGRX4
Reverse_Sc_GRX4	CTCCTGCAGTTACTGTAGAGCATGTTGGAAATATTC	pCM189, pCM189-pGRX4
Reverse_Sc_GRX4_Myc	GTATCCTGCAGTTACAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTCACTCTGTAGAGCATGTTGGA	pCM189, pCM189-pGRX4
Reverse_Sc_GRX4_SP_C_Term	CTCCTGCAGTTAATTGGGAAGCATCTCTTGCAATTCACCATTTTCAATCATCTCCGAGATAATATCCAAACCTCC	pCM189, pCM189-pGRX4
Forward_Sp_GRX4	GGGGATCCATGAGCGTCGAAATTAC	pCM189, pCM189-pGRX4
Reverse_Sp_GRX4	CTCCTGCAGTTAATTGGGAAGCATC	pCM189, pCM189-pGRX4

Reverse_Sp_GRX4_Myc	GCCCTCCTGCAGTTACAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTCACTATTGGGAAGCATCTCTT	pCM189
Forward_Dm_GRX4	ATTCGCGGATCCATGCCCGTGGTGAACGTGTC	p416MET25
Reverse_Dm_GRX4	GATACCGGAATTCGTAGGAGTAGATGCAATCCG	p416MET25
Forward_Hs_GRX3	GGGGATCCATGGCGGCGGGGGCGGCTG	p416MET25
Reverse_Hs_GRX3	CTCCTGCAGTTAATTTTCTCCTCTCAGTAT	p416MET25

2.3.2 Mutagenese-Oligonukleotide

Name	**Sequenz (5' nach 3')**	**Ausgangs-Vektor**
Forward_CPFS	ATGCCCATTTTCTAGACAGTTAGTTGGTATCCT	GRX4-pCM189, GRX4-Promotor
Reverse_CPFS	AGAAAATGGGCATTTAGGTTCTGATGGGCTTCC	GRX4-pCM189, GRX4-Promotor
Forward_CPYS	ATGCCCATATTCTAGACAGTTAGTTGGTATCCT	GRX4-pCM189, GRX4-Promotor
Reverse_CPYS	AGAATATGGGCATTTAGGTTCTGATGGGCTTCC	GRX4-pCM189, GRX4-Promotor
Forward_CGYS	CGGATATTCTAGACAGTTAGTTGGTATCCT	GRX4-pCM189, GRX4-Promotor
Reverse_CGYS	AGAATATCCGCATTTAGGTTCTGATGGGCT	GRX4-pCM189, GRX4-Promotor
Forward_CSYC	ATGCAGTTATTGTAGACAGTTAGTTGGTATCCTCAG	GRX4-pCM189, GRX4-Promotor
Reverse_CSYC	TCTACAATAACTGCATTTAGGTTCTGATGGGCTTCC	GRX4-pCM189, GRX4-Promotor
Forward_CGFC	ATTTTGTAGACAGTTAGTTGGTATCCTCAG	GRX4-pCM189, GRX4-Promotor
Reverse_CGFC	TCTACAAAATCCGCATTTAGGTTCTGATG	GRX4-pCM189, GRX4-Promotor
Forward_CPFC	ATGCCCATTTTGTAGACAGTTAGTTGGTATCCTCAG	GRX4-pCM189, GRX4-Promotor
Reverse_CPFC	TCTACAAAATGGGCATTTAGGTTCTGATGGGCTTCCT	GRX4-pCM189, GRX4-Promotor
Forward_CPYC	ATGCCCATATTGTAGACAGTTAGTTGGTATCCTCAG	GRX4-pCM189, GRX4-Promotor
Reverse_CPYC	TCTACAATATGGGCATTTAGGTTCTGATGGGCTTCCT	GRX4-pCM189-GRX4-Promotor

Forward_W33D	GTCTTATATTTTAAAGCTCAAGACGCTGATCCTTGCAAAACTATGAG	GRX4-pCM189, GRX4-Promotor
Reverse_W33D	CTCATAGTTTTGCAAGGATCAGCGTCTTGAGCTTTAAAATATAAGAC	GRX4-pCM189, GRX4-Promotor

2.3.3 *Oligonukleotide* zur Konstruktion chimärer Grx4 Varianten

Name	**Sequenz (5' nach 3')**	**Ziel-Vektor**
SpTRX/ScGRX-Chimäre:		
R1_Sp_TRX_Sc_GRX	GCTGCTTTCCTCATCAGAAGTTTCCACGGACGCG	pCM189
F2_Sp_TRX_Sc_GRX	CGCGTCCGTGGAAACTTCTGATGAGGAAAGCAGC	pCM189
ScTRX/SpGRX-Chimäre:		
R1_Sc_TRX_Sp_GRX	CTTTCATTTAGTTCTTCTTCAGTTTCGTCCTC	pCM189
F2_Sc_TRX_Sp_GRX	GAGGACGAAACTGAAGAAGAACTAAATGAAAGGTTG	pCM189
HsTRX/ScGRX-Chimäre:		
R1_Hs_Trx_Sc_GRX	CTGCTTTCCTCATCAGATGCATGTCGCTGAAC	pCM189
F2_Hs_TRX_Sc_GRX	GTTCAGCGACATGCATCTGATGAGGAAAGCAG	pCM189
ScTRX/HsGRX1+2-Chimäre:		
R1_Sc_TRX_Hs_GRX_1+2	CAATTTCTTCAAGCGAAGGTTGAGTTCTTCTTCAGTTTCGTCCTC	pCM189
F2_Sc-TRX_Hs_GRX_1+2	GACGAAACTGAAGAAGAACTCAACCTTCGCTTGAAGAAATTG	pCM189
ScTRX/HsGRX2-Chimäre		
R1_Sc_TRX_Hs_GRX_second	CACTTTGAGCCTTTCCTCTAATTCTTCTTCAGTTTCGTCCTC	pCM189
F2_Sc_TRX_Hs_GRX_second	GAGGACGAAACTGAAGAAGAATTAGAGGAAAGGCTCAAAGTGCTG	pCM189

2.3.4 RNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz (5‘ nach 3‘)	Hersteller
GRX3-SiRNA1	Sense: GCCUAUUCCAGUUGGCCUAtt Antisense: UAGGCCAACUGGAAUAGGCtt	Ambion/Eurogentec
GRX3-SiRNA2	Sense: GGAUGAAGAAGUUCGGCAAtt Antisense: UUGCCGAACUUCUUCAUCCtt	Thermo Scientific
GRX3-SiRNA3	Sense: GUGCACAGAUGAACGAAGUtt Antisense: ACUUCGUUCAUCUGUGCACtt	Thermo Scientific
GRX3-SiRNA4	Sense: GCGCUAAUGAACAUCUUAAtt Antisense: UUAAGAUGUUCAUUAGCGCtt	Thermo Scientific
GRX3-SiRNA5	Sense: CCUCAAGUUUCAUUUGUGAtt Antisense: UCACAAAUGAAACUUGAGGtt	Thermo Scientific
Kontroll-SiRNA	Ambion® *In Vivo* Negative Control #1 siRNA, Katalognummer 4457289	Ambion

2.4 Plasmide

In dieser Arbeit wurden folgende Plasmide für die Expression der angegebenen Gene in *S. cerevisiae* verwendet.

Plasmid	ORF	Tag	Vektor	Promotor	Quelle/ Referenz
pGRX4-GRX4	*S. cerevisiae GRX4*	C-terminal Myc	pCM189 (Gari et al., 1997)	*GRX4* (422bp upstream) *Sma* I/ *Hind* III	(Muhlenhoff et al., 2010)
pCM189-GRX4	*GRX4*	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	(Muhlenhoff et al., 2010)
pCM189-GRX4-C171S	*GRX4*-C171S	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	(Muhlenhoff et al., 2010)
pGRX4-CPFS	*GRX4*-G172P	C-terminal Myc	pCM189	*GRX4*	diese Arbeit
pCM189-GRX4-CPFS	*GRX4*-G172P	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit

pGRX4-CPYS	*GRX4*-G172P, F173Y	C-terminal Myc	pCM189	*GRX4*	diese Arbeit
pCM189-GRX4-CPYS	*GRX4*-G172P, F173Y	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
pGRX4-CGYS	*GRX4*-F173Y	C-terminal Myc	pCM189	*GRX4*	diese Arbeit
pCM189-GRX4-CGYS	*GRX4*-F173Y	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
pGRX4-CSYC	*GRX4*-G172S, F173Y, S174C	C-terminal Myc	pCM189	*GRX4*	diese Arbeit
pCM189-GRX4-CSYC	*GRX4*-G172S, F173Y, S174C	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
pGRX4-CGFC	*GRX4*-S174C	C-terminal Myc	pCM189	*GRX4*	diese Arbeit
pCM189-GRX4-CGFC	*GRX4*-S174C	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
pGRX4-CPFC	*GRX4*-G172P, S174C	C-terminal Myc	pCM189	*GRX4*	diese Arbeit
pCM189-GRX4-CPFC	*GRX4*-G172P, S174C	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
pGRX4-CPYC	*GRX4*-G172P, F173Y, S174C	C-terminal Myc	pCM189	*GRX4*	diese Arbeit
pCM189-GRX4-CPYC	*GRX4*-G172P, F173Y, S174C	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
pGRX4-W33D	*GRX4*-W33D	C-terminal Myc	pCM189	*GRX4*	diese Arbeit
pCM189-GRX4-W33D	*GRX4*-W33D	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
pGRX4-T211R	*GRX4*-T211R	C-terminal Myc	pCM189	*GRX4*	Jose Godoy
pCM189-GRX4-T211R	*GRX4*-T211R	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	Jose Godoy
pGRX4-D226R	*GRX4*-D226R	C-terminal Myc	pCM189	*GRX4*	Jose Godoy
pCM189-GRX4-D226R	*GRX4*-D226R	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	Jose Godoy
pCM189-GRX-Dom	*GRX*-Domäne von *GRX4*	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	Jose Godoy
pCM189-TRX-Dom	*TRX*-Domäne von *GRX4*	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	Jose Godoy

p416-GRX5ΔN	*GRX5* (Δ1-27)	-	p416MET25 (Funk et al., 2002)	*MET25*	diese Arbeit
p416-H.s.GRX3	*H. sapiens GRX3(PICOT)*	-	p416MET25	*MET25*	diese Arbeit
p426-D.m.GRX4	*D. melanogaster GRX4*	-	p426TDH3 (Funk et al., 2002)	*TDH3*	diese Arbeit
p426-S.p.GRX4	*S. pombe GRX4*	-	p426TDH3	*TDH3*	diese Arbeit
pCM189-S.p.GRX4	*S. pombe GRX4*	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
pGRX4-S.p.GRX4	*S. pombe GRX4*	-	pCM189	*GRX4*	diese Arbeit
pH.s.TRX-S.c.GRX	*H. sapiens GRX3* (1-117) + *S. cerevisiae GRX4* (125-244)	-	pCM189	*GRX4*	diese Arbeit
pCM189-hTRX-S.c.GRX	*H. sapiens GRX3* (1-117) + *S. cerevisiae GRX4* (125-244)	-	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
pCM189-S.c.TRX-hGRX1+2	*S. cerevisiae GRX4(1-144)+H. sapiens GRX3(147-355)*	-	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
pCM189-S.c.TRX-hGRX2	*S. cerevisiae GRX4(1-144)+H. sapiens GRX3(249-355)*	-	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
pS.p.TRX-S.c.GRX	*S. pombe GRX4* (1-120) + *S. cerevisiae* (125-244)	-	pCM189	*GRX4*	diese Arbeit
pCM189-S.p.TRX-S.c.GRX	*S. pombe GRX4* (1-120) + *S. cerevisiae* (125-244)	-	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit

pCM189-S.p.TRX-S.c.GRX-Myc	*S. pombe GRX4* (1-120) + *S. cerevisiae* (125-244)	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
pS.c.TRX-S.p.GRX	*S. cerevisiae GRX4* (1-144) + *S. pombe GRX4* (145-244)	-	pCM189	*GRX4*	diese Arbeit
pCM189-S.c.TRX-S.p.GRX	*S. cerevisiae GRX4* (1-144) + *S. pombe GRX4* (145-244)	-	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
pCM189-S.c.TRX-S.p.GRX-Myc	*S. cerevisiae GRX4* (1-144) + *S. pombe GRX4* (145-244)	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
pGRX4-S.p.-C-term	*S. cerevisiae GRX4* (229-244) + *S. pombe Grx4* (230-244)	-	pCM189	*GRX4*	diese Arbeit
pCM189-GRX4-S.p.-C-term-Myc	*S. cerevisiae GRX4* (229-244) + *S. pombe Grx4* (230-244)	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
pCM189-GRX4-S.p.-C-term-Myc	*S. cerevisiae GRX4* (229-244) + *S. pombe Grx4* (230-244)	C-terminal Myc	pCM189	*tetO7*	diese Arbeit
p416-RLI1-HA	*RLI1*	C-terminal HA	p416	*MET25*	(Kispal et al., 2005)
p416-RLI1-C25S-HA	*RLI1-C25S*	C-terminal HA	p416	*MET25*	(Kispal et al., 2005)
YEp181-CUP-His-UBI4	*UBI4*	N-terminal His	YEp181	*CUP1*	(Ulrich and Davies, 2009)
YEp181-CUP-His-SMT3	*SMT3*	N-terminal His	YEp181	*CUP1*	(Ulrich and Davies, 2009)
pFET3-GFP	*GFP*	-	p416		(Hausmann et al., 2008)

2.5 Verwendete Hefe-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Generations Methode	Referenz
W303-1A	*MATa; ura3-1; ade2-1; trp1-1; his3-11,15; leu2-3,112*		**(Mortimer and Johnston, 1986)**
Gal-GRX4 */grx3*	W303-1A, *pGRX4::GAL-L-natNT2; grx3::LEU2*	W303 *grx3*Δ; PCR fragment (pYM-N27) (Janke et al., 2004)	(Muhlenhoff et al., 2010)
Gal-GRX4*/grx3*/AFT1-luc2	Gal-GRX4*/grx3*, *AFT1::HIS3-AFT1-LUC2*	PCR fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Mühlenhoff et al, Manuskript in Vorbereitung)
Gal-GRX4*/grx3*/aft1Δ	Gal-GRX4*/grx3*, *AFT1::HIS3*	PCR fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Mühlenhoff et al, Manuskript in Vorbereitung)
Gal-NBP35	W303-1A, *pNBP35::GAL1-10-HIS3*	PCR fragment (pFA6a-HIS3-Gal) (Muhlenhoff et al., 2003a)	(Hausmann et al., 2005)
Gal-NFS1	W303-1A, *pNFS1::GAL1-10-HIS3*	PCR fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Muhlenhoff et al., 2003a)

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium (Sambrook and DW, 2001), welches aus Selektionsgründen teils mit Ampicillin (100 µg/mL) supplementiert wurde. Die hier verwendeten *E. coli* Kulturen wurden bei 37 °C inkubiert. Autoklaviert wurde das Medium für 20 Minuten bei 121 °C und 1,5 bar. Die Zugabe von Ampicillin erfolgte nach dem Autoklavieren (20 min, 121 °C, 1,5 bar), wenn sich der LB-Agar auf ca. 55°C abgekühlt hatte.

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

Bei der Herstellung von Agarplatten wurden zusätzlich 20 g/L Agar zum LB-Medium hinzugegeben.

2.6.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Dagert and Ehrlich, 1979). In dieser Arbeit fand ausschließlich der *E. coli* Stamm DH5α (Genotyp: *F*⁻ ϕ80d*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(rk ⁻mk ⁺) *pho*A *sup*E44 *thi*-1 g*yr*A96 *rel*A1 λ⁻) Verwendung. Dabei wurden 100 mL LB-Medium mit Zellen einer Vorkultur inokuliert, sodass eine OD bei 600nm von 0,1 vorlag. Diese Kultur wurde bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 schüttelnd (150 rpm) und anschließend für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 1800·g, 4°C) und Aufnahme der Zellen in 10 mL TFBI-Puffer, folgte eine weitere 10-minütige Inkubation auf Eis. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 1800·g, 4°C) wurden die Zellen in 2 mL TFBII-Puffer resuspendiert. Jeweils 100 µL Aliquots der Zellen wurden in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

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

2.6.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zu Plasmid DNA (25 - 100 ng) oder 10 µL eines Ligationsansatzes (siehe Abschnitt 2.8.8) wurden 100 µL kompetenter *E. coli* Zell-Suspension gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation bei 42 °C für 90 Sekunden („Hitzeschock“). Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde zu den Zellen 1 ml LB-Medium gegeben und die Kultur bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Durch Zentrifugation (6 min, 1000·g) wurden die Zellen sedimentiert und 900 µL des Überstands verworfen. In den verbliebenen 100µl Überstand wurden die Zellen resuspendiert und auf eine LBAmp-Agarplatte ausgestrichen. Die Agaplatte wurde bei 37 °C für 16 Stunden inkubiert.

2.6.4 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae*-Stämme erfolgte bei 30°C in Vollmedium, Synthetischem-Minimalmedium oder Synthetischem-Komplettmedium (SC). Bei der Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium nach dem Autoklavieren zusätzlich Agar (20g/L) hinzugefügt.

2.6.4.1 Vollmedium

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

Dieser Ausgangslösung wurden verschiedene Kohlenstoffquellen hinzugefügt, woraus sich verschiedene Kulturmedien ergaben:

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

2.6.4.2 Synthetisches Minimal- und Komplettmedium

Das Synthetische Minimalmedium, das in dieser Arbeit verwendet wurde, hatte folgende Zusammensetzung:

Synthetisches-Minimalmedium	
Yeast Nitrogen Base without Amino Acids & Ammonium Sulphate (Firma Formedium LTD)	1,9 g/ L
$(NH_4)_2SO_4$	5 g/ L

Für die Kultivierung der einzelnen *S. cerevisiae* Stämme, wurde das Medium, je nach Anforderungen des jeweiligen Stammes, mit folgenden Substanzen supplementiert.

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

Durch die Zugabe der unten angegebenen Additiv-Lösung zu Synthetischem-Minimalmedium, wurde Synthetisches-Komplettmedium hergestellt.

Additiv-Lösung	
L-Arginin	20 mg/ L
L-Aspartat	100 mg/ L
L-Glutamat	100 mg/ L
myo-Inositol	20 mg/ L
L-Isoleucin	80 mg/ L
L-Lysin	60 mg/ L
L-Methionin	20 mg/ L
L-Phenylalanin	50 mg/ L
L-Serin	375 mg/ L
L-Threonin	200 mg/ L
L-Valin	150 mg/ L

Weiterhin ergaben sich aus der Zugabe verschiedener Kohlenstoffquellen folgende Medien.

Kohlenstoffquelle	Synthetisches-Minimalmedium	Synthetisches-Komplettmedium
20 g/ L Glukose	SD-w/o-DO-Medium	SD-Medium
20 g/ L Galaktose	SGal-w/o-DO-Medium	SGal-Medium
30 g/ L Glycerol	SGly-w/o-DO-Medium	SGly-Medium

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich Synthetisches-Komplettmedium verwendet. Für die im Kapitel 2.9.15 beschriebene *in vivo* Markierung von Grx4 mit radioaktiven ^{55}Fe wurde zur Herstellung des entsprechendem Minimalmediums die “Yeast Nitrogen Base without Amino Acids & Ammonium Sulphate & Iron“ von der Firma *Formedium LTD* verwendet.

2.6.5 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* wurde mit der Lithiumacetat-Methode durchgeführt (Gietz and Woods, 2002; Ito et al., 1983). Dabei wurden DNA-Fragmente und Plasmide in die Zelle eingebracht. Dies ermöglicht die rekombinanten Expression von Genen oder eine dauerhafte Veränderung der chromosomalen DNA mittels homologer Rekombination.

50 ml SD oder SGal Medium wurden mit den entsprechenden *S. cerevisiae* Zellen aus einer 50 ml Vorkultur inokuliert, sodass eine OD_{600nm} von 0,5 vorlag. Die Kultur wurde dann bei 30°C schüttelnd (150 rpm) bis zu einer OD_{600nm} von 1 inkubiert.

Durch Zentrifugation (5 min, 1800·g) wurden die Zellen sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 1 ml ddH_2O resuspendiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut durch Zentrifugation (5 min, 4700·g) sedimentiert. Die Zellen wurden dann in 1 ml Lithiumacetat-Lösung aufgenommen und zu jeweils 100 µl aliquotiert. 100µl dieser Suspension wurden mit 0,5 - 5 µg DNA und 2,5 µl denaturierter Lachsperma DNA versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 30°C für 30 Minuten. Daraufhin wurde der Transformationsansatz mit 700µl PEG-Lösung versetzt und bei 42°C für 15-60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (3 min, 4700·g) sedimentiert, in 1 ml YPD- oder YPGal-Medium aufgenommen und bei 30°C für 1 Stunde inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (3 min, 4700·g), wurden die Zellen mit 1ml ddH_2O gewaschen, in 100µl ddH_2O resuspendiert und auf einer Minimalmedium-Agarplatte mit entsprechenden Supplementen ausgestrichen.

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

2.6.6 Dauerkulturen von *S. cerevisiae*

Die Lagerung von *S. cerevisiae* Stämmen erfolgte in einer 15%igen Glyzerin-SD- oder SGal-Minimalmedium-Lösung bei -80°C.

2.7 Zellkulturmethoden

2.7.1 HeLa Zellen

HeLa Zellen wurden 1951 aus dem Zervix-Karzinom einer 31 Jahre alten Frau isoliert und in Kultur genommen. Sie stellen damit die älteste humane Zelllinie dar. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Kultivierung von HeLa Zellen in DMEM (*PAA*) Medium, das mit 10% FCS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (0, 1 mg/ml)

(PAA) supplementiert war. Im Abstand von zwei bis drei Tagen wurden die HeLa Zellen in einem Verhältnis von 1:10 bis 1:15 passagiert.

2.7.2 Passagieren von HeLa Zellen

Alle verwendeten Medien und Reagenzien wurden vor der Verwendung auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Die verwendeten Kulturgefäße mit einer Fläche von 75 cm^2 wurden von der Firma *Greiner* bezogen. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit DMEM-Medium ohne Supplemente gewaschen. Anschließend wurden die Zellen vom Kulturgefäß abgelöst, indem sie mit 3 ml einer 100-fachen Trypsin-Lösung *(PAA)* bedeckt und für 5-10 Minuten bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert wurden. Die Trypsin-Reaktion wurde durch die Zugabe von 7 ml FCS-haltigem DMEM Medium gestoppt. Die Zellen wurden erneut resuspendiert und in der entsprechenden Verdünnung in neue Kulturgefäße ausgesät.

2.7.3 Aussäen dauerhaft gelagerter Kulturen von HeLa Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 20 ml frischem FCS haltigem DMEM-Medium überführt.

2.7.4 Bestimmung der Zellzahl einer HeLa-Kultur

Die Zellen wurden mittels Trypsin wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben von dem Kulturgefäß mit einer Fläche von 75 cm^2 abgelöst und die Trypsin-Reaktion mit 7 ml Elektroporations-Puffer (siehe Kapitel 2.7.5) gestoppt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 130·g) sedimentiert und in 10 ml Elektroporations-Puffer aufgenommen. 100µl dieser Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:10 mit Elektroporations-Puffer verdünnt. 20 µl dieser Verdünnung wurden dann in eine Zählkammer der Firma *Nexcelom* überführt. Mit dem Gerät Cellometer™ AutoT4 erfolgte anschließend die automatisierte Zählung der Zellen. Dabei erfolgte die Bestimmung der Zellzahl immer in Triplikaten.

2.7.5 Transfektion mittels Elektroporation von HeLa Zellen

Das Ermitteln der Zellzahl einer Kultur wurde wie in Kapitel 2.7.4 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 130·g) sedimentiert. Für die Transfektion erfolgte die Aufnahme von 5 bis 7 x 10^6 Zellen in 500 bis 650 µl Elektroporations-Puffer. Wurde nur eine einzelne siRNA transfiziert, so wurde die Zellsuspension mit 12 nm siRNA versetzt. Wurde eine Mischung aus 4 verschiedenen siRNA transfiziert, so wurde die Suspension mit jeweils 3 nm jeder einzelnen siRNA versetzt. Die Zellen wurden in eine Elektroporations-Küvette überführt und die Elektroporation erfolgte bei 250V und 1500 µF für 25-30ms. Danach wurden die Zellen sofort in 20 ml FCS-haltigem DMEM Medium überführt und für 3 Tage bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Elektroporations-Puffer
21 mM HEPES
137 mM NaCl
5 mM KCl
0, 7 mM Na2HPO4
6 mM D-Glukose
pH=7,15

2.7.6 Ernten von HeLa-Zellen

Die Zellzahl einer Kultur wurde wie in Kapitel 2.7.4 beschrieben bestimmt. Daraufhin wurden die Zelle durch Zentrifugation (5 min, 130·g) sedimentiert und in 1 ml Elektroporations-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde der Proteingehalt dieser Suspension nach Bradford, wie in Kapitel 2.9.5 beschrieben, bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation der Zell-Suspension (5 min, 130·g) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zu der Analyse wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Produkt NucleoSpin Plasmid-Kit der Firma *Macherey & Nagel* nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei dieser Methode erfolgt die Aufreinigung der Plasmid-DNA durch Bindung an eine Silikat-Membran.

2.8.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (Mullis and Faloona, 1987). Die PCR basiert prinzipiell auf drei Schritten: (1) Die Ausgangs-DNA wird durch eine Temperatur von 95 - 98 °C denaturiert. (2) Bei einer Temperatur von 50 - 65 °C lagern sich zwei spezifische DNA-Oligonukleotide an die Ausgangs-DNA an (*Annealing*). Dabei richtet sich die Temperatur nach den Schmelzpunkten der verwendeten DNA-Oligonukleotide. (3) Durch eine thermostabile DNA-Polymerase werden die entsprechenden Mononukleotidtriphosphate an die DNA-Oligonukleotide angehängt, sodass das gewünschte DNA-Produkt synthetisiert wird (*Elongation*). Die Temperatur richtet sich dabei nach dem Wirkungsoptimum der DNA-Polymerase und liegt zwischen 72 - 75°C. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Phusion® DNA Polymerase der Firma *Finnzymes* verwendet. Dieses Enzym besitzt eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, die das Enzym befähigt das neu synthetisierte PCR-Produkt zu „kontrollieren" (*Proofreading*). Dadurch werden inkorrekt eingebaute Nukleotide entfernt und durch die korrekten ersetzt. Damit ist diese Polymerase wesentlich genauer als DNA-Polymerasen ohne 3'→5'-Exonukleaseaktivitat. Ein Standard PCR Ansatz enthält 25 ng Ausgangs-DNA, jeweils 20 pmol der beiden DNA-Oligonukleotide und 10U der thermostabilen DNA-Polymerase. Das Endvolumen der Reaktion beträgt 50 µl und wurde in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Einzelne Optimierungen (Zyklen-Zahl, Elongationszeit, Annealing-Temperatur, Reaktionspuffer, DMSO-Zugabe) wurden nach Herstellerangaben

vorgenommen. Im Folgenden sind eine Standard-PCR-Reaktion und ein Standard-PCR-Programm angegeben.

Standard-PCR Reaktion (50 µL)		**Standard PCR-Programm**		
Ausgangs-DNA (1 - 500 ng)	1 µl	Temperatur	Zeit	Zyklen-anzahl
5x HF-Puffer	10 µl	98°C	30 s	
dNTP-Mix (je 10 mM)	5 µl	Beginn des PCR-Zykluses		
Oligonucleotid 1 (10 µM)	2,5 µl	98°C	15 s	
Oligonucleotid 2 (10 µM)	2,5 µl	50 - 65°C	30 s	25-30
Phusion-Polymerase (2 U / µL)	1 µl	72°C	15-30 s/kB	
ddH2O	28 µl	Ende des PCR-Zykluses		
		72°C	5 min	

2.8.3 Einführung von spezifischen Mutationen in ein Gen durch eine PCR-Reaktion

Zu der Einführung spezifischer Mutationen in das Gen *GRX4* wurde eine modifizierte Version der Quick Change™ Methode (*Stratagen, La Jolla, CA*) nach (Zheng et al., 2004) angewandt. Bei der Quick Change Methode wird das komplette Plasmid, das den entsprechenden ORF beinhaltet, mit zwei vollständig zueinander komplementären DNA-Oligonukleotide, die die gewünschte Mutation aufweisen, mit einer Highfidelity Phusion® DNA-Polymerase (*Finnzymes*) amplifiziert. Anschließend wird die methylierte Ausgangs-DNA durch eine Restriktion mit dem Enzym DpnI entfernt. DpnI spaltet nur die Phosphodiesterbindungen von methylierter DNA (Abb. 10).

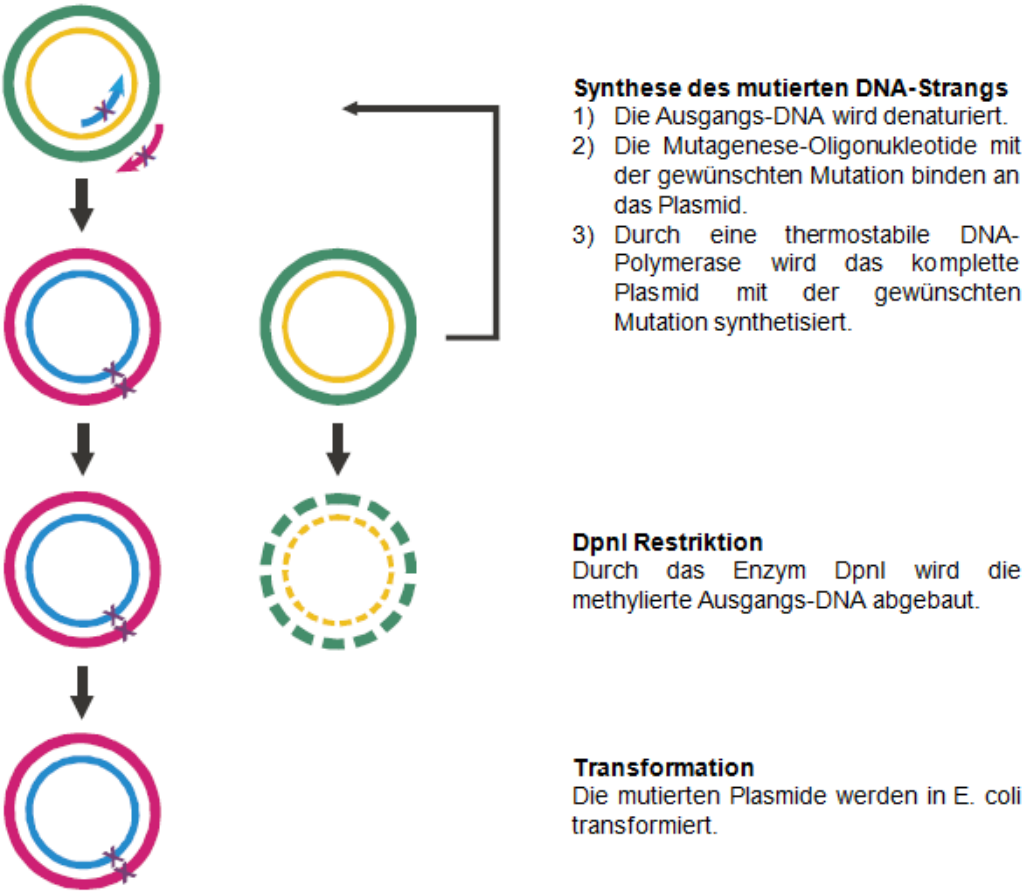

Abbildung 10. Schematische Darstellung der Quick Change Methode zur Einführung spezifischer Mutationen in Plasmid DNA. Entnommen aus dem Handbuch des QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kits der Firma *Stratagene*.

Der Nachteil des Quick Change Verfahrens ist, dass die vollständig zueinander komplementären Primer nicht an die 5‘Enden der neu synthetisierten DNA-Stränge binden können. So können die in der PCR amplifizierte DNA nicht als „Template“ für die DNA-Oligonukleotide dienen. Daher verläuft die Amplifikation nur linear und die Effizienz der PCR-Reaktion ist deutlich erniedrigt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine modifizierte Variante des Quick Change™ Verfahrens angewandt, bei der die Primer nicht vollständig komplementär zueinander sind, sondern sich nur partiell überlappen (Abb. 11) (Zheng et al., 2004). 6 Basen vor ihrem 5‘-Ende befindet sich in diesen Oligonukleotiden die gewünschte Mutation. Weiterhin weisen die Oligonukleotide einen Überhang von 15 Basen am 3‘-Ende auf. So wird die Effizienz dieser Reaktion deutlich gesteigert, da diese PCR nun exponentiell ablaufen kann. Mit dieser Methode können bis zu 7 Mutationen simultan eingeführt werden.

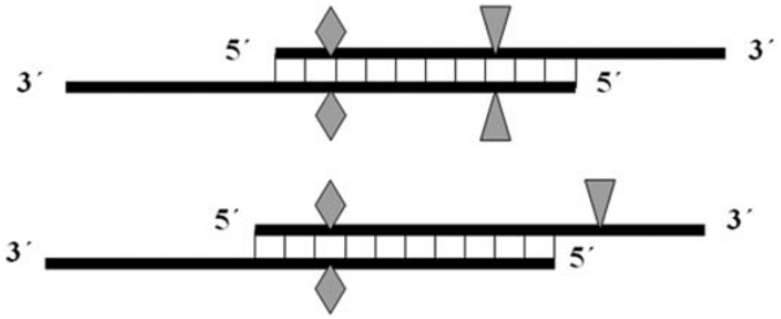

Abbildung 11. Schematische Darstellung der sich partiell überlappenden Mutagenese-Primer. Die Rauten geben die gewünschten Mutationen an. Die Dreiecke geben zusätzliche Stille Mutationen an, die es ermöglichen neue Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen einzuführen. Entnommen aus (Zheng et al., 2004).

2.8.4 Überhang-Extension-PCR

Um die Thioredoxin- oder die Glutaredoxin-Domäne von Grx4 in dieser Arbeit mit einer entsprechenden Domäne eines Multidomänen Glutaredoxin aus einem anderen Organismus zu fusionieren, wurde in dieser Arbeit eine spezielle PCR Methode nach (Heckman and Pease, 2007) angewandt. Die Überhang-Extension-PCR basiert im wesentlichem auf zwei Schritten. Im ersten Schritt werden die 2 zu fusionierenden DNA Fragmente in separaten PCR-Reaktionen amplifiziert. Die DNA-Oligonukleotide sind dabei besonders gestaltet (Abb. 12). Das Fragment, welches am 5'Ende des chimären Konstrukts liegen soll, weist einen 3' Überhang auf. Das zweite zu fusionierende PCR-Produkt hat am 5'Ende einen Überhang. Diese beiden Überhänge sind vollständig komplementär zueinander (Abb. 12). 5 ng der beiden PCR-Produkte werden daraufhin in eine zweite PCR Reaktion eingesetzt. Diese PCR-Reaktion beinhaltet nur die Primer, die am 5'-Ende bzw. 3'- Ende des gewünschten chimären DNA-Konstrukts binden (Abb. 12). Die beiden DNA-Fragmente können mittels ihrer Überhänge miteinander hybridisieren. Das gewünschte chimäre PCR Produkt kann durch die Extension der beiden spezifischen Oligonukleotide durch eine thermostabile DNA-Polymerase amplifiziert und anschließend in den gewünschten Vektor kloniert werden.

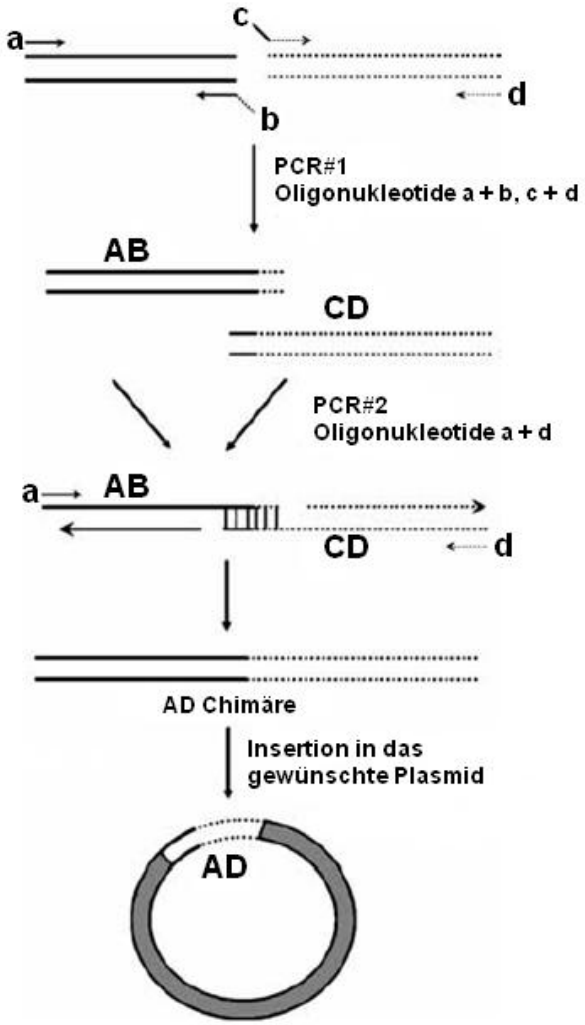

Abbildung 12. Schematische Darstellung des Prinzips der Überhang-Extesion-PCR. Entnommen aus (Heckman and Pease, 2007).

2.8.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, Restriktions- oder PCR-Ansätzen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, Restriktions- oder PCR-Ansätzen wurde das NucleoSpin® Extract II Kit der Firma *Macherey & Nagel* nach Herstellerangaben verwendet. Die Reinigung basiert auch bei diesem Verfahren auf der Bindung von DNA an Silikat-Membranen in Gegenwart chaotroper Reagenzien (Vogelstein and Gillespie, 1979). Die DNA-Fragmente wurden je nach der vorliegenden Menge mit 15 – 50 µL 10 mM Tris-HCl pH 8,5 eluiert.

2.8.6 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmenten wurden nach ihrer Größe in 1 – 2,5 %ige (w/v) Agarosegele aufgetrennt. Als Lauf-Puffer wurde TAE-Puffer benutzt. Vor dem Beladen des Gels wurde die DNA-Probe im Verhältnis 1:9 mit 10-fach konzentriertem DNA-Lade-Puffer versetzt. Durch Zugabe von 1 µL 100x GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain der Firma *Biotium* zu jeder DNA-Probe wurde die DNA gefärbt. Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte die Visualisierung der DNA-Fragmente mit Hilfe des GDS Systems der Firma *Intas* oder eines UV-Schirms. Durch Vergleich mit dem Größenstandard GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (*Fermentas*) wurde die Größe der DNA-Fragmente sowie ihre Konzentration abgeschätzt.

TAE-Puffer
40 mM Tris-HCl pH 8,0
1 mM EDTA
0,01 % (v/v) Essigsaure

DNA-Lade-Puffer (10x)
65 % (w/v) Saccharose
10 mM Tris-HCl pH 7,5
10 mM EDTA
0,3 % (w/v) Bromphenolblau

2.8.7 Spaltung von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Für die hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindung von DNA wurden Typ II Restriktionsendonukleasen der Firmen *Fermentas* und *New England Biolabs* verwendet. Die Reaktionsbedingungen richteten sich dabei nach den Angaben des entsprechenden Herstellers. Das Endvolumen der Reaktion war bei analytischen Restriktionsexperimenten einheitlich 10µl. Bei präparativen Restriktionen betrug das Endvolumen 50µl.

2.8.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von PCR-Produkten oder aufgereinigten DNA-Fragmenten mit einem Vektor wurde die T4-DNA-Ligase von der Firma *New England Biolabs* verwendet. Dieses Enzym katalysiert unter ATP Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen. Das molare Verhältnis von DNA-Fragment zu Vektor

betrug dabei 3:1. Diese Reaktionen wurden einheitlich in einem Endvolumen von 20µl durchgeführt. Weiterhin wurden 1-10U der T4-DNA-Ligase in eine Reaktion eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen.

2.8.9 Microarray-Analysen

Änderungen in der differentiellen Genexpression von HeLa-Zellen wurden mittels Microarray-Experimenten analysiert. Hierfür wurden die HeLa Zellen 3-mal mit den angegebenen siRNAs transfiziert (Stehling et al., 2008). Um einen Eisenmangel zu induzieren, wurden HeLa Zellen 3-mal ohne siRNA transfiziert. 24 Stunden vor der finalen Ernte, wurde das Kulturmedium mit dem Eisen-spezifischen Chelator Deferoxamin (DFO) (125 µM) supplementiert. Die Zellen wurden geerntet (siehe 2.7.6) und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zu der Isolation der Gesamt-RNA wurden die Proben bei -80°C gelagert. Für die Isolation der Gesamt-RNA wurde das NucleoSpin-RNA II Kit (*Macherey-Nagel*) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Qualität der Gesamt-RNA wurde mit dem Experion Bio-Analyzer System (*Bio-Rad*) entsprechend der Angaben des Herstellers überprüft. Für die cDNA-Synthese und die Markierung der cDNA wurde das „Quick-Amp Labeling Kit (2 color)“ (*Agilent-Technologies* 5190-0444) nach Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend wurde der „SurePrint G3 Human GE 8x60k“ Chip (*Agilent-Technologies T*G4851A) mit fragmentierter und markierter cDNA entsprechend den Herstellerangaben hybridisiert. Letztendlich wurde der Chip nach Angaben des Herstellers gewaschen und mit dem Microarray Scanner G2505C (*Agilent-Technologies*) ausgelesen.

Für die Datenanalyse wurde das Programm Feature Extraction v10.5.1.1 (*Agilent-Technologies*) verwendet. Die Analyse der Daten wurde von Lukas Rycak (IMT Marburg) oder Dr. Mario Mernberger (IMT Marburg) durchgeführt.

2.9 Biochemische Methoden

2.9.1 Präparation von Hefegesamtzellextrakt mittels Glasperlen

Um *S. cerevisiae* Zellen zu lysieren wurden diese durch Zentrifugation (5 min, 1000·g) sedimentiert und mit ddH_2O gewaschen. Die Zellen wurden dann in TNETG-Puffer (1ml pro Gramm Hefezellen (Feuchtgewicht)) oder Ni-NTA-Puffer A (1ml pro Gramm Hefezellen (Feuchtgewicht)) aufgenommen. Anschließend erfolgte die Zugabe von Glasperlen (0,75 - 1 mm Durchmesser). Dabei entsprach das Volumen an Glasperlen etwa dem halben Volumen der Zellsuspension. Anschließend wurden die Hefezellen durch 3 maliges 1 minütiges starkes Schütteln, unter Verwendung eines Vortex-Gerätes, mechanisch aufgeschlossen. Alle Arbeitsschritte erfolgten von nun an auf Eis mit vorgekühlten Puffern. Zwischen den einzelnen Aufschluss-Schritten durch das Vortex-Gerät, wurden die Zellen für jeweils 1 Minute auf Eis inkubiert. Die Glasperlen wurden durch Zentrifugation (10 min, 1800·g, 4°C) sedimentiert und der Überstand in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch erneute Zentrifugation (10 min, 16200·g, 4°C) wurden die nicht löslichen Bestandteile der Zellen sedimentiert. Daraufhin wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

TNETG-Puffer	**Ni-NTA Puffer A**
20 mM Tris-HCl pH 7,4	100 mM NaH_2PO_4
150 mM NaCl	10 mM Tris-HCl
2,5 mM EDTA	6 M Guanidin-Hydrochlorid
10 % (v/v) Glycerol	ph 8,0
0,5 % (v/v) Triton X-100	1 mM PMSF
1 mM PMSF	

2.9.2 Isolation von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Zu der Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* wurde zunächst die Zellwand enzymatisch mit Zymolyase abgebaut. Die entstandenen Sphäroplasten wurden dann mechanisch lysiert. Anschließend wurden die Mitochondrien durch differentielle Zentrifugation isoliert (Daum et al., 1982; Diekert et al., 2001).

Die entsprechende *S. cerevisiae* Kultur wurde bis zu einer OD_{600nm} von 1 – 1,5 bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation (5 min, 1000·g) sedimentiert. Das folgende Protokoll gilt für 10 g Hefezellen (Feuchtgewicht). Bei abweichendem Feuchtgewicht wurden die Volumina der Puffer-Lösungen angepasst. Im ersten Schritt wurden die Zellen in 30 ml Tris-SO_4-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 1000·g) sedimentiert, mit Sorbitol-Puffer gewaschen und in 40 ml Sorbitol-Puffer aufgenommen. Weiterhin wurde die Suspension pro Gramm Hefezellen mit 0,7 g Zymolyase T100 (*Seikagu*) versetzt und für 25 – 30 min bei 30°C inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis und mit vorgekühlten Puffer-Lösungen durchgeführt. Die entstandenen Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation (5 min, 1000·g, 4°C) sedimentiert und in 40 ml Sorbitol-Puffer resuspendiert. Die Sphäroplasten wurden nochmal mit 40 ml Sorbitol-Puffer gewaschen und anschließend in 30 ml 2x konzentriertem BB-Puffer aufgenommen. Zu dieser Suspension wurde 30 ml dH_2O hinzugefügt. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Sphäroplasten mit Hilfe eines Glas-Homogenisators. Durch Zentrifugation (5 min, 1500·g, 4 °C) der Suspension wurden die Zelltrümmer sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Mitochondrien durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 14000·g, 4°C). Der Überstand, der die löslichen Proteine des Cytosols enthielt und als Post-Mitochondrialer-Überstand (PMS) bezeichnet wird, wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Mitochondrien wurden in 25 ml 1x konzentriertem BB-Puffer resuspendiert und erneut durch Zentrifugation (10 min, 14000·g, 4°C) sedimentiert. Abschließend wurden die Mitochondrien in 250 µl 1x konzentriertem BB-Puffer vorsichtig aufgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung aller Proben erfolgte bis zu der Analyse bei -80°C.

Tris-SO4-Puffer	**Sorbitol-Puffer**	**2x BB-Puffer**	**1x BB-Puffer**
100 mM Trsi-SO4	1,2 M Sorbitol	1,2 M Sorbitol	0,6 M Sorbitol
10 mM DTT	20 mM K-Phosphat	40 mM Hepes-KOH	20 mM Hepes-KOH
pH 9,4	pH 7,4	1 mM PMSF	pH 7.4
		pH 7.4	

2.9.3 Präparation von HeLa-Zelllysaten für Western Blot Analysen

Um HeLa Zelllysate für einen Western Blot zu präparieren, wurden die Zellen erst in ddH_2O aufgenommen und mit zweifach konzentriertem Laemmli-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 % (w/v) Glyzerin, 4 % (w/v) SDS, 0,1 mg/ mL Bromphenolblau, 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) versetzt. Die Volumina von ddH_2O und 2x konzentriertem Laemmli-Puffer waren dabei gleich groß und wurden so gewählt, dass die Lösung eine Proteinkonzentration von 25 µg/ml aufwies.

2.9.4 Fraktionierung von HeLa Zellen mittels der Digitonin Methode

Die Zellzahl einer HeLa-Kultur wurde bestimmt (siehe Kapitel 2.7.4) und die Zellen wurden geerntet (siehe Kapitel 2.7.6). Anschließend wurden die Zellen in Mitochondrien-Puffer aufgenommen. Das Volumen wurde dabei so gewählt, dass in der Suspension 8 x 10^6 Zellen/ml vorlagen. Diese Suspension wurde mit einer 0,1%igen Digitonin-Lösung versetzt, sodass die Endkonzentration des Digitonins 0,008% (w/v) im Mitochondrienpuffer betrug. Digitonin permeabilisiert die Zellmembran und dadurch gehen die cytosolischen löslichen Bestandteile in die Lösung über. Anschließend wurde diese Suspension für 5 – 10 Minuten auf Eis inkubiert. Ein Drittel des Volumens der Suspension wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis inkubiert. Aus den restlichen zwei Drittel der Suspension wurden die nicht löslichen Membranbestandteile der Zelle durch Zentrifugation (10 min, 16200·g) sedimentiert und der Überstand, der die cytosolische Fraktion darstellt, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis inkubiert. Das Sediment wurde mit 1 ml Mitochondrien-Puffer gewaschen und in 2/3 des Volumens der Ausgangs-Suspension vor der Digitonin-Zugabe resuspendiert. Von allen Proben wurde der Proteingehalt nach Bradford wie in Kapitel 2.9.5 angegeben bestimmt. Bis zu der Analyse wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Mitochondrien-Puffer
5 mM Tris-HCl
250 mM Sucrose
1, 5 mM MgCl2
1 mM PMSF
pH 7.4

Digitonin-Puffer
Mitochondrien-Puffer + 0,008% Digitonin

2.9.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Protein-Konzentration von Zelllysaten oder Lösungen wurde in dieser Arbeit mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Bei dieser Methode wird der Farbstoff Coomassie-Brillant Blau G-250 verwendet, welcher an die basischen Aminosäurereste von Proteinen bindet. Dadurch wird das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffs von 465nm auf 595nm verschoben. Um die Protein-Konzentration bestimmen zu können, wurde eine Eichreihe mit Proben bekannten BSA-Gehalts erstellt. Aus der Absorption bei 595nm wurde die Protein-Konzentration von Proben unbekanntem Proteingehalts berechnet. Verwendet wurde in dieser Arbeit eine fünffach konzentrierte Bradford-Lösung (*Biorad*) die vor der Verwendung im Verhältnis 1:5 mit ddH_2O verdünnt wurde.

2.9.6 Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung)

Die Proteine aus *S. cerevisiae* Zelllysaten wurden mittels Trichloressigsäure (TCA) gefällt, wenn sie durch eine SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert werden sollten. Dabei wurden 25µl Zelllysat mit 25µl ddH2O und 50µl einer 25%igen TCA-Lösung versetzt. Wurden Proteine aus Zelllysaten gefällt, die mit Ni-NTA-Puffer1 präpariert wurden, so wurde die Probe 1:100 mit ddH_2O verdünnt. Diese Lösung wurde dann mit dem gleichen Volumen einer 25%igen TCA-Lösung versetzt.

Die Lösungen wurden gut gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zentrifugation (10 min, 16200·g) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1 ml eiskaltem Aceton aufgenommen. Die Proteine wurden erneut durch Zentrifugation (10 min,

16200·g) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proteine nochmals mit Aceton gewaschen. Je nach Menge wurden die Proteine dann in 50-100µl Laemmli-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 % (w/v) Glyzerin, 2 % (w/v) SDS, 0,05 mg/ mL Bromphenolblau, 2,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) aufgenommen. Bevor die Proteine durch eine SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt wurden, erfolgte eine Inkubation für 5 Minuten bei 95°C.

2.9.7 Aktivitäts-Messungen von Enzymen in *S. cerevisiae* Zelllysaten

Um die Aktivität eines Enzyms zu bestimmen, muss ein Stoffumsatz kontinuierlich gemessen werden. Die Messungen erfolgten unter Bedingungen, bei denen das Substrat bzw. das Kosubstrat im Überschuss im optimalen Puffer vorlag. Die Aktivitäts-Messungen von Enzymen in *S. cerevisiae* Zelllysaten wurden in einem UV/Vis Spektralphotometer durchgeführt. Wenn Aktivitäten von Enzymen in HeLa Proben bestimmt wurden, erfolgte die Messung in einem Plattenlesegerät (Infinite® 2000, Tecan) Dabei wurde die Absorption einer bestimmten Wellenlänge gemessen, bei der nur das Substrat, Ko-Substrat oder das Produkt absorbiert. Durch die Absorptionsänderung pro Zeiteinheit ($\Delta E/\Delta t$) konnte die Aktivität eines Enzyms berechnet werden. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte nach der Formel $E_{spez.Akt.} = \Delta E/(\Delta t*d*\varepsilon*m)$. Die Schichtdicke (d) der Küvette betrug 1cm. Der Extinktionskoeffizient (ε) ist jeweils von der gemessenen Spezies (Substrat, Ko-Substrat, Produkt) abhängig.

2.9.7.1 Messungen der Katalase-Aktivitäten

Das Enzym Katalase enthält einen Häm-Kofaktor und setzt H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff um. Die Messung beruht auf der Absorption von H_2O_2 bei 240nm (Extinktionskoeffizient ε_{240nm} = 3890 M^{-1} cm^{-1}). Die Messung wurde in 1 ml Katalase-Puffer über einen Zeitraum von 90 Sekunden durchgeführt.

Katalase-Puffer	Substrat	Messung (*S. cerevisiae*)
50 mM MES pH 6,5	3 % H_2O_2	970 µL Puffer
50 mM NaCl		25 µL H_2O_2
		50 - 100 µg Probe

2.9.7.2 Messungen der Aconitase-Aktivitäten

Die mitochondriale Aconitase (Aco1), ist ein [4Fe-4S] Enzym und spielt im Citratzyklus eine Rolle, wo Aco1 die Isomerisierung von Citrat über das Zwischenprodukt cis-Aconitat zu Iso-Citrat reversibel katalysiert. In dieser Arbeit wurde ein gekoppelter Enzymtest zur Messung der Aconitase-Aktivität verwendet, bei dem die durch die Iso-Citrat-Dehydrogenase (IDH) katalysierte Folgereaktion im Citratzyklus zur Messung ausgenutzt wird. Die IDH katalysiert irreversibel die Umsetzung von Iso-Citrat zu α-Ketoglutarat über das Zwischenprodukt Oxalsuccinat. Bei dieser Reaktion wird das Kosubstrat $NADP^+$ der IDH zu $NADPH+H^+$ umgesetzt. In diesem gekoppelten Enzymtest wurde Cis-Aconitat als Substrat eingesetzt und die Absorption von $NADPH+H^+$ bei 340nm gemessen (ε_{340nm} = 6220 M^{-1} cm^{-1}). Durch die Kopplung der Bildung von Iso-Citrat, die von der Aconitase katalysiert wird, an die IDH katalysierte Folge-Reaktion, wird das Gleichgewicht in Richtung Iso-Citrat verschoben. Unter diesen Bedingungen ist die Aconitase das geschwindigkeitsbestimmende Enzym. Die Messung wurde in 1 ml Aconitase-Puffer über einen Zeitraum von 2 Minuten durchgeführt.

Aconitase-Puffer	Substrat	Messung	Referenz
50 mM Triethanolamin pH8,0	20 mM Cis-Aconitat	1000 µL Aconitase-Puffer	950µl Aconitase-Puffer
50 mM NaCl	100 mM $NADP^+$	200 µM Cis-Aconitat	
1,5 mM MgCl2	Isocitratdehydogenase (IDH) 40 mU/ µL	400 µU IDH	
		1,2 mM $NADP^+$	1,2 mM $NADP^+$
		50 - 100 µg Probe	50 - 100 µg Probe

2.9.8 Messung der Enzym-Aktivitäten in HeLa-Proben

Die Messung der Enzym-Aktivitäten in HeLa-Proben erfolgte in Multiwellplatten unter Verwendung eines Plattenlesegeräts nach (Stehling et al., 2007).

2.9.8.1 Messungen der Aconitase-Aktivitäten

Für die Messung der Aconitase-Aktivität wurde die gleiche Methode wie für die Bestimmung der Aconitase-Aktivität in *S. cerevisiae* Zelllysaten angewandt. Allerdings erfolgten die Messungen der Aconitase-Aktivität in HeLa Proben unter leicht veränderte Pufferbedingungen. Weiterhin wurde die Messung in einem Endvolumen von 250 µl für eine Stunde durchgeführt. Mit dieser Methode wurden die Aktivitäten in der cytosolischen Fraktion und in der Sediment-Fraktion von subzellulär fraktionierten HeLa Zellen gemessen.

Aconitase-Puffer (HeLa)	Substrat/Kosubstrat Stamm-Lösungen	Messung	Referenz
100 mM Triethanolamin	20 mM Cis-Aconitat	250µl Aconitase-Puffer (HeLa)	250µl Aconitase-Puffer (HeLa)
1, 5 mM MgCl2	100 mM $NADP^+$	1,3 mM $NADP^+$	1,3 mM $NADP^+$
0, 1 % Triton X-100	IDH 40 mU/µl	400 µU/IDH	
pH 8,0		200 µM Cis-Aconitat	
		4 - 20 µg Protein	4 - 20 µg Protein

2.9.8.2 Messung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität

Die Succinat-Dehydrogenase ist ein Fe/S Cluster bindendes Enzym und enthält weiterhin FAD und Häm als prosthetische Gruppen. Die Aktivität dieses Enzyms wurde in dieser Arbeit über die Reduktion des artifiziellen Elektronenakzeptor Dichlorphenolindophenol (DCPIP) bei 600 nm (ε_{600nm} = 21000 M^{-1} cm^{-1}) für 30 min gemessen. Hierbei ist Succinat der Elektronendonor, der über Decylubiquinon die Elektronen auf DCPIP überträgt.

SDH-Puffer	Substrat/Kosubstrat/Inhibitor Stamm-Lösungen	Messung	Referenz
50 mM Tris/SO4	20% (w/v) Natrium-Succinat	250 µl SDH-Puffer	250 µl SDH-Puffer
0, 1 mM EDTA	20% (w/v) Natrium-Malonat	0,25% Succinat	0,25% Succinat
0, 1 % Triton X-100	1,4 M DCPIP	70 µM DCPIP	0,25% Malonat
pH 7,4	0,1 M KCN	60 µM Decylubiquinon	70 µM DCPIP
		0,01 mM KCN	60 µM Decylubiquinon
			1 mM KCN
		4 - 12 µg Protein	4 - 12 µg Protein

2.9.8.3 Messung der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität

Die Cytochrom-c-Oxidase (COX) gehört zu der Familie der Häm-Kupfer-Oxidasen und ist der terminale Elektronenakzeptor in der mitochondrialen Atmungskette. Die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase wurde gemessen, indem die Oxidation von reduziertem Cytochrom *c* (ε_{550nm} = 20000 M^{-1} cm^{-1}) bei 550 nm für 30 Minuten gemessen wurde. Als Referenz diente dabei COX-Puffer der reduziertes Cytochrom-c enthielt. Hierbei wurde die Oxidationsrate bestimmt, die durch den Sauerstoff in der Atmosphäre verursacht wurde. Die Aktivität der COX wurde in der Sediment-Fraktion von subzellulär fraktionierten HeLa Proben bestimmt.

COX-Puffer	Substrat Stamm-Lösung	Messung	Referenz
15 mM KH_2PO_4	20 mg/ml reduziertes Cytochrom-C	250 µl COX-Puffer	250 µl COX-Puffer
0, 5 mM DDM		1 mg/ml reduziertes Cytochrom-C	1 mg/ml reduziertes Cytochrom-C
0,1% BSA		1 - 3 µg Protein	
pH 7.2			

2.9.8.4 Messung der Citrat-Synthase Aktivität

Die Citrat-Synthase ist kein Eisen-abhängiges Enzym, da sie weder Eisen noch einen Fe/S Cluster oder Häm bindet. Dieses Enzym hat eine Funktion im mitochondrialem Citratzyklus wo sie die irreversible Kondensation von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu

Citrat katalysiert. In dieser Arbeit wurde die Citrat-Synthase als Kontrollenzym verwendet. Zum einen konnte durch die Messung die Effizienz der Zellfraktionierung (siehe Abschnitt 2.9.4) von HeLa Zellen überprüft werden. Zum Anderem wurden die Aktivitäten der gemessenen mitochondrialen Enzyme auf die Aktivität der Citrat-Synthase normalisiert. Die Messung basiert auf der Reaktion des Ellmans Reagenz (Dithio-Nitrobenzoat, DTNB) mit der freien Thiolgruppe des entstehenden CoA-H (Stehling et al., 2007). Durch diese Reaktion wird 2-Nitro-5-Thiobenzoat (NTB^-) gebildet, dass bei 412 nm absorbiert (ε_{412nm} = 13300 M^{-1} cm^{-1}). Die Aktivität wurde im Lysat, der cytosolischen Fraktion und der Sediment-Fraktion von HeLa Zellen für 30 Minuten gemessen.

Citrat-Synthase-Puffer	Substrat/Kosubstrat Stamm-Lösungen	Messung	Referenz
50 mM Tris	10 mg/mL Acetyl-CoA	250 µl Citrat-Synthase-Puffer	250 µl Citrat-Synthase-Puffer
100 mM NaCl	0,5 M DTNB in DMSO	10 µg Acetyl-CoA	10 µg Acetyl-CoA
0, 1 % Triton X-100	100 mM Oxalacetat	0,5 mM DTNB	0,5 mM DTNB
		100 µM Oxalacetat	
		0,6 - 6 µg Protein	0,6 - 6 µg Protein

2.9.8.5 Messung der Lactat-Dehydrogenase Aktivität

Die Lactat-Dehydrogenase (LDH) ist ebenfalls ein Eisen-unabhängiges Enzym und katalysiert im Cytosol reversibel die Oxidation von L-Lactat zu Pyruvat, wobei ein Molekül NAD^+ zu NADH reduziert wird. In dieser Arbeit wurde eine Methode angewandt, bei der als Substrat bzw. Kosubstrat Pyruvat und NADH eingesetzt wurde. Durch die LDH wird hierbei das Pyruvat unter NADH verbrauch reduziert und die sinkende NADH Konzentration (ε_{340nm} = 6220 M^{-1} cm^{-1}) wurde für 30 Minuten bei 340 nm gemessen. Als Referenz diente ein Reaktionsansatz zu dem keine Probe hinzugefügt wurde. Dadurch wurde die spontane Oxidation von NADH durch den Luftsauerstoff gemessen. Im dieser Arbeit wurde die LDH-Aktivität in Lysat, der cytosolischen Fraktion sowie der Sediment-Fraktion von HeLa Proben gemessen.

LDH-Puffer	Stamm-Lösungen	Messung	Referenz
50 mM Tris-HCl	50 mM Na-Pyruvat	750 µl LDH-Puffer	750 µl LDH-Puffer
1 mM EDTA	10 mg/ml NADH	750 µM Na-Pyruvat	750 µM Na-Pyruvat
0,1% Triton X-100		150 ng/ml NADH	150 ng/ml NADH
pH 7,4		1 - 10 µg Protein	

2.9.9 Messung der Luciferase-Aktivität

Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgte mit dem „Luciferase Assay System“ der Firma *Promega* nach Angaben des Herstellers. Für die Messung wurde allerdings ein leicht modifizierter CCLR-Puffer verwendet.

CCLR-Puffer
25 mM Tris-Phosphat pH 7,8
2 mM EDTA
2 mM DTT
10% Glyzerin
0,1% Triton X-100

2.9.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteine der Größe nach aufzutrennen wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (SDS-PAGE). Proteine besitzen individuelle Ladungseigenschaften und daher müssen sie mit dem Reagenzien ß-Mercaptoethanol und Natriumdodecylsulfat vollständig reduziert und denaturiert werden. ß-Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken. Weiterhin bindet Natriumdodecylsulfat in einem definierten Verhältnis, das sich nach der Anzahl der Aminosäuren richtet, an Proteine. Da Natriumdodecylsulfat selber negativ geladen ist, maskiert es die Ladungseigenschaften von Proteinen. Somit ist das Verhältnis von Masse zu Ladung bei allen Proteinen einheitlich. Durch den Acrylamid-Anteil der Gele werden die Trennungseigenschaften beeinflusst. Niederprozentige Gele eignen sich zur Auftrennung größerer Proteine und hochprozentige Gele eignen sich zur Auftrennung kleinerer Proteine. In dieser Arbeit wurden zur Auftrennung der *S.*

cerevisiae Proben Gele verwendet, die eine Acrylamid-Konzentration von 12,5% aufwiesen. Für Die Auftrennung von HeLa-Proben wurden Gele verwendet, die einen Acrylamid-Konzentrations-Gradienten von 6 – 16 % aufwiesen. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 0,001 % (v/v) TEMED und 0,05% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) ausgelöst. Dabei wies ein SDS-PAGE-Gel eine Fläche von 210 cm^2 auf. Die folgende Tabelle enthält die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten SDS-PAGE Gele und des Elektroden-Puffers.

Sammelgel	Trenngel	Elektrodenpuffer
125 mM Tris-HCl pH 6,8	375 mM Tris-HCl pH 8,8	25 mM Tris pH
0,1 % (v/w) SDS	0,1 % (v/w) SDS	0,1 % (v/w) SDS
5 % (w/v) Acrylamid (Acrylamid: Bisacrylamid = 37,5:1)	6 - 16 % (w/v) Acrylamid (Acrylamid: Bisacrylamid = 37,5:1)	192 mM Glycin

Die Proben die durch die SDS-PAGE analysierten werden sollten, wurden vor dem Auftragen auf das Gel bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 35mA und einer Spannung von 170V. Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose Membran transferiert oder die Proteine wurden im Gel durch kolloidales Coomassie gefärbt.

2.9.11 Ponceau-Färbung und Western Blot

Bei einem Western Blot werden die in der SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennten Proteine auf eine Membran transferiert (Towbin et al., 1979). Die Membran kann dabei aus Nitrocellulose, positiv geladenem Nylon oder Polyvinylidenfluorid (PVDF) bestehen. Die Bindung der Proteine an die Membran erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen (Nitrocellulose, PVDF) oder ionischen Wechselwirkungen (Nylon). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Nitrocellulose-Membranen verwendet. Zum Transfer der Proteine aus dem SDS-PAGE-Gel auf die Membran, wurde das so genannten „Semi Dry“ Verfahren angewandt. Auf 2 bis 3 Whatman-Filterpapiere, die mit Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 200 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,02 % (w/v) SDS) getränkt waren, wurde die ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtete Nitrocellulose-Membran gelegt. Auf die Membran wurde das SDS-

PAGE-Gel aufgelegt, welches dann mit 2 bis 3 weiteren mit Transferpuffer angefeuchteten Whatman-Filterpapieren bedeckt wurde. Anschließen erfolgte der Zusammenbau der Blot-Apparatur und der Transfer für 60-120 Minuten bei 2 mA pro cm^2 Gel. Nachdem die Proteine auf die Membran transferiert wurden, erfolgte eine Färbung mit einer Ponceau-S-Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) TCA) um die Effizienz des Transfers zu überprüfen. Die Färbezeit mit Ponceau-S-Lösung betrug wenige Minuten. Anschließend erfolgte eine Waschung der Membran mit ddH_2O. Um die Färbung wieder zu entfernen, wurde die Membran in TBS-T Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20) für 10-30 Minuten inkubiert.

TBS-T-Puffer
10 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
0,1 % (v/v) Tween 20
pH 7,4

2.9.12 Kolloidale Coomassie Färbung von SDS-PAGE Gelen

80g $(NH_4)_2SO_4$ wurden in 765,2 ml ddH2O gelöst. Zu dieser Lösung wurden 18,8 ml einer 85%igen Phosphorsäure-Lösung gegeben (2% (v/v)). Dieses Gemisch wurde weiterhin mit 16 ml einer 5%igen Coomassie Brillant G-250 (Sigma) Lösung versetzt. Kurz vor der Anwendung wurde dieser Lösung Methanol in einer Endkonzentration von 20% (v/v) hinzugefügt und das SDS-PAGE-Gel wurde über Nacht in dieser Lösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde das gefärbte SDS-PAGE-Gel in ddH2O inkubiert, woraufhin die Dokumentation folgte.

2.9.13 Immunofärbungen von Western Blot Membranen

Der Nachweis bestimmter Proteine im Western Blot wurde mit immunologischen Methoden durchgeführt. Hierbei bindet ein spezifischer sogenannter Erstantikörper an das jeweilige, auf der Membran immobilisiert Protein. Aber auch dieser Erstantikörper hat Proteineigenschaften was im folgenden Schritt aus genutzt wird,

um das gewünschte Protein sichtbar zu machen. Dabei wird die Membran in einer Lösung inkubiert, die den sogenannten Zweitantikörper enthält. Dieser erkennt spezifische Immunglobuline, die von der Spezies abhängig sind, aus der der Erstantikörper gewonnen wurde. Darüber hinaus ist der Zweitantikörper mit einem Enzym wie z.B. der Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert, welches die Oxidation von Luminol unter Beteiligung von H_2O_2 als Oxidationsmittel katalysiert. Dabei entsteht Chemilumineszenz, die detektiert werden kann.

Als erstes wurden unspezifische Bindestellen der Membran blockiert, indem die Membran in TBS-T Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20), mit 5% Milchpulver (v/v) oder 1% BSA (Blockierungspuffer) für 16 Stunden bei 4°C oder für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Das Serum mit dem Erstantikörper lag in einem Verhältnis von 1:500 bis 1:2000 in Blockierungspuffer verdünnt vor. Die Membran wurde in dieser Lösung für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran für jeweils 5 Minuten, 3-mal mit TBS-T Puffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Membran dann in Blockierungspuffer mit dem Zweitantikörper-Konjugat (Im Verhältnis 1:10000 verdünnt) überführt. Nach einstündiger Inkubation wurde die Membran erneut 3-mal für 5 Minuten mit TBS-T Puffer gewaschen. Mit Hilfe einer ECL-Lösung (*GE Healthcare*) wurde das HRP-Konjugat nachgewiesen.

TBS-T-Puffer
10 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
0,1 % (v/v) Tween 20
pH 7,4

2.9.14 Immunopräzipitation

Mit dieser Methode können spezifische Proteine aus Zelllysaten mit Hilfe von Antikörpern, die am Mikropartikel gekoppelt sind, präzipitiert werden. Durch Zentrifugation können die mit einem Antikörper konjugierten Mikropartikel sedimentiert werden. Proteine die Spezifisch an den Antikörper gebunden haben, werden so selektiv angereichert. Das immunopräzipitierte Material kann dann durch

eine SDS-PAGE und anschließendem Western Blot oder Massenspektrometrie auf die Anwesenheit verschiedener Proteine untersucht werden. So kann z.B. *in vivo* die Interaktion von Proteinen nachgewiesen werden (Berggard et al., 2007).

Immunopräzipitationen wurden mit *S. cerevisiae* Zelllysaten durchgeführt und einheitlich wurde TNETG-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerol, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 1 mM PMSF) verwendet. Dabei wurden 200 – 250 µl der Probe mit 5-30 µl der entsprechenden Immunobeads versetzt. Die Immunobeads wurden vor der Anwendung resuspendiert. Daraufhin wurde die Suspension bei 4°C für eine Stunde rotierend inkubiert. Im nächsten Schritt folgte eine Sedimentation der Immunobeads (10 min, 900·g, 4°C) und der Überstand wurde verworfen (10 min, 900·g, 4°C). Die Sedimentfraktion wurde 3-mal mit 500µl TNETG-Puffer gewaschen. Abschließend wurden die Immunobeads in 50µl TNETG oder 50 µl ddH_2O aufgenommen. Erfolgte einen Szintillationszählung, so wurden die Immunobeads noch zusätzlich mit 1ml der Ultima-Gold-Lösung (*Perkin Elmar*) versetzt.

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

Um die Fähigkeit von den in dieser Arbeit angefertigten mutierten Grx4 Varianten zu untersuchen, einen Fe/S Cluster in vivo binden zu können, wurden Wildtyp-W303-1A Zellen mit den entsprechenden Proteine unter Eisenmangelbedingungen herangezogen und mit radioaktivem ^{55}Fe (Elektroneneinfang, 5,9 keV, t1/2 1005 d) für 2 Stunden inkubiert. Die verschiedenen Grx4 Varianten wurden daraufhin immunopräzipitiert (siehe Kapitel 2.9.14) und die Rate an inkorporiertem ^{55}Fe wurde durch Szintillationszählung bestimmt.

Die entsprechenden *S. cerevisiae* Zellen wurden in 50 ml SD Medium für 16 Stunden inkubiert und durch Zentrifugation (5 min, 1800·g) geerntet. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml ddH_2O gewaschen. 100ml SD-Medium, das nur einer sehr geringen Eisenkonzentration aufwies und als „Eisen-freies“ Medium bezeichnet wird, wurde dann mit diesen Zellen und einer OD von 0,2 inokuliert. Diese Kultur wurde für 16 Stunden bei 37°C inkubiert, woraufhin die Zellen sedimentiert (5 min, 1800·g) und mit ddH_2O gewaschen wurden. Im nächsten Schritt wurden genau 0,5g

Zellen in 10ml Eisen-freies Medium überführt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 30°C wurde die Kultur mit 10µCi $^{55}FeCl_3$ (*Perkin Elmer*) in 100 mM Natriumascorbat versetzt, und für 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen Sedimentiert (5 min, 1800·g) und mit 10ml Citrat-Puffer (50 mM Na-Citrat, 1 mM EDTA, pH 7,0) gewaschen. Weiterhin wurden die Zellen in 10ml ddH_2O gewaschen und mit Hilfe von Glasperlen aufgeschlossen (siehe Kapitel 2.9.1). Anschließend wurden die entsprechenden Grx4 Varianten mit αMyc-Immunobeads präzipitiert (siehe Kapitel 2.9.14). Die Menge an inkorporiertem ^{55}Fe wurde dann durch Szintillationszählung bestimmt.

2.9.16 Analyse der Interaktion von Aft1 und Grx4

Gal-GRX4/Aft1-luc2 Zellen mit den entsprechenden Myc-getaggten Grx4 Varianten wurden für 48 Stunden in Glukose-haltigem Medium inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 1800·g) geerntet und mit der Hilfe von Glasperlen lysiert (siehe Kapitel 2.9.1). Anschließend wurden die Grx4-Myc Proteine mit αMyc-Antikörpern in einer Mikrotiterplatte immunopräzipitiert (siehe Kapitel 2.9.14). Die sedimentierten Immunobeads wurde einmal mit TNETG und einmal mit CCLR Puffer (25 mM Tris-Phosphat ph 7,8, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% Glyzerin, 0,1% Triton X-100) gewaschen. Die Immunobeads wurden nach dem letzten Waschschritt in 5 µl CCLR Puffer aufgenommen (siehe Kapitel 2.9.9). Die Menge an kopräzipitiertem Aft1 wurde durch die Messung der Luciferase-Aktivität bestimmt (siehe Kapitel 2.9.9).

2.9.17 Identifikation von ubiquitinylierten oder sumoylierten Proteinen

100 ml Synthetisches-Minimalmedium mit den entsprechend Supplementen wurden mit dem jeweiligem *S. cerevisiae* Stamm, der das *UBI4-HIS*-p*CUP1* oder *SMT3-HIS*-p*CUP1* Plasmid enthielt, aus einer Vorkultur inokuliert, sodass eine OD von 0,1 vorlag. Anschließend wurden die Kulturen für 16 Stunden bei 30°C schüttelnd (150 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5min, 1800·g) sedimentiert und mit 10 ml ddH_2O gewaschen. 0,5 g Hefe-Zellen (Feuchtgewicht) wurden anschließend in 100 ml Synthetisches-Minimalmedium mit 1mM Kupfersulfat und 50

µM Bathophenantrolin oder 50 µM Eisenammoniumcitrat überführt und bei 30°C für 2 - 4 Stunden inkubiert. Die Zugabe von Kupfersulfat, Bathophenantrolin oder Eisenammoniumcitrat erfolgte dabei direkt oder wenn angegeben, nach 2 Stunden. Daraufhin wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 1800·g) sedimentiert und mit 10 ml ddH_2O gewaschen. Alle Arbeitsschritte wurden von nun an auf Eis mit vorgekühlten Puffern durchgeführt. Anschließend wurde genau 0,5 g Hefezellen (Feuchtgewicht) mit Hilfe von Glasperlen in 0,5 ml Ni-NTA-Puffer A lysiert (siehe Kapitel 2.9.1). Die Glasperlen wurden durch Zentrifugation (3 min, 1800·g, 4°C) sedimentiert. 1ml des Überstandes wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die nicht löslichen Bestandteile der Zelle wurden durch Zentrifugation (10 min, 16000·g, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 10µl einer 10%igen Tween-20-Lösung sowie 15µl einer 1M Imidazol-Lösung pH 8,0 versetzt. Zu dem Ansatz wurde nun 50µl Ni-NTA Agarose hinzugegeben. Vor der Verwendung wurde die Ni-NTA Agarose 3-mal mit dem Ni-NTA-Puffer A gewaschen. Nach der Zugabe der Ni-NTA Agarose wurde der Ansatz bei 4°C für 16 Stunden rotierend inkubiert.

Anschließend wurde die Ni-NTA Agarose durch Zentrifugation (10 min, 900·g, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Ni-NTA Agarose 2-mal mit 1 ml Ni-NTA Puffer A, und 3-mal mit 1ml Ni-NTA Puffer B gewaschen. Die Immunobeads wurden dann in 100µl Laemmli-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 % (w/v) Glyzerin, 2 % (w/v) SDS, 0,05 mg/ mL Bromphenolblau, 2,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) resuspendiert und für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht. Im letzten Schritt wurde die Ni-NTA Agarose erneut sedimentiert (5 min, 900·g) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Ni-NTA Agarose wurde verworfen und das präzipitierte Material durch eine SDS-PAGE (siehe 2.9.10) und anschließendem Western Blot (siehe Kapittel 2.9.11 und 2.9.13) analysiert.

Ni-NTA Puffer A	**Ni-NTA Puffer B**
100 mM NaH_2PO_4	100 mM NaH_2PO_4
10 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl
6 M Guanidinhyrochlorid	8 M Urea
ph 8,0	pH 6,3
1 mM PMSF	1 mM PMSF

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Aminosäurereste im aktiven Zentrum von Grx4 in Bezug auf ihre Funktion in der Eisenbindung und der Regulation der Eisenhomöostase

Durch vorhergehende Arbeiten an den Thioredoxin-Glutaredoxin Multidomänen Fusionsproteinen wurde gezeigt, dass Grx3-4 einen Eisen-Schwefel (Fe/S) Cluster im aktiven Zentrum der Glutaredoxindomäne binden (Hanschmann et al., 2013; Muhlenhoff et al., 2010). Sind Grx3-4 nicht mehr in der Lage einen Fe/S Cluster zu binden, so können sie ihre generelle Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine nicht mehr ausüben (Muhlenhoff et al., 2010). Bisher ist aber nur wenig bekannt, welche Voraussetzungen ein aktives Zentrum eines Glutaredoxins erfüllen muss, um einen Eisen-Schwefel-Cluster binden zu können. Ein Prolin im aktiven Zentrum scheint mit der Bindung eines Fe/S Kofaktors inkompatibel zu sein, und die Substitution des Prolins zu einem Serin oder Glycin befähigt die entsprechenden Glutaredoxine einen Fe/S Cluster zu koordinieren (Lillig et al., 2008). Diese Erkenntnisse basieren auf *in vitro* Studien mit rekombinanten Proteinen aus *E. coli*. Die *in vivo* Relevanz dieser Aussagen konnte bisher aber nicht untersucht werden, da die genaue physiologische Funktion der meisten Monothiol-Glutaredoxine nicht bekannt ist. Darüber hinaus kann die Eisenbindung von Grx3-4 aus *S. cerevisiae* in seiner natürlichen Umgebung *in vivo* analysiert werden und mit ihr ist eine essenzielle Funktion assoziiert. Dies stellt eine einzigartige Gelegenheit dar, die Beziehung von Struktur und Funktion der Monothiol-Glutaredoxine zu untersuchen. Dabei sollte auch bestimmt werden, welche Aminosäurereste im aktiven Zentrum von Grx3-4 wichtig für die Regulation des Transkriptionsfaktor Aft1 sind, der eine wichtige Funktion in der zellulären Eisenhomöostase in *S. cerevisiae* hat. Das erste Ziel dieser Studie war es, präzise die Fe/S Bindestelle im aktiven Zentrum in Bezug auf die Fe/S-Clusterbindung, die Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine *in vivo* und die Regulation des Transkriptionsfaktors Aft1 zu untersuchen. Dafür wurden die benachbarten Aminosäuren des konservierten Cysteins im CGFS aktivem Zentrum systematisch durch andere natürlich vorkommende Aminosäurereste ersetzt. Die modifizierten Proteine wurden dann in der Hefe unter der Kontrolle des nativen *GRX4* Promotors exprimiert (Tabelle 3.1).

Hierzu wurde eine modifizierte Version des Plasmids pCM189 verwendet, in dem der *tetO$_7$* Promotor durch den endogenen *GRX4* Promotor ersetzt worden war.

Tabelle 3.1. Motive der Glutaredoxine und ihr natürliches Vorkommen

Motiv	Beispiel	Lokalisation	Organismus
CGFS	Grx4	Cytosol	*Saccharomyces cerevisiae*
CPFS	α-Glutathion-Transferase A1-1	Cytosol	*Homo sapiens*
CGYS	kommt nicht natürlich vor		
CPYS	Grx7	cis-Golgi	*S. cerevisiae*
CGFC	GrxC	Cytosol	*Roseovarius. sp. TM1035*
CPFC	Grx C2	Cytosol	*P. trichocarpa*
CSYC	Grx2	Cytosol	*H. sapiens*
CPYC	klassisches Dithiol	Cytosol	Ubiquitär

Die Aminosäuren, die sich vom CGFS Wildtyp-Grx4 Motiv im aktiven Zentrum unterscheiden, sind unterstrichen.

Als erstes wurde der Effekt der Substitution von Glycin zu Prolin untersucht, da *in vitro* rekombinante Glutaredoxine, mit einem CPFS oder CPYS Motiv im aktiven Zentrum, nahezu völlig die Fähigkeit verlieren, einen Fe/S Cluster zu binden (Berndt et al., 2007; Rouhier et al., 2007; Su et al., 2007). Dazu wurden Grx4 Proteine mit jeweils einem CPFS, CPYS oder CGYS Motiv im aktiven Zentrum in dem regulierbaren Hefe Stamm Gal-GRX4/grx3Δ (Gal-GRX4) exprimiert. Dabei wiesen alle Grx4 Varianten einen C-terminalen Myc-Tag auf, und die Expression erfolgte unter der Kontrolle des endogenen *GRX4* Promotors von einem Plasmid aus. Der Gal-GRX4/grx3Δ (Gal-GRX4) Stamm wurde verwendet, da in diesem Stamm das endogene *GRX4* unter der Kontrolle des Glukose-repremierbaren Promotors *GAL-L* exprimiert wird. Weiterhin ist in diesem Stamm *GRX3* deletiert. Um die Effekte der Mutationen auf die Funktion von Grx4 zu untersuchen wurden Gal-GRX4 Zellen zunächst in SC Minimalmedium mit Glukose für 40 h kultiviert. Um zu überprüfen, ob die Mutationen einen vollständigen Funktionsverlust von Grx4 zur Folge haben, wurde eine Verdünnungsreihe der depletierten Gal-GRX4 Zellen auf Glyzerin-haltigem SC Minimalmedium ausplattiert. Während Grx4 depletierte Gal-GRX4 Zellen keine Kolonien mehr auf diesem Medium bilden konnten, waren Zellen mit einer der drei Grx4-Myc Varianten in der Lage, auf diesem Medium zu wachsen. Das Wachstum war dabei mit dem von Wildtyp-Grx4 exprimierenden Gal-GRX4 Zellen vergleichbar (Abb. 13.B). Um weiterhin die Auswirkungen auf den Eisenstoffwechsel

zu untersuchen, wurden die Aktivitäten des mitochondrialen Fe/S Proteins Aconitase und des cytosolischen Häm-Proteins Katalase gemessen. Konsistent mit dem Wachstumsverhalten konnten in Gal-GRX4 Zellen mit einer der Grx4-Myc Varianten die gleichen Enzymaktivitäten, wie in Wildtyp-Grx4 exprimierenden Gal-GRX4 Zellen, nachgewiesen werden (Abb. 13.C). Im nächsten Schritt wurde dann die Fähigkeit der verschiedenen Grx4 Proteine analysiert, Eisen *in vivo* zu binden. Hierfür wurden die entsprechenden Grx4-Myc Varianten unter der Kontrolle des starken $tetO_7$ Promotors im Wildtyp-Hefe Stamm W303 überexprimiert und die Zellen mit radioaktiven ^{55}Fe markiert. Anschließend folgte eine Immunopräzipitation mit einem αMyc Antikörper und die Menge an Grx4-Myc gebundenem ^{55}Fe wurde durch Szintillationszählung bestimmt. Bemerkenswerterweise banden die Grx4 Proteine, mit einem CPFS, CPYS oder CGYS Motiv im aktiven Zentrum fast die gleichen Mengen an Eisen wie das Wildtyp-Protein (Abb. 13.E). Da die Proteine in vergleichbaren Mengen exprimiert wurden, beeinflusst ein CPxS Motiv im aktiven Zentrum weder die Koordination eines Fe/S Kofaktors noch die Funktion von Grx4 bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Multidomänen Thioredoxin-Glutaredoxin Fusionsproteine von den Einzeldomänen Glutaredoxinen unterscheiden. Bei den Einzeldomänen Glutaredoxinen ist die Insertion von einem Prolin ins aktive Zentrum inkompatibel mit der Koordination eines Fe/S Clusters.

In *S. cerevisiae* fungiert das an Grx3-4 gebundene Eisen als Sensor für den Eisen-regulierten Transkriptionsfaktor Aft1. Dieser aktiviert unter eisenlimitierenden Bedingungen die Expression von Genen, die bei der zellulären Eisenaufnahme involviert sind (Muhlenhoff et al., 2010; Ojeda et al., 2006; Pujol-Carrion et al., 2006). Um den Effekt der Mutationen im aktiven Zentrum auf die Rolle von Grx4 als Eisensensor zu untersuchen, wurde die Expressionsrate des Aft1 abhängigen Gens *FET3* bestimmt. Dabei fungierte ein *FET3*-Promotor-GFP Fusionskonstrukt als Reporter (Molik et al., 2007). Während in Grx4 depletierten Zellen der *FET3* Promotor voll aktiviert war, konnte in Gal-GRX4 Zellen mit der CGYS Mutante nur eine basale Aktivität des *FET3* Promotors gemessen werden. Diese war vergleichbar mit der *FET3* Promotoraktivität in Wildtyp-Grx4 exprimierenden Gal-GRX4 Zellen. Im Gegensatz dazu war der *FET3* Promotor in Zellen mit der CPFS- oder CPYS-Grx4

Variante partiell aktiviert (Abb. 13.D). Anscheinend war Aft1 teilweise dereguliert. Offensichtlich beeinflusst ein Prolin im aktiven Zentrum die Funktion von Grx4 als Eisen-Sensor, obwohl die Eisenbindung durch diese Substitution nicht beeinträchtigt ist. Anscheinend reichen schon kleine Änderungen in der Umgebung des Fe/S Kofaktors aus, um die Funktion von Grx4 als Eisensensor zu stören.

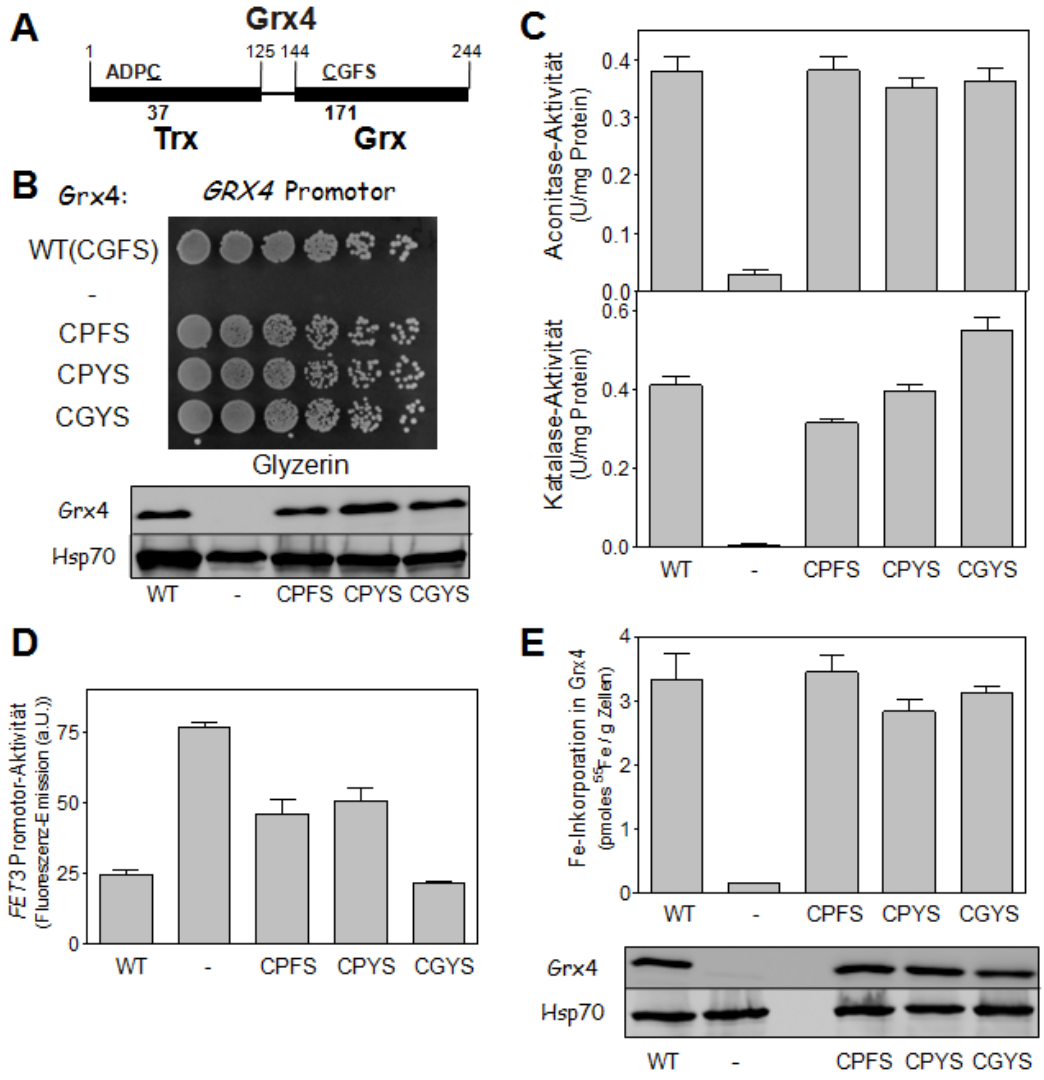

Abbildung 13. Ein Prolin im aktiven Zentrum der Glutaredoxindomäne beeinträchtigt nicht die Funktion von Grx4. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Grx4. (B-D) Gal-GRX4 Zellen, die Wildtyp-Grx4 oder die angegebenen Grx4 Mutanten unter der Kontrolle des *GRX4* Promotors exprimieren, wurden in Glukose-haltigem Minimalmedium (SD) kultiviert. (B) Nach 40 Stunden wurden sechs serielle 1:10 Verdünnungen auf Glyzerin-haltigem Minimalmedium getüpfelt und die Agarplatte bei 30°C kultiviert. Die Expression der einzelnen Grx4 Varianten wurde durch immunologische Färbungen der untersuchten Zellextrakte in Western Blots mit αMyc Antikörpern bestimmt. Die Färbung des cytosolischen Proteins Hsp70 diente als Ladekontrolle. (C) Nach 64 Stunden wurden die Enzymaktivitäten der Aconitase und Katalase gemessen und (D) die Aktivität des *FET3* Promotors wurde bestimmt. (E) W303-1A Wildtyp-Zellen, die das Wildtyp-Grx4 oder die

angegebenen Grx4 Varianten unter der Kontrolle des *tetO$_7$* Promotors exprimierten, wurden für 16 Stunden in Eisen-freiem SD Minimalmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 10µCi ^{55}Fe für zwei Stunden radioaktiv markiert. Grx4 wurde aus den Zellextrakten mit αMyc-Antikörpern immunpräzipitiert, und die Menge an kopräzipitierten ^{55}Fe wurde durch Szintillationszählung bestimmt. Die Expression von Grx4 und Hsp60 wurde durch immunologische Färbungen der untersuchten Zellextrakte in Western Blots bestimmt. Zellen mit dem Leervektor pCM189 (-) dienten als Kontrollen. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (Standard Error of the Mean, SEM), an. (n > 4).

Grx3-4 sind in *S. cerevisiae* wichtige Proteine und die Funktion der cytosolischen Monothiol-Glutaredoxinen kann nicht von ihren verwandten cytosolischen Dithiol-Glutaredoxinen übernommen werden (Muhlenhoff et al., 2010; Peggion et al., 2008). Daher ist möglicherweise ein Dithiol-Motiv im aktiven Zentrum inkompatibel mit der generellen Funktion von Grx3-4 bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine. Aus diesem Grund wurden Grx4 Varianten mit einem CSYC, CGFC, CPFC oder CPYC Motiv im aktiven Zentrum konstruiert. Ein CSYC Motiv kommt im aktiven Zentrum des humanen Grx2 vor und klassische Dithiol-Glutaredoxine weisen CPFC oder CPYC Motive auf. Alle vier Grx4 Varianten komplementierten den Wachstumsphänotyp von Grx4 depletierten Zellen wie das Wildtyp-Protein (Abb. 14.A). Allerdings waren die Aktivitäten des mitochondrialen Fe/S Enzyms Aconitase in Gal-GRX4 Zellen mit einer der Grx4 Mutanten um 25% bis 50% niedriger als in Gal-GRX4 Zellen mit dem Wildtyp-Protein. Die Aktivitäten der Katalase waren allerdings generell stärker beeinflusst (bis zu ~5,8-fach reduziert). Wenn Grx4 Varianten exprimiert wurden, die im Dithiol-Motiv zusätzlich noch ein Prolin an der Position 2 aufwiesen, war dieser Effekt nochmal stärker ausgeprägt (Abb. 14.B). Darüber hinaus haben alle Dithiol-Grx4 Varianten wesentlich weniger Eisen gebunden (~2,5 bis ~5,5-fach reduziert), wenn die Proteine jeweils in Wildtyphefezellen überexprimiert und die Zellen mit radioaktiven ^{55}Fe markiert wurden (Abb. 14.D). Dieser Effekt war generell bei Dithiol-Grx4 Varianten mit einem Prolin im aktiven Zentrum größer (bis zu dem Faktor 12 im Vergleich zum Wildtyp-Protein reduziert), als bei den Grx4 Varianten mit einem CSYC oder CGFC Motiv im aktiven Zentrum (Bis zu 2.6-5,5-fach reduziert). Zusätzlich war der *FET3* Promotor in Gal-GRX4 Zellen mit einer der vier Dithiol-Grx4 Versionen voll aktiviert. Somit ist ein Dithiol im aktiven

Zentrum von Grx4 inkompatibel mit der Regulation des Transkriptionsfaktors Aft1 (Abb. 14.C). Offensichtlich unterscheidet Aft1 zwischen Monothiol- und Dithiol-Glutaredoxinen und kann nicht von Dithiol-Glutaredoxinen reguliert werden. Ob Aft1 direkt den zweiten Cystein-Rest erkennt, oder auf die reduzierte Menge an gebundenem Eisen reagiert, kann hierbei nicht unterschieden werden.

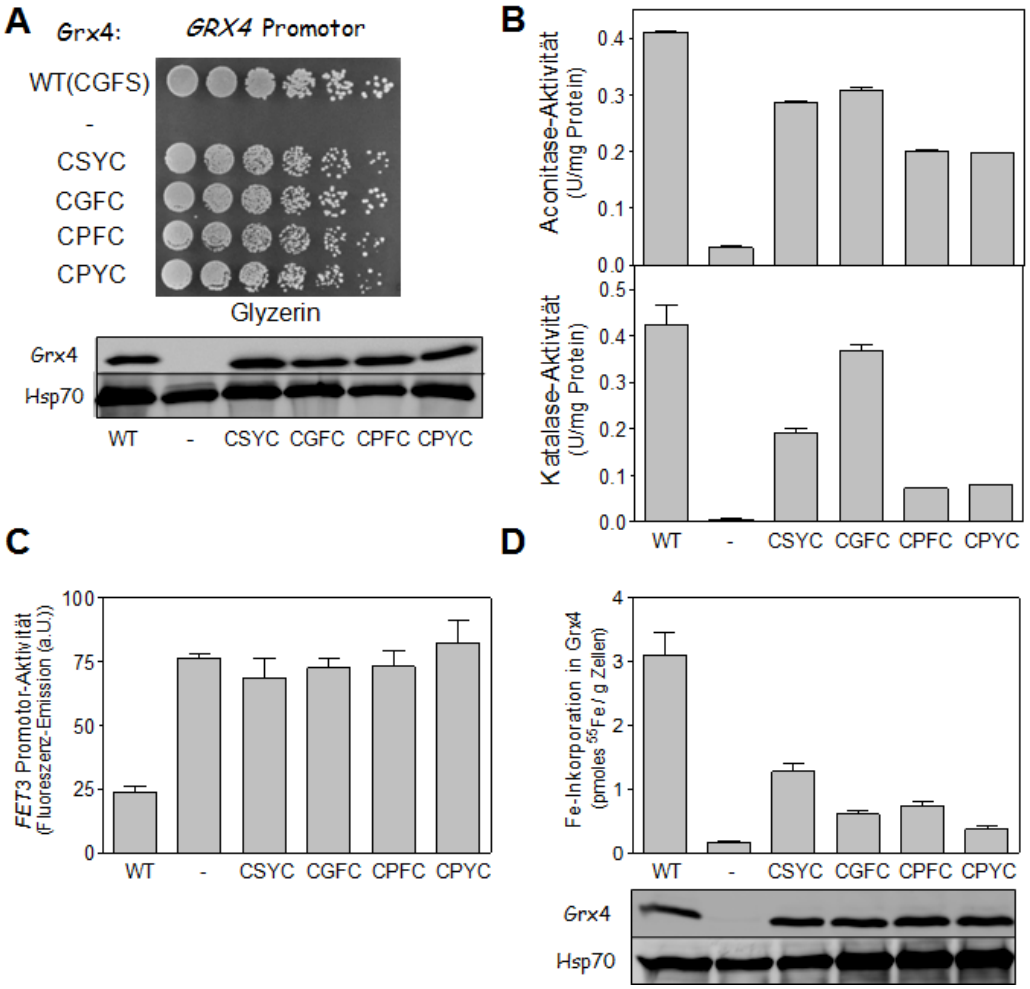

Abbildung 14. Ein Dithiol-Motiv im aktiven Glutaredoxin-Zentrum beeinträchtigt die Funktionen von Grx4 bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine und der Regulation der Eisenhomöostase. (A-C) Gal-GRX4 Zellen, die Wildtyp-Grx4 und die angegebenen Grx4 Mutanten unter der Kontrolle des *GRX4* Promotors exprimieren, wurden in *SD* Minimalmedium kultiviert. (A) Nach 40 Stunden wurden 6 serielle 1:10 Verdünnungen auf Glyzerin-haltigem Minimalmedium getüpfelt und die Agarplatte bei 30°C kultiviert. Die Expression der einzelnen Grx4 Varianten wurde durch immunologische Färbungen der untersuchten Zellextrakte in Western Blots mit αMyc Antikörpern bestimmt. Die Färbung des cytosolischen Proteins Hsp70 diente als Ladekontrolle. (B) Nach 64 h wurden die Enzymaktivitäten der Aconitase und Katalase gemessen und (C) die Aktivität des *FET3* Promotors wurde bestimmt. (D) W303-1A Wildtyp-Zellen die das Wildtyp-Grx4 oder die angegebenen Grx4 Varianten unter der Kontrolle des *tetO*$_7$ Promotors exprimierten, wurden für 16 Stunden in eisenfreiem SD Minimalmedium kultiviert. Anschließend wurde die Eisenbindung an die

Grx4 Varianten durch *in vivo* Markierung mit ^{55}Fe und Immunopräzipitation mit αMyc-Antikörpern bestimmt. Die Expression von Grx4 und Hsp70 wurde durch immunologische Färbungen der untersuchten Zellextrakte in Western Blots bestimmt. Zellen mit dem Leervektor pCM189 (-) dienten als Kontrollen. Die Fehlerbalken geben den SEM an (n > 4).

Zusammengefasst hat (1) ein Dithiol-Motiv im aktivem Zentrum einen deutlich stärkeren Effekt auf die Eisenbindung der cytosolischen Glutaredoxin-Thioredoxin Fusionsproteine und ihre generelle Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine sowie ihre Funktion als Eisensensor, als ein Prolin an Position 2. (2) Im Gegensatz zu den Multidomänen Glutaredoxinen können Einzeldomänen Glutaredoxine effizient einen Fe/S Kofaktor binden, auch wenn sich ein Dithiol-Motiv im aktiven Zentrum befindet, wie es für das humane Grx2 der Fall ist (Lillig et al., 2005). (3) Weiterhin sind Einzeldomänen Glutaredoxine in Bezug auf die Bindung eines Fe/S Kofaktors generell deutlich sensitiver für die Insertion eines Prolins ins Motiv des aktiven Zentrums, als die Multidomänen Glutaredoxine.

Genau wie es für die Einzeldomänen Glutaredoxinen beschrieben wurde, fungiert, nach *in vitro* Rekonstitution des Kofaktors, reduziertes Glutathion (GSH) als Ligand für den durch Grx4 gebundenen Fe/S Cluster (Hoffmann et al., 2011). Um zu testen welche Rolle das nicht kovalent gebundene GSH *in vivo* spielt, wurden zwei Mutationen, T211R und T226R, an der GSH Bindestelle eingeführt. Im humane Grx2 beeinflussen Mutationen an diesen Positionen die GSH Bindung kritisch (Berndt et al., 2007). In Einklang mit den *in vitro* Daten war die Eisenbindung um den Faktor 2 reduziert, wenn einer der beiden Varianten unter der Kontrolle eines starken Promotors in Grx4-depletierten Zellen exprimiert wurde (Abb. 15.A). Allerdings konnten die beiden mutierten Proteine die niedrigen Enzymaktivitäten der Aconitase sowie der Katalase von Grx4 depletierten Gal-GRX4 Zellen weitestgehend komplementieren (Abb. 15.B).

Eine katalytisch wichtige Funktion der Thioredoxin Domäne wurde aus vorangegangen Arbeiten ausgeschlossen, da das konservierte Cystein der Thioredoxin Domäne nicht für die *in vivo* Funktion von Grx4 in *S. cerevisiae* gebraucht wird (Muhlenhoff et al., 2010). Konsistent zeigte eine Grx4-W33D

Variante *in vivo* eine normale Eisenbindung. Darüber hinaus komplementierte Grx4-W33D den Phänotyp der Gal-GRX4 Zellen vollständig (Abb. 15.B). Bei dieser Variante wurde das Tryptophan, welches direkt neben dem aktiven Zentrum der Thioredoxindomäne lokalisiert ist, durch ein Aspartat ersetzt.

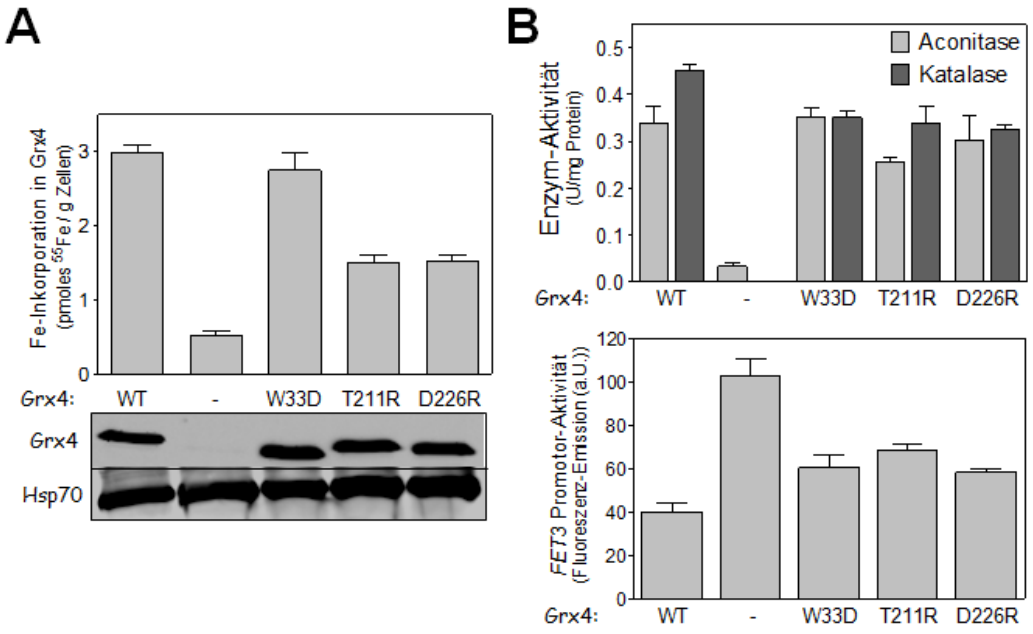

Abbildung 15. Glutathion dient als Ligand des Fe/S Clusters des Multidomänen Glutaredoxins 4 (Grx4). (A) Die Eisenbindung an die angegebenen Grx4 Varianten wurde durch *in vivo* Markierung mit ^{55}Fe und Immunopräzipitation mit αMyc-Antikörpern entsprechend Abb. 13 bestimmt. Die Expression von Grx4 und Hsp70 wurde durch immunologische Färbungen der untersuchten Zellextrakte in Western Blots bestimmt. (B) Gal-GRX4 Zellen, die Wildtyp-Grx4 und die angegebenen Grx4 Mutanten unter der Kontrolle des *GRX4* Promotors exprimieren, wurden in *SD* Minimalmedium kultiviert. Nach 64 Stunden wurden die Enzymaktivitäten der Aconitase und Katalase gemessen und die Aktivität des *FET3* Promotors wurde bestimmt. Zellen mit Leervektor pCM189 (-) dienten als Kontrollen. Die Fehlerbalken geben den SEM an (n > 4).

3.2 Die Analyse der Funktion der Thioredoxindomäne

Für die Funktion von Grx3-4 in *S. cerevisiae* ist nur das konservierte Cystein im CGFS Motiv des aktiven Zentrums der Glutaredoxindomäne essenziell, was die bisherigen Analysen gezeigt haben (Muhlenhoff et al., 2010). Weiterhin können die cytosolischen Dithiol-Glutaredoxine Grx1 und Grx2 nicht die Funktion der cytosolischen Monothiol-Glutaredoxine Grx3-4 übernehmen. Diese Tatsache kann

nicht allein durch die Unterschiede in den Motiven der aktiven Zentren erklärt werden. Aus diesem Grund wurde analysiert, ob das Fehlen der funktionellen Komplementation durch Dithiol-Glutaredoxine nur auf Unterschiede in der Glutaredoxin Domäne beschränkt ist. Darüber hinaus ist nicht bekannt welche Funktion die Thioredoxindomäne hat und ob sie überhaupt essenziell ist. Aus diesen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit die einzelne Thioredoxindomäne sowie die einzelne Glutaredoxindomäne von Grx4 separat in Gal-GRX4 Zellen exprimiert. Dabei waren beide Domänen alleine nicht in der Lage den Phänotyp von Gal-GRX4 Zellen in Bezug auf das Wachstum, sowie die Funktion von Eisen-abhängigen Enzymen zu komplementieren, obwohl sie in großen Mengen exprimiert wurden (Abb. 16.A,B). Aus diesem Grund ist die Thioredoxindomäne essenziell für die Funktion von Grx3-4 in *S. cerevisiae*.

Grx4 kann weiterhin die Funktion von dem mitochondrialen Einzeldomänen Monothiol-Glutaredoxin Grx5 ersetzen, was auf eine hohe funktionelle Konservierung der beiden Proteine hindeutet (Molina et al., 2004). Bei diesen Experimenten wurde eine Grx4 Variante verwendet, die am N-Terminus ein mitochondriales Signalpeptid aufwies. Daher wurde im nächsten Schritt analysiert, ob Grx5 aus *S. cerevisiae* die Funktion von Grx3-4 im Cytosol übernehmen kann. Um eine cytosolische Lokalisation von Grx5 zu erreichen, wurde in dieser Arbeit eine Grx5 Variante (ΔN-Grx5) verwendet, bei der die ersten 24 Aminosäuren deletiert waren. Die deletierten Aminosäuren stellen das mitochondriale Lokalisationssignal dar. Die Expression erfolgte dabei unter der Kontrolle des starken Promotors *MET25* von einem Plasmid aus. Wie erwartet konnte die Überexpression von ΔN-Grx5 den Wachstumsphänotyp von Gal-GRX4 Zellen nicht komplementieren (Abb. 16.A). ΔN-Grx5 exprimierende Gal-GRX4 Zellen waren nicht in der Lage auf Glyzerin-haltigem Minimalmedium zu wachsen. Unter diesen Bedingungen werden Hefezellen gezwungen zu respirieren. Aber auch unter fermentativen Bedingungen, bei denen der Zelle Glukose als C-Quelle angeboten wird, konnte kein Wachstum beobachtet werden (Abb. 16.A).

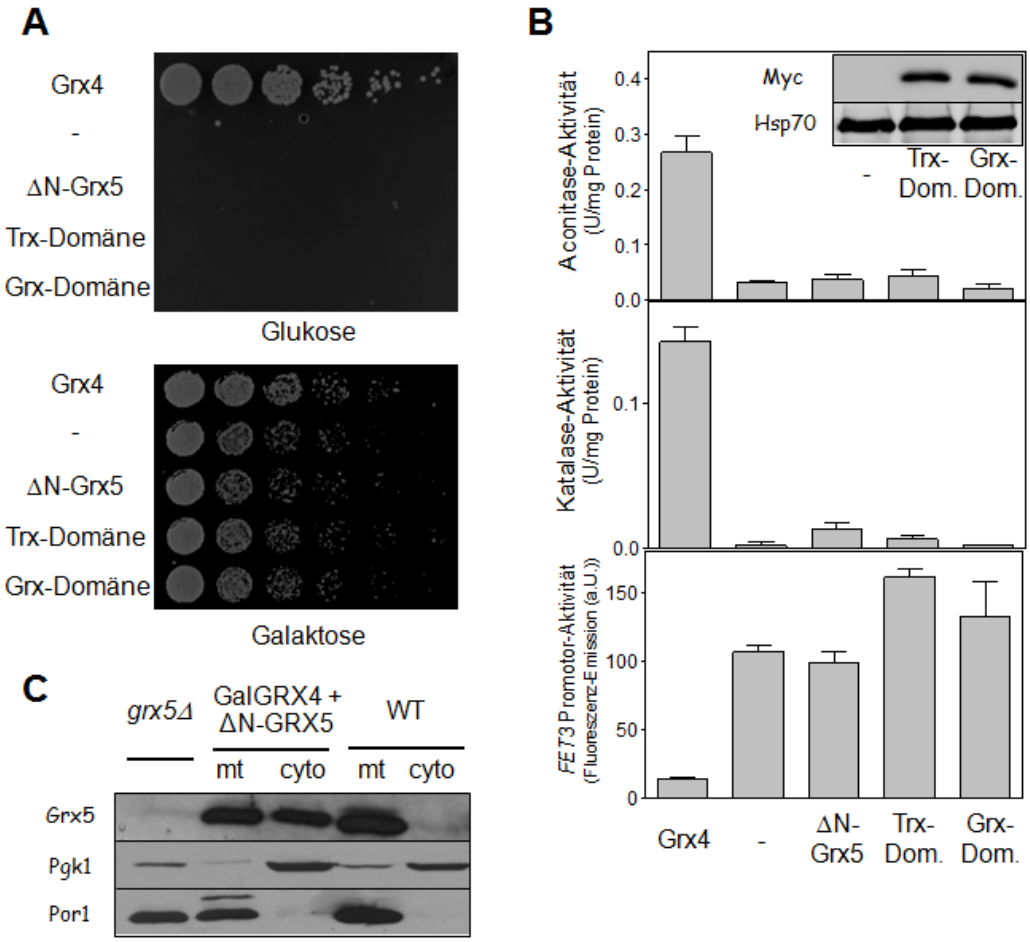

Abbildung 16. Die N-terminale Thioredoxindomäne ist essenziell für die Funktion von Grx4. (A) Gal-GRX4 Zellen die entweder das Wildtyp-Grx4, eine cytosolische *S. cerevisiae* Grx5 Variante (ΔN-Grx5), die N-terminale Thioredoxin-(Trx) oder die C-terminale Glutaredoxindomäne (Grx) von Grx4, unter der Kontrolle des *tetO*$_7$ oder *MET25* Promotors überexprimierten, wurden in *SD* Minimalmedium kultiviert. (A) Nach 40 Stunden wurden 6 serielle 1:10 Verdünnungen auf Minimalmedium mit Glukose oder Galaktose getüpfelt und bei 30°C kultiviert. (B) Nach 64 Stunden wurden die Enzymaktivitäten der Aconitase und Katalase gemessen und (C) die Aktivität des *FET3* Promotors bestimmt. Die Expression von Grx4 und Hsp70 wurde durch immunologische Färbungen der untersuchten Zellextrakte in Western Blots bestimmt (Inset). Zellen mit dem Leervektor pCM189 (-) dienten als Kontrollen. Die Fehlerbalken geben den SEM an (n > 4). (C) ΔN-Grx5 exprimierende Zellen wurden in SD Minimalmedium kultiviert und die Mitochondrien (Mito) sowie der Postmitochondriale-Überstand (PMS) wurden isoliert. Durch Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern wurden die erhaltenen Fraktionen auf die Anwesenheit von Grx5, das mitochondriale Protein Por1, oder das cytosolische Protein 3-Phosphoglycerat-Kinase Pgk1 untersucht. *grx5*Δ Zellen dienten als Kontrolle.

Konsistent mit diesen Ergebnissen zeigten ΔN-Grx5 exprimierende Gal-GRX4 Zellen nur sehr geringe Aconitase- und Katalase-Aktivitäten und der *FET3* Promotor war voll aktiviert (Abb. 16.B). Hierbei war ΔN-Grx5 im Cytosol und den Mitochondrien lokalisiert, was subzelluläre Fraktionierungs-Experimente zeigten (Abb. 16.C). Daher konnte ΔN-Grx5 offensichtlich nicht Grx3-4 im Cytosol funktionell ersetzen. Dies

bestätigt den essenziellen Charakter der Thioredoxindomäne. Zusammengefasst unterscheiden sich die Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine funktionell von den Einzeldomänen Glutaredoxinen, da die N-terminale Thioredoxindomäne essenziell für ihre Funktion ist.

3.3 Nur das *S. pombe* Grx4 ist in *S. cerevisiae* partiell funktionell

Als Nächstes wurde untersucht, in wie weit homologe Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine anderer Spezies Grx3-4 in *S. cerevisiae* funktionell ersetzten können, da eine einzelne Glutaredoxindomäne offensichtlich nicht ausreichend ist. Dazu wurden das humane Grx3 (PICOT), das Grx3 aus *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), sowie das Grx4 aus *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) unter der Kontrolle des *TDH3* Promotors in Gal-GRX4 Zellen überexprimiert. Von allen getesteten Proteinen war nur das Grx4 aus *S. pombe* in der Lage, den Wachstumsphänotyp von Gal-Grx4 Zellen partiell zu komplementieren. *S. pombe* Grx4 exprimierende Gal-GRX4 Zellen konnten auf Glukose-haltigem Medium wachsen (Abb. 17.A). Allerdings waren die Zellen nicht in der Lage zu respirieren, da sie nicht auf Glyzerin-haltigem Medium wachsen konnten. Wurde das *S. pombe* Grx4 unter der Kontrolle des endogenen *S. cerevisiae* Grx4 Promotors exprimiert, so konnte nur noch ein leichter Wachstumsdefekt auf Glukose-haltigen Medien beobachtet werden (Abb. 17.A). Im Einklang mit diesen Daten führte die Überexpression von Grx4 aus *S. pombe* zu einem moderaten Anstieg der Aktivitäten der getesteten Eisen-abhängigen Enzyme. Die Enzymaktivitäten der Aconitase und der Katalase lagen bei 20%-30% der *S. cerevisiae* Grx4 exprimierenden Gal-GRX4 Zellen (Abb. 17.B). Dieser „high-copy Suppressor“ Phänotyp des *S. pombe* Grx4 zeigt, dass die eukaryotischen Multidomänen Glutaredoxine funktionelle Orthologe sind. Allerdings existieren Spezies-spezifische Unterschiede, die funktionelle Studien in *S. cerevisiae* unmöglich machen. Da Gal-GRX4 Zellen nicht, oder nur partiell durch cytosolische Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine aus anderen Spezies komplementiert werden können, unterscheiden sich die Multidomänen Glutaredoxine von den Einzeldomänen Proteinen. Das mitochondriale Einzeldomänen Glutaredoxin Grx5 kann z.B. durch eine große Anzahl von

Glutaredoxinen verschiedener Spezies funktionell ersetzt werden (Bandyopadhyay et al., 2008b). Bemerkenswerterweise band das *S. pombe* Grx4 ~3-mal mehr Eisen als das *S. cerevisiae* Grx4, wenn es in Wildtyp-Hefezellen überexprimiert und die Zellen mit radioaktivem ^{55}Fe markiert wurden (Abb. 17.C). Möglicherweise beruht die fehlende Komplementation auf einem Defekt bei der Insertion von Eisen in Eisenabhängige Proteine. Ein Defekt der Fe/S Cluster-Assemblierung kann nicht ausgeschlossen werden, da das *S. pombe* Grx4 möglicherweise mononukleäres Eisen gebunden hat.

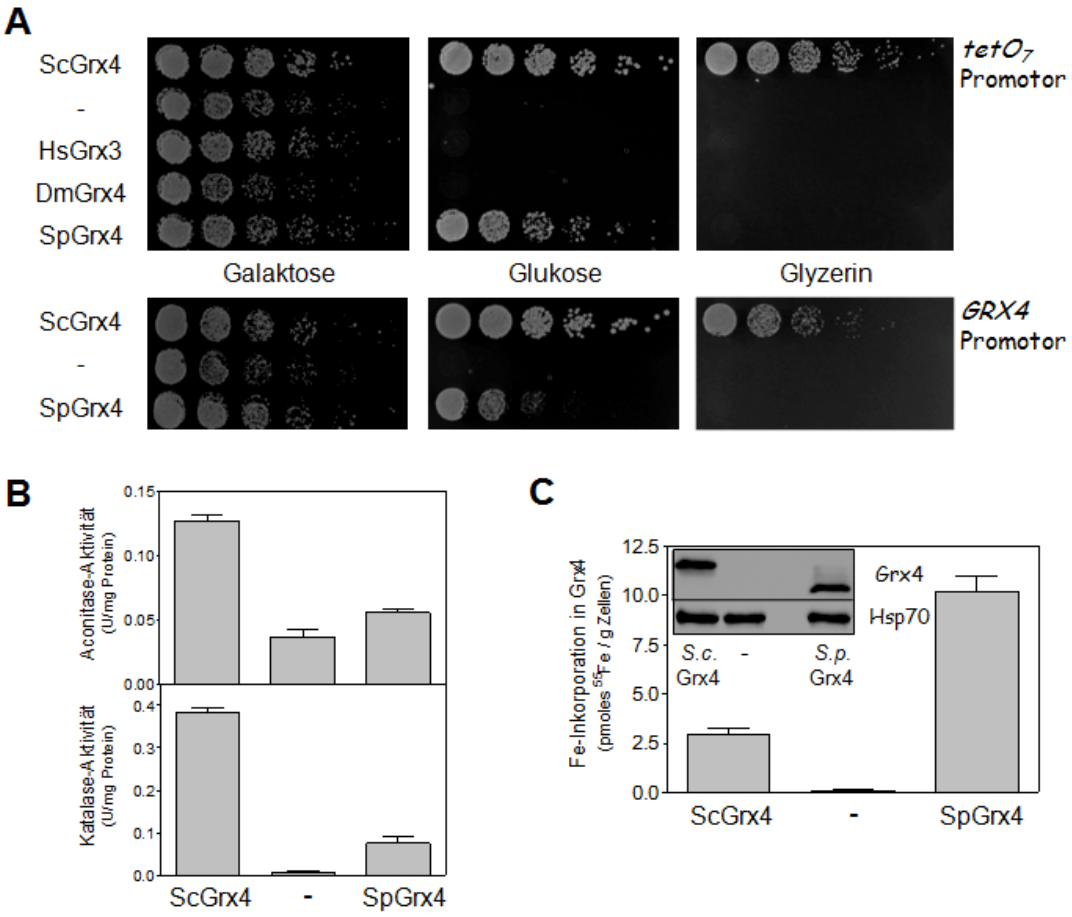

Abbildung 17. Das *S. pombe* Grx4 komplementiert partiell den Wachstumsdefekt von Gal-GRX4 Zellen. Das humane Grx3 (HsGrx3), das *D. melanogaster* Grx4 (DmGrx4) oder das *S. pombe* Grx4 (SpGrx4) wurden unter der Kontrolle des *TDH3* oder *MET25* Promotors, in Gal-GRX4 Zellen überexprimiert. *S. pombe* Grx4 wurde ebenfalls unter der Kontrolle des *S. cerevisiae GRX4* Promotors exprimiert (A) Serielle 1:10 Verdünnungen wurden auf SC Minimalmedium mit Galaktose, Glukose oder Glyzerin getüpfelt und bei 30°C kultiviert. (B) Enzymaktivitäten der Aconitase und Katalase in Gal-GRX4 Zellen mit überexprimiertem *S. pombe* Grx4. (C) ^{55}Fe Bindung an *S. pombe* oder *S. cerevisiae* Grx4 wurde durch *in vivo* Markierung mit ^{55}Fe und Immunopräzipitation in Wildtyp-Zellen bestimmt, die die entsprechenden Proteine mit einem C-terminalen Myc-Tag unter der Kontrolle des

tetO$_7$ Promotors überexprimierten. Die Expression von Grx4 und Hsp70 wurde durch immunologische Färbungen der untersuchten Zellextrakte in Western Blots bestimmt (Inset). Zellen mit dem Leervektor pCM189 (-) dienten als Kontrollen. Die Fehlerbalken geben den SEM an (n > 4).

3.4 Chimäre *S. cerevisiae*/*S. pombe* Grx4 Proteine komplementieren partiell den Phänotyp von Gal-GRX4 Zellen

Um die essenzielle Rolle der Thioredoxin Domäne zu demonstrieren, wurden Grx4 Chimären konstruiert, bei denen die *S. cerevisiae* Thioredoxin- oder Glutaredoxin-Domäne durch die korrespondierende Domäne des *S. pombe* Grx4 substituiert wurde (Abb. 18.A). Bei allen Konstrukten wurde der schwach konservierte Linker des *S. cerevisiae* Grx4 beibehalten und die Proteine wurden unter der Kontrolle des *GRX4* Promotors exprimiert. Alle chimären Grx4 Proteine komplementierten vollständig den Wachstumsdefekt von Gal-GRX4 Zellen unter nicht fermentierbaren Wachstumsbedingungen (Abb. 18.B). Beide *S. pombe*-*S. cerevisiae* Chimären waren auch in der Lage, die Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine partiell zu erfüllen. Die Aktivitäten der Aconitase erreichten bis zu 70%, und die Aktivität der Katalase lagen bei 30% bis 70% der Aktivitäten von Gal-GRX4 Zellen mit dem Wildtyp-Grx4 (Abb. 18.C). Um die Fähigkeit der beiden Chimären, Eisen *in vivo* zu binden, zu analysieren, wurden diese in Wildtyp-Hefezellen mit einem C-terminalen Myc-Tag unter der Kontrolle des *tetO$_7$* Promotors von dem Plasmid pCM189 aus überexprimiert. Die Zellen wurden dann mit radioaktivem Eisen markiert. Bei der Immunopräzipitation mit αMyc-Antikörpern war genauso viel ^{55}Fe mit den chimären Grx4 Proteinen assoziiert, wie mit dem *S. cerevisiae* Grx4 (Abb. 18.D).

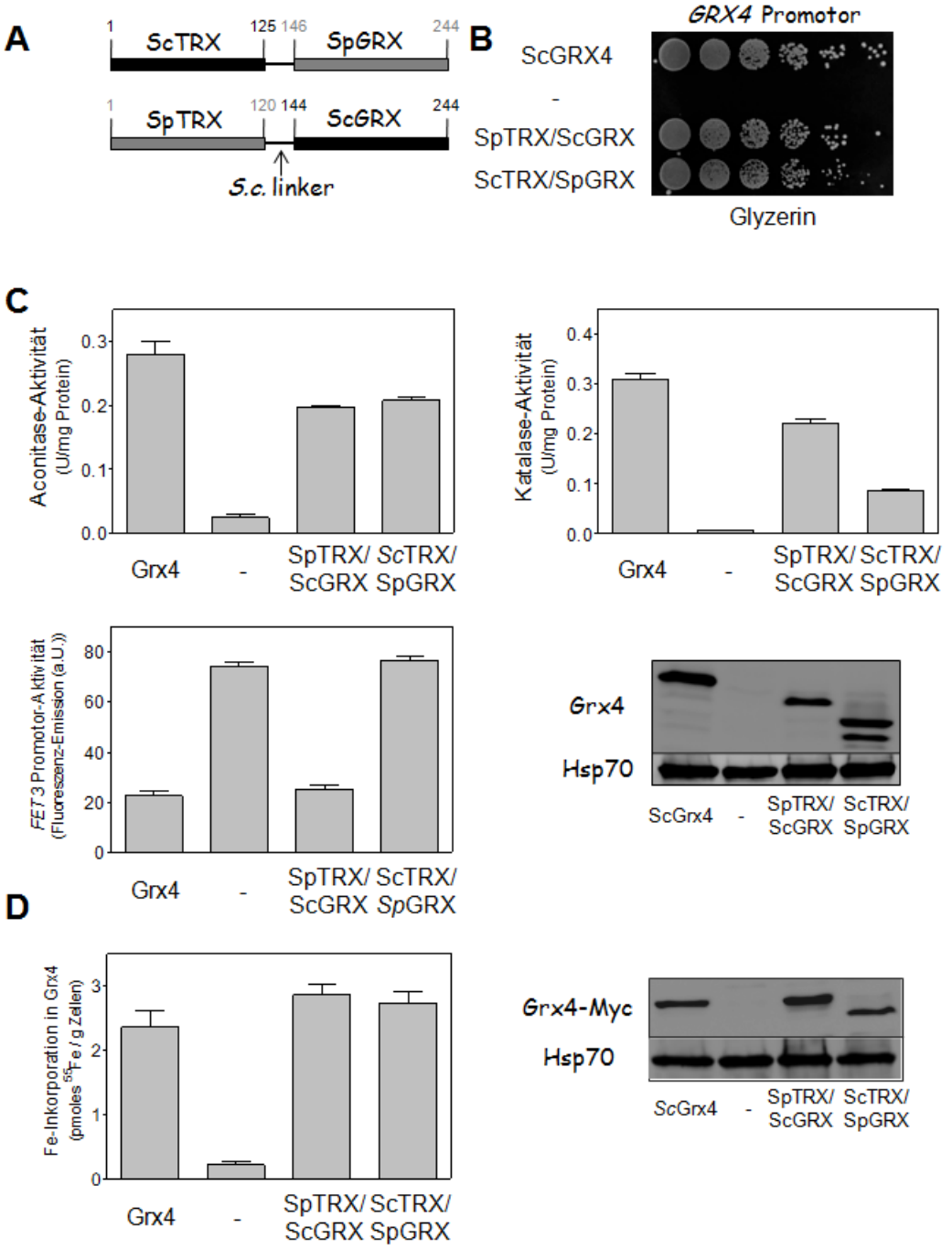

Abbildung 18. Der Phänotyp von Gal-GRX4 Zellen wird durch *S. cerevisiae/S. pombe* Grx4-Chimären komplementiert. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur der analysierten Grx4 Chimären. Gal-GRX4 Zellen, die die angegebenen Proteine unter der Kontrolle des nativen *GRX4* Promotors exprimierten, wurden entsprechend Abb. 13 in Bezug auf das (B) Wachstum, (C) die Enzymaktivitäten der Aconitase und Katalase sowie die Aktivität des *FET3* Promotors, analysiert. Im Western Blot wurden die Grx4 Chimären, welche ohne Myc-Tag exprimiert wurden, und das Wildtyp-Grx4 analysiert (D) Die Bindung von ^{55}Fe an das *S. pombe* oder *S. cerevisiae* Grx4 wurde durch *in vivo* Markierung mit ^{55}Fe und Immunopräzipitation in Wildtyp-Zellen bestimmt, die die entsprechenden Proteine mit einem C-terminalen Myc-Tag unter der Kontrolle des *tetO$_7$* Promotors überexprimierten. Die Expression von Grx4 und Hsp70 wurde durch immunologische Färbungen der untersuchten

Zellextrakte in Western Blots bestimmt (rechts). Zellen mit dem Leervektor pCM189 (-) dienten als Kontrollen. Die Fehlerbalken geben den SEM an (n > 4).

Wurden aber die Chimären und das Wildtyp-Protein unter der Kontrolle des starken *tetO*$_7$ Promotors in Gal-GRX4 Zellen überexprimiert, zeigte sich ein anderes Bild. Die ScTRX/SpGRX Chimäre, konnte das Wachstum der Gal-GRX4 Zellen auf der nicht fermentierbaren C-Quelle Glyzerin fast genauso gut wie das Wildtyp-Protein komplementieren (Abb. 19.A). Diese Zellen zeigten nur einen moderaten Verlust der Aconitase-Aktivität und eine 50%ige Reduktion der Katalase-Aktivität (Abb. 19.B). Die SpTRX/ScGRX Chimäre war dagegen nur noch partiell funktionell, da Gal-GRX4 Zellen mit dieser Chimäre nicht in der Lage waren auf Glyzerin-haltigem Medium zu wachsen. Allerdings konnten diese Zellen auf Glukose-haltigen Medium wachsen (Abb. 19.A). Dieses Ergebnis kann aber nicht durch die Messung der Aconitase- und Katalase-Aktivitäten erklärt werden, da Gal-GRX4 Zellen mit der ScTRX/SpGRX Chimäre nur eine ~50% Reduktion der Aktivitäten der Aconitase und der Katalase, im Vergleich zu Wildtyp-Grx4 exprimierenden Gal-GRX4 Zellen, aufzeigten (Abb. 19.B). Hinsichtlich der Regulation von Aft1 unterschieden sich aber die beiden Chimären. Während in Zellen mit dem SpTRX/ScGRX Protein nur eine basale *FET3*-Promotoraktivität gemessen werden konnte, wie sie auch in den Wildtyp-Protein exprimierenden Zellen vorlag, war der *FET3* Promotor in Gal-GRX4 Zellen mit der SpTRX/ScGRX Chimäre partiell aktiviert. Dies könnte erklären, warum die SpTRX/ScGRX exprimierenden Zellen nicht mehr in der Lage waren zu respirieren. Beide Chimären sind nur partiell funktionell, aber die Überexpression der SpTRX/ScGRX Variante hat eine niedrige intrazelluläre Eisenkonzentration zur Folge. Folglich verloren die Zellen die Fähigkeit zu respirieren.

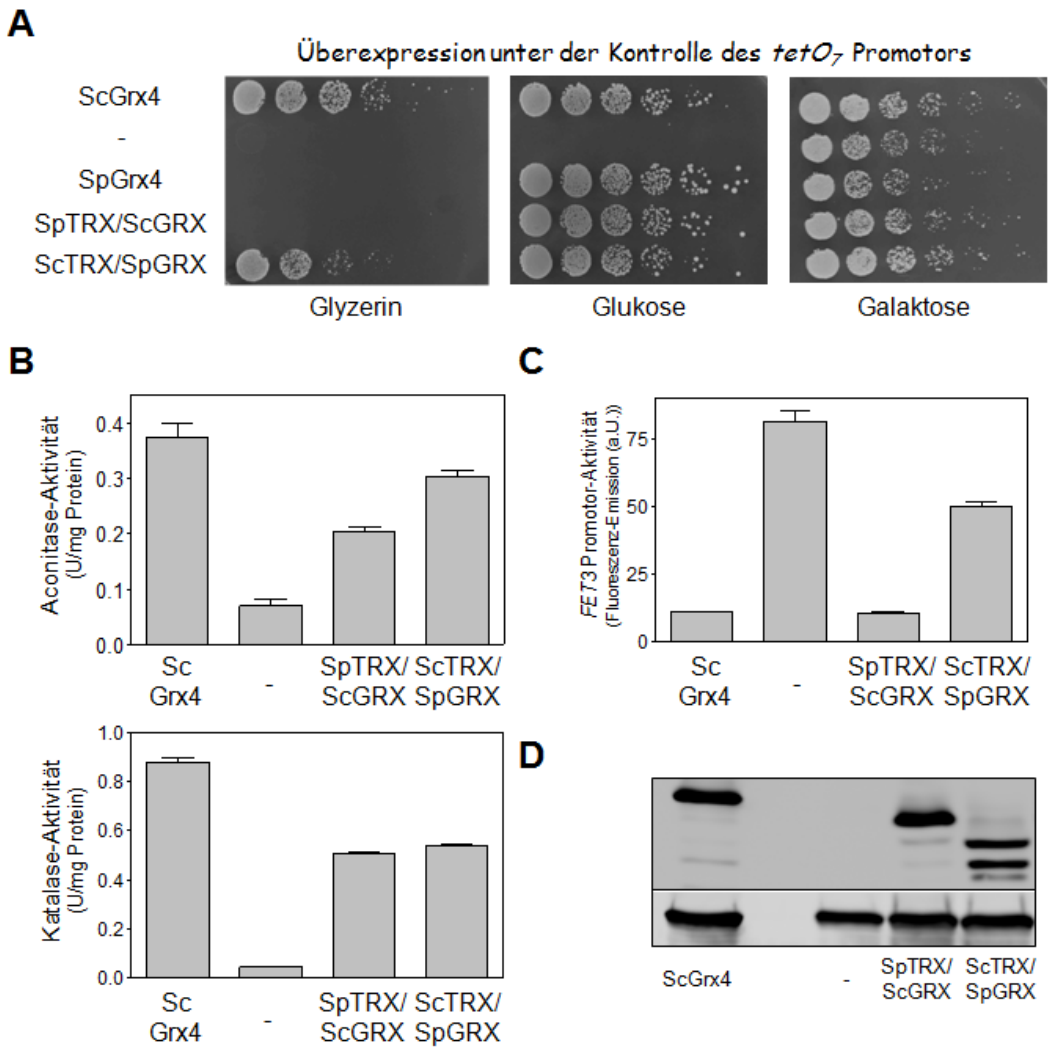

Abbildung 19. Die Überexpression chimärer Glutaredoxine komplementiert partiell den Phänotyp von Grx4 depletierten Zellen. (A) Gal-GRX4 Zellen, die die angegebenen Proteine exprimierten wurden entsprechend Abb. 13 in Bezug auf das Wachstum, (B) die Enzymaktivitäten der Aconitase und Katalase sowie (C) die Aktivität des *FET3* Promotors, analysiert (D) Die Expression von Grx4 und Hsp70 wurde durch immunologische Färbungen der untersuchten Zellextrakte in Western Blots bestimmt. Zellen mit dem Leervektor pCM189 (-) dienten als Kontrollen. Die Fehlerbalken geben den SEM an (n > 4).

Das humane Grx3 kann Grx3-4 in *S. cerevisiae* nicht funktionell ersetzen (Abb. 17.A). Möglicherweise konnte das humane Grx3 die Funktion von *S. cerevisiae* Grx3-4 entweder gar nicht ausüben, oder die Umgebung in *S. cerevisiae* ist für das humane Grx3 zu fremd, um seine Funktion effizient zu erfüllen. Im letzteren Fall könnte eine der beiden Domänen des humanen Grx3 nicht kompatibel mit einer Funktion in *S. cerevisiae* sein. Um dies zu untersuchen, wurden ebenfalls Grx4 Chimären

konstruiert, bei denen die Thioredoxindomäne oder die Glutaredoxindomäne des *S. cerevisiae* Grx4 durch die entsprechenden Domänen des humanen Grx3 ausgetauscht wurden (Abb. 20.A). Da das humane Grx3 zwei C-terminale Glutaredoxindomänen aufweist, wurde die Thioredoxin Domäne des *S. cerevisiae* Grx4 mit der zweiten Glutaredoxindomäne, und mit beiden Glutaredoxindomänen des humanen Grx3 fusioniert. Die chimären Proteine wurde unter der Kontrolle des endogenen *GRX4* Promotors oder des *tetO7* Promotors von dem Plasmid pCM189 aus in Gal-GRX4 Zellen exprimiert. Die HsTRX/ScGRX Chimäre war nicht in der Lage den Wachstumsphänotyp der Gal-GRX4 Zellen zu komplementieren, wenn dieses Protein von dem *GRX4* Promotor aus exprimiert wurde. Erfolgte die Expression dieser Chimäre allerdings unter der Kontrolle des starken $tetO_7$ Promotors, so konnten Gal-GRX4 Zellen auf Glukose-haltigem Medium, wenn auch langsam, wachsen (Abb. 20.B). Die beiden Chimären, bei denen die Thioredoxindomäne von Grx3-4 aus *S. cerevisiae* mit der zweiten Glutaredoxindomäne oder mit beiden Glutaredoxindomänen des humanen Grx3 fusioniert wurde, konnten den Wachstumsdefekt von Gal-GRX4 Zellen jedoch nicht komplementieren (Abb. 20.C).

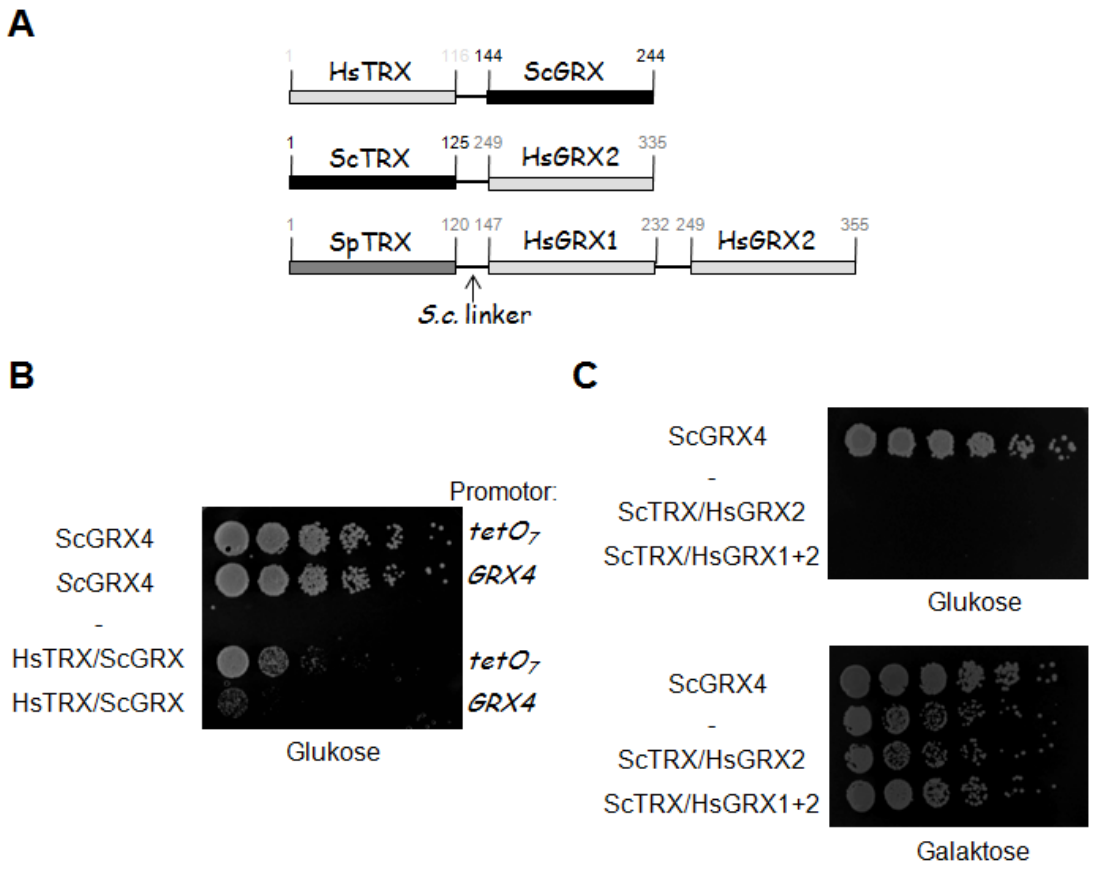

Abbildung 20. Die Funktion der Humanen Thioredoxindomäne von Grx3 und der Thioredoxindomäne des *S. cerevisiae* Grx4 ist partiell konserviert. (A) Schematische Darstellung der chimären Proteine. (B) Wachstumstest auf Glukose-haltigem Minimalmedium von Gal-GRX4 Zellen, die die angegebenen Proteine unter der Kontrolle des entsprechenden Promotors exprimierten. (C) Wachstumstest von Gal-GRX4 Zellen, die die angegebenen Grx4 Proteine, unter der Kontrolle des $tetO_7$ Promotors exprimierten.

Zusammengefasst konnte mit dieser Untersuchung gezeigt werden, dass die Thioredoxin- und Glutaredoxin-Domänen der cytosolischen Monothiol-Glutaredoxine, die alleine nicht funktionell sind, ihre Funktion in *S. cerevisiae* wiedergewinnen, wenn sie mit exogenen Thioredoxin- oder Glutaredoxin-Domänen fusioniert werden. Die Funktionalität dieser Chimären hängt hierbei vom evolutionären Verwandtschaftsgrad zu *S. cerevisiae* ab.

3.5 Identifikation der Interaktionsstelle zwischen Grx4 und dem Transkriptionsfaktor Aft1

Aft1-ähnliche Transkriptionsfaktoren gibt es nur in einer kleinen Gruppe von Ascomyceten (Babu et al., 2006). In den meisten Pilzen wird die zelluläre Eisenhomöostase durch eine Kombination zweier Eisen-regulierter Repressoren gesteuert, die nicht mit Aft1 verwandt sind (Haas et al., 2008; Hortschansky et al., 2007; Labbe et al., 2007). Zu dieser Gruppe zählt auch die Spalthefe *S. pombe*. Überraschenderweise zeigten die beiden *S. pombe-S. cerevisiae* Chimären ein völlig entgegengesetztes Verhalten hinsichtlich der Regulation des Transkriptionsfaktors Aft1 (Abb. 18 und 19). Die SpTRX/ScGRX Chimäre war in der Lage Aft1 korrekt zu regulieren, da seine Expression in Gal-GRX4 Zellen nur eine basale Expressionsrate des Aft1 abhängigen Gens *FET3* zur Folge hatte, wie sie auch in Wildtyp-Zellen vorlag. In Gal-GRX4 Zellen mit der ScTRX/SpGRX Chimäre war die Expression von *FET3* jedoch voll induziert (Abb. 18.C). Beide Chimären zeigten jedoch keine Defekte in der Eisenbindung und konnten den Wachstumsphänotyp der Gal-GRX4 Zellen komplementieren. Aus diesem Grund können beide Proteine die Funktion der cytosolischen Glutaredoxine bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine übernehmen. In *S. pombe* wird die Eisenhomöostase nicht über einen

transkriptionellen Aktivator wie Aft1, sondern über ein Repressorsystem gesteuert, welches mit Grx4 interagiert (Jbel et al., 2011; Labbe et al., 2007; Vachon et al., 2012). Daher könnte sich in der Glutaredoxindomäne des *S. cerevisiae* Grx4 ein für die Regulation von Aft1 wichtiges Motiv befinden, welches in der korrespondierenden Glutaredoxindomäne des *S. pombe* Grx4s fehlt. Auffälligerweise unterschieden sich der C-Terminus der Aft1-regulierenden Proteine Grx3-4 aus *S. cerevisiae* erheblich von dem C-Terminus des *S. pombe* Grx4, obwohl die Aminosäure Sequenz der cytosolischen Grx4 Proteine aus beiden Pilzen insgesamt hoch konserviert ist (Abb. 21.A). Um zu untersuchen, ob der C-terminus wichtig für die Regulation von Aft1 ist, wurde eine *S. cerevisiae* Grx4 Mutante konstruiert, Grx4-Sp-C-term, bei der die letzten 16 C-terminalen Aminosäuren durch die 15 korrespondierenden Aminosäuren des *S. pombe* Grx4 ausgetauscht wurden (Abb. 21.A). Die Expression dieses Proteins in Grx4 depletierten Zellen führte zu genau den gleichen Wachstumsraten auf Glyzerin-haltigem Medium, wie die Expression des Wildtyp-Proteins (Abb. 21.B). In Bezug auf Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine war die Grx4-Sp-C-term Mutante ebenfalls voll funktionsfähig. In Grx4-Sp-C-term exprimierende Gal-GRX4 Zellen wurden ähnliche Aktivitäten der Aconitase und der Katalase gemessen, wie in Gal-GRX4 Zellen mit dem Wildtyp-Grx4 (Abb. 21.C). Allerdings hatte das Grx4-Sp-C-term Protein vollständig die Fähigkeit verloren Aft1 zu regulieren, da in Grx4-Sp-C-term exprimierenden Gal-GRX4 Zellen die Expression des *FET3* Gens genauso hoch induziert war, wie in Gal-GRX4 Zellen mit dem Leervektor (Abb. 21.C). Um einen möglichen Defekt in der Clusterassemblierung auf der Grx4-Sp-C-term Mutante als Grund für die Deregulation von Aft1 auszuschließen, wurde die Fähigkeit dieser Mutante untersucht, Eisen *in vivo* zu binden. Hierzu wurde diese Grx4 Variante in dem Wildtyp-Stamm W303 überexprimiert und die Zellen mit radioaktivem ^{55}Fe markiert. Hierbei band das Grx4-Sp-C-term Protein Eisen mit der gleichen Effizienz wie das Wildtyp-Grx4 (Abb. 21.D). Diese Ergebnisse zeigen, dass der C-Terminus von Grx4 eine wichtige Rolle bei der Regulation von Aft1 spielt.

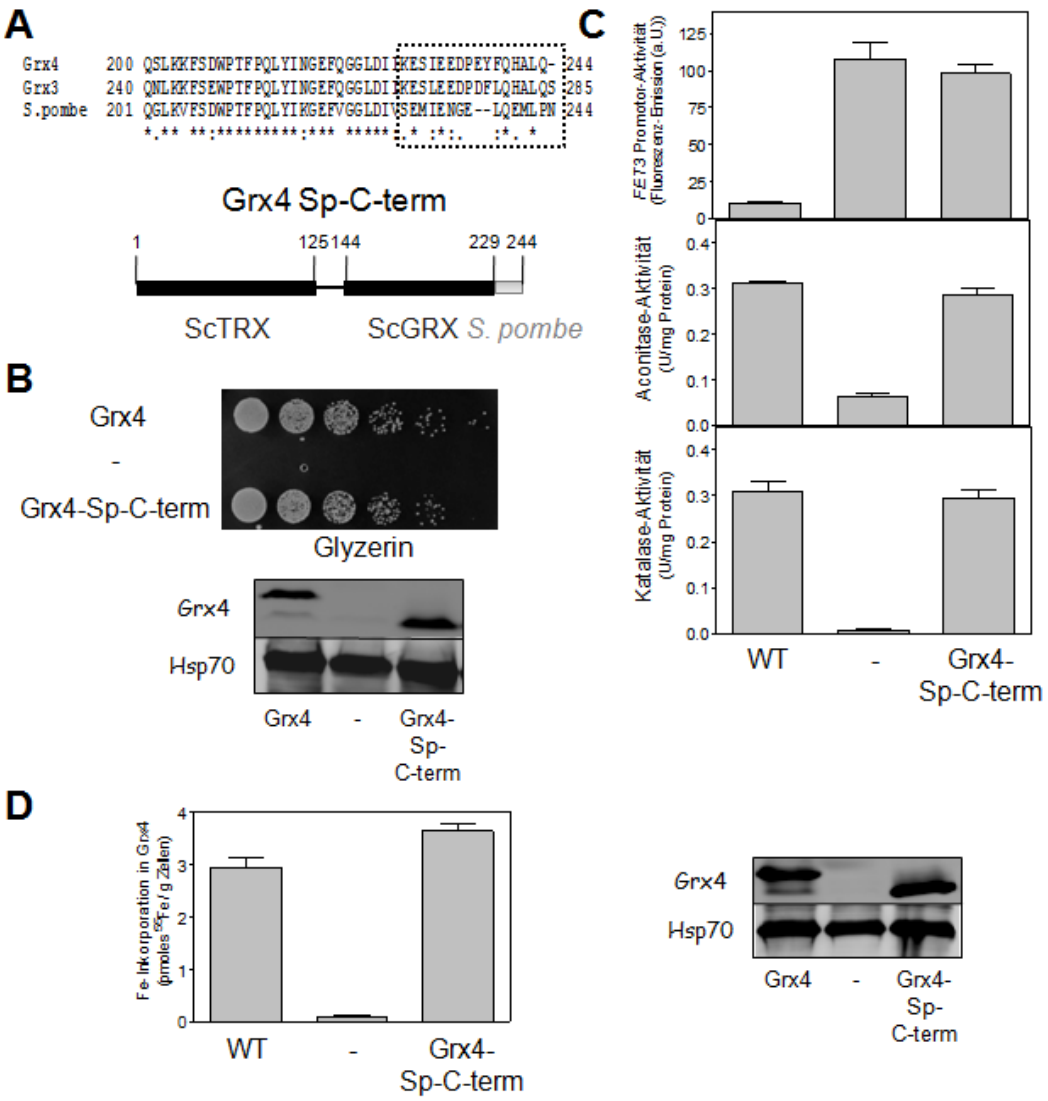

Abbildung 21. Der C-Terminus von Grx4 ist essenziell für die Regulation von Aft1. (A) Sequenzvergleich der C-Termini vom *S. cerevisiae* Grx3-4 und *S. pombe* Grx4. Der eingerahmte Bereich zeigt den zwischen dem *S. cerevisiae* und dem *S. pombe* Grx4 schwach konservierten C-Terminus. Gal-GRX4 Zellen, die Wildtyp-Grx4 oder eine Grx4 Variante, welche den C-Terminus vom *S. pombe* Grx4 enthielt (Sp-C-term), unter Kontrolle des *S. cerevisiae GRX4* Promotor exprimierten, wurden entsprechend Abb. 13 in Bezug auf das Wachstum (A), das Expressionsniveau der Grx4 Varianten, (B), Aktivität des *FET3* Promotors, und die Aktivitäten der Aconitase und der Katalase analysiert. (C) Die Eisenbindung an Wildtyp-Grx4 und Grx4 Sp-C-term wurde durch *in vivo* Markierung mit ^{55}Fe und Immunopräzipitation in Wildtyp-Zellen bestimmt, die die Proteine mit einem C-terminalen Myc-Tag unter der Kontrolle des *tetO$_7$* Promotors überexprimierten. Die Expression von Grx4 und Hsp70 wurde durch immunologische Färbungen der untersuchten Zellextrakte in Western Blots bestimmt (rechts). Zellen mit dem Leervektor pCM189 (-) dienten als Kontrollen. Die Fehlerbalken geben die SEM an (n > 4).

Im einfachsten Szenario ist der C-Terminus von *S. cerevisiae* Grx4 die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Aft1. Da Aft1 nur in sehr niedrigen Mengen exprimiert wird, ist es schwierig die Interaktion von Aft1 mit konventionellen immunologischen Methoden zu untersuchen. Um Aft1 dennoch detektieren zu können, wurde der offene Leserahmens von *AFT1* im Genom von Gal-GRX4 Zellen, am extremen C Terminus mit dem offenen Leserahmen der Luciferase aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis* fusioniert (Abb. 22.A). Um zu überprüfen, ob dieses Fusionsprotein noch funktionell war, wurde der erhaltene Gal-GRX4/AFT1-luc2 Stamm und Gal-GRX4 Zellen in Glukose- oder Galaktose-haltigen Medium kultiviert und die *FET3* Promotor-Aktivität bestimmt (Abb. 22.B). Hierbei war das Aft1-luc2 Protein funktionell, da in Gal-GRX4/Aft1-Luc Zellen, die in Glukose-haltigen Medium kultiviert wurden, der *FET3*-Promotor aktiviert war (Abb. 22.B). Allerdings war die Induktion um den Faktor 2, im Vergleich zu den Kontrollzellen, reduziert. Um die Interaktion von Aft1 mit Grx4 zu studieren, wurde der Gal-GRX4/AFT1-luc2 Stamm mit Plasmiden transformiert, von denen aus Myc-getaggtes Wildtyp-Grx4 oder die ebenfalls Myc-getaggte C-terminale Austauschmutante Grx4-Sp-C-term unter der Kontrolle des $tetO_7$ Promotors exprimiert wurde. Die erhaltenen Gal-GRX4/AFT1-luc2 Zellen wurden auf SD Medium kultiviert und die Myc-getaggten Grx4 Proteine mit einem αMyc Antikörper aus Zellextrakten immunpräzipitiert. Zur Quantifikation der Menge koimmunopräzipitierten Aft1-luc2 Proteins, wurde die Luciferase-Aktivität der Immunobeads quantifiziert. Zur Korrektur der unspezifischen Bindung von Aft1-luc2 an die Immunobeads wurde von diesem Signal die Luciferase-Aktivität abgezogen, die mit einem unspezifischen Antikörper kopräzipitierte. Signifikante Mengen an Luciferase-Aktivität koimmunopräzipitierte mit dem Wildtyp-Grx4 mit dieser Methode. Im Gegensatz hierzu, war die Menge an Luciferase-Aktivität die mit der C-terminalen Austauschmutante Grx4-Sp-C-term assoziiert war, um den Faktor ~4 reduziert und lag nur um den Faktor ~2 über dem Hintergrund (Abb. 22.C). Da beide Grx4 Proteine in vergleichbaren Mengen exprimiert wurden, spielen die C-terminalen Aminosäurereste von Grx4 eine Rolle für die Bindung des Eisen-regulierte Transkriptionsfaktors Aft1. Diese Interaktion ist essenziell für die Regulation der zellulären Eisenhomöostase von *S. cerevisiae*.

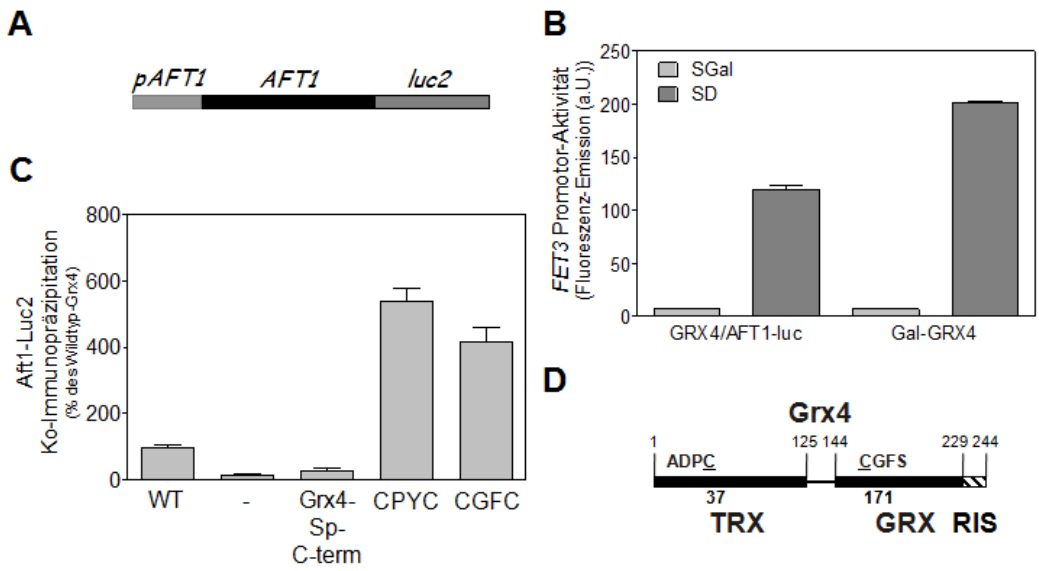

Abbildung 22. Grx4-Sp-C-term bindet nicht den Eisen-regulierten Transkriptionsfaktor Aft1. (A) Schematische Darstellung des Aft1 Locus im Stamm Gal-GRX4/AFT1-luc2. Der *AFT1* ORF ist in diesem Stamm am C-Terminus mit dem Luciferase-Gen fusioniert. (B) Gal-GRX4/AFT1-luc2 oder Gal-GRX4 Zellen wurden in Glukose oder Galaktose haltigen Medium für 40 Stunden inkubiert, und die Aktivität des *FET3* Promotors wurde bestimmt. (C) Die angegebenen Grx4 Proteine wurden unter der Kontrolle des $tetO_7$ Promotor in Gal-GRX4/AFT1-luc2 exprimiert. Das endogene Grx4 wurde durch Kultivierung der Zellen in SD Medium depletiert. Anschließend wurde Grx4 mit αMyc Antikörpern immunopräzipitiert und die Menge an koimmunopräzipitierter *Luciferase*-Aktivität bestimmt. Die Fehlerbalken geben die SEM an. Zellen mit dem Leervektor pCM189 (-) dienten als Kontrollen. Die Fehlerbalken geben die SEM an (n > 4). (D) Domänenstruktur des *S. cerevisiae* Grx4 (RIS: Regulatorische Interagierende Sequenz).

Es wurde vorgeschlagen, dass der an Grx4 gebundene Fe/S Kofaktor direkt an der Bindung zwischen Aft1 und Grx4 in Form eines überbrückenden Kofaktors beteiligt ist (Ojeda et al., 2006; Ueta et al., 2012). Um dies zu überprüfen, wurden die Dithiol-Grx4 Varianten mit einem CGFC bzw. CPYC Motiv im aktiven Zentrum auf ihre Fähigkeit untersucht, mit Aft1 zu interagieren. Dabei wurde das oben beschriebene Protokoll zur Aft1-Interaktion verwendet. In diesem Experiment banden die beiden Dithiol-Grx4 Varianten wesentlich mehr Aft1-luc2 Protein, als das Wildtyp-Grx4 (Abb. 22.C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Aft1 mit dem C-Terminus von Grx4 interagiert, und dass der Fe/S Kofaktor wahrscheinlich keine Rolle bei der Bindung von Aft1 an Grx4 spielt.

Die extremen C-Termini von Multidomänen Glutaredoxine in Pilzen mit Aft1 artigen Transkriptionsfaktoren sind stark konserviert, was phylogenetische Analysen der C-Termini der Multidomänen Glutaredoxine aus verschiedenen Pilzen zeigten (Abb. 23).

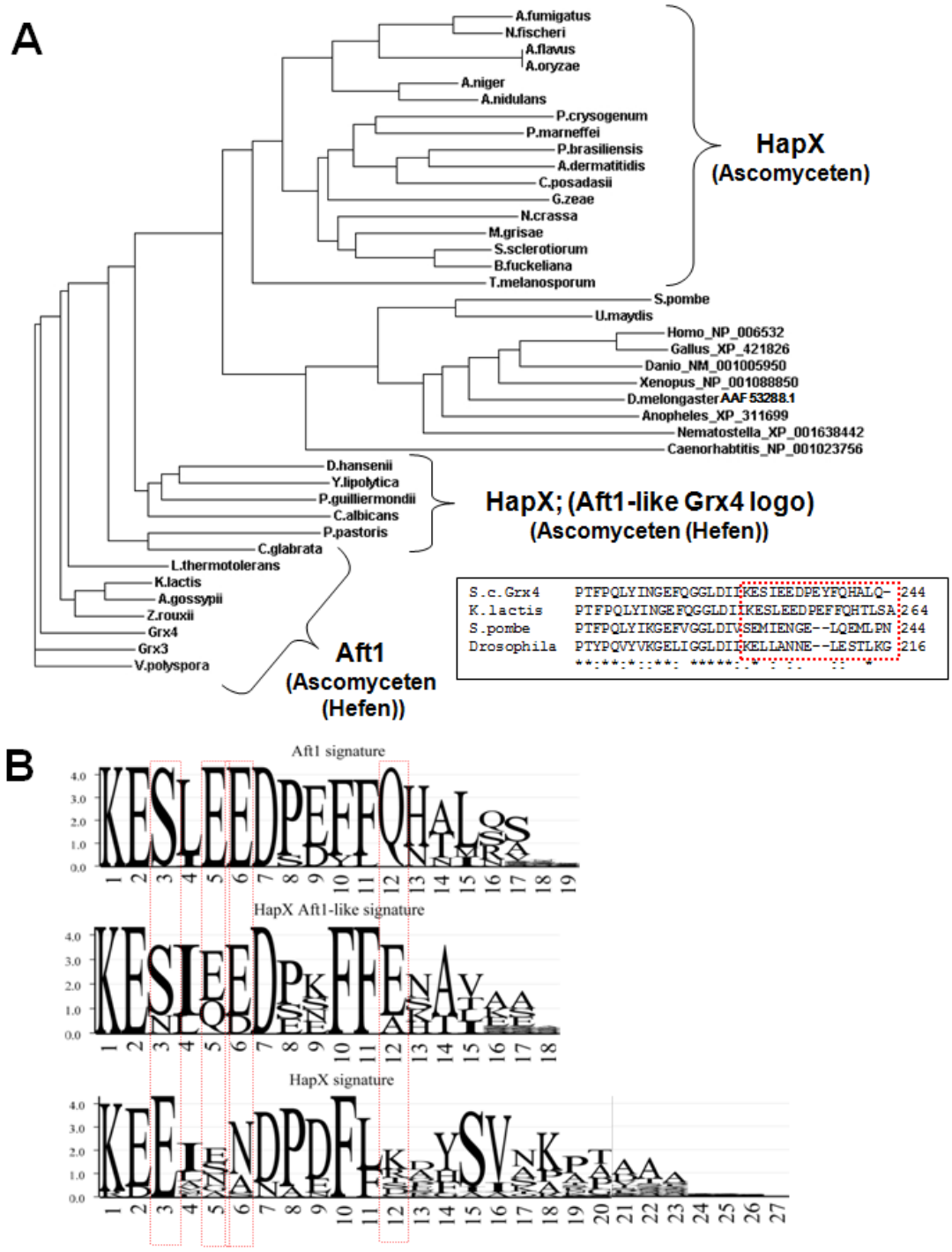

Abbildung 23. Die C-terminale Domäne von Grx4 ist in Aft1 enthaltenen Hefen hoch konserviert. (A) Phylogenetischer Stammbaum der direkten C-Termini von Grx4 aus sieben Hefen (Ascomyceten), zu denen auch Grx3-4 aus *S. cerevisiae* gehört, und 22 Pilzen die den Eisen-regulierten *Repressor* HapX besitzen. Zusätzlich wurden in diesem Stammbaum Grx4 aus *S. pombe* und dem Basidiomyceten

Ustilago maydis, die Eisen-regulierte Repressoren besitzen die strukturell nicht mit HapX verwandt sind, sowie Multidomänen Glutaredoxine aus acht repräsentativen IRP1 enthaltenen *Eukaryoten* berücksichtigt. Der Stammbaum wurde mit dem Programm ClustalW2 auf der Basis der letzten Acht Aminosäure-Reste, die auf den letzten konservierten Bereich (GGLDII) der Glutaredoxindomäne von Grx4 folgen erstellt (siehe Inset). (B) Vergleich der Sequenz-Motive der Grx4 C-Termini von Aft1 enthaltenen Hefen mit denen von HapX beinhaltenden Pilzen. Die Logi wurden mit dem Programm GENIO auf der Basis der in (A) verwendet Sequenz erstellt. Ein Wert von vier entspricht einer 100%igen Konservierung. Die Rot eingerahmten Bereiche geben die voll konservierten Aminosäuren des Aft1 Logos von Grx4 an, die sich von HapX enthaltenen Ascomyceten unterscheiden. (S3 des Aft1 Logos ist unveränderlich E in HapX enthaltenen Ascomyceten, E5 / E6 sind ungeladen, und Q12 ist prädominant ein positiv geladener Rest in HapX beinhaltenden Spezies.) Hefe aus der Gruppe der Ascomyceten, die HapX Repressoren beinhalten, zeigen ein leicht modifiziertes Aft1 Logo, Die C-Termini aus Eukaryoten, die nicht zu den Pilzen gehören, zeigen hingegen Sequenzhomologie untereinander und zu denen aus der Gruppe der Pilze.

Unauffällig sind dagegen die C-terminalen Motive der Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine von unizellulären Ascomyceten, die nahe mit *S. cerevisiae* verwandt sind. Die C-Termini dieser Ascomyceten mit HapX-artigen Repressoren unterscheiden sich nur leicht von den C-terminalen Glutaredoxin Motiven von Pilzen mit Aft1-artigen Proteinen. Überraschenderweise zeigt der andere Zweig der Ascomyceten, mit einem transkriptionellen HapX Repressoren-System zur Regulation der Eisenhomöostase, ebenfalls ein konserviertes C-terminales Glutaredoxin Motiv. Dieses unterscheidet sich deutlich von dem Motiv der Hefen mit Transkriptionsfaktoren vom Aft1-Typ. Trotz dieser offensichtlichen Unterschiede sind die C-Termini der Multidomänen Glutaredoxinen der Ascomyceten mit Aft1 oder HapX-artige Transkriptionsfaktoren, aber eindeutig miteinander verwandt und unterscheiden sich deutlich von denen anderer Pilze oder höheren Eukaryoten (Abb. 23). Dass der C-Terminus der Monothiol-Glutaredoxine eine wichtige Funktion bei der Regulation Eisen-abhängiger Transkriptionsfaktoren in Pilzen spielt, wird somit durch die phylogenetische Analyse unterstützt.

In *S. cerevisiae* gibt es einen zweiten Eisen-regulierten Transkriptionsfaktor von Aft1-Typ, Aft2 (Rutherford et al., 2005). In wie weit Aft2 von Grx4 reguliert wird und ob diese beiden Proteine miteinander interagieren, ist jedoch nicht bekannt. Um zu

untersuchen, ob Grx4 bei der Regulation von Aft2 eine Rolle spielt, wurde ein *S. cerevisiae* Gal-Grx4/aft1Δ Stamm konstruiert. Zusätzlich wurde dieser Stamm noch mit einem Plasmid transformiert, welches die Luciferase unter der Kontrolle des *AFT1* Promotors kodiert. Wenn Aft1 nicht mehr vorhanden ist, wird der Plasmid-codierte *AFT1* Promotor hauptsächlich von Aft2 reguliert (Mühlenhoff *et al*, Manuskript in Vorbereitung). In diesem Stamm wurden nun jeweils das Wildtyp-Grx4-Myc, die ScTRX/SpGRX-Myc Chimäre, die SpTRX/ScGRX-Myc Chimäre oder die C-terminale Austauschmutante Grx4-Sp-C-term-Myc unter der Kontrolle des $tetO_7$ Promotors überexprimiert. Die Zellen wurden zuerst in Glukose-haltigen SD Medium kultiviert, damit kein endogenes Grx4 mehr exprimiert wurde. Anschließend wurden die Grx4 Proteine mit einem Myc-Antikörper immunopräzipitiert und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Zellen mit der SpTRX/ScGRX Chimäre zeigten die gleiche basale Aktivität des *AFT1* Promotors wie Wildtyp-Grx4 exprimierende Gal-GRX4 Zellen (Abb. 24.A). Im Gegensatz dazu, konnte die ScTRX/SpGRX Chimäre anscheinend Aft2 nicht mehr regulieren, da in ScTRX/SpGRX exprimierenden Gal-GRX4 Zellen eine partielle Induktion des *AFT1* Gens gemessen werden konnte (Abb. 24.A). Da die Glutaredoxindomäne aus *S. pombe* nicht mehr in der Lage war diese Funktion zu erfüllen, ist für die Regulation von Aft2 die Glutaredoxindomäne von Grx4 essenziell. Des Weiteren war auch in Grx4-Sp-C-term exprimierenden Zellen der *AFT1* Promotor partiell induziert. Dabei hatte die Expression dieser Grx4 Variante die gleiche *AFT1* Promotoraktivität zur Folge, wie sie auch in Zellen mit der ScTRX/SpGRX Chimäre vorlag. Somit spielt der extreme C-Terminus der Glutaredoxindomäne von Grx3-4 auch eine Rolle für die Regulation von Aft2 und ist nicht nur die Bindestelle für Aft1. Um zu überprüfen, ob Grx3-4 direkt mit Aft2 interagiert, wurde Aft2 mit einem C-terminalem HA-Tag, und Grx4 mit einem C-terminalem Myc-Tag in Wildtyp-Zellen überexprimiert. Anschließend wurden Immunopräzipitationen mit Antikörpern gegen HA oder Myc durchgeführt und das präzipitierte Material wurde auf die Anwesenheit von Aft2 und Grx4 hin untersucht. Dabei war Grx4 und Aft2 mit der Myc- als auch mit der HA-Sepharose assoziiert (Abb. 24.B).

Um weiterhin zu analysieren, ob der C-Terminus von Grx4 auch die Bindestelle für Aft2 ist, wurde die C-terminal Myc-getaggte Grx4-Sp-C-term Mutante und Aft2-HA in Wildtyp-Hefen überexprimiert. Da allerdings das Expressionsniveau von Aft2 in

dieser Situation sehr niedrig war, konnte durch Koimmunopräzipitationen nicht nachgewiesen werden, ob Aft2 noch mit Grx4-Sp-C-term interagiert (Abb. 24.B). Zusammenfassend interagiert Grx4 mit Aft1 und Aft2 direkt, und der C-Terminus von Grx4 spielt eine wichtige Rolle für die Regulation von Aft1 und Aft2. Im Falle von Aft1 ist der C-Terminus von Grx4 wichtig für die Bindung von Aft1. Hingegen spielt der Fe/S Kofaktor keine Rolle bei der Bindung von Aft1 an Grx4, obwohl die Koordination eines Kofaktors von Grx4 essenziell für eine Inaktivierung von Aft1 ist.

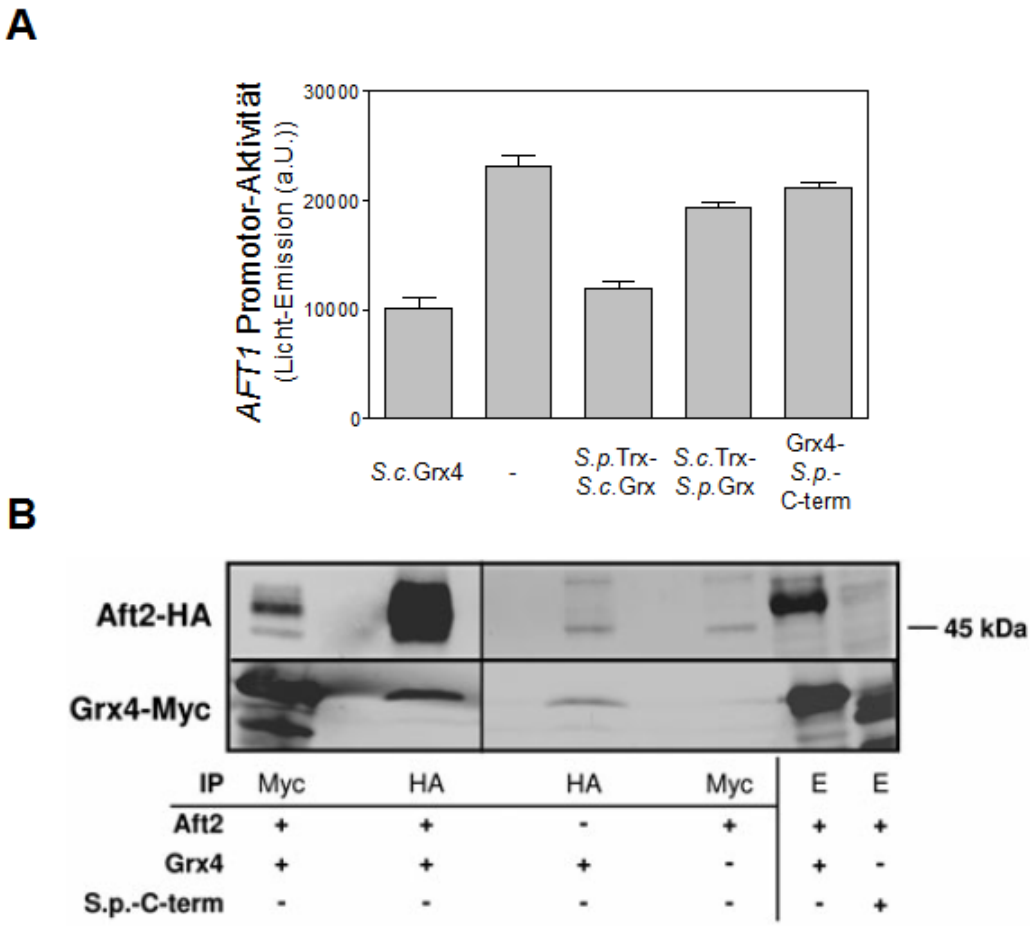

Abbildung 24. Grx4 interagiert mit dem Eisen-reguliertem Transkriptionsfaktor Aft2. (A) Gal-GRX4/aft1Δ Zellen, die die angegebenen Grx4 Proteine, und die Luciferase unter der Kontrolle des *AFT1* Promotors, exprimierten, wurden in SD Medium für 40 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität der Extrakte bestimmt. (B) Wildtyp-Hefezellen die Aft2-HA, unter der Kontrolle des starken Promotors *TDH3* und das Wildtyp-Grx4-Myc oder die C-terminale Austauschmutante Sp-C-term-Myc überexprimierten, wurden in SD Minimalmedium kultiviert. Die Zellen wurden lysiert und Aft2 oder Grx4 mit Antiseren gegen Myc oder HA immunopräzipitiert. Das präzipitierte Material wurde in Western Blot auf die Anwesenheit von Grx4-Myc und Aft2-HA untersucht. Dabei wurden polyklonale Antikörper gegen Grx4 oder monoklonale HA Antikörper verwendet. In den Zellextrakten (E) entspricht die schwache Bande mit einer Größe von etwa 45 kDa,

die in der Immunopräzipitation mit HA-Antikörper sichtbar ist, den schweren Seitenketten der IgGs Antikörpern.

3.6 Rolle des humanen Grx3 im Eisenmetabolismus

Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine sind in allen Eukaryoten zu finden. Der Mensch besitzt ein Multidomänen Glutaredoxin, Grx3. Dieses besteht aus einer N-terminalen Thioredoxindomäne und zwei C-terminalen Glutaredoxindomänen. Wie oben gezeigt, kann das humane Grx3 nicht die Funktion von Grx3-4 in *S. cerevisiae* ausüben (Abb. 17.A). Möglicherweise kann das humane Grx3 die Funktion von *S. cerevisiae* Grx3-4 gar nicht ausüben, oder die Umgebung in *S. cerevisiae* ist für das humane Grx3 zu fremd, um seine Funktion effizient zu erfüllen. Die Funktion der Thioredoxindomänen des humanen Grx3 und Grx3-4 aus *S. cerevisiae* ist aber partiell konserviert, was im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Wurde die humane Thioredoxindomäne mit der Glutaredoxindomäne des *S. cerevisiae* Grx4 fusioniert, so konnte dieses Protein den Wachstumsphänotyp von Gal-GRX4 Zellen partiell komplementieren (Abb. 20.B). Ähnlich wie sein *S. cerevisiae* Homologes trägt das humane Grx3 einen Fe/S Cluster, der durch zwei Grx3 Monomere und zwei Moleküle GSH koordiniert wird (Haunhorst et al., 2010). Ursprünglich wurde Grx3 als Interaktionspartner der Protein Kinase C-θ identifiziert, weshalb dieses Protein auch **P**rotein Kinase C-**I**nteracting **C**ousin of **T**hioredoxin (PICOT) genannt wird (Witte et al., 2000). Die genaue molekulare Funktion des humanen Grx3 ist allerdings unklar. Zur Abklärung, ob das humane Grx3 in Analogie zu Grx3-4 aus *S. cerevisiae* eine Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, wie sich die Depletion von Grx3 auf den Eisenmetabolismus von kultivierten humanen HeLa Zellen auswirkt. Um weitere Prozesse zu identifizieren, an denen Grx3 möglicherweise beteiligt ist, wurden darüber hinaus Microarray-Analysen mit diesen Grx3-depletierten Zellkulturlinien durchgeführt.

3.7 Depletion von Grx3 in HeLa Zellen mittels siRNA basierten Techniken

Um die Funktion des humanen Grx3 zu untersuchen, wurden HeLa Zellen (1) mit einer siRNA (siRNA-1) die gegen die Grx3 mRNA gerichtet war, (2) einer Kontroll-siRNA (Scramble), die gegen keine RNA Spezies gerichtet war, oder (3) ohne siRNA (Mock) transfiziert. Nach einer dreitägigen Inkubation wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl bestimmt. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt so dass insgesamt 3 Transfektionen durchgeführt wurden (Stehling et al., 2008). Hierbei wiesen die Grx3-depletierten HeLa Zellen einen deutlichen Wachstumsdefekt im Vergleich zu den Kontrollzellen auf (Abb. 25.A).

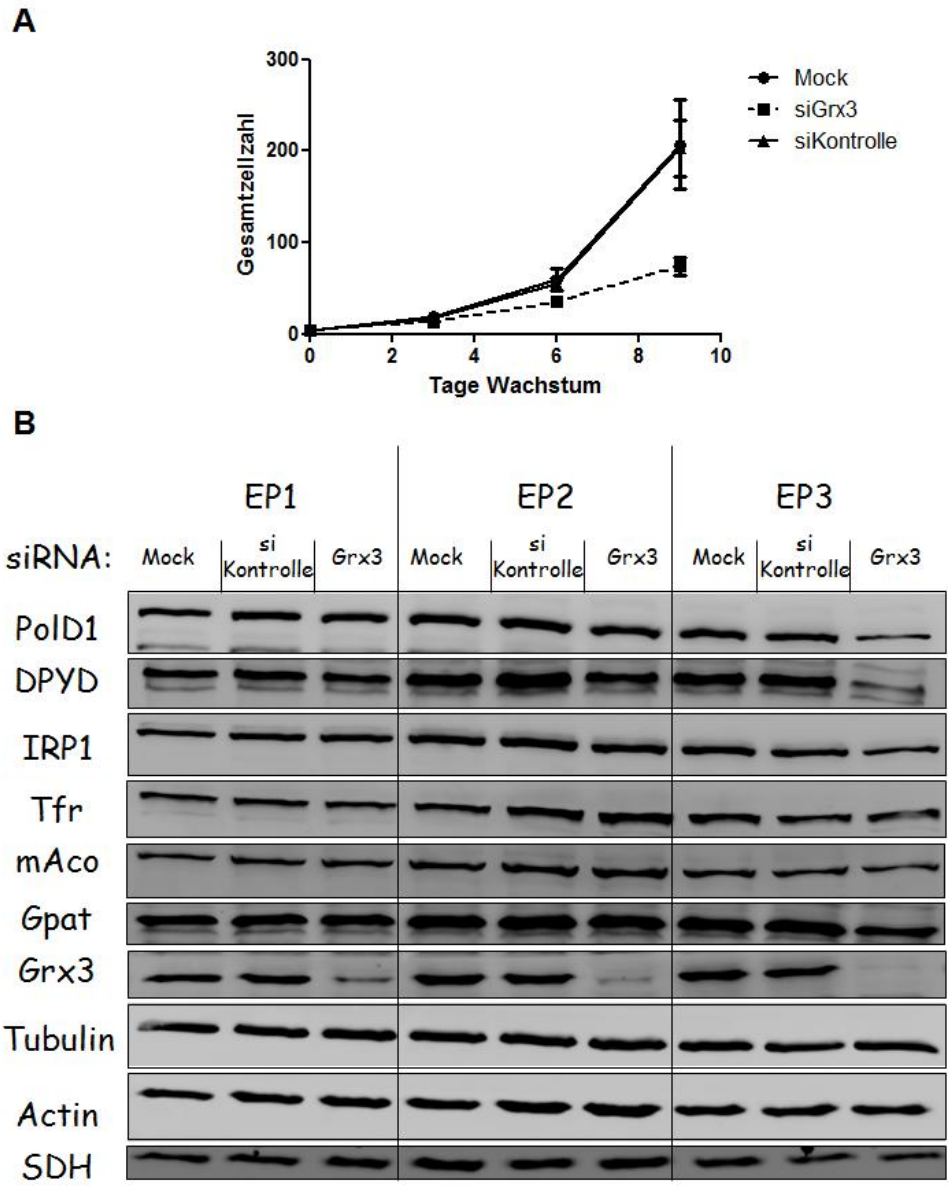

Abbildung 25. Der Phänotyp von Grx3 depletierten HeLa Zellen. (A) Wachstumskurven von Zellen die mit den angegebenen siRNAs oder in Abwesenheit von siRNA transfiziert wurden. (B) Nach jeder

Elektroporation (EP1-3) wurden die Lysate der Zellen, die mit den angegebenen siRNA transfiziert wurden, durch einen Western Blot auf die Anwesenheit der links angegebenen Proteine analysiert. Aktin und Tubulin dienten als Ladekontrolle.

Mit dem Zelllysat wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Proteinmengen von Fe/S Enzymen in den Grx3 depletierten HeLa Zellen beeinflusst sind. Im Western Blot konnte Grx3 nach der dritten Transfektion nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 25.B). Grx3 konnte also effizient durch die siRNA1 depletiert werden. Darüber hinaus lag die Dihydropyrimidin-dehydrogenase (DPYD) nur in sehr geringen Mengen nach Grx3 Depletion vor. Die DPYD ist ein [4Fe-4S] Protein und das geschwindigkeitsbestimmende Enzym im Pyrimidin Katabolismus (Schnackerz et al., 2004). Eine Reduktion der Proteinmengen war ebenfalls für das Fe/S Protein Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase (GPAT) zu erkennen (Abb. 25.B). Von diesem Effekt waren auch das Fe/S Proteine PolD1 sowie IRP1 betroffen. Die Depletion von Grx3 hatte jedoch keinen Effekt auf die Mengen der mitochondrialen Enzyme Aconitase und Succinat-Dehydrogenase (Abb. 25.B). Das cytosolische Protein IRP1 fungiert als Aconitase, wenn es einen Fe/S Cluster gebunden hat. Um die Aktivität von IRP1 von dem der mitochondrialen Aconitase differenzieren zu können, erfolgte eine subzelluläre Fraktionierung nach Öffnung der geernteten Zellen mit Hilfe von Digitonin. Dabei wurde die cytosolische Fraktion von der mitochondrialen Fraktion getrennt. In der mitochondrialen Fraktion wurden zusätzlich die Aktivitäten des Fe/S Enzymes Succinat-Dehydrogenase sowie der Häm-abhängigen Cytochrom-c-Oxidase bestimmt. Die Effizienz der Zellfraktionierung wurde durch Aktivitätsbestimmungen der mitochondrialen Citrat-Synthase und der cytosolischen Malat-Dehydrogenase überprüft. Weiterhin wurden die gemessenen Werte der mitochondrialen Enzyme auf die Aktivität der Citrat-Synthase und die Aconitase-Aktivität von IRP1 im Cytosol auf die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase normalisiert.

Die Zellfraktionierung wurde erfolgreich durchgeführt, was die Verteilung der Aktivitäten der Citrat-Synthase und der Malat-Dehydrogenase zeigte. Darüber

hinaus waren die Aktivitäten dieser Enzyme durch die siRNA-Behandlung nicht wesentlich beeinflusst (Abb. 26.E,F).

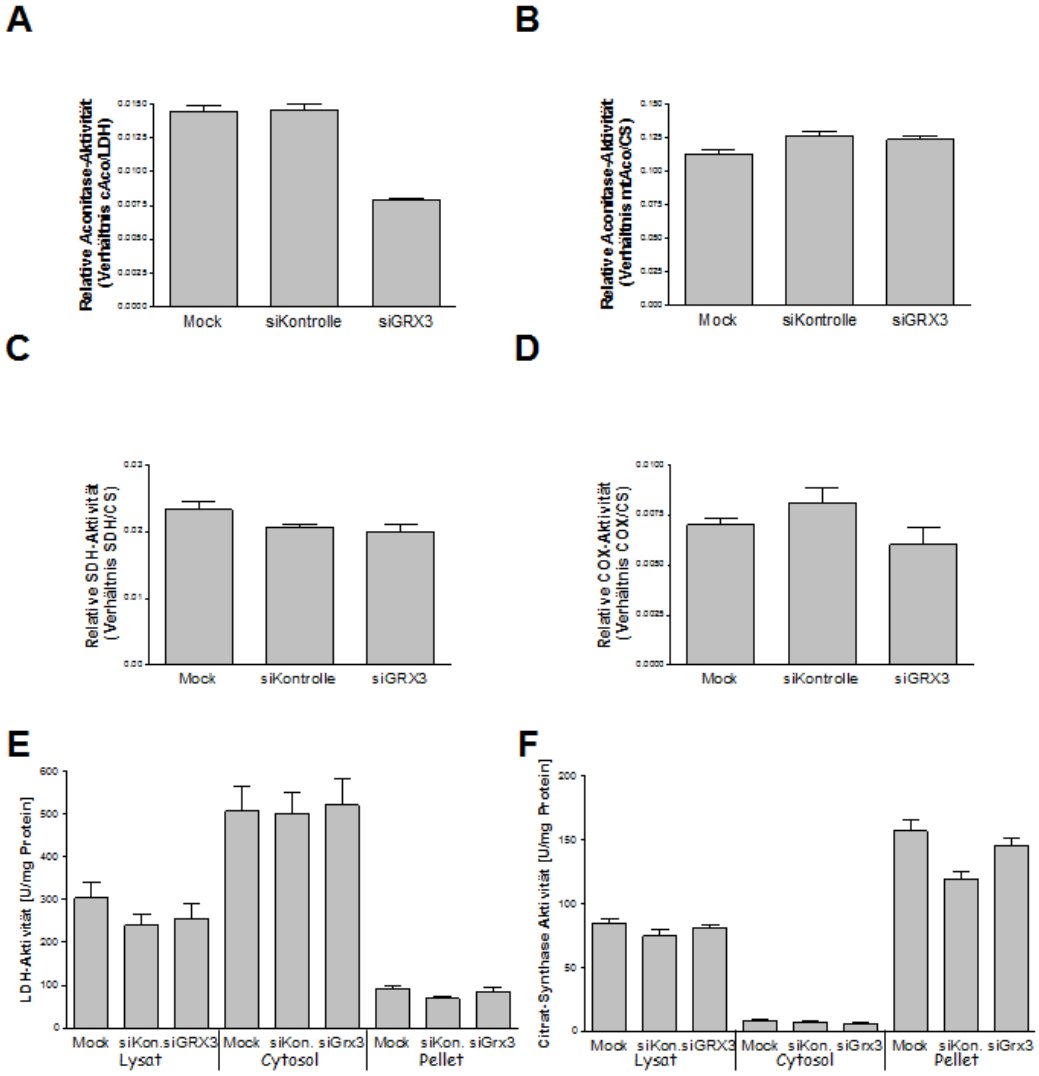

Abbildung 26. Aktivitäten der Fe/S Cluster und/oder Häm-abhängigen Proteine im Vergleich zu Kontrollenzymen in Grx3-depletierten Zellen. HeLa Zellen wurden in drei aufeinanderfolgenden Elektroporationen (1) ohne siRNA (Mock) (2) mit einer Kontroll-siRNA (siKontrolle) oder (3) mit einer gegen die GRX3 mRNA gerichteten siRNA transfiziert. Nach der dritten Transfektion wurden die Zellen geerntet und durch eine Behandlung mit Digitonin subzellulär fraktioniert. In der cytosolischen Fraktion wurde die (A) IRP1 Aconitase-Aktivität (cAco) sowie in der Sedimentfraktion die Aktivitäten der (B) Aconitase (mtAco), (C) SDH und (D) Cox nach der dritten Transfektion gemessen. In den 2 erhaltenen Fraktionen (Cytosol und Pellet) sowie im Lysat, wurde die Aktivitäten des (E) cytosolischen Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) und (F) des mitochondrialen Enzyms Citrat-Synthase (CS) bestimmt. Die Holo-IRP1-Aktivität wurde gegen die Werte der LDH, und die Aktivitäten der mitochondrialen Enzyme gegen die Werte der Citrat-Synthase, normalisiert. Die Fehlerbalken geben die SEM an ($n \geq 3$).

Nach der dritten Transfektion mit spezifischer siRNA war die Aconitase-Aktivität im Cytosol Grx3 depletierter Zellen um ~50% niedriger als in Kontrollzellen (Abb. 26.A). Dies war konsistent mit der reduzierten Menge an IRP1 im Western Blot. Anscheinend wurde IRP1 abgebaut, da kein Fe/S Cluster mehr auf IRP1 assembliert wurde. Dieses Ergebnis wird durch die signifikante Reduktion in der Aconitase-Aktivität von IRP1 bestätigt. Allerdings konnte kein signifikanter Effekt auf die getesteten mitochondrialen Eisen-abhängigen Enzyme nachgewiesen werden. Weder die Fe/S Enzyme Aconitase oder Succinat-Dehydrogenase, noch die Häm-abhängige Cytochrom-c-Oxidase, zeigten eine signifikante Reduktion in ihren Aktivitäten nach der Depletion von Grx3 gegenüber den Aktivitäten dieser Enzyme in Kontroll-Zellen (Abb. 26.B-D).
Um die Spezifität der hier verwendeten siRNA zu überprüfen, wurde getestet, ob mit einer Mischung aus 4 verschiedenen siRNAs, die jeweils an einer anderen Stellen der GRX3 mRNA binden (Abb. 27.A), die gleichen Effekte hervorgerufen werden können. Hierzu wurden HeLa Zellen entweder mit (1) der siRNA1 von der Firma Ambion, (2) der siRNA1 von der Firma Eurogentec, (3) mit der Mischung aus 4 verschiedenen gegen die Grx3 mRNA gerichteten siRNAs oder (4) ohne siRNA je dreimal transfiziert (Abb. 27.A).

Nach der dritten Transfektion hatten die verschiedenen siRNA Ansätze ähnliche Effekte auf die Mengen der getesteten Proteine im Western Blot (Abb. 27.B), die Aconitase-Aktivität von IRP1 im Cytosol sowie die mitochondrialen Enzyme (Abb. 28). Da die verschiedenen siRNA Ansätze den gleichen Phänotyp von HeLa Zellen bewirken, ist der Phänotyp somit spezifisch auf die Depletion von Grx3 zurückzuführen. Es handelt sich hierbei also um keine unspezifischen siRNA Effekte. Dies war eine wichtige Kontrolle für die im Folgenden durchgeführte Microarray Analyse. Hierbei ist zu erwarten, dass die Behandlung mit einer spezifischen siRNA zu einer differentiellen Genexpression führt, die nicht ausschließlich auf die Depletion des gewünschten Proteins zurück zu führen ist, sondern auch durch unspezifische siRNA Effekte ausgelöst wird. Der Vergleich der Transkriptome mehrerer unterschiedlicher siRNA Ansätze erlaubt es, diese „off target“ Effekte zu

identifizieren und jene Gene auszuschließen, die aufgrund des jeweiligen siRNA Ansatzes unspezifisch reguliert wurden.

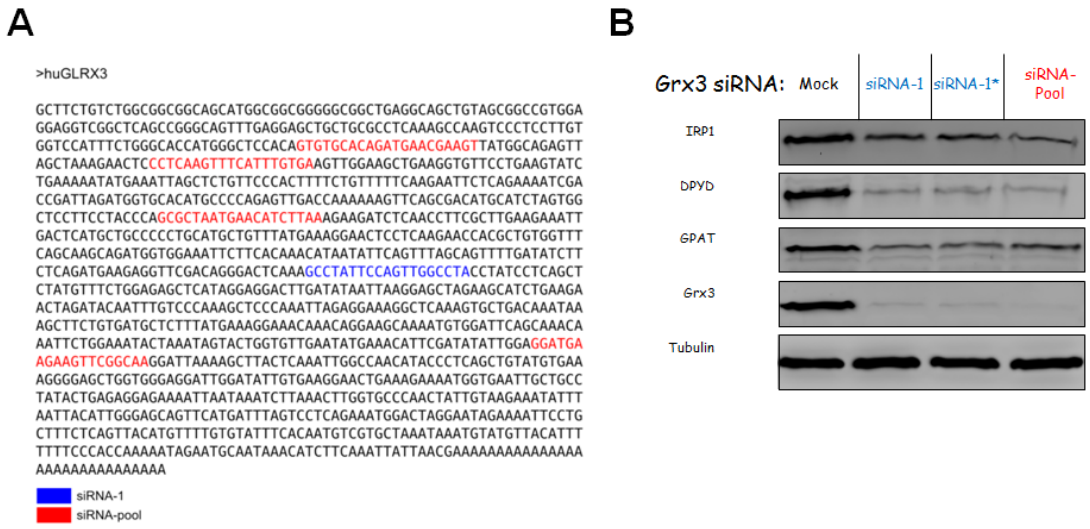

Abbildung 27. Sequenz der in dieser Arbeit verwendeten siRNAs für die Grx3-Depletion. (A) Regionen des Grx3 Gens gegen die im Versuch verwendeten siRNAs gerichtet waren: siRNA-1 (Blau) von der Firma Ambion oder siRNA-1* (Blau) von der Firma Eurogentec; Mischung aus 4 verschiedenen siRNAs (Rot). (B) Lysate der Zellen die mit den angegebenen siRNA 3-mal transfiziert worden sind, wurden im Western Blot auf die Anwesenheit der links angegebenen Proteine analysiert. Tubulin dienten als Ladekontrolle.

Zusammengefasst könnte Grx3 in HeLa Zellen eine Funktion bei der Assemblierung von Fe/S Proteinen des Cytosol haben. Sollte das humane Grx3 eine generelle Funktion bei der Maturierung von allen Klassen Eisen-haltiger Proteine haben, sind die Effekte aber nicht so stark ausgeprägt, wie für Grx3-4 in *S. cerevisiae*. Möglicherweise liegt noch eine Restmenge an Grx3 nach der siRNA Transfektion vor, die nicht mehr im Western Blot detektiert werden kann. In *S. cerevisiae* Gal-GRX4 W303 Zellen führt eine niedrige Expressionsrate von Grx3-4 erst zu einem Effekt auf Eisen-abhängige Proteine des Cytosols und erst darauf folgt der mitochondriale Phänotyp (Muhlenhoff et al., 2010). Die Depletions-Effizienz in HeLa Zellen könnte also möglicherweise nicht ausreichend gewesen sein, um einen mitochondrialen Phänotyp zu bewirken.

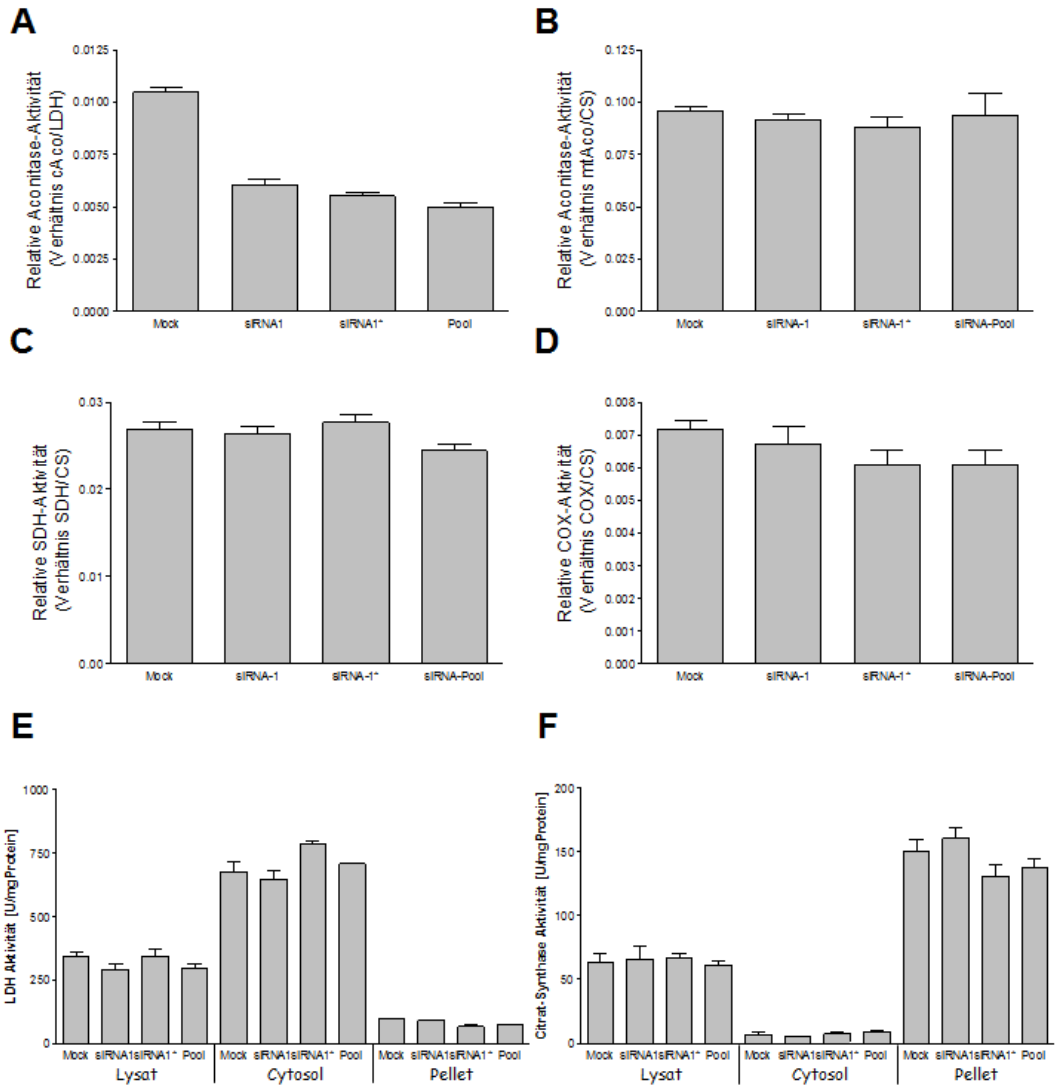

Abbildung 28. Aktivitäten der Fe/S und/oder Häm-abhängigen Proteine in Zellen, die mit verschiedenen gegen Grx3 gerichteten siRNAs transfiziert wurden. HeLa Zellen, die 3-mal ohne siRNA (Mock) oder mit verschiedenen gegen Grx3 gerichteten siRNAs (siRNA-1 von der Firma Ambion, siRNA-1* von der Firma Eurogentec, siRNA-Pool) transfiziert worden waren, wurden subzellulär fraktioniert. In der cytosolischen Fraktion wurde die Enzymaktivität von (A) der Aconitase (Holo-IRP1), in der Sedimentfraktion die Aktivitäten der (B) Aconitase, (C) Succinat-Dehydrogenase (SDH) und (D) Cytochrom-c-Oxidase (Cox) der jeweils dritten Transfektion gemessen. In beiden Fraktionen (Cytosol und Sediment) sowie im Zelllysat wurden die Aktivitäten des (E) cytosolischen Enzyms LDH und (F) des mitochondrialen Enzyms Citrat-Synthase bestimmt. Die Holo-IRP1 Aktivität wurden gegen die Werte der LDH, und die Aktivitäten der mitochondrialen Enzyme wurden gegen die Werte der Citrat-Synthase normalisiert. Die Fehlerbalken geben die SEM an ($n \geq 3$).

3.8 Microarray Analyse von Grx3 depletierten Zellen

In Vertebraten wird die Regulation des Eisenmetabolismus hauptsächlich posttranskriptionell durch die Proteine IRP1 und IRP2 gesteuert (Hentze et al., 2010). Nicht auszuschließen ist aber eine kleinere transkriptionelle Regulation, bei der vielleicht in Analogie zu *S. cerevisiae* das humane Grx3 eine Rolle spielt. Es wurden daher Microarray-Analysen mit der Gesamt-RNA Grx3-depletierter HeLa Zellen durchgeführt. Sollte Grx3 die aus den Daten von *S. cerevisiae* geschlussfolgerte generelle Funktion bei der Umwandlung von Eisen in eine bioverfügbare Form und der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine haben, so müssten humane Grx3-depletierte Zellen eine ähnliche differentielle Genexpression wie Eisen-depletierte Zellen aufweisen. Daher wurden ebenfalls Microarray-Analysen mit der Gesamt-RNA von Zellen durchgeführt, bei denen ein Eisenmangel induziert wurde.

Die Microarray-Analysen wurden mit Gesamt-RNA aus HeLa Zellen durchgeführt, die drei Mal mit der siRNA-1 oder mit dem siRNA-Pool transfiziert wurden. Die erfolgreiche Depletion von Grx3 in diesen Zellen wurde parallel in Western Blots verifiziert (siehe Kapitel 3.7). Um die Auswirkungen eines direkten Eisenmangels auf die transkriptionelle Regulation zu untersuchen, wurde Gesamt-RNA aus Zellen isoliert, die zunächst dreimal ohne siRNA transfiziert wurden, und abschließend, 24 Stunden vor der finalen Ernte, mit dem Eisenchelator Deferoxamin (DFO) (125µM) behandelt wurden. Als Referenz für alle Proben diente Gesamt RNA aus HeLa Zellen bei denen eine Transfektion ohne siRNA erfolgte. Die Effizienz der Behandlung mit DFO wurde überprüft, indem die Aktivitäten Eisen-abhängiger Enzyme bestimmt wurden. Wie erwartet, war in Eisen-depletierten Zellen die Aconitase-Aktivität von IRP1 stark reduziert (Abb. 29.A). Darüber hinaus waren die Aktivitäten der mitochondrialen Eisen-abhängigen Enzyme Aconitase, Succinat-Dehydrogenase und Cytochrom-c-Oxidase ebenfalls reduziert, während die Aktivitäten der Citrat-Synthase und der Lactat-Dehydrogenase nicht von der DFO-Behandlung beeinflusst waren (Abb. 29.B-F).

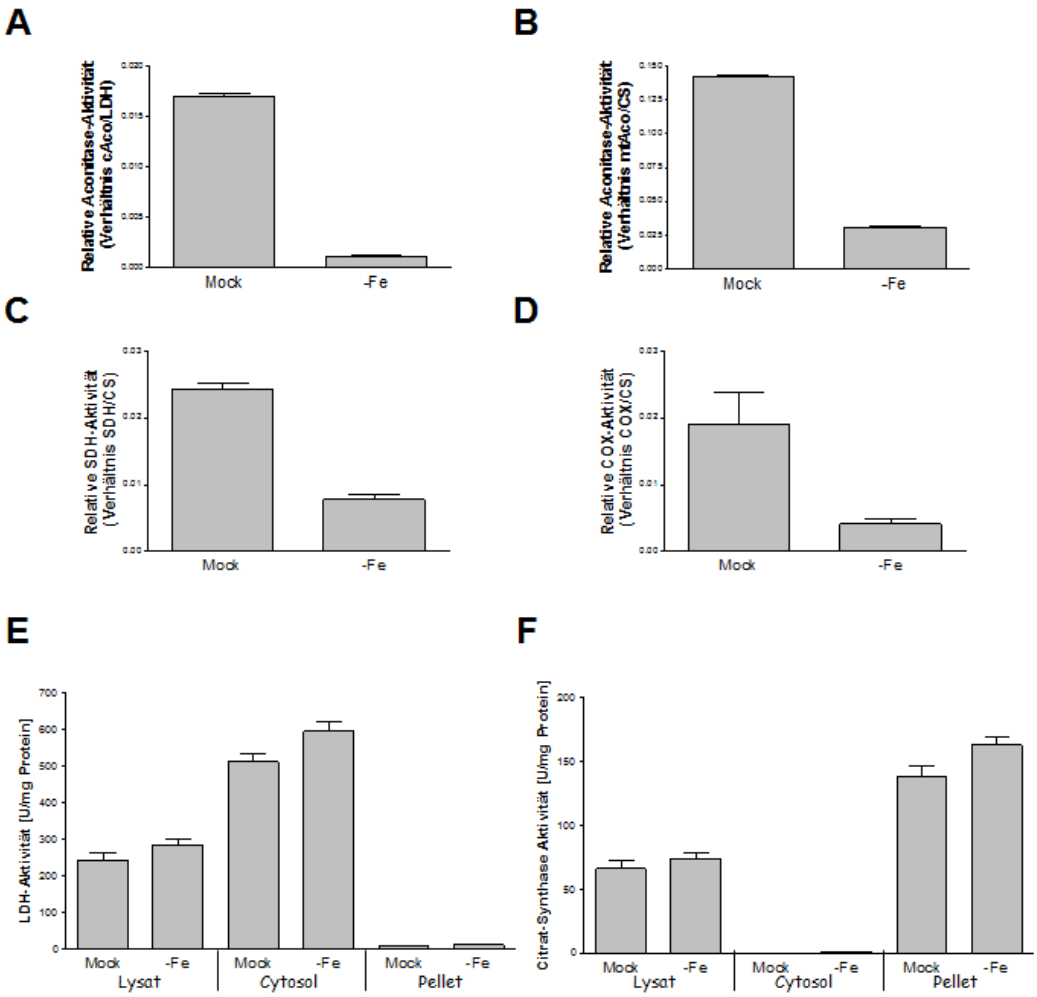

Abbildung 29. Aktivitäten der Fe/S und/oder Häm-abhängigen Proteine in Eisen-depletierten Zellen. HeLa Zellen, die 3-mal ohne siRNA (Mock) und 24 Stunden vor der finalen Ernte mit DFO behandelt worden sind, wurden subzellulär fraktioniert. In der cytosolischen Fraktion wurde die Enzymaktivität von (A) der Aconitase (Holo-IRP1), in der Sedimentfraktion die Aktivitäten der (B) Aconitase, (C) Succinat-Dehydrogenase (SDH) und (D) Cytochrom-c-Oxidase (Cox) der jeweils dritten Transfektion gemessen. In beiden Fraktionen (Cytosol und Sediment) sowie im Zelllysat wurde die Aktivitäten des (E) cytosolischen Enzyms LDH und (F) des mitochondrialen Enzyms Citrat-Synthase bestimmt. Die Aconitase-Aktivität von IRP1 wurde gegen die Werte der LDH, und die Aktivitäten der mitochondrialen Enzyme wurden gegen die Werte der Citrat-Synthase normalisiert. Die Fehlerbalken geben die SEM an ($n \geq 3$).

Um aus den erhaltenen Daten die Gene herauszufiltern, deren Expression von Grx3 beeinflusst werden, wurde eine Liste von mRNAs erstellt, die signifikante Änderungen in ihren Mengen sowohl in den Transfektionsansätzen mit der siRNA-1 als auch mit dem siRNA-Pool aufwiesen. Auf dieser Basis wurden RNAs eliminiert,

deren Expression durch „off-target“ Effekte der einzelnen siRNAs hervorgerufen wurden. Dies war wichtig, da von den ~1700 durch siRNA-1 in HeLa Zellen induzierten RNAs, lediglich ~ 40 ebenfalls vom siRNA Pool induziert wurden. Von den ~900 Genen durch siRNA-1 reprimierten, waren nur ~50 auch vom siRNA-Pool reprimiert (Abb. 30.C,D) (Tabelle 3.2). Dabei wurden nur Transkripte berücksichtigt die mindesten eine ~1,5-fache Änderung in den Expressionsmengen aufwiesen. Mit Hinblick auf die geringe Überlappung (~27%) zwischen beiden Experimenten, wäre ein Microarray-Experiment mit nur einer siRNA somit vollkommen ohne Aussagekraft. Würden nur RNAs berücksichtigt, deren Expression mindestens um einen Faktor 2 im Vergleich zu ohne siRNA transfizierten Zellen verändert war, würden nur 8 RNAs dieses Kriterium erfüllen (Abb. 30.A,B, Schnittmenge der beiden Grx3 siRNA-Ansätze). Somit hat die Depletion von Grx3 nur geringe Effekte auf das Expressionsmuster von HeLa Zellen zur Folge. Daher wurden für die weitere Analyse auch RNAs berücksichtigt, deren Expression sich lediglich um einen Faktor von 1,5 änderte.

Die geringe Zahl deregulierter Gene macht es unmöglich, systematisch Stoffwechselwege zu identifizieren, deren Expression in Grx3-depletierten Zellen konsistent verändert wurden. Daher wird im folgendem auf die Funktion der 10 am stärksten induzierten bzw. 10 am stärksten reprimierten Gene eingegangen. Unter den 10 am stärksten induzierten Genen waren 3 mit unbekannter Funktion, und von den 10 reprimierten ist die Funktion von 2 Genen nicht untersucht (Tabelle 3.2). Am stärksten exprimiert waren die Gene der Häm-Oxygenase und des Transferrinrezeptors (Tabelle 3.2). Die Häm-Oxygenase spaltet Häm, um Biliverdin zu bilden, und wird vermehrt unter Stressbedingungen exprimiert (Chepelev and Willmore, 2011). Das so freigesetzte Eisen könnte dem Stoffwechsel zur Verfügung gestellt werden, so dass eine Induktion der Häm-Oxygenase unter Eisenmangelbedingungen sinnvoll erscheint. Unter den 10 am stärksten induzierten Genen befanden sich aber auch Gene die eine Funktion beim Spleißen von RNAs haben. Dies sind CLK2 und die U6 RNA, die kein Protein kodiert. CLK2 phosphoryliert Proteine des Spleißosom-Komplexes die viele Serin und Arginin Reste enthalten, wodurch das Spleißen von mRNAs reguliert wird (Colwill et al., 1996; Talmadge et al., 1998; Umehara et al., 2003). Die U6 spleißosomale RNA ist Teil des U6 SnRNP

(**S**mall **N**uclear **R**ibonucleoprotein) und hat ebenfalls eine regulatorische Funktion (Brow and Guthrie, 1988). Ebenfalls wurde die Expression des Gens KLHL12 induziert (Tabelle 3.2). KLHL12 ist Teil des BCR (BTB-CUL3-RX1) E3 Ubiquitin Ligase Komplexes und spielt eine Rolle bei dem ER-Golgi Transport, indem es die Größe der COPII Vesikel reguliert. Weiterhin ist KLHL12 ein negativer Regulator der Wnt Signalkaskade und polyubiquitinyliert den Dopamin DRD4 Rezeptor (Angers et al., 2006; Jin et al., 2012; Rondou et al., 2008). Darüber hinaus wurde auch CCL2 vermehrt exprimiert, welches ein Chemokin ist, dass Monozyten, T-Gedächtniszellen und dendritische Zellen an inflammatorische Herde rekrutiert (Carr et al., 1994). Als letztes der 10 am stärksten induzierten Gene ist MYPN, das auch Myopalladin genannt wird, zu nennen. Dieses Protein ist eine Komponente des Sarkomers und hat dort möglicherweise strukturelle und regulatorische Funktionen (Bang et al., 2001; Ma and Wang, 2002). Ob diese Effekte allerdings spezifisch sind muss geklärt werden, da aus zeitlichen Gründen keine Verifikation mittels einer Quantitativen-Real-Time-PCR (qRT-PCR) durchgeführt werden konnte.

In Grx3-depleltierten Zellen war unter den 10 am stärksten reprimierten Genen, die Funktion von EGR2, ARC, EGR1, FOSB, JUN, KLF2 und FOS bekannt. EGR1 und EGR2 sind Transkriptionsfaktoren des Zinkfinger-Typs und regulieren hauptsächlich Gene, die in der frühen Differenzierung und dem Zellwachstum eine Rolle spielen (Chepelev and Willmore, 2011; O'Donovan et al., 1999). ARC spielt eine Rolle bei der Regulation der Zellmorphologie, der Organisation des Cytoskeletts und der Zell-Migration (Bai et al., 2011). Auffälligerweise wurde für das humane Grx2 beschrieben, dass es einen Einfluss auf das Cytoskelett hat (Brautigam et al., 2011). FOS und FOSB gehören mit FOSL1 und FOSL2 zu einer Gruppe von Genen die Leucin-Zipper Proteine codieren, die mit Jun dimerisieren können, und so den Transkriptionsfaktor AP-1 bilden. AP-1 ist ein wichtiger Regulator der Zellproliferation und der Apoptose. Weiterhin spielt AP-1 bei der Tumorgenese und bei dem Wachstum von Blutgefäßen (Angiogenese) eine Rolle. (Eferl and Wagner, 2003; Lopez-Bergami et al., 2010; Ozanne et al., 2007; Shaulian and Karin, 2002). Laut einer früheren Arbeit interagiert Grx3 mit Jun und inhibiert dadurch die Aktivität von AP-1 (Witte et al., 2000). Der Krüppel-Like Faktor 2 (KLF2) ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor des Zinkfinger-Typs, der die Motilität von T-Zellen reguliert.

Dabei induziert KLF2 die Expression des Lipid-bindenden Rezeptors S1P1 (Weinreich and Hogquist, 2008). Weiterhin wurde die RNA für den Transkriptionsfaktor IER2 vermindert exprimiert. IER2 reguliert Gene, die in der Entwicklung und bei der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielen (Hong and Dawid, 2009; Neeb et al., 2012). Auffälligerweise wurde auch die Expression des Transkriptionsfaktors IER3 reprimiert. Dieser Faktor ist, wie IER2, wichtig für die Entwicklung in Vertebraten, indem es den Zellzyklus sowie die Apoptose reguliert. Das Homologe IER1 spielt bei der Inflammation sowie der Tumorigenese eine Rolle (Arlt and Schafer, 2011). Insgesamt war auffällig, dass die Depletion von Grx3 die Expression vieler Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Insgesamt waren 22 Transkriptionsfaktoren betroffen (Tabelle 3.2). Diese Effekte könnten aber auch unspezifisch sein und müssten durch weitere Experimente überprüft werden.

Auffälligerweise unterscheidet sich das RNA Profil von Grx3 depletierten HeLa Zellen stark von dem Eisen-depletierter Zellen (siehe auch Kapitel 3.9). Lediglich 14 RNAs der induzierten und 10 RNAs der reprimierten Gene der Grx3 depletierten Zellen waren auch Eisen-reguliert, wobei diese Gene aber nicht die am stärksten unter Eisenmangel regulierten Gene waren (Abb. 30) (Tabelle 3.2). Weiterhin waren die Expressionslevel dieser Transkripte in Grx3 depletierten Zellen fast ausnahmslos stärker dereguliert, als in den unter Eisenmangel gewachsenen Zellen. Vermutlich sind die in Grx3-depletierten Zellen deregulierten Gene in Eisen-depletierten Zellen als dereguliert zu finden, weil Eisenmangel (unter anderem) auch die Funktion von Grx3 beeinträchtigt. Möglicherweise ist Grx3 nicht funktionsfähig, wenn es keinen Fe/S Cluster gebunden hat. Gene, die eine Funktion im mitochondrialen Metabolismus haben, waren in Grx3-depletierten Zellen ebenfalls nicht dereguliert, was auf eine normale Versorgung der Mitochondrien mit Eisen hinweist. Darüber hinaus konnten auch keine Zielgene des Hypoxie-Induzierten Faktor 1 (HIF-1), die in einer früheren Studie beschrieben wurden (Benita et al., 2009), in Grx3-depletierten Zellen identifiziert werden. HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch niedrige Mengen von Eisen und Sauerstoff aktiviert wird (Murphy, 2012). Diese Tatsache spricht gegen eine zentrale Funktion von Grx3 im Eisenstoffwechsel humaner HeLa Zellen. Sollte Grx3 Eisen aus dem labilen Eisenpool in eine bioverfügbare Form überführen, müsste die Depletion von Grx3 zu einem faktischen Mangel an

bioverfügbaren Eisen führen, der HIF-1 aktiviert und auch die Mitochondrien betrifft.

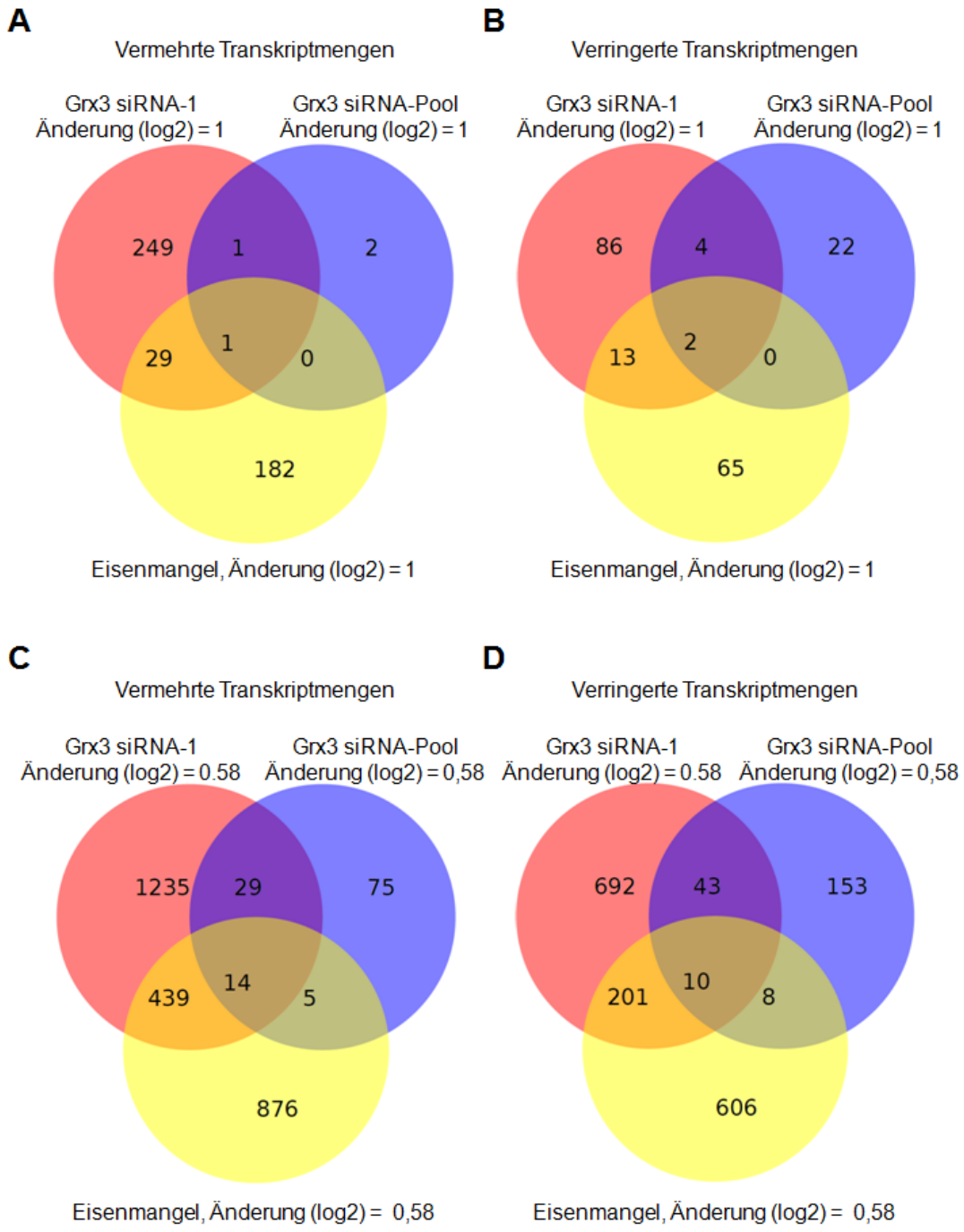

Abbildung 30. Vergleich der differentiellen Genexpression von Grx3 depletierten HeLa Zellen und Zellen bei denen ein Eisenmangel induziert wurde. Gezeigt werden die Anzahl an RNAs, die eine differentielle Genexpression mit (A, B) einer Änderung (log2) = 1 und (C, D) Änderung (log2) = 0,58 aufweisen. Die Änderung gibt den Logarithmus des relativen Faktor zur Basis Zwei an, um den ein Transkript induziert oder reprimiert wurde. Ein Änderung (log2) = 1 entspricht einem Faktor 2, und eine Änderung (log2) = 0.58 entspricht dem Faktor 1,5. Die RNAs die vermehrt in den angegebenen

Zellen vorlagen sind in (A, C) gezeigt und die RNAs die eine Reduktion in ihren Mengen zeigten sind in (B, D) dargestellt. Alle Zahlen die sich in einem Kreis befinden beziehen sich auf das angegebene RNA Profil. Die Zahlen die sich in einem Überlappungsbereich befinden, zeigen an, wie viele RNAs in den zwei bzw. drei RNA Profilen, gemeinsam reguliert wurden.

Die mRNA des Transferrinrezeptors lag jedoch in Grx3-depletierten Zellen in signifikant vermehrten Mengen vor (Tabelle 3.2). Dies bestätigt die biochemischen Daten. Diese besagen, dass die Depletion von Grx3 zu Defekten in der Maturierung von cytosolischen Fe/S Proteinen führt, was u.a. zu einer Deregulation von IRP1 und einer erhöhten Eisenaufnahme führt. Daher leiden Grx3-depletierte HeLa Zellen nicht unter einem generellen Mangel an bioverfügbarem Eisen. Der Eisenmangel-Phänotyp beschränkt sich vielmehr nur auf das Cytosol. Das Fehlen einer Regulation von HIF-1 lässt sogar den Schluss zu, dass Grx3 in HeLa Zellen nur eine spezifische Rolle in der Biogenese von cytosolischen Fe/S Proteinen spielt. HIF-1 wird durch eisenabhängige Hydroxylasen reguliert, die offensichtlich in Grx3-depletierten Zellen nicht betroffen sein können. Defekte in der Biosynthese von cytosolischen Fe/S Proteinen führen zu einer Deregulation von IRP1. Dies führt zur Stabilisierung der mRNA des Transferrinrezeptors und zu einer Blockade der Translation von HIF-2α. Dabei ist der mitochondriale Eisenmetabolismus nicht betroffen. In der Tat zeigen die Ergebnisse der biochemischen Analyse Grx3 depletierter HeLa Zellen eine auffällig große Übereinstimmung mit denen CIA-depletierter Zellen (Stehling et al., 2008).

Tabelle 3.2. Transkripte die eine differentielle Genexpression nach Grx3 Depletion aufweisen. Die Rot-markierten Gene sind auch in HeLa Zellen unter Eisenmangel differentiell exprimiert.

Abkürzung	Name	Gen-ID	Änderung (log2)	Eisenmangel Änderung (log2)
HMOX1	heme oxygenase	5013	1,59	0,88
TFRC	transferrin receptor	11763	1,25	2,90
ZNF146	zinc finger protein 146	12931	0,80	0,89
SNHG6	small nucleolar RNA host gene 6	32965	0,78	0,79
CLK1	CDC-like kinase 1	2068	0,74	1,55

KLHL12	kelch-like 12	19360	0,74	
LRRC8C	leucine rich repeat containing 8 family, member C	25075	0,73	0,72
U6 (snRNA)	U6 spliceosomal RNA	RF00026	0,72	
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	10618	0,71	
MYPN	myopalladin	23246	0,70	
ELOVL3	ELOVL fatty acid elongase 3	18047	0,69	
STK32B	serine/threonine kinase 32B	14217	0,68	
SDCBP2	syndecan binding protein (syntenin) 2	15756	0,67	
KPNA5	karyopherin alpha 5 (importin alpha 6)	6398	0,65	0,79
ABCA8	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8	38	0,64	0,76
TNFRSF11B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	11909	0,64	
EPGN	epithelial mitogen homolog	17470	0,64	
TADA2B	transcriptional adaptor 2B	30781	0,63	
GRPEL1	GrpE-like 1, mitochondrial	19696	0,63	
RBM20	RNA binding motif protein 20	27424	0,62	0,76
PDE7A	phosphodiesterase 7A	8791	0,62	0,75
SPTBN1	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	11275	0,61	0,61
GSTCD	glutathione S-transferase, C-terminal domain containing	25806	0,61	0,80
GFM2	G elongation factor, mitochondrial 2	29682	0,61	
SPRED2	sprouty-related, EVH1 domain containing 2	17722	0,60	0,89
RNF213	ring finger protein 213	14539	0,60	
ACTR3C	ARP3 actin-related protein 3 homolog C	37282	0,60	
PALM2	PALM2-AKAP2 readthrough	33529	0,59	0,94
AKAP2	A kinase (PRKA) anchor protein 2	372	0,59	0,94
KLHDC7B	kelch domain containing 7B	25145	-0,59	
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	1084	-0,59	
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	9605	-0,59	
S1PR4	sphingosine-1-phosphate receptor 4	3170	-0,60	
KCNU1	potassium channel, subfamily U, member 1	18867	-0,60	
C6orf100	chromosome 6 open reading frame 100	21195	-0,60	-0,73
FRAT1	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas	3944	-0,60	
DAPK1	death-associated protein kinase 1	2674	-0,61	
C4orf3	chromosome 4 open reading frame 3	19225	-0,61	
PRDM1	PR domain containing 1, with ZNF domain	9346	-0,61	
ELANE	elastase, neutrophil expressed	3309	-0,62	
ERBB4	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4	3432	-0,62	
EIF2B5	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 5 epsilon	3261	-0,62	
CHRD	chordin	1949	-0,62	
ELF3	E74-like factor 3	3318	-0,62	
CDHR5	cadherin-related family member 5	7521	-0,63	
DACT1	dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 1	17748	-0,64	
ADM2	adrenomedullin 2	28898	-0,65	
MXI1	MAX interactor 1, dimerization protein	7534	-0,65	

NR4A2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	7981	-0,67	
ORAI3	ORAI calcium release-activated calcium modulator 3	28185	-0,68	
KLF10	Kruppel-like factor 10	11810	-0,69	
IER3	immediate early response 3	5392	-0,72	
CTSZ	cathepsin Z	2547	-0,73	-0,66
TWIST1	twist homolog 1	12428	-0,75	
NFATC4	nuclear factor of activated T-cells calcineurin-dependent 4	7778	-0,75	
NXPH4	neurexophilin 4	8078	-0,79	
NAT16	N-acetyltransferase 16 (GCN5-related, putative)	22030	-0,80	
KLF6	Kruppel-like factor 6	2235	-0,81	
PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	8875	-0,89	
NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	7980	-0,99	
IER2	immediate early response 2	28871	-1,02	-0,83
C16orf95	chromosome 16 open reading frame 95	40033	-1,07	
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	3796	-1,11	
KLF2	Kruppel-like factor 2	6347	-1,48	-0,70
JUN	jun proto-oncogene	6204	-1,50	-0,76
FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	3797	-1,87	-0,84
EGR1	early growth response 1	3238	-2,02	-1,37
ARC	activity-regulated cytoskeleton-associated protein	648	-2,52	-0,72
EGR2	early growth response 2	3239	-3,45	-1,11
GLRX3	glutaredoxin 3	15987	-3,81	

Da aber aus zeitlichen Gründen keine Verifikation durchgeführt werden konnte, müssen weitere Experimente durchgeführt werden, bei denen die Effekte, die in den Microarray Analysen festgestellt werden konnten, erst validiert werden.

Insgesamt hatte die Depletion von Grx3 kaum einen Effekt auf die differentielle Genexpression von HeLa Zellen. Unter den 10 am stärksten induzierten bzw. 10 am stärksten reprimierten Genen fanden sich Gene, die verschiedene zelluläre Funktionen haben. Auffälligerweise wurden vor allem die mRNAs von Transkriptionsfaktoren reguliert. Insbesondere wurde die Expression von Proteinen reguliert, die den Transkriptionsfaktor AP-1 bilden. Die Interaktion von Grx3 mit dem AP1- Faktor Jun war schon beschrieben (Witte et al., 2000). Allerdings wurde nicht die Expression mitochondrialer Proteine nach Grx3 Depletion reguliert und HIF-1 wurde auch nicht aktiviert, da keine HIF-1 Zielgene eine differentielle Genexpression aufwiesen. Ob Grx3 in HeLa Zellen möglicherweise die Funktion eines spezialisierten

CIA Faktors oder eine Funktion bei der Bildung von Eisen-haltigen Proteinen hat, muss durch weitere Experimente geklärt werden.

3.9 Differentielle Genexpression von Eisen-depletierten HeLa Zellen

Die Microarray-Analyse von Eisen-depletierten HeLa Zellen diente als Kontrolle für die Analyse der Grx3-defizienten Zellen. Da sich aber kaum ein Überlappungsbereich der beiden Transkriptome identifizieren lässt, wurde eine Computer-gestützte, funktionelle Analyse der Eisenmangel-Array-Daten durchgeführt. Eine Funktionelle-Annotation mit Hypergeometrischer-Verteilung (Gentleman et al., 2004) erbrachte kein Ergebnis. Daher wurde das RNA-Profil Eisen-depletierter Zellen manuell nach Auffälligkeiten untersucht.

Das Transkriptom von Eisen-depletierten Zellen enthielt ~ 290 Gene, die mindestens um den Faktor 2 induziert oder reprimiert wurden. Dabei lagen ~210 RNAs in vermehrten und 80 RNAs in reduzierten Mengen vor (Abb. 30.A,B) (Tabelle 3.3). Weiterhin waren die Transkripte von 4 Eisen-abhängigen Enzymen reprimiert. Unter Eisenmangelbedingungen, wird kein Eisen in die entsprechenden Proteine inseriert, und somit könnten diese Proteine ihre Funktion nicht erfüllen können. Darüber hinaus waren ~20 Gene mit einer Funktion bei der mitochondrialen Respiration, in geringeren Mengen transkribiert. Desgleichen waren 7 mRNAs von Genen der mitochondrialen Translation reprimiert. Da Eisen essenziell für eine funktionelle Atmungskette ist, kann die Zelle nicht mehr respirieren, und daher werden die entsprechenden Stoffwechselwege reprimiert (Tabelle 3.3).

Die unter einem Eisenmangel kultivierten Zellen haben auch vermehrt Energie durch den Hexose-Metabolismus gewonnen, was im Einklang mit dieser Interpretation beobachtet werden konnte. 8 mRNAs von Genen, die bei der Glykolyse, bei dem Recycling von Reduktions-Äquivalenten sowie bei der Aufnahme von Hexosen eine Rolle spielen, lagen vermehrt in der Zelle vor. Da ohne Eisen und ohne eine funktionelle Atmungskette kein Sauerstoff verstoffwechselt werden kann, wurde nun manuell analysiert, ob Gene, die unter hypoxischen Bedingungen, oder Zielgene des Transkriptionsfaktors HIF-1 (Hypoxie induzierten Faktors 1) sind, reguliert

wurden. Die HIF-1 Zielgene wurden in einer früheren Studie beschrieben (Benita et al., 2009). In der Tat konnten 35 RNAs identifiziert werden, deren Transkription unter Sauerstoffmangel differentiell reguliert wird, oder Zielgene von HIF-1 sind. Die Transkription von HIF-1 war nicht verändert (Tabelle 3.3). Weiterhin spielen die Proteine PCBP1 und PCBP2, die Eisen binden und in Ferritin inserieren, eine Rolle bei der Regulation von HIF-1 (Nandal et al., 2011; Shi et al., 2008). Die mRNAs von PCBP1/2 waren aber nicht bei einem induzierten Eisenmangel reguliert. Darüber hinaus wurden 5 Gene von mitochondrialen Proteinen vermehrt exprimiert, die eine Funktion bei der Abwehr von ROS haben, oder beim mitochondrialem Proteinimport eine Rolle spielen. Der Eisenmangel erhöhte auch die Transkriptmengen von Genen der MAP Kinase Signaltransduktionswege. Diesen Kinasen konnte aber in diesem Zusammenhang keine spezifische Funktion zugeordnet werden. Eine negative differentielle Genexpression wiesen aber auch 8 Gene von Metallothioneine auf. Der verwendete Chelator DFO komplexierte möglicherweise auch Cu^{2+} Ionen, da Metallothioneine im Kupfermetabolismus eine Rolle spielen. Somit wurde vielleicht auch ein Kupfermangel induziert. Möglicherweise spielen diese Proteine aber auch eine Rolle im Eisenmetabolismus. Im letzteren Fall würde dies zu einer Verfügbarmachung von Eisen beitragen. Auffälligerweise wurde auch die Transkription von 11 Genen, die zu der Familie der sogenannten „Solute Carrier“ gehören, induziert. Dabei haben 6 Gene eine Funktion bei der Aufnahme von Ionen.

Zusammenfassend beeinflusst Eisenmangel die Expression von Genen Eisen-abhängiger Enzyme, des mitochondrialen Metabolismus, des Hexose-Metabolismus, der „Solute Carrier“ Proteinfamilie und von Genen die unter hypoxischen Bedingungen induziert werden, was mittels Microarray Analysen gezeigt werden konnte. Zusätzlich wiesen auch Gene des MAP Kinase Signaltransduktionswege eine differentielle Genexpression auf, wobei diesen keine spezifische Funktion zugeordnet werden konnte. Die Ergebnisse müssen allerdings noch durch eine qRT-PCR verifiziert werden.

Tabelle 3.3. Auszug von Genen die eine differentielle Genexpression nach induziertem Eisenmangel aufweisen.

Abkürzung	Name	Gen-ID	Änderung (log2)
Induzierte Gene Eisen-abhängiger Proteine			
CYP2S1	cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide 1	15654	0,80
CYP4A11	cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11	2642	0,65
Reprimierte Gene Eisen-abhängiger Proteine			
CYP2F1	cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide 1	2632	-0,61
HBG2	hemoglobin, gamma G	4832	-0,75
CYP4X1	cytochrome P450, family 4, subfamily X, polypeptide 1	20244	-0,77
HBA2	hemoglobin, alpha 2	4824	-0,90
Induzierte mitochondriale Gene			
MMP24	matrix metallopeptidase 24	7172	0,85
SOD2	superoxide dismutase 2	11180	0,78
SLC25A36	solute carrier family 25 (pyrimidine nucleotide carrier), member 36	25554	0,73
MARC1	mitochondrial amidoxime reducing component 1	26189	0,63
PMPCA	peptidase (mitochondrial processing) alpha	18667	0,59
Reprimierte mitochondriale Gene			
MRPL30	mitochondrial ribosomal protein L30	14036	-0,59
MRM1	mitochondrial rRNA methyltransferase 1 homolog	26202	-0,60
BCS1L	BC1 (ubiquinol-cytochrome c reductase) synthesis-like	1020	-0,60
MPV17L2	MPV17 mitochondrial membrane protein-like 2	28177	-0,61
SCO2, TYMP	SCO2 cytochrome c oxidase assembly protein	10604	-0,61
MPC1	mitochondrial pyruvate carrier 1	21606	-0,61
NT5M	5',3'-nucleotidase, mitochondrial	15769	-0,61
MT-ATP6	mitochondrially encoded ATP synthase 6	7414	-0,62
MT-ND2	mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2	7456	-0,62
MRPS14	mitochondrial ribosomal protein S14	14049	-0,63
CKMT1B	creatine kinase, mitochondrial 1B	1995	-0,63
CKMT1A	creatine kinase, mitochondrial 1A	31736	-0,63
MRPL4	mitochondrial ribosomal protein L4	14276	-0,63
RMRP	RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease	10031	-0,67
TIMM13	translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog	11816	-0,70
MMP15	matrix metallopeptidase 15 (membrane-inserted)	7161	-0,73

MT-ND1	mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1	7455	-0,76
MT-ND3	mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 3	7458	-0,77
MRPS36	mitochondrial ribosomal protein S36	16631	-0,77
MAVS	mitochondrial antiviral signaling protein	29233	-0,79
ACO2	aconitase 2, mitochondrial	118	-0,80
BOLA1	bolA homolog 1	24263	-1,13
CYB5B	cytochrome b5 type B	24374	-1,28
UQCRB	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	12582	-1,40
RMRP	RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease	10031	-1,16
Induzierte Gene des Hexose-Metabolismus			
SLC2A14	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 14	18301	1,68
SLC2A3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	11007	1,63
SLC2A1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	11005	1,40
SLC2A5	solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:11010]	11010	0,93
SLC50A1	solute carrier family 50 (sugar transporter), member 1	30657	0,89
GPI	glucose-6-phosphate isomerase	4458	0,88
SLC2A11	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 11	14239	0,70
GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	4456	0,67
Induzierte Gene von Solute Carrieren			
SLC35E1	solute carrier family 35, member E1	20803	0,86
SLC15A4	solute carrier family 15, member 4	23090	0,83
SLC31A1	solute carrier family 31 (copper transporters), member 1	11016	0,82
SLC11A2	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2	10908	0,75
SLC12A8	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 8	15595	0,73
SLC6A6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	11052	0,71
SLCO1C1	solute carrier organic anion transporter family, member 1C1	13819	0,70
SLCO3A1	solute carrier organic anion transporter family, member 3A1	10952	0,68
SLC1A1	solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	10939	0,63
SLC25A40	solute carrier family 25, member 40	29680	0,62
SLC16A6	solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)	10927	0,60
Reprimierte Gene von Solute Carrieren			
SLC48A1	solute carrier family 48 (heme transporter), member 1	26035	-0,60

SLC26A2	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2	10994	-0,61
SLC38A3	solute carrier family 38, member 3	18044	-0,62
SLC7A11	solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11	11059	-0,62
SLC27A4	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4	10998	-0,74
SLC16A14	solute carrier family 16, member 14 (monocarboxylic acid transporter 14)	26417	-0,80
Unter Hypoxie induzierte Gene			
ADM	adrenomedullin	259	3,26
INSIG2	insulin induced gene 2	20452	2,03
HILPDA	hypoxia inducible lipid droplet-associated	28859	2,23
EDN2	endothelin 2	3177	2,05
NDRG1	N-myc downstream regulated 1	7679	1,87
LOX	lysyl oxidase	6664	1,73
P4HA1	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I	8546	1,48
SPAG4	sperm associated antigen 4	11214	1,45
ERO1L	ERO1-like	13280	1,44
TMEM45A	transmembrane protein 45A	25480	1,36
ANKRD37	ankyrin repeat domain 37	29593	1,34
PGK1	phosphoglycerate kinase 1	8896	1,30
EFNA1	ephrin-A1	3221	1,24
DDIT4L	DNA-damage-inducible transcript 4-like	30555	1,24
ALDOC	aldolase C, fructose-bisphosphate	418	1,17
ATF3	activating transcription factor 3	785	1,16
P4HA2	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II	8547	1,16
MXI1	MAX interactor 1, dimerization protein	7534	1,10
WSB1	WD repeat and SOCS box containing 1	19221	0,97
LDHA	lactate dehydrogenase A	6535	0,89
RARA	retinoic acid receptor, alpha	9864	0,81
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2561	0,73
CLK3	CDC-like kinase 3	2071	0,72
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4141	0,70
VDAC1	voltage-dependent anion channel 1	12669	0,65
PPME1	protein phosphatase methylesterase 1	30178	0,62
R3HDM1	R3H domain containing 1	9757	0,62
PGAM1	phosphoglycerate mutase 1	8888	0,62
PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	8933	0,59
Unter Hypoxie reprimierte Gene			
ATF7IP	activating transcription factor 7 interacting protein	20092	-0,63
MRPL4	mitochondrial ribosomal protein L4	14276	-0,63
GOSR2	golgi SNAP receptor complex member 2	4431	-0,74
SLC16A14	solute carrier family 16, member 14 (monocarboxylic acid transporter 14)	26417	-0,80
ILF3	ILF3 antisense RNA 1	27115	-0,95
CCNB1	cyclin B1	1579	-0,97

Induzierte Gene des Map-Kinase Signaltransduktionsweg			
SPRY1	sprouty MAPK homolog 1, antagonist of FGF signaling	11269	2,31
MAPKAP1	mitogen-activated protein kinase associated protein 1	18752	1,10
MAP3K13	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	6852	1,06
MAP3K2	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	6854	1,03
MAP2K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	6840	0,90
MAPK6	mitogen-activated protein kinase 6	6879	0,77
MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13	6875	0,71
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	6871	0,68
MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3	6843	0,65
MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8	6881	0,64
MAP4K3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3	6865	0,62
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9	6886	0,59
Reprimiertes Gen des Map-Kinase Signaltransduktionsweg			
EPGN	epithelial mitogen homolog	17470	-0,81
Induzierter Cu^{2+} Transporter			
ATP7A	ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide	869	0,65
Reprimierte Gene von Metallothioneinen			
MT2A	metallothionein 2A	7406	-0,76
MT1F	metallothionein 1F	7398	-0,79
AOC3	amine oxidase, copper containing 3	550	-0,86
MT1B	metallothionein 1B	7394	-0,89
MT1X	metallothionein 1X	7405	-0,90
MT1E	metallothionein 1E	7397	-0,93

3.10 Charakterisierung der Ubiquitinylierung von Eisen-abhängigen Enzymen

S. cerevisiae besitzt ein transkriptionelles Regulationssystem, um sich an Eisen-limitierende Wachstumsbedingungen anzupassen. Möglicherweise spielen aber auch posttranskriptionelle Prozesse bei der Anpassung an Eisenmangelbedingungen eine Rolle. Geraten Hefe-Zellen in einen Eisenmangel oder ist die ISC Maschinerie nicht funktionell, so gibt es Hinweise dafür, dass Eisen-abhängige Proteine abgebaut werden (Gerber et al., 2003; Muhlenhoff et al., 2004). Dies ist aber bisher nicht systematisch untersucht worden. Prinzipiell wäre ein aktiver Proteinabbau von nicht essenziellen Eisen-bindenden Proteinen sinnvoll. Dieses Element könnte so für andere, lebenswichtigere Prozesse bereitgestellt werden. Ubiquitin, welches von

dem Gen *UBI4* kodiert wird, hat beim Abbau durch das Proteasom eine entscheidende Funktion (Finley et al., 2012; Ulrich, 2009). Es sollte deshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob beim Übergang zu Eisenmangelbedingungen eine Ubiquitinylierung von Eisen-abhängigen Enzymen des Nukleus und des Cytosols stattfindet, die möglicherweise das Signal für den aktiven Proteinabbau durch das Proteasom ist. Darüber hinaus könnte das Protein Smt3 in diesen Prozess involviert sein. Smt3 gehört zu der Familie der **S**mall **U**biquitin-like **Mo**difier (SUMO) Proteine, die eine Funktion bei der Proteinstabilität, beim nukleo-cytoplasmatischem Transport von Proteinen, der transkriptionellen Regulation, Apoptose und generell bei der Regulation des Zellzyklus haben (Finley et al., 2012; Ulrich, 2009). Ubiquitin oder Smt3 werden über die Carboxylgruppe des terminalen Glycins mit der ε–Aminogruppe von Lysin-Resten der Zielproteine verknüpft. Diese Ubiquitinylierung und SUMOylierung wird durch E1-E2-E3 Ligase Kaskaden durchgeführt, und stellen ein Signal für den Abbau von Proteinen dar. Diese Modifikationen können aber auch regulatorische Funktionen ausüben. So können sie z.B. die Funktion des Zielproteins modifizieren, oder die Translokation in ein anderes Kompartiment, z.B. den Transport vom Cytosol in den Nukleus, stimulieren (Finley et al., 2012; Ulrich, 2009).

Um eine mögliche Beteiligung von Ubiquitin oder Smt3 bei der Adaption von *S. cerevisiae* an Eisenmangelbedingungen zu untersuchen, wurden Wildtyp-Hefezellen mit Plasmiden transformiert, von denen aus N-terminal His-getaggtes Ubi4 oder Smt3 überexprimiert werden kann (Ulrich and Davies, 2009). Die Expression erfolgte dabei unter der Kontrolle des Kupfer-induzierbaren Promotors *CUP1*. Diese Zellen wurden in Eisen-haltigem SD Minimalmedium über Nacht kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in Kupfersulfat-haltigem SD Minimalmedium überführt. Dabei induzierte das Kupfersulfat die Expression der Ubi- bzw. SUMO-Proteine. Zu einem Teil der Probe wurde weiterhin der Eisen-spezifische Chelator Bathophenanthrolin hinzugefügt, um Eisenmangelbedingungen zu induzieren. Zur anderen Hälfte wurde Eisenammoniumcitrat hinzugefügt. Nach Inkubation für zwei Stunden wurden die Zellen unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von 6 M Guanidiniumhydrochlorid lysiert und alle Proteine, die mit His-getaggten Ubi4 oder Smt3 modifiziert waren, über Nickel-NTA Agarose unter denaturierenden

Bedingungen aufgereinigt. Würde die Aufreinigung unter nicht denaturierenden Bedingungen durchgeführt, so bestünde die Möglichkeit der Entfernung der entsprechenden Modifikation durch eine E3 Ligase. E3 Ligasen katalysieren sowohl die Ubiquitinylierung als auch die Sumoylierung in reversibler Weise (Ulrich and Davies, 2009). Das Agarose-gebundene Material wurde anschließend durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot auf die Anwesenheit Eisen-abhängiger Proteine untersucht. Als Kandidaten-Proteine wurden Grx3-4 und Leu1 genauer untersucht. Diese Proteine binden einen [2Fe-2S] oder [4Fe-4S] Cluster und sind relativ abundant im Cytosol der Hefe. Um die Auswirkungen auf Eisen-abhängige Proteine zu analysieren, wurde als Kandidaten-Protein Rnr2 ausgewählt. Rnr2 benötigt die Bindung von dinukleärem Eisen für seine Funktion. Darüber hinaus wurde zur Überprüfung der Spezifität dieses Experimentes das Ni-NTA Agarose-gebundene Material auf die Anwesenheit des mitochondrialen Fe/S Proteins Aconitase untersucht. Ubi4 und Smt3 haben keine Funktion bei dem Abbau mitochondrial lokalisierter Proteine und somit sollte die Aconitase nicht an die Ni-NTA-Agarose binden und im Eluat nachgewiesen werden können.

Im ersten Schritt wurden die mit der Ni-NTA Agarose assoziierten Proteine durch eine SDS PAGE der Größe nach aufgetrennt und durch eine kolloidale Coomassie Färbung sichtbar gemacht. Sowohl unter Eisen-limitierenden als auch unter Eisen-gesättigten Bedingungen wurden die relativ kleinen Proteine Ubi4 und Smt3 in jeweils vergleichbaren Mengen exprimiert (Abb. 31.A). Weiterhin waren kovalente Ubi4-Addukte im niedermolekularen bis hochmolekularem Bereich sichtbar. Das Muster der Proteine unterschied sich unter Eisenmangel- und Eisenreichen-Wachstumsbedingungen nur sehr schwach. Somit konnten unter Eisen-limitierenden Wachstumsbedingungen keine spezifisch ubiquitinylierte Proteine identifiziert werden (Abb. 31.A). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch für die mit Smt3 modifizierten Proteine. Hier waren ebenfalls wieder Proteine mit diversen Molmassen sichtbar, jedoch keine, die spezifisch unter Eisen-limitierenden Bedingungen Smt3 gebunden hatten (Abb. 31.A).

In der Western-Blot Analyse mit Antiseren gegen das *S. cerevisiae* Grx4 konnte dieses Protein im Ni-NTA Eluat nachgewiesen werden, wenn Ubi4 exprimiert wurde und ein Eisenmangel vorlag (Abb. 31.B). Dabei zeigten sich auch Banden mit höheren

Molmassen als das Wildtyp-Protein. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um polyubiquitinyliertes Grx4. Überraschenderweise wurde auch eine Bande nachgewiesen, die der Molmasse von nicht modifiziertem Grx4 entsprach. Weiterhin konnte mit Ubi4 modifiziertes Grx4 nur in viel geringeren Mengen nachgewiesen werden, wenn *S. cerevisiae* Wildtyp-Zellen in der Gegenwart von Eisenammoniumcitrat kultiviert wurden. Grx4 scheint daher unter Eisenmangel-Bedingungen ubiquitinyliert zu werden.

Um zu überprüfen, ob das cytosolische Fe/S Enzym Leu1 ebenfalls posttranskriptionell durch Smt3 oder Ubi4 reguliert ist, wurde das Präzipitat auf die Anwesenheit von Leu1 durch Färbung mit spezifischen Antikörpern untersucht. Dabei war Leu1 mit His-getaggtem Ubi4 modifiziert, wenn ein Eisenmangel induziert wurde (Abb. 31.B). Unter normalen Wachstumsbedingungen konnte zwar ebenfalls mit Ubi4 modifiziertes Leu1 nachgewiesen werden, allerdings lag das Protein dann in viel geringeren Mengen im Ni-NTA Eluat vor. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob diese Art der Regulation auch spezifisch für Eisen-abhängige Proteine ist. Diese Enzyme benötigen die Bindung von nukleärem Eisen für ihre Funktion. Eine Färbung mit Antikörpern gegen Rnr2 ergab, dass auch dieses Protein His-getaggtes Ubi4 gebunden hatte wenn der Zelle nicht genug Eisen zur Verfügung stand, da nur unter diesen Bedingungen Rnr2 effizient mit der Ni-NTA Agarose präzipitierte (Abb. 31.B). Darüber hinaus war keines der getesteten Proteine mit His-getaggtem Smt3 modifiziert, da sie nicht effizient mit der Ni-NTA Agarose aufgereinigt werden konnten. Somit kann eine posttranskriptionelle Regulation Eisen-abhängiger Proteine durch SUMO weitestgehend ausgeschlossen werden.

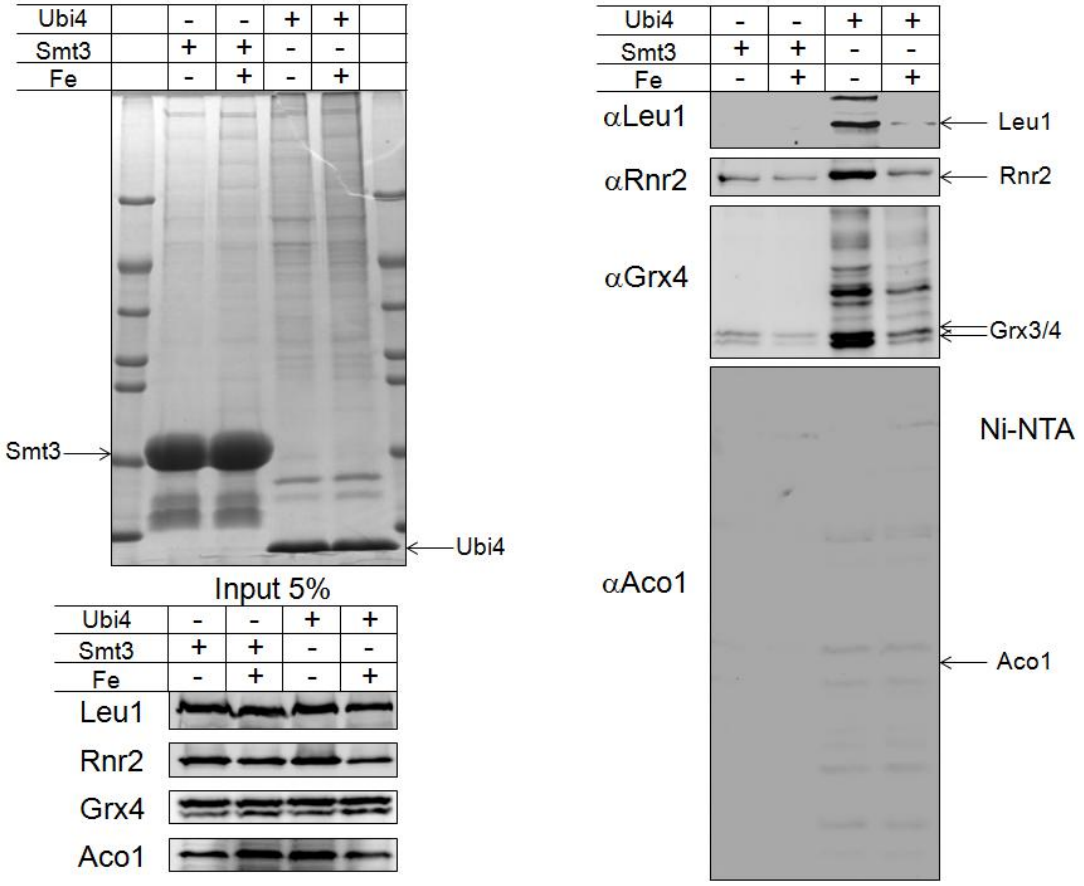

Abbildung 31. Eisen-abhängige Enzyme werden unter Eisenmangel polyubiquitinyliert. W303-Wildtyp-Hefezellen, die von einem Plasmid aus His-getaggtes Ubi4 oder Smt3 unter der Kontrolle des *CUP1* Promotors exprimierten, wurden über Nacht in SD Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in Kupfersulfat-haltiges SD Minimalmedium überführt. Zu einem Teil der Kultur wurde der Eisen-spezifische Chelator Bathophenanthrolin (-Fe) gegeben. Der andere Teil der Kultur wurde mit Eisenammoniumcitrat (+Fe) supplementiert. Beide Kulturen wurden für zwei Stunden bei 30°C inkubiert. Aus den Zelllysaten wurden die His-getaggten Proteine durch Ni-NTA Agarose präzipitiert. Das Ni-NTA Eluat wurde (A) durch kolloidales Coomassie gefärbt und (B) durch Western Blot Analysen auf die Anwesenheit der angegebenen Proteine untersucht. (C) Western Blot der verwendeten Lysate auf die angegebenen Proteine.

In einem weiteren Schritt wurde die Spezifität dieses Experiments überprüft. Dazu wurde das mit der Ni-NTA Agarose präzipitierte Material mit einem Antiserum gegen das mitochondriale Fe/S Enzym Aconitase angefärbt. Wie erwartet war dieses Protein nicht mit der Ni-NTA Agarose assoziiert (Abb. 31.B). Da alle getesteten Proteine in jeweils vergleichbaren Mengen exprimiert wurden (Abb. 31.C) und Smt3 bzw. Ubi4 jeweils mit der gleichen Effizienz präzipitiert wurden (Abb. 31.A), werden Eisen-abhängige Proteine des Cytosols und des Nukleus ubiquitinyliert und

möglicherweise über das Proteasom abgebaut. Mit dieser Methode kann allerdings keine proteomweite Analyse der unter Eisenmangel ubiquitinylierten Proteine durchgeführt werden. Durch Färbung mit kolloidalem Coomassie konnten keine weiteren Proteine identifiziert werden, die spezifisch unter Eisenmangel-Bedingungen ubiquitinyliert wurden. Somit kann nur getestet werden, ob bereits bekannte Eisen-abhängige Proteine mit Ubiquitin modifiziert waren.

3.11 Einfluss der ISC und CIA Maschinerien auf die Ubiquitinylierung von Eisen-abhängigen Enzymen

Da die Fe/S-Cluster Assemblierung von der ISC-Maschinerie abhängig ist (Lill, 2009; Muhlenhoff et al., 2004) wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Depletion von Nfs1 auch zur Ubiquitinylierung von Grx3-4 führt. Dafür wurde der Gal-NFS1 Stamm mit dem *CUP1-UBI4*-His Plasmid oder dem *CUP1-SMT3*-His Plasmid transformiert. Nfs1 wurde für 48 Stunden durch Kultivierung in Glukose-haltigen Medium depletiert. Zellen, die in Galaktose-haltigen herangezogen wurden, dienten als Kontrolle, da unter diesen Bedingungen weiterhin Nfs1 exprimiert wurde. Um die Expression von His-getaggten Ubi4 oder Smt3 zu induzieren, wurden die Zellen geerntet und entweder in Kupfersulfat-haltiges SD- oder SGal-Minimalmedium überführt und für vier Stunden inkubiert. Es war wichtig, dass die Zugabe von Kupfersulfat erst nach zweistündiger Inkubation erfolgte, damit die Zellen sich wieder in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Anschließend wurden Zellextrakte hergestellt und die His-getaggten Proteine mit Hilfe von Nickel Ni-TA Agarose unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Die Agarose-gebundenen Proteine wurden eluiert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurden mit Antiseren gegen Grx4 und Rnr2 immunologische Färbungen durchgeführt. Dabei war mit Ubiquitin modifiziertes Grx4 in großen Mengen mit der Ni-NTA Agarose assoziiert, wenn Nfs1 depletiert war und Ubi4-His exprimiert wurde (Abb. 32.A). Ubiquitinyliertes Grx4 konnte auch nachgewiesen werden, wenn Nfs1 noch exprimiert wurde, allerdings waren die Grx4 Proteinmengen viel geringer. Daher wird Grx4 ubiquitinyliert, wenn

die ISC-Maschinerie nicht funktionell ist und somit kein Fe/S Cluster auf Grx4 assembliert wird. In den Zellen die Smt3-His exprimierten, konnte so gut wie kein sumoyliertes Grx4 nachgewiesen werden. Es wurde weiterhin überprüft, ob Rnr2 aufgrund der Nfs1-Depletion ubiquitinyliert wird, da die Insertion von Eisen in Rnr2 von Grx4 abhängig ist (Muhlenhoff et al., 2010; Zhang et al., 2011). Im Fall von Rnr2 wies das Protein nur größere Molmassen auf, wenn Ubi4-His exprimiert wurde und Nfs1 depletiert war. Die erhöhten Molmassen lassen darauf schließen, dass es sich dabei um polyubiquitinyliertes Rnr2 handelt. Dieser Effekt war aber im Vergleich zu Grx4 weniger stark ausgeprägt. Dabei wurde Rnr2 auch mit Ubiquitin modifiziert, wenn Nfs1 nicht depletiert wurde (Abb. 32.A). Darüber hinaus konnte sumoyliertes Rnr2 nicht nachgewiesen werden. Da alle Proteine in jeweils vergleichbaren Mengen exprimiert wurden und Ubi4 bzw. Smt3 jeweils in vergleichbaren Mengen im Ni-NTA Eluat vorlagen, war Grx4 möglicherweise nicht richtig gefaltet, wenn kein Fe/S Cluster in das Protein inseriert wurde. Dies könnte auch der Fall sein, wenn in Rnr2 kein Eisen inseriert wurde. Als Folge werden Eisen-abhängige Proteine ubiquitinyliert.

Weiterhin wurde überprüft, ob die Depletion der CIA Maschinerie einen ähnlichen Effekt wie ein Eisenmangel auf die Ubiquitinylierung von cytosolischen Fe/S Enzymen hat. Im Gegensatz zu Eisenmangelbedingungen und der Depletion von Nfs1 hat das Fehlen der CIA-Maschinerie keinen generellen Einfluss auf die Eisenhomöostase und Eisen-abhängige Enzyme. Die CIA-Maschinerie ist vielmehr spezifisch für die Maturierung von Fe/S Proteinen des Cytosols zuständig (Lill, 2009). Um die Effekte der Depletion der CIA-Maschinerie auf die Ubiquitinylierung von cytosolischen Fe/S Enzymen zu untersuchen, wurde mit dem Gal-NBP35 Stamm das gleiche Experiment wie für Gal-NFS1 Zellen durchgeführt.

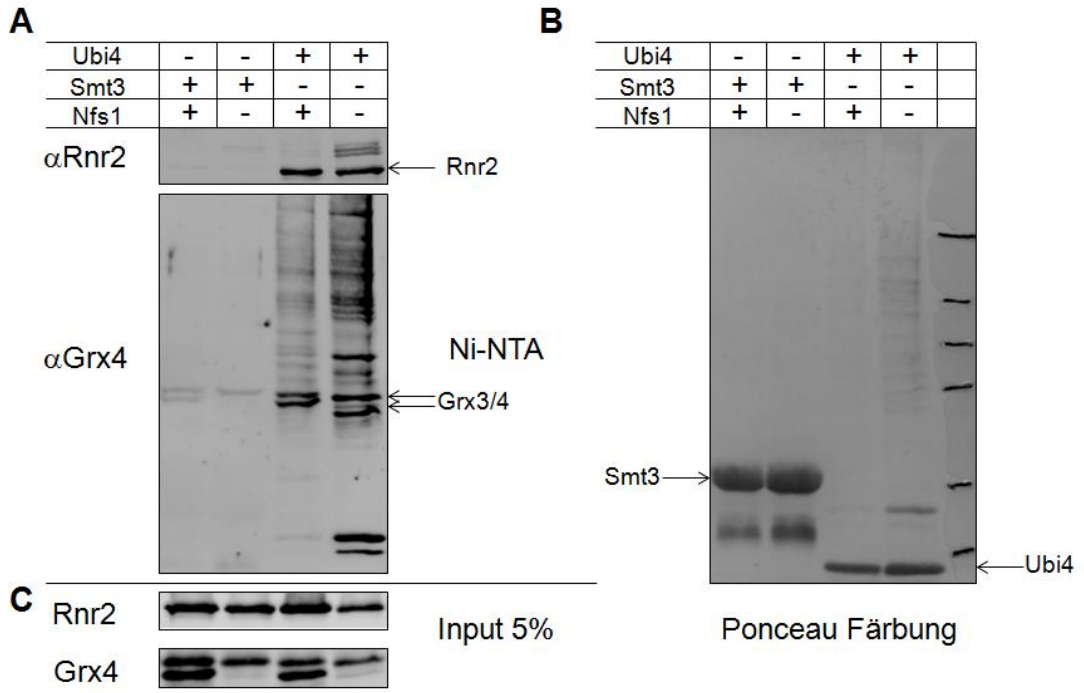

Abbildung 32. Die Depletion von Nfs1 führt zur Ubiquitinylierung von Eisen-abhängigen Enzymen. Gal-NFS1 Zellen wurden für 48 Stunden in SD Medium oder SGal Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in das entsprechende neue Medium überführt und für 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Zu den Kulturen wurde daraufhin Kupfersulfat gegeben und es folgte eine weitere Inkubation für 2 Stunden bei 30°C. Aus den Zelllysaten wurden die His-getaggten Proteine durch Ni-NTA Agarose präzipitiert. Das Ni-NTA Eluat wurde (A) durch Western Blot Analyse auf die Anwesenheit der angegebenen Proteine untersucht und (B) Ponceau gefärbt. (C) Western Blot der verwendeten Lysate auf die angegebenen Proteine.

Gal-NBP35 Zellen wurde für 40 Stunden durch Kultivierung in Glukose-haltigem Medium depletiert. Gal-NBP35 Zellen, die ebenfalls für 40 Stunden in Galaktose-haltigem Medium inkubiert wurden, dienten als Kontrolle. Immunofärbungen mit einem Antiserum gegen Leu1 zeigten, dass Leu1 nur mit Polyubiquitinketten konjugiert war, wenn NBP35 depletiert war (Abb. 33.A). Allerdings konnte auch mit Smt3 modifiziertes Leu1 in Nbp35-depletierten Zellen nachgewiesen werden. Dabei war der Effekt nicht so stark ausgeprägt, wie bei der Modifizierung mit Ubiquitin. Da Leu1 ein bekanntes SUMO Zielprotein ist, bleibt zu klären welche physiologische Rolle die Modifikation mit Smt3 hat. Im Gegensatz zu Leu1 war das Monothiol-Glutaredoxin Grx4 nicht im Ni-NTA Eluat anwesend. Da die Fe/S Clusterassemblierung von Grx3-4 nicht von der CIA-Maschinerie abhängig ist (Muhlenhoff et al., 2010), hat Grx4 seinen Kofaktor gebunden und liegt somit stabil

in der Zelle vor. Da alle getesteten Proteine jeweils in vergleichbaren Mengen exprimiert wurden und vergleichbare Mengen von Ubi4 oder Smt3 mit der Ni-NTA Agarose präzipitierten (Abb. 33.B,C), werden cytosolische und nukleäre Fe/S Proteine ubiquitinyliert, wenn von der CIA-Maschinerie kein Fe/S Cluster in diese Proteine inseriert wird.

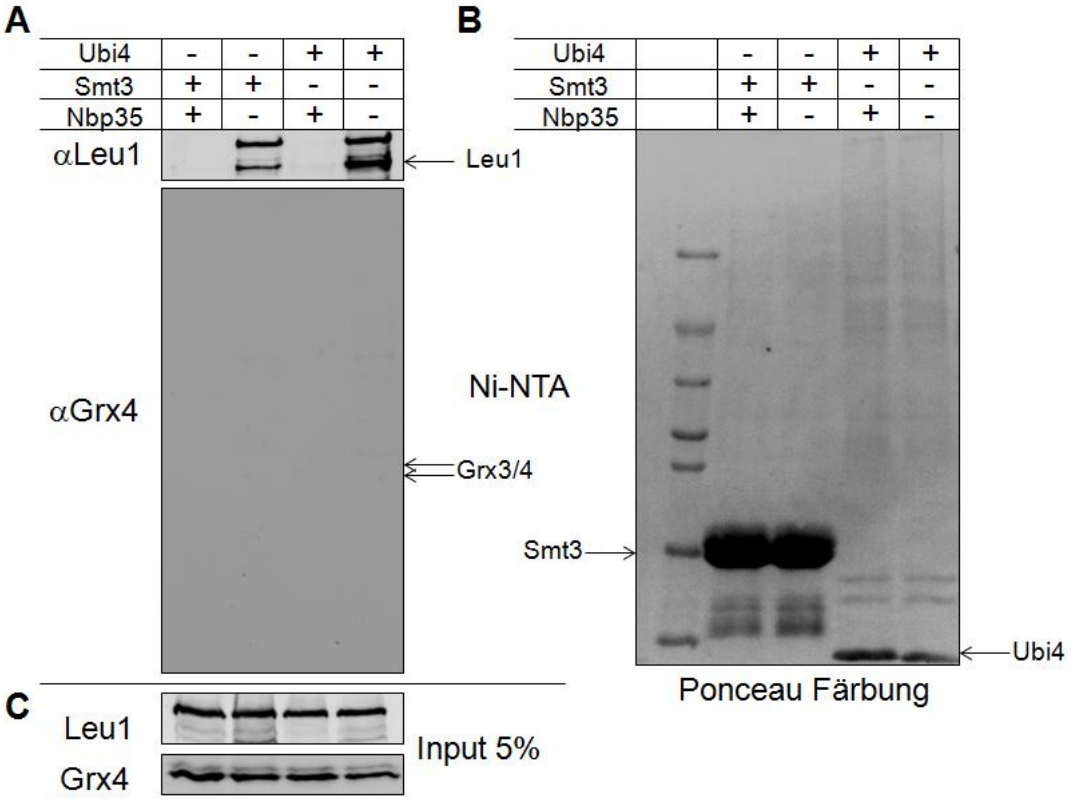

Abbildung 33. Leu1 wird nach Depletion von Nbp35 polyubiquitinyliert. Gal-NBP35 Zellen wurden für 40 Stunden in Glukose haltigem oder Galaktose haltigem SC Minimalmedium kultiviert. Weiterhin wurde wie in Abb. 31 beschrieben vorgegangen. Aus den Zelllysaten wurden die His-getaggten Proteine durch Ni-NTA Agarose präzipitiert. Das Ni-NTA Eluat wurde (A) durch Western Blot Analyse auf die Anwesenheit der angegebenen Proteine untersucht und (B) Ponceau gefärbt. (C) Western Blot der verwendeten Lysate auf die angegebenen Proteine.

3.12 Der Verlust des Fe/S Kofaktors führt zur Ubiquitinylierung Eisen-abhängiger Enzyme

Schließlich wurde untersucht, was die Ubiquitinylierung eines Fe/S Proteins auslöst. Die einfachste Erklärung hierfür ist, dass der Verlust des Fe/S Kofaktors das Signal für die Ubiquitinylierung ist. Dies wurde am Beispiel von Grx4 uns Rli1 überprüft. Zum

einen wurde verfolgt, ob eine modifizierte Myc-getaggte Grx4 Variante mit einer C171A Mutation (Grx4-C171A) auch unter Eisen-reichen Wachstumsbedingungen ubiquitinyliert wird. Die Grx4-C171A Variante ist nicht in der Lage einen Fe/S Cluster zu koordinieren und kann den Phänotyp von Gal-GRX4 Zellen nicht komplementieren (Muhlenhoff et al., 2010). Zum anderen wurde untersucht, ob HA-getaggtes Rli1 mit der Mutation C25S (Rli1-C25S) ebenfalls ubiquitinyliert wird. Rli-C25S kann keinen Fe/S Cluster binden (Kispal et al., 2005). Die beiden mutierten Proteine, sowie die entsprechenden Wildtyp-Proteine wurden jeweils unter der Kontrolle des *tetO$_7$* (*GRX4*) Promotors, oder des *TDH3* (*RLI1*) Promotors in Wildtyp-Zellen überexprimiert. Dabei enthielten die Zellen zusätzlich noch das *CUP1-UBI4*-His Plasmid. Die Zellen wurden in Eisen-haltigem SD-Minimalmedium kultiviert. Aus den Zellextrakten wurden die ubiquitinylierten Proteine über Ni-NTA Agarose unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Die Iimmunofärbungen mit Antiseren gegen Myc oder HA zeigten, dass die Proteinvarianten Grx4-C171A und Rli1-C25S in viel größeren Mengen ubiquitinyliert wurden, als die entsprechenden Wildtyp-Proteine (Abb. 34.A). Im Fall von Grx4 konnten auch hier wieder Banden nachgewiesen werden, bei denen es sich um polyubiquitinyliertes Grx4 handelt. Weiterhin wurden die beiden Grx4 Varianten und die beiden Rli1 Proteine jeweils in gleichen Mengen exprimiert (Abb. 34.C). Auch Ubi4 lag in vergleichbaren Mengen im Ni-NTA Eluat vor. Dies deutet darauf hin, dass der fehlende Fe/S Kofaktor der untersuchten Proteine Grx4-C171A und Rli1-C25S zu deren Ubiquitinylierung geführt hat. Möglicherweise hatte das Fehlen des Fe/S Clusters eine fehlerhafte Faltung der Proteine zur Folge, was dann als Signal für die Ubiquitinylierung dienen könnte.

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass die Eisen-abhängigen Proteine Grx4, Leu1 und Rnr2 unter Eisenmangel polyubiquitinyliert und möglicherweise über das Proteasom abgebaut werden. Eine Rolle von Smt3 bei dieser posttranskriptionellen Regulation erscheint aus diesen Versuchen unwahrscheinlich. Einen ähnlichen Effekt wie bei einem Eisenmangel wurde auch nach der Depletion von Nfs1 beobachtet. Ohne eine funktionelle ISC Maschinerie wird kein Fe/S Cluster auf Grx3-4 und Leu1 assembliert und daher wurden sie ubiquitinyliert. Die Depletion des CIA-Faktors Nbp35 hat allerdings nur einen Effekt auf das Fe/S Protein Leu1, nicht aber auf Grx4.

Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass die Assemblierung des Fe/S Clusters auf Grx4 nicht von der CIA-Maschinerie abhängig ist (Muhlenhoff et al., 2010). Hingegen wurde nach Nbp35 Depletion sowohl eine Modifikation mit Ubi4 als auch mit Smt3 von Leu1 beobachtet. Die physiologische Rolle dieser Modifikation muss allerdings noch geklärt werden. Weiterhin führte der Verlust des Fe/S Kofaktors nach Mutation der koordinierenden Cysteinreste zur Ubiquitinylierung von Grx4 und Rli1. Die Modifikation mit Ubiquitin stellt möglicherweise das Signal für die Degradation durch das Proteasom dar.

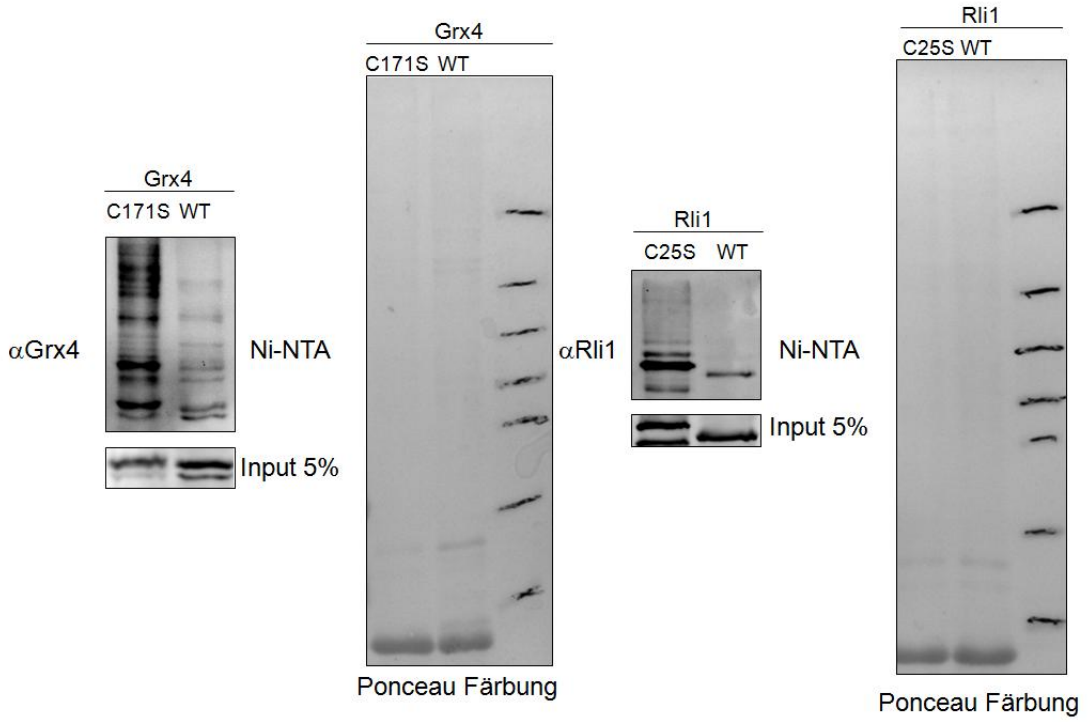

Abbildung 34. Fe/S Proteine ohne gebundenen Kofaktor werden ubiquitinyliert. Wildtyp-Hefezellen mit dem Ubi-His-*CUP1*-Plasmid, die jeweils Grx4-Myc, Grx4C171A-Myc, Rli1-HA oder Rli1C25S-HA von einem Plasmid aus exprimierten, wurden für 16 Stunden in SD Minimalmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Kupfersulfat-haltiges SD Medium überführt und für zwei Stunden inkubiert. Aus den Zelllysaten wurden die His-getaggten Proteine durch Ni-NTA Agarose präzipitiert. Das Ni-NTA Eluat wurde (A,C) durch eine Western Blot Analyse auf die Anwesenheit der angegebenen Proteine untersucht und (B,D) Ponceaus gefärbt. Die unteren Bereiche der Teile A und C zeigen eine immunologische Färbung der Zellextrakte auf die angegebenen Proteine.

4 Diskussion

In den letzten Jahren wurde eine große Anzahl an Glutaredoxinen mit nicht kanonischen Motiven im aktiven Zentrum identifiziert (Comini et al., 2008; Couturier et al., 2009a; Herrero and de la Torre-Ruiz, 2007; Izquierdo et al., 2008; Lillig et al., 2008; Mesecke et al., 2008; Rouhier et al., 2006). Die exakte physiologische Funktion der meisten dieser Proteine ist nicht bekannt und es ist unklar, ob individuelle Glutaredoxine übereinstimmende Funktionen aufweisen. Weiterhin gibt es nur wenige Informationen darüber, in wie weit cytosolische Glutaredoxine untereinander funktionell in der Zelle austauschbar sind. Monothiol-Glutaredoxine mit einem CGFS Motiv im aktiven Zentrum stellen eine gut konservierte Proteinfamilie dar, die in allen Reichen des Lebens vorkommt (Herrero and de la Torre-Ruiz, 2007). Zu dieser Gruppe gehören Proteine, die nur eine einzelne Glutaredoxindomäne aufweisen sowie Multidomänen Proteine, die aus einer N-terminalen Thioredoxindomäne und ein bis drei C-terminalen Glutaredoxindomäne(n) bestehen (Alves et al., 2009; Herrero and de la Torre-Ruiz, 2007; Rouhier, 2010). Vorhergehende Arbeiten an den beiden cytosolischen Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine Grx3 und Grx4 in *S. cerevisiae* haben eine Funktion dieser Proteine in der Regulation der zellulären Eisenhomöostase aufgezeigt, indem sie mit dem Eisen-reguliertem Transkriptionsfaktor Aft1 interagieren (Ojeda et al., 2006; Ueta et al., 2012; Yamaguchi-Iwai et al., 2002). Darüber hinaus haben sie eine essenzielle Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine der Zelle (Muhlenhoff et al., 2010).

Im Cytosol von *S. cerevisiae* kommen neben Grx3-4 noch die zwei redundanten Dithiol-Glutaredoxine Grx1 und Grx2 vor. Diese abundanten Dithiol-Glutaredoxine spielen eine Rolle bei der Protektion vor oxidativem Stress und tragen dazu bei, das korrekte Redoxpotential der Zelle einzuhalten, haben aber anscheinend eine unterschiedliche Substratspezifität (Herrero et al., 2008; Herrero et al., 2006; Lillig et al., 2008; Luikenhuis et al., 1998; Morano et al., 2012). Weiterhin können Grx1 und Grx2 nicht die Funktion von Grx3-4 übernehmen, und haben daher keine Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine und der Regulation der intrazellulären Eisenhomöostase. Umgekehrt spielen die Multidomänen Monothiol-

Glutaredoxine Grx3-4 keine signifikante Rolle bei der Detoxifikation von ROS. Darüber hinaus können Grx3-4, im Gegensatz zu den klassischen Dithiol-Glutaredoxinen, einen mit Hilfe von GSH koordinierten [2Fe-2S] Cluster komplexieren (Bandyopadhyay et al., 2008a; Couturier et al., 2009b; Li et al., 2009; Muhlenhoff et al., 2010; Picciocchi et al., 2007; Su et al., 2007). Daher stellte sich die Frage, in wie weit sich die aktiven Zentren von Monothiol- und Dithiol-Glutaredoxinen strukturell unterscheiden und welche Unterschiede sie befähigen, eine jeweils unterschiedliche spezialisierte Funktion in der Zelle auszuführen. Der von Grx3-4 gebundene Fe/S Cluster ist essenziell für ihre beiden Funktionen (Muhlenhoff et al., 2010). Umso mehr war es von Interesse zu untersuchen, welche Voraussetzungen ein aktives Zentrum eines Glutaredoxins erfüllen muss, um einen Fe/S Cluster binden zu können. Bisher wurde angenommen, dass ein Prolin im aktiven Zentrum eines Glutaredoxins inkompatibel mit der Fe/S Cluster Bindung ist (Lillig et al., 2008). Hierbei sollte auch geklärt werden, ob ein Dithiol-Motiv überhaupt die Voraussetzungen für eine Fe/S Cluster Bindung erfüllen kann, und ob dieses Motiv mit der Regulation der Eisenhomöostasen kompatibel ist. Aus diesem Grund wurde das CGFS Motiv im aktiven Zentrum von Grx4 systematisch durch andere natürlich vorkommende Monothiol- und Dithiol-Motive substituiert. Diese Grx4 Varianten wurden dann auf ihre Fähigkeit hin untersucht, *in vivo* einen Fe/S Cluster binden zu können. Ebenso wurde ihre Funktionalität bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine und der Regulation der intrazellulären Eisenhomöostase untersucht. Weiterhin stellte sich die Frage, welche Rolle die Thioredoxindomäne bei den Multidomänen Monothiol-Proteinen spielt. Einzeldomänen Glutaredoxine kommen in den Mitochondrien vor, wo sie eine Funktion bei der Assemblierung von Fe/S Cluster Proteinen haben (Lee et al., 2009; Muhlenhoff et al., 2003a; Rodriguez-Manzaneque et al., 1999). Diese Funktion kann aber auch von vielen anderen Monothiol-Glutaredoxinen übernommen werden, zu denen auch die Multidomänen Glutaredoxine Grx3-4 aus *S. cerevisiae* und Glutaredoxine mit einem nicht kanonischen Motiv im aktiven Zentrum gehören (Bandyopadhyay et al., 2008b; Molina-Navarro et al., 2006). Anscheinend toleriert die Biogenese von mitochondrialen Fe/S Proteinen Glutaredoxine, die sich in ihrer Struktur erheblich unterscheiden (Bandyopadhyay et al., 2008b; Molina et al., 2004;

Rouhier, 2010). Die physiologische Relevanz dieser Austauschbarkeit ist unklar und stellt im übrigem ein Hindernis bei der Identifikation von spezifischen Funktionen der nicht kanonischen Glutaredoxine dar. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die Thioredoxindomäne von Grx4 essenziell für die Funktion von Grx4 im Cytosol von *S. cerevisiae* ist. Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass ein Prolin im aktiven Zentrum von Grx3-4 kompatibel mit der Koordination eines Fe/S Clusters ist. Weiterhin beeinflusste die Einführung eines Dithiol-Motivs in Grx3-4 drastisch die Eisenbindung. Die Dithiol Grx4 Varianten waren weiterhin nicht mehr in der Lage Aft1 zu regulieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Thioredoxindomäne von Grx3-4 absolut essenziell für die Funktion dieser Proteine ist.

Multidomänen Monothiol-Glutaredoxinen kommen in fast allen Eukaryoten vor, was eine konservierte physiologische Funktion dieser Proteinklasse nahelegt (Hanschmann et al., 2013; Lillig et al., 2008). Daher war es von entscheidender Bedeutung zu untersuchen, ob Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine in anderen Organismen auch eine Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteinen haben. Diese Fragestellung sollte zum einen durch Komplementationsstudien untersucht werden, indem getestet wurde, ob Multidomänen Monothiol-Glutaredoxinen aus anderen Organismen funktionell in *S. cerevisiae* sind. Darüber hinaus sollte aber die Funktion von Grx3 in direkt Vertebraten untersucht werden. Über die Funktion des humanen Grx3 war vor dieser Arbeit nur wenig bekannt. In T-Lymphozyten führt die Überexpression von Grx3 zu einer Aktivierung der c-Jun-terminalen Kinase, und zu einer Inhibierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB. Daraus wurde gefolgert, dass Grx3 eine Funktion bei der Aktivierung von T-Zellen hat (Witte et al., 2000). Weiterhin interagiert Grx3 mit den „**S**erum **R**esponse Transkriptions-**F**aktoren“ (SRFs), die eine Rolle bei der Herzentwicklung spielen. Zusätzlich entwickelten Mäuse mit einer verminderten Grx3 Expression, vermehrt eine Herzhypertrophie (Jeong et al., 2006; Jeong et al., 2008; Zhang et al., 2005). Darüber hinaus scheint Grx3 auch eine Rolle bei der neuronalen Zelldifferenzierung zu spielen (Brynczka and Merrick, 2007). Um eine mögliche Funktion von Grx3 in der Erythropoese zu untersuchen, eignet sich besonders die Verwendung des Zebrafisches *Danio rerio* als Modellorganismus.

Hierbei ist bekannt, dass die Depletion von Grx5 einen Defekt in der Häm-Biosynthese von Zebrafisch-Embryonen verursacht (Wingert et al., 2005). Als Folge kann die Erythropoese nicht mehr stattfinden. Um aber eine mögliche Funktion von Grx3 bei der Biogenese von Fe/S Proteinen in Vertebraten aufzuzeigen, sollten in dieser Arbeit HeLa Zellen verwendet werden, die ein gut etabliertes Modellsystem für diesen Prozess sind (Sheftel et al., 2009; Stehling et al., 2012). Aus diesem Grund wurde mit siRNA-basierten Techniken das humane Grx3 in HeLa Zellen depletiert und die Auswirkungen auf den Eisenmetabolismus untersucht. Da Grx3-4 in *S. cerevisiae* mit dem Transkriptionsfaktor Aft1 interagieren, könnten Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine auch in anderen Organismen direkt mit Transkriptionsfaktoren interagieren und deren Funktion regulieren. In *S. pombe* interagiert Grx4 z.B. mit einem transkriptionellen Repressorsystem und reguliert dessen Aktivität (Jbel et al., 2011; Mercier and Labbe, 2009; Vachon et al., 2012). Da sich das Fehlen des humanen Grx3 in diesem Fall auf das Transkriptionsprofil auswirken würde, sollten Microarray-Analysen mit der Gesamt-RNA von Grx3-depletierten HeLa Zellen durchgeführt werden.

Die Grx3-Depletion in HeLa Zellen ergab, dass diese Zellen Defekte in der Biogenese von Fe/S Proteinen des Cytosols aufwiesen. Allerdings waren die Mitochondrien nicht von diesem Effekt betroffen und die Microarray-Analysen gaben nur wenig Hinweise auf einen generellen Mangel an bioverfügbarem Eisen in Grx3-depletierten HeLa Zellen, wie es nach dem Phänotyp von *S. cerevisiae* zu erwarten war. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen eine auffällige Ähnlichkeit mit HeLa Zellen, die für eine CIA Komponente depletiert wurden. Im Zebrafisch wurde aber eine mögliche zentrale Funktion von Grx3 im Eisenmetabolismus beschrieben. Dabei wiesen Grx3-depletierte Zebrafisch-Embryonen einen Anämie und leicht, aber konsistent reduzierte Aktivitäten von mitochondrialen Eisen-abhängigen Enzymen auf (Haunhorst et al., 2013). Daher muss in weiteren Studien geklärt werden, ob Grx3 in HeLa Zellen eine Komponente der CIA-Maschinerie ist, oder ob Grx3 eine generelle Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine hat.

4.1 Ein Dithiol-Motiv im aktivem Zentrum von Grx4 führt zu einer reduzierten Eisenbindung und beeinträchtigt die Funktion dieses Proteins *in vivo*

Im Gegensatz zu den meisten klassischen Dithiol-Glutaredoxinen mit einem CPYC Motiv im aktiven Zentrum, können Monothiol-Glutaredoxine, zu deren Gruppe auch die Multidomänen Glutaredoxine aus *S. cerevisiae* gehören, einen mit Hilfe von GSH koordinierten Fe/S Cluster im aktiven Zentrum binden (Bandyopadhyay et al., 2008a; Couturier et al., 2009b; Li et al., 2009; Muhlenhoff et al., 2010; Picciocchi et al., 2007; Su et al., 2007). Es wurde bisher angenommen, dass die Substitution eines Glycins durch ein Prolin an der Position 2 des kanonischen CGFS Motivs des aktiven Zentrums der Grund für das Fehlen der Fe/S Cluster-Bindung ist. Ein Prolin an der Position 2 kommt im Motiv des aktiven Zentrums von klassischen Dithiol-Glutaredoxinen vor (Berndt et al., 2007; Rouhier et al., 2007; Su et al., 2007). Diese Schlussfolgerungen beruhen aber auf *in vitro* Studien mit rekombinanten Proteinen aus *E. coli*, die unter nicht physiologischen Bedingungen durchgeführt wurden. Daher besitzen sie nur eine begrenzte Aussagekraft. Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit *in vivo* Hefe Grx4 Varianten mit einem CP(Y/F)S Motiv im aktiven Zentrum identifiziert, die Eisen mit nahezu Wildtyp-Affinitäten in ihrer natürlichen Umgebung binden können und nahezu voll funktionsfähig sind. Im Gegensatz hierzu beeinträchtigte die Einführung eines zweiten Cysteins ins aktive Zentrum die Eisenbindung von Grx4 nachhaltig. Diese reduzierte Eisenbindung beeinträchtigte ebenfalls die generelle Funktion der cytosolischen Glutaredoxine Grx3-4 bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine *in vivo*, allerdings nur sehr moderat. Diese Beobachtung steht erneut im Gegensatz zu dem, was für die Einzeldomänen Glutaredoxine beschrieben wurde. Das humane Dithiol-Glutaredoxin Grx2 z.B. kann einen Fe/S Cluster in seinem aktivem Zentrum koordinieren (Hoff et al., 2009; Lillig et al., 2005; Rouhier et al., 2007). Kürzlich wurde auch das erste Dithiol-Glutaredoxin mit einem CPYC Motiv im aktiven Zentrum identifiziert, welches einen Eisen-Schwefel-Cluster binden kann. Dieses Protein stellt innerhalb der Dithiol-Glutaredoxine eine klare Ausnahme dar (Ceylan et al., 2010). Die Einführung eines kanonischen Dithiol-CP(Y/F)C Motivs ins aktive Zentrum von Grx4 in *S. cerevisiae* führte zu einer noch stärker ausgeprägten Reduktion der Fe/S Cluster Bindung. Diese Grx4 Varianten waren auch in ihrer Funktionsfähigkeit stark

beeinträchtigt, da die Expression dieser Proteine in Gal-GRX4 Zellen zu einem moderaten Verlust der Aconitase-Aktivität und einer starken Reduktion der Katalase-Aktivität führte. Diese Zellen waren aber immer noch in der Lage, auf Glyzerin-haltigem Minimalmedium unter nicht-fermentativen Bedingungen zu wachsen. Somit hatte die Einführung der modifizierten CP(Y/F)C Motive ins aktive Zentrum von Grx3-4 nicht den vollständigen Funktionsverlust dieser Proteine zur Folge. Offensichtlich können Grx4 Varianten trotz großer struktureller Unterschiede im aktiven Zentrum partiell ihre Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine ausführen. Daher können die Unterschiede im aktiven Zentrum der Glutaredoxindomäne nicht erklären, warum die Funktion der cytosolischen Monothiol-Glutaredoxinen nicht von den cytosolischen Dithiol-Glutaredoxinen übernommen werden kann. Dennoch ist, neben den klaren Unterschieden an die Anforderungen an eine Fe/S Cluster-Bindung von Einzeldomänen und Multidomänen Glutaredoxinen, nur das erste Cystein des CGFS Motivs absolut essenziell für die Fe/S Cluster Bindung und die Funktion dieser Proteine *in vivo* (Belli et al., 2002; Muhlenhoff et al., 2010; Ojeda et al., 2006).

4.2 Die Thioredoxindomäne ist essenziell für die Funktion von Grx3-4

Anscheinend kann das aktive Zentrum von Grx3-4 sehr variabel gehalten werden. Darüber hinaus ist jedoch die Glutaredoxindomäne der Multidomänen Glutaredoxinen alleine nicht funktionell, was im Rahmen dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden konnte. Gal-GRX4 Zellen, die nur diese Domäne von Grx4 exprimierten, zeigten den gleichen Phänotyp wie Grx3-4-depletierte Zellen. Weiterhin war das mitochondriale Grx5 nicht in der Lage, Grx3-4 funktionell zu ersetzten, wenn es im Cytosol lokalisiert war. Deswegen ist eine der Hauptaussagen dieser Arbeit, dass das Vorhandensein der N-terminalen Thioredoxindomäne eine absolut essenzielle Voraussetzung für die *in vivo* Funktion der Multidomänen Glutaredoxine ist. Anscheinend stellt die Fusion der N-terminalen Thioredoxindomäne mit einer C-terminalen Glutaredoxindomäne nicht nur einen strukturellen Unterschied zwischen den Multidomänen Glutaredoxinen und den korrespondierenden Einzeldomänen Glutaredoxinen dar. Die Fusion mit der

Thioredoxindomäne ist vielmehr eine absolut unverzichtbare und entscheidende Voraussetzung für diese Proteine, eine neue, spezialisierte Funktion übernehmen zu können. Überraschenderweise können Multidomänen Glutaredoxine aus anderen Organismen nicht Grx4 in *S. cerevisiae* effizient ersetzten. Einzeldomänen Glutaredoxine hingegen können effizient durch eine große Anzahl von verschiedenen Glutaredoxinen anderer Organismen substituiert werden (Bandyopadhyay et al., 2008b; Molina-Navarro et al., 2006). Diese Spezies-spezifischen Unterschiede sind nicht alleine auf die Thioredoxin- oder Glutaredoxin-Domänen zurück zu führen, und erfordern weitere Komplementationsstudien in *S. cerevisiae*.

Was könnte die molekulare Funktion der Thioredoxindomäne sein? Eine enzymatische Rolle der Thioredoxindomäne kann ausgeschlossen werden, da das konservierte Cystein im aktiven Zentrum sowie das benachbarte, ebenfalls konservierte und für die Funktion von Thioredoxinen erforderliche Tryptophan nicht essenziell für die Funktion von Grx3-4 in *S. cerevisiae* sind. Möglicherweise ist die Thioredoxindomäne für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich, die zum Beispiel bei der Assemblierung von Fe/S Clustern auf cytosolischen Monothiol-Glutaredoxinen eine Rolle spielen. Da Thioredoxine mit einer großen Anzahl an Zielproteinen interagieren, ist das Modell einer Interaktionsdomäne attraktiv (Berndt et al., 2008; Holmgren et al., 2005; Lindahl and Kieselbach, 2009). Eindeutige Interaktionspartner sind aber mit Ausnahme des BolA-artigen Proteins Fra2 und der Eisen-regulierten Transkriptionsfaktoren Aft1 und Aft2 zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht bekannt (Kumanovics et al., 2008; Li et al., 2009; Ojeda et al., 2006; Pujol-Carrion et al., 2006). Ob diese direkt mit der Thioredoxin Domäne interagieren, ist, mit Ausnahme von Aft1 (siehe Kapitel 4.3) bisher nicht untersucht worden.

4.3 Der C Terminus von Grx4 fungiert als die Bindestelle für den Eisen-regulierten Transkriptionsfaktor Aft1

Die physische Interaktion von Grx3-4 und Aft1 war die erste Evidenz für eine Funktion der Multidomänen Glutaredoxine im zellulären Eisenmetabolismus (Ojeda

et al., 2006; Pujol-Carrion et al., 2006). Das Zusammenwirken von Grx3-4 und Aft1 ist ein zentraler Aspekt bei der zellulären Eisenaufnahme in *S. cerevisiae*, da der an Grx3-4-gebundene Fe/S Cluster als Sensor für den zellulären Eisengehalt fungiert und Aft1 so den Eisenstatus registriert (Muhlenhoff et al., 2010). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass die Funktion von Grx3-4 in der Bildung von Eisen-haltigen Proteinen und der Regulation von Aft1 nicht von dem Monothiol-Glutaredoxin Grx5 übernommen werden kann. Dies widerspricht einer anderen Studie, welche mit dem *S. cerevisiae* Grx3 durchgeführt wurde und nahelegt, dass die Thioredoxindomäne nicht für die Regulation des Transkriptionsfaktors Aft1 gebraucht wird (Ojeda et al., 2006). Allerdings wurde bei dieser Arbeit ein anderer *S. cerevisiae* Stamm verwendet, bei dem die Deletion von Grx3-4 nicht letal ist. Weiterhin beinhaltete das verwendete Glutaredoxindomänen-Konstrukt die komplette Linkerregion und einen Teil der Thioredoxindomäne von Grx3.

Darüber hinaus ist die Funktion von Grx3-4 in der Regulation des Transkriptionsfaktors Aft1 sehr sensitiv in Bezug auf Veränderungen im aktiven Zentrum der Glutaredoxindomäne. Schon kleine Abweichungen im CGFS Motiv reichen aus, um diese Funktion zu beeinträchtigen, während diese Grx4 Varianten ihre Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine noch ausüben können. Auffälligerweise ist der Mechanismus mit dem Aft1 den Eisenstatus ermittelt, völlig inkompatibel mit einem Dithiol-Motiv im aktiven Zentrum von Grx3-4. In Gal-GRX4 Zellen mit einer der Dithiol-Grx4 Varianten war der *FET3* Promotor voll aktiviert, obwohl diese Proteine noch in der Lage waren, den Phänotyp von Gal-GRX4 Zellen in Bezug auf die Funktion Eisen-abhängiger Proteine partiell zu komplementieren. Diese Tatsache erklärt, wie Aft1 Monothiol- und Dithiol-Glutaredoxine unterscheidet, die beide im Cytosol von *S. cerevisiae* vorkommen. Da Dithiol-Glutaredoxine in großen Mengen im Cytosol vorliegen, ist diese funktionelle Differenzierung sinnvoll.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Aft1 an den C Terminus von Grx4 bindet. Da der Verlust der Interaktion zu einer konstitutiven Aktivierung der Aft1-abhängigen Transkription führt, ist eine direkte physische Interaktion zwischen Grx3-4 und Aft1 essenziell für die Signalweiterleitung von Grx3-4 an Aft1. Die gleiche

konstitutive Transkription der Gene des Eisenregulons wurde beobachtet, wenn Grx3-4 keinen Fe/S Cluster mehr binden konnten (Muhlenhoff et al., 2010). Da die Interaktion von Aft1 mit Grx3-4 erhöht ist, wenn sich im aktiven Zentrum ein CPYC Motiv befindet und somit kaum Eisen an das Protein gebunden ist, kann daraus geschlossen werden, dass der von Grx3-4 gebundene Fe/S Cluster zwar direkt an der Signalweiterleitung beteiligt ist, aber nicht essenziell für die Bindung zwischen Grx4 und Aft1 ist. Die Interaktion von Grx4 mit Aft1 ist also nicht Eisen-abhängig. Darüber hinaus wird Aft1 von Grx4 im Nukleus inaktiviert. Diese Inaktivierung ist von dem an Grx3-4 gebundenen Fe/S Cluster abhängig, wobei der Mechanismus nicht aufgeklärt ist. Auffälligerweise hat der Verlust der Interaktion zwischen Aft1 und Grx3-4 bis auf die Deregulation von Aft1 keinen Effekt auf Eisen-abhängige Stoffwechselwege. Gal-GRX4 Zellen mit der C-terminale Austauschmutante Grx4-Sp-C-term, die den C-Terminus des *S. pombe* Grx4 enthält, wiesen Wildtyp-Aktivitäten von Eisen-abhängigen Enzymen auf und zeigten keinen Wachstumsdefekt. Folglich ist die generelle Funktion der Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine unabhängig von ihrer Funktion in der Regulation der zellulären Eisenhomöostase. Diese beiden Funktionen können also separiert werden. Anscheinend stellt der C Terminus von Grx4 eine eigenständige Binderegion dar, die C-terminal mit der Glutaredoxindomäne fusioniert und ein wichtiges Element des Aufbaus von Grx4 ist (Abb. 35).

Aft1 ähnliche Transkriptionsfaktoren finden sich in einer kleinen Gruppe von Hefen, die zu den Ascomyceten gehören (Babu et al., 2006). Der extreme C-Terminus der Glutaredoxine ist in allen Hefen, die einen Aft1-artigen Transkriptionsfaktor enthalten, konserviert. Diese Beobachtung ist insofern auffällig, da der C-Terminus von Multidomänen Glutaredoxinen nur sehr schwach in Eukaryoten konserviert ist. Wahrscheinlich ist der C-Terminus der Multidomänen Glutaredoxine eine spezifische Bindestelle für Aft1-artige Transkriptionsfaktoren, die durch ein spezifisches Signaturmotiv erkannt wird.

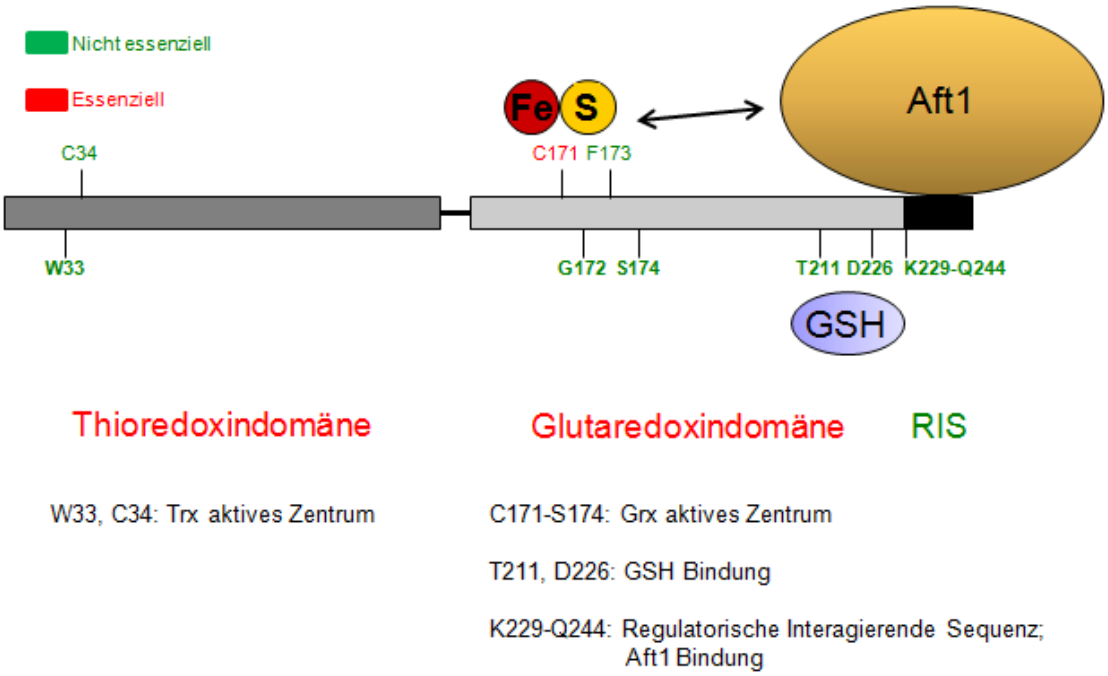

Abbildung 35. Schematische Darstellung des modularen Aufbaus von Grx4 und die Eigenschaften der einzelnen Domänen. Grx4 besteht aus einer N-terminalen Thioredoxindomäne, einer zentralen Glutaredoxindomäne und einer C-terminalen regulatorischen Interaktionsstelle (Regulatorische Interagierende Sequenz (*Regulatory Interaction Site*), RIS). Die Eisen-regulierten Transkriptionsfaktoren Aft1 und interagiert mit dem C Terminus von Grx4. Essenzielle und nicht essenzielle Aminosäurereste der Thioredoxin- und Glutaredoxindomänen sind angegeben.

In *S. pombe* ist eine direkte Interaktion zwischen Grx4 und dem Eisen-reguliertem Transkriptionsfaktor Php4 essenziell für dessen Regulation (Mercier and Labbe, 2009). Aft1 und Php4 sind strukturell nicht miteinander verwandt und die direkten C Termini des *S. pombe* Grx4 und Grx3-4 aus *S. cerevisiae* unterscheiden sich erheblich (Babu et al., 2006; Kaplan and Kaplan, 2009; Labbe et al., 2007; Mercier and Labbe, 2009). Php4 ist funktionell, allerdings nicht strukturell, mit dem eisenregulierten Repressor HapX verwandt, welcher eine zentrale Rolle in der zellulären Eisenhomöostase der meisten Pilzen spielt (Haas et al., 2008; Hortschansky et al., 2007; Labbe et al., 2007). Die Deletion des C Terminus des *S. pombe* Grx4 hatte aber in einem „Yeast-Two-Hybrid“ Experiment keinen Einfluss auf die Interaktion von Grx4 mit Php4 (Simon Labbe, persönliche Mitteilung). Daher bleibt es weiterhin zu klären, welche Rolle der extreme C Terminus der Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine bei der Interaktion mit HapX-artigen Transkriptionsfaktoren in den entsprechenden Pilzen spielt. Es müssten daher weitere Interaktions-Studien in

Modellorganismen wie z.B. *Aspergillus fumigatus* durchgeführt werden, um diese Frage zu klären.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind mit Aft1, seinem Paralog Aft2 und Yap5 drei Eisen-regulierte Transkriptionsfaktoren in *S. cerevisiae* bekannt. Yap5 wird zudem auch durch zellulären Stress reguliert und spielt eine regulatorische Rolle für die vakoläre Eisenspeicherung (Li et al., 2008). Alle drei Transkriptionsfaktoren sind in Grx3-4-depletierten *S. cerevisiae* Zellen konstitutiv aktiviert, was auf eine direkte Regulation durch die Monothiol-Glutaredoxine hindeutet (Ojeda et al., 2006). In der Tat konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Grx4 mit Aft2 direkt interagiert und für dessen Regulation verantwortlich ist. Ob Aft2 auch an den C Terminus von Grx4 bindet, muss aber weiter untersucht werden. Weiterhin ist es nicht bekannt, ob Yap5 auch direkt mit Grx3-4 interagiert, oder ob es als Reaktion auf den Defekt bei der generellen Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine von Grx3-4 depletierten Zellen dereguliert ist. *S. cerevisiae* hat zusätzliche Transkriptionsfaktoren, die nicht direkt auf die intrazelluläre Eisenkonzentration reagieren, sondern durch Metabolite reguliert werden, die von Eisen-abhängigen Enzymen, wie Leu1 oder Lys4, synthetisiert werden (Ihrig et al., 2010). Ihre Deregulation ist eindeutig auf die Defekte bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine von Grx3-4-depletierten Zellen zurückzuführen (Babu et al., 2006; Kaplan and Kaplan, 2009; Labbe et al., 2007; Mercier and Labbe, 2009; Muhlenhoff et al., 2010). Eine direkte Interaktion mit Grx4 ist also unwahrscheinlich.

Eine Reihe von Beobachtungen charakterisiert die Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine als eine eigenständige funktionelle Subgruppe innerhalb der Thioredoxin-Familie. Diese Subgruppe unterscheidet sich eindeutig von den Einzeldomänen Monothiol-Glutaredoxinen, obwohl beide Gruppen Mitglieder beinhalten, die einen Eisen-Schwefel-Cluster binden können. (1) Die Einzeldomänen Glutaredoxine findet man in allen Reichen des Lebens, wo sie eine Funktion bei der Maturierung von zellulären Fe/S Kofaktoren haben. Im Gegensatz dazu findet man Multidomänen Monothiol-Glutaredoxine nur in Eukaryoten. In *S. cerevisiae* spielen sie eine generelle Rolle bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine und der Regulation der zellulären Eisenhomöostase. Die Multidomänen Monothiol-

Glutaredoxine grenzen sich weiterhin von den Einzeldomänen Monothiol-Glutaredoxinen ab, da (2) die Thioredoxindomäne in den Fusionsproteinen essenziell für ihre Funktion ist. Dabei ist Grx4 aus einer N-terminalen Thioredoxin-Domäne, einer zentralen Glutaredoxindomäne und einer C-terminalen Binde-Region, für den Eisen-regulierten Transkriptionsfaktor Aft1, modular aufgebaut (Abb.35). Darüber hinaus unterscheiden sich die Multidomänen Proteine von den Dithiol-Glutaredoxinen, da (3) Dithiol-Grx4 Varianten nicht Aft1 regulieren können. Weiterhin sind die (4) Dithiol-Grx4 Proteine, im Gegensatz zu den Einzeldomänen Proteinen, stark in ihrer Fähigkeit einen Fe/S Cluster binden zu können beeinträchtigt.

4.4 In HeLa Zellen hat die Depletion von Grx3 einen Defekt in der Assemblierung von cytosolischen Fe/S Proteinen zur Folge

Multidomänen Glutaredoxine sind in fast allen Eukaryoten konserviert. Dies lässt auf eine zentrale Funktion dieser Proteine in eukaryotischen Zellen schließen. In *S. cerevisiae* hatte die Depletion von Grx3 und Grx4 (Grx3-4) den Funktionsverlust von Eisen-abhängigen Proteinen aller Kompartimente (inklusive der Mitochondrien) und eine Deregulation der intrazellulären Eisenhomöostase zur Folge. Die Komplementation Grx3-4-depletierter Hefezellen mit den Homologen aus Mensch und Fliege war jedoch nicht erfolgreich. Um die Funktion von Grx3 in Vertebraten besser einzugrenzen, sollte daher untersucht werden, in wie weit der Phänotyp von Grx3-depletierten humanen Zellen mit dem von *S. cerevisiae* übereinstimmt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Funktion von Grx3 in HeLa Zellen deutet auf eine konservierte Rolle von Grx3 bei der Maturierung von Fe/S Proteinen des Cytosols hin, was in Abbildung 36 dargestellt ist. Der Funktionsverlust von Grx3 führte zu reduzierten Mengen der Fe/S Proteine DPYD, GPAT und POLD1. GPAT wird im Cytosol als inaktives Apo-Enzym translatiert. Die Maturierung des aktiven Zentrums ist von der Insertion eines [4Fe-4S] Clusters und der damit verbundenen Abspaltung eines N-terminalen Peptids abhängig (Zhou et al., 1992). Defekte in diesem Prozess führen zum Abbau des Proteins. Die geringen Mengen an GPAT in Grx3 defizienten Zellen zeigen daher direkt einen Fe/S Cluster Einbaudefekt an.

Zusammengefasst deuten diese Daten auf einen generellen Defekt in der Biogenese von cytosolischen Fe/S Proteinen hin, wie er auch in *S. cerevisiae* gefunden wurde.

Darüber hinaus weisen Grx3-depletierte HeLa Zellen eine moderate Deregulation des Eisen-regulatorischen Proteins 1 (IRP1) auf (Haunhorst et al., 2013). IRP1 fungiert als cytosolische Aconitase, wenn es einen Fe/S Cluster gebunden hat und spielt eine Rolle bei der Regulation des Eisenmetabolismus. Wenn IRP1 keinen Fe/S Cluster gebunden hat, bindet es an sogenannte „Iron-Response Elements“ (IRE-Elemente) bestimmter mRNAs. Je nach Position dieser IREs werden die mRNAs hierdurch entweder stabilisiert oder deren Translation wird blockiert. In der Tat war eine erhöhte Bindung von IRP1 an die Ferritin-mRNA in „Enzyme-Mobility-Shift-Assays“ nachweisbar (Haunhorst et al., 2013). Somit lag ein Defekt in der Fe/S Cluster Assemblierung von IRP1 vor. Passend hierzu, waren die Aconitase-Aktivität und die Proteinmenge von IRP1 im Western Blot im Vergleich zu Kontroll-Zellen signifikant reduziert. Da die Bindung von IRP1 an die Ferritin-mRNA deren Translation blockiert, waren auch die Proteinmengen von Ferritin in Grx3-depletierten Zellen erniedrigt (Haunhorst et al., 2013). Dies spricht für einen Eisenmangel im Cytosol, da Ferritin ein Eisenspeicher-Protein ist, das bei einer niedrigen intrazellulären Eisenkonzentration abgebaut wird, um der Zelle Eisen zur Verfügung zu stellen. Weiterhin wurde aufgrund der Deregulation von IRP1 auch die mRNA des Transferrinrezeptor stabilisiert und vermehrt translatiert. Dies deutet ebenfalls auf einen Eisenmangel hin, da über den Transferrinrezeptor an Transferrin gebundenes Eisen in die Zelle aufgenommen wird (Haunhorst et al., 2013). Es wurde aber, wie in Grx3-4-defizienten *S. cerevisiae* Zellen, eine erhöhte intrazelluläre Eisenkonzentration in Grx3-depletierten Zellen nachgewiesen (Haunhorst et al., 2013).

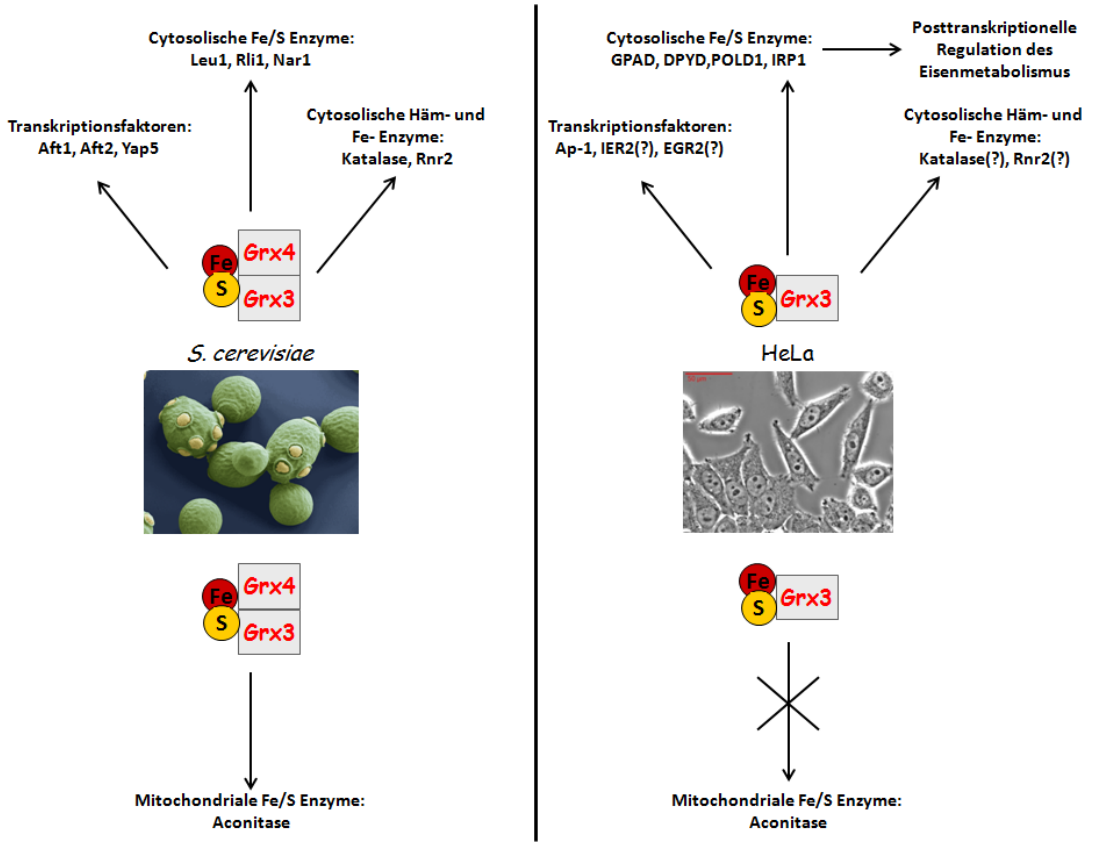

Abbildung 36. Unterschiedliche Rollen der Glutaredoxine Grx3-4 in *S. cerevisiae* und Grx3 in humanen Zellen im Eisenmetabolismus und der Maturierung zellulärer Fe/S Enzyme. Links: Grx3-4 in *S. cerevisiae* haben eine generelle Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-abhängiger Proteine. Dabei haben sie eine wichtige Funktion bei der Maturierung von Fe/S Proteinen des Cytosols (Leu1, Rli1 und Nar1), sowie Eisen- oder Häm-haltigen Proteinen (Rnr2, Katalase). Darüber hinaus werden Grx3-4 ebenfalls für die Assemblierung mitochondrialer Fe/S Enzymen (Aconitase) gebraucht. Weiterhin interagieren Grx3-4 mit den Eisen-regulierten Transkriptionsfaktoren Aft1 und Aft2 und beeinflussen den ebenfalls Eisen- und Stress-regulierten Transkriptionsfaktor Yap5. So regulieren Grx3-4 die intrazelluläre Eisenhomöostase. Rechts: Grx3-depletierte HeLa Zellen zeigen Defekte in der Maturierung von Fe/S Enzymen des Cytosols und des Nukleus (GPAT, DPYD, POLD1). Das humane Grx3 hat weiterhin einen Einfluss auf die zelluläre Eisenhomöostase, indem es wichtig für die Assemblierung eines Fe/S Clusters auf IRP1 ist. Ob die Grx3-Depletion die cytosolischen Fe- oder Häm-haltigen Proteine Rnr2 und Katalase beeinflusst, wurde nicht untersucht. Darüber hinaus wiesen Grx3-depletierte HeLa Zellen eine differentielle Genexpression von Transkriptionsfaktoren (AP1, IER2, EGR2) auf. Ein Effekt der Depletion von Grx3 auf Fe/S Enzyme der Mitochondrien konnte nicht nachgewiesen werden. (Das *S. cerevisiae* Bild ist aus microbiologyonline.org.uk entnommen. Das Bild der HeLa Zellen stammt aus dem Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik, St. Ingbert, Paul Anastasiadis, Eike Weiß.)

Das RNA Profil Grx3-depletierter HeLa Zellen hingegen konnte eine Funktion von Grx3 bei Umwandlung von Eisen in eine bioverfügbare Form und der Versorgung der Mitochondrien mit Eisen, wie es der Phänotyp in *S. cerevisiae* nahelegt, nicht bestätigen. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass die Zellen faktisch unter einem Mangel an bioverfügbaren Eisen leiden müssten. In *S. cerevisiae* wiesen Grx3-4- und Eisen-depletierte Zellen ein sehr ähnliches Transkriptom auf (Ojeda et al., 2006). In HeLa Zellen hingegen unterschied sich das RNA Profil von Grx3-depletierten Zellen deutlich von dem RNA Profil Eisen-depletierter Zellen. Insgesamt konnten nur 24 Gene identifiziert werden, die in beiden RNA Profilen zu finden sind und mindestens 1,5-fach induziert oder reprimiert waren. Ein Eisenmangel hingegen beeinflusst die Expression von etwa 290 Genen um mindestens den Faktor 2. Daher hat die Grx3-Depletion keinen generellen Einfluss auf die Regulation des zellulären Eisenmetabolismus. Würde die Depletion von Grx3 einen Mangel an bioverfügbarem Eisen induzieren, so hätten die am stärksten regulierten Transkripte in Eisen-depletierten Zellen, auch zu den am stärksten regulierten Transkripten in Grx3-depletierten Zellen gehören müssen. Dies war jedoch nicht der Fall. Dieser deutliche Unterschied zu den Hefe-Daten erscheint bei genauerer Betrachtung aber nicht überraschend. Hinsichtlich der Eisenaufnahme und der Regulation der intrazellulären Eisenhomöostase unterscheiden sich *S. cerevisiae* und humane Zellen dramatisch (Hentze et al., 2010; Philpott, 2006). Das Glutaredoxin Grx3 greift in diese Mechanismen in beiden Zelltypen offensichtlich mit unterschiedlichen Mechanismen ein.

Die meisten der 24 Eisen- und Grx3-regulierten Gene waren fast einheitlich stärker durch die Grx3-Depletion reguliert. Somit könnte ein Eisenmangel die Funktion von Grx3 beeinträchtigen, da dieses wahrscheinlich ein Eisen-abhängiges Protein ist. Hingegen hat die Depletion von Grx3 keine Eisenmangel-Antwort zur Folge. Dies muss aber durch weitere Experimente abgeklärt werden, da die verwendeten siRNAs durch unspezifische „off target“ Effekte eine rein zufällige differentiellen Genexpression in Grx3-depletierten Zellen bewirkt haben könnten. Darüber hinaus gab der Vergleich der Transkriptome von Grx3- und Eisen-depletierten Zellen keinerlei Hinweis auf einen faktischen Mangel an bioverfügbarem Eisen in Grx3-depletierten Zellen. In Eisen-depletierten Zellen wurden relativ viele (mindestens

32) Zielgene des Hypoxie Induzierten Faktors 1 (HIF-1) reguliert. HIF-1 reguliert die Expression von Genen, die eine Rolle bei der Anpassung an hypoxische Bedingungen spielen. Die Aktivität von HIF-1 wird durch Eisen-abhängige Prolyl-Hydroxylasen reguliert, die bei einer ausreichenden cytosolischen Eisen- und Sauerstoff-Konzentration HIF-1 inhibieren. Liegt aber eine zu niedrige Eisen-Konzentration vor, so kann Eisen nicht in die entsprechenden Hydroxylasen inseriert und HIF-1 nicht mehr hydroxyliert und abgebaut werden. Dies führt zu der Aktivierung von HIF-1 (Greer et al., 2012). Im Gegensatz dazu konnte in Grx3-depletierten Zellen keine transkriptionelle Regulation durch HIF-1 nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte die Existenz weiterer Metallochaperone sein, die Eisen in die entsprechenden Prolyl-Hydroxylasen inserieren. In der Tat wurde eine Rolle der Eisenchaperone PCBP1 und PCBP2, die Eisen in Ferritin inserieren, auch bei der Regulation von HIF-1 durch die Insertion von Eisen in die Prolyl-Hydroxlasen beschrieben (Nandal et al., 2011; Shi et al., 2008). Allerdings wurden die Transkripte von PCBP1 und PCBP2 weder in Grx3-depletierten, noch in Eisen-depletierten Zellen differentiell reguliert. Eine Regulation dieser Gene unter Eisenmangelbedingungen wäre aber zu erwarten gewesen, wenn sie wirklich die beschriebene Funktion eines Eisenchaperons haben.

Weiterhin hatte die Depletion von Grx3 kaum einen Einfluss auf die Regulation des Eisen-regulatorischen Protein 2 (IRP2), da die Mengen dieses Proteins durch das Fehlen von Grx3 so gut wie nicht beeinflusst waren (Haunhorst et al., 2013). IRP2 wird bei ausreichend verfügbarem Eisen durch die Ubiquitin-E3-Ligase FBXL5 ubiquitinyliert und daraufhin durch das Proteasom abgebaut (Salahudeen et al., 2009; Vashisht et al., 2009). Dabei ist FBXL5 wahrscheinlich ein Eisen-bindendes Protein, das direkt auf die intrazelluläre Eisenkonzentration reagiert (Thompson and Bruick, 2012). Darüber hinaus wurde die Transkription von mehreren Genen Eisen-abhängiger Enzyme in Eisen-depletierten, aber nicht in Grx3-depletierten Zellen reguliert. Dies könnte ebenfalls darauf hindeuten, dass in Grx3-depletierten Zellen kein genereller Mangel an bioverfügbaren Eisen vorliegt. Weiterhin wurden in Eisen-depletierten Zellen Gene des MAP-Kinase-Signaltransduktionswegs reguliert. Abgesehen von der Tatsache, dass es schwierig ist, diesen Genen eine eindeutige Funktion im Metabolismus zuzuordnen und nachzuvollziehen, warum sie von

Eisenmangel angesprochen werden, ist in Grx3-depletierten Zellen keines dieser Gene transkriptionell reguliert. Darüber hinaus hatte die Depletion von Grx3-4 in *S. cerevisiae* einen klaren Effekt auf den mitochondrialen Eisenmetabolismus, der in Grx3 depletierten HeLa Zellen ebenfalls nicht nachweisbar ist. Die Depletion des humanen Grx3 induzierte keine Deregulation von Genen, die eine Funktion bei der mitochondrialen Respiration haben und die Aktivitäten Eisen-abhängiger mitochondrialer Enzyme waren in Grx3-depletierten HeLa Zellen nicht beeinträchtigt. Weder die mitochondrialen Fe/S Enzyme Aconitase und Succinat-Dehydrogenase, die eine Funktion im Citratzyklus und der Respiration haben, noch die Cytochrom-c-Oxidase wiesen in Grx3 depletierten Zellen reduzierte Aktivitäten auf. Alle diese Effekte wären bei der postulierten Funktion von Grx3 bei der Maturierung aller Klassen Eisen-abhängiger Enzyme zu erwarten gewesen und sind *de facto* in Eisen-depletierten Zellen auch nachweisbar. Vielmehr konnte nur ein Phänotyp im Eisenmetabolismus des Cytosols von Grx3-depletierten Zellen nachgewiesen werden, wie es in Abbildung 36 dargestellt ist. Eine weitere Erklärung für den Phänotyp von Grx3-defizienten Zellen, könnte aber auch ein Defekt in der Maturierung von Rnr2 sein. In der Hefe wurde beschrieben, dass die Maturierung von Rnr2 von dem cytosolischen Fe/S Protein Dre2 abhängig ist (Zhang et al., 2011). Da die Depletion des humanen Grx3 einen Defekt in der Assemblierung von cytosolischen Fe/S Proteinen zur Folge hat, könnte die Maturierung von Rnr2 dadurch indirekt beeinflusst sein. Andererseits könnte aber auch kein Eisen in Grx3 abhängiger Weise in Rnr2 inseriert werden. In Grx3-4-depletierten *S. cerevisiae* Zellen folgt der Phänotyp im mitochondrialen Eisenmetabolismus erst zeitlich verzögert auf den cytosolischen Eisen-Phänotyp (Muhlenhoff et al., 2010). Eine mangelnde Depletionseffizienz von Grx3 kann daher nicht ausgeschlossen werden, so dass zu klären bleibt, ob Grx3 eine Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-abhängiger Proteine hat.

Zusammenfassend steht der Phänotyp von Grx3-defizienten HeLa Zellen nur partiell im Einklang mit dem Phänotyp Grx3-4-depletierter *S. cerevisiae* Zellen (Muhlenhoff et al., 2010). In HeLa Zellen haben niedrige Mengen von Grx3 nur einen Einfluss auf den Eisenmetabolismus im Cytosol, wobei zu klären ist, ob neben Fe/S Proteinen noch andere Klassen von Eisen-abhängigen Proteinen betroffen sind, wie es in *S.*

cerevisiae der Fall war. Die Mitochondrien hingegen, sind von diesem Effekt nicht betroffen. Darüber hinaus unterscheidet sich das Transkriptom von Grx3-depletierten HeLa Zellen erheblich von dem Eisen-depletierter Zellen. Im Gegensatz dazu weisen Grx3-4-depletierte *S. cerevisiae* Zellen einen klaren Phänotyp im mitochondrialen Eisenmetabolismus und eine ähnliche differentielle Genexpression wie Eisen-depletierte *S. cerevisiae* Zellen auf (Muhlenhoff et al., 2010; Ojeda et al., 2006).

Auffälligerweise lassen sich die biochemischen Effekte in Grx3-depletierten HeLa Zellen aber eher mit humanen Zellen vergleichen, bei denen ein klassischer CIA Faktor, wie z.B. NBP35, depletiert wurde (Stehling et al., 2008). Diese Zellen weisen eine Deregulation von IRP1 und eine induzierte Expression des Transferrinrezeptors auf. Weiterhin war in diesen Zellen die Mengen von Ferritin ~2-fach reduziert. Darüber hinaus ist in NBP35 depletierten HeLa Zellen die Stabilität von IRP2 nur leicht beeinträchtigt (um ~20% reduziert) und das cytosolische Fe/S Protein GPAT liegt ebenfalls in reduzierten Mengen vor (um ~80% reduziert). Mitochondriale Enzyme, wie Aconitase, Succinat-Dehydrogenase und Cytochrom-c-Oxidase sind hingegen nicht in ihren Aktivitäten beeinträchtigt (Stehling et al., 2008). Weitere Experimente sind notwendig, um zu klären, ob Grx3 in HeLa Zellen eine generelle Funktion bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine hat, oder ein spezialisierter CIA-Faktor ist.

Im Zebrafisch *Danio rerio* scheint die Rolle von Grx3 in der zellulären Eisenhomöostase über eine Funktion in der Maturierung von cytosolischen Fe/S Proteinen hinauszugehen (Haunhorst et al., 2013). Die Depletion von Grx3 durch spezifische Phosphorodiamidate-Morpholino-Oligonukleotide (sogenannte Morpholinos) in Zebrafisch-Embryonen induziert eine Anämie. Dieser Effekt war auf einen Defekt in der Häm-Biosynthese zurückzuführen, da die Apo-Form des Globins in ausreichenden Mengen nachweisbar war. Zusammen mit den leicht erniedrigten Aktivitäten mitochondrialer Fe/S Enzyme deutet dieser Phänotyp von Grx3-depletierten Zebrafisch-Embryonen auf eine zentrale Funktion von Grx3 im Eisenmetabolismus hin (Haunhorst et al., 2013). Dies wiederum entspricht den Ergebnissen aus *S. cerevisiae*.

4.5 Die Depletion von Grx3 beeinflusst die differentielle Genexpression von Transkriptionsfaktoren

Die Microarray-Analysen von Grx3-depletierten HeLa Zellen zeigten nur eine geringe Anzahl von spezifisch auf der Transkriptionsebene regulierten Genen. Dies macht die Identifikation von Stoffwechselwegen, an denen Grx3 beteiligt ist, unmöglich. Auffälligerweise sind im Transkriptom von Grx3-depletierten HeLa Zellen 22 Gene von Transkriptionsfaktoren dereguliert, wobei es allerdings unklar bleibt, ob es sich um spezifische oder indirekte Effekte handelt. Dabei gehörten die Transkripte von Jun, FOS und FOSB zu den am stärksten reprimierten Genen. Diese Daten passen zu der in früheren Arbeiten beschriebenen Rolle von Grx3 bei der Aktivierung der c-Jun-terminalen-Kinase, was die Inhibierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB zur Folge hat (Witte et al., 2000). Dabei ist Jun selbst eines der Proteine, die den Transkriptionsfaktor AP-1 bilden. AP-1 spielt eine Rolle bei der Apoptose und der Proliferation, sowie bei der Tumorgenese und bei dem Wachstum von Blutgefäßen (Angiogenese) (Eferl and Wagner, 2003; Lopez-Bergami et al., 2010; Ozanne et al., 2007; Shaulian and Karin, 2002). Ob es sich dabei aber um eine direkte Interaktion von Grx3 mit AP-1 handelt, muss abschließend geklärt werden, da die Interaktion von Grx3 und Jun nur nach Überexpression beider Proteine beobachtet werden konnte (Witte et al., 2000). Die exakte physiologische Funktion dieser Interaktion bleibt daher unklar.

Die differentielle Expression der Gene von Transkriptionsfaktoren in Grx3-depletierten HeLa Zellen wirft die Frage auf, ob das humane Grx3, ähnlich wie in Grx3-4 in *S. cerevisiae*, direkt mit Transkriptionsfaktoren interagieren kann. Diese Hypothese muss daher durch weitere Koimmunopräzipitations-Studien belegt werden.

4.6 Eisen-abhängige Proteine werden unter Eisen-limitierten Wachstumsbedingungen ubiquitinyliert.

Bisher wurde im Rahmen dieser Arbeit unter anderem die transkriptionelle Regulation der Eisenhomöostase analysiert. Es stellte sich aber die Frage, ob auch

posttranskriptionelle Prozesse an der Adaption an Eisenmangel-Bedingungen beteiligt sind. Möglicherweise werden Eisen-abhängige Proteine aktiv unter Eisenmangel-Bedingungen abgebaut, um Eisen aus nicht-essenziellen Eisen-abhängigen Proteinen für lebenswichtigere Prozesse bereit zu stellen. Andererseits ist es aber auch möglich, dass Proteine ohne Eisen-abhängige Kofaktoren, die eine Rolle in Eisen-abhängigen Stoffwechselwegen haben, ebenfalls aktiv abgebaut werden, da sie nur noch in reduziertem Umfang benötigt werden. Ubi4 und Smt3 spielen bei dem aktiven proteasomalen Abbau von Proteinen eine essenzielle Rolle (Finley et al., 2012; Ulrich, 2009). Ubi4 ist als Ubiquitin bekannt und Smt3 gehört zu der Familie der **S**mall **U**biquitin-like **Mo**difier (SUMO) Proteine. Daher wurde in dieser Arbeit analysiert, ob Ubi4 und Smt3 in *S. cerevisiae* eine direkte Rolle bei der posttranskriptionellen Adaption von Zellen an Eisen-limitierende Wachstumsbedingungen spielen. Zu diesem Zweck wurden alle in Eisen-depletierten Zellen mit Ubi4 oder Smt3 modifizierten Proteine aufgereinigt und durch Western Blots auf die Anwesenheit Eisen-abhängiger Enzyme untersucht.

In der Tat konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass einige Eisen-abhängige Proteine des Nukleus und des Cytosols bei einem induzierten Eisenmangel verstärkt ubiquitinyliert werden. Hingegen konnte eine Modifikation mit Smt3 unter diesen Bedingungen nicht beobachtet werden. Daher kann eine Rolle von Smt3 beim aktiven Abbau von Proteinen unter Eisen-limitierenden Wachstumsbedingungen weitestgehend ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich stellt die Modifikation mit Ubiquitin das Signal für den Abbau über das Proteasom dar. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Fe/S Proteine verstärkt ubiquitinyliert werden, wenn auf ihnen kein Kofaktor mehr assembliert werden konnte, da die Depletion einzelner Komponenten der ISC- und CIA- Maschinerien ebenfalls dazu führte, dass ausgewählte Fe/S Proteine des Cytosols mit Ubiquitin modifiziert wurden. Dies wurde weiterhin durch die Beobachtung untermauert, dass Fe/S Protein Varianten, die den Kofaktor nicht mehr binden konnten, ebenfalls verstärkt ubiquitinyliert wurden. Allerdings war es mit diesem experimentellen System nicht möglich, durch Massenspektrometrie die Gesamtheit aller Proteine zu identifizieren, die bei einem induzierten Eisenmangel mit Ubiquitin oder Smt3 modifiziert wurden. Im hier durchgeführten Experiment erfolgte die Expression von

Ubiquitin oder Smt3 unter der Kontrolle des Kupfer-induzierbaren Promotors *CUP1*. Kupfersulfat ist toxisch und löst in der Zelle offensichtlich die Ubiquitinylierung und SUMOylierung sehr vieler Proteine aus. Daher überlagert die Reaktion der Zelle auf die Behandlung mit Kupfersulfat den Effekt des induzierten Eisenmangels. Folglich müsste ein neues induzierbares Expressionssystem für Ubi4 und Smt3 in *S. cerevisiae* etabliert werden, das eine ähnlich hohe Expressionsrate wie der *CUP1* Promotor ermöglicht, ohne jedoch toxisch zu sein. Die Expression von *UBI4* könnte z.B. unter der Kontrolle des Eisen-regulierten Promotors des *FET3* Gens erfolgen.

4.7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch zellbiologische und biochemische Untersuchungen wichtige strukturelle Voraussetzungen für die Funktion der Multidomänen Glutaredoxine Grx3 und Grx4 bei der Maturierung aller Klassen Eisen-haltiger Proteine und der Regulation der intrazellulären Eisenhomöostase in *S. cerevisiae* aufgezeigt. Darüber hinaus konnte eine konservierte Funktion des humanen Grx3 Homologen hinsichtlich der Assemblierung von cytosolischen Fe/S Proteinen bestätigt werden. Mitochondriale Defekte waren im Gegensatz zur Hefe an humanen Grx3-depletierten Zellen jedoch nicht zu beobachten. Damit zeigten Grx3-defiziente HeLa Zellen einen ähnlichen Phänotyp wie Zellen, bei denen ein klassischer CIA Faktor depletiert wurde. Eine zentrale Aufgabe von weiteren Arbeiten wird es daher sein, die genaue Funktion von Grx3 im Eisenmetabolismus von Vertebraten aufzuklären. Ein Vergleich der Transkriptome von Grx3- und ISC- bzw. CIA-depletierten Zellen könnten helfen, diese Fragestellung zu klären. Für humane Zellen ist bisher nur bekannt, dass die ISC und CIA Maschinerien einen Einfluss auf die Regulation des Eisenmetabolismus über die Assemblierung eines Fe/S Clusters auf IRP1 haben (Sheftel et al., 2010a). Ob diese drei Maschinerien darüber hinaus die transkriptionelle Regulation der Eisenhomöostase beeinflussen, ist nicht bekannt. In *S. cerevisiae* haben nur die ISC und ISC-Export Maschinerien einen Einfluss auf die intrazelluläre Eisenhomöostase. Die CIA Maschinerie hingegen hat keinen Einfluss auf diesen Prozess (Lill, 2009). Eine wichtige Frage ist daher, in wieweit sich das Transkriptom von Grx3-depletierten HeLa Zellen mit dem von ISC- oder CIA-depletierten Zellen vergleichen lässt. Sollte die Depletion von

Komponenten der ISC und CIA Maschinerien einen ähnlichen oder stark unterschiedlichen Einfluss auf die differentielle Genexpression wie die von Grx3 haben, so würde das die Funktion von Grx3 als CIA-Faktor bestätigen oder widerlegen. Aus diesem Grund könnte mittels siRNA-basierten Techniken Komponenten der ISC oder CIA Maschinerie depletiert und mit der Gesamt-RNA dieser Zellen Microarray-Analysen durchgeführt werden.

Grx3-depletierte Zebrafisch-Embryonen zeigen einen Defekt in der Häm-Biosynthese (Haunhorst et al., 2013). Dabei ist es unklar, ob dieser Effekt auf eine generelle Störung bei der Maturierung von Eisen-abhängigen Proteinen zurückzuführen ist, oder ob Grx3 im Zebrafisch eine direkte Funktion in der Häm-Biosynthese hat, die nicht unmittelbar mit dem Eisenmetabolismus assoziiert ist. Da weitere Studien in HeLa Zellen diese Frage nicht zufriedenstellend beantworten werden, könnten zukünftige Experimente mit primären erythropoetischen Zellen oder Makrophagen durchgeführt werden. Es müsste untersucht werden, wie sich die Depletion von Grx3 auf die Erythropoese und den Eisenmetabolismus funktionell in diesen primären Zellen auswirkt. Möglicherweise hat Grx3 in erythropoetischen Zellen auch eine Funktion in der transkriptionellen Regulation des Eisenmetabolismus, oder der Erythropoese. Diese interessante Frage könnte durch Microarray-Analysen der Gesamt-RNA von Grx3-depletierten erythropoetischen Zellen beantwortet werden.

Weiterhin könnte der ausgeprägte Wachstumsdefekt von Grx3-depletierten Zellen auf einen Defekt bei der Maturierung der kleinen Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase (Rnr2) zurückzuführen sein. Eine nicht funktionelle Rnr2 Untereinheit könnte mühelos den essenziellen Charakter von Grx3 erklären. Einerseits könnte durch den Funktionsverlust von Grx3 kein Eisen mehr in Rnr2 inseriert werden. Andererseits könnte aber auch der Defekt in der Assemblierung cytosolischer Fe/S Proteine in Grx3-depletierten Zellen der Grund für eine nicht funktionelle Rnr2 Untereinheit sein (Zhang et al., 2011). Weitere Experimente bezüglich der Maturierung und Funktionalität von Rnr2 könnten diese Fragestellung klären.

In dieser Arbeit wurde eine differentielle Genexpression von Transkriptionsfaktoren in Grx3-depletierten Zellen beobachtet. Da Grx3-4 in *S. cerevisiae* mit den Eisen-regulierten Transkriptionsfaktoren Aft1 und Aft2 interagiert, kann spekuliert

werden, ob das humane Grx3 ebenfalls mit Transkriptionsfaktoren im Nukleus interagiert und deren Aktivität reguliert. Die direkte Interaktion von Grx3 mit Transkriptionsfaktoren könnte durch Koimmunopräzipitationen und Chromatin-Koimmunopräzipitationen nachgewiesen werden. Diese Experimente könnten Hinweise auf mögliche Funktionen der cytosolischen Monothiol-Glutaredoxine jenseits ihrer Funktion im Eisenmetabolismus liefern. In der Zukunft werden daher weitere Studien sicherlich fundamentale Erkenntnisse über die Multidomänen Glutaredoxine und ihre Funktion bei der Maturierung von Fe/S Enzymen und der Regulation der intrazellulären Eisenhomöostase, sowie eventuell bisher umstrittene Prozesse liefern.

5 Literaturverzeichnis

Adam, A.C., Bornhovd, C., Prokisch, H., Neupert, W., and Hell, K. (2006). The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. Embo J *25*, 174-183.
Adinolfi, S., Iannuzzi, C., Prischi, F., Pastore, C., Iametti, S., Martin, S.R., Bonomi, F., and Pastore, A. (2009). Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. Nat Struct Mol Biol *16*, 390-396.
Adlard, P.A., and Bush, A.I. (2006). Metals and Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis *10*, 145-163.
Agar, J.N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B.H., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2000). IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. Biochemistry *39*, 7856-7862.
Alves, R., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., and Herrero, E. (2009). Evolution based on domain combinations: the case of glutaredoxins. BMC evolutionary biology *9*, 66.
Amutha, B., Gordon, D.M., Gu, Y., Lyver, E.R., Dancis, A., and Pain, D. (2008). GTP is required for iron-sulfur cluster biogenesis in mitochondria. J Biol Chem *283*, 1362-1371.
Anderson, C.P., Shen, M., Eisenstein, R.S., and Leibold, E.A. (2012). Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. Biochim Biophys Acta *1823*, 1468-1483.
Andrew, A.J., Dutkiewicz, R., Knieszner, H., Craig, E.A., and Marszalek, J. (2006). Characterization of the interaction between the J-protein Jac1p and the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu1p. J Biol Chem *281*, 14580-14587.
Angers, S., Thorpe, C.J., Biechele, T.L., Goldenberg, S.J., Zheng, N., MacCoss, M.J., and Moon, R.T. (2006). The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt-beta-catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation. Nat Cell Biol *8*, 348-357.
Arlt, A., and Schafer, H. (2011). Role of the immediate early response 3 (IER3) gene in cellular stress response, inflammation and tumorigenesis. Eur J Cell Biol *90*, 545-552.
Babu, M.M., Iyer, L.M., Balaji, S., and Aravind, L. (2006). The natural history of the WRKY-GCM1 zinc fingers and the relationship between transcription factors and transposons. Nucleic Acids Res *34*, 6505-6520.
Bai, S.W., Herrera-Abreu, M.T., Rohn, J.L., Racine, V., Tajadura, V., Suryavanshi, N., Bechtel, S., Wiemann, S., Baum, B., and Ridley, A.J. (2011). Identification and characterization of a set of conserved and new regulators of cytoskeletal organization, cell morphology and migration. BMC Biol *9*, 54.
Balk, J., Aguilar Netz, D.J., Tepper, K., Pierik, A.J., and Lill, R. (2005). The essential WD40 protein Cia1 is involved in a late step of cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly. Mol Cell Biol *25*, 10833-10841.
Balk, J., Pierik, A.J., Netz, D.J., Muhlenhoff, U., and 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., and Pilon, M. (2011). Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. Trends Plant Sci *16*, 218-226.
Bandyopadhyay, S., Chandramouli, K., and Johnson, M.K. (2008a). Iron-sulfur cluster biosynthesis. Biochem Soc Trans *36*, 1112-1119.
Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M.M., Gualberto, J.M., Claxton, R., Naik, S.G., Huynh, B.H., Herrero, E., Jacquot, J.P., Johnson, M.K.*, et al.* (2008b). Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. Embo J *27*, 1122-1133.
Bang, M.L., Mudry, R.E., McElhinny, A.S., Trombitas, K., Geach, A.J., Yamasaki, R., Sorimachi, H., Granzier, H., Gregorio, C.C., and Labeit, S. (2001). Myopalladin, a novel 145-kilodalton

sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. J Cell Biol *153*, 413-427.
Bao, G., Clifton, M., Hoette, T.M., Mori, K., Deng, S.X., Qiu, A., Viltard, M., Williams, D., Paragas, N., Leete, T.*, et al.* (2010). Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex. Nat Chem Biol *6*, 602-609.
Belli, G., Polaina, J., Tamarit, J., De La Torre, M.A., Rodriguez-Manzaneque, M.T., Ros, J., and Herrero, E. (2002). Structure-function analysis of yeast Grx5 monothiol glutaredoxin defines essential amino acids for the function of the protein. J Biol Chem *277*, 37590-37596.
Benita, Y., Kikuchi, H., Smith, A.D., Zhang, M.Q., Chung, D.C., and Xavier, R.J. (2009). An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. Nucleic Acids Res *37*, 4587-4602.
Berggard, T., Linse, S., and James, P. (2007). Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. Proteomics *7*, 2833-2842.
Berndt, C., Hudemann, C., Hanschmann, E.M., Axelsson, R., Holmgren, A., and Lillig, C.H. (2007). How does iron-sulfur cluster coordination regulate the activity of human glutaredoxin 2? Antioxid Redox Signal *9*, 151-157.
Berndt, C., Lillig, C.H., and Holmgren, A. (2008). Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. Biochim Biophys Acta *1783*, 641-650.
Bharath, S., Hsu, M., Kaur, D., Rajagopalan, S., and Andersen, J.K. (2002). Glutathione, iron and Parkinson's disease. Biochem Pharmacol *64*, 1037-1048.
Biederbick, A., Stehling, O., Rosser, R., Niggemeyer, B., Nakai, Y., Elsasser, H.P., and Lill, R. (2006). Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. Mol Cell Biol *26*, 5675-5687.
Bonomi, F., Iametti, S., Morleo, A., Ta, D., and Vickery, L.E. (2008). Studies on the mechanism of catalysis of iron-sulfur cluster transfer from IscU[2Fe2S] by HscA/HscB chaperones. Biochemistry *47*, 12795-12801.
Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem *72*, 248-254.
Brautigam, L., Schutte, L.D., Godoy, J.R., Prozorovski, T., Gellert, M., Hauptmann, G., Holmgren, A., Lillig, C.H., and Berndt, C. (2011). Vertebrate-specific glutaredoxin is essential for brain development. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 20532-20537.
Bridwell-Rabb, J., Iannuzzi, C., Pastore, A., and Barondeau, D.P. (2012). Effector role reversal during evolution: the case of frataxin in Fe-S cluster biosynthesis. Biochemistry *51*, 2506-2514.
Brow, D.A., and Guthrie, C. (1988). Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals. Nature *334*, 213-218.
Brynczka, C., and Merrick, B.A. (2007). Nerve growth factor potentiates p53 DNA binding but inhibits nitric oxide-induced apoptosis in neuronal PC12 cells. Neurochem Res *32*, 1573-1585.
Bushweller, J.H., Aslund, F., Wuthrich, K., and Holmgren, A. (1992). Structural and functional characterization of the mutant Escherichia coli glutaredoxin (C14----S) and its mixed disulfide with glutathione. Biochemistry *31*, 9288-9293.
Bych, K., Kerscher, S., Netz, D.J., Pierik, A.J., Zwicker, K., Huynen, M.A., Lill, R., Brandt, U., and Balk, J. (2008). The iron-sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. Embo J *27*, 1736-1746.
Camaschella, C., Campanella, A., De Falco, L., Boschetto, L., Merlini, R., Silvestri, L., Levi, S., and Iolascon, A. (2007). The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. Blood *110*, 1353-1358.
Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A.*, et al.* (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. Science *271*, 1423-1427.

Canessa, P., and Larrondo, L.F. (2013). Environmental responses and the control of iron homeostasis in fungal systems. Appl Microbiol Biotechnol *97*, 939-955.
Carr, M.W., Roth, S.J., Luther, E., Rose, S.S., and Springer, T.A. (1994). Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 3652-3656.
Castells-Roca, L., Muhlenhoff, U., Lill, R., Herrero, E., and Belli, G. (2011). The oxidative stress response in yeast cells involves changes in the stability of Aft1 regulon mRNAs. Mol Microbiol *81*, 232-248.
Ceylan, S., Seidel, V., Ziebart, N., Berndt, C., Dirdjaja, N., and Krauth-Siegel, R.L. (2010). The dithiol glutaredoxins of african trypanosomes have distinct roles and are closely linked to the unique trypanothione metabolism. J Biol Chem *285*, 35224-35237.
Chamnongpol, S., Dodson, W., Cromie, M.J., Harris, Z.L., and Groisman, E.A. (2002). Fe(III)-mediated cellular toxicity. Mol Microbiol *45*, 711-719.
Chandramouli, K., and Johnson, M.K. (2006). HscA and HscB stimulate [2Fe-2S] cluster transfer from IscU to apoferredoxin in an ATP-dependent reaction. Biochemistry *45*, 11087-11095.
Chepelev, N.L., and Willmore, W.G. (2011). Regulation of iron pathways in response to hypoxia. Free Radic Biol Med *50*, 645-666.
Colwill, K., Feng, L.L., Yeakley, J.M., Gish, G.D., Caceres, J.F., Pawson, T., and Fu, X.D. (1996). SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. J Biol Chem *271*, 24569-24575.
Comini, M.A., Rettig, J., Dirdjaja, N., Hanschmann, E.M., Berndt, C., and Krauth-Siegel, R.L. (2008). Monothiol glutaredoxin-1 is an essential iron-sulfur protein in the mitochondrion of African trypanosomes. J Biol Chem *283*, 27785-27798.
Cossee, M., Durr, A., Schmitt, M., Dahl, N., Trouillas, P., Allinson, P., Kostrzewa, M., Nivelon-Chevallier, A., Gustavson, K.H., Kohlschutter, A.*, et al.* (1999). Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. Ann Neurol *45*, 200-206.
Couturier, J., Jacquot, J.P., and Rouhier, N. (2009a). Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. Cell Mol Life Sci *66*, 2539-2557.
Couturier, J., Koh, C.S., Zaffagnini, M., Winger, A.M., Gualberto, J.M., Corbier, C., Decottignies, P., Jacquot, J.P., Lemaire, S.D., Didierjean, C.*, et al.* (2009b). Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site. J Biol Chem *284*, 9299-9310.
Dagert, M., and Ehrlich, S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. Gene *6*, 23-28.
Daum, G., Bohni, P.C., and Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. J Biol Chem *257*, 13028-13033.
Diekert, K., de Kroon, A.I., Kispal, G., and Lill, R. (2001). Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast Saccharomyces cerevisiae. Methods Cell Biol *65*, 37-51.
Dutkiewicz, R., Schilke, B., Cheng, S., Knieszner, H., Craig, E.A., and 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., Schilke, B., Knieszner, H., Walter, W., Craig, E.A., and 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.
Eferl, R., and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. Nat Rev Cancer *3*, 859-868.
Feng, Y., Zhong, N., Rouhier, N., Hase, T., Kusunoki, M., Jacquot, J.P., Jin, C., and Xia, B. (2006). Structural insight into poplar glutaredoxin C1 with a bridging iron-sulfur cluster at the active site. Biochemistry *45*, 7998-8008.

Fernandes, A.P., and Holmgren, A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. Antioxid Redox Signal *6*, 63-74.
Finley, D., Ulrich, H.D., Sommer, T., and Kaiser, P. (2012). The ubiquitin-proteasome system of Saccharomyces cerevisiae. Genetics *192*, 319-360.
Froschauer, E.M., Schweyen, R.J., and Wiesenberger, G. (2009). The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. Biochim Biophys Acta *1788*, 1044-1050.
Funk, M., Niedenthal, R., Mumberg, D., Brinkmann, K., Ronicke, V., and Henkel, T. (2002). Vector systems for heterologous expression of proteins in Saccharomyces cerevisiae. Methods Enzymol *350*, 248-257.
Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in Saccharomyces cerevisiae. Yeast *13*, 837-848.
Gelling, C., Dawes, I.W., Richhardt, N., Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2008). Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. Mol Cell Biol *28*, 1851-1861.
Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J.*, et al.* (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. Genome Biol *5*, R80.
Geoffroy, M.C., and Hay, R.T. (2009). An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis. Nat Rev Mol Cell Biol *10*, 564-568.
Gerber, J., Muhlenhoff, U., and Lill, R. (2003). An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. EMBO Rep *4*, 906-911.
Gerber, J., Neumann, K., Prohl, C., Muhlenhoff, U., and 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.
Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. Methods Enzymol *350*, 87-96.
Gravina, S.A., and Mieyal, J.J. (1993). Thioltransferase is a specific glutathionyl mixed disulfide oxidoreductase. Biochemistry *32*, 3368-3376.
Greer, S.N., Metcalf, J.L., Wang, Y., and Ohh, M. (2012). The updated biology of hypoxia-inducible factor. Embo J *31*, 2448-2460.
Haas, H. (2012). Iron - A Key Nexus in the Virulence of Aspergillus fumigatus. Front Microbiol *3*, 28.
Haas, H., Eisendle, M., and Turgeon, B.G. (2008). Siderophores in fungal physiology and virulence. Annu Rev Phytopathol *46*, 149-187.
Hanschmann, E.M., Godoy, J.R., Berndt, C., Hudemann, C., and Lillig, C.H. (2013). Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins-Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. Antioxid Redox Signal.
Haunhorst, P., Berndt, C., Eitner, S., Godoy, J.R., and Lillig, C.H. (2010). Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein. Biochem Biophys Res Commun *394*, 372-376.
Haunhorst, P., Hanschmann, E.M., Brautigam, L., Stehling, O., Hoffmann, B., Muhlenhoff, U., Lill, R., Berndt, C., and Lillig, C.H. (2013). Crucial function of vertebrate glutaredoxin 3 (PICOT) in iron homeostasis and hemoglobin maturation. Mol Biol Cell *24*, 1895-1903.
Hausmann, A., Aguilar Netz, D.J., Balk, J., Pierik, A.J., Muhlenhoff, U., and 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., Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2008). Cellular and mitochondrial remodeling upon defects in iron-sulfur protein biogenesis. J Biol Chem *283*, 8318-8330.

Heckman, K.L., and Pease, L.R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. Nat Protoc *2*, 924-932.
Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Galy, B., and Camaschella, C. (2010). Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. Cell *142*, 24-38.
Herrero, E., and de la Torre-Ruiz, M.A. (2007). Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. Cell Mol Life Sci *64*, 1518-1530.
Herrero, E., Ros, J., Belli, G., and Cabiscol, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. Biochim Biophys Acta *1780*, 1217-1235.
Herrero, E., Ros, J., Tamarit, J., and Belli, G. (2006). Glutaredoxins in fungi. Photosynth Res *89*, 127-140.
Heymann, P., Ernst, J.F., and Winkelmann, G. (2000). Identification and substrate specificity of a ferrichrome-type siderophore transporter (Arn1p) in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiol Lett *186*, 221-227.
Hoff, K.G., Culler, S.J., Nguyen, P.Q., McGuire, R.M., Silberg, J.J., and Smolke, C.D. (2009). In vivo fluorescent detection of Fe-S clusters coordinated by human GRX2. Chem Biol *16*, 1299-1308.
Hoff, K.G., Cupp-Vickery, J.R., and Vickery, L.E. (2003). Contributions of the LPPVK motif of the iron-sulfur template protein IscU to interactions with the Hsc66-Hsc20 chaperone system. J Biol Chem *278*, 37582-37589.
Hoff, K.G., Silberg, J.J., and 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., Ta, D.T., Tapley, T.L., Silberg, J.J., and Vickery, L.E. (2002). Hsc66 substrate specificity is directed toward a discrete region of the iron-sulfur cluster template protein IscU. J Biol Chem *277*, 27353-27359.
Hoffmann, B., Uzarska, M.A., Berndt, C., Godoy, J.R., Haunhorst, P., Lillig, C.H., Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2011). The multidomain thioredoxin-monothiol glutaredoxins represent a distinct functional group. Antioxid Redox Signal *15*, 19-30.
Holmgren, A. (1978). Glutathione-dependent enzyme reactions of the phage T4 ribonucleotide reductase system. J Biol Chem *253*, 7424-7430.
Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lonn, M.E., Hudemann, C., and Lillig, C.H. (2005). Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. Biochem Soc Trans *33*, 1375-1377.
Hong, S.K., and Dawid, I.B. (2009). FGF-dependent left-right asymmetry patterning in zebrafish is mediated by Ier2 and Fibp1. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 2230-2235.
Hortschansky, P., Eisendle, M., Al-Abdallah, Q., Schmidt, A.D., Bergmann, S., Thon, M., Kniemeyer, O., Abt, B., Seeber, B., Werner, E.R.*, et al.* (2007). Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex--a novel mechanism of gene regulation by iron. Embo J *26*, 3157-3168.
Ihrig, J., Hausmann, A., Hain, A., Richter, N., Hamza, I., Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2010). Iron regulation through the back door: iron-dependent metabolite levels contribute to transcriptional adaptation to iron deprivation in Saccharomyces cerevisiae. Eukaryot Cell *9*, 460-471.
Isakov, N., Witte, S., and Altman, A. (2000). PICOT-HD: a highly conserved protein domain that is often associated with thioredoxin and glutaredoxin modules. Trends Biochem Sci *25*, 537-539.
Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J Bacteriol *153*, 163-168.
Iwema, T., Picciocchi, A., Traore, D.A., Ferrer, J.L., Chauvat, F., and Jacquamet, L. (2009). Structural basis for delivery of the intact [Fe2S2] cluster by monothiol glutaredoxin. Biochemistry *48*, 6041-6043.

Izquierdo, A., Casas, C., Muhlenhoff, U., Lillig, C.H., and Herrero, E. (2008). Saccharomyces cerevisiae Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. Eukaryot Cell *7*, 1415-1426.
Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E*., et al.* (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. Yeast *21*, 947-962.
Jbel, M., Mercier, A., and Labbe, S. (2011). Grx4 monothiol glutaredoxin is required for iron limitation-dependent inhibition of Fep1. Eukaryot Cell *10*, 629-645.
Jbel, M., Mercier, A., Pelletier, B., Beaudoin, J., and Labbe, S. (2009). Iron activates in vivo DNA binding of Schizosaccharomyces pombe transcription factor Fep1 through its amino-terminal region. Eukaryot Cell *8*, 649-664.
Jeong, D., Cha, H., Kim, E., Kang, M., Yang, D.K., Kim, J.M., Yoon, P.O., Oh, J.G., Bernecker, O.Y., Sakata, S*., et al.* (2006). PICOT inhibits cardiac hypertrophy and enhances ventricular function and cardiomyocyte contractility. Circ Res *99*, 307-314.
Jeong, D., Kim, J.M., Cha, H., Oh, J.G., Park, J., Yun, S.H., Ju, E.S., Jeon, E.S., Hajjar, R.J., and Park, W.J. (2008). PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin-NFAT signaling. Circ Res *102*, 711-719.
Jin, L., Pahuja, K.B., Wickliffe, K.E., Gorur, A., Baumgartel, C., Schekman, R., and Rape, M. (2012). Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function. Nature *482*, 495-500.
Johansson, C., Lillig, C.H., and Holmgren, A. (2004). Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase. J Biol Chem *279*, 7537-7543.
Johansson, C., Roos, A.K., Montano, S.J., Sengupta, R., Filippakopoulos, P., Guo, K., von Delft, F., Holmgren, A., Oppermann, U., and Kavanagh, K.L. (2011). The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity. Biochem J *433*, 303-311.
Kaplan, C.D., and Kaplan, J. (2009). Iron acquisition and transcriptional regulation. Chem Rev *109*, 4536-4552.
Kim, K.D., Kim, H.J., Lee, K.C., and Roe, J.H. (2011). Multi-domain CGFS-type glutaredoxin Grx4 regulates iron homeostasis via direct interaction with a repressor Fep1 in fission yeast. Biochem Biophys Res Commun *408*, 609-614.
Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., and Lill, R. (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. Embo J *18*, 3981-3989.
Kispal, G., Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Bedekovics, T., Janaky, T., Bassler, J., Aguilar Netz, D.J., Balk, J., Rotte, C*., et al.* (2005). Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. Embo J *24*, 589-598.
Kosman, D.J. (2003). Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. Mol Microbiol *47*, 1185-1197.
Kumanovics, A., Chen, O.S., Li, L., Bagley, D., Adkins, E.M., Lin, H., Dingra, N.N., Outten, C.E., Keller, G., Winge, D*., et al.* (2008). Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. J Biol Chem *283*, 10276-10286.
Labbe, S., Pelletier, B., and Mercier, A. (2007). Iron homeostasis in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Biometals *20*, 523-537.
Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Muhlenhoff, U., Kispal, G., and 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.
Lee, D.W., Kaur, D., Chinta, S.J., Rajagopalan, S., and Andersen, J.K. (2009). A disruption in iron-sulfur center biogenesis via inhibition of mitochondrial dithiol glutaredoxin 2 may contribute to mitochondrial and cellular iron dysregulation in mammalian glutathione-

depleted dopaminergic cells: implications for Parkinson's disease. Antioxid Redox Signal *11*, 2083-2094.
Li, H., Mapolelo, D.T., Dingra, N.N., Keller, G., Riggs-Gelasco, P.J., Winge, D.R., Johnson, M.K., and Outten, C.E. (2011a). Histidine 103 in Fra2 is an iron-sulfur cluster ligand in the [2Fe-2S] Fra2-Grx3 complex and is required for in vivo iron signaling in yeast. J Biol Chem *286*, 867-876.
Li, H., Mapolelo, D.T., Dingra, N.N., Naik, S.G., Lees, N.S., Hoffman, B.M., Riggs-Gelasco, P.J., Huynh, B.H., Johnson, M.K., and Outten, C.E. (2009). The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation. Biochemistry *48*, 9569-9581.
Li, H., Mapolelo, D.T., Randeniya, S., Johnson, M.K., and Outten, C.E. (2012a). Human glutaredoxin 3 forms [2Fe-2S]-bridged complexes with human BolA2. Biochemistry *51*, 1687-1696.
Li, H., and Outten, C.E. (2012). Monothiol CGFS glutaredoxins and BolA-like proteins: [2Fe-2S] binding partners in iron homeostasis. Biochemistry *51*, 4377-4389.
Li, L., Bagley, D., Ward, D.M., and Kaplan, J. (2008). Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast. Mol Cell Biol *28*, 1326-1337.
Li, L., Jia, X., Ward, D.M., and Kaplan, J. (2011b). Yap5 protein-regulated transcription of the TYW1 gene protects yeast from high iron toxicity. J Biol Chem *286*, 38488-38497.
Li, L., Miao, R., Bertram, S., Jia, X., Ward, D.M., and Kaplan, J. (2012b). A Role for Iron-Sulfur Clusters in the Regulation of Transcription Factor Yap5-dependent High Iron Transcriptional Responses in Yeast. J Biol Chem *287*, 35709-35721.
Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. Nature *460*, 831-838.
Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A.J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M.A., Webert, H., Wilbrecht, C., and Muhlenhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. Biochim Biophys Acta *1823*, 1491-1508.
Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. Annu Rev Biochem *77*, 669-700.
Lillig, C.H., Berndt, C., and Holmgren, A. (2008). Glutaredoxin systems. Biochim Biophys Acta *1780*, 1304-1317.
Lillig, C.H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lonn, M.E., Hudemann, C., Bill, E., and Holmgren, A. (2005). Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 8168-8173.
Lindahl, M., and Kieselbach, T. (2009). Disulphide proteomes and interactions with thioredoxin on the track towards understanding redox regulation in chloroplasts and cyanobacteria. J Proteomics *72*, 416-438.
Lopez-Bergami, P., Lau, E., and Ronai, Z. (2010). Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. Nat Rev Cancer *10*, 65-76.
Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I.W., and Grant, C.M. (1998). The yeast Saccharomyces cerevisiae contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. Mol Biol Cell *9*, 1081-1091.
Lundstrom-Ljung, J., and Holmgren, A. (1995). Glutaredoxin accelerates glutathione-dependent folding of reduced ribonuclease A together with protein disulfide-isomerase. J Biol Chem *270*, 7822-7828.
Ma, K., and Wang, K. (2002). Interaction of nebulin SH3 domain with titin PEVK and myopalladin: implications for the signaling and assembly role of titin and nebulin. FEBS Lett *532*, 273-278.
Magaki, S., Raghavan, R., Mueller, C., Oberg, K.C., Vinters, H.V., and Kirsch, W.M. (2007). Iron, copper, and iron regulatory protein 2 in Alzheimer's disease and related dementias. Neurosci Lett *418*, 72-76.

Mercier, A., and Labbe, S. (2009). Both Php4 function and subcellular localization are regulated by iron via a multistep mechanism involving the glutaredoxin Grx4 and the exportin Crm1. J Biol Chem *284*, 20249-20262.
Mesecke, N., Mittler, S., Eckers, E., Herrmann, J.M., and Deponte, M. (2008). Two novel monothiol glutaredoxins from Saccharomyces cerevisiae provide further insight into iron-sulfur cluster binding, oligomerization, and enzymatic activity of glutaredoxins. Biochemistry *47*, 1452-1463.
Mieyal, J.J., Gallogly, M.M., Qanungo, S., Sabens, E.A., and Shelton, M.D. (2008). Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. Antioxid Redox Signal *10*, 1941-1988.
Molik, S., Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2007). Methods for studying iron metabolism in yeast mitochondria. Methods Cell Biol *80*, 261-280.
Molina-Navarro, M.M., Casas, C., Piedrafita, L., Belli, G., and Herrero, E. (2006). Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe/S clusters in yeast mitochondria. FEBS Lett *580*, 2273-2280.
Molina, M.M., Belli, G., de la Torre, M.A., Rodriguez-Manzaneque, M.T., and Herrero, E. (2004). Nuclear monothiol glutaredoxins of Saccharomyces cerevisiae can function as mitochondrial glutaredoxins. J Biol Chem *279*, 51923-51930.
Morano, K.A., Grant, C.M., and Moye-Rowley, W.S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in Saccharomyces cerevisiae. Genetics *190*, 1157-1195.
Mortimer, R.K., and Johnston, J.R. (1986). Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. Genetics *113*, 35-43.
Muhlenhoff, U., Balk, J., Richhardt, N., Kaiser, J.T., Sipos, K., Kispal, G., and Lill, R. (2004). Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem *279*, 36906-36915.
Muhlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., and Lill, R. (2003a). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. Embo J *22*, 4815-4825.
Muhlenhoff, U., Gerl, M.J., Flauger, B., Pirner, H.M., Balser, S., Richhardt, N., Lill, R., and Stolz, J. (2007). The ISC [corrected] proteins Isa1 and Isa2 are required for the function but not for the de novo synthesis of the Fe/S clusters of biotin synthase in Saccharomyces cerevisiae. Eukaryot Cell *6*, 495-504.
Muhlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J.R., Uzarska, M.A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E.*, et al.* (2010). Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. Cell Metab *12*, 373-385.
Muhlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A.J., and Lill, R. (2011). Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. J Biol Chem *286*, 41205-41216.
Muhlenhoff, U., Stadler, J.A., Richhardt, N., Seubert, A., Eickhorst, T., Schweyen, R.J., Lill, R., and Wiesenberger, G. (2003b). A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions. J Biol Chem *278*, 40612-40620.
Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol *155*, 335-350.
Murphy, M.P. (2012). Modulating mitochondrial intracellular location as a redox signal. Sci Signal *5*, pe39.
Nandal, A., Ruiz, J.C., Subramanian, P., Ghimire-Rijal, S., Sinnamon, R.A., Stemmler, T.L., Bruick, R.K., and Philpott, C.C. (2011). Activation of the HIF prolyl hydroxylase by the iron chaperones PCBP1 and PCBP2. Cell Metab *14*, 647-657.
Navarro-Sastre, A., Tort, F., Stehling, O., Uzarska, M.A., Arranz, J.A., Del Toro, M., Labayru, M.T., Landa, J., Font, A., Garcia-Villoria, J.*, et al.* (2011). A fatal mitochondrial disease is

associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. Am J Hum Genet *89*, 656-667.
Neeb, A., Wallbaum, S., Novac, N., Dukovic-Schulze, S., Scholl, I., Schreiber, C., Schlag, P., Moll, J., Stein, U., and Sleeman, J.P. (2012). The immediate early gene Ier2 promotes tumor cell motility and metastasis, and predicts poor survival of colorectal cancer patients. Oncogene *31*, 3796-3806.
Nemeth, E., and Ganz, T. (2006). Regulation of iron metabolism by hepcidin. Annu Rev Nutr *26*, 323-342.
Netz, D.J., Pierik, A.J., Stumpfig, M., Bill, E., Sharma, A.K., Pallesen, L.J., Walden, W.E., and Lill, R. (2012a). A bridging [4Fe-4S] cluster and nucleotide binding are essential for function of the Cfd1-Nbp35 complex as a scaffold in iron-sulfur protein maturation. J Biol Chem *287*, 12365-12378.
Netz, D.J., Pierik, A.J., Stumpfig, M., Muhlenhoff, U., and Lill, R. (2007). The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. Nat Chem Biol *3*, 278-286.
Netz, D.J., Stith, C.M., Stumpfig, M., Kopf, G., Vogel, D., Genau, H.M., Stodola, J.L., Lill, R., Burgers, P.M., and Pierik, A.J. (2012b). Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. Nat Chem Biol *8*, 125-132.
Netz, D.J., Stumpfig, M., Dore, C., Muhlenhoff, U., Pierik, A.J., and Lill, R. (2010). Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. Nat Chem Biol *6*, 758-765.
O'Donovan, K.J., Tourtellotte, W.G., Millbrandt, J., and Baraban, J.M. (1999). The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. Trends Neurosci *22*, 167-173.
Ojeda, L., Keller, G., Muhlenhoff, U., Rutherford, J.C., Lill, R., and Winge, D.R. (2006). Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem *281*, 17661-17669.
Olson, J.W., Agar, J.N., Johnson, M.K., and Maier, R.J. (2000). Characterization of the NifU and NifS Fe-S cluster formation proteins essential for viability in Helicobacter pylori. Biochemistry *39*, 16213-16219.
Ozanne, B.W., Spence, H.J., McGarry, L.C., and Hennigan, R.F. (2007). Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals. Oncogene *26*, 1-10.
Pantopoulos, K. (2004). Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. Ann N Y Acad Sci *1012*, 1-13.
Peggion, C., Lopreiato, R., Casanova, E., Ruzzene, M., Facchin, S., Pinna, L.A., Carignani, G., and Sartori, G. (2008). Phosphorylation of the Saccharomyces cerevisiae Grx4p glutaredoxin by the Bud32p kinase unveils a novel signaling pathway involving Sch9p, a yeast member of the Akt / PKB subfamily. Febs J *275*, 5919-5933.
Philpott, C.C. (2006). Iron uptake in fungi: a system for every source. Biochim Biophys Acta *1763*, 636-645.
Philpott, C.C., Leidgens, S., and Frey, A.G. (2012). Metabolic remodeling in iron-deficient fungi. Biochim Biophys Acta *1823*, 1509-1520.
Philpott, C.C., and Protchenko, O. (2008). Response to iron deprivation in Saccharomyces cerevisiae. Eukaryot Cell *7*, 20-27.
Philpott, C.C., Rashford, J., Yamaguchi-Iwai, Y., Rouault, T.A., Dancis, A., and Klausner, R.D. (1998). Cell-cycle arrest and inhibition of G1 cyclin translation by iron in AFT1-1(up) yeast. Embo J *17*, 5026-5036.
Picciocchi, A., Saguez, C., Boussac, A., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2007). CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium Synechocystis PCC6803 and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster. Biochemistry *46*, 15018-15026.

Pimentel, C., Vicente, C., Menezes, R.A., Caetano, S., Carreto, L., and Rodrigues-Pousada, C. (2012). The role of the Yap5 transcription factor in remodeling gene expression in response to Fe bioavailability. PLoS One *7*, e37434.
Pujol-Carrion, N., Belli, G., Herrero, E., Nogues, A., and de la Torre-Ruiz, M.A. (2006). Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in Saccharomyces cerevisiae. J Cell Sci *119*, 4554-4564.
Rodriguez-Manzaneque, M.T., Ros, J., Cabiscol, E., Sorribas, A., and Herrero, E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol *19*, 8180-8190.
Rondou, P., Haegeman, G., Vanhoenacker, P., and Van Craenenbroeck, K. (2008). BTB Protein KLHL12 targets the dopamine D4 receptor for ubiquitination by a Cul3-based E3 ligase. J Biol Chem *283*, 11083-11096.
Rouault, T.A. (2006). The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. Nat Chem Biol *2*, 406-414.
Rouault, T.A., and Tong, W.H. (2005). Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol *6*, 345-351.
Rouhier, N. (2010). Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly. New Phytol *186*, 365-372.
Rouhier, N., Couturier, J., and Jacquot, J.P. (2006). Genome-wide analysis of plant glutaredoxin systems. J Exp Bot *57*, 1685-1696.
Rouhier, N., Couturier, J., Johnson, M.K., and Jacquot, J.P. (2010). Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. Trends Biochem Sci *35*, 43-52.
Rouhier, N., Unno, H., Bandyopadhyay, S., Masip, L., Kim, S.K., Hirasawa, M., Gualberto, J.M., Lattard, V., Kusunoki, M., Knaff, D.B.*, et al.* (2007). Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 7379-7384.
Rutherford, J.C., and Bird, A.J. (2004). Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. Eukaryot Cell *3*, 1-13.
Rutherford, J.C., Ojeda, L., Balk, J., Muhlenhoff, U., Lill, R., and 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.
Salahudeen, A.A., Thompson, J.W., Ruiz, J.C., Ma, H.W., Kinch, L.N., Li, Q., Grishin, N.V., and Bruick, R.K. (2009). An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis. Science *326*, 722-726.
Sambrook, J., and DW, R. (2001). Molecular Cloning - A laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Schnackerz, K.D., Dobritzsch, D., Lindqvist, Y., and Cook, P.F. (2004). Dihydropyrimidine dehydrogenase: a flavoprotein with four iron-sulfur clusters. Biochim Biophys Acta *1701*, 61-74.
Shakamuri, P., Zhang, B., and Johnson, M.K. (2012). Monothiol glutaredoxins function in storing and transporting [Fe2S2] clusters assembled on IscU scaffold proteins. J Am Chem Soc *134*, 15213-15216.
Shaulian, E., and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. Nat Cell Biol *4*, E131-136.
Sheftel, A., Stehling, O., and Lill, R. (2010a). Iron-sulfur proteins in health and disease. Trends Endocrinol Metab *21*, 302-314.
Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Elsasser, H.P., Muhlenhoff, U., Webert, H., Hobler, A., Hannemann, F., Bernhardt, R., and Lill, R. (2010b). Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 11775-11780.

Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Netz, D.J., Kerscher, S., Elsasser, H.P., Wittig, I., Balk, J., Brandt, U., and Lill, R. (2009). Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. Mol Cell Biol *29*, 6059-6073.
Sheftel, A.D., Wilbrecht, C., Stehling, O., Niggemeyer, B., Elsasser, H.P., Muhlenhoff, U., and Lill, R. (2012). The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. Mol Biol Cell *23*, 1157-1166.
Shelton, M.D., Chock, P.B., and Mieyal, J.J. (2005). Glutaredoxin: role in reversible protein s-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. Antioxid Redox Signal *7*, 348-366.
Shi, H., Bencze, K.Z., Stemmler, T.L., and Philpott, C.C. (2008). A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. Science *320*, 1207-1210.
Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Ullmann, P., Lill, R., and Kispal, G. (2002). Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. J Biol Chem *277*, 26944-26949.
Srinivasan, U., Mieyal, P.A., and Mieyal, J.J. (1997). pH profiles indicative of rate-limiting nucleophilic displacement in thioltransferase catalysis. Biochemistry *36*, 3199-3206.
Stehling, O., Netz, D.J., Niggemeyer, B., Rosser, R., Eisenstein, R.S., Puccio, H., Pierik, A.J., and Lill, R. (2008). Human Nbp35 is essential for both cytosolic iron-sulfur protein assembly and iron homeostasis. Mol Cell Biol *28*, 5517-5528.
Stehling, O., Smith, P.M., Biederbick, A., Balk, J., Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2007). Investigation of iron-sulfur protein maturation in eukaryotes. Methods Mol Biol *372*, 325-342.
Stehling, O., Vashisht, A.A., Mascarenhas, J., Jonsson, Z.O., Sharma, T., Netz, D.J., Pierik, A.J., Wohlschlegel, J.A., and Lill, R. (2012). MMS19 assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity. Science *337*, 195-199.
Stemmler, T.L., Lesuisse, E., Pain, D., and Dancis, A. (2010). Frataxin and mitochondrial FeS cluster biogenesis. J Biol Chem *285*, 26737-26743.
Su, D., Berndt, C., Fomenko, D.E., Holmgren, A., and Gladyshev, V.N. (2007). A conserved cis-proline precludes metal binding by the active site thiolates in members of the thioredoxin family of proteins. Biochemistry *46*, 6903-6910.
Sun, Q.A., Kirnarsky, L., Sherman, S., and Gladyshev, V.N. (2001). Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 3673-3678.
Sutak, R., Lesuisse, E., Tachezy, J., and Richardson, D.R. (2008). Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. Trends Microbiol *16*, 261-268.
Talmadge, C.B., Finkernagel, S., Sumegi, J., Sciorra, L., and Rabinow, L. (1998). Chromosomal mapping of three human LAMMER protein-kinase-encoding genes. Hum Genet *103*, 523-524.
Tamarit, J., Belli, G., Cabiscol, E., Herrero, E., and Ros, J. (2003). Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. J Biol Chem *278*, 25745-25751.
Thompson, J.W., and Bruick, R.K. (2012). Protein degradation and iron homeostasis. Biochim Biophys Acta *1823*, 1484-1490.
Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A *76*, 4350-4354.
Tsai, C.L., and Barondeau, D.P. (2010). Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. Biochemistry *49*, 9132-9139.
Ueta, R., Fujiwara, N., Iwai, K., and Yamaguchi-Iwai, Y. (2012). Iron-induced dissociation of the Aft1p transcriptional regulator from target gene promoters is an initial event in iron-dependent gene suppression. Mol Cell Biol *32*, 4998-5008.
Ulrich, H.D. (2009). The SUMO system: an overview. Methods Mol Biol *497*, 3-16.
Ulrich, H.D., and Davies, A.A. (2009). In vivo detection and characterization of sumoylation targets in Saccharomyces cerevisiae. Methods Mol Biol *497*, 81-103.

Umehara, H., Nishii, Y., Morishima, M., Kakehi, Y., Kioka, N., Amachi, T., Koizumi, J., Hagiwara, M., and Ueda, K. (2003). Effect of cisplatin treatment on speckled distribution of a serine/arginine-rich nuclear protein CROP/Luc7A. Biochem Biophys Res Commun *301*, 324-329.
Urzica, E., Pierik, A.J., Muhlenhoff, U., and Lill, R. (2009). Crucial role of conserved cysteine residues in the assembly of two iron-sulfur clusters on the CIA protein Nar1. Biochemistry *48*, 4946-4958.
Uzarska, M.A., Dutkiewicz, R., Freibert, S.A., Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2013). The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. Mol Biol Cell.
Vachon, P., Mercier, A., Jbel, M., and Labbe, S. (2012). The monothiol glutaredoxin Grx4 exerts an iron-dependent inhibitory effect on Php4 function. Eukaryot Cell *11*, 806-819.
Vashisht, A.A., Zumbrennen, K.B., Huang, X., Powers, D.N., Durazo, A., Sun, D., Bhaskaran, N., Persson, A., Uhlen, M., Sangfelt, O*., et al.* (2009). Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. Science *326*, 718-721.
Vlamis-Gardikas, A. (2008). The multiple functions of the thiol-based electron flow pathways of Escherichia coli: Eternal concepts revisited. Biochim Biophys Acta *1780*, 1170-1200.
Vlamis-Gardikas, A., and Holmgren, A. (2002). Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. Methods Enzymol *347*, 286-296.
Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc Natl Acad Sci U S A *76*, 615-619.
Weinreich, M.A., and Hogquist, K.A. (2008). Thymic emigration: when and how T cells leave home. J Immunol *181*, 2265-2270.
Wiedemann, N., Urzica, E., Guiard, B., Muller, H., Lohaus, C., Meyer, H.E., Ryan, M.T., Meisinger, C., Muhlenhoff, U., Lill, R*., et al.* (2006). Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. Embo J *25*, 184-195.
Wingert, R.A., Galloway, J.L., Barut, B., Foott, H., Fraenkel, P., Axe, J.L., Weber, G.J., Dooley, K., Davidson, A.J., Schmid, B*., et al.* (2005). Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. Nature *436*, 1035-1039.
Witte, S., Villalba, M., Bi, K., Liu, Y., Isakov, N., and Altman, A. (2000). Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF-kappaB pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain. J Biol Chem *275*, 1902-1909.
Xu, X.M., and Moller, S.G. (2011). Iron-sulfur clusters: biogenesis, molecular mechanisms, and their functional significance. Antioxid Redox Signal *15*, 271-307.
Yamaguchi-Iwai, Y., Ueta, R., Fukunaka, A., and Sasaki, R. (2002). Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem *277*, 18914-18918.
Yang, Y., Jao, S., Nanduri, S., Starke, D.W., Mieyal, J.J., and Qin, J. (1998). Reactivity of the human thioltransferase (glutaredoxin) C7S, C25S, C78S, C82S mutant and NMR solution structure of its glutathionyl mixed disulfide intermediate reflect catalytic specificity. Biochemistry *37*, 17145-17156.
Yang, Y.F., and Wells, W.W. (1991). Catalytic mechanism of thioltransferase. J Biol Chem *266*, 12766-12771.
Ye, H., Jeong, S.Y., Ghosh, M.C., Kovtunovych, G., Silvestri, L., Ortillo, D., Uchida, N., Tisdale, J., Camaschella, C., and Rouault, T.A. (2010). Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. J Clin Invest *120*, 1749-1761.
Ye, H., and Rouault, T.A. (2010). Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. Biochemistry *49*, 4945-4956.
Yoon, T., and Cowan, J.A. (2003). Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. J Am Chem Soc *125*, 6078-6084.

Yun, C.W., Tiedeman, J.S., Moore, R.E., and Philpott, C.C. (2000). Siderophore-iron uptake in saccharomyces cerevisiae. Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. J Biol Chem *275*, 16354-16359.
Yuvaniyama, P., Agar, J.N., Cash, V.L., Johnson, M.K., and Dean, D.R. (2000). NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 599-604.
Zhang, S.X., Garcia-Gras, E., Wycuff, D.R., Marriot, S.J., Kadeer, N., Yu, W., Olson, E.N., Garry, D.J., Parmacek, M.S., and Schwartz, R.J. (2005). Identification of direct serum-response factor gene targets during Me2SO-induced P19 cardiac cell differentiation. J Biol Chem *280*, 19115-19126.
Zhang, Y., Liu, L., Wu, X., An, X., Stubbe, J., and Huang, M. (2011). Investigation of in vivo diferric tyrosyl radical formation in Saccharomyces cerevisiae Rnr2 protein: requirement of Rnr4 and contribution of Grx3/4 AND Dre2 proteins. J Biol Chem *286*, 41499-41509.
Zheng, L., Baumann, U., and Reymond, J.L. (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. Nucleic Acids Res *32*, e115.
Zhou, G., Broyles, S.S., Dixon, J.E., and Zalkin, H. (1992). Avian glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase propeptide processing and activity are dependent upon essential cysteine residues. J Biol Chem *267*, 7936-7942.

6 Anhang

6.1 Lebenslauf

Seite 164 (Lebenslauf) enthält personliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veroffentlichung.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

Aft1	*Activator of ferric transcription*
Amp	Ampicillin
AP-1	*Activator Protein* 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
a.U.	willkürliche Einheit (*arbitrary unit*)
BSA	Rinderserumalbumin
CIA	*cyotosolic iron sulfur cluster assembly*
C Terminus	Carboxyterminus
DFO	Deferoxamin
dH_2O	einfach destilliertes Wasser
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
D. melanogaster	*Drosophila Melanogaster*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DO	*Drop out mix*
DDM	Dodecyl-ß-D-Maltosid
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Fötales Kälberserum
Fe/S	Eisen-Schwefel
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
Gal	Galaktose
Glu	Glukose
Gly	Glycerol
Grx	Glutaredoxin
GSH	Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HA	Hämagglutinin
His	Histidinyl
HRP	*Horseradish Peroxidase*
H. sapiens	*Homo sapiens*
ISC	*iron sulfur cluster assembly*
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertan
min	Minuten
mM	millimolar (millimol/L)
M	molar (mol/L)
mRNA	Boten RNA
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
Ni	Nickel

NTA	Nitrilotriacetat
N Terminus	Aminoterminus
ORF	*open reading frame*
OD_x	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMS	Post-mitochondrialer Überstand
PMSF	Phenylmethylensulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)
RT	Raumtemperatur
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	*small interfering RNA*
SRF	*Serum Responsive Factor*
SOD	Superoxid-Dismutase
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trx	Thioredoxin
U	Unit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Wt	Wildtyp

6.3 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden oder werden in folgenden Artikeln publiziert:

Hoffmann, B. Uzarska, MA. Berndt, C. Godoy, JR. Haunhorst, P. Lillig, CH. Lill, R. Mühlenhoff, U. (2011). The multidomain thioredoxin-monothiol glutaredoxins represent a distinct functional group. Antioxid Redox Signal *15, 19-30*.

Lill, R. Hoffmann, B. Molik, S. Pierik, AJ. Rietzschel, N. Stehling, O. Uzarska, MA. Webert, H. Wilbrecht, C. Mühlenhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. Biochim Biophys Acta *1823, 1491-508*.

Haunhorst, P. Hanschmann, EM. Bräutigam, L. Stehling, O. Hoffmann, B. Mühlenhoff, U. Lill, R. Berndt, C. Lillig, CH. (2013). Crucial function of vertebrate glutaredoxin 3

(PICOT) in iron homeostasis and hemoglobin maturation. Mol Biol Cell 24, *1895-1903*.

Mühlenhoff, U. Richter, N. Hoffmann, B. Christ, S. Belli, G. Lill, R. (2013) Auto-amplification of the transcription factor Aft1 is essential for iron uptake regulation in *S. cerevisiae*. Manuskript in Vorbereitung.

Tagungsbeitrage:

Hoffmann, B. Uzarska, MA. Berndt, C. Godoy, JR. Haunhorst, P. Lillig, CH. Lill, R. Mühlenhoff, U. Structure/function analysis of the multidomain monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae*. 6th International Conference „Biogenesis of iron-sulfur proteins and regulatory functions“ 2011, Cambridge.

Hoffmann, B. Uzarska, MA. Berndt, C. Godoy, JR. Haunhorst, P. Lillig, CH. Lill, R. Mühlenhoff, U. Structure/function analysis of the multidomain monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae.* ESF-EMBO Symposium „Glutathione and Related Thiols in Living Cells“ 2011, Sant Feliu de Guixols.

6.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Aachen:

Bräunig, Büchs, Elling, Enders, Frentzen, Grambow, Hartmeier, Klinner, Kreuzaler, Peterhänsel, Ratte, Reiss, Schäfer, Schaffrath, Schuphan, Simon, Slusarenko, Stahl, Stens, Vossen, Wagner, Wolf und Zimmermann.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren in Marburg an der Lahn:

Lill, Mühlenhoff.

6.5 Danksagung

Besonders danken möchte ich Prof Dr. Roland Lill und PD Dr. Ulrich Mühlenhoff für die Möglichkeit an diesem Institut promovieren zu dürfen und für die Vergage dieses interesanten Themas. Dabei ist die ständige Unterstützung und Gesprächsbereitschaft von Prof. Lill und Dr. Mühlenhoff besonders hervorzuheben, ohne die diese Arbeit sicherlich nicht möglich gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Jude Przyborski für das Erstellen des Zweitgutachtens und die sehr guten Gespräche sowie Anregungen im Rahmen des Graduiertenkollegs und darüber hinaus. Weiterhin möchte ganz herzlich Prof. Dr. Uta-Maria Bauer für die Übernahme des Vorsitzes in der Disputation danken.

Der AG Lillig, im Insbesonderen Dr. Christopher H. Lillig, möchte ich für die gute und sehr fruchtfolle Zusammenarbeit danken. Dies gilt auch für Dr. Carsten Berndt.

Darüber hinaus danke ich auch der Microarray-Facility des IMTs Marburgs für die Durchführung der Microarray-Analysen. Hierbei gilt mein Dank besonders Dr. Michael Krause, Dr. Marco Mernberger und Lukas Rycak.

Für die Finanzierung möchte ich dem SFB 593 „Mechanismen der zellulären Kompartimentierung und deren krankheitsrelevante Veränderungen“ und dem Graduiertenkolleg 1216 „Intra- und interzellulärer Transport und Kommunikation (IITC)“ danken.

Besonderer Dank gilt auch der ganzen AG Lill und dem gesamten Institut für Zytobiologie und Zythopathologie für das besonders gute Arbeitsklima und einen Zusammenhalt, der wohl in keinem anderen anderem Institut zu finden ist. All die schönen Grillfeiern, Sommerfeste, Betriebsausflüge und Weihnachtsfeiern waren immer etwas ganz besonderes für mich.

An dieser Stelle muss ich der Institutband „Wild Types“ und deren Mitgliedern ganz besonders danken. Ich denke, dass eine Institutband absolut einzigartig ist und ich danke dafür, Teil dieser Band gewesen sein zu dürfen. Angefangen haben wir nur mit drei Personen um einen kleinen Beitrag zu einer Weihnachtsfeier zu leisten. Entwickelt hat sich daraus ein fester Bestandteil des Instituts. Die Proben, CD-

Aufnahmen und Auftritte waren immer eine gute Abwechslung zum wissenschaftlichen Alltag und haben unheimlich viel Spaß gemacht.

Nicht zu letzt muss ich meinen Eltern, meiner Familie sowie meinen Freunden danken. Ohne eure Unterstützung hätte ich das Alles ohne jeden Zweifel nicht geschaft. Ihr wart immer für mich da und habt sowohl in guten wie auch in schlechten Zeiten zu mir gestanden und hattet immer ein offenes Ohr für meine Probleme und Sorgen. Daher werde ich euch immer dankbar sein.