

Veränderungen des Proteoms von *Saccharomyces cerevisiae* infolge einer Beeinträchtigung der Fe/S-Biosynthese durch CIA- und Eisen-Depletion

vom Fachbereich Chemie der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität
Kaiserslautern-Landau zur Verleihung des akademischen Grades „Doktor der
Naturwissenschaften“ genehmigte Dissertation

DE-386



vorgelegt von

Lukas Philipp Hewener

Betreuer: Prof. Dr. Antonio J. Pierik

Rheinland-Pfälzische Technische Universität Kaiserslautern-Landau

17. Juli 2025

Der praktische Teil dieser wissenschaftlichen Arbeit entstand im Zeitraum Juli 2019 bis Juli 2023 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Antonio J. Pierik an der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität Kaiserslautern-Landau, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Biochemie.

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 06.02.2024

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17.07.2025

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Jörg Fahrer

1. Berichtserstatter: Prof. Dr. Antonio J. Pierik

2. Berichtserstatter: Prof. Dr. Johannes M. Herrmann

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die anliegende Dissertation mit dem Thema: "Veränderungen des Proteoms von *Saccharomyces cerevisiae* infolge einer Beeinträchtigung der Fe/S-Biosynthese durch CIA- und Eisen-Depletion" selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken (einschließlich des Internets und anderer elektronischer Text- und Datensammlungen) dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angabe der Quelle bzw. der Sekundärliteratur als Entlehnung kenntlich gemacht. Ergebnisse etwa beteiligter Mitarbeiter und anderer Autoren sind klar gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich hiermit, dass die o.g. Arbeit noch nicht anderweitig eingereicht wurde. Ich versichere, dass ich mich zuvor an keiner Hochschule um einen Dokortitel beworben habe.

Kaiserslautern, den _____

Lukas Philipp Hewener

Abstract

Verbindungen aus Eisen- und säurelabilen Schwefel-Ionen, Eisen-Schwefel (Fe/S) Cluster, dienen als einer der wichtigsten und ältesten Proteinkofaktoren. Das Proteom der Hefe umfasst, wie auch bei den meisten Eukaryoten, zwei Synthesewege dieser Fe/S Cluster. Zum einen das **Iron-Sulfur-Cluster-System (ISC)**, welches für die Synthese von Fe/S-Kofaktoren und deren Integration in die kofaktorabhängigen Proteine der Mitochondrien zuständig ist. Zusätzlich wird für die Synthese und Integration der zytosolischen Fe/S-Kofaktoren die **Cytosolic-Iron-Sulfur-Assembly-Maschinerie (CIA)** benötigt. Damit ist sie essentiell für lebenswichtige Prozesse wie die DNA-Replikation, -Reparatur, -Transkription und Proteinbiosynthese.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch genetische Manipulation der chromosomalen DNA von *Saccharomyces cerevisiae* eine Bibliothek an verschiedenen CIA-(Doppel-)Mutanten generiert. Da die CIA-Gene essentiell sind, wäre eine Deletion letal. Deshalb wurden die natürlichen Promotoren durch galaktoseregulierbare Promotoren ersetzt. Die introduzierten Promotoren erlaubten eine gezielte und nahezu vollständige Depletion der jeweiligen Proteine durch Wachstum für eine geeignete Zeit in galaktosefreiem Medium.

Nach einer gründlichen Charakterisierung der Stämme über PCR, DNA-Sequenzierung, Western Blots, Isopropylmalat-Isomerase Aktivitätsmessungen und der phänotypischen Analyse des Wachstums wurden diese Mutanten genutzt, um über quantitative, massenspektrometrische Proteom-Analyse die Auswirkungen einer Beeinträchtigung der CIA-Maschinerie, wie sie zum Beispiel bei Eisen-Mangel oder in einigen Krankheiten vorkommen, zu studieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass nicht alle CIA-Mutationen den gleichen Phänotyp aufzeigen, ein Hinweis darauf, dass manche CIA-Proteine eine kritischere Funktion im Fe/S-Biosyntheseweg ausüben. Unter anderem konnte die Rolle einzelner CIA-Proteine in der Regulation des Eisenhaushaltes näher beleuchtet werden. Studien mit humanen Systemen wurden unter der Annahme einer deutlichen Instabilität von Apo-Protein gegenüber der Holo-Form, was sich auf die Abundanz auswirkt, durchgeführt (Stehling *et al.*, 2008; Stehling *et al.*, 2013). Diese Arbeit zeigt, dass auch in Hefe manche Fe/S-Proteine deutliche Abundanzunterschiede bei Kofaktormangel zeigen. Nicht alle Fe/S-Proteine reagierten gleich auf die Depletion, eine Priorisierung der Klientenproteine kann als wahrscheinlich angesehen werden. Auch konnten, ergänzend zu früheren Studien (Paul, 2014), weitere Fe/S-Proteine als Klienten der CIA-Adaptorproteine Yae1 und Lto1 ausgeschlossen werden.

Neben den Auswirkungen auf die zytosolischen Fe/S-Proteine konnten auch die Auswirkungen der CIA-Depletion auf die wichtigsten Stoffwechselprozesse analysiert werden. Viele Biosynthesewege zeigen eine gegenseitige Beeinflussung und Regulation durch die beteiligten Proteine und Intermediate. Auch die CIA-Maschinerie ist einer intrikaten, multifaktoriellen Regulation unterlegen. Im Verlauf dieser Arbeit konnten Grx4 und Nar1 als Hauptakteure der Regulation innerhalb der CIA-Maschinerie identifiziert werden.

Zudem konnten Hinweise auf die zytosolische Lokalisierung der Fe/S-haltigen Glutamat-Synthase Glt1 erlangt werden. Während frühere Studien die Lokalisierung dieses Proteins in den Mitochondrien suggerierten, konnte hier eine eindeutige Abhängigkeit von der CIA-Maschinerie gezeigt werden, was eine zytosolische Lokalisierung impliziert. Dies eröffnet die Möglichkeit, Messungen der Glt1-Aktivität als neues Assay zur Untersuchung der CIA-Aktivität zu nutzen.

Abstract

Compounds made of iron and acid-labile sulfur, iron-sulfur (Fe/S) clusters, serve as one of the most important and oldest protein cofactors. The yeast proteome, as well as most eukaryotes, comprises of two synthesis pathways for those Fe/S clusters. One is the **Iron-Sulfur Cluster system (ISC)**, which is responsible for the synthesis of iron sulfur cofactors and their integration into the cofactor-dependent mitochondrial proteins. Additionally the **Cytosolic Iron-Sulfur-Assembly machinery (CIA)** is responsible for the synthesis and integration of cytosolic iron-sulfur cofactors. It is therefore essential for vital processes such as DNA-replication, -repair, -transcription and protein biosynthesis.

Within the scope of this work, genetic manipulation of the chromosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae* was used to create a library of different CIA (double-) mutants. Since the deletion of the mostly essential CIA genes would be lethal, their natural promoters were replaced by galactose-regulatable promoters. The introduced regulatable promoters enabled a targeted and almost complete depletion of the respective proteins by growth in galactose-free medium.

After thorough characterization of the strains via PCR, DNA sequencing, Western blot, isopropylmalate isomerase activity measurements and phenotypic analysis of growth, these mutants were used to study the effects of impairment of the CIA machinery, such as those found in iron deficiency or in some diseases, via quantitative mass spectrometric proteomic analysis. It was shown that not all CIA mutations exhibit the same phenotype, indicating that some CIA proteins have a more critical function in the Fe/S biosynthetic pathway. Among other things, the role of individual CIA proteins in the regulation of iron homeostasis could be examined in more detail. Studies with human systems were performed under the assumption of a clear instability of apo-protein compared to the holo-form, which affects abundance (Stehling *et al.*, 2008; Stehling *et al.*, 2013). This work shows that, in yeast, some Fe/S proteins show significant abundance differences when deficient in cofactors. Not all Fe/S proteins responded equally to depletion; a prioritization of client proteins can be considered likely. The specificity of the CIA proteins Yae1 and Lto1 as adaptor proteins could also be defined more precisely, excluding more Fe/S-proteins from being dependent on Yae1 and Lto1 than in previous studies (Paul, 2014).

In addition to the effects on the cytosolic Fe/S proteins, the effect of CIA depletion on the most important metabolic processes has been analyzed aswell. Many biosynthetic pathways show a mutual influence and regulation by the proteins and intermediates involved. The CIA machinery is also subject to intricate, multifactorial regulation. In the course of this work, Grx4 and Nar1 were identified as the main regulatory players within the CIA machinery.

In addition, evidence for the cytosolic localization of the Fe/S-containing glutamate synthase Glt1 was obtained. While previous studies suggested a mitochondrial localization of this protein, a clear dependence on the CIA machinery could be shown here, which implies a cytosolic localization. This opens up the possibility of using Glt1 activity measurements as a new assay to study CIA activity.

Danksagung

„Noch ein Stück. Noch ein Stück. Noch ein Stück.“ - S.

Diese Arbeit entstand in der Zeit von August 2019 bis Juni 2025 in Prof. Dr. Antonio J. Pieriks Arbeitsgruppe an der Technischen Universität Kaiserslautern.

Für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Bereitstellung eines interessanten Themas möchte ich deshalb Prof. Dr. Antonio J. Pierik danken. Auch konnte ich mich immer auf seine Unterstützung bei Problemen verlassen.

Prof. Dr. Johannes M. Herrmann und Prof. Dr. Jörg Fahrer möchte ich herzlich für ihre Rolle als Zweitprüfer, bzw. die Übernahme des Prüfungsvorsitzes für diese Arbeit danken.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Herrmann für die Nutzung der FastPrep bedanken, welche die Erzielung konsistenter Ergebnisse ermöglichte. Auch gilt mein Dank Dr. Markus Räschle und Jan-Eric Bökenkamp. Beide verbrachten viel Zeit damit, mich bei den massenspektrometrischen Experimenten zu unterstützen.

Genauso möchte ich PD Dr. Daili J. A. Netz danken, welche mir auch bei allen Problemen mit hilfreichen Anregungen zur Seite stand.

Ich möchte mich auch beim gesamten Arbeitskreis für die Hilfsbereitschaft bedanken. Zu Beginn der Arbeit sind hier vor allem Nadine Duppe, Bazlur Rashid und Monika Schneider hervorzuheben, welche immer ein offenes Ohr für meine Anliegen hatten und auch ein angenehmes Arbeitsklima schufen. Nach einiger Zeit stießen Jessica Soares, Magda Orgozała, Lukas Knauer und Taric Begic zur Arbeitsgruppe, wodurch die angenehme und produktive Arbeitsatmosphäre noch weiter gestärkt wurde. An unsere gemeinsamen Ausflüge werde ich mich gerne erinnern.

Dr. Michelle Gehringer möchte ich sowohl in ihrer Funktion als ehemalige Betreuerin, als auch motivierende Privatperson danken. Auch Doreen Knochenhauer danke ich für die Hilfe bei diversen Themen, insbesondere dem Klonieren und dem Vorbereiten von Praktika.

Natürlich gilt ein besonderer Dank meinen Eltern, die mir überhaupt erst das Studium ermöglichten.

Meiner Lebensgefährtin danke ich von Herzen für ihre unerschütterliche Geduld, ihren Humor und ihre liebevolle Unterstützung.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg, mg, g	Mikrogramm, Milligramm, Gramm
µl, ml, l	Mikroliter, Milliliter, Liter
3HA	Triple Hämagglutinin-Tag
ABC	ATP-Binding Cassette
ACN	Acetonitril
AJPxxxx, DIVxxx	Interne Probenbezeichnung Sequenzierungen
AP	Apurinisch/Apyrimidinisch
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BER	Basenexzisionsreparatur
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CODH	Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase
CTC	CIA Targeting Complex
CIA	Cytosolic Iron-sulfur-Assembly
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DDA	Data-Dependent Acquisition
DDI	Data-Independent Acquisition
DDIA	Data-Dependent-Independent Acquisition
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DOC	Desoxycholat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektronensprayionisierung
ESR	Elektronenspinresonanz
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDR	False Discovery Rate
FMN	Flavin-Mononukleotid
G418	Genitacin
Gal	Galaktose

GC-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt
Glt1	Glutamat-Synthase
Glu	Glukose
GO-Terms	Gene Ontology-Terms
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GSSSG	Glutathiontrisulfid
HA-Tag	Hämagglutinin-Tag
IGR	Intergenregion
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ISC	Iron-Sulfur Cluster Assembly
IsoDTB	Isodesthiobiotin
kanMX4	Kassette für Geneticinresistenz
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Lysogeny Broth
Leu1	Isopropylmalat-Isomerase
LFQ	Label-free quantification
LT	Lysin/Trypsin
MIM	Mitochondrial Inner Membrane
ml, µl, l	Milliliter, Mikroliter, Liter
MOM	Mitochondrial Outer Membrane
mRNA	messengerRNA
MS	Massenspektrometrie
mU, U	Milliunit, Unit
nM, µM, mM, M	Nanomolar, Mikromolar, Millimolar, Molar
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
natNT2	Resistenzkassette für Nourseothricin
NDOR1	NADPH-abhängige Oxidoreduktase 1
NIF	Nitrogen Fixation
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Database

pH	potentia Hydrogenii
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SC	Synthetic complete Medium
SDB-RPS	Styrol-Divinylbenzol-Reverse-Phase-Sulfonat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGD	<i>Saccharomyces</i> Genome Database
SUF	Sulfur Utilisation Factor
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin)
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TFA	Trifluoressigsäure
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vis	Sichtbar
w/v, v/v	weight per volume, volume per volume
YP	Hefeextrakt und Pepton Medium

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eisenhaltige Proteine in <i>S. cerevisiae</i>	32
Tabelle 2: Oligonukleotide zur Überprüfung homologer Rekombinationen.....	41
Tabelle 3: Oligonukleotide für die homologe Rekombination	42
Tabelle 4: Oligonukleotide für klassische Klonierung in Plasmide	44
Tabelle 5: Auxotrophiemarker Mutationen in W303-K6001	44
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Plasmide	45
Tabelle 7: Probenvorbereitung für die PCR.....	51
Tabelle 8: Ablauf einer PCR.....	52
Tabelle 9: Probenvorbereitung für die Agarosegelelektrophorese.....	52
Tabelle 10: TAE-Puffer (50x)	53
Tabelle 11: Reaktionsgemisch für einen Restriktionsverdau	53
Tabelle 12: Reaktionsgemisch für eine Proberestriktion.....	54
Tabelle 13: Zusammensetzung Ligation	54
Tabelle 14: YP-Medium	56
Tabelle 15: SC-Medium	56
Tabelle 16: Zuckerlösung (10x)	57
Tabelle 17: Auxotrophiemarker-Mix (1000x).....	57
Tabelle 18: Adenin-Lösung (1000x).....	57
Tabelle 19: Antimykotika (1000x)	57
Tabelle 20: Li-Ac-Lösung	57
Tabelle 21: PEG-Lösung	58
Tabelle 22: Lösung 1	60
Tabelle 23: TES-Puffer	60
Tabelle 24: TE-Puffer	60
Tabelle 25: LB-Medium	63
Tabelle 26: Puffer für His ₆ -Tag-Aufreinigung	64
Tabelle 27: Entsalzungspuffer	65
Tabelle 28: CaCl ₂ /Glyzerin-Lösung.....	66
Tabelle 29: Lösungen für Micro-Biuret	68
Tabelle 30: TE-Puffer	69
Tabelle 31: MIX-Lösung	69
Tabelle 32: Zusammensetzung SDS-PAGE 12.5 %	70
Tabelle 33: Zusammensetzung Probenpuffer (5-fach konzentriert).....	71
Tabelle 34: Laufpuffer (10-fach konzentriert) pH ~8.3.....	71
Tabelle 35: Coomassie-Färbelösung	71
Tabelle 36: Entfärbelösung.....	71
Tabelle 37: Konservierungslösung	71
Tabelle 38: Transferpuffer.....	72
Tabelle 39: TBS-Puffer (10-fach konzentriert)	73
Tabelle 40: TBS-T-Puffer	73
Tabelle 41: Blockierlösung	73
Tabelle 42: Ponceau S Lösung	73
Tabelle 43: TNEG- und TNETG-Puffer	74
Tabelle 44: Leu1-Puffer	75
Tabelle 45: Leu1-Aktivitätsassay.....	75
Tabelle 46: Glt1-Aktivitätsassay	75

Tabelle 47: Lysepuffer	78
Tabelle 48: LT-Puffer (MS-Grade)	78
Tabelle 49: A/A*-Puffer (MS-Grade)	78
Tabelle 50: Schritte und Reagenzien der SDB-RPS-stage-tip-Aufreinigung	79
Tabelle 51: Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	80
Tabelle 52: Click-Lösung	80
Tabelle 53: In dieser Arbeit verwendete CIA-Depletionsstämme	83
Tabelle 54: Kinetische Parameter der Glt1-Aktivitätsmessungen	101
Tabelle 55: Histone in <i>S. cerevisiae</i>	106
Tabelle 56: Verifizierung der Depletion in MS-Proben	108
Tabelle 57: Niedrigabundante CIA-Proteine	108
Tabelle 58: Wildtypabundanzen zytosolischer und nuklearer Fe/S-Proteine	116
Tabelle 59: Abundanzen mitochondrialer ISC- und Fe/S-Proteine im Wildtyp	120
Tabelle 60: Yae1 und Lto1 in der Fe/S-Reifung	142
Tabelle 61: Identifikation potentieller Fe/S-Proteine über Venn-Diagramme	146
Tabelle 62: Fe- und S²⁻-Bestimmung putativer Fe/S-Proteine	150
Tabelle 63: Vergleich der gemessenen Proteomgröße verschiedener Publikationen	160
Tabelle 64: Optimale Depletionszeiten der Hefestämme	165
Tabelle 65: Kinetische Parameter von Glt1 im Zellextrakt	168
Tabelle 66: Inhibition von Glt1 im Zellextrakt	168
Tabelle 67: GO-terms Zusammenfassung	177
Tabelle 68: Auswertung der 20 reaktivsten Cysteine bei Nar1-Depletion	186

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturen und wichtigste Oxidationszustände von kristallografisch definierten Fe/S-Clustern	3
Abbildung 2: Redoxpotentiale verschiedener Fe/S-Cluster- und Liganden-konfigurationen	4
Abbildung 3: Hauptkomponenten der NIF-Maschinerie.....	6
Abbildung 4: Überblick über die SUF-Maschinerie	6
Abbildung 5: Proteine der ISC-Maschinerie	9
Abbildung 6: Proteine der CIA-Maschinerie	11
Abbildung 7: Cryo-EM des CIA-targeting-Complex aus <i>H. sapiens</i>	11
Abbildung 8: Effekte auf zelluläre Prozesse durch Beeinträchtigung der Fe/S-Biosynthese.....	12
Abbildung 9: Zusammenfassung der an der Eisenhomöostase von <i>S. cerevisiae</i> beteiligten Proteine	14
Abbildung 10: PRIM2, gebunden an einen RNA/DNA-Heteroduplex.....	17
Abbildung 11: Fe/S-Kofaktor von Pol ϵ	19
Abbildung 12: Fe/S-Kofaktor der Untereinheit XPD des humanen TFIIH-Komplexes....	21
Abbildung 13: Fe/S-Kofaktoren von TYW1	25
Abbildung 14: Fe/S-Kofaktoren der Radikal-SAM-Enzyme Dph1 und Dph2.....	27
Abbildung 15: Radical SAM Mechanismus in der Diphthamid Synthese	27
Abbildung 16: Leu1-katalysierte Reaktion von 2-Isopropylmalat zu 3-Isopropylmalat .	28
Abbildung 17: Glutamatsynthese und Stickstoffassimilierung in <i>S. cerevisiae</i>	30
Abbildung 18: Glt1-Zytophydien in verschiedenen Wachstumsstadien	30
Abbildung 19: Schema des in dieser Arbeit verwendeten MS-Geräts	34
Abbildung 20: Bestimmung der Cysteinreaktivität mittels IsoDTB	35
Abbildung 21: Flussdiagramm des Perseus-Arbeitsablaufs.....	49
Abbildung 22: Flussdiagramm der homologen Rekombination	59
Abbildung 23: Schema eines Tüpfeltests	61
Abbildung 24: Aufbau eines Semi-Dry Western Blots	72
Abbildung 25: Michaelis-Menten-Diagramm.....	76
Abbildung 26: Isodesthiobiotin (IsoDTB)	80
Abbildung 27: Probenvorbereitung zur Messung reaktiver Cysteine.....	81
Abbildung 28: Schematische Darstellung der verschiedenen Gen-Loci in den verwendeten Hefestämmen	85
Abbildung 29: Agarosegel der PCR-Produkte für die homologe Rekombination.....	86
Abbildung 30: Schema einer homologen Rekombination und Überprüfung mit PCR...	87
Abbildung 31: Gelelektrophorese der PCR-Produkte mit genomischer DNA der Mutanten	87
Abbildung 32: Gelelektrophorese der PCR-Fragmente mit genomischer DNA der Mutanten	88
Abbildung 33: Gelelektrophorese der PCR-Fragmente mit genomischer DNA weiterer Mutanten	88
Abbildung 34: Western Blot für die Analyse der Depletion von Tah18, Dre2, Nbp35 und Cfd1.....	89
Abbildung 35: Western Blot für die Analyse der Depletion von Nar1 und Dre2.....	90
Abbildung 36: Western Blot für die Analyse der Depletion von Met18 und Cia1.....	90
Abbildung 37: Western Blot für die Analyse der Depletion von Nbp35 und Yae1	91
Abbildung 38: Western Blot für die Analyse der Depletion von Cfd1 und Cia2.....	91

Abbildung 39: Western Blot für die Analyse der Depletion von Grx3 und Grx4	92
Abbildung 40: Tüpfeltests aller Hefedepletionsstämme	94
Abbildung 41: Verdopplungszeiten der mutierten Hefestämme in galaktosehaltigem Medium	96
Abbildung 42: Relative Verdopplungszeiten der mutierten Hefestämme unter Depletionsbedingungen (Glukose) im Vergleich zum Wildtyp W303	97
Abbildung 43: Reaktionsschema der Glutamatsynthase Glt1	98
Abbildung 44: Stabilität der Glutamat-Synthase in Zellextrakt	99
Abbildung 45: L-Azaserin hemmt Glt1-Aktivität	100
Abbildung 46: Abhängigkeit der Glt1-Aktivitätsmessung vom pH-Wert	102
Abbildung 47: Glutamat-Synthase-Aktivität der Zellextrakte für MS-Analyse	103
Abbildung 48: Isopropylmalat-Isomerase-Aktivität der Zellextrakte für MS-Analyse ..	104
Abbildung 49: Unterschiede der durchschnittlichen Abundanzen des Wildtyps verschiedener Messdurchgänge	106
Abbildung 50: Abundanz der Histone im Wildtyp in verschiedenen Datenserien	107
Abbildung 51: Vergleich der Isopropylmalat-Isomerase-Aktivität und Abundanz verschiedenener Hefestämme	109
Abbildung 52: Vergleich der Glutamatsynthase-Aktivität und Abundanz verschiedenener CIA _↓ -Hefestämme	110
Abbildung 53: Zusammenfassung der Abundanz der CIA-Proteine unter verschiedenen Bedingungen	112
Abbildung 54: Gegenseitige Beeinflussung der CIA-Faktoren	115
Abbildung 55: Vergleich von gemessenen Abundanzen für zytosolische und nukleare Fe/S-Proteine des Wildtyps mit Literaturwerten	117
Abbildung 56: Abundanz von zytosolischen und nuklearen Eisen-Schwefel-Proteinen unter verschiedenen Depletionsbedingungen	118
Abbildung 57: Abundanz von mitochondrialen Eisen-Schwefel- und ISC-Proteinen im Vergleich zum Wildtyp	122
Abbildung 58: Änderungen der Abundanz von Komplexpartnern und Proteinen desselben Stoffwechselweges der zytosolischen FeS-Proteine	125
Abbildung 59: Volcano Plot der Grx3/4-Depletionsstämme	126
Abbildung 60: Unterschiede von Grx3 _↓ und Grx4 _↓	127
Abbildung 61: Änderung der Abundanz von zytosolischen und nukleären eisenhaltigen nicht-Fe/S Proteinen	129
Abbildung 62: Änderung der Abundanz von eisenhaltigen Proteinen im ER und der Vakuole	129
Abbildung 63: Änderung der Abundanz von mitochondrialen eisenhaltigen Proteinen	130
Abbildung 64: Auswirkungen der CIA-Depletion auf den Stoffwechselweg der Glykolyse	131
Abbildung 65: Auswirkungen der CIA-Depletion auf den Citratzyklus	132
Abbildung 66: Auswirkungen der CIA-Depletion auf die Pyruvatdehydrogenase	133
Abbildung 67: Auswirkungen der CIA-Depletion auf die Atmungskette	134
Abbildung 68: Auswirkungen der CIA-Depletion auf die Gärung	134
Abbildung 69: Auswirkungen der CIA-Depletion auf den Pentosephosphatweg	135
Abbildung 70: Auswirkungen der CIA-Depletion auf die die THF-Biosynthese und Wiederverwertung	136

Abbildung 71: Auswirkungen der CIA-Depletion auf die Riboflavin-, FMN- und FAD-Biosynthese.....	138
Abbildung 72: Abundanzen der Flavoproteine von <i>S.cerevisiae</i>	139
Abbildung 73: Reifung von Fe/S-Proteinen durch Yae1 und/oder Lto1.....	141
Abbildung 74: Auswirkungen der CIA-Depletion auf die Proteine der Ribosomenbiogenese für die zytosolischen Untereinheiten (60S und 40S)	143
Abbildung 75: Venn-Diagramme der Depletionsstämme.....	145
Abbildung 76: Anreicherung von FeS-Proteinen über Venn-Diagramme	146
Abbildung 77: GO-terms Anreicherung von Proteinen im 15/15 Venn-Subset	148
Abbildung 78: Messung der Cysteinreaktivität in Fe/S-Proteinen	151
Abbildung 79: Cysteinreaktivität verschiedener Proteingruppen.....	153
Abbildung 80: Cysteinreaktivität Leu1.....	154
Abbildung 81: Cysteinreaktivität Glt1	155
Abbildung 82: Cysteinreaktivität und Fe/S-Proteine.....	156
Abbildung 83: Bekannte unspezifische Proteomänderungen.....	163
Abbildung 84: Zusammenfassung des Wachstumsphänotyps der Yae1- und Lto1-Mutanten	166
Abbildung 85: Lokalisierung des L-Glutamat-Biosynthesewegs.....	167
Abbildung 86: Unterschiede der Abundanz und Aktivität von Leu1 und Glt1 bei CIA-Depletion.....	169
Abbildung 87: Zusammenfassung Beeinflussung der CIA-Proteine	170
Abbildung 88: Instabilität von Apo-Fe/S-Proteinen.....	172
Abbildung 89: Yae1 und Lto1 als Adaptorprotein	173
Abbildung 90: Cysteinreaktivität von Fba1 in Nar1-Mutanten.....	174
Abbildung 91: Auswirkungen der CIA-Depletion auf die wichtigsten Prozesse des Metabolismus	175
Abbildung 92: Komplexstabilität und Adaptorproteine von Eisen-Schwefel-Proteinen	176
Abbildung 93: Unterschiede von Tyw1 bei verschiedenen Depletionsbedingungen ..	180
Abbildung 94: Venn-Diagramm CIA- und Eisendepletion.....	181
Abbildung 95: Gemeinsamkeiten von Grx3/4- und Eisendepletion	181
Abbildung 96: Unterschiede von Eisen- und CIA-Depletion	182
Abbildung 97: Abundanz mitochondrialer FeS-Proteine bei Eisendepletion.....	183
Abbildung 98: Cysteinreaktivität bei Nar1-Depletion.....	184
Abbildung 99: Beispiel für die Geometrie von 2Fe2S- und 4Fe4S-Kofaktoren	185
Abbildung 100: Cysteinreaktivität von Fe/S-Proteinen bei Nar1-Depletion.....	185
Abbildung 101: Tüpfeltests verschiedener Hefedepletionsstämme	213
Abbildung 102: Tüpfeltests verschiedener Hefedepletionsstämme	214
Abbildung 103: Tüpfeltests Verschiedener Hefedepletionsstämme.....	215
Abbildung 104: Tüpfeltests verschiedener Hefestämme.....	216
Abbildung 105: Zusammenfassung der Western Blots von Zellextrakten mutierter Hefestämme.....	217
Abbildung 106: Verdopplungszeiten der mutierten Hefestämme nach 16 Stunden Wachstum mit Glukose als Kohlenstoffquelle	218
Abbildung 107: Verdopplungszeiten der mutierten Hefestämme nach 64 Stunden Wachstum mit Glukose als Kohlestoffquelle	219
Abbildung 108: Relative Lag-Zeit der mutierten Hefestämme im Vergleich zum Wildtyp W303.....	220

Abbildung 109: Abundanz des CIA-Proteins Tah18 in verschiedenen Depletionsstämmen	221
Abbildung 110: Abundanzen der CIA-Proteine in verschiedenen Depletionsstämmen	222
Abbildung 111: Abundanzen der CIA-Proteine in verschiedenen Depletionsstämmen	223
Abbildung 112: Abundanz der CTC-Proteine in verschiedenen Depletionsstämmen	224
Abbildung 113: Abundanz von Yae1 in verschiedenen Depletionsstämmen	225
Abbildung 114: Stabilität der zytosolischen Eisen-Schwefel-Proteine unter Fe/S-limitierenden Bedingungen	226
Abbildung 115: Abundanz von Glt1 in verschiedenen Depletionsstämmen	226
Abbildung 116: Abundanz von Rad3, Leu1 und Pol1 in verschiedenen Depletionsstämmen	227
Abbildung 117: Abundanz von Pol3, Pri2 und Pol2 in verschiedenen Depletionsstämmen	228
Abbildung 118: Abundanz von Dph2, Apd1 und Dna2 in verschiedenen Depletionsstämmen	229
Abbildung 119: Abundanz von Dph1, Met5 und Ncs6 in verschiedenen Depletionsstämmen	230
Abbildung 120: Abundanz von Elp3, Rli1 und Tyw1 in verschiedenen Depletionsstämmen	231
Abbildung 121: Abundanz von Mak16 in verschiedenen Depletionsstämmen	232
Abbildung 122: Änderungen an den Proteinabundanzen der Glykolyse	233
Abbildung 123: Abundanzen der Krebs-Zyklus-Proteine von <i>S.cerevisiae</i>	234
Abbildung 124: Änderungen an den Proteinabundanzen der Atmungskette	235
Abbildung 125: Änderungen an den Proteinabundanzen von Stoffwechselwegen mit Pyruvat als Substrat	236
Abbildung 126: Änderungen an den Proteinabundanzen des Pentosephosphatwegs	237
Abbildung 127: Änderungen an den Proteinabundanzen der Tetrahydrofolatbiosynthese und -wiederverwertung	238
Abbildung 128: Änderungen an den Proteinabundanzen der Flavobiosynthese	239
Abbildung 129: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Tah18-Depletionsstamm	240
Abbildung 130: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Dre2-Depletionsstamm	241
Abbildung 131: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Dre2/Tah18-Depletionsstamm	242
Abbildung 132: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Cfd1-Depletionsstamm	243
Abbildung 133: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Nbp35-Depletionsstamm	244
Abbildung 134: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Cfd1/Nbp35-Depletionsstamm	245
Abbildung 135: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Nar1-Depletionsstamm	246
Abbildung 136: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Cia1-Depletionsstamm	247

Abbildung 137: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Cia2-Depletionsstamm	248
Abbildung 138: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Met18-Depletionsstamm	249
Abbildung 139: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Lto1-Depletionsstamm	250
Abbildung 140: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Yae1-Depletionsstamm	251
Abbildung 141: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Lto1/Yae1-Depletionsstamm	252
Abbildung 142: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Δ Grx4/Grx3-Depletionsstamm	253
Abbildung 143: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Δ Grx3/Grx4-Depletionsstamm	254
Abbildung 144: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem eisendepletionsstamm	255
Abbildung 145: N-Terminus von Glt1	256
Abbildung 146: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion der frühen CIA-Proteine ihre Abundanz erhöhen	256
Abbildung 147: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion der frühen CIA-Proteine ihre Abundanz verringern	257
Abbildung 148: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion der CIA-Scaffold-Proteine ihre Abundanz erhöhen	257
Abbildung 149: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion der CIA-Scaffold-Proteine ihre Abundanz verringern	258
Abbildung 150: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion von Nar1 und der CTC-Proteine ihre Abundanz verringern	258
Abbildung 151: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion von Eisen und Grx3/4 ihre Abundanz erhöhen	259
Abbildung 152: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion von Eisen und Grx3/4 ihre Abundanz verringern	259
Abbildung 153: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion von Yae1 und Lto1 ihre Abundanz erhöhen	260
Abbildung 154: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion von Yae1 und Lto1 ihre Abundanz verringern	260
Abbildung 155: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion von CIA-Proteinen, ohne Grx3/4, Yae1 und Lto1 ihre Abundanz verringern	261
Abbildung 156: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion von Dre2 ihre Abundanz verringern	261
Abbildung 157: Reaktive Cysteine von Adh7, Sol2, Rpl40B und Arg8	262
Abbildung 158: Reaktive Cysteine von YHR020W, Nce103, Yhi9 und Rpl23B	263
Abbildung 159: Reaktive Cysteine von Caf16, Odc2, Ade17 und Ppz1	264
Abbildung 160: Reaktive Cysteine von Map2, Rpl35B, Cpa2, Aip1 und Dak1	265

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus	1
1.2 Eisen-Schwefel-Cluster	2
1.3 Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern	5
1.3.1 SUF- und NIF-Maschinerie	5
1.3.2 ISC-Maschinerie	7
1.3.3 CIA-Maschinerie	9
1.4 Eisenhomöostase in <i>S. cerevisiae</i>	13
1.5 Extramitochondriale Eisen-Schwefel-Proteine	16
1.5.1 DNA-Instandhaltung durch Polymerase α , ϵ , δ und ζ	16
1.5.2 DNA-Helikasen und DNA-Glykosylase	20
1.5.3 Ribosome und tRNA Modifizierung	23
1.5.4 Aminosäuren und weitere Biosynthesen	26
1.5.5 Zusammenfassung aller Fe-haltigen Proteine in Hefe	32
1.6 Massenspektrometrie	33
1.6.1 Proteomics – labelfree LC-MS/MS	33
1.6.2 Iso-DTB und Cysteinreaktivität	35
2. Aufgabenstellung	36
3. Material und Methoden	37
3.1 Geräte und Chemikalien	37
3.1.1 Geräte und Verbrauchswaren	37
3.1.2 Chemikalien	38
3.1.3 Antikörper	41
3.1.4 Oligonukleotide	41
3.1.5 Verwendete Plasmide für homologe Rekombination	45
3.1.6 Verwendete Marker für die Elektrophorese	45
3.2 Übergreifende Methoden	46
3.2.1 Lagerung	46
3.2.2 Bestimmung der Zelldichte	46
3.3 Bioinformatische Methoden	47
3.3.1 Design von Primern	47
3.3.2 Bestimmung von Proteinparametern	47
3.3.3 Sequenzalignment	48
3.3.4 MaxQuant	48
3.3.5 Perseus	48
3.3.6 Weitere Webtools	50
3.4 Molekularbiologische Methoden	51

3.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	51
3.4.2 Agarosegelelektrophorese	52
3.4.3 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen.....	53
3.4.3.1 Proberestriktion.....	53
3.4.4 Ligation.....	54
3.4.5 DNA-Aufreinigung mittels Mini-Prep-Kit	54
3.4.6 Sequenzierung	55
3.5 Mikrobiologische Methoden	56
3.5.1 Zellanzucht <i>S. cerevisiae</i>	56
3.5.2 Transformation und homologe Rekombination <i>S. cerevisiae</i>	57
3.5.3 Glyzerinstock.....	59
3.5.4 <i>S. cerevisiae</i> DNA-Präparation.....	60
3.5.5 Tüpfeltest	61
3.5.6 Wachstumskurven und Berechnung der Verdopplungszeit (t_v)	62
3.5.7 Zeba Spin Aufreinigung	63
3.5.8 Zellanzucht <i>E. coli</i>	63
3.5.9 Transformation in <i>E. coli</i>	64
3.5.10 His ₆ -Tag-Aufreinigung	64
3.5.11 Entsalzung mittels PD-10-Säule	66
3.5.12 Reinigung der Säulen	66
3.5.13 Herstellung kompetenter Zellen	66
3.6 Weitere Methoden.....	67
3.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	67
3.6.1.1 Bradford-Assay	67
3.6.1.2 MicroBiuret.....	67
3.6.1.3 BCA-Assay	68
3.6.2 Zellaufschluss nach Rödel.....	69
3.6.3 TCA-Präzipitation von Zellextrakten.....	70
3.6.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	70
3.6.5 Western Blot.....	72
3.6.6 Bestimmung der Enzymaktivität.....	73
3.6.6.1 Herstellung von Zellextrakten.....	74
3.6.5.2 Messung der Isopropylmalat-Isomerase-spezifischen (Leu1) Aktivität	75
3.6.6.3 Messung der Glutamat-Synthase-spezifischen (Glt1) Aktivität	75
3.6.6.4 Bestimmung kinetischer Parameter von Enzymaktivitäten	76
3.7 Massenspektrometrie.....	77
3.7.1 Anzucht der galaktoseregulierbaren Hefestämme für MS	77
3.7.2 Anzucht der eisendepletierten Hefestämme für MS	77

3.7.3 Vorbereitung der Proben für die Massenspektrometrie (label-free)	78
3.7.4 Vorbereitung der Proben für die Messung der reaktiven Cysteine	80
3.7.5 Analyse der Daten der Cysteinreaktivität	82
3.7.6 Massenspektrometrie	83
3.8 Verwendete Hefestämme	83
4. Ergebnisse	85
4.1 Herstellung der galaktoseregulierbaren Hefestämme	85
4.1.1 Übersicht der Hefestämme	85
4.1.2 PCR der zur Rekombination benötigten Genkassetten	86
4.2 Verifizierung der Hefestämme	87
4.2.1 Gelelektrophoretische Verifizierung inserierten DNA	87
4.2.2 Western Blot zur Verifizierung der CIA-Depletion von MS-Proben	89
4.3 Überprüfung auf Viabilität und phänotypische Charakterisierung	93
4.3.1 Tüpfeltest	93
4.3.2 Wachstumskurven und Verdopplungszeiten	95
4.4 Fe/S-Enzymaktivitätsmessungen im Zellextrakt und Enzymkinetik	98
4.4.1 Etablierung des Glutamat-Synthase Aktivitäts-Assays	98
4.4.1.1 Stabilität der Glutamatsynthase in Zellextrakt	99
4.4.1.2 Inhibition der Enzymkatalyse	100
4.4.1.3 Kinetische Parameter der Glutamat-Synthase im Zellextrakt	101
4.4.1.4 pH-Abhängigkeit der Glt1-Reaktion	101
4.4.2 Glutamat-Synthase-Aktivität der Zellextrakte für die MS-Analyse	102
4.4.3 Isopropylmalat-Isomerase-Aktivität der Zellextrakte für die MS-Analyse	103
4.5 Analyse und Verifizierung der massenspektrometrischen Daten	105
4.5.1 Vergleichbarkeit der Messreihen (MS)	105
4.5.2 Verifizierung der Depletionsstämme durch MS	107
4.5.3 Vergleich Leu1-Aktivität und Leu1-Abundanz	109
4.5.4 Vergleich Glt1-Aktivität und Glt1-Abundanz	110
4.6 Auswirkungen auf Stoffwechselwege	111
4.6.1 Auswirkungen der Depletion auf die CIA-Maschinerie	111
4.6.1.1 Auswirkungen auf die Abundanz innerhalb der CIA-Komplexe	112
4.6.1.2 Auswirkungen auf die Abundanz durch andere, nicht-Komplexpартner	113
4.6.2 Abundanz der cytosolischen und nuklearen Fe/S-Proteine	115
4.6.3 Abundanzen der mitochondrialen FeS-Proteine	120
4.6.4 Abundanzänderungen der näheren Umgebung von Fe/S-Proteinen	124
4.6.5 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Grx3↓- und Grx4↓-Proteome	126
4.6.6 Abundanzänderung der eisenhaltigen-Proteine	128
4.6.7 Abundanzänderung der Glykolyse	131

4.6.8 Abundanzänderung im Citratzyklus	132
4.6.9 Abundanzänderung der Pyruvatdehydrogenase	133
4.6.10 Abundanzänderung der Atmungskette.....	133
4.6.11 Abundanzänderung der Gärung	134
4.6.12 Abundanzänderung des Pentosephosphatweges	135
4.6.13 Abundanzänderung der THF-Biosynthese und -Wiederverwertung	136
4.6.14 Abundanzänderungen der Flavoproteine und deren Synthese	137
4.7 „Branching“ in der CIA-Maschinerie	140
4.7.1 Reifung von Fe/S-Proteinen durch Lto1 und Yae1.....	140
4.7.2 Reifung der 60S- und 40S-Ribosomenuntereinheiten.....	142
4.8 Proteomänderungen und putative Fe/S-Proteine	143
4.8.1 Vergleich der Mutantenproteome mittels Venn Diagramm	143
4.8.2 GO-term Analyse.....	147
4.8.3 Charakterisierung ausgewählter putativer Fe/S-Proteine	150
4.9 Reaktive Cysteine	151
4.9.1 Reaktivität cysteinhaltiger Peptide	152
4.9.2 Reaktive Cysteine von Glt1 und Leu1.....	153
4.9.3 Reaktive Cysteine und Proteinabundanz	156
5. Diskussion.....	158
5.1 Rezente Erkenntnisse der humanen CIA-Forschung	158
5.2 Vergleich mit anderen MS-basierten Studien	159
5.2.1 Abdeckung des Proteoms durch MS-Detektion	159
5.2.2 Vergleich der Anzahl der Replikate.....	161
5.2.3 Geeignete Themengebiete und Möglichkeiten für MS	161
5.2.4 Typische Abundanzänderungen in MS-basierten Experimenten.....	162
5.2.5 Bekannte unspezifische Proteomänderungen.....	163
5.3 Herstellung, Depletion und Wachstum der Mutanten	164
5.3.1 Wachstumsphänotyp von CIA-Depletionsmutanten	165
5.4 Zytoplasmatische Lokalisierung von Glt1	166
5.5 Aktivitätsmessungen und Enzymkinetik	167
5.5.1 Kinetische Parameter von Glt1	167
5.5.2 Unterschiede in der Beladung von Glt1 und Leu1.....	168
5.6 Auswirkungen der CIA-Depletion	170
5.6.1 Gegenseitige Beeinflussung der CIA-Proteine.....	170
5.6.2 Instabilität von Fe/S-Apoproteinen.....	171
5.6.3 Betrachtung von Yae1- und Lto1-Klientenproteinen.....	172
5.6.4 Auswirkungen auf den Metabolismus	173
5.6.5 Auswirkungen auf Komplexstabilität	176

5.6.6 Weitere Auswirkungen auf das Proteom anhand von GO-terms	177
5.7 Proteomics der Grx3/4- und Eisendepletion	179
5.7.1 Die Sonderrolle von Tyw1	179
5.7.2 Unterschiede zwischen Grx3/4-, CIA- und Eisendepletion	180
5.7.3 Export des Fe/S-Präkursors aus den Mitochondrien	182
5.8 Fe/S-Screening mittels reaktiver Cysteine	183
5.8.1 Cysteinreaktivität bekannter Fe/S-Proteine	183
5.8.2 Proteine mit hoher Cysteinreaktivität	184
5.8.3 Proteine mit geringer Cysteinreaktivität	187
5.9 Bewertung der Aussagekraft von Proteomics	187
6. Ausblick	189
7. Literatur	192
8. Anhang	213
8.1 Tüpfeltests	213
8.2 Western Blots	217
8.3 Wachstumskurven	218
8.4 Abundanzen verschiedener Proteingruppen in Depletionsstämmen	221
8.4.1 Proteine der CIA-Maschinerie	221
8.4.2 Zytoplasmatische Fe/S-Proteine	226
8.4.3 Glykolyseproteine	233
8.4.4 Citratzyklusproteine	234
8.4.5 Atmungskette	235
8.4.6 Glukosefermentation und Pyruvatdehydrogenase	236
8.4.7 Pentosephosphatweg	237
8.4.8 THF-Syntheseweg	238
8.4.9 Flavoproteine	239
8.5 Ribosombiogenese	240
8.6 Gruppierung mittels Venn-Diagramm	256
8.7 N-Terminus von Glt1	256
8.8 GO-term-Analyse	256
8.9 Strukturen der Top 20-Hits des Screenings nach reaktiven Cysteinen	262
8.10 Sequenzalignment der Sequenzierungen neuer Stämme	266

1. Einleitung

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus

Die Menschheit nutzt seit über zehntausend Jahren den Organismus Hefe zum Backen und Brauen. Die Weiterentwicklung der Brauerei war auch eine der Hauptmotivationen um die Genetik der Hefe, anfänglich unter der Aufsicht der Carlsberg-Brauerei, genauer zu untersuchen (Liti, 2015). Die Hefe, insbesondere die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, hat sich als herausragender Modellorganismus für die biologische Forschung an Eukaryoten etabliert. Dabei wurde der Stamm W303-1A als Abkömmling von S288c gezüchtet (Rothstein, 1983). S288c dient als Referenzgenom für *S. cerevisiae* (Ralser *et al.*, 2012), aber beide Stämme besitzen ein sehr ähnliches Genom und auch Proteom (Rogowska-Wrzesinska *et al.*, 2001). Die Eignung als Forschungs- und Laborstamm entspringt vor allem aus Mutationen, welche Auxotrophien in das Genom einbrachten.

Die Gene von *S. cerevisiae* besitzen, im Vergleich zu anderen einfachen Modellorganismen wie *Escherichia coli*, eine hohe Homologie zu menschlichen Genen. Dies ermöglicht eine Übertragung von Erkenntnissen auf höhere Organismen, wodurch die Grundvoraussetzung für eine Verwendung als Modellorganismus erfüllt ist. Trotz der vergleichbar unkomplizierten Kultivierung als Einzeller ist die Hefe als eukaryotischer Organismus somit oft ein besserer als Modellorganismus als ein Prokaryot wie *E. coli* (Goffeau *et al.*, 1996). Ein weiterer Vorteil von Hefe als Modellorganismus ist die Einfachheit der genetischen Manipulation. Techniken wie Gendeletion, Überexpression, Rekombination und Austausch von Genen ermöglichen die Untersuchung der Funktionen von spezifischen Genen, sowohl auf Plasmiden, als auch im Hefegenom (Sherman, 2002). Ein weiterer Vorteil dieses Modellorganismus ist das Vorliegen von Chromosomen im haploiden Zustand im verwendeten Paarungstyp *MAT α* (Haber, 2012). Die Ähnlichkeit zu opportunistisch pathogenen Organismen wie *Candida albicans* aus der Familie der *Saccharomycotina* ermöglicht zudem eine Übertragung von Forschungsergebnissen auf Therapieansätze für eine Erkrankung mit einem solchen Erreger.

Die genetische Ähnlichkeit zwischen *S. cerevisiae* und *Homo sapiens* ist stark ausgeprägt, sodass von 350 publizierten Versuchen bei mindestens 200 eine teilweise oder vollständige Komplementation der humanen Gene durch die entsprechenden Gene der Hefe erfolgreich war (Dunham & Fowler, 2013). Auch für die relevanten Gene dieser Arbeit besteht eine hohe Ähnlichkeit zwischen dem Modellorganismus und humanen Zellen. Dennoch sind manche Proteine der Cytosolic Iron-sulfur-Assembly (CIA)-Maschinerie wie Nar1 der Bäckerhefe trotz einer starken Ähnlichkeit zu humanen CIA-Proteinen nicht durch diese komplementierbar (Balk

et al., 2004). Eine Übertragbarkeit, der mit Hilfe von Hefe als Modellorganismus erlangten Forschungsergebnisse, auf die humane CIA-Maschinerie wird durch die Erkenntnisse anderer Forschungsarbeiten jedoch unterstützt. Beispielsweise wurde eine Komplementierung von Cia1 durch das homologe Protein CIAO1 aus *H. sapiens* für Cia1 beschrieben (Srinivasan *et al.*, 2007).

Ein weiterer Vorteil von Hefe ist die Möglichkeit der Nutzung eines galaktoseinduzierbaren, bzw. glukoserepressierbaren Promotors. Die Möglichkeit den Wechsel der Kohlenstoffquelle im Medium zwischen Glukose und Galaktose zur Regulation der Transkription zu nutzen ist besonders hilfreich, da es nicht nur die Induktion, sondern auch eine Repression von Genen ermöglicht, sogar wenn deren Deletion letal wäre. Die Existenz von verschiedenen Abwandlungen der verschiedenen GAL-Promotoren ermöglicht eine kontrollierbare Variabilität des Expressionslevels von Proteinen. Zum Beispiel besitzt *GAL1* einen starken Promotor, welcher durch Verkürzung geschwächt und dann *GalL* oder *GalS* genannt wird (Mumberg *et al.*, 1994; Janke *et al.*, 2004). Neben dem starken Einfluss des Promotors auf die Genexpression ist auch der Terminator für die Abundanz der exprimierten Proteine relevant. Zum einen kann die Transkription dadurch moduliert werden, zum anderen beeinflusst der Terminator die Stabilität der transkribierten mRNA, wodurch die Genexpression stark verändert werden kann, in manchen Fällen bis zu 26-fach (He *et al.*, 2020). Die Bindung des konstitutiv exprimierten Gal4 an den Promotor von *GAL1*, von welchem auch der in dieser Arbeit verwendete Promotor *GalL* abgeleitet ist, führt zu einer Transkription dieses Gens. Durch die Bindung von Gal80 an Gal4 wird die Repression verhindert und die Bindung von Gal3 verhindert wiederum die Repression durch Gal80 (Bhat & Murthy, 2001). Neben der Regulation durch Gal3, Gal80 und Gal4 kann *GAL1* auch durch Mig1, ein Zinkfingerprotein, dessen Expression durch Glukose induziert wird, reprimiert werden (Nehlin & Ronne, 1990). Die Einführung von mehreren GAL-Promotoren in das Hefegenom kann zu genetischer Instabilität aufgrund der Neigung zu homologer Rekombination führen, was durch die Nutzung von GAL-Promotoren mit veränderten DNA-Sequenzen verhindert werden kann (Peng *et al.*, 2018).

1.2 Eisen-Schwefel-Cluster

Eisen-Schwefel-Cluster (Fe/S-Cluster) sind vielseitige metallhaltige Kofaktoren, die in einer Vielzahl von Proteinen und Enzymen in allen Domänen des Lebens vorkommen. Sie spielen eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl von biologischen Prozessen, darunter Energiegewinnung, DNA-Synthese und -Reparatur, Enzymkatalyse und der Regulation des

zellulären Redoxgleichgewichts (Lénon *et al.*, 2022). Dabei fand die Rekrutierung des Eisen-Schwefel-Clusters als Kofaktor sehr früh in der Evolution statt. Die im Vergleich zu anderen Metallen, welche als Kofaktor geeignet wären, hohe Abundanz von Eisen lässt eine frühe Entwicklung von eisenhaltigen Kofaktoren vermuten. Die Eisen-Schwefel-Cluster befinden sich in vielen Redoxenzymen der anaeroben Stoffwechselwege in Prokaryoten und Archäen und ermöglichten die Entstehung der Photosynthese, was wiederum die Sauerstoffkonzentration so stark erhöhte, dass die sauerstoffempfindlichen Fe/S-Cluster nun eine spezialisierte Maschinerie zur Biosynthese von Fe/S-Clustern benötigten (Baussier *et al.*, 2020). Dazu entwickelten sich Eisen-Schwefel-Cluster in verschiedenen Formen und atomaren Zusammensetzungen. Am häufigsten kommen in der Natur [2Fe-2S], [3Fe-4S] sowie [4Fe-4S]-Cluster vor (siehe Abbildung 1) (Beinert *et al.*, 1997). Allerdings können auch weitere Heteroatome und organische Moleküle vorliegen, so zum Beispiel Homocitrat und Molybdän, welche im komplizierten Eisen-Schwefel-Molybdän-Kofaktor (FeMoCo) der Nitrogenase vorkommen (McSkimming & Suess, 2021). Dieses Cluster ermöglicht es aus dem inerten N₂ der Atmosphäre das bioverfügbare NH₃ zu synthetisieren, weshalb Molybdän als Spurenelement indirekt für die Menschheit als essentielles Element für die Symbionten von Leguminosen relevant ist. Das ungewöhnliche Element Molybdän kann zudem von dem Element Vanadium oder Eisen ersetzt werden (Glazer & Kechris, 2009; Schmidt *et al.*, 2024). Auch Nickel wurde als Heteroatom in Eisen-Schwefel-Clustern, hier dem C-Cluster der Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase, in Form eines Ni-[4Fe-4S]-Clusters beschrieben (Hadj-Saïd *et al.*, 2015).

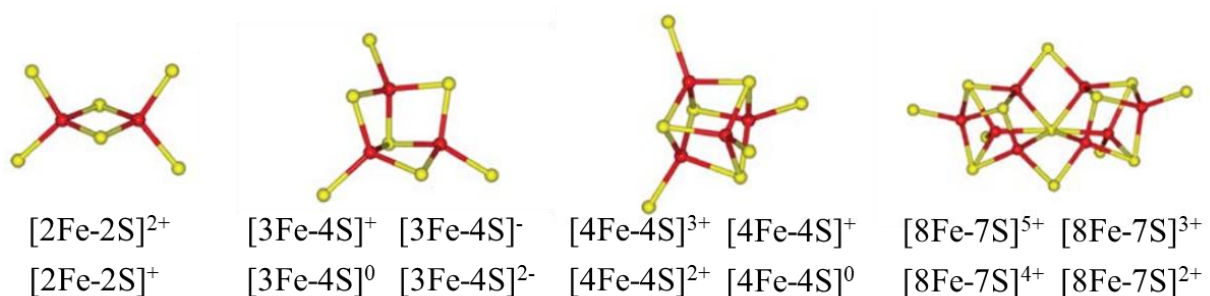


Abbildung 1: Strukturen und wichtigste Oxidationszustände von kristallografisch definierten Fe/S-Clustern. Gezeigt werden verschiedene Clusterkonfigurationen mit Eisen (rot) und Schwefel (gelb) [verändert nach (Johnson & Dean *et al.*, 2005)].

Diese Vielfalt von Fe/S-Clustern erlaubt auch eine Fülle von Eigenschaften und Funktionen. Ihre Fähigkeit Elektronen über die Eisen- und Schwefel-Atome zu delokalisieren bedingt ihre Eignung für ihre Hauptaufgabe des Elektronentransports, wie zum Beispiel bei der Photosynthese oder in der Atmungskette (Glaser *et al.*, 2000; Johnson & Dean *et al.*, 2005). Während üblicherweise ein Elektron übertragen wird, ermöglichen [8Fe-7S]-P-Cluster den Transport von zwei Elektronen gleichzeitig (Peters *et al.*, 1997). Ein anderes Beispiel für die

Vielfalt von Funktionen sind Enzyme, welche zur Radical **S**-Adenosylmethionin (SAM) Familie gehören. Diese Enzyme nutzen [4Fe-4S]-Cluster um aus SAM ein 5'-Desoxyadenosylradikal zu erzeugen, welches wiederum als Radikal eine Vielzahl an Reaktionen ermöglicht (Broderick *et al.*, 2014).

Nicht nur die atomare und geometrische Zusammensetzung der Eisen-Schwefel-Cluster ermöglicht eine Modulation der Eigenschaften. Auch die Liganden der Cluster ändern die Eigenschaften und somit Funktionen stark. Das Redoxpotential ist stark von den Liganden abhängig und neben der bekannten tetraedrischen Koordination der Eisenatome durch die Thiolgruppe von Cysteinen ist auch die Koordination durch Histidin, Asparaginsäure, Serin, Stickstoff der Peptidbindung zwischen Aminosäuren der Proteine und Heteromoleküle wie Wasser oder Glutathion möglich (Calzolari *et al.*, 1996; Hurley *et al.*, 1997; Hunsicker-Wang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009).

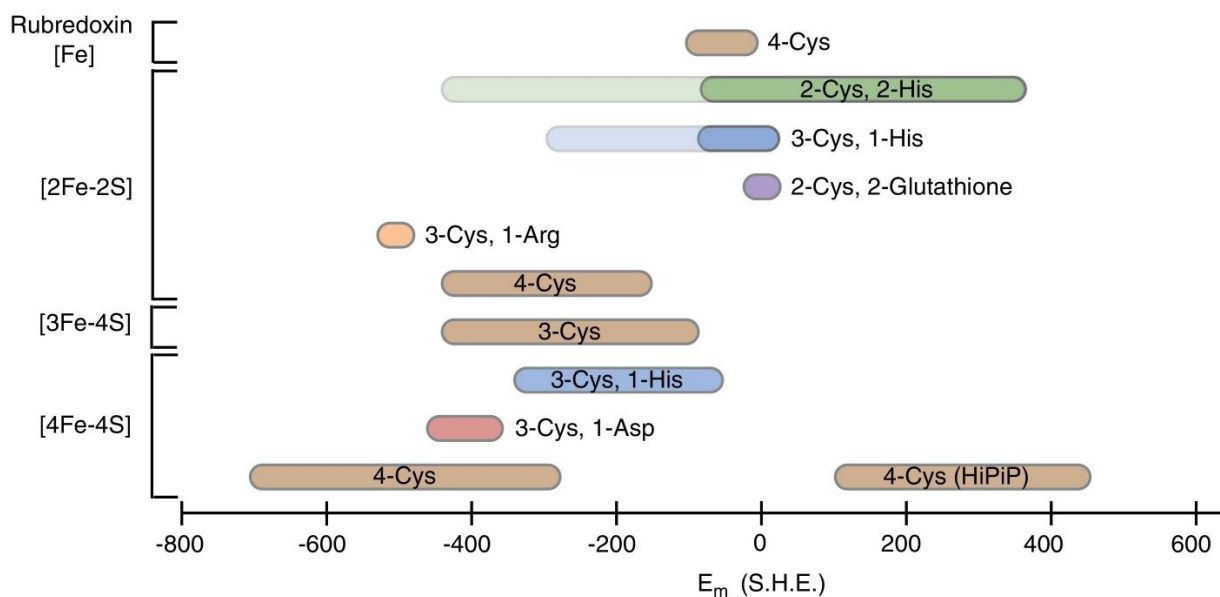


Abbildung 2: Redoxpotentiale verschiedener Fe/S-Cluster- und Ligandenkonfigurationen. Gezeigt sind Eisen-Schwefel-Cluster in verschiedenen, üblichen Konfigurationen und deren Redoxpotentiale (Bak & Elliott, 2014).

Neben der Zusammensetzung des Clusters selbst und der Einflüsse durch verschiedene Liganden ist, wie bei anderen Enzymen auch, die dreidimensionale Struktur des Proteins für die Eigenschaften relevant und das Zusammenspiel ermöglicht eine große Palette an Eigenschaften und „Finetuning“ (siehe Abbildung 2). Dieses „Finetuning“ des Redoxpotentials und weiterer Eigenschaften ermöglicht komplexe Systeme und ein Zusammenspiel von mehreren Elektronenübertragungen, welche unterschiedliche Redoxpotentiale voraussetzen, wie am Beispiel der Atmungskette zu sehen ist.

1.3 Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern

Eine Betrachtung der Biosynthese der verschiedenen Eisen-Schwefel-Kofaktoren zeigt, dass verschiedene Biosynthesewege für unterschiedliche Zellkompartimente und Organismen existieren. Es sind vier verschiedene Biosynthesewege bekannt:

- **Sulfur Utilisation Factor (SUF)**
- **Nitrogen Fixation (NIF)**
- **Iron-Sulfur-Cluster (ISC)**
- **Cytosolic Iron-Sulfur-Assembly (CIA)**

1.3.1 SUF- und NIF-Maschinerie

Das SUF- und das NIF-System sind in manchen Organismen an der Fe/S-Cluster-Biosynthese beteiligt. Das NIF-System kommt in Prokaryoten vor und wurde in *A. vinelandii* entdeckt, wo es für die Reifung der speziellen Eisen-Schwefel-Cluster für die Nitrogenase genutzt wird (Xu & Møller, 2011). Auch wenn dieses System in manchen Organismen vorkommt, welche keinen Stickstoff fixieren, zum Beispiel *Helicobacter pylori* und *Entamoeba histolytica*, so ist es trotzdem in den meisten Fällen eng an die Fähigkeit des Organismus zur Stickstofffixierung gebunden (Olson *et al.*, 2000; Ali *et al.*, 2004). Die nötige Schwefelquelle für die Biosynthese der Eisen-Schwefel-Cluster der Nitrogenase ist Cystein, welches mit Hilfe der NifS Cystein-Desulfurase bewerkstelligt wird (Zheng *et al.*, 1994). Das resultierende Persulfid wird daraufhin auf NifU übertragen, welches im weiteren Verlauf der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese eine Rolle spielt (siehe Abbildung 3) (Zheng *et al.*, 1993; Hu & Ribbe, 2016). NifU dient als Gerüst, auf welchem die Eisen-Schwefel-Cluster zusammengesetzt werden, während es selbst zwei [2Fe-2S]-Cluster mit ungeklärter Funktion besitzt (Fu *et al.*, 1994). Diese relativ einfachen grundlegenden Fe/S-Cluster-synthetisierenden Proteine werden durch weitere Proteine des Organismus ergänzt welche eine spezialisierte Rolle erfüllen können, wie zum Beispiel NfuA, welches als Fe/S-reifendes Protein unter Sauerstoffstress arbeiten kann (Angelini *et al.*, 2008). Auch mit anderen Fe/S-Biosynthesewegen kann eine Interaktion stattfinden. Teilweise ist es möglich die Funktion von IscU durch NifU durch Überexpression zu ersetzen, während IscS nicht durch NifS ersetzbar ist, aber NifU und NifS durch IscU beziehungsweise IscS ersetzbar sind (Dos Santos *et al.*, 2007). Zusammengefasst wird davon ausgegangen, dass Organismen mit NIF-Maschinerie diese als spezialisiertes System nutzen, während die ISC-Maschinerie als „housekeeping“-System dient (Johnson, Dos Santos & Dean, 2005).

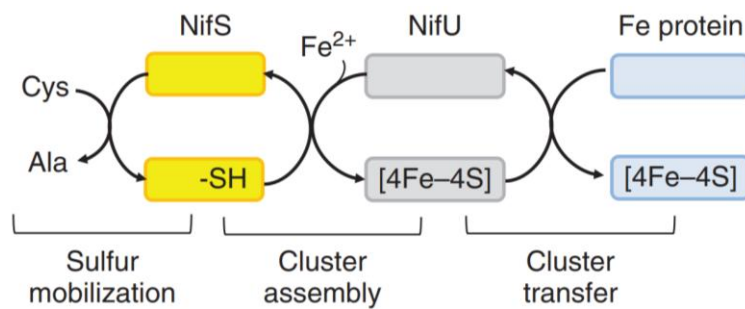


Abbildung 3: Hauptkomponenten der NIF-Maschinerie. Gezeigt sind die zwei mindestens benötigten Proteine zur Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese mit Hilfe der NIF-Maschinerie (Santos & Dean, 2011).

Die **Sulfur Utilisation Factor (SUF)**-Maschinerie ist ein weiteres weit verbreitetes System zur Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern (siehe Abbildung 4). Organismen, welche dieses System beinhalten sind vor allem Prokaryoten, manche Spezies wie *Staphylococcus aureus* oder *Mycobacterium tuberculosis* nutzen die SUF-Maschinerie sogar als einziges System zur Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern (Huet *et al.*, 2005; Boyd *et al.*, 2014; Mashruwala *et al.*, 2015). Aber auch in den Chloroplasten von Pflanzen ist dieses System auffindbar (Bai *et al.*, 2018). Es wird davon ausgegangen, dass in *E. coli* das SUF-System als Notfallsystem dient, um dem Organismus Resistenz gegenüber harschen Bedingungen wie Eisenmangel oder der Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies zu verleihen (Nachin *et al.*, 2003). Ähnlich anderen Systemen wird Cystein als Schwefelquelle genutzt. Dabei agiert SufS mit verschiedenen Partnern als Cystein-Desulfurase. Üblicherweise wird ein Dimer mit SufE gebildet, welches aber auch durch SufU funktionell ersetzt werden kann (Albrecht *et al.*, 2010). Die genaue Art der Übertragung des Eisens in diesem Biosyntheseweg ist ungeklärt.

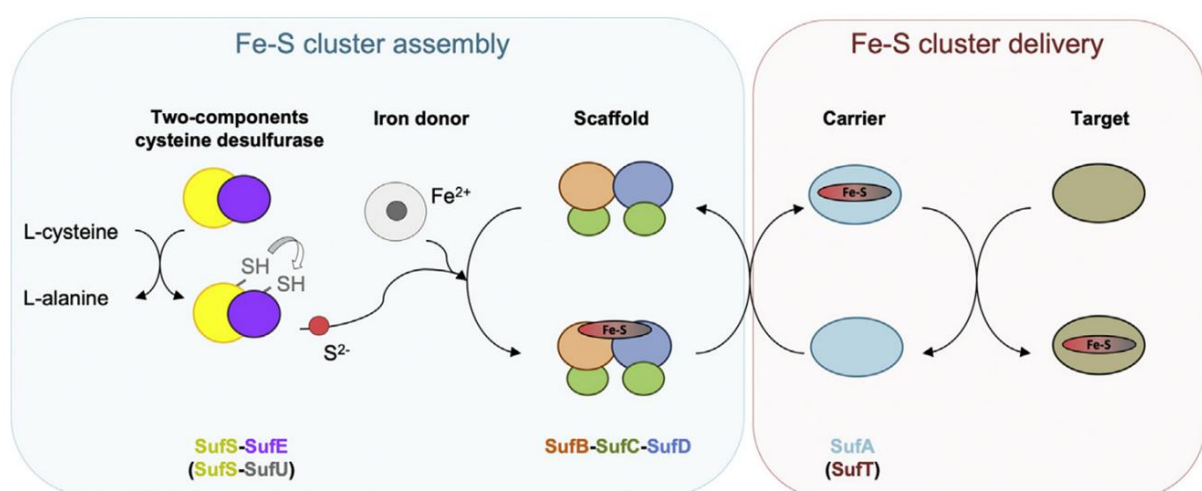


Abbildung 4: Überblick über die SUF-Maschinerie. Gezeigt sind die Hauptkomponenten der SUF-Maschinerie, aufgeteilt in Synthese (assembly) und Transport/ Lieferung (delivery) (Garcia *et al.*, 2019).

Schwefel und Eisen reagieren auf dem Gerüstkomplex SufBC₂D zu Eisen-Schwefel-Clustern. Der Proteinkomplex aus *E. coli* besitzt als Fe/S-Liganden des Proteins SufB neben der kanonischen Aminosäure Cys405 die Aminosäuren Glu434, His433 und/oder Glu432 (Yuda *et al.*, 2017). *In vitro* kann SufB sowohl [2Fe-2S] als auch [4Fe-4S]-Cluster an Apo-Zielproteine transferieren (Garcia *et al.*, 2019). SufC besitzt neben einem konservierten Glutamatrest strukturelle Ähnlichkeiten zu ABC-ATPasen und zeigt auch eine entsprechende ATPase-Aktivität. Eine Interaktion mit SufB und SufD erhöht diese ATPase-Aktivität das bis zu 180-fache (Petrovic *et al.*, 2008). SufD ist in vielen Organismen als Paralog von SufB vorhanden, bindet aber alleine kein Eisen-Schwefel-Cluster. Während eine Struktur kristallografisch bestimmt wurde und die Funktion ein Thema in der aktuellen Forschung ist, ist sie dennoch weiterhin ungeklärt (Badger *et al.*, 2005; Veronesi *et al.*, 2024). Der physiologisch relevante Komplex SufBC₂D kann durch Konformationsänderungen die Position des Fe/S-Liganden Cys405 so verändern, dass dieser nach außen freiliegend ist, was wahrscheinlich die Funktion der Fe/S-Synthese moduliert (Hirabayashi *et al.*, 2015). Neben dem Gerüstkomplex existieren auch die Transportproteine SufA und SufT (Gupta *et al.*, 2009; Mashruwala & Boyd, 2018).

1.3.2 ISC-Maschinerie

Die Bäckerhefe, welche im Verlauf dieser Arbeit als Modellorganismus dient, besitzt zwei Systeme zur Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern. Wegen der Nutzung von *S. cerevisiae* als Hauptorganismus in dieser Arbeit, wird ab hier auch, wenn möglich, der Name des in Hefe exprimierten Proteins verwendet oder angegeben. Nachdem in den 90er Jahren die NIF-Maschinerie gefunden wurde, wurde kurz darauf auch die ISC-Maschinerie entdeckt, ausgehend von der Beobachtung, dass in *Azotobacter vinelandii* eine „loss of function“ Mutation der SUF-Maschinerie nicht letal war (Zheng *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 2024). Die ISC-Maschinerie der Bäckerhefe ist in den Mitochondrien lokalisiert (siehe Abbildung 5). Wie auch die SUF- und NIF-Maschinerie benötigt die ISC Maschinerie eine Cystein-Desulfurase. Nfs1, ein Homolog des bakteriellen IscS, stellte sich als diese Desulfurase mit ähnlicher Aktivität zu NifS und dem gleichen Kofaktor, PLP, heraus (Flint, 1996). Nfs1 bildet einen Komplex mit Isd11, welches für die Funktion als Sulfidonor der Fe/S-Biosynthese essentiell und weit verbreitet in Eukaryoten ist, aber nicht in Bakterien vorkommt (Wiedemann *et al.*, 2006). Neben dieser Funktion kann IscS auch Schwefel für andere Stoffwechselwege wie die Thiamin-Synthese liefern (Shi *et al.*, 2010). Zusätzlich ist Acp1 an der Persulfid-Biosynthese aus Cystein beteiligt und somit für das ISC essentiell (Pandey *et al.*, 2024). Umstritten ist die Funktion des Frataxin-Homologs Yfh1, welches Eisen in Form von Fe²⁺ binden kann, als Eisendonator (Gakh *et al.*, 2008; Lill & Freibert, 2020). Isu1 bildet das Gerüst, welches die

Bildung von Fe/S-Clustern erlaubt. Dabei kann es mit mehreren Proteinen des ISC-Systems interagieren. Das Ferredoxin Yah1 und die Ferredoxinreduktase Arh1, neben ihrer Funktion in der Biosynthese von Häm-a, liefern die benötigten Elektronen zur Reduktion von Schwefel zu Sulfid indem Arh1 zuerst von NADPH reduziert wird, welches dann wiederum das [2Fe-2S]-Protein Yah1 reduziert, welches das Elektron an den Isu1-Komplex weitergibt (Alves *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2024). Das dort gebildete Fe/S-Cluster wird durch die Interaktion mit dem Chaperon Ssq1 freigesetzt, wobei das Kochaperon Jac1 sowie der Nukleosidaustauschfaktor Mge1 auch an diesem Prozess beteiligt sind (Dutkiewicz *et al.*, 2006). Das zur CGFS-Untergruppe zugehörige Monothiol-Glutaredoxin Grx5 ist auf bisher ungeklärte Weise an einem Transferprozess der Fe/S-Cluster vom Isu1-Gerüstkomplex auf Zielproteine beteiligt (Lillig *et al.*, 2008). Es konnte festgestellt werden, dass Grx5 mit Isa1 interagiert und durch eine Überexpression von Isa1 oder Isa2 in $\Delta grx5$ -Zellen den entstandenen Wachstumsphänotyp wieder rückgängig macht (Kim *et al.*, 2010). Diese Proteine Isa1 und Isa2 bilden einen Komplex mit Iba57, welcher die Synthese eines [4Fe-4S]-Clusters aus einem Edukt, welches wahrscheinlich durch Grx5 transportiert wird, ermöglicht. Dabei ist es je nach Oxidationszustand des [2Fe-2S]-Edukts denkbar, dass kein Elektronendonator für diese Reaktion nötig ist (Braymer & Lill, 2017). Je nach Zielprotein ist die Nutzung von weiteren Cluster-bindenden Proteinen zur Übertragung der Cluster nötig. Neben dem Isa1-Isa2-Iba57-Komplex wurde ein weiteres Protein als mögliches Gerüstprotein zur [4Fe-4S]-Synthese vorgeschlagen, wobei dessen Fähigkeit zur [4Fe-4S]-Synthese als Homodimer und der Bereitstellung der Edukte durch einen Grx5-Bol3-Komplex experimentell aufgezeigt wurde (Nasta *et al.*, 2020). Ein Zusammenhang zwischen der Fe/S-Biosynthese, Ind1 und dem Cluster-Gehalt von Komplex I konnte in Eukaryoten mit einem membranständigen Komplex I festgestellt werden (Bych *et al.*, 2008). Eine Versorgung mit Eisen wird durch den Importer Mrs3/4 gewährleistet, während Atm1 vermutlich den Export eines noch ungeklärten Stoffes für die zytosolische Fe/S-Synthese ermöglicht (Srinivasan *et al.*, 2014). Atm1 ist ein essentieller ABC-Transporter, welcher zusammen mit GSH funktioniert (Sipos *et al.*, 2002).

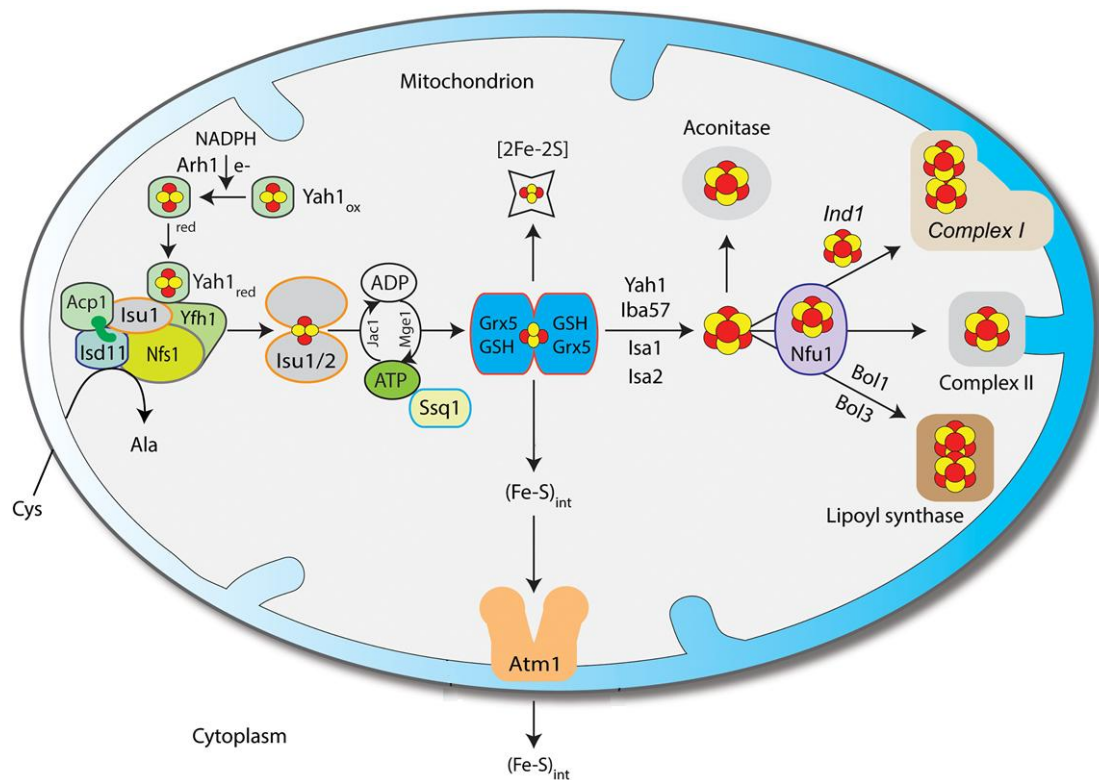


Abbildung 5: Proteine der ISC-Maschinerie. Gezeigt sind die bisher bekannten beteiligten Proteine an der mitochondrialen Fe/S-Biosynthese, der ISC-Maschinerie in Hefe. Das uncharakterisierte exportierte Intermediat wurde als $(\text{Fe-S})_{\text{int}}$ gekennzeichnet (abgeändert nach Dancis *et al.*, 2024).

Neben der Synthese und dem Transfer von Eisen-Schwefel-Clustern ist für ein funktionierendes Fe/S-Protein die Faltung auch essentiell, zumal Apo-Fe/S-Proteine oft instabiler als Holoenzyme sind und somit schnell degradiert werden können. Dieser Prozess ist für Fe/S-Proteine noch wenig untersucht. Während frühere Studien einen Zusammenhang zwischen der Expression von Chaperonen und der Reifung von Aconitase in *E. coli* zeigten (Gupta *et al.*, 2006), kamen neuere Studien zu dem Schluss, dass das Chaperon Hsp90 und Chaperone der J-Protein Familie nicht an der Fe/S-Biogenese beteiligt sind (Carvalho *et al.*, 2023).

1.3.3 CIA-Maschinerie

Während die ISC-Maschinerie für die Biogenese und den Einbau von Fe/S-Kofaktoren der mitochondrialen Fe/S-Proteine benötigt wird, ist für die Reifung der zytosolischen und nukleären Fe/S-Proteine die CIA-Maschinerie (siehe Abbildung 6) unerlässlich. Diese Gruppe von Proteinen zeigt eine starke Konservierung zwischen dem Menschen und dem Modellorganismus Hefe. Im Gegensatz zu allen anderen Fe/S-Biogenese-Systemen fehlt ihr jedoch die Möglichkeit Sulfid mit Hilfe einer Cystein-Desulfurase zu erzeugen. Diese Aufgabe

wird hingegen von einem unbekannten Stoff übernommen, welcher aus den Mitochondrien mit Hilfe des Transporters Atm1 exportiert wird, was auch dazu führt, dass die CIA-Maschinerie nur unter Anwesenheit einer funktionierenden ISC-Maschinerie Eisen-Schwefel-Cluster erzeugen kann (Lill *et al.*, 2015). Die Proteine der zentralen ISC-Maschinerie sind essentiell für die Funktion des CIA-Systems (Lill *et al.*, 2012). Es konnte in Experimenten gezeigt werden, dass eine Ligation von [2Fe-2S]-Clustern durch GSH möglich ist, aber ein ausschließlich an GSH gebundener Kofaktor wahrscheinlich nicht der exportierten Form entspricht (Qi *et al.*, 2012; Lill *et al.*, 2015). Alternativ wurde die Vermutung aufgestellt, dass GSSG oder GSSSG als Exportmolekül dienen, was allerdings unwahrscheinlich erscheint, da die Glutathionoxidoreduktase Glr1 im Zytosol GSH zu GSSG oxidieren kann (Schaedler *et al.*, 2014). Trotzdem ist eine Abhängigkeit der Fe/S-Biosynthese von GSH eindeutig festzustellen und die genauen Zusammenhänge sind noch unklar (Kumar *et al.*, 2011). Die Abhängigkeit der CIA- von der ISC-Maschinerie legt auch eine Kommunikation der beiden Biosynthesewege nahe. Die P-loop ATPasen Nbp35 und Cfd1 bilden einen heterotetrameren Gerüstkomplex, auf welchem transiente [4Fe-4S]-Kofaktoren synthetisiert werden (Netz *et al.*, 2007; Pallesen *et al.*, 2013). Zudem besitzt Nbp35 neben dem transienten [4Fe-4S]-Kofaktor, welcher die Komplexpartner verbrückt, einen weiteren [4Fe-4S]-Kofaktor im N-terminalen Bereich von Nbp35 (Netz *et al.*, 2012). Die ATPase-Domäne ist essentiell für die Beladung des Komplexes mit Fe/S-Clustern, allerdings ist der genaue Mechanismus unbekannt (Netz *et al.*, 2012). Zur Clustersynthese werden Elektronen benötigt, welche von der Diflavin-Reduktase Tah18 und dem Fe/S-Protein Dre2 *in vitro* mit Hilfe von einem [2Fe-2S] auf das Zielprotein übertragen werden (Netz *et al.*, 2010). Dre2 besitzt zusätzlich einen [4Fe-4S]-Kofaktor und zeigt eine Lokalisierung in der Nähe der Mitochondrien auf (Peleh *et al.*, 2014). Nach der frühen CIA-Maschinerie werden Cluster vom Gerüstkomplex auf das Fe-Fe-Hydrogenase-ähnliche Protein Nar1 übertragen. Die zwei Cluster von Nar1 unterscheiden sich in mehreren Eigenschaften. Zum Einen unterscheidet sich die Stabilität, zum anderen ist eines der Cluster in Nähe der Proteinoberfläche gebunden (Urzica *et al.*, 2009). Forschungsergebnisse zeigten, dass Nar1 mit Nbp35, Cfd1 und dem CIA-Targeting-Complex (CTC) aus Cia1, Cia2 und Met18 einen schwach gebundenen Komplex als Metabolon bildet, welcher durch äußerliche Einflüsse reguliert werden kann und auf das Fe/S-Cluster in Nar1 angewiesen ist (Fan *et al.*, 2022). Es ist bekannt, dass die humanen Homologe der CTC-Proteine auf definierte Zielproteine spezialisiert sind (Paul & Lill, 2015). Das humane CIA-Protein CIA2A ist zusammen mit dem Eisenregulationsfaktor IRP2 an der Eisenhomöostase beteiligt, jedoch existiert kein Homolog hierzu in der Bäckerhefe (Paul & Lill, 2014). Neben dem „branching“ des CTC existieren weitere spezialisierte Adaptorproteine, Yae1 und Lto1, welche für die Reifung von Rli1 essentiell sind und ihr konserviertes Tryptophan zur Interaktion mit dem CTC nutzen (Paul *et al.*, 2015). Es gibt noch viele offene Fragen zur Interaktion zwischen Zielproteinen und der

CTC, wobei kürzlich die Flexibilität von Met18, sowie eine Bindung des Zielproteins an eine konservierte Stelle von Cia1 als wichtige Bestandteile dieses Prozesses definiert werden konnten (siehe Abbildung 7) (Kassube & Thomä, 2020). Zudem zeigte sich das C-terminale Tryptophan im LDW-Motiv als ausschlaggebendes Merkmal zur Erkennung von ca. 25 % aller Zielproteine (Marquez *et al.*, 2023).

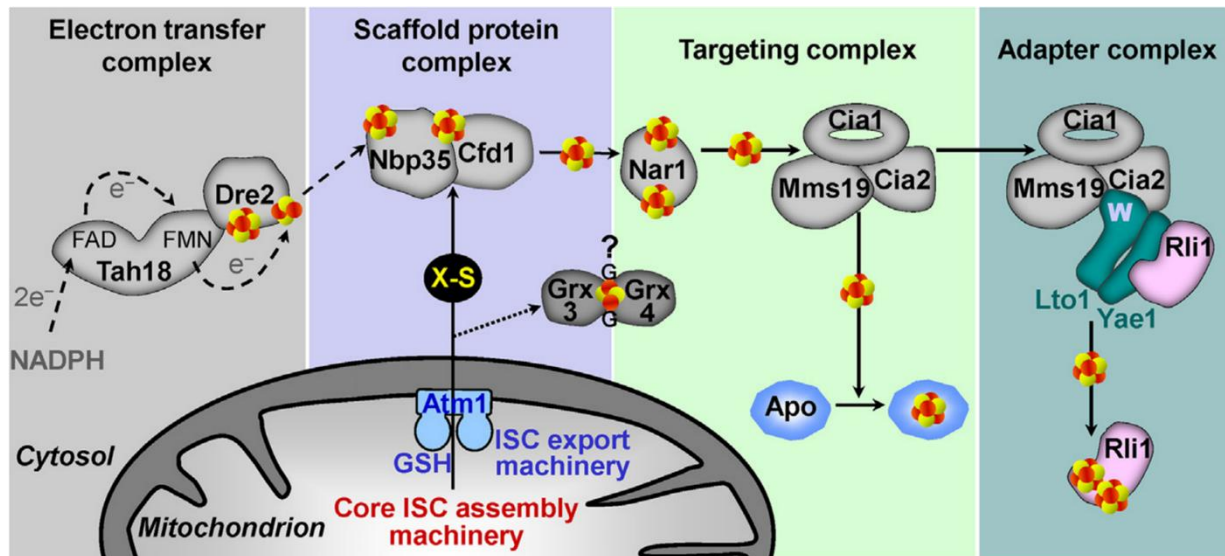


Abbildung 6: Proteine der CIA-Maschinerie. Gezeigt ist der Prozess der Biosynthese von Fe/S-Clustern im Zytosol von Hefe. Dabei ist die Funktion von Grx3/4 nicht endgültig geklärt, und Yae1/Lto1 ist, soweit bisher bekannt, nur für das Zielprotein Rli1 nötig. Das CTC-Protein MMS19 entspricht Met18 aus *S. cerevisiae* (abgeändert nach Lill *et al.*, 2015).

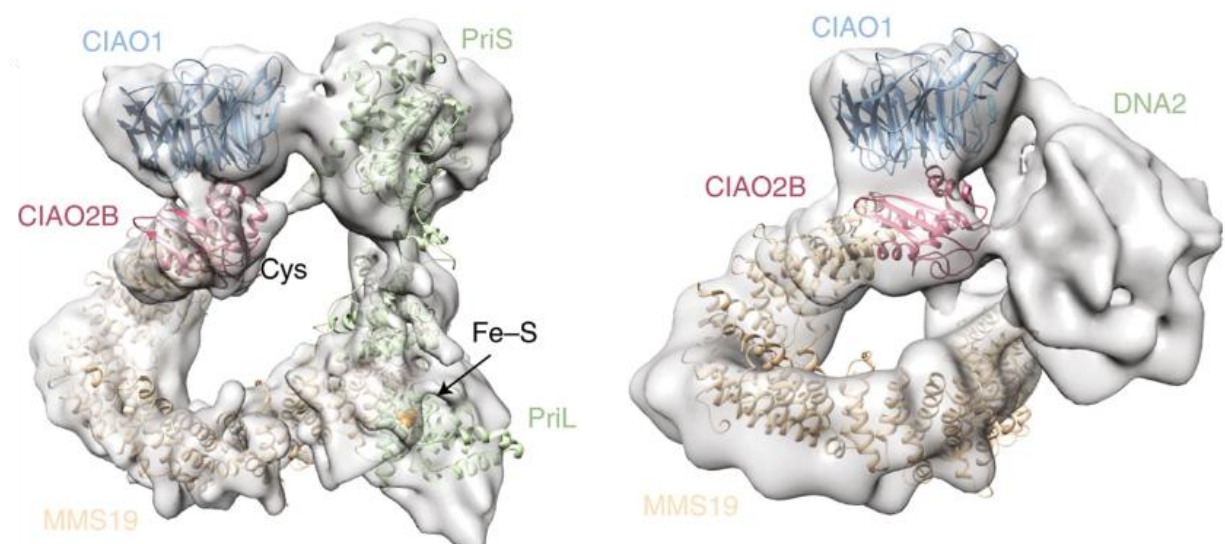


Abbildung 7: Cryo-EM des CIA-targeting-Complex aus *H. sapiens*. Gezeigt sind zwei Cryo-EM-Strukturen, wobei die drei CIA-Proteine CIAO1, CIAO2B und MMS19 (Cia1, Cia2 und Met18 in *S. cerevisiae*) an zwei verschiedene Klientenproteine gebunden ist (PriS-PriL links, Dna2 rechts), ermöglicht durch die hohe Flexibilität von MMS19 (Kassube & Thomä, 2020).

Eine Störung der humanen Fe/S-Biosynthese hat eine Vielzahl an Auswirkungen (siehe Abbildung 8) und löst zum Beispiel schwerwiegende Krankheiten wie die Friedreich-Ataxie aus (Monfort *et al.*, 2022). In vielen Fällen führt es zur Apoptose, da Eisen-Schwefel-Cluster-Protein an vielen essentiellen Prozessen beteiligt sind. Bei teilweiser Störung wird eine Kaskade an regulatorischen Effekten ausgelöst, die den Symptomen einer Eisendepletion ähnelt (siehe Abbildung 8). Im humanen Proteom konnte eine Verbindung zwischen dem humanen Cia2-Homolog CIA2A und dem Fe/S-Protein IRP1, welches eine essentielle Rolle für die Eisenhomöostase spielt gezeigt werden. Die Regulation ist aber nicht nur auf den Einbau von Fe/S-Clustern beschränkt, wie die Stabilisierung von IRP2 durch CIA2A zeigt (Stehling *et al.*, 2013). Das zweite humane Cia2-Homolog CIAO2B ist hierbei für die Reifung anderer Fe/S-Proteine zuständig und die Depletion von humanem CIA1, CIA2A und CIAO2B zeigt keinen Effekt auf die mitochondrialen Fe/S-Proteine Aconitase und Succinat-Dehydrogenase (SDH) (Albrecht *et al.*, 2010; Stehling *et al.*, 2013). Diese Beobachtungen sind auch ein Beispiel für das „branching“, was eine Spezialisierung der späten CIA-Proteine auf spezifische Fe/S-Proteine vermuten lässt. Die Beteiligung der CIA-Maschinerie in der Eisenhomöostase der Hefe konnte bereits aufgezeigt werden, wobei Experimente sogar die Einbeziehung der Fe/S-Biosynthese als Zwischenschritt der Regulation implizieren, wobei immer noch offene Fragen hierzu existieren (Chen *et al.*, 2004).

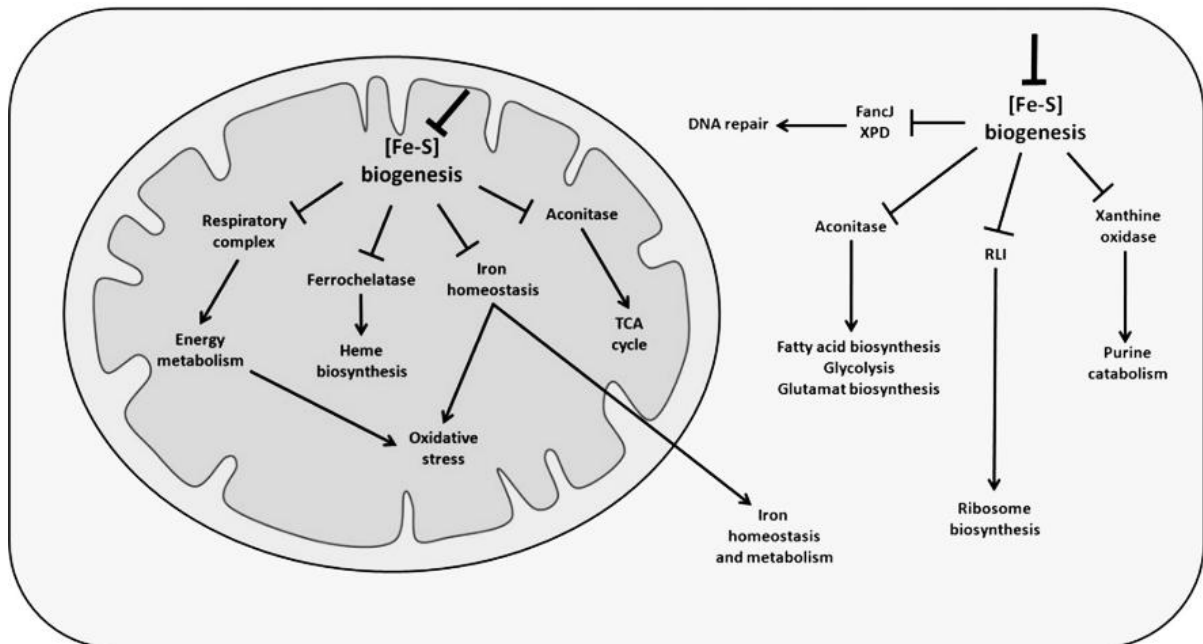


Abbildung 8: Effekte auf zelluläre Prozesse durch Beeinträchtigung der Fe/S-Biosynthese. Gezeigt sind die Stoffwechselwege, auf welche sich eine Fe/S-Defizienz auswirkt (Xu & Møller, 2011). Neben der DNA-Reparatur ist auch die DNA-Synthese durch Pol1, Pol2 und Pol3 reprimiert.

1.4 Eisenhomöostase in *S. cerevisiae*

Die Auswirkungen von Eisen- und Eisen-Schwefel-Depletion sind teilweise ähnlich. Die Eisenhomöostase wird durch ein komplexes System aus vielen Proteinen sowohl durch Kontrolle der Transkription und Translation, als auch in späteren Schritten beeinflusst (siehe Abbildung 9). Die Eisenaufnahme wird aber nicht nur durch das klassische Eisenregulon moduliert, sondern vermutlich auch durch weitere Signalwege (Martins, Costa & Pereira, 2018). Eine strikte Kontrolle der Fe^{2+} -Abundanz ist besonders wichtig, da dieses per Fenton-Reaktion für die Zelle gefährliche Radikale erzeugen kann und Hefe kein Eisen ausscheiden kann, sondern nur die Aufnahme regulieren kann (MacKenzie *et al.*, 2008). Unter Eisen-Sättigung wird die Aufnahme von Eisen durch das „low affinity“ System, bestehend aus den konstitutiv exprimierten Metallionentransporter Smf1 und dem Eisentransporter Fet4, durchgeführt (Martins, Costa & Pereira, 2018). Überschüssiges Eisen wird durch den $\text{Fe}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -Transporter Ccc1 in die Vakuole importiert, wobei eine Verbindung zu den Eisentransportern Mrs3 und Mrs4 besteht, da der Phänotyp durch die Deletion eines der Gene durch die Überexpression des jeweils anderen Proteins gerettet werden kann, was auch impliziert, dass verschiedene Kompartimente der Zelle den selben Vorrat an Eisen nutzen (Li & Kaplan, 2004). Bei hohen Eisenkonzentrationen induziert der eisenabhängige Transkriptionsfaktor Yap5 die Transkription von Ccc1, dem Glutaredoxin Grx4, dem Fe/S-Protein Tyw1 und dem kupferbindenden Metallothionein Cup1. Dabei wurde postuliert, dass Grx4 und Tyw1 überschüssiges Eisen in Form von Fe/S-Clustern absondern (Li *et al.*, 2011). Das Glutaredoxin Grx3 und Grx4 wirken außerdem über die Inhibition der Transkriptionsfaktoren Aft1 und Aft2, welche bei geringen Eisenkonzentrationen wirken (Ojeda *et al.*, 2006; Poor *et al.*, 2014). Die Lokalisierung wird als Reaktion auf die Eisenkonzentration durch die Karyopherine Pse1 und Msn5 gesteuert, wobei Msn5 bei hoher Eisenkonzentration Aft1/2 aus dem Nukleus exportiert, während Pse1 konstant importiert (Ueta *et al.*, 2007). Auch die eisenregulierten Repressoren Fra1 und Fra2 sind an diesem Prozess beteiligt. Da auch Eisen-Schwefel-Cluster an diesem Prozess beteiligt sind wurde der Zusammenhang zwischen Fe/S-Biosynthese und Eisenhomöostase untersucht, wobei festgestellt wurde, dass die Eisenhomöostase von dem ISC-, aber nicht vom CIA-System abhängig ist (Chen *et al.*, 2004; Rutherford *et al.*, 2005). Währenddessen ist die Rolle von Cup1 ungeklärt. Ccc1 wird außerdem durch die Transkriptionsfaktoren Msn2 und Msn4, sowie den Glukosesensor Snf1 reguliert (Li *et al.*, 2017).

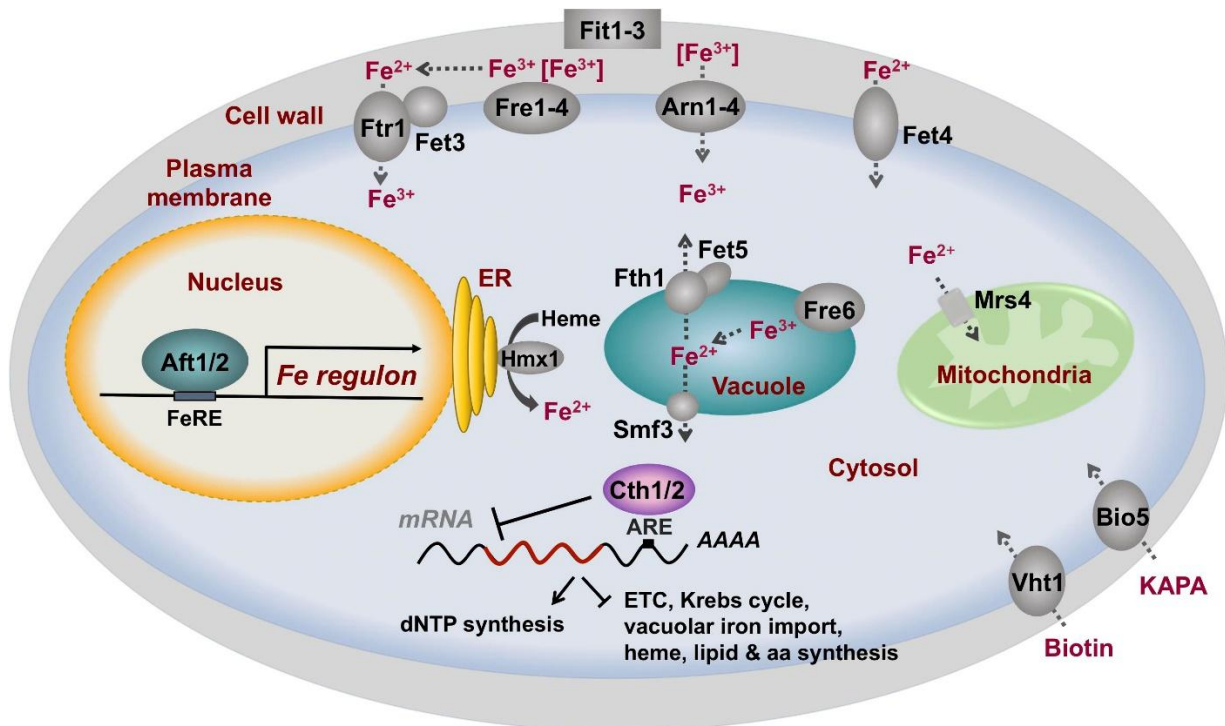


Abbildung 9: Zusammenfassung der an der Eisenhomöostase von *S. cerevisiae* beteiligten Proteine. Gezeigt sind Proteine und Prozesse, welche Teil der Eisenhomöostase, oder durch sie beeinflusst sind (Ramos-Alonso *et al.*, 2020).

Unter eisendepletierten Bedingungen wird Fe^{3+} durch die Reduktasen Fre1 und Fre2 zu Fe^{2+} reduziert und durch einen Komplex aus der Oxidoreduktase Fet3 und der Eisenpermease Ftr1 ins Zytosol transportiert, oder als Fe^{3+} -Siderophor-Komplex mit Hilfe von des Transportkomplexes Arn1-4 durch die Membran transportiert (Stearman *et al.*, 1996; Heymann *et al.*, 2000). Siderophorgebundenes Eisen kann auch durch Fre1-Fre4 reduziert werden und durch den Fet3-Ftr1-Komplex importiert werden. Auch die Zellwandproteine Fit1-3 sind in den Import involviert (Protchenko *et al.*, 2001). Niedrige Eisenkonzentrationen führen zu einer erhöhten Expression aller genannten „high-affinity“-Proteine, wobei bei oxidativem Stress vermehrt Fe^{3+} und unter anaeroben Bedingungen vermehrt Fe^{2+} importiert wird. Zellen, deren Hämbiosynthese durch eine Deletion des Hämbiosynthesegens *HEM1* gehemmt ist, exprimieren kein Fet3 und Ftr1 (Crisp *et al.*, 2003). Bei einer Unterversorgung mit Eisen wird zuerst der Eisenbedarf der Mitochondrien gedeckt, indem die Importer Mrs3/4 aktiviert werden, welche zusätzlich zu Eisen auch Cu^{2+} mit ähnlicher Affinität transportieren können (Froschauer *et al.*, 2009). Weitere durch Eisenmangel induzierte Gene sind *FRE6* (Metallreduktase der Vakuole), *FET5* und *FTH1* („high affinity“ Eisentransport), *SMF3* („low affinity“ Transporter), sowie *CTH1* und *CTH2*, welche Proteine kodieren, die einen Abbau der mRNA von Proteinen aus eisennutzenden Stoffwechselwegen, wie der Atmungskette und Hämsynthese, erhöht (Singh *et al.*, 2007; Puig *et al.*, 2008). Ein Eisenmangel erhöht auch die Abundanz der Hämoxygenase Hmx1, welche durch Hämdegradation die Aktivität der Transkriptionsfaktoren Hap1/2/3/4/5 verringert, wodurch wiederum die Transkription von Genen des aeroben

Wachstums wie eisenreiche Cytochrome verringert, während die Hämkonzentration wiederum eine Reihe an weiteren Auswirkungen auf das Proteom der Zelle hat (Kwast *et al.*, 1998). Die sphingolipidaktivierbaren Proteinkinasen Pkh1 und Ypk1 sind Mediatoren der Eisentoxizität (Lee *et al.*, 2012). Auch das an der Sphingolipidbiosyntheseprotein Sur2 ist an der Eisenhomöostase beteiligt. Die mitochondriale Phospholipase Ddl1 wird auch durch Aft1/2 reguliert, was auf die Beteiligung von bioaktiven Lipiden in der Eisenhomöostase hindeutet (Yadav & Rajasekharan, 2016).

Eine weitere Möglichkeit der Eisenregulation involviert die Proteinkinase A (PKA), ein Tetramer aus Bcy1, Tpk1, Tpk2 und Tpk3. Der Mechanismus der Regulation ist ungeklärt, aber es konnte beobachtet werden, dass eine Deletion von *TPK2* die Expression vieler Eisentransportproteine wie Ftr1 induziert (Schothorst *et al.*, 2017). Eine bisher nicht bis ins Detail geklärte Rolle hat auch die Proteinkinase Hog1 in der Eisenhomöostase, wo es an der Phosphorylierung von Aft1 beteiligt ist (Martins & Pereira *et al.*, 2018). Auch wurde inzwischen die Rolle von GSH in der Eisenhomöostase beschrieben, wobei hier die Übergänge zwischen Fe/S- und GSH-vermittelter Eisenhomöostase fließend ist, da zum Beispiel GSH für den Export des Fe/S-Präkursors benötigt wird (Daniel *et al.*, 2020). Obwohl Schlüsselproteine der Eisenhomöostase wie Aft1/2 inzwischen beschrieben und charakterisiert sind, existieren immer noch viele offene Fragen zur Regulierung der Eisenaufnahme, Eisenverteilung und Beteiligung von Signalwegen.

1.5 Extramitochondriale Eisen-Schwefel-Proteine

Neben den Proteinen der CIA-Maschinerie, welche selbst fest oder transient gebundene Eisen-Schwefel-Cluster enthalten, sind bisher 19 weitere zytosolische und nukleäre Eisen-Schwefel-haltige Proteine in *S. cerevisiae* identifiziert worden. Diese sind alle auf die CIA-Maschinerie angewiesen um von ihrer Apoform in ihre Holoform versetzt zu werden. In den folgenden Abschnitten werden diese 19 Fe/S-Proteine und deren Funktion beschrieben.

1.5.1 DNA-Instandhaltung durch Polymerase α , ϵ , δ und ζ

Eisen-Schwefel-Cluster sind an der DNA-Synthese und Replikation, sowie der Erhaltung der Genomstabilität beteiligt. Die Replikation von doppelsträngiger DNA wird im Nukleus von Eukaryoten von den drei Polymerasekomplexen Pol α , Pol δ und Pol ϵ durchgeführt. Zur Nutzung der Polymeraseaktivität wird ein Primer benötigt, welcher von der Primase an der ssDNA synthetisiert wird. Bevor diese Proteine jedoch an die DNA binden, muss diese erst durch andere Proteine vorbereitet werden. Dabei ist dieser Prozess in eukaryotischen Organismen wesentlich komplexer als in Prokaryoten, in welchen er detaillierter untersucht wurde (Johnson & O'Donnell, 2005). Die Polymerasen δ und ϵ benötigen zur Bindung einen AAA+ „clamp-loader“ (RFC-Komplex), welcher zusammen mit einem Ringklemmenprotein (PCNA) unter ATP-Verbrauch die Polymerase an die DNA bindet (Bowman *et al.*, 2004). Aktuelle Studien legen nahe, dass eine der Aufgaben von [4Fe-4S]-Kofaktoren in DNA-prozessierenden Proteinen die Nutzung als Redoxschalter sein könnte, da die DNA-Affinität des Kofaktors um einen Faktor von ~500 durch den Redoxzustand geändert werden kann (Barton *et al.*, 2019). Auch wurde der DNA-vermittelte Ladungstransfer als Mechanismus für die DNA-Schadensüberwachung vorgeschlagen (Barton *et al.*, 2019).

Pri2 und **Pol1** sind an der DNA-Instandhaltung beteiligt. Nach der Auftrennung der dsDNA durch Helikase und andere Proteine wie die Topoisomerase bei der DNA-Replikation kann Pol α , bestehend aus Pol1 und Pol12, zusammen mit den Primasen Pri1 und Pri2 einen Komplex bilden um an die ssDNA zu binden (Yuan *et al.*, 2023). Dabei ist die Aufgabe einer Primase ein kurzes komplementäres Stück RNA zu erzeugen, welches von der Polymerase α als Ansatzstelle für die Elongation genutzt werden kann. Dabei besitzen Pol1 und Pri1 die DNA-Polymerase bzw. RNA-Primase Aktivität, während Pol12 als Plattform zur Assemblierung des Komplexes und Pri2 als flexibles Scharnier, welches das katalytische Zentrum von Pol1

stabilisiert, eine strukturelle oder regulatorische Aufgabe erfüllen (Yuan *et al.*, 2023). Die Primasen Pri1 und Pri2 synthetisieren zuerst einen RNA-Primer aus 10 nt, welcher daraufhin mit Hilfe der Polymerase α durch ein 15-20 nt langes DNA-Segment verlängert wird, wodurch ein 25-30 nt langes RNA/DNA-Hybridsegment entsteht (Klinge *et al.*, 2009). Die Untereinheit Pri2 enthält ein redoxaktives [4Fe-4S]-Cluster, welches von Cys336, Cys417, Cys434 und Cys474 ligiert wird (siehe Abbildung 10) (Sauguet *et al.*, 2010). Dieses Cluster könnte laut Studien genutzt werden um die Bindung der Primase an die DNA zu modulieren, wobei das oxidierte $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Cluster eine deutlich erhöhte Affinität zur DNA aufweist als die reduzierte Form (Salay *et al.*, 2022). Aufgrund dieses Effekts wird vermutet, dass das Fe/S-Cluster von Pri2 als Redoxschalter dient, welcher nach der Synthese des Primers ein Elektron vom Fe/S-Cluster von Pol1 erhält, wodurch sich die Affinität von Pri2 zur DNA verringert, das aktive Zentrum der Primase sich von der DNA löst und die Polymerase-Untereinheit des Komplexes die DNA-Synthese weiterführen kann (O'Brien *et al.*, 2017). Zur Übertragung der Elektronen könnten sowohl die DNA, als auch eine Reihe an Tyrosinresten von Pri2 zuständig sein (O'Brien *et al.*, 2018; Salay *et al.*, 2022).

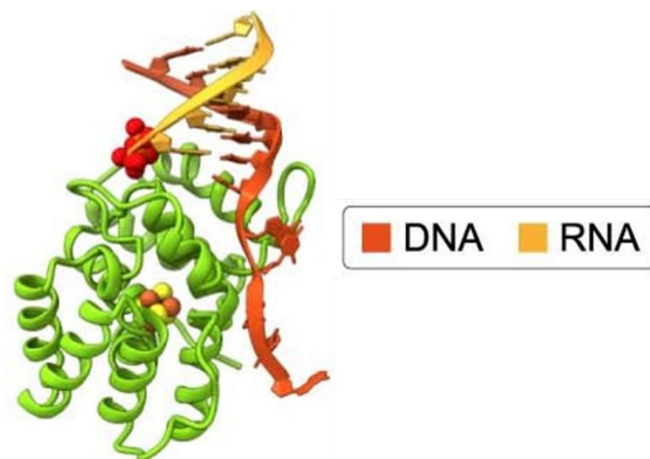


Abbildung 10: PRIM2, gebunden an einen RNA/DNA-Heteroduplex. Gezeigt ist eine Kristallstruktur des humanen Homologs von *S. cerevisiae* Pri2, PRIM2, gebunden an einen RNA/DNA-Heteroduplex (Mullins *et al.*, 2024).

Pol1, mit einem Molekulargewicht von 167 kDa, kann *in vitro* ein sehr labiles [4Fe-4S]-Cluster binden, weshalb frühere Experimente stattdessen ein ligiertes Zinkion implizierten. Später konnte nachgewiesen werden, dass das erste konservierte cysteinhaltige Motiv (CysA) ein Zinkion ligiert, während die Aminosäuren Cys1348, Cys1353, Cys1367 und Cys1372 des CysB-Motivs das 4Fe4S-Cluster ligieren können (Klinge *et al.*, 2009; Netz *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Pol12 die Eiseninkorporation in der C-terminalen-Domäne von Pol1 erhöht, was unter anderem durch eine Beteiligung von Pol12 an der Clusterinkorporation hinweisen könnte (Netz *et al.*, 2011). Es ist unbekannt, ob der Mechanismus der Bindung an Leit- und Folgestrang der DNA identisch ist. Das Adaptorprotein

Ctf4 unterstützt die Polymerase α bei der Initiation der DNA-Replikation (Porcella *et al.*, 2020). Pol1 und damit auch die Polymerase α ist ein sehr stabiles Protein, welches sogar nach Depletion der transkribierten mRNA mehrere Zellzyklen aktiv war (Muzi Falconi *et al.*, 1993). Pol α enthält auch ein konserviertes Histonbindemotiv für die Histone H2A und H2B, welches für die Regulation des Replisoms aus Pol α und weiteren Proteinen eine Rolle spielt (Evrin *et al.*, 2018). Pol α , δ und ε interagieren aufgrund ihrer wichtigen Rolle bei der DNA-Replikation auch genetisch mit vielen anderen Proteinen (siehe Dubarry *et al.*, 2015). Pol1 ist als nuklear lokalisiertes Protein bekannt, wurde jedoch in einzelnen Studien auch in den Mitochondrien nachgewiesen (Lasserre *et al.*, 2013). Diese möglicherweise duale Lokalisierung eines Fe/S-Proteins würde Gemeinsamkeiten von CIA- und ISC-Zielproteinerkennung erfordern, da der Import eines solchen Proteins vom Zytosol in die Mitochondrienmatrix ungefaltet und damit als Apoprotein erfolgen sollte.

Pol2 ist ein Bestandteil der Polymerase ε . Nach der Synthese von DNA/RNA-Primern durch Polymerase α kann die Polymerase ε die weitere Synthese des Leitstrangs der DNA durchführen. Zudem besitzt diese Polymerase eine mit einer Reparaturfunktion zusammenhängende Exonukleasefunktion, mit Hilfe derer unpassende Nukleotide ersetzt werden können (Shivji *et al.*, 1995). Dank dieser Funktion entsteht bei der DNA-Replikation eine Fehlpaarung pro 10^5 synthetisierten Nukleotiden (Arana & Kunkel, 2010). Pol ε besteht aus den drei Untereinheiten Pol2, Dpb2, Dpb3 und Dpb4, wobei Pol2 die katalytische Untereinheit der DNA Polymerase ist (Netz *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2020). Dpb3 und Dpb4 sind für die Stabilität des Komplexes zuständig (Yuan *et al.*, 2020). Das molekulare Gewicht von Pol2 beträgt 256 kDa und es besitzt ein [4Fe-4S]-Cluster, welches durch Cysteinreste einer cysteinreichen Insertion der aktiven Polymerasedomäne (Aminosäure 1-1187) koordiniert wird (Jain *et al.*, 2014). Die Liganden (Cys665, Cys668, Cys677 und Cys 763) für einen weiteren [4Fe-4S]-Cluster des CysX-Motivs im Zentrum der katalytischen Domäne wurden wenige Jahre später bestimmt (siehe Abbildung 11) (Beek *et al.*, 2019). Die Polymerase arbeitet eng mit anderen DNA-Replikationsfaktoren zusammen, wie z.B. dem Replikationsfaktor C, den Helikasen und den PCNA (proliferating cell nuclear antigen)-Ladepoteinen, um eine effiziente und genaue DNA-Replikation sicherzustellen, wobei Mutationen des humanen Homologs POLE mit einer erhöhten Abundanz von Tumoren zusammenhängen (Henninger & Pursell, 2014). Das [4Fe-4S]-Cluster ist redoxaktiv und könnte zur Modulation der Polymeraseaktivität verwendet werden, wobei die Reduktion des Clusters die Aktivität erhöht und eine Oxidation des Clusters diese verringert (Pinto *et al.*, 2021). Interessanterweise ist Pol ε nicht essentiell für die Zelle und kann, wenn auch unter

Erzeugung eines starken Phänotyps in Hefe, in ihrer Funktion durch Pol δ ersetzt werden (Kesti *et al.*, 1999).

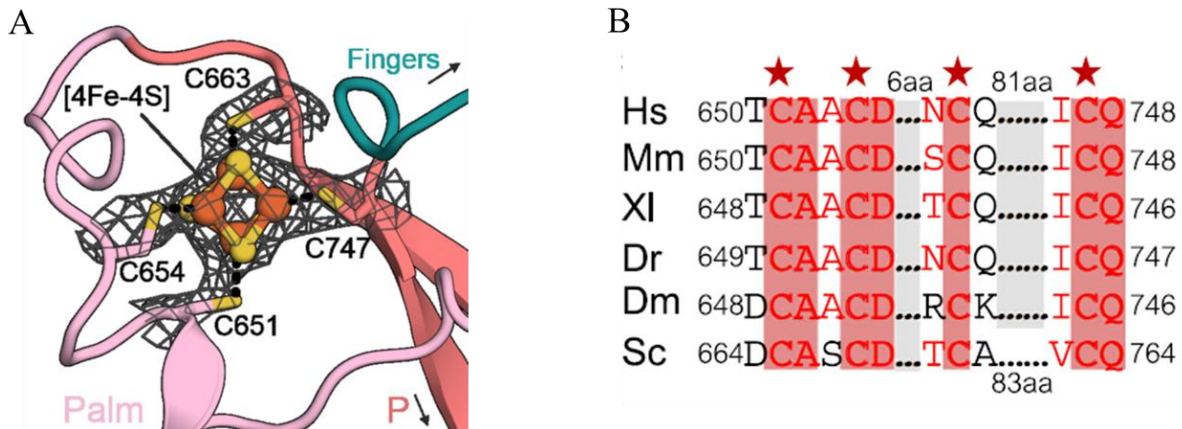


Abbildung 11: Fe/S-Kofaktor von Pol ϵ . Gezeigt ist die Kryo-EM-Struktur der Fe/S-bindenden Tasche der humanen Pol ϵ (A) (Roske & Yeeles, 2024), sowie das Sequenzalignment der Fe/S-bindenden Cysteinreste von Pol2 verschiedener Organismen (Hs = *Homo sapiens*, Mm = *Mus musculus*, Xl = *Xenopus laevis*, Dr = *Danio rerio*, Dm = *Drosophila melanogaster*, Sc = *Saccharomyces cerevisiae*) (B) (He *et al.*, 2024).

Pol3 ist ein Bestandteil der Polymerase δ . Pol δ hat drei Untereinheiten: Pol3, Pol31 und Pol32. Dabei bindet die katalytische Untereinheit Pol3, welches 125 kDa misst, ein [4Fe-4S]-Cluster über die Aminosäuren Cys1056, Cys1059, Cys1069 und Cys1074 (Netz *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu Pol ϵ bevorzugt Pol δ den Folgestrang als Vorlage für die DNA-Replikation (Nick McElhinny *et al.*, 2008). Dabei bindet Pol32 als regulatorische Untereinheit an PCNA, Pol31 an Pol32 und Pol3 an Pol31 (Nir Heyman *et al.*, 2023). Das humane Homolog von Pol δ benötigt das Fe/S-Cluster für die PCNA-abhängige Primer Extension, die Bindung an die DNA und die Exonukleaseaktivität (Jozwiakowski *et al.*, 2019). In Hefe deuten Experimente auf eine Beteiligung des Fe/S-Clusters an der Bindung zwischen Pol3 und Pol31, sowie der Exonukleaseaktivität hin (Chanet *et al.*, 2021). Analog zu seiner Rolle in Pol2 kann das Fe/S-Cluster auch die Aktivität von Pol3 über seinen Redoxzustand modulieren, wobei eine Oxidation die Aktivität stark verringert (Bartels *et al.*, 2017). Trotz des ähnlichen Aufbaus der drei Polymerasen α , ϵ und δ scheint das Fe/S-Cluster teilweise unterschiedliche Aufgaben zu übernehmen.

Rev3 ist ein Bestandteil der Polymerase ζ . Neben den bereits genannten Polymerasen der DNA-Replikation existieren weitere Fe/S-Cluster-haltige Systeme welche mit der DNA interagieren. Dabei ist die Polymerase ζ hervorzuheben, welche an einem Großteil der DNA-Schaden induzierten Mutagenese beteiligt ist. Pol ζ ist eine Translasion (TLS) Polymerase, welche durch ihr flexibles aktives Zentrum und die fehlende Exonukleaseaktivität DNA-

Läsionen überspringen kann, welche bei anderen Polymerasen zum Abbruch der Synthese führen würden (Szwajczak *et al.*, 2017). Dabei setzt sich Pol ζ aus der katalytischen Untereinheit Rev3, Rev7, Pol31 und Pol32 zusammen (Gómez-Llorente *et al.*, 2013). Nicht nur die Untereinheiten von Pol ζ und δ sind teilweise identisch, auch die Proteine Rev3 und Pol3 weisen Ähnlichkeit auf, wobei auch bei Rev3 ein [4Fe-4S]-Cluster durch das CysB-Motiv koordiniert wird (Szwajczak *et al.*, 2017). Rev3 besitzt eine molekulare Masse von 173 kDa und nutzt Cys1446, Cys1449, Cys1468 und Cys1473 als Liganden des Fe/S-Clusters. Das Fe/S-Cluster ist essentiell für die Bildung des Komplexes und den Prozess der durch defekte Replisome induzierten Mutagenese (DRIM) (Szwajczak *et al.*, 2017).

1.5.2 DNA-Helikasen und DNA-Glykosylase

Chl1 ist eine nuklear lokalisierte Helikase mit einem Molekulargewicht von 99 kDa, welche an DNA-Reparaturprozessen beteiligt ist. Mutationen des humanen Homologs DDX11 wurden als Ursache für das Warsaw-Breakage-Syndrom identifiziert. Das [4Fe-4S]-Cluster wird durch Cys280, Cys298, Cys308 und Cys350 ligiert. Als Helikase nutzt Chl1 die Energie, welche bei der Hydrolyse von ATP entsteht, um die DNA in eine gerade, abgewickelte und damit exponierte Form zu bringen, sodass weitere Proteine, wie zum Beispiel DNA-Polymerasen an die DNA binden können (Wu & Brosh, 2012). Die Expression von Chl1 wird durch DNA-Schäden induziert, während gesunde Zellen niedrige Abundanzen dieses Proteins aufweisen. Andere Helikasen können auch RNA-Strukturen exponieren. Helikasen werden in vier kleine und zwei große Familien (SF1 und SF2) klassifiziert (Singleton *et al.*, 2007). Helikasen der SF1 und SF2 besitzen zwei RecA-Motive, welche essentiell für die Bindung von Nukleinsäuren, NTP, NTP-Hydrolyse, sowie dessen Kopplung mit der DNA-Abwicklung ist (Wu & Brosh, 2012). Zwischen diesen RecA-Motiven liegen unterschiedliche proteinspezifische Motive, wie zum Beispiel Walker A/B. Die Familien unterscheiden sich mechanistisch durch verschiedene Faktoren, ihre Fähigkeit DNA oder RNA als Substrat zu nutzen, ihre Präferenz des Substrates der NTP-Hydrolyse und ihrer Abwicklungspolarität in 3'-5' oder 5'-3-Richtung (Fairman-Williams *et al.*, 2010). Die SF1-Helikase UvrD aus *E. coli* weist eine ATP-Bilanz von einem hydrolysierten ATP pro abgewickelter DNA-Basenpaar auf, wobei die Übertragbarkeit dieser Energiebilanz auf andere Helikasen ungeklärt ist (Lee & Yang, 2006). Chl1 ist ein Mitglied der SF2-Familie, welcher auch die humanen Proteine FANCI und XPD angehören. Es wickelt DNA in 5'-3'-Richtung unter Verwendung von ATP ab und es konnten mehrere Interaktionen und Aufgaben experimentell bestimmt werden, sodass Chl1 die Bindung von Scc2 während der DNA-Replikation an die DNA erhöht und am Zentromer-Clustering der Interphase beteiligt ist (Inoue *et al.*, 2011; Rudra & Skibbens, 2013). Die Rolle des Fe/S-

Clusters ist noch ungeklärt, es gibt aber Hypothesen. Zum einen kann das Cluster eine strukturelle Aufgabe erfüllen, zum anderen wurde eine Rolle in der Detektion von DNA-Schäden mittels Elektronentransfer vorgeschlagen (White, 2009).

Rad3 ist eine auch nuklear lokalisierte SF2-Helikase mit einem Molekulargewicht von 90 kDa, welche ein Teil des TFIIH-Komplexes ist (siehe Abbildung 12). Damit spielt Rad3 eine wichtige Rolle in der Transkription und der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER). Das [4Fe-4S]-Cluster wird von den Aminosäuren Cys115, Cys133, Cys156 und Cys191 ligiert und ist essentiell für die Helikaseaktivität, nicht aber für die Stabilität, DNA-Bindung oder ATPase Aktivität, wobei es auch an diesen Prozessen beteiligt ist (Rudolf *et al.*, 2006; Pugh *et al.*, 2008). Mutationen des humanen Homologs XPD sind für mehrere genetisch vererbte Krankheiten ursächlich: Xeroderma Pigmentosum (Mondscheinkrankheit, eine starke Hautempfindlichkeit gegenüber UV-Licht), Trichothiodystrophie (niedriger Schwefelgehalt und Brüchigkeit von Haaren) und das Cockayne-Syndrom (eine Wachstumsbeeinträchtigung mit Mikroenzephalie) (Wu & Brosh, 2012).

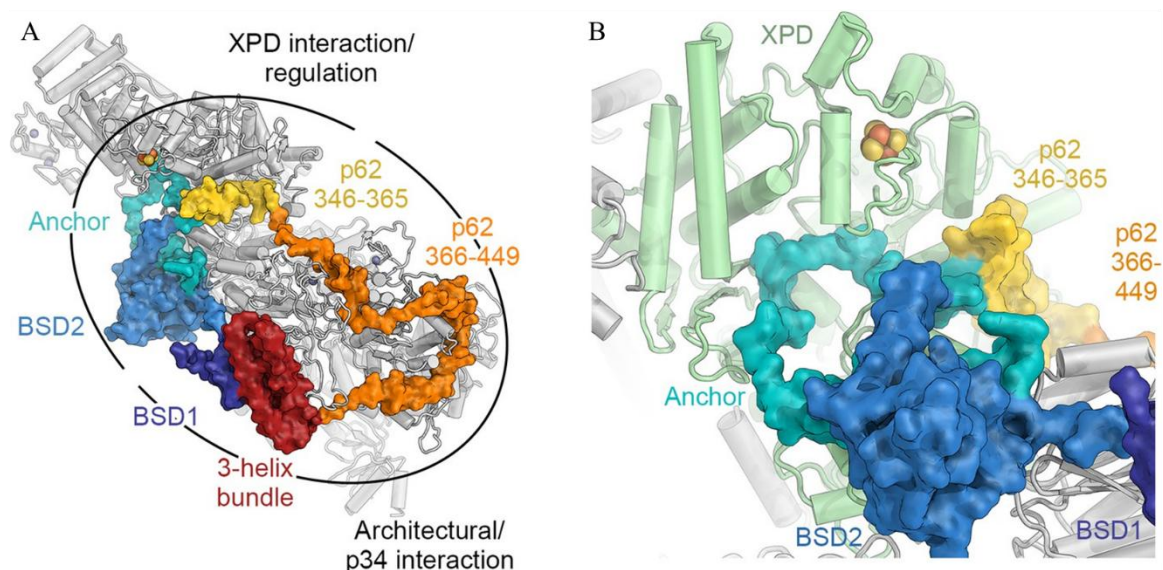


Abbildung 12: Fe/S-Kofaktor der Untereinheit XPD des humanen TFIIH-Komplexes. Gezeigt ist die Kristallstruktur des humanen Homologs des TFIIH-Komplexes (A), sowie des des Rad3-Homologs XPD (B) (Greber *et al.*, 2019).

Dna2 ist eine nuklear lokalisierte SF1-Helikase mit 5'→3'-Nukleasefunktion und einem molekularen Gewicht von 172 kDa. Das [4Fe-4S]-Cluster wird von den Aminosäuren Cys519, Cys768, Cys771 und Cys777 koordiniert (Pokharel & Campbell, 2012). Bei Experimenten zur Funktion von Dna2 konnte eine Beteiligung an der Prozessierung von Okazakifragmenten, der Telomerstabilisierung und der Prozessierung von Doppelstrangbrüchen gezeigt werden (Kang

et al., 2010; Paeschke *et al.*, 2010). Insbesondere die Prozessierung von Doppelstrangbrüchen ist essentiell und eine Funktionsunfähigkeit von Dna2 führt zu unkontrollierten Insertionen von bis zu 1.5 kBp großen DNA-Fragmenten, vor allem aus Ty-Retrotransposons, ribosomaler DNA und fragilen Regionen des Genoms, in Doppelstrangbrüche, wodurch Mutationen und damit auch Krankheiten wie Krebs entsteht (Yu *et al.*, 2018). Ty-Retrotransposons sind mobile repetitive DNA-Sequenzen (TEs) aus Hefe welche in fünf Familien unterteilt werden können und durch verschiedene Prozesse gezielt in Zielregionen der DNA integriert werden (Bonnet & Lesage, 2021). Die Funktion von Dna2 überschneidet sich teilweise mit der Funktion der Exonuklease Exo1 (Wang *et al.*, 2018). Die Rolle des Fe/S-Clusters ist eng mit der enzymatischen Funktion verwoben, sodass eine Mutation der clusterligierenden Cysteine zu einer starken Reduktion der Nuklease- und der ATPase-Aktivität, im Gegensatz zur unbeeinflussten Bindung an die DNA, führt (Pokharel & Campbell, 2012). Dna2 zeigt eine duale Lokalisierung mit unterschiedlicher Funktionalität. Neben der Funktion als nuklear lokalisiertem Protein ist es auch in den Mitochondrien lokalisiert, wo es für die Basenexzisionsreparatur zuständig ist (Duxin *et al.*, 2009).

Ntg2 ist eine nuklear lokalisierte DNA-Glykosylase und DNA-(apurinische oder apyrimidinische) Lyase (AP-Lyase) mit einem Molekulargewicht von 44 kDa, welche an dem Prozess der Basenexzisionsreparatur (BER) beteiligt ist. Ntg2 ist ein Protein, dessen [4Fe-4S]-Cluster von den Aminosäuren Cys319, Cys326, Cys329 und Cys335 ligiert wird, während das Paralog Ntg1, welches eine ähnliche Struktur und Funktion aufweist, keine Fe/S-Cluster-Domäne enthält (Meadows *et al.*, 2003). Beide Proteine sind Homologe der Endonuklease III aus *E. coli*, welche auch ein [4Fe-4S]-Cluster aufweist (Thayer *et al.*, 1995). Mit nur 125 Molekülen pro Zelle liegt Ntg2 in sehr geringer Abundanz vor (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Ntg2 wird im Gegensatz zu Ntg1, welches durch DNA-schädigende Stoffe induziert wird, konstitutiv exprimiert (Alseth *et al.*, 1999). Diese DNA-Schäden spielen in humanen Zellen eine Rolle in Mutagenese, Krebs und dem Altern, weshalb das humane Homolog NTHL1 des Ntg2 durch BER als Hauptprozess die oxidativen DNA-Schäden beheben kann (Seeberg *et al.*, 1995). Hierbei wird zuerst die Veränderung einer Base festgestellt und diese dann durch die DNA-Glykosylase entfernt, was eine abasische Stelle (AP site) der DNA zurücklässt, wobei an dieser Stelle das Phosphatrückgrat der DNA durch die AP-Lyase-Aktivität von Endonukleasen gespalten wird (Alseth *et al.*, 1999). Danach wird die Reparatur durch Phosphodiesterasen, DNA-Polymerasen und DNA-Ligasen fertiggestellt (Alseth *et al.*, 1999). Neue Forschungsergebnisse zeigten, dass die BER mittels Ntg2 seltener als die BER mittels Apn1/2 und Rad27 verwendet wird (Godin *et al.*, 2016). Interessanterweise erhöht eine Deletion von Ntg2 die Resistenz von *S. cerevisiae* gegenüber H₂O₂ (Melo *et al.*, 2004).

1.5.3 Ribosome und tRNA Modifizierung

Rli1 ist ein essentielles ABC-Protein des Nukleus und Zytoplasmas mit zwei [4Fe-4S]-Clustern, welches an der Biogenese von Ribosomen beteiligt ist und ein molekulares Gewicht von 68 kDa aufweist. Dabei dienen die konservierten Aminosäuren Cys17, Cys22, Cys25 und Cys65 als Liganden eines Fe/S-Clusters und die Aminosäuren Cys55, Cys58, Cys61 und Cys29 als Liganden des zweiten Fe/S-Clusters (Kispal *et al.*, 2005). Bei der Biogenese von Ribosomen entsteht die 27S rRNA im Nukleolus und die 5S rRNA außerhalb des Nukleolus. Die 35S rRNA wird im Nukleoplasma und Zytoplasma zu 18S, 5.8S und 25S rRNA prozessiert (Woolford & Baserga, 2013). Gleichzeitig entsteht aus rRNA und ribosomalen Proteinen die große (60S) und kleine (40S) Ribosomenuntereinheit, welche im Zytosol ein Ribosom bilden. Dabei ist Rli1 direkt an der Prozessierung von 7S zu 5.8S rRNA beteiligt (Yarunin *et al.*, 2005). Interaktionsstudien zeigten dabei eine Interaktion zwischen Rli1 und dem eIF3j-Homolog Hcr1 über das Walker A Motiv, sowie mit verschiedenen Proteinen der großen und kleinen Ribosomenuntereinheit und dem Hefehomolog des Initiationsfaktorkomplexes eIF3, es konnte aber kein Effekt auf die Abundanz von ribosomalen Proteinen gezeigt werden, jedoch eine Akkumulation von Ribosomen im Nukleus, woraus auf eine Exportfunktion von Rli1 geschlossen werden konnte (Kispal *et al.*, 2005). Dieselben Experimente zeigten auch die Notwendigkeit der Fe/S-Cluster für den Ribosomtransport (Kispal *et al.*, 2005). Neuere Studien zeigten und charakterisierten den Mechanismus des humanen Rli1-Homologs ABCE1 in der Translationstermination, wobei es die Trennung von 80S in 60S- und 40S-Untereinheiten durch eine 150° Rotation der Fe/S-Domäne in der Bindetasche der 40S-Untereinheit ermöglicht (Heuer *et al.*, 2017). Auch für das Recycling von Ribosomen nach der Termination ist Rli1 essentiell (Young *et al.*, 2015). Die Insertion von Fe/S-Clustern in Rli1 ist auf die Adapterproteine Yae1 und Lto1 angewiesen (Paul *et al.*, 2015).

Elp3, welches zytoplastisch und nuklear lokalisiert ist, ist an der Modifizierung der Wackelbase Uridin in tRNA beteiligt und weist ein Molekulargewicht von 64 kDa auf. Dabei bildet die für die katalytische Funktion hauptsächliche Untereinheit Elp3 zusammen mit weiteren Proteinen einen strukturell konservierten heterohexameren Elongatorkomplex aus Elp1-6 (Jaciuk *et al.*, 2023). Das [4Fe-4S]-Cluster wird von den Aminosäuren Cys108, Cys118 und Cys121 und dem Heteromolekül S-Adenosylmethionin ligiert (Paraskevopoulou *et al.*, 2006). Neben dem Fe/S-Cluster besitzt Elp3 noch eine C-terminale Domäne mit Histonacetyltransferase (HAT) Aktivität, welche nicht von der Integrität des Fe/S-Clusters abhängt (Greenwood *et al.*, 2009). Das Fe/S-Cluster ist jedoch für die Integrität des Elongatorkomplexes, sowie dessen Interaktion mit den Proteinen Kti11 und Kti12 essentiell und das Protein ist vorallem zytoplastisch

lokalisiert (Greenwood *et al.*, 2009). Die Modifizierung des tRNA-Anticodons durch den Elongatorkomplex beinhaltet das Fe/S-Cluster als kritischen Bestandteil der radical SAM-Reaktion. Hierbei bindet zuerst ein flexibles Elp1,2,3-Hexamer SAM, die tRNA und Acetyl-CoA in der Nähe des Fe/S-Clusters von Elp3 (Jaciuk *et al.*, 2023). Danach wird SAM gespalten und das Radikal über Tyrosin auf ein acetyliertes Lysin übertragen, wobei das entstehende Acetylradikal daraufhin mit einem Kohlenstoffatom des U₃₄ der tRNA reagieren kann, woraufhin ein Elp4,5,6-Hexamer bei der Abspaltung der modifizierten tRNA unter ATP-Spaltung behilflich ist, wobei der entstehende Elp1,2,3,4,5,6-Komplex danach mit einem bisher ungeklärten Mechanismus wieder in Elp1,2,3 und Elp4,5,6 gespalten wird (Jaciuk *et al.*, 2023). Viele der beschriebenen Phänotypen von $\Delta ELP3$ -Zellen lassen sich auf die fehlende tRNA-Modifikation zurückführen (Karlsborn *et al.*, 2014).

Tyw1 ist ein Radikal-SAM Flavoenzym mit einem Molekulargewicht von 90 kDa. Es ist an der Modifizierung des Guanosin von Phenylalanin-tragender tRNA beteiligt, wodurch eine 4-Dimethylwyosin-tRNA entsteht (Young & Bandarian, 2021). Das erste [4Fe-4S]-Cluster wird durch die Aminosäuren Cys479, Cys483 und Cys486, sowie die α -Amino- und α -Carboxy-Position von SAM ligiert (siehe Abbildung 13) (Noma *et al.*, 2006). Unter Verwendung von NAD(P)H kann dieses Fe/S-Cluster über FMN reduziert werden, sodass das Fe/S-Cluster im Oxidationszustand +1 SAM in ein 5'-Deoxyadenosylradikal spalten kann (Chen *et al.*, 2003). Das entstandene dAdo-Radikal kann daraufhin ein Wasserstoff der Methylgruppe des *N*-Methylguanosins abstrahieren, wodurch eine Reaktion mit Pyruvat ermöglicht wird, welche unter Abspaltung von CO₂ oder Ameisensäure zum Produkt 4-Dimethylwyosin am G₃₇ reagieren (Young & Bandarian, 2015; Young & Bandarian, 2021). Das zweite Hilfs-[4Fe-4S]-Cluster wird auch von drei konservierten Cysteinresten Cys479, Cys483 und Cys486 koordiniert, wobei zusätzlich ein Lysinrest in räumlicher Nähe des unkoordinierten Eisens zu finden ist, welcher eine Schiff'sche Base mit Pyruvat bilden kann (Grell *et al.*, 2018). Der Sauerstoff der Carboxylgruppe des gebundenen Pyruvats und der Stickstoff der Bindung wird als vierter Ligand des [4Fe-4S]-Clusters verwendet (Young & Bandarian, 2021). Interessanterweise unterscheiden sich prokaryotische Tyw1-Homologe von Eukaryotischen durch die Abwesenheit der Flavodoxindomäne (Noma *et al.*, 2006). Es konnte eine Verbindung von Tyw1 und der Eisenhomöostase nachgewiesen werden, wobei Yap5 die Abundanz von Tyw1 reguliert und eine Überexpression von Tyw1 zu einer Induktion des Eisenregulons führt (Li *et al.*, 2011). Dabei führte eine hohe Eisenabundanz zu einer hohen Abundanz von Tyw1, möglicherweise um die Zelle vor hohen Eisenkonzentrationen zu schützen, und hohe Tyw1-Abundanz zu hohen Eisenkonzentrationen (Li *et al.*, 2011).

eukaryotischer Ribosomen beteiligt, wobei es zusammen mit den Proteinen Nsa1, Rpf1 und Rrp1 ein Modul bildet (Nsa1-Modul), welches von Intermediat „A“ bis zum Intermediat „D“ an das pre-60S Partikel bindet (Kater *et al.*, 2017). Die Interaktion des Nsa1-Moduls findet insbesondere mit dem rRNA Expansionssegment ES7a statt (Kater *et al.*, 2017). Eine Aufreinigung des Proteins gestaltete sich als schwierig, es wird *in vivo* wahrscheinlich durch die Interaktion mit RNA stabilisiert, aber auch die Interaktion mit seinen Modulpartnern führte in Experimenten zu einer erhöhten Stabilität (Nadine Duppe, 2025). In weiteren Experimenten konnten die Aminosäuren Cys15, Cys28, Cys38 und Cys43 als Liganden des [4Fe-4S]-Clusters festgestellt werden (Nadine Duppe, 2025). Das gesamte Nsa1-Modul wurde als Stabilisator der lösungsmittel-exponierten Seite definiert, welches nur im Nukleolus agiert (Dörner *et al.*, 2023).

1.5.4 Aminosäuren und weitere Biosynthesen

Dph1 und **Dph2** sind nicht kanonische Radikal-SAM-Enzyme, welche an der Synthese von Diphthamid beteiligt sind. Sie haben ein Molekulargewicht von 48 kDa und 60 kDa. Der eukaryotische und archaische Elongationsfaktor 2, welcher für die Translokation des Ribosoms bei der Translation wichtig ist, beinhaltet eine einzigartige post-translationale Modifikation, ein an den Histidinrest gebundenes Diphthamidmolekül. Für manche Bakterieninfektionen ist das Diphthamid ein Angriffspunkt (Su *et al.*, 2013). Dph1 und Dph2 besitzen beide ein, für Radikal-SAM-Enzyme nicht kanonisch, gebundenes [4Fe-4S]-Cluster, welches von jeweils drei Aminosäuren ligiert wird, Cys133, Cys239 und Cys368 im Fall von Dph1, sowie Cys107, Cys128 und Cys362 bei Dph2 (siehe Abbildung 14) (Dong *et al.*, 2019).

Zur Generierung des Radikals benötigt der Komplex aus Dph1 und Dph2 Elektronen, welche von Dph3, einem eisenbindenden „Zinkfingerprotein“, und Cbr1, einem Flavoprotein, eingebracht werden (siehe Abbildung 15) (Dong *et al.*, 2014). Neben der Funktion als Elektronendonator kann Dph3 auch als Eisendonator dienen, wodurch die Sauerstoffempfindlichkeit der Fe/S-Cluster ausgeglichen werden kann, indem das Abbauprodukt [3Fe-4S] mit dem von Dph3 bereitgestellten Eisen unter aeroben Bedingungen zu einem [4Fe-4S]-Cluster reagieren kann (Zhang *et al.*, 2021).

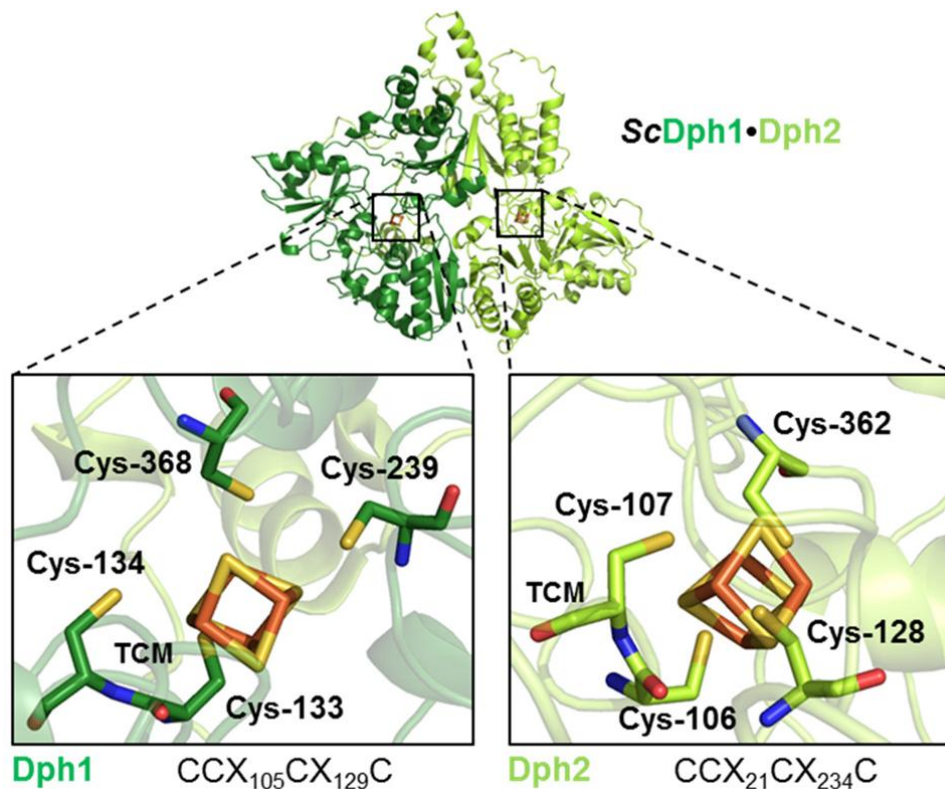


Abbildung 14: Fe/S-Kofaktoren der Radikal-SAM-Enzyme Dph1 und Dph2. Gezeigt sind die Kristallstrukturen von Dph1 und Dph2 aus *S. cerevisiae* und die Liganden der Fe/S-Kofaktoren (Ütkür *et al.*, 2024).

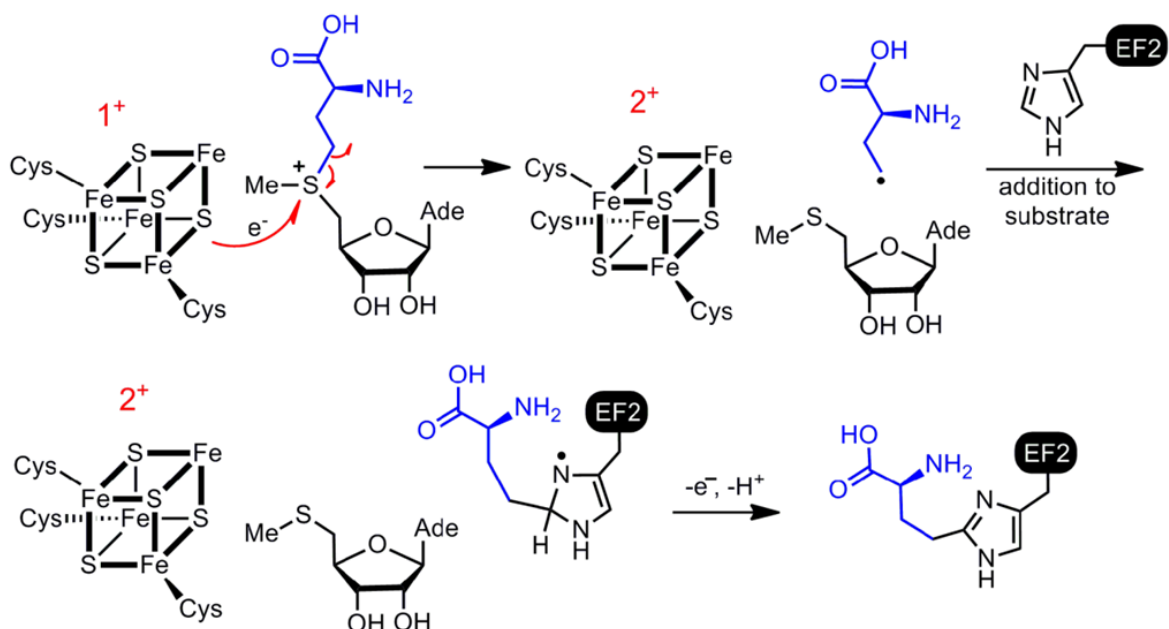


Abbildung 15: Radical SAM Mechanismus in der Dipthamid Synthese. Gezeigt ist der Mechanismus von Dph2 in der Radikalgenerierung und die weitere Reaktion mit dem Histidinrest des EF2 (Su *et al.*, 2013).

Met5 ist neben Met10 eine der beiden Untereinheiten des zytosolisch lokalisierten heterodimeren Sulfitreduktasekomplexes, das den Reduktionsschritt von Sulfiten (SO_3^{2-}) zu Sulfiden (S^{2-}) katalysiert. Die Met5-Untereinheit weist ein Molekulargewicht von 161 kDa auf und das enthaltene [4Fe-4S]-Cluster wird von den Aminosäuren Cys1300, Cys1306, Cys1345 und Cys1349 ligiert. Zusätzlich wird auch das Eisen des Sirohäm-Kofaktors über Cys1349 gebunden. *S. cerevisiae* benötigt Schwefel zur Synthese der Aminosäure Cystein und Methionin. Dabei wird zuerst Sulfat von Sul1 und Sul2 in die Zelle aufgenommen, danach durch Einbau in Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) oder 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) aktiviert, welches von einer APS-Reduktase zu SO_3^{2-} und danach durch ein Dimer eines Dimers aus Met10 und Met5 zu S^{2-} reduziert wird. Der entstandene Schwefelwasserstoff wird danach durch eine Cystein-Synthase zur Synthese von L-Homocystein verwendet (Chen *et al.*, 2018). Neben dem Fe/S-Cluster nutzt dieses Enzym auch FAD, FMN und Sirohäm als Kofaktoren (Kobayashi & Yoshimoto, 1982). Über die Funktion des Fe/S-Clusters in diesem Protein ist nur wenig bekannt.

Leu1 ist ein zytosolisch lokalisiertes [4Fe-4S]-Protein mit einem Molekulargewicht von 86 kDa und hoher Abundanz im Hefestamm W303, da es durch Mutationen des *LEU2*-Gens im Vergleich zu anderen Hefestämmen überexprimiert wird. Dabei katalysiert Leu1 die Reaktion von (2*S*)-2-Isopropylmalat zu (2*R*,3*S*)-3-Isopropylmalat. Der Zwischenschritt über 2-Isopropylmaleat erlaubt hierbei auch die Messung der Enzymaktivität mittels UV/Vis-Spektroskopie (Pierik *et al.*, 2009). Der [4Fe-4S]-Kofaktor wird durch Cys360, Cys421 und Cys424 koordiniert.

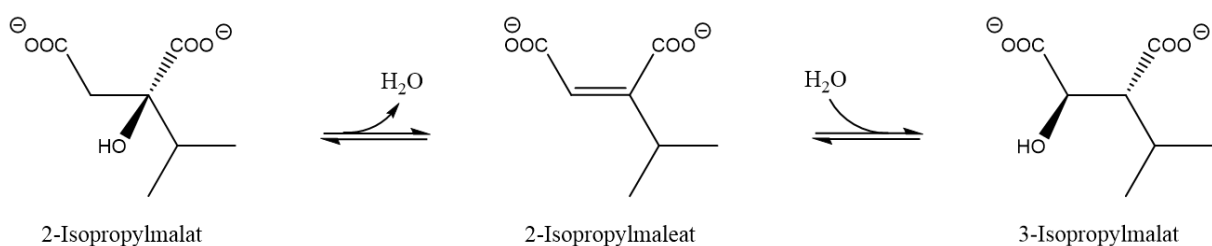


Abbildung 16: Leu1-katalysierte Reaktion von 2-Isopropylmalat zu 3-Isopropylmalat. (Satyanarayana *et al.*, 1968)

2-Isopropylmalat wird durch Leu4 und Leu9 in den Mitochondrien synthetisiert und durch einen bisher unbekannten Exporter ins Zytosol exportiert, wo dann Leu1 die Isomerasereaktion durchführt (Kohlhaw, 2003). Dort kann dann Leu2 unter NADH und CO_2 Erzeugung das 2-Ketoisocapronat synthetisieren, welches durch Bat2 zum proteinogenen L-Leucin reagieren kann, wobei L-Glutamat zu 2-Ketoglutarat desaminiert wird (Kohlhaw, 2003). Neben der erwähnten Regulation durch Leu2 wird die Abundanz von Leu1 und auch weiteren Proteinen

der Leucin-Biosynthese auch durch die Transkriptionsfaktoren Gcn4 und Leu3 beeinflusst, während die Bindungsaffinität von Leu3 wiederum durch die Abundanz von Leucin, Valin und Isoleucin beeinflusst wird (Börlin *et al.*, 2020). Neue Experimente nutzen Leu1 um ein Assay zur Definition des unbekannten Exportstoffes X-S zu entwickeln (Pandey *et al.*, 2023).

Glt1 ist eine hoch abundante Glutamatsynthase mit einem Molekulargewicht von 238 kDa. Sie katalysiert die Reaktion von L-Glutamin, α -Ketoglutarat, einem Proton und NADH zu zwei Molekülen L-Glutamat und NAD⁺ (Roon *et al.*, 1974). Durch eine Zugabe von L-Azaserin oder L-Homocystein lässt sich eine Inhibition beobachten (Masters & Meister, 1982; Wang, 1985). Im Stoffwechsel der Hefe wird das Edukt α -Ketoglutarat durch die NADP-Isocitrat-Dehydrogenase aus Idp1, Idp2 und Idp3 synthetisiert, während das Edukt L-Glutamin durch die Glutamin-Synthase Gln1 synthetisiert wird (DeLuna *et al.*, 2001). Alternativ zu Glt1 kann auch L-Glutamat durch die NADP-Glutamat-Dehydrogenase Gdh1 und Gdh3 mit α -Ketoglutarat, NADPH, Protonen und Ammonium als Edukte synthetisiert werden (Avendaño *et al.*, 1997). Durch Gelfiltration konnte eine trimere Quartärstruktur ausgemacht werden (Cogoni *et al.*, 1995). Das bakterielle Homolog GltS besitzt zwei Untereinheiten, α und β , welche durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Zusammen binden diese Untereinheiten fünf Kofaktoren: FMN, FAD, [3Fe-4S] und zwei [4Fe-4S]-Kofaktoren (Vanoni, 2021). Eukaryotische Mikroorganismen wie die Hefe besitzen ein Fusionsprotein, bei dem die α - und β -Untereinheit, welche die gleiche Anzahl an Kofaktoren trägt, von einem einzigen Gen kodiert werden (Vanoni, 2021). Als Liganden des [3Fe-4S]-Clusters, konnten die Aminosäuren Cys1185, Cys1191 und Cys1196 definiert werden (Vanoni *et al.*, 2005). Die Expression von Glt1 wird von mehreren Faktoren reguliert. Eine Repression wird durch eine hohe Abundanz von Glutamat, dem Produkt der Glt1-katalysierten Reaktion, ausgelöst, während die Transkriptionsfaktoren Gln3 und Gcn4 die Expression erhöhen, wobei Gcn4 eine geringere Auswirkung auf die Expression hat (Valenzuela *et al.*, 1998).

Der Metabolit α -Ketoglutarat wurde in Studien mit *E. coli* als wichtiger Regulator oder Signalmolekül aufgezeigt, da er zwischen dem Citratzyklus, einem wichtigen Teil des Kohlenstoffstoffwechsels und der Stickstoffassimilierung über Glt1 oder Gdh1/3 liegt (siehe Abbildung 17) (Huergo & Dixon, 2015). Es wurde gezeigt, dass auch in anderen Organismen α -Ketoglutarat als Signalmolekül genutzt wird und in *S. cerevisiae* fungiert α -Ketoglutarat als Indikator für den Stickstoffstatus und ist an der Modulation zentraler Stoffwechselrouten und Glutamatdehydrogenasen beteiligt (Mara *et al.*, 2018).

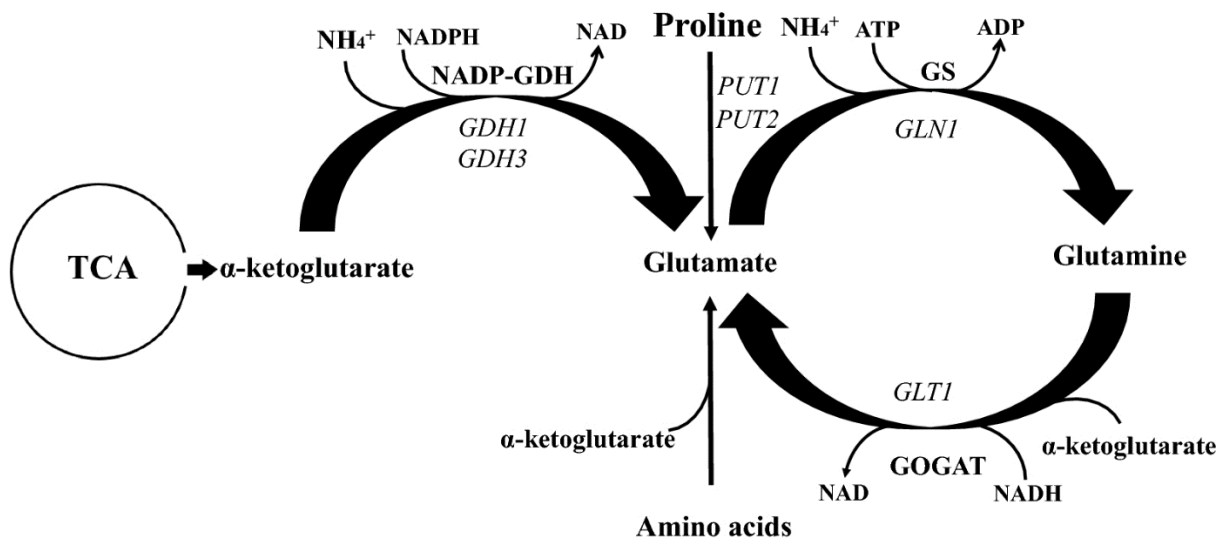


Abbildung 17: Glutamatsynthese und Stickstoffassimilierung in *S. cerevisiae*. Gezeigt sind relevante Stoffwechselwege die an der Glutamatsynthese beteiligt sind, sowie die zentrale Rolle des Substrates α -Ketoglutarat (Mara *et al.*, 2018).

Die Konzentration von α -Ketoglutarat ist abhängig von der Konzentration einer Stickstoffquelle, sowie auch von der Kohlenstoffkonzentration im Medium, wodurch es als Signalmolekül für deren Konzentrationen geeignet ist, welches wiederum durch Sensorproteine gemessen werden kann (Huergo & Dixon, 2015). In *E. coli* ist ein solches Sensorprotein als P_{II}-Protein GlnB bekannt (Adler *et al.*, 1975). Glt1 sticht auch durch dessen Organisation in Filamenten hervor (siehe Abbildung 18) (Li & Liu, 2025).

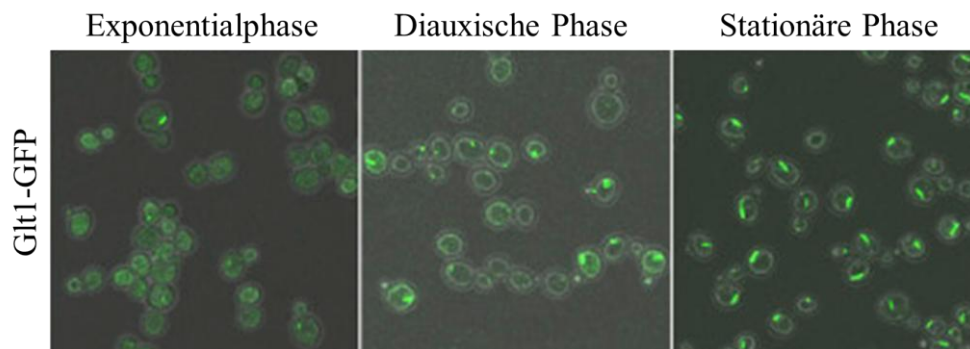


Abbildung 18: Glt1-Zytophydien in verschiedenen Wachstumsstadien. Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen von Glt1-GFP-Fusionsproteinen (hellgrün) in verschiedenen Wachstumsphasen von *S. cerevisiae* (abgeändert nach Shen *et al.*, 2016).

Dabei handelt es sich um eine neuartige Ausbildung der Kompartimentierung, welche die Kompartimentierung durch Membranen wie beispielsweise bei Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum ergänzt. Auch kann dadurch eine metabolische Regulation stattfinden (Shen *et al.*, 2016). Dabei werden Filamente gebildet, indem viele Moleküle eines Proteins aneinanderbinden, wodurch Strukturen entstehen, welche eine Länge erreichen können, die dem Durchmesser der Zellen entspricht. Bisher sind für *S. cerevisiae* 60

filamentformende Proteine bekannt, welche vor allem an der Translationsregulation und Aminosäuresynthese aber auch weiteren Prozessen beteiligt sind (Noree *et al.*, 2019).

Apd1, welches ein Molekulargewicht von 36 kDa aufweist, nimmt unter den zytosolischen Fe/S-Proteinen in Hefe eine Sonderrolle ein, da es das einzige [2Fe-2S]-Cluster-Protein ist, welches nicht der CIA-Maschinerie angehört. Damit ist es auch das einzige bisher bekannte [2Fe-2S]-Protein in *S. cerevisiae* und *H. sapiens* an dessen Einbau nachgewiesenermaßen die CIA-Maschinerie beteiligt ist (Braymer *et al.*, 2024). Es existiert auch ein Homolog in den Mitochondrien, Aim32, welches ein vergleichbares Fe/S-Cluster aufweist (Stegmaier *et al.*, 2019). Die Aufgabe dieses Proteins ist auch noch nicht endgültig geklärt, es ist jedoch bekannt, dass eine Deletion von *APD1* oder der Fe/S-bindenden Histidinen zu einer Sensitivität gegenüber Hydroxyharnstoff führt (Tang *et al.*, 2015). Neben der Resistenz gegen Hydroxyharnstoff verleiht Apd1 auch eine Resistenz gegen Gallobenzophenon und Pyrogallol, welche auch von den Liganden des 2Fe2S-Clusters abhängig sind (Stegmaier *et al.*, 2019). Diese Liganden sind eine weitere Besonderheit des Proteins, welches das nicht-Rieske bishistidinylkoordinierte 2Fe2S-Cluster durch die Aminosäuren Cys207, Cys216, His255 und His259 ligiert, wodurch die Eigenschaften gegenüber einer Koordination mit vier Cysteinen stark verändert werden, wobei der Grund für die abweichende Koordination nicht endgültig geklärt ist, aber wahrscheinlich auf der Modulation der Eigenschaften durch Protonierung des Histidins basiert (Stegmaier *et al.*, 2019). Das C-terminale Tryptophan von Apd1 ist konserviert und für die Funktion des Proteins bei der Resistenzausbildung gegen Gallobenzophenon essentiell (Marquez *et al.*, 2023).

1.5.5 Zusammenfassung aller Fe-haltigen Proteine in Hefe

Zur späteren Verwendung in der Analyse werden hier die eisenhaltigen Proteine sortiert zusammengefasst, welche einer Tabelle aus Lindahl und Vali (im Supplement) entnommen wurde, in welchem auch die Art des Kofaktors nachgelesen werden kann (Lindahl & Vali, 2022).

Tabelle 1: Eisenhaltige Proteine in *S. cerevisiae*. Gezeigt sind alle Proteine die in Hefe Eisen oder eisenhaltige Kofaktoren koordinieren. Damit sind neben mononuklearem Eisen auch Fe/S-Cluster und verschiedene Hämkofaktoren inbegriffen. Eisenhaltige (**blau**), Fe/S-haltige (**fett**) und Hämhaltige (**rot**) Proteine sind farblich markiert, manche Proteine haben allerdings mehrere Arten von Kofaktoren (Lindahl & Vali, 2022).

Zytosol		Mitochondrium		Nukleus	ER	Vakuole
Aft1	Fre3	Aco1	Hem15	Chl1	Cyb5	Fre6
Aft2	Fre4	Aco2	Ilv3	Dna2	Cyp51	
Apd1	Fre7	Aim32	Isa1	Hap1	Dap1	
Bna1	Glt1	Bio2	Isa2	Hap4	Erg3	
Bol2	Grx3	Bol1	Isu1	Ntg2	Erg5	
Cfd1	Grx4	Bol3	Isu2	Pol1	Erg25	
Cta1	Leu1	Ccp1	Lip5	Pol2	Fre8	
Ctt1	Lia1	Cob1	Lys4	Pol3	Grx6	
Dbr1	Met5	Coq7	Mss51	Pri2	Hmx1	
Dph1	Nar1	Cox1	Nfu1	Rad3	Mpo1	
Dph2	Nbp35	Cox10	Rip1	Rev3	Ole1	
Dph3	Ncs6	Cox15	Sdh2	Tpa1	Scs7	
Dph4	Rli1	Cyb2	Sdh3	Yap5	Sfh5	
Dre2	Rnr2	Cyc1	Sdh4		Sur2	
Elp3	Tdh3	Cyc7	Thi4		Yno1	
Fre1	Tyw1	Cyt1	Thi5			
Fre2	Yhb1	Exo5	Yah1			
		Fre5	Yfh1			
		Grx5				

1.6 Massenspektrometrie

1.6.1 Proteomics – labelfree LC-MS/MS

Die Massenspektrometrie ist eine leistungsstarke Methode, die in vielen Bereichen der wissenschaftlichen Analyse verwendet wird. Sie ermöglicht eine Quantifizierung von Molekülen und eine Kombination mit auftrennenden Methoden erlaubt eine hohe Auflösung bei geringen verwendeten Mengen des Analyts. Dadurch wird es möglich mit nur wenigen Milligramm Zellpellet die Abundanz aller Proteine in diesen Zellen zu bestimmen, wobei durch Weiterentwicklungen der Sensitivität der Methode inzwischen das Proteom aus einzelnen Zellen bestimmt werden kann (Zhang & Vertes, 2018). Die wichtigste Vorbereitung der Proben für Proteomstudien ist der Verdau mit Proteasen. Der Verdau ermöglicht es aus den großen Proteinmolekülen kleine, definierte Peptide zu erzeugen, welche gleichzeitig groß genug für eine spezifische Identifikation und klein genug für eine effiziente Ionisierung sind. Üblicherweise beginnt der Prozess nach der Vorbereitung der Proben mit einer Flüssigchromatographie, wodurch eine erste Auftrennung der zu identifizierenden Moleküle stattfindet. Daraufhin folgt die Ionisierung der Probe durch Elektronensprayionisierung (ESI), wobei im Gegensatz zur Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) Methode, welche mittels Laserquelle eine Probe von einer Platte ionisiert, die ESI durch hohe Spannung die flüssige Probe als Aerosol in Richtung der Gegenelektrode sendet, wobei während dem Flug das Lösungsmittel verdampfen kann (Aebersold & Mann, 2003). Nach der Ionisierung erfolgt eine weitere Aufspaltung der Probe durch einen Quadrupol, woraufhin die Ionen in der Ionenfalle (C-Trap) zwischengelagert werden können (Scheltema *et al.*, 2014). Die gelagerten Ionen können nun entweder direkt über die zweite MS-Stufe, den Orbitrap, analysiert werden, oder vorher durch Kollision mit Stickstoff zu kleineren Ionen gespalten werden (Scheltema *et al.*, 2014).

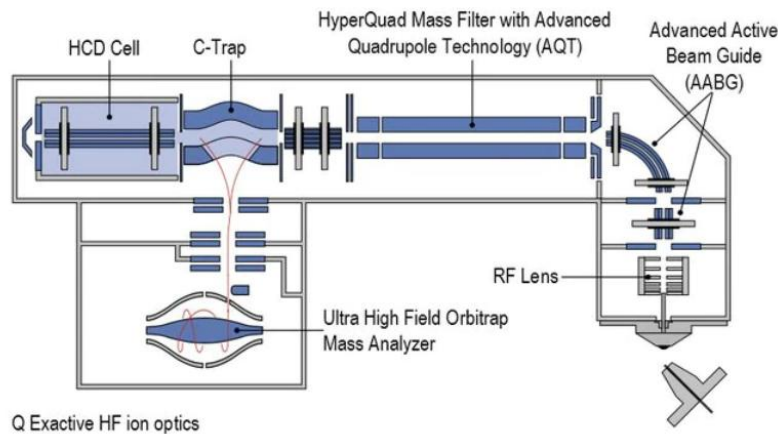


Abbildung 19: Schema des in dieser Arbeit verwendeten MS-Geräts. Gezeigt sind die Bauteile von ESI (rechts) bis zum Orbitrap-Analyser (links) (RPTU FB Biologie, 2023).

Dabei bedient man sich üblicherweise der Data dependent acquisition (DDA) Methode, wobei man zuerst einen MS1-Vollscan durchführt bei dem die ionisierten Peptide analysiert werden ohne diese durch Kollisionen zu fragmentieren (Guan *et al.*, 2020). Im Anschluss werden nach und nach die Peptide mit der höchsten Abundanz isoliert und durch exakt einfache Fragmentierung definierte Ionen erzeugt, welche mittels MS2-Vollscan eine Sequenzierung der Aminosäuren erlauben (Kalli *et al.*, 2013). Neueste Entwicklungen erlauben eine Data-independent acquisition (DIA), beziehungsweise SWATH-MS wobei statt einzelner ionisierter Peptide ganze Massenbereiche gleichzeitig fragmentiert und analysiert werden, oder eine Verwendung beider Methoden gleichzeitig als Data Dependent-Independent Acquisition (DDIA), wodurch eine bessere Reproduzierbarkeit der Daten, eine bessere Abdeckung des Proteoms und schnellere Messzeiten erzielt werden soll, was jedoch mit einer komplizierteren Datenauswertung einhergeht (Ludwig *et al.*, 2018; Guan *et al.*, 2020).

Bei der Datengewinnung durch die LS-MS/MS entstehen Rohdaten, welche durch Programme den richtigen Peptiden und Proteinen zugeordnet werden müssen. Dies geschieht über ein Programm namens „MaxQuant“ (www.maxquant.org/maxquant/), welches sowohl die m/z -Werte der MS-Analyse, als auch die Retentionszeit der Flüssigchromatographie berücksichtigt (Cox & Mann, 2008). Natürlich stellt diese Methode ohne Isotopenmarkierungen die Analyse vor die Herausforderung der Normalisierung der Abundanz von Proteinen, was durch die Entwicklung von „MaxLFQ“ (www.maxquant.org/perseus/) angegangen wurde, welches für eine Normalisierung von Proteinabundanz mehrerer Proben sorgen soll (Cox *et al.*, 2014). Dabei wird die Normalisierung nachgelagert, wobei alle gemessenen Intensitäten mit variablen Normalisationsfaktoren aufaddiert werden, welche danach durch einen globalen Optimisierungsalgorithmus, mit dem Ziel einer möglichst geringen gesamten Proteomvarianz, angepasst werden (Cox *et al.*, 2014). Dabei werden andere Methoden wie die Nutzung von externen Quantifizierungsstandards oder „housekeeping“-Proteinen bewusst ausgelassen (Cox *et al.*, 2014; Wiśniewski & Mann, 2016).

1.6.2 Iso-DTB und Cysteinreaktivität

Eine Methode um gezielt Peptide zu finden oder zu quantifizieren ist die Markierung mittels Isotopen. Dabei kann der Unterschied der Masse der Isotope genutzt werden um zum Beispiel in „**S**table **I**sotope **L**abeling by **A**minoacids in **C**ulture“ (SILAC) Experimenten den Einbau und Stoffwechselweg verschiedener Aminosäuren zu verfolgen, wie es zum Beispiel zur Identifizierung von Substraten der Tyrosin-Kinase durchgeführt wurde (Ibarrola *et al.*, 2004). Außerdem wurde eine Methode entwickelt, welche es ermöglicht freie Thiolgruppen der Aminosäure Cystein von Thioethern in Peptiden zu unterscheiden, wobei diese Methode abgewandelt auch auf die reaktive Gruppe anderer Aminosäurereste anwendbar ist (Backus *et al.*, 2016). Zur Bestimmung der Cysteinreaktivität können dabei leichte und schwere Isotope eines Desthiobiotinderivats verwendet werden, welche mittels Click-Chemie an ein Iodoacetamid (IA)-Alkyl gebunden werden (Zanon *et al.*, 2020). Danach kann mittels Massenspektrometrie durch den Unterschied der Reaktivität zwischen gebundenen und freien Thiolgruppen unterschieden werden (Zanon *et al.*, 2020). Diese Methode wurde anfangs verwendet um funktionale Cysteine im Proteom von *E. coli* vorherzusagen, wobei bereits hier eine Verbindung zu den Cystein-ligierten Fe/S-Clustern beschrieben wurde (Weerapana *et al.*, 2010). Später ermöglichte diese Methode eine gezielte Betrachtung der Fe/S-Beladung des *E. coli* Proteoms (Bak & Weerapana, 2023).

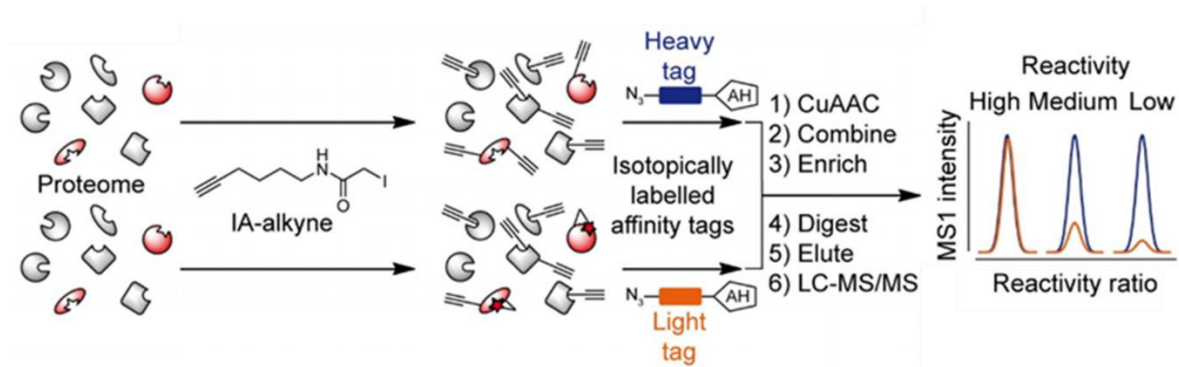


Abbildung 20: Bestimmung der Cysteinreaktivität mittels IsoDTB. Gezeigt ist die Bestimmung der Cysteinreaktivität, wobei links die Zellextrakte zwei verschiedener Bedingungen dargestellt sind (Zanon *et al.*, 2020).

2. Aufgabenstellung

Die Fe/S-Cluster Biosynthese ist ein essenzieller Prozess in allen Lebewesen. In *Saccharomyces cerevisiae* wird die Synthese und Reifung zytosolischer Fe/S-Proteine durch die Cytosolic Iron-Sulfur-Assembly (CIA)-Maschinerie gewährleistet. Beeinträchtigungen dieses Systems sind mit zellulären Dysfunktionen und Krankheiten assoziiert, doch viele Aspekte der Funktion, Regulation und Substratspezifität dieser Maschinerie sind bislang unklar.

Ziel dieser Arbeit ist es, systematisch zu untersuchen, wie sich die gezielte Depletion einzelner Komponenten der CIA-Maschinerie auf das zelluläre Proteom der Hefe auswirkt. Hierzu soll eine Sammlung genetisch manipulierter Hefestämme erzeugt werden, in denen die CIA-Gene durch galaktoseregulierbare Promotoren kontrolliert werden. Dies erlaubt eine nahezu vollständige Repression der Gene, ohne die letalen Effekte einer vollständigen Gendeletion. Diese Aufgabe beinhaltet die Optimierung der Mutationsmethode, sowie die Verifizierung der erzeugten Mutationsstämme.

Mittels quantitativer, nativer Massenspektrometrie (Label-free LC-MS/MS) werden die Proteomveränderungen dieser Depletionsstämme untersucht und mit jenen verglichen werden, die durch Eisenmangel verursacht wurden. Der Fokus liegt dabei auf Unterschieden und Gemeinsamkeiten in der Regulation zellulärer Prozesse, der Stabilität belegter und wahrscheinlicher CIA-Substrate und der Reaktion verschiedener Fe/S-abhängiger Enzyme auf den Kofaktormangel. Insbesondere die Rollen der Glutaredoxine Grx3 und Grx4, sowie der Adaptorproteine Yae1 und Lto1 in der CIA-Maschinerie und weiteren zellulären Prozessen sind bisher nicht endgültig geklärt und bedürfen einer näheren Untersuchung. Dieser Untersuchung liegt die Hypothese zu Grunde, dass ein Apoprotein (ohne Kofaktor) in vielen Fällen instabiler ist, als ein Holoprotein (mit Kofaktor).

Des Weiteren wird die IsoDTB-Methode zur Messung der Reaktivität von Cysteinresten implementiert. Diese Technik erlaubt die Identifikation potenzieller Eisen-Schwefel-haltiger Proteine basierend auf der chemischen Reaktivität von Thiolgruppen. Diese kommen als reaktive Gruppe in der Aminosäure Cystein vor, welche einen Großteil der Fe/S-Liganden in Proteinen stellen.

Die gewonnenen Daten liefern neue Erkenntnisse über die Funktion einzelner CIA-Komponenten, potenzielle neue Fe/S-Proteine und die hierarchische Organisation der CIA-abhängigen Proteinreifung. Diese Arbeit leistet damit einen Beitrag zum molekularen Verständnis der CIA-Maschinerie und ihrer Rolle in der zellulären Homöostase.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte und Chemikalien

3.1.1 Geräte und Verbrauchswaren

Gerät	Hersteller	Modell
Anaerobe Glovebox	Coy Lab Products	-
Autoklav	Zirbus	LVSA 40/60
Biospin® Säule	Bio-Rad	Bio-Spin® P-6 Gel Columns
Blot-Transfer	Bio-Rad	Trans-Blot® Turbo™
CD-Spektrophotometer	Applied Photophysics	Chirascan™ V100
Elektrophoresekammer (senkrecht)	Bio-Rad	Mini-Protean 3 Cell
Elektrophoresekammer (waagerecht)	Roth	HU10
Elektrophorese-Netzteil	Bio-Rad	PowerPac3000
FastPrep®	MP Biomedicals™	FastPrep™-24 5G
Fluorimeter	Perkin Elmer	LS 50 B
Flüssigchromatograph	Thermo Scientific	Easy-nLC 1200 System
French press	Thermo Spectronic	SLM Aminco FA-032
Gel-Schüttler	IKA	Rocker 3D digital
Großkulturschüttler	Infors HT	Multitron Pro
Impfösen (Einweg)	Sarstedt	-
Inkubationsschrank (30 °C)	Thermo-Scientific	Heratherm IGS 100
Inkubationsschrank (37 °C)	VWR	Incu-Line
Ionenquelle	Thermo Scientific	Nanospray Flex
Kleinkulturschüttler	New Brunswick Scientific	Innova 4000
LoBind Reaktionsgefäß	Eppendorf	LoBind™
Mikrotiterplattenlesegerät	Biotek	ELx808
Nanodrop	Thermo Scientific	NanoDrop ONE ^C
Nanopure H ₂ O	Sartorius	Arium H ₂ O pro-UF-T
NucleoSpin Säule	Macherey-Nagel	Gel and PCR
NucleoSpin Säule	Macherey-Nagel	Plasmid-DNA
Orbitrap MS/MS	Thermo Scientific	Q Exactive HF
PCR-Cycler	Bio-Rad	T-100

PD-10-Säule	GE-Healthcare	PD-10
Petrischalen	Sarstedt	92 mm x 16 mm
pH-Elektrode	WTW	InLab easy Elektrode
pH-Messgerät	WTW	pH521
Reaktionsgefäß	Sarstedt	50 ml
Reaktionsgefäß	Greiner	15 ml
Sauerstoffdurchlässige Folie	Omnilab	Axygen® 1172007
Sonifizierer	Diagenode	Bioruptor® Pico
Speedvac®	Eppendorf	Concentrator Plus
Stand-Kühlzentrifuge	Beckman Coulter	Avanti J-26S XP
Sterilbank	Thermo Scientific	MSC-Advantage
Sterilfilter	Sarstedt	0.2µm PES-Membran
Thermoblock	Eppendorf	Thermomixer comfort
Tiefkühlschrank (-80 °C)	Sanyo	VIP™ SERIES -86 °C
Tisch-Kühlzentrifuge	Eppendorf	5810R
Tischzentrifuge	Sigma	1-16
UV/Vis Photometer	Thermo Scientific	Genesys 10uv
UV/Vis Photometer	Shimadzu	UV 1900
UV-Geldokumentation	Vilber Lourmat	Fusion SL
UV-Geldokumentation	Intas	New-Line ECL ChemoSTar
UV-Küvetten	Sarstedt	PMMA
UV-Transilluminator	Fröbel	FirstLight UV
Vis-Küvette	Sarstedt	Polystyrol
ZebaSpin Säule	Thermo Scientific	Zeba™ Spin 5ml, 7K MWCO

3.1.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Katalognummer
3-Isopropylmalat	Sigma-Aldrich	02339
Aceton	Honeywell	32201-1L
ACN (MS-Grade)	Roth	AE70.1
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	Sigma-Aldrich	A3699-100ML
Adenin	Sigma-Aldrich	A8751
Agar-Agar	Roth	5210.2
Agarose	Biozym	M3044.0500

Ammoniumsulfat	AppliChem	131140,1211
Ampicillin	AppliChem	A0839,0100
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich	A3678
β -Mercaptoethanol	Merck	805740
Bradford-Reagenz	Bio-Rad	5000006
Bromphenolblau	Serva	15375.01
BSA	Sigma-Aldrich	A9418
BSA Fraktion V	Roth	8076.2
Coomassie G-250	Thermo-Fisher Scientific	043318.18
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	Roth	7758-99-8
Cutsmart-Puffer	New England Biolabs	B7204
DMSO	VWR	235500.297
DNAse	AppliChem	A3778
dNTP's	New England Biolabs	N0447
DOC	Sigma-Aldrich	D6750
DTT	AppliChem	A2948,0010
EDTA	AppliChem	A5097
EDTA Di-Natrium-Salz	AppliChem	A2937
Essigsäure (100%)	Roth	6755.1
Ethanol ($\geq 98 \%$)	Roth	9065.2
G418 Sulfat	Roth	0239.3
Galaktose	Roth	4987.3
Gel Loading Dye Purple 6x	New England Biolabs	B7025
Gel Red®	Biotium	B-41003
Glasperlen ($\varnothing 1 \text{ mm}$)	Roth	A554.1
Glukose	Roth	6887.1
Glyzerin	Roth	3783.2
H_2O (MS-Grade)	Merck	1153332500
Harnstoff	Merck	U5128
HCl (37%)	Bernd Kraft	05430
Hefeextrakt	Roth	2363.1
Histidin	Sigma Aldrich	H8000-100G
IA-Alkin	Prof. Dr. Stephan Hacker	(Zanon <i>et al.</i> , 2020)
Imidazol	AppliChem	A1073
IPTG	Roth	2316.4
Iso-DTB	Prof. Dr. Stephan Hacker	(Zanon <i>et al.</i> , 2020)
Kanamycin	AppliChem	A1493

Lachssperma-DNA	Invitrogen™	AM9680
LB-Medium (Lysogeny-Broth)	Roth	X968.4
Leucin	Roth	3984.1
Luminol	Thermo Scientific™	32106
LysC (MS-Grade)	Wako	125-05061
Lysin	USB	18585
Lysozym	Roche	10837059001
Magnesiumsulfat	Merck	105886
MeOH (MS-Grade)	Merck	106035
Na ₂ CO ₃	Merck	106392
Na ₂ H ₂ PO ₄	AppliChem	A1047
NaCl	Roth	P029.3
NaOH	Sigma-Aldrich	567530
NH ₄ (MS-Grade)	Merck	22LX.1
Ni-NTA Säulenmaterial	Cube-Biotech	31103
Nourseothricin	Jena Bioscience	AB-102L
NP40	Thermo Fischer	J60766.AK
Nitrozellulosemembran 0.45 µm	Cytivia	10600002
Pepton	Roth	8986.2
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer	23227
PMSF	AppliChem	A0999
Polymerase Q5	New England Biolabs	M0491
Ponceau S	Thermo Scientific™	A40000279
Rotiphorese gel 30	Roth	3029.2
SDB-RPS-Säulenmaterial	Thermo Scientific™	13-110-022
SDS	Roth	CN30.2
Streptavidin-Beads	Merck	49532
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs	M0202
TBTA	Prof. Dr. Stephan Hacker	(Zanon <i>et al.</i> , 2020)
TCA	Roth	3744.1
TCEP	Thermo Scientific	PG82080
TEMED	AppliChem	A1148
Tetracyclin	AppliChem	A2228
TFA (MS-Grade)	Thermo Scientific™	85183
Triethylammoniumbikarbonat	Thermo Fischer	90114
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth	4088.1
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	AppliChem	A1086

Trypsin (MS-Grade)	Sigma-Aldrich	T6567
TEAB	Thermo Scientific	90114
Tryptophan	AppliChem	A344S,0100
Tween20	Merck	P1379
Uracil	Sigma-Aldrich	U0750
Wasserstoffperoxid	AppliChem	A1134.0250
Wattepapier Blot	Thermo Scientific	88620
Yeast Nitrogen Base	FORMEDIUM	CYN1702
Yeast Nitrogen Base (Fe-free)	FORMEDIUM	CYN0505

3.1.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Zweck	Verdünnung
α -HA F7, sc-7392	Santa-Cruz	Western-Blot	1:2000 BSA 5% (w/v)
α -Mouse IgG-HRP	Santa-Cruz	Western-Blot	1:10000 BSA 5% (w/v)
α -Rabbit IgG-HRP	Santa-Cruz	Western-Blot	1:10000 BSA 5% (w/v)
α -Leu1 (Rabbit)	C. Blinn	Western-Blot	1:2000 Milch 5% (w/v)

3.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (bis Mai 2020) oder der Firma Sigma-Aldrich (ab Mai 2020) bezogen. Die lyophilisierten Primer wurden vor Verwendung gemäß Herstellerangabe in H₂O gelöst und dann zehnfach verdünnt. Kurze Oligonukleotide wurden entsalzt bestellt, lange Oligonukleotide (>60 Basen) wurden HPLC-gereinigt bestellt.

Tabelle 2: Oligonukleotide zur Überprüfung homologer Rekombinationen

Name	Sequenz (5' -> 3')
Rfc2_for	CAGTAACGGCATGATCTTGAGC
Atx2_187	ACCGGAAAGGAAGTTAGATCTGG
Yae1_122_rev	CTCACTATTCCGTCCAAGTACC
Lto1_rev	ACAAACCTTCCATTTGTCCCAGG
Dre2_-172_for	ATATCCCGGTACCGGAATAAGTCC

Dre2_356_rev	TTAATCCAGCAATAATCTGGTTTCG
Dre2_-172_for	ATATCCCGGTACCGGAATAAGTCC
Dre2_356_rev	TTAATCCAGCAATAATCTGGTTTCG
Msf1_Cterm_for	CGTAGAACTCAGATAGGGATACG
Tah18_247_rev	AGAACGTGACGGGTCTTTCACC
Nar1_-82_for	CTAAGAACTTGTCTTGTCTGAGCTGG
Nar1_423_rev	CTCCGTTCCAACCATATACTTGC
Grx3_-103_for	GTGTTCTTTTCAGGTTCCATCTGC
Grx3_Msh6_rev	CAGAAGCCATTATTATGTCACAC
Grx4_-81_for	CATTGTTGTCTTTGGGTACTGAGC
Grx4_425_rev	TCAGTTTCGTCCTCTTCATCATCG
pYM_seq3	GACTCACTATAGGGAGACC
Nbp35_min236	CAGTTCTATGCATTGACACGTCG
Nbp35_310_rev	GTAAATCTTCGTCAGCTGAAAGTGC
Cfd1_-100for	GGAAGGCTTCATTAGTCATGAACG
Cfd1_300rev	CTACAATACCACCATCTGGTTTGG
Grx3_200_Seq_rev	TTCCGAGTTTTTCGTCCGC
Glt1_-200_for	GCAGACGGATACTCTCAGTTGC
Glt1_+500_rev	CGAGGATGAGGATACTATCAATGC
pYM_KLtryp	CTGATAACGTTTCTGTTGCC
Cia2_prom_for	CGCAATGCTTGGGTGTACGG
Cia2_rev	GACTTAACGGGTGCTCAGGG

Tabelle 3: Oligonukleotide für die homologe Rekombination

Name	Sequenz (5' -> 3')
Yae1_S1	TTGATAGAAGAGAACAAAAAGGAACAGTGTTACAATA GTATATAGAGATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
Yae1_S4	TTCAGTTTTCGACATCACTGTCTGATGCCCATACATCGT CCCAAGTATTCGACATCGATGAATTCTCTGTCTG
Lto1_S1	CTTATCATATTTGAAGAGTAAATGGAAAGTAAAGATCA CTGGACAAATAAAAAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
Lto1_S4	AAACCTTCTTGGTAATACTGTTCTTCTAGGTTTAGTAA ATTATCAAAATCCATCGATGAATTCTCTGTCTG
Dre2_S1	GTCTTTTCATCACATTTGATCTAAGCATATACACTGTAA GTGAAGGTATCGATGCGTACGCTGCAGGTCGAC

Dre2_S4	CGTTGTAGTCACCGCCGGATGTATTAAGTAAACCA GTTTTGTATTGTGACATCGATGAATTCTCTGTCTG
Tah18_S1	GAAGATTCTAGTCAACAGTAGGCCATCTGTGTTTCCAT TAATCGCTGCATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
Tah18_S4	CGTTACCTGTCTCCGATCCATAGAGGATGACGATTTT CTTGCTCGATGACATCGATGAATTCTCTGTCTG
Nar1_S1	GGGAGCTTCCTTTTCCTGAGTGACAAGATAAGTGTAC AAGAAAGCATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
Nar1_S4	GCGGGACTGATAAAATCGTTTAGGTCAGACTCGGACA GTAGAGCACTCATCGATGAATTCTCTGTCTG
DGrx3_Sfor	ATAAACGCCACCAAGCAAGATATTACACAGCAGCAAA ACTTTTTCAGGAAGTGTAGCTTGCCTCGTCCC
DGrx3_Srev	GAAATGGAGACTTTTCTGTTTCAATTTACACTAAATAC ATCTATTTATTTATCGATGAATTCGAGCTCG
Grx4_S1	TTTTCCAATTACATATAACTAAATTTCTGTGCTCTTCCT CCAATAAATATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
Grx4_S4	AGTGGTTAGTTGCGTAAATTGGTCCTGGCTTTTTATTT CAACCACAGTCATCGATGAATTCTCTGTCTG
Nbp35_S1	GAAGTCTTTCTGTTTTTGAGAACAACAGTATACATAAG TGATATCCAAGACGTACGCTGCAGGTCGAC
Nbp35_S4	TACTCTGCTGGTAGCACTTCGTCTTTACATGTGGTA GTATCTCAGTCATCGATGAATTCTCTGTCTG
Cfd1_S1	GCGTCGAGGAGCACCCAAACTAATACGACTATTACA ATTAAGCATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
Cfd1_S4	GTTTTATTCCTGCCAAAGAGGCCGCAGGAACGCCTAT CTCCTGTTTCTCCATCGATGAATTCTCTGTCTG
DGrx4_Sfor	TTTTCCAATTACATATAACTAAATTTCTGTGCTCTTCCT CCAATAAATCTGTTTAGCTTGCCTCGTCCC
DGrx4_Srev	GGAAATATTCCACACAAATCTATGCACATTACATTCTA GAATAAATTAATATCGATGAATTCGAGCTCG
Grx3_S1	AAACGCCACCAAGCAAGATATTACACAGCAGCAAAAC TTTTTCAGGAAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
Grx3_S4	GTAGTTAGGTAAGTAAATTGCTCTTGATCGTTAATTTT AATAACAGGCATCGATGAATTCTCTGTCTG
Glt1_S1_del	GCCATTTATTTATTTTGAAGAACTAGAAAAAGAATTAG AAAAGAAAGCATGCGTACGCTGCAGGTCGAC

Glt1_S2_del	CAAGCTTTTTAGACTTGACTAGCTAATTCTTTCAATAG TTTGTAAATCAATCGATGAATTCGAGCTCG
Glt1_S3	GGACGGCACTACGTATCTACCAAGTAATGGTGGTATC GTTCAACGCGTACGCTGCAGGTCGAC
GallCia2_S1	AGTCGAATATAAAATCTTGCTACTGCATTATTCTACGA TTTCCTGTTATCGTACGCTGCAGGTCGAC
GallCia2_S4	AGTTGGTTCTCCTCTAAAATGTCGGGATTTTCATTCAA AAACTCAGACATCGATGAATTCTCTGTCTCG

Tabelle 4: Oligonukleotide für klassische Klonierung in Plasmide

Name	Sequenz (5' -> 3')
Yhi9_for_NdeI	ATGGTACATATGATGACTTTAATGGTACC
Yhi9_rev_BamHI	TACCATGGATCCCTAAACTTTGATCTTACC
Map2_NdeI_for	ATGGTACATATGATGACAGACGCTG
Map2_XhoI_rev	TACCATCTCGAGTCAGTAGTCATCACC
Ykl033w-A_NdeI_for	ATGGTACATATGATGACACATTCTGTAGC
Ykl033w-A_BamHI_rev	TACCATGGATCCCTCACAGTCCATATTTGG
Nce103_XhoI_for	ATGGTACTCGAGATGAGCGCTACCG
Nce103_BamHI_rev	TACCATGGATCCCTATTTTGGGGTAACT
Adh5_for_BamHI	ATGGTAGGATCCATGCCTTCGCAAGTC
Adh5_rev_NcoI	TACCATCCATGGCATTTAGAAGTCTCAAC

Tabelle 5: Auxotrophiemarker Mutationen in W303-K6001. Gezeigt sind die Mutationen, welche W303-1A, sowie W303-K6001 ihre Auxotrophien verleiht (Ralser et al., 2012).

Allelname	Lokus	Mutation
<i>ade2-1</i>	YOR128C	nonsense, <i>glu64STOP</i>
<i>trp1-1</i>	YDR007W	nonsense, <i>glu83STOP</i>
<i>can1-100</i>	YEL063C	frameshift, <i>lys47</i>
<i>leu2-3,112</i>	YCL018W	frameshift, <i>gly83</i>
<i>his3-11,15</i>	YOR202W	2x frameshift, <i>ala70</i> , <i>glu106</i>
<i>ura3-1</i>	YEL0221W	missense, <i>gly234</i>

3.1.5 Verwendete Plasmide für homologe Rekombination

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Name	Rekombinierbare Merkmale	Referenz
pYM-N28	Gall-3HA (N-term) Nourseothricin-Resistenz	(Janke <i>et al.</i> , 2004)
pYM-N28 (kanMX4)	Gall-3HA (N-term) Geneticin-Resistenz	RPTU Labor
pYM-N27	Gall (N-term) Nourseothricin-Resistenz	(Janke <i>et al.</i> , 2004)
pYM-N26	Gall (N-term) Geneticin-Resistenz	(Janke <i>et al.</i> , 2004)
pYM13	Deletion Geneticin-Resistenz	(Janke <i>et al.</i> , 2004)

3.1.6 Verwendete Marker für die Elektrophorese

Für alle Agarosegele wurde derselbe Marker (1 kb Plus-DNA Ladder, NEB) verwendet. Mit dessen Hilfe ist es möglich, die Größe und Menge der DNA zwischen 0.1 und 10 Kilobasen abzuschätzen. Für SDS-PAGEs wurden verschiedene Proteinmarker verwendet, wobei alle Marker die Abschätzung des molekularen Gewichts von ungefähr 10 bis 250 kDa erlauben (New England Biolabs, 2022b; New England Biolabs, 2022c; New England Biolabs, 2022d). Außerdem wurden vorgefärbte Marker verwendet, was Abschätzung des molekularen Gewichts ohne eine Proteinfärbung als Zwischenschritt erlaubt.

3.2 Übergreifende Methoden

3.2.1 Lagerung

Zellextrakte und Zellpellets, die nicht unmittelbar weiterverarbeitet wurden, wurden zur Konservierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 20 °C gelagert. Hefestämme wurden für die langfristige Lagerung in Glycerol-Aliquots eingefroren und bei - 80 °C konserviert. Diese Vorgehensweise gewährleistet die Reproduzierbarkeit und Stabilität der Proben.

3.2.2 Bestimmung der Zelldichte

Das Wachstum von Zellen wurde spektroskopisch untersucht. Dazu wurde die optische Dichte (OD₆₀₀) bei 600 nm bestimmt. Als Referenz, bzw. Leerprobe diente frisches Medium. Die Messung erfolgte regelmäßig während des Wachstums, insbesondere vor Ernte- und Induktionsschritten, um vergleichbare und kontrollierte Wachstumsbedingungen sicherzustellen.

3.3 Bioinformatische Methoden

3.3.1 Design von Primern

Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*:

Zur Vorbereitung der PCR wurden Primer mit einer zur Reaktion passenden Sequenz bestellt. Die Primer-Sequenz wurde erhalten, indem die Sequenz des Proteins in einer Proteindatenbank nachgeschlagen wurde (www.yeastgenome.org) (Wong *et al.*, 2023). Sequenzen für Primer für Proteinexpression wurden auf mögliche Transmembransequenzen mittels (open.predictprotein.org) untersucht. Die Primer wurden anhand der Nukleotidsequenz so gewählt, dass keine N- oder C-terminale Transmembransequenzen amplifiziert werden, dafür aber die Enden des Gens von Restriktionsschnittstellen, welche nicht im Gen selbst präsent sind, flankiert werden. Dies wurde für alle untersuchten Gene wiederholt, wobei in allen Fällen dieselben Schnittstellen gewählt wurden, sodass die Restriktion möglichst wenig Anpassung bedurfte.

Homologe Rekombination in *S. cerevisiae*:

Primer für die PCR der homologen Rekombination wurden anhand der Anleitung von Janke *et al.* (Janke *et al.*, 2004) erstellt. Dabei wurde eine Länge zwischen 60 und 70 Basen angestrebt. Desweiteren wurde auf einen ausgeglichenen GC-Gehalt von Primerpaaren geachtet, um ähnliche Schmelz- und Annealing-Temperaturen zu erhalten, sowie nach Möglichkeit ein abschließendes GC-Motiv eingeplant.

3.3.2 Bestimmung von Proteinparametern

Zur Bestimmung von Proteinparametern wurde die DNA-Sequenz des zu exprimierenden Proteins inklusive der eingeführten Mutationen auf einer Webseite in die Aminosäuresequenz übersetzt (web.expasy.org) (Artimo *et al.*, 2012). Durch Auswahl des richtigen Leserasters und des webbasierten Tools „ProtParam“ (web.expasy.org/protparam/) konnten Proteinparameter wie molare Masse, isoelektrischer Punkt und die Anzahl der Aminosäuren bestimmt werden.

3.3.3 Sequenzalignment

Zur Überprüfung der Übereinstimmung von klonierten DNA-Sequenzen mit genomischen DNA-Sequenzen, sowie zur Überprüfung der korrekten Insertion im Verlauf der homologen Rekombination wurden sequenzierte DNA-Sequenzen mittels „Clustal Omega“ (www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo) überprüft (Sievers *et al.*, 2011). Dort wurden die zu überprüfenden Sequenzen und die erwartete Sequenz im FASTA-Format, einem gängigen Dateiformat für DNA-Sequenzen, hochgeladen. Als Ergebnis wird eine Grafik erhalten, aus welcher Übereinstimmungen und Abweichungen der mutierten DNA-Sequenz im Vergleich zur erwarteten Sequenz ersichtlich sind (siehe Kapitel 8.10 Sequenzalignment der Sequenzierungen neuer Stämme).

3.3.4 MaxQuant

Durch die Messung mittels Massenspektrometer wurden Datensätze des „raw“-Dateiformats erzeugt. Diese wurden mit Hilfe eines spezialisierten Programmes, namens „MaxQuant“ (Cox & Mann, 2008) in weiter analysierbare Peptiddaten umgewandelt. Dazu wurden diese zuerst in das Programm geladen, wobei dort die spezifischen Parameter zur Art der Labels „Multiplicity“ auf 1 (für Label-freie Quantifizierung), beziehungsweise 2 (für Heavy- und Light-Label Quantifizierung) gestellt wurden. Auch die zum Verdau genutzten Enzyme wurden hier angegeben. Im nächsten Schritt wurde eine FASTA-Datei des untersuchten Proteoms angegeben. Daneben gibt es noch weitere Parameter, welche von den Entwicklern erklärt wurden (Tyanova *et al.*, 2016). Dieser Schritt wurde von Dr. Markus Räsche und Jan-Eric Bökenkamp an den Computern des Fachgebiets Molekulare Genetik der RPTU Kaiserslautern durchgeführt, da das Programm eine hohe Rechenleistung benötigt.

3.3.5 Perseus

Nach MaxQuant wurden die Daten mittels Perseus (Version 1.6.13.0) analysiert. Dabei wurden die Daten aus MaxQuant ohne weitere Zwischenschritte in Perseus geöffnet. Da diese Daten noch Kontaminanten und nicht real existente „Test“-Peptide enthielten, mussten die Daten in mehreren Schritten bearbeitet werden.

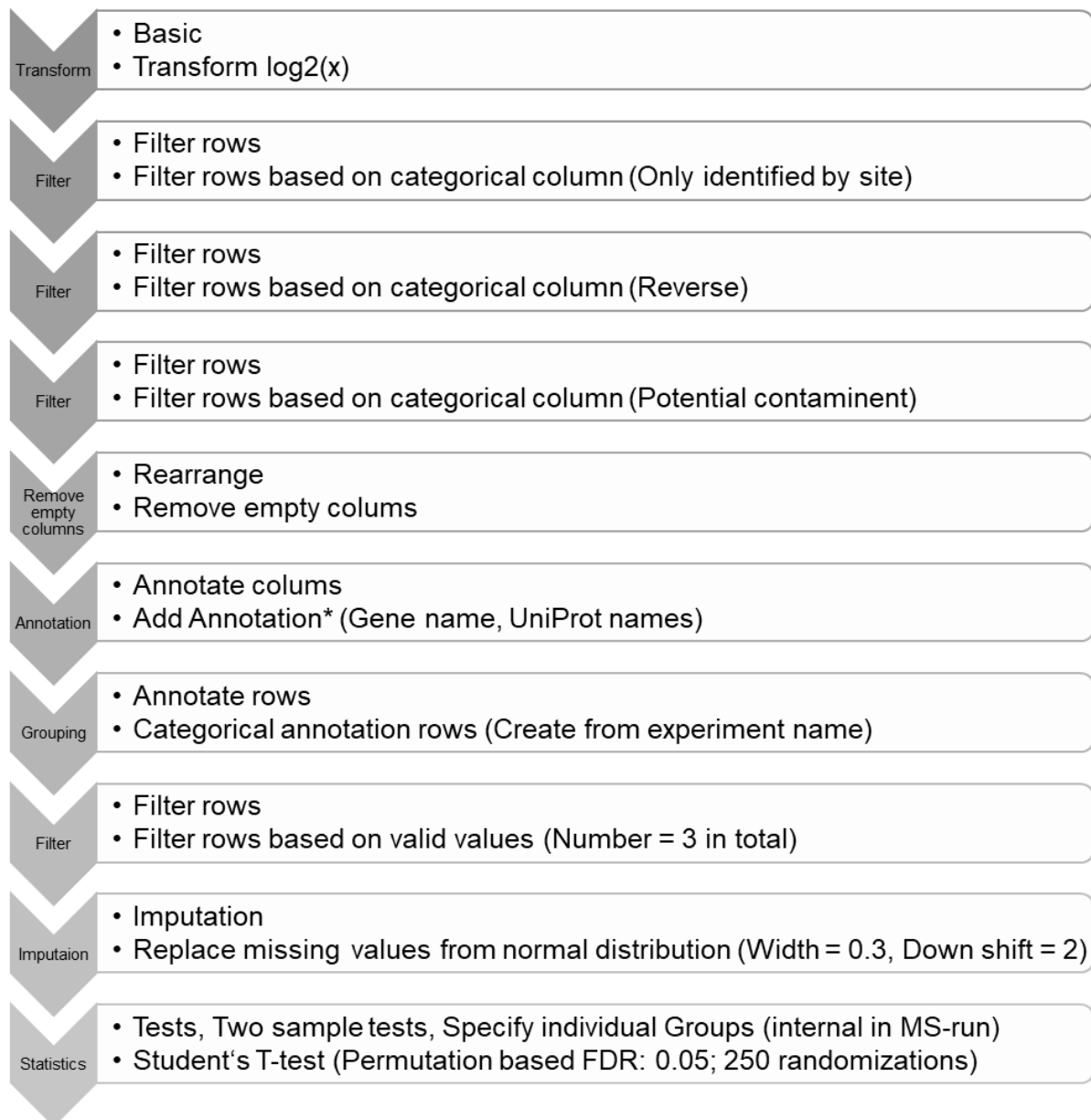


Abbildung 21: Flussdiagramm des Perseus-Arbeitsablaufs. Gezeigt ist der Arbeitsablauf der Daten in Perseus. Dabei ist links die Beschreibung wie sie auch in Perseus angezeigt wird. Rechts ist eine genauere Beschreibung der für diesen Schritt verwendeten Parameter. *Die Datei der Annotationen für *S. cerevisiae* muss zuerst von GitHub heruntergeladen werden.

Dabei wurden die Daten zuerst logarithmiert (Transform „ $\log_2(x)$ “). Dann wurden die Daten mehrfach gefiltert. Zuerst wurden Peptide entfernt, welche nur durch ihre modifizierten Aminosäuren identifiziert wurden (Only identified by site) entfernt, dann wurden weitere Peptide entfernt, welche über eine Falschpositivrate (FDR) als falschpositive Treffer identifiziert wurden (reverse hits) und zuletzt wurden Einträge entfernt, welche Kontaminationen wie Keratin sind (contaminants). Dadurch wurden ungefähr 5 % der gesamten Zeilen entfernt. Danach wurden Annotationen hinzugefügt, welche die Namen der Gene anzeigen und als aktuelle, organismusspezifische Version erhältlich sind (annotations.perseus-framework.org). Daraufhin wurden die einzelnen Replikate der

verschiedenen Hefestämme in Gruppen zusammengefasst, was die Grundlage für die spätere Statistik bildete. Danach wurden Einträge entfernt, bei welchen zu wenige Replikate messbare Abundanzen aufwiesen (Filter rows based on valid values). Je nach Fragestellung kann diese Aussortierung restriktiver oder offener gestaltet werden. Fehlende Werte wurden danach durch Imputation ersetzt, wobei Werte aus einer Standardverteilung genutzt wurden. Die Annahme hierbei ist, dass die fehlenden Werte niedriger als die gemessenen sind, weshalb ein „downshift“-Wert verwendet wurde, wodurch der Mittelwert der Standardverteilung niedriger als die gemessenen Werte war. Diese Imputation erforderte bei der Analyse eine Betrachtung der Rohdaten um falschpositive oder falschnegative Ergebnisse auszusortieren. Die daraufhin erhaltenen Daten konnten statistisch zum Beispiel mittels *t*-Test betrachtet werden.

3.3.6 Weitere Webtools

SGD, Uniprot, PDB und Alphafold2:

Proteinparameter wie Molekulargewicht und Aminosäure-, beziehungsweise DNA-Sequenzen wurden von der *Saccharomyces* Genome Database (SGD) entnommen (www.yeastgenome.org) (Cherry *et al.*, 2012). Andere Proteinparameter wie Liganden des Fe/S-Clusters von Fe/S-Proteinen wurden der uniprot-Datenbank entnommen (www.uniprot.org) (2023). Proteinstrukturen wurden dabei der Protein Databank (PDB) (www.rcsb.org) entnommen (Berman *et al.*, 2000). Falls keine röntgenkristallografische oder Kryo-EM-Strukturen vorlagen wurden die Proteinstrukturen von Alphafold2 verwendet (Jumper *et al.*, 2021).

GO-term-Analyse durch *DAVID, PANTHER*:

DAVID (www.davidbioinformatics.nih.gov/summary.jsp) wurde verwendet um eine Anreicherung an GO-terms zu bestimmen. Dazu wurde eine Genliste im „Uniprot ID“-Format hochgeladen, woraufhin eine Liste mit GO-terms und ihrer Anreicherung heruntergeladen werden kann (Da Huang *et al.*, 2009; Sherman *et al.*, 2022). Alternativ konnten GO-terms auch mittels PANTHER (www.pantherdb.org/) analysiert werden (Thomas *et al.*, 2022).

xPFAM:

Informationen über Proteinfamilien und Beziehungen wurden mittels xPFAM (www.pfam.xfam.org/) ermittelt (Mistry *et al.*, 2021).

Grammatik- und Rechtschreibprüfung durch *DeepL und ChatGPT Version 4o*:

Zur Überprüfung von Grammatik, der Verbesserung von Formulierungen, dem Finden von Synonymen und als Rechtschreibprüfung wurde DeepL (www.deepl.com) und ChatGPT 4o (www.chatgpt.com) verwendet.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

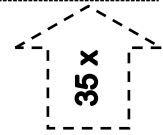
PCRs wurden zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen und Genotypisierungen durchgeführt. Dabei wird die DNA in Einzelstränge geschmolzen, welche daraufhin von der Polymerase zu Doppelsträngen vervollständigt werden. Diese Prozedur erfolgt in drei Schritten, die meistens 35 Mal wiederholt werden. Im ersten Schritt wurde die DNA bei hohen Temperaturen zu Einzelsträngen geschmolzen. Beim Annealing wird die Temperatur so reduziert, dass die Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA möglich wird, aber noch keine unspezifische Bindung stattfindet. Bei der Elongation hängt die Polymerase an den 3'-Enden der Primer-DNA komplementäre Basen an, wobei die Polymerase die Stelle der Anlagerung der Primer als Startpunkt nimmt. Dadurch verdoppelt sich mit jedem vollständigen Zyklus die Menge der Ziel-DNA. Grundlage wurde das Protokoll des Polymerase-Herstellers (New England Biolabs, 2022e) verwendet und dieses auf das DNA-Produkt und die Primer angepasst. Zur Überprüfung des Amplifikats wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Je nach Quelle der Vorlagen-DNA kann die Dauer der initialen Denaturierung variiert werden. Bei Plasmid-Vorlagen reicht eine kurze Zeit von 30 Sekunden, bei genomischer DNA sollte diese Zeit auf zwei Minuten erhöht werden.

Tabelle 7: Probenvorbereitung für die PCR

Komponente	Menge	Finale Konzentration
Q5 Reaction buffer	10 µl	1 x
dNTPs	1 µl	200 µM
Forward Primer	2.5 µl	0.5 µM
Reverse Primer	2.5 µl	0.5 µM
Template DNA	0.5 – 2 µl	1 ng bis 1 µg (genomisch) 1 pg bis 10 ng (Plasmid)
Q5-Polymerase	0.5 µl	0.02 U/µl
H ₂ O (reinst)	ad 50 µl	

Tabelle 8: Ablauf einer PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s (Plasmid) 2 min (genomisch)
Denaturierung	98 °C	20 s
Anlagerung	50 – 72 °C	30 s
Elongation	72 °C	30 s pro kBp
Finale Elongation	72 °C	5 min
Halt	4 °C	∞



3.4.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Stücke und Überprüfung der Reinheit und Größe eines DNA-Stranges bzw. des PCR-Produktes wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde TAE-Puffer (80 ml) mit, je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden DNA, Agarosepulver (1 - 2 % w/v) bis zum Siedepunkt erhitzt und danach in eine Form gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde dieses in einer Gelelektrophorese-Kammer mit TAE-Puffer bedeckt und mit den Proben, sowie DNA-Marker (6 µl) beladen. Für ein analytisches Gel wurde die Elektrophoresekammer 40 Minuten mit 100 Volt betrieben. Für ein präparatives Gel wurde die Kammer 45 Minuten mit 75 Volt betrieben. Die angelegte Spannung führt dazu, dass die (aufgrund der Phosphatgruppen am DNA-Rückgrat) negativ geladene DNA zum Pluspol migriert. Die engmaschige Struktur der quervernetzten Agarose erlaubt eine Auftrennung nach Größe der DNA, da große Stücke stärker zurückgehalten werden und somit länger brauchen, um eine bestimmte Strecke zurückzulegen. Die Größe der DNA in den einzelnen Banden kann anhand des Markers abgeschätzt werden. Für die Sichtbarkeit der DNA sorgt ein durch UV-Licht anregbarer fluoreszenter Farbstoff (Gel Red®), der sich an die DNA durch Interkalation anlagert.

Tabelle 9: Probenvorbereitung für die Agarosegelelektrophorese

Komponente	Menge (analytisch)	Menge (präparativ)
DNA-Probe	2 µl	50 µl
Loading-Dye x6	3.4 µl	13 µl
Gel-Red®	2 µl	8 µl
H ₂ O (reinst)	ad 20 µl	ad 80 µl

Tabelle 10: TAE-Puffer (50x)

Komponente	Endkonzentration
Tris (pH 8)	2 M
Essigsäure	900 mM
EDTA	100 mM

3.4.3 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme können genutzt werden um an definierten Stellen das Phosphatrückgrat zu hydrolysieren und so das DNA-Molekül zu spalten. Dabei können diese Enzyme sowohl glatte, als auch klebrige Enden, also Enden mit Basen-Überhängen, erzeugen. Glatte Enden ermöglichen eine unspezifische Ligation. Klebrige Enden ermöglichen eine spezifische Neuzusammensetzung der DNA-Fragmente, da nur komplementäre Überhänge durch die Ligase miteinander verbunden werden. Um passende klebrige Enden der DNA zu erhalten, wurden diese mit Restriktionsenzymen behandelt. Das Reaktionsgemisch wurde bei der vom Hersteller für das Enzym empfohlenen Optimaltemperatur (meist 37 °C) inkubiert (2 h).

Tabelle 11: Reaktionsgemisch für einen Restriktionsverdau

Komponente	Menge (für Plasmid)	Menge (für Insert)
Restriktionsenzym 1	1 µl	1 µl
Restriktionsenzym 2	1 µl	1 µl
Cutsmart/ 3.1-Puffer	5 µl	5 µl
DNA	1 µg	1 µg
H ₂ O (reinst)	ad 50 µl	ad 50 µl

3.4.3.1 Proberestriktion

Zur Überprüfung einer Klonierung nach einer Ligation können die Restriktionsenzyme so gewählt werden, dass bei erfolgreicher Ligation, Transformation und Minipräparation der Plasmid-DNA für das Konstrukt spezifische DNA-Fragmente entstehen. War die vorherige Ligation nicht erfolgreich, so entstehen weniger oder Banden anderer Größen. Das Reaktionsgemisch wurde für mindestens zwei Stunden bei der für das Enzym vom Hersteller vorgegebenen Optimaltemperatur (meist 37 °C) inkubiert.

Tabelle 12: Reaktionsgemisch für eine Proberestriktion

Komponente	Menge
Restriktionsenzym	1 µl
DNA	600 ng
Cutsmart/ 3.1-Puffer	2 µl
H ₂ O (reinst)	ad 20 µl

3.4.4 Ligation

Zum Zusammenfügen zweier passender Überhänge der klebrigen Enden von DNA wurde eine Ligation durchgeführt. Dazu wurden die geschnittenen DNA-Stücke (Vektor und Insert) in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen mit Ligase (T4 DNA-Ligase), Puffer und Wasser vermischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Neben einer Negativkontrolle ohne Insert wurde eine Ligation in stöchiometrischem Insert/Vektor Verhältnis und eine Ligation mit einem dreifachen molaren Überschuss an Insert durchgeführt. Die Formel zur Berechnung des stöchiometrischen Verhältnisses ist:

$$m(\text{Insert}) = \frac{m(\text{Vektor}) * MW(\text{Insert})}{MW(\text{Vektor})}$$

Tabelle 13: Zusammensetzung Ligation

Komponente	Negativkontrolle	Ligation (1:1)	Ligation (1:3)
Vektor	100 ng	100 ng	100 ng
Insert	-	$m_{(\text{Vektor})}$	$3 \times m_{(\text{Vektor})}$
Ligase	1 µl	1 µl	1 µl
T4 DNA Ligase Puffer	1 µl	1 µl	1 µl
H ₂ O (MQ)	ad 20 µl	ad 20 µl	ad 20 µl

3.4.5 DNA-Aufreinigung mittels Mini-Prep-Kit

Aufreinigung von Plasmiden aus Kulturen:

Grundsätzlich wurden Plasmide aus *E.coli* Kulturen nach dem Protokoll des Herstellers des Mini-Prep-Kits (Plasmid DNA purification „NucleoSpin® Plasmid“) aufgereinigt (Macherey-Nagel, 2022b). Dabei wurde das Protokoll 5.2 verwendet („Isolation of low-copy plasmids, P1

constructs, or cosmids“). Hier wurden Übernachtskultur (6 ml) zentrifugiert (4 °C, 15 min, 4000 rpm Eppendorf) und das Pellett in Puffer A1 (500 µl) resuspendiert. Nach Zugabe von Puffer A2 (500 µl) wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes durch Invertieren gemischt. Nach einer Inkubationszeit (RT, 5 min) wurde Puffer A3 (600 µl) hinzugefügt und durch Invertieren gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde zentrifugiert (10 min, 11000 rpm) und der Überstand auf eine der mitgelieferten Säulen übertragen. Durch Zentrifugation (30 s, 11000 rpm) wurde die DNA an die Säule gebunden. Waschpuffer AW (500 µl) wurde auf die Säule aufgetragen und diese wiederum zentrifugiert (30 s, 11000 rpm). Danach wurde Puffer A4 (600 µl) hinzugegeben und die Säule zentrifugiert (30 s, 11000 rpm). Durch erneute Zentrifugation (2 min, 11000 rpm) wurde die Säule getrocknet. Die Elution erfolgte in zwei Schritten. Es wurde jeweils erhitzter Puffer AE (30 µl, 70 °C) auf die Säule gegeben wurde, woraufhin diese schüttelnd inkubiert (2 min, 70 °C, 550 rpm) und dann zentrifugiert (1 min, 11000 rpm) wurde. Der Durchfluss mit dem Plasmid wurde als Elution aufgefangen und gelagert.

Aufreinigung von DNA aus PCR und Agarosegelen:

Grundsätzlich wurden PCR-Produkte, Restriktionsprodukte mit Verunreinigungen durch Primer, DNA-Fragmenten kleiner als 25 Bp oder aus Agarosegel ausgeschnittene Banden nach dem Protokoll des Herstellers des Mini-Prep-Kits (PCR clean-up Gel extraction „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“) aufgereinigt (Macherey-Nagel, 2022a). Flüssige Gemische wurden 1 zu 2 (v/v) mit Puffer NTI vermischt, Banden aus Agarosegelen 1 zu 2 (w/v). Zudem mussten Proben mit Agarose schüttelnd inkubiert (5 - 10 min, 50 °C, 550 rpm) werden, bis sich die Agarose gelöst hat. Danach wurde das Gemisch auf eine Säule geladen und zentrifugiert (30 s, 11000 rpm). Durch zweifache Hinzugabe von Puffer NT3 (700 µl) und Zentrifugation (30 s, 11000 rpm) wurde die Säule gewaschen. Durch anschließende Zentrifugation (1 min, 11000 rpm) wurden die Rückstände von Puffer NT3 entfernt. Durch Inkubation (2 - 5 min, 70 °C) wurden die restlichen Rückstände entfernt. Die zweifache Elution wurde durch jeweils vorgeheizten Puffer NE (20 µl, 70 °C) und Inkubation der Säule mit Elutionspuffer bei 70 °C vorbereitet und dann durch Zentrifugation (1 min, 11000 rpm) erreicht.

3.4.6 Sequenzierung

Sequenzierungen mit der Kodierung AJPXXX wurden von *SEQ-IT GmbH & Co. KG* in Kaiserslautern durchgeführt. Dazu wurden DNA-Probe (5 µl, maximal 500 ng) mit 1 µl des entsprechenden Primers vermischt und zur Analyse gesendet. Die per E-mail erhaltenen Sequenzen wurden dieser Arbeit angehängt.

Sequenzierungen mit der Kodierung DIVXXX wurden von Eurofins Genomics durchgeführt. Hierbei werden DNA-Proben (7.5 µl, maximal 500 ng) mit einem Primer (2.5 µl) gemischt und zur Analyse gesendet. Die auf der Seite erhältlichen Sequenzen wurden dieser Arbeit angehängt.

3.5 Mikrobiologische Methoden

3.5.1 Zellanzucht *S. cerevisiae*

Vor Verwendung der Medien muss eine Mischung aus YP- oder SC-Medium, Zuckerlösung und Auxotrophiemarker-Mix (für SC-Medium) oder Adenin-Lösung (für YP-Medium) angesetzt werden. Diese drei Lösungen werden getrennt autoklaviert.

Zur Selektion von Mutanten können mehrere Methoden verwendet werden. Entweder man nutzt ein SC-Medium mit einem Auxotrophiemarker-Mix, dem eine Komponente fehlt, welche für den Wildtyp, aber nicht die Mutante essentiell ist, also eine Selektion über eine Auxotrophie, oder man verwendet Medien, die Antimykotika enthalten, gegen welche die Mutanten resistent sind.

Flüssigkulturen wurden über Nacht bei schüttelnd inkubiert (16 h, 30 °C, 150 rpm). Hefekulturen auf Agarplatten wurden für zwei (YP-Medium) bis drei (SC-Medium) Tage inkubiert (30 °C).

Tabelle 14: YP-Medium

Komponente	Massenkonzentration
Pepton	20 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
Agar (für Platten)	20 g/l

Tabelle 15: SC-Medium

Komponente	Massenkonzentration
Yeast Nitrogen Base	1.9 g/l
Ammoniumsulfat	5 g/l
Agar (für Festmedium)	20 g/l

Tabelle 16: Zuckerlösung (10x)

Komponente	Massenkonzentration
Glukose <i>oder</i>	200 g/l
Galaktose	200 g/l

Tabelle 17: Auxotrophiemarker-Mix (1000x)

Komponente	Massenkonzentration
Adenin	4 mg/ml
Leucin	3.33 mg/ml
Tryptophan	2 mg/ml
Uracil	1 mg/ml
Histidin	1 mg/ml
Lysin	1.5 mg/ml

Tabelle 18: Adenin-Lösung (1000x)

Komponente	Massenkonzentration
Adenin	4 mg/ml

Tabelle 19: Antimykotika (1000x)

Komponente	Massenkonzentration
Nourseothricin	100 mg/ml
Geneticin (G-418)	600 mg/ml

3.5.2 Transformation und homologe Rekombination *S. cerevisiae*

Tabelle 20: Li-Ac-Lösung. Die Bestandteile wurden getrennt autoklaviert.

Komponente	Konzentration
Tris/HCl (pH 7.5)	10 mM
Lithiumacetat	100 mM
EDTA (pH 8)	1 mM

Tabelle 21: PEG-Lösung. Das Gemisch wurde sterilfiltriert.

Komponente	Menge (pro 50 ml)
Polyethylenglykol 4000	20 g
Li-Ac-Lösung	ad 50 ml

Die geplanten Experimente erforderten eine gezielte Senkung der Abundanz spezifischer Proteine der Zelle. Da diese Proteine essentielle Proteine sind, konnten die Gene nicht deletiert werden. Als Lösung dieses Problems wurde auf die Insertion eines GalL-Promotors stromaufwärts des Gens zurückgegriffen. Hierfür wurde die homologe Rekombination gewählt, mit Hilfe derer es möglich ist, DNA-Fragmente gezielt in die genomische DNA der Hefe zu integrieren.

Für die homologe Rekombination wurde galaktosehaltiges YP-Medium (25 ml) mit dem geeigneten Hefestamm inokuliert und schüttelnd inkubiert (16 h, 30 °C, 150 rpm). Danach wurde die optische Dichte bestimmt und YP-Medium (50 ml) mit Galaktose auf eine $OD_{600} = 0.2$ inokuliert. Die Flüssigkultur wurde solange schüttelnd inkubiert (30 °C, 150 rpm), bis die optische Dichte $OD_{600} = 0.5$ bis 1.0 betrug. Der Wert wurde notiert. Die Flüssigkultur wurde zentrifugiert (3 min, RT, 3500 rpm Eppendorf) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml H₂O (reinst) resuspendiert. Danach wurde die Suspension zentrifugiert (3 min, RT, 3500 rpm Eppendorf) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Li-Ac-Lösung resuspendiert und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Gemisch wurde zentrifugiert (3 min, RT, 3500 rpm Eppendorf) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml pro $OD_{600} = 1$ Li-Ac-Lösung resuspendiert. Danach wurde Lachssperma-DNA denaturiert (5 min, 95 °C). Die Zellsuspension (100 µl) wurde mit Lachssperma-DNA (12.5 µl, 10 mg/ml), der zu inserierenden DNA (5 µl) und PEG-Lösung (700 µl) in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß invertiert. Danach wurde das Gemisch schüttelnd inkubiert (30 min, 30 °C, 550 rpm). Daraufhin wurde das Gemisch für einen Hitzeschock schüttelnd inkubiert (30 min, 42 °C, 550 rpm), zentrifugiert (3 min, RT, 3500 rpm) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in YP-Medium (1 ml) mit Galaktose resuspendiert und danach schüttelnd inkubiert (1 h, 30 °C, 550 rpm). Nach einer Zentrifugation (3 min, RT, 3500 rpm Eppendorf) wurden das Pellet in H₂O (1 ml, reinst) gewaschen und wiederrum zentrifugiert (3 min, RT, 3500 rpm Eppendorf). Das Pellet wurde in H₂O (200 µl) resuspendiert und auf Platten ausgestrichen, welche die passenden Selektionsmarker enthielten. Diese werden solange inkubiert (30 °C, 3-4 Tage), bis große Kolonien zu sehen sind. Danach wurden diese Kolonien verdünnt (1:16000) und auf neue Platten mit Selektionsmarker ausgestrichen (100 µl).

Diese Methode beinhaltet kritische Schritte und Variationsmöglichkeiten. In jedem Fall müssen die Zellen von Anfang bis Ende steril behandelt werden, wozu auch die verwendeten Lösungen

sterilisiert werden müssen. Die hinzugegebene DNA sollte ein möglichst geringes Volumen aufweisen. Die Menge an DNA und Lachssperma-DNA kann dagegen erhöht werden. Die Zeit des Hitzeschocks kann auf 45 min, die der zweiten Wachstumsphase auf zwei Stunden erhöht werden. Die gängigsten Selektionsmarker Nourseothricin und G418 haben eine optimale Wirkung bei 100 µg/ml bzw. 600 µg/ml (Katharina Krotz, 2020). Die Erzeugung von Doppelmутanten war erfolgreicher, wenn die erste Selektion mit G418 und die zweite Selektion mit Nourseothricin stattfand.

Neben der eigentlich homologen Rekombination wurden vorbereitende und nachbereitende Schritte nach einem Ablaufplan gestaltet (siehe Abbildung 22).

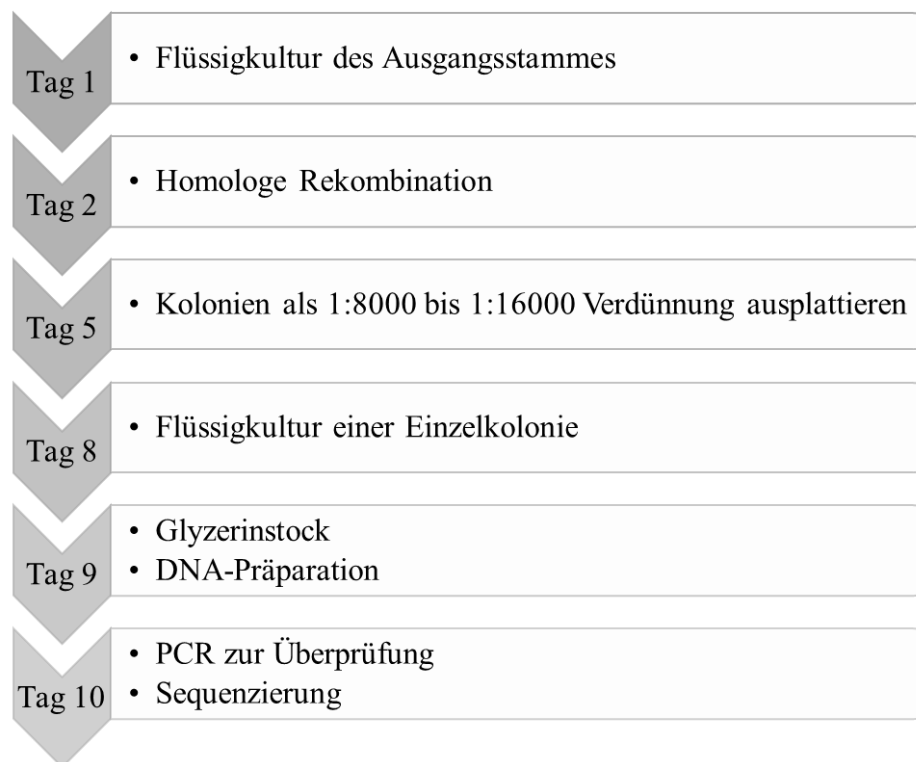


Abbildung 22: Flussdiagramm der homologen Rekombination. Gezeigt ist der typische Ablauf der homologen Rekombination inklusive Vor- und Nachbereitung.

3.5.3 Glyzerinstock

Kandidaten für eine erfolgreiche homologe Rekombination wurden als Glyzerinstock eingefroren und haltbar gemacht. Dabei wurde der Glyzerinstock von derselben Flüssigkultur erzeugt, welche auch für die DNA-Präparation verwendet wurde, sodass sichergestellt wurde, dass der Glyzerinstock genetisch identisch mit der weiter verifizierten genomischen DNA ist. Dazu wurde Übernachtskultur (1.2 ml) mit steriler Glyzerinlösung (400 µl, 70 % v/v) vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.5.4 *S. cerevisiae* DNA-Präparation

Tabelle 22: Lösung 1

Komponente	Konzentration
Sorbitol	0.9 M
EDTA (pH 8)	0.1 M
KP _i -Puffer (pH 7.4)	0.01 M

Tabelle 23: TES-Puffer

Komponente	Konzentration
EDTA (pH 8)	0.3 M
Tris/HCl (pH 8)	0.2 M
SDS	2 % (w/v)

Tabelle 24: TE-Puffer

Komponente	Konzentration
Tris/HCl (pH 8)	10 mM
EDTA (pH 8)	1 mM

DNA-Inaktivierung in RNase A-Lösung:

Für die DNA-Präparation aus Hefezellen wurde eine RNase-Lösung mit inaktivierter DNase benötigt. Diese wurde hergestellt, indem Natriumacetat (10 mM) mit Essigsäure (1 mM) auf pH = 5.2 titriert wurde. Außerdem wurde Tris/HCl (1 M, pH 7.4) hergestellt. Diese Puffer wurden autoklaviert. Danach wurde 1 mg RNase A in 900 µl Natriumacetat-Puffer gelöst. Die Lösung wurde inkubiert (15 min, 100 °C). Danach wurde Tris/HCl-Puffer (100 µl) hinzugegeben. Vor Benutzung wurde die Lösung mit TE-Lösung verdünnt (1:20).

Präparation genomischer DNA:

Zur DNA-Präparation wurde eine Hefeübernachtskultur (25 ml) inokuliert und schüttelnd inkubiert (30 °C, 150 rpm). Von dieser Flüssigkultur wurden 10 ml abgetrennt und zentrifugiert (5 min, RT, 3500 rpm Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0.9 ml Lösung 1 gelöst. Dann wurden 0.1 ml Zymolyase (20 mg/ml) und 1 µl β-Mercaptoethanol hinzugegeben. Das Gemisch wurde inkubiert (30 min, 37 °C, 150 rpm) und zentrifugiert (5 min,

RT, 3500 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0.4 ml TE/RNase-Lösung resuspendiert. Es wurden 30 µl TES-Lösung hinzugegeben und inkubiert (30 min, 60°C). Danach wurden 80 µl Kaliumacetat (5 M) hinzugegeben und durch invertieren gemischt. Das Gemisch wurde auf Eis inkubiert (1 h) und zentrifugiert (15 min, 4 °C, 13000 rpm). Der Überstand wurde entnommen, mit 1 ml kaltem Ethanol (100 %, -20 °C) vermischt und inkubiert (1 h, -80 °C). Danach wurde das Gemisch zentrifugiert (10 min, 4 °C, 13000 rpm) und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl kaltem Ethanol (70 % v/v) gewaschen. Durch zentrifugieren (10 min, RT, 13000 rpm) und Verwerfen des Überstands wurde so viel Flüssigkeit wie möglich entfernt. Danach wurde das Pellet solange in der Sterilwerkbank getrocknet (ungefähr 1 h), bis keine Flüssigkeit mehr vorhanden war. Danach wurde das Pellet in 300 µl TE/RNase-Lösung resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

3.5.5 Tüpfeltest

Der Tüpfeltest wurde genutzt um den Wachstumsphänotyp der genetisch veränderten Hefestämme zu untersuchen, da es wichtig war für die folgenden Experimente Zellen zur Verfügung zu haben, welche einen klaren Phänotyp zeigen, allerdings noch nicht apoptotisch sind.

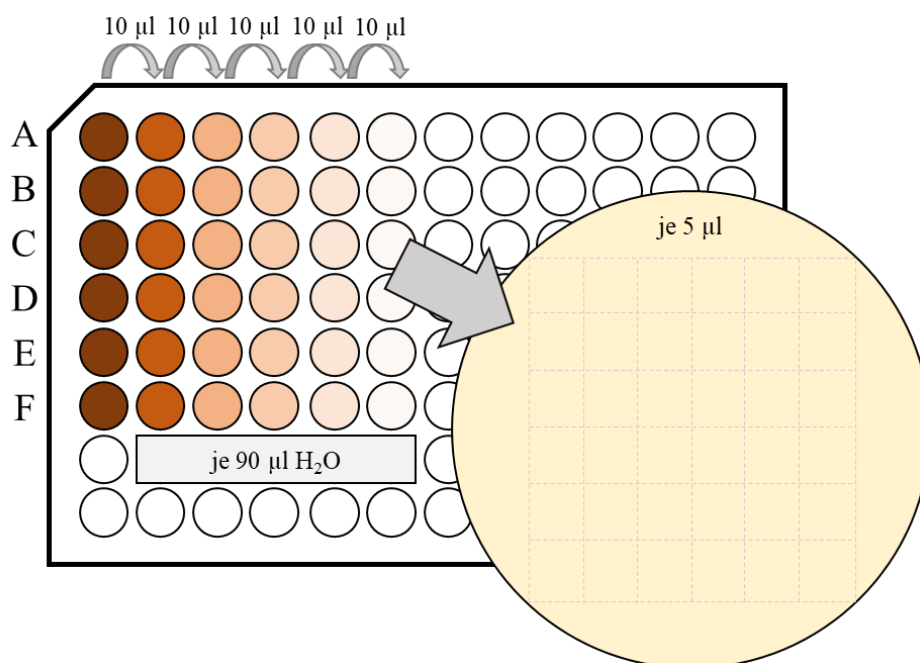


Abbildung 23: Schema eines Tüpfeltests. Gezeigt ist das Schema eines Tüpfeltests, dabei können pro Agarplatte mehrere Hefestämme analysiert werden (A-F). Diese werden in die erste Spalte mit einer $OD_{600} = 0.5$ vorgelegt und dann in den weiteren Spalten, in denen immer 90 µl H_2O vorgelegt wurde, seriell 1:10 verdünnt (nach Greth, 2018).

Hierzu wurde eine Hefeübernachtskultur auf eine $OD_{600} = 0.5$ eingestellt und dann eine serielle Verdünnung (1:10) dieser Kulturen in einer Mikrotiterplatte hergestellt. Anschließend wurden von diesen Verdünnungsreihen je 5 μ l nach dem Schema (siehe Abbildung 23) auf eine Agarplatte aufgetragen und für zwei bis drei Tage inkubiert (30 °C).

3.5.6 Wachstumskurven und Berechnung der Verdopplungszeit (t_v)

Zur Überprüfung der Viabilität von Hefestämmen wurden Wachstumskurven gemessen und daraus die Verdopplungszeit (t_v) in Minuten bestimmt.

Zur Vorbereitung wurde SC-Medium (25 ml) mit dem Hefestamm inokuliert und schüttelnd inkubiert (16 h, 30 °C, 150 rpm). Danach wurde photometrisch die optische Dichte bei 600 nm bestimmt und so viel der Flüssigkultur in ein Reaktionsgefäß überführt, dass damit 25 ml Flüssigkultur auf eine $OD_{600} = 0.1$ inokuliert werden könnte. Die Probe wurde zentrifugiert (5 min, RT, 3500 rpm Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 10 ml H_2O (reinst) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, RT, 3500 rpm Eppendorf) wurde der Überstand verworfen und das Pellet zur Inokulierung einer neuen Flüssigkultur verwendet. Diese wurde schüttelnd inkubiert (16/24 h, 30 °C, 150 rpm) und entweder nach 16 Stunden (bei Doppelmутanten) geerntet, oder nach 24 Stunden zur Inokulierung einer weiteren Flüssigkultur verwendet (alle weiteren Mutanten).

Nach dem Wachstum wurde die optische Dichte (OD_{600}) bestimmt und frisches Flüssigmedium mit der entsprechenden Kohlenstoffquelle angeimpft, sodass die optische Dichte zu Anfang $OD_{600} = 0.1$ betrug. In eine 96-Well Mikrotiterplatte wurden pro Well 250 μ l Flüssigkultur hinzugegeben. Danach wurde die Mikrotiterplatte mit einer sauerstoffdurchlässigen Folie verschlossen und im Mikrotiterplattenlesegerät schüttelnd inkubiert (30 °C). Das Programm wurde so eingestellt, dass 49 Mal alle 30 Minuten zuerst die Mikrotiterplatte geschüttelt (schnell, 5 s) und danach die Absorption der Proben bei 630 nm gemessen wurde.

Die resultierenden optischen Dichten wurden zuerst logarithmiert, danach wurde die erste Ableitung der Werte nach der Zeit gebildet und daraufhin der natürliche Logarithmus von zwei durch den erhaltenen Wert geteilt (Hall *et al.*, 2014) (siehe Formel 1). Von den erhaltenen Werten wurde die geringste Verdopplungszahl als Wert für die Verdopplungszeit dieser Probe festgelegt (typischerweise zwischen $OD_{600} = 0.3$ bis 0.8).

Formel 1: Berechnung der Verdopplungszeit t_v

$$t_v = \frac{\ln(2)}{\frac{\Delta \ln(OD_{600})}{\Delta t}}$$

3.5.7 Zeba Spin Aufreinigung

Zur Aufreinigung der Proteine aus *S. cerevisiae* für die Bestimmung der Cysteinreaktivität wurde eine Gelfiltration mit einer Zeba Spin-Säule durchgeführt (Thermo Fischer, 2022). Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt und die Proteine in Tris/HCl (pH 7.4, 1 mM) eluiert:

Zuerst wurde die Säule vorbereitet, indem sie in einem Sammelgefäß zentrifugiert wurde (1 min, RT, 2000 rpm Eppendorf). Danach wurde die Seite markiert, an welcher das Säulenmaterial höher war. Von hier an wurde diese Seite beim Zentrifugieren immer nach außen gedreht. Danach wurde die Säule drei Mal mit dem Zielpuffer beladen und zentrifugiert (1 min, RT, 2000 rpm Eppendorf). Daraufhin wurde die Säule mit Probe beladen und zentrifugiert (2 min, 4 °C, 2000 rpm Eppendorf).

3.5.8 Zellanzucht *E. coli*

E.coli-Kulturen wurden aus einer Kolonie herangezogen. Dazu wurde eine Kolonie von einer Agarplatte gewählt und in autoklaviertes LB-Medium (siehe Tabelle 25), meist mit einem Antibiotikum als Selektionsmarker, überführt. Das Reaktionsgefäß wurde daraufhin schüttelnd inkubiert (37 °C, 150 rpm), bis die gewünschte Zelldichte erreicht wurde.

Tabelle 25: LB-Medium

Komponente	Menge (pro Liter)
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	10 g

E.coli-Kulturen wurden aus Flüssigmedium auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Selektionsmarkern, meist Kanamycin (30 µg/ml), ausgestrichen. Bakterien ohne die nötige Resistenz werden in ihrem Wachstum inhibiert, wodurch nur Bakterien wachsen können, welche das Plasmid mit der Resistenz tragen. Neben der Resistenz ist auch das Gen auf dem Plasmid, welches das zu untersuchende Protein kodiert. Dazu wurde LB-Medium-Pulver

(25 g/l) mit Agar-Agar (15 g/l) in destilliertem Wasser autoklaviert. Bei einer Temperatur von unter 60 °C wurde das Antibiotikum hinzugegeben und das Medium anschließend in Petrischalen gegossen.

3.5.9 Transformation in *E. coli*

Zur Transformation der Vektoren in *E. coli* (NEB 5 α für Plasmid-Replikation, BL21-pRK-ISC für FeS-Protein-Expression) wurde das Protokoll des Herstellers (New England Biolabs, 2022a) in abgewandelter Form verwendet. Dabei wurden in Schritt 9 anstatt einer Verdünnungsreihe die Zellen herunterzentrifugiert (5 min, RT, 5000 rpm), 900 μ l Medium abgenommen und das Pellet im restlichen Medium (100 μ l) resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Selektionsmarker, hier üblicherweise Kanamycin (30 μ g/ml), Ampicillin (100 μ g/ml) oder Tetracyclin (10 μ g/ml) aufgetragen.

3.5.10 His₆-Tag-Aufreinigung

Bei allen Schritten nach der Zellernte wurden die Zellen und Extrakte immer so kalt wie möglich gehalten. Dazu wurden die verwendeten Puffer sowie die Druckkammer der French Press auf 4 °C vorgekühlt. Elutionsfraktionen und Suspensionen wurden zwischen den Inkubationsphasen auf Eis gelagert.

Tabelle 26: Puffer für His₆-Tag-Aufreinigung

Komponente	Lysepuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
Tris/HCl	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	300 mM	300 mM	300 mM
Imidazol	10 mM	20 mM	250 mM
Glycerin	10 % (v/v)	10% (v/v)	10% (v/v)
pH	8.0	8.0	8.0

Tabelle 27: Entsalzungspuffer

Komponente	Menge
Tris/HCl	20 mM
NaCl	150 mM
Glycerin	10 % (v/v)
pH	8.0

Zur Expression des mit His₆-Tag versehenen Proteins wurden zuerst eine *E. coli* Vorkultur Nacht angezogen. Dazu wurde LB-Medium (25 ml) mit einer *E. coli* Kolonie inokuliert und schüttelnd inkubiert (16 h, 37 °C, 150 rpm). Die Vorkultur wurde in die Hauptkultur überführt, wobei das Volumen ungefähr 2.5% der Hauptkultur betrug. Die Kultur wurde schüttelnd inkubiert (37 °C, 150 rpm), bis sie eine OD₆₀₀ = 0.5 vorwies. Daraufhin wurde IPTG als Induktor in einer Endkonzentration von 0.5 mM zugegeben. Zur Expression wurden die Kulturen schüttelnd inkubiert (über Nacht, 30 °C, 550 rpm).

Nach der Induktion wurden die Kulturen zentrifugiert (15 min, 4 °C, 6000 rpm) (Avanti J-265, Rotor: JLA-8.1000). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in ungefähr 40 ml Waschpuffer pro 10 g Pellet in einem Falcon-Tube (50 ml) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 4 °C, 4000 rpm Eppendorf) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet bei -20 °C aufbewahrt oder direkt aufgeschlossen.

Je 10 g *E. coli* Zellen wurden in 40 ml Lysepuffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit einer Spatelspitze DNase, einer Spatelspitze Lysozym, sowie einer Spatelspitze PMSF (in 98 % Ethanol) versetzt, gut vermischt und mit Hilfe der French Press bei 20000 psi lysiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (60 min, 4 °C, 20000 rpm) (Avanti J-265, Rotor: JA-25.50). Der Überstand wurde weiterverwendet und das Pellet verworfen.

Zur Bindung der His₆-Tag-Proteine an das Nickel-NTA-Säulenmaterial wurde dieses zuerst mit Lysepuffer (50 ml) äquilibriert und dann zusammen mit dem Lysat vermischt und rotierend inkubiert (60 min, 4 °C). Nach Inkubation wurde das Lysat mit dem Säulenmaterial in eine Säule gegeben, wobei das Lysat als zu verwerfender Durchfluss durch die Fritte abtropfen konnte, während das Nickel-NTA-Säulenmaterial mit den gebundenen Proteinen in der Säule zurückblieb. Daraufhin wurde die Säule mit Waschpuffer (50 ml) gewaschen. Das Protein wurde mit Elutionspuffer (3 ml) eluiert und in 500 µl Fraktionen aufgefangen. 5 µl jeder Fraktion wurden mit Bradford-Reagenz vermischt, um die proteinhaltigen Fraktionen mit Hilfe der Blaufärbung zu bestimmen. Neben dem Bradford-Assay wurde alternativ auch die Absorption bei 280 nm gemessen, um die proteinhaltigen Fraktionen zu bestimmen.

3.5.11 Entsalzung mittels PD-10-Säule

Vor Benutzung wurde die Säule mit Entsalzungspuffer (30 ml) (siehe Tabelle 27) äquilibriert. Die zusammengeführten Elutionsfraktionen der Nickel-NTA-Aufreinigung wurden daraufhin auf die Säule aufgetragen. Nachdem die proteinhaltige Fraktion (maximal 2.5 ml) in die Säule eingezogen war, wurden Entsalzungspuffer (3 ml) dazugegeben, sodass wiederum der Durchfluss in Fraktionen (500 µl) gesammelt werden konnte. Die mit Hilfe des Bradford-Reagenz oder Absorptionsmessungen bei 280 nm bestimmten, proteinhaltigen Fraktionen wurden zusammengeführt und aufbewahrt.

3.5.12 Reinigung der Säulen

Nickel-NTA-Säule:

Die Säule wurde zuerst mit Elutionspuffer (10 ml), danach mit Waschpuffer (50 ml) gewaschen und anschließend in Lysepuffer bei 4 °C aufbewahrt.

PD-10-Säule:

Die Säule wurde zuerst mit Entsalzungspuffer (30 ml) gewaschen, dann mit H₂O (30 ml, reinst) gespült und anschließend wieder mit Entsalzungspuffer reäquilibriert und bei 4 °C gelagert.

3.5.13 Herstellung kompetenter Zellen

E. coli kann in seinem unbehandelten Zustand nicht effizient fremde DNA aufnehmen. Um also eine effiziente Transformation zu ermöglichen, müssen die Zellen vorher zu kompetenten Zellen verändert werden.

Tabelle 28: CaCl₂/Glyzerin-Lösung

Komponente	Menge
CaCl ₂	0.1 M
Glycerin	15 % (v/v)

E. coli Zellen wurden auf LB-Agar-Medium ausgestrichen und inkubiert (37 °C, 16 h). Eine einzelne Kolonie wurde in 10 ml LB-Medium schüttelnd inkubiert (16 h, 37 °C, 150 rpm). Danach wurde LB-Medium (400 ml) mit Vorkultur (4 ml) angeimpft und schüttelnd bis zu einer

OD₆₀₀ = 0.4 inkubiert (37 °C, 150 rpm). Danach wurde die Flüssigkultur in Zentrifugationsbechern unter gelegentlichem rotieren auf Eis inkubiert (30 min). Danach wurde die Flüssigkultur zentrifugiert (15 min, 4 °C, 3000 rpm Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 200 ml CaCl₂ (0.1 M, 4 °C) resuspendiert und auf Eis inkubiert (20 min). Danach wurde das Gemisch zentrifugiert (15 min, 4 °C, 2000 rpm Eppendorf) und das Pellet in CaCl₂/Glyzerin-Lösung (16 ml) resuspendiert. Danach wurde die Suspension in Aliquote (200 µl) aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.6 Weitere Methoden

3.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.6.1.1 Bradford-Assay

Diese Methode eignet sich besonders gut um schnell Proteinkonzentrationen abschätzen zu können, da sie innerhalb von zehn Minuten durchführbar ist. Hierzu wurde die Farbreaktion des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Blau mit den Aminosäuren Arginin, Lysin und Histidin im sauren Milieu genutzt. Je mehr dieser Aminosäuren, beziehungsweise je höher die Proteinkonzentration, desto höher die Absorption des Gemisches bei $\lambda = 595$ nm (Kruger, 2009). Der Test benötigt eine Standardreihe (0 bis 50 µg/ml) als Vergleichswert, welche mit BSA (Bovine serum albumin) bekannter Konzentration hergestellt wurde.

Alle Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit Bradford-Reagenz vermischt und für fünf Minuten inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und die Geradengleichung des linearen Bereiches der Standardreihe zur Berechnung der unbekannten Proteinkonzentration der Proben verwendet. Als Leerprobe wurde H₂O (reinst) im Verhältnis 1:10 mit Bradford-Reagenz vermischt.

3.6.1.2 MicroBiuret

Zur Berechnung der kinetischen Parameter bei Aktivitätsmessungen wurde die Proteinkonzentration mittels Micro-Biuret-Methode bestimmt. Diese Bestimmungsmethode beruht auf der Komplexbildung von zweiwertigen Kupferionen mittels Peptidbindungen und ist

somit im Gegensatz zur Bradford-Methode nicht von bestimmten Aminosäuren abhängig. Der durch den Kupferbiuretkomplex entstandene Farbumschlag kann bei $\lambda = 545 \text{ nm}$ gemessen werden (Lowry *et al.*, 1951).

Tabelle 29: Lösungen für Micro-Biuret

Reagenz	Komponente	Konzentration
BSA-Lösung	BSA	2 mg/ml
DOC-Lösung	DOC	0.15 % (w/v)
Micro-Biuret-Lösung	Tri-Natriumcitrat Dihydrat	588 mM
	Na_2CO_3	940 mM
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	69 mM

Die zu messenden Proteinproben wurden mit H_2O (reinst) auf 1000 μl aufgefüllt. Als Standard wurden Proben von BSA in H_2O genutzt, welche 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 und 0.6 mg Protein enthielten. Danach wurden sie mit 100 μl DOC-Lösung versetzt und nach dem Mischen inkubiert (5 min, RT). Daraufhin wurden die Proteine mittels TCA (100 μl , 70 % w/v) gefällt. Die Proben wurden gemischt und zentrifugiert (13000 rpm, 10 min). Der entstandene Überstand wurde abgetrennt und verworfen. Das Pellet wurde in 950 μl NaOH (3 % w/v) gelöst. Nach Zugabe von Micro-Biuret-Lösung (50 μl) wurden die Proben im Dunkeln inkubiert (15 min). Die Absorptionsmessung erfolgte danach bei $\lambda = 545 \text{ nm}$. Die Zusammensetzungen der Lösungen sind Tabelle 29 zu entnehmen.

3.6.1.3 BCA-Assay

Als Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen der MS-Proben wurde die BCA-Methode verwendet. Hierbei beruht die Messung der Proteinkonzentration auf einem Komplex aus einwertigem Kupfer und Bicinchoninsäure. Dieser sensitive Test ist besonders robust und störresistent gegen das in großen Mengen in den Proben vorhandene Guanidiniumchlorid.

Als Proben des Proteinstandards wurden in einer 96-well Platte je 0, 2, 4, 6, 8 oder 10 μl BSA-Lösung (2 mg/ml) mit 1 oder 3 μl Lysepuffer vermischt und auf 15 μl H_2O aufgefüllt. Von den Proteinproben wurde je 1 und 3 μl auf die Platte gegeben und mit H_2O auf 15 μl aufgefüllt. Als Arbeitsreagenz wurde eine Mischung aus Teil „A“ und Teil „B“ im Verhältnis 50:1 genutzt. Davon wurden 200 μl zu den Proben gegeben und diese inkubiert (37 °C, 30 min). Gemessen

wurde die Absorption bei $\lambda = 562$ nm in Mikrotiterplatten. Diese Methode beruht auf den Herstellervorgaben (Thermo Fischer).

3.6.2 Zellaufschluss nach Rödel

Um bei SDS-PAGEs und Western Blots die Protease-Aktivität und damit die Proteolyse der Proteine von Interesse bei Zellaufschluss so gering wie möglich zu halten, wurde hierfür der nicht native Zellaufschluss nach Rödel genutzt. Als Nachteil ist hier zu sehen, dass diese Zellextrakte sich nicht mehr für Aktivitätsmessungen eignen, da die Proteine denaturieren (Methodensammlung AG Pierik, entwickelt von PD Dr. Daili J.A. Netz).

Zum Aufschluss wurde 1 ml Zellsuspension einer $OD_{600} = 1$ geerntet. Die Suspension wurde zentrifugiert (1 min, 4 °C, 12000 rpm) und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit kaltem TE-Puffer (0.5 ml) (siehe Tabelle 30) gewaschen und wie vorher pelletiert. Das Pellet wurde in kaltem H₂O (0.5 ml, reinst) resuspendiert. Es wurde kalte, frisch zubereitete MIX-Lösung (75 µl) (siehe Tabelle 31) hinzugegeben und die Suspension inkubiert (10 min, 4 °C). Danach wurde kaltes TCA (575 µl, 50 % w/v) hinzugegeben und die Probe gemischt und daraufhin zentrifugiert (10 min, 4 °C, 12000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zwei Mal mit kaltem Aceton gewaschen. Nach restlosem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in SDS-PAGE-Probenpuffer (60 µl) gelöst.

Tabelle 30: TE-Puffer

Komponente	Endkonzentration
Tris/HCl (pH 8)	10 mM
EDTA (pH 8)	1 mM

Tabelle 31: MIX-Lösung

Komponente	Endkonzentration
NaOH	1.85 M
β-Mercaptoethanol	1 M
PMSF	10 mM

3.6.3 TCA-Präzipitation von Zellextrakten

Zellextrakte, welche zur Messung von Enzymaktivitäten im Zellextrakt hergestellt wurden, konnten auch zur Erstellung von Proben für Western Blots genutzt werden. Dazu wird das Zellextrakt mit Hilfe von TCA gefällt und danach in Probepuffer (siehe Tabelle 33) gelöst.

Dazu wurde zuerst Zellextrakt (50 µl) mit TCA-Lösung (150 µl, 30 % w/v in H₂O) auf Eis gemischt. Nach einer Inkubation (10 min) wurde das Gemisch zentrifugiert (10 min, 4 °C, 12000 rpm) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Aceton (500 µl, -20 °C) resuspendiert und die Suspension zentrifugiert (5 min, 4 °C, 12000 rpm). Nach einer Wiederholung dieses Schrittes wurde das Pellet in Probepuffer (100 µl) gelöst.

3.6.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Als Vorbereitung für Western Blots und zur Überprüfung des Molekulargewichts und der Reinheit einer Proteinprobe wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurden 10 µl der zu untersuchenden Probe mit 10 µl Probenpuffer (2-fach konzentriert) (siehe Tabelle 33) versetzt und 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Taschen des SDS-Gels (siehe Tabelle 32) wurden mit 10 µl Probe oder 5 µl Proteinmarker beladen. Zuerst wurde die mit Lauffpuffer gefüllte (siehe Tabelle 34) Elektrophorese mit 75 Volt (30 min) betrieben, danach mit 150 Volt (60 min), beziehungsweise bis die Lauffront das Ende des Gels erreichte. Das Sammelgel wurde von dem Trenngel separiert und verworfen. Für Western Blots wurde das Protokoll hier beendet. Für eine Proteinfärbung des Gels wurde das Trenngel eine Stunde lang mit Coomassie-Lösung (siehe Tabelle 35) gefärbt und danach mit Entfärbelösung (siehe Tabelle 36) so lange inkubiert, bis der gewünschte Entfärbungsgrad erreicht war (einige Stunden). Zur Aufbewahrung wurde das Gel entweder getrocknet oder in Konservierungslösung gelagert (siehe Tabelle 37).

Tabelle 32: Zusammensetzung SDS-PAGE 12.5 %. Ausreichend für zwei SDS-Gele.

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid/ Bisacrylamid	5 ml	0.6 ml
APS (10 % w/v)	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl
Tris/HCl (1.5 M, pH 8.8)	3 ml (1.5 M; pH 8.8)	
Tris/HCl (0.5 M, pH 6.8)		1.125 ml
H ₂ O (reinst)	3.9 ml	2.73 ml

Tabelle 33: Zusammensetzung Probenpuffer (5-fach konzentriert). DTT wurde getrennt zubereitet und gelagert.

Komponente	Endkonzentration
Tris/HCl (pH 6.8)	0.5 M
SDS	5 % (w/v)
Bromphenolblau	0.5 % (w/v)
Glycerin	40 % (v/v)
DTT	0.4 M

Tabelle 34: Laufpuffer (10-fach konzentriert) pH ~8.3

Komponente	Endkonzentration
Tris	0.25 M
Glycin	1.92 M
SDS	1 % (w/v)

Tabelle 35: Coomassie-Färbelösung

Komponente	Menge
Ethanol	50 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R (R-250)	0.25 % (w/v)
Essigsäure	5 % (v/v)

Tabelle 36: Entfärbelösung

Komponente	Menge
Ethanol	30 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Tabelle 37: Konservierungslösung

Komponente	Menge
Ethanol	20 % (v/v)
Glycerin	5 % (v/v)

3.6.5 Western Blot

Zur Verifizierung der erstellten Hefestämme wurden Western Blots nach der Semi-Dry-Methode angefertigt. Hierbei wird einer zuvor erstellte SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran zwischen zwei Watteschwämmen ein elektrisches Feld angelegt.

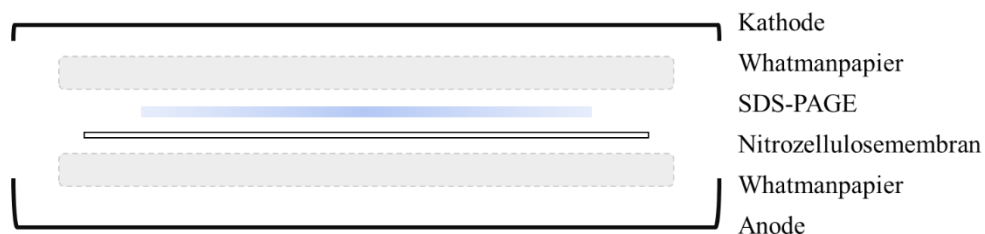


Abbildung 24: Aufbau eines Semi-Dry Western Blots

Dabei werden die Saugpapiere und die Nitrozellulosemembran in Transferpuffer (siehe Tabelle 38) angefeuchtet bevor sie zusammen gestapelt werden (siehe Abbildung 24). Für die Western Blots wurde auch ein vorgefärbter Protein-Marker in der SDS-PAGE verwendet. Der Blot-Transfer fand bei von der Herstellerfirma vordefinierten Bedingungen statt (30 min, 25 V, 1 A). Nach dem Transfer wurden die SDS-PAGE, sowie die Filterpapiere verworfen und die Blotmembran in Blockierlösung (siehe Tabelle 41) inkubiert (1 h, RT oder 16 h, 4 °C). Hierbei wird je nachdem ob der folgende Antikörper monoklonal oder polyklonal ist entschieden, ob die Blockierlösung mit BSA oder Milchpulver respektive hergestellt wurde. Nach dem Blockieren wurde die Membran in TBS-T-Puffer gewaschen (3 Mal, je 15 min) (siehe Tabelle 39 und Tabelle 40) und in primärem Antikörper inkubiert (16 h, 4 °C). Danach wurde die Membran mit TBS-T-Puffer gewaschen (3 Mal, je 15 min). Danach wurde die Membran in sekundärem Antikörper inkubiert (1 h, RT oder 16 h, 4 °C). Daraufhin wurde die Membran gewaschen (3 Mal, je 15 min). Zur Erzeugung der Chemilumineszenz wurden eine Luminol- und eine Wasserstoffperoxid-Lösung gemischt (1:1) und auf der Membran verteilt, worauf diese inkubiert wurde (1 min, RT). Überschüssige Flüssigkeit wurde abdekantiert und die Lumineszenz wurde mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Lösungen primärer Antikörper wurden nach Inkubation aufgefangen, gelagert (-20 °C) und bis zu zehn Mal wiederverwendet.

Tabelle 38: Transferpuffer

Komponente	Endkonzentration
Ethanol	20 % (v/v)
Trans-Blot Turbo® (5x)	20 % (v/v)

Tabelle 39: TBS-Puffer (10-fach konzentriert)

Komponente	Endkonzentration
Tris/HCl (pH 7.4)	0.1 M
NaCl	1.5 M

Tabelle 40: TBS-T-Puffer

Komponente	Endkonzentration
TBS (10x)	10 % (v/v)
Tween20	0.1 % (w/v)

Tabelle 41: Blockierlösung

Komponente	Endkonzentration
TBST	100 % (v/v)
Milchpulver oder BSA	5 % (w/v)

Zur Überprüfung der Beladung kann eine Färbung mit Ponceau S (siehe Tabelle 42) durchgeführt werden. Hierbei wurde die Membran direkt nach dem Transfer in einer Lösung mit Ponceau S inkubiert (5 min). Danach wurde die Membran durch Waschen mit H₂O (reinst) entfärbt. Nach Dokumentation des Gels konnte mit dem Blockieren fortgefahren werden.

Tabelle 42: Ponceau S Lösung

Komponente	Endkonzentration
Ponceau S	0.2 % (w/v)
TCA	3 % (w/v)

3.6.6 Bestimmung der Enzymaktivität

Zur Verifizierung der erstellten Hefestämme wurde die Enzymaktivität von zwei Eisen-Schwefelproteinen gemessen. Dazu wurden Zellextrakte mit verschiedenen Substraten in Küvetten gemischt und bei einer festen Wellenlänge über einen Zeitraum in einem Photometer vermessen. Aus der Änderung der Absorption mit der Zeit ($\Delta A/\text{min}$), dem molaren

Extinktionskoeffizient des gebildeten Produkts (Isopropylmalat-Isomerase-Aktivität) oder verbrauchten Substrates (Glutamat-Synthase-Aktivität) bei der verwendeten Wellenlänge ϵ_λ in ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und der Masse des Enzyms m in (mg) in der Küvette wurde die spezifische Aktivität (U/mg) bestimmt:

$$\text{spezifische Aktivität } \left(\frac{U}{\text{mg}} \right) = \frac{\frac{\Delta A / \text{min}}{\epsilon_\lambda}}{m} * V(\text{ml})$$

3.6.6.1 Herstellung von Zellextrakten

Zellextrakte von *S. cerevisiae* wurden auf mehrere Arten hergestellt. Zur Messung der Aktivität wurde ein nativer Aufschluss nach (Pierik *et al.*, 2009) verwendet. Hierbei wurden 100 ml (SC) einer Übernacht-Kultur mit geeigneten Auxotrophiemarkern und Zuckern geerntet, das Pellet in 10 ml sterilem H_2O resuspendiert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation (5 min, 4 °C, 3000 rpm Eppendorf) wurde das Pellet gewogen und in einem Volumen frisch zubereitetem TNETG (siehe Tabelle 43) resuspendiert (1 ml TNETG pro Gramm Nassgewicht der Zellen). Dabei wurde darauf geachtet, dass das Nassgewicht 0,4 bis 0,6 g entspricht. Danach wurden 10 μl einer PMSF-Lösung (200 mM PMSF in Ethanol) und 1 ml Glasperlen hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde so umgedreht, dass die Suspension in den Deckel des Reaktionsgefäßes fiel. Danach wurde das Gemisch mit dem Deckel nach unten drei Mal je eine Minute lang auf höchster Stufe auf einem Reagenzglasschüttler geschüttelt. Zwischendurch wurde das Gemisch jeweils eine Minute lang auf Eis inkubiert. Danach wurde das Reaktionsgefäß zentrifugiert (5 min, 4 °C, 3000 rpm Eppendorf) und der Überstand wurde in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt, welches zentrifugiert (10 min, 4 °C, 14000 rpm) wurde. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß übertragen, wobei darauf geachtet wurde die oberste Schicht nicht mit zu übertragen.

Tabelle 43: TNEG- und TNETG-Puffer. TNETG-Puffer wird durch die Hinzugabe von Triton X-100 (0.5 % v/v) zu TNEG-Puffer erhalten.

Komponente	Endkonzentration
Tris/HCl (pH 7.4)	10 mM
EDTA (pH 7.4)	2.5 mM
NaCl	150 mM
Glyzerin	10 % (v/v)

3.6.5.2 Messung der Isopropylmalat-Isomerase-spezifischen (Leu1) Aktivität

Die Zellextrakte wurden gemäß Tabelle 45 gemischt und in einem Photometer in einer UV-Küvette bei $\lambda = 235 \text{ nm}$ eine Minute lang gemessen. Der Hintergrund wurde vermessen, indem die Messung ohne 3-Isopropylmalat durchgeführt wurde. Die Aktivitätsmessungen wurden stets bei 25°C durchgeführt. Der Extinktionskoeffizient des Produktes ist $4.35 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Pierik *et al.*, 2009).

Tabelle 44: Leu1-Puffer

Komponente	Endkonzentration
Tris/HCl (pH 7.4)	20 mM
NaCl	50 mM

Tabelle 45: Leu1-Aktivitätsassay

Komponente	Endkonzentration
Leu1-Puffer (siehe Tabelle 44)	980 – X μl
3-Isopropylmalat (10 mM)	20 μl
Zellextrakt	X μl (1-10 μl typisch)

3.6.6.3 Messung der Glutamat-Synthase-spezifischen (Glt1) Aktivität

Tabelle 46: Glt1-Aktivitätsassay

Komponente	Endkonzentration
NADH (10 mM)	8 μl
α -Ketoglutarat (0.5 M)	16 μl
L-Glutamin (0.1 M in 0.1 M KPi)	80 μl
KPi -Puffer (0.1 M, pH 7.8)	696 – X μl
Zellextrakt	X μl (2-20 μl typisch)

Die Zellextrakte wurden gemäß Tabelle 46 gemischt und in einem Photometer bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ eine Minute lang gemessen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Lösung von L-Glutamin frisch anzusetzen ist. Als Hintergrundmessung wurde eine identische Probe vorbereitet und 16 μl Puffer wurden durch L-Azaserin (4 mM) ersetzt. Die Aktivitätsmessungen wurden stets bei

25 °C durchgeführt. Der Extinktionskoeffizient von NADH ist $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Methode wurde für die aufgereinigte Glutamat-Synthase etabliert (Roon *et al.*, 1974).

3.6.6.4 Bestimmung kinetischer Parameter von Enzymaktivitäten

Aus der Division der gemessenen Werte der Absorptionsänderung pro Minute und dem Extinktionskoeffizienten wurde die Enzymaktivität [U] bestimmt. Die Division der Enzymaktivität durch die gemessene Proteinkonzentration erlaubte die Bestimmung der spezifischen Aktivität $[\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}]$. Variiert man hierbei die Substratkonzentration, so wurde aus diesen Werten ein Diagramm erzeugt, auf dem die Umsatzgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration aufgetragen wurde. Diese Werte entsprechen einer Sättigungskurve, wobei der Y-Wert der Asymptote $V_{\max}$ entspricht und die Konzentration der X-Achse bei $x = \frac{V_{\max}}{2}$ dem K_M -Wert entspricht. Die Temperatur bei den Versuchen wurde konstant auf Raumtemperatur (25 °C) gehalten um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Eine Variation des pH-Wertes anstatt der Substratkonzentration erlaubt eine Bestimmung des pH-Optimums.

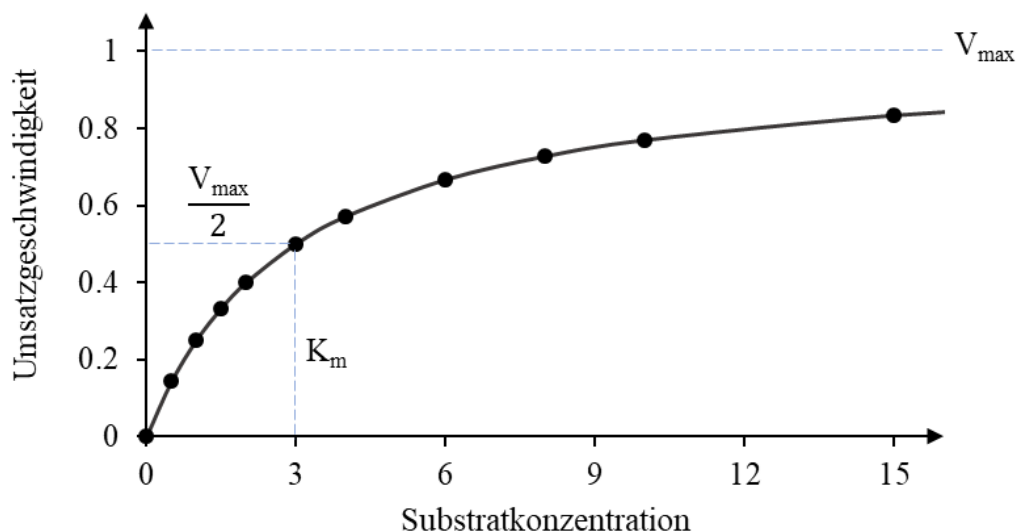


Abbildung 25: Michaelis-Menten-Diagramm. Gezeigt ist ein Michaelis-Menten-Diagramm, bei dem die Umsatzgeschwindigkeit v gegen die Substratkonzentration $[S]$ aufgetragen wurde. Zudem wurde die Asymptote $V_{\max}$ eingezeichnet sowie die graphische Bestimmung des K_M -Wertes.

Waren die Messwerte weit von $V_{\max}$ entfernt, so wurde statt eines Michaelis-Menten-Diagramms ein Lineweaver-Burk Diagramm erstellt. Hier wurden die Messwerte als Kehrwerte der Enzymgeschwindigkeit v gegen die Kehrwerte der Substratkonzentration $[S]$ aufgetragen. Dadurch kann $V_{\max}$ als der Kehrwert des Schnittpunktes der Ausgleichgeraden mit der Y-Achse berechnet werden sowie der K_M Wert als negativer Kehrwert des Schnittpunktes der Ausgleichsgeraden mit der X-Achse.

3.7 Massenspektrometrie

3.7.1 Anzucht der galaktoseregulierbaren Hefestämme für MS

Die Flüssigkulturen des Wildtyps und der Mutanten wurden immer nach demselben Ablauf kultiviert. Dabei wurden die Hefestämme aus dem Glycerinstock auf YP-Galaktose Agarplatten ausgestrichen und inkubiert (2 Tage, 30 °C). Danach wurde von einer Agarplatte 25 ml Flüssigkultur mit Minimalmedium (SC) mit Galaktose als Zucker inokuliert und schüttelnd inkubiert (24 h, 30 °C, 150 rpm). Danach wurde photometrisch die optische Dichte bei 600 nm bestimmt und so viel der Flüssigkultur in ein Reaktionsgefäß überführt, dass damit 100 ml Flüssigkultur auf eine $OD_{600} = 0.1$ eingestellt wurde. Die Probe wurde zentrifugiert (5 min, RT, 3000 rpm Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 10 ml sterilem H_2O (reinst) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, RT, 3000 rpm Eppendorf) wurde der Überstand verworfen und das Pellet zur Inokulierung einer neuen Flüssigkultur mit Galaktose als Zucker verwendet. Diese wurde schüttelnd inkubiert (16/24 h, 30 °C) und entweder nach 16 Stunden (bei Doppelmutanten) geerntet, oder nach 24 Stunden zur Inokulierung einer weiteren Flüssigkultur mit Galaktose als Zucker verwendet (alle weiteren Mutanten). Das Ernten der Flüssigkulturen wurde durch Zentrifugation (5 min, RT, 3000 rpm Eppendorf), Verwerfen des Überstands und Resuspension in sterilem H_2O (reinst) erreicht. Danach wurden die Proben wieder zentrifugiert (5 min, RT, 3000 rpm Eppendorf) und der Überstand verworfen. Falls die Zellen nicht sofort verwendet wurden, wurden die Zellpellets mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

3.7.2 Anzucht der eisendepletierten Hefestämme für MS

Für die Experimente wurden neben CIA-depletierten Hefestämmen auch eisendepletierte Hefestämme gezüchtet. Dabei wurde die gefrorene Glycerinkultur auf einer YP-Glukose-Agarplatte ausgestrichen und inkubiert (2 Tage, 30 °C). Daraufhin wurde eine Flüssigkultur inokuliert und schüttelnd inkubiert (24h, 30 °C, 150 rpm). Danach wurden Erlenmeyerkolben ein Mal mit HNO_3 (1 % v/v) und zwei Mal mit H_2O (reinst) gewaschen um restliche Eisenionen, welche an der Glaswand adsorbiert sind zu entfernen. Die präparierten Erlenmeyerkolben wurden durch Hitze sterilisiert. Danach wurde die optische Dichte der Übernachtskultur bestimmt und neues Flüssigmedium in den säuregewaschenen Erlenmeyerkolben auf $OD_{600} = 0.1$ inokuliert und schüttelnd inkubiert (24 h, 30 °C, 150 rpm). Danach wurde erneut Flüssigmedium in säuregewaschenen, sterilisierten Erlenmeyerkolben auf $OD_{600} = 0.1$

inokuliert. Es wurde mit FeCl_3 -Lösung supplementiert, sodass verschiedene Eisen-Endkonzentrationen erreicht werden konnten (0 μM , 0.2 μM , 0.8 μM), wobei der letzte Wert ungefähr der Eisenkonzentration des normalen Minimalmediums entsprach. Die Flüssigkulturen wurden schüttelnd inkubiert (24 h, 30 °C, 150 rpm). Danach wurde erneut Flüssigmedium in säuregewaschenen, sterilisierten Erlenmeyerkolben auf $\text{OD}_{600} = 0.1$ inokuliert, mit FeCl_3 -Lösung supplementiert und schüttelnd inkubiert (16 h, 30 °C, 150 rpm). Danach wurden die Flüssigkulturen mittels Zentrifugation (5 min, RT, 3000 rpm Eppendorf) geerntet. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in sterilem H_2O (reinst) gewaschen und nach Zentrifugation (5 min, RT, 3000 rpm Eppendorf) und Verwerfen des Überstands in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

3.7.3 Vorbereitung der Proben für die Massenspektrometrie (label-free)

Tabelle 47: Lysepuffer

Komponente	Endkonzentration
Guanidinhydrochlorid	4 M
Tris(2-carboxyethyl)phosphin	10 mM
2-Chloracetamid	40 mM
Tris/HCl (pH 8.5)	100 mM

Tabelle 48: LT-Puffer (MS-Grade)

Komponente	Endkonzentration
ACN (Acetonitril)	10 % (v/v)
Tris/HCl pH 8.5	25 mM

Tabelle 49: A/A*-Puffer (MS-Grade)

Komponente	Endkonzentration
Ameisensäure	0.09 % (v/v)
ACN	0.2 % (v/v)
TFA	0.01 % (v/v)

Die Proben wurden nach dem Protokoll von Kulak et al. angefertigt (Kulak *et al.*, 2014). Dabei wurde zuerst ein Volumen Hefeflüssigkultur geerntet, welches 10 ml mit einer $\text{OD}_{600} = 1$ entspricht. Das durch Zentrifugation (5 min, RT, 5000 rpm Eppendorf) erhaltene Pellet wurde

in 400 µl Lysepuffer (Tabelle 47) gelöst. Die Proben wurden denaturiert (95 °C, 10 min) und ab hier bis zum Verdau auf Eis gelagert. Es wurden Glasperlen (200 µl, $\varnothing$ 1mm) hinzugegeben. Danach wurden die Zellen in Reagiergefäßen mit Schraubdeckel schüttelnd aufgeschlossen (FastPrep®, 4 °C, 3x 20 s, je 120 s Pause, Geschwindigkeit 6). Danach wurde das Extrakt zentrifugiert (10 min, 4 °C, 13000 rpm). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde daraufhin die BCA-Methode verwendet, da diese keine störenden Nebenreaktionen mit dem Lysepuffer eingeht. Es wurden 36 µg Protein in 85 µl LT-Puffer (Tabelle 48) gegeben. Dabei wurde das Volumen des LT-Puffers so gewählt, dass maximal 10 % des Endvolumens durch Lysepuffer dargestellt wurde. Danach wurden Trypsin und Lys-C (je 1.44 µl einer 0.5 µg/µl Lösung in LT-Puffer) hinzugegeben und das Gemisch inkubiert (16 h, 37 °C). Danach wurde erneut Trypsin (0.5 µl) hinzugegeben und das Gemisch inkubiert (30 min, 37 °C). Daraufhin wurde das Gemisch mit so viel TFA (10 % v/v) versetzt, bis der pH-Wert niedriger als 2 war.

Zur Aufreinigung der Peptide wurde eine SDB-RPS-stage-tip-Aufreinigung durchgeführt, wobei das Säulenmaterial in einer Pipettenspitze angebracht wurde, wobei eine Beladung über das breite Ende der Spitzen erfolgte. Zwischen jeder Auftragung einer Lösung wurden die stage-tips zentrifugiert. Zuerst wurde ACN (100 µl) auf das Säulenmaterial gegeben. Daraufhin wurde die Säule equilibriert (100 µl, 30 % Methanol, 1 % TFA) und gewaschen (100 µl, 0.2 % TFA). Danach wurde die Probe ($\leq$ 100 µl) aufgetragen, gefolgt von einem weiteren Waschschrift (100 µl, 0.2 % TFA). Danach wurde die Probe in kleine Reagiergefäße eluiert (60 µl, 5 % Ammoniak, 80 % ACN). Eine Zusammenfassung der stage-tip-Aufreinigung ist Tabelle 50 zu entnehmen. Die Prozentangaben beziehen sich auf eine wässrige Lösung.

Tabelle 50: Schritte und Reagenzien der SDB-RPS-stage-tip-Aufreinigung

1. Aktivierung (100 µl)	2. Equilibrierung (100 µl)	3. Waschen 1 (100 µl)
ACN	MeOH (30 % v/v) TFA (1 % v/v)	TFA (0.2 % v/v)
4. Beladung ($\leq$ 100 µl)	5. Waschen 2 (100 µl)	6. Elution (60 µl)
Probe	TFA (0.2 % v/v)	NH ₃ (5 % v/v) ACN (80 % v/v)

Nach der Elution wurden die Proben mittels Speedvac eingeeengt, sodass kein Lösungsmittel mehr vorhanden war. Dabei wurde zuerst bei 45 °C und 110 mbar für 5 min, dann 35 mbar für 5 min und schließlich 7 mbar bis zum Verdampfen zentrifugiert. Die Proben wurden in A/A*-Puffer (10 µl) (Tabelle 49) resuspendiert und in einem Wasserbad sonifiziert.

3.7.4 Vorbereitung der Proben für die Messung der reaktiven Cysteine

Um den Unterschied der Reaktivität von Cysteinen in Proteinen zwischen verschiedenen Proben zu sehen wurden diese Proben mit einem Reagenz mit verschiedenen isotopenmarkierten Reagenzien vermischt, welche mit ungebundenen Cysteinresten reagieren. Dabei wurde die Clickchemie genutzt um ein an die Cysteinreste bindendes Alkin an die isotopenmarkierten IsoDTB-Tags zu binden. Hierbei wird durch Kupfer die Addition von Azid und Alkin katalysiert. Die Vorbereitung der Proben wurde aufgrund der Länge des Protokolls auf mehrere Tage aufgeteilt. Das Protokoll beruht auf der Arbeit von (Zanon *et al.*, 2020), in der ein neuartiger kurzer isotopenmarkierter „tag“ entwickelt wurde:

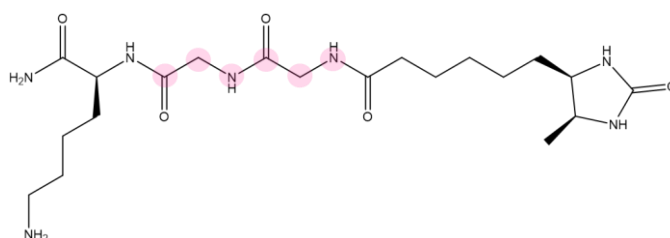


Abbildung 26: Isodesthiobiotin (IsoDTB). Gezeigt ist ein Desthiobiotinderivat, welches an 6 Atomen Isotopenspezifisch synthetisiert wurde (rosa Kreise). Dabei wurden entweder ^{12}C und ^{14}N („leicht“) oder ^{13}C und ^{15}N („schwer“) zur Synthese verwendet.

Tabelle 51: Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

Komponente	Endkonzentration
KP _i pH 7.4	12 mM
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM

Tabelle 52: Click-Lösung

Komponente	Menge (pro 120 µl Reaktionsansatz)
TBTA (1.7 mM, in DMSO/tBuOH 1:4)	60 µl
CuSO ₄ ·5H ₂ O (50 mM)	20 µl
TCEP (50 mM)	20 µl
Iso-Desthiobiotin (5 mM, in DMSO)	20 µl

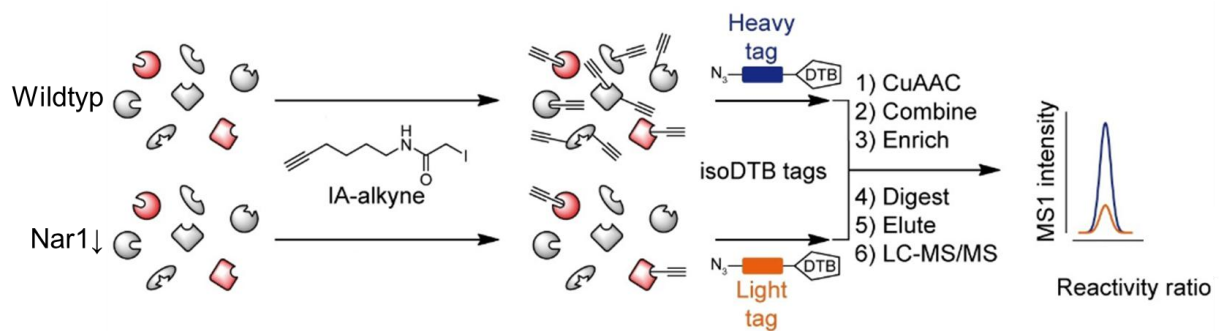


Abbildung 27: Probenvorbereitung zur Messung reaktiver Cysteine. Gezeigt ist ein Überblick des Ablaufs der Probenvorbereitung und Messung reaktiver Cysteine in einem CIA-Depletionsstamm (abgeändert nach Zanon *et al.*, 2020)

Tag 1:

Es wurden Zellextrakte erzeugt und deren Proteinkonzentration bestimmt. Daraufhin wurden Zellextrakt-Proben normalisiert, sodass die Proben einem Volumen von 1 ml mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml entsprachen. Danach wurden 20 µl Iodacetamid-Alkin (50 mM in DMSO) hinzugegeben und das Gemisch rotierend inkubiert (60 min, 4 °C). Danach wurden die Proben mittels Zeba Spin aufgereinigt (siehe 3.5.7 Zeba Spin Aufreinigung). Die Proben wurden mit 120 µl Click-Lösung mit leichten oder schweren Desthiobiotin-Isotopen (Iso-DTB) versetzt und inkubiert (60 min, RT). Dabei wurde dem Wildtyp das schwere Isotop und der Nar1-Depletionsmutante das leichte Isotop zugeordnet. Die zusammengehörigen Proben mit verschiedenen Isotopen wurden in 8 ml kaltem Aceton vereinigt und inkubiert (16 h, -20 °C).

Tag 2:

Die Proben wurden in einem Ausschwingrotor zentrifugiert (10 min, RT, 3500 rpm Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zwei Mal mit 1000 µl Methanol gewaschen und zwischendurch mittels Sonifizierung (20 s Zyklus, 3 Zyklen, 100 %) resuspendiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl Harnstofflösung (8 M) mit 0.1 M Triethylammoniumbicarbonat (TEAB) durch Sonifizierung (20 s Zyklus, 3 Zyklen, 100 %) resuspendiert. Danach wurden 900 µl TEAB (0.1 M) hinzugegeben. Daraufhin wurden 50 µl Streptavidin-Säulenmaterial pro Probe vorbereitet. Dazu wurde dieses drei Mal gewaschen (0.2 % v/v NP40, in PBS), zentrifugiert (3 min, RT, 1000 rpm Eppendorf) und in 1200 µl (0.2 % v/v NP40, in PBS) resuspendiert. Pro Probe wurde das Säulenmaterial in zwei LoBind®-Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit jeweils der Hälfte der Probe versetzt. Danach wurden die Proben rotierend inkubiert (60 min, RT) und zentrifugiert (3 min, RT, 1000 rpm Eppendorf). Der Überstand wurde entfernt und das Säulenmaterial in 600 µl Puffer (0.1 % v/v NP40, in PBS) resuspendiert und in leere Säulen überführt und in mehreren Schritten gewaschen: zwei Mal mit je 600 µl (0.1 % v/v NP40, in PBS), dann drei Mal mit je 600 µl (PBS)

und drei Mal mit je 600 µl (H₂O reinst). Danach wurde das Säulenmaterial in 600 µl Harnstofflösung (8 M CH₄N₂O, 0.1 M TEAB) resuspendiert, in LoBind®-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (3 min, RT, 1000 rpm Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Säulenmaterial in 300 µl Harnstofflösung resuspendiert. Danach wurden 6 µl DTT (0.5 M) hinzugegeben und die Proben rotierend inkubiert (45 min, 37 °C). Es wurden 15 µl Iodacetamid (74 mg/ml in DMSO) hinzugegeben und rotierend inkubiert (30 min, 25 °C). Danach wurden 6 µl DTT (0.5 M) hinzugegeben und rotierend inkubiert (30 min, 25 °C). Es wurden 900 µl TEAB (0.1 M) hinzugegeben und zentrifugiert (3 min, RT, 1000 rpm Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Säulenmaterial wurde in 200 µl Harnstofflösung (2 M CH₄N₂O, 0.1 M TEAB) resuspendiert. Danach wurden 4 µl Trypsin (0.5 mg/ml) hinzugegeben und rotierend inkubiert (16 h, 37 °C).

Tag 3:

Den an das Säulenmaterial gebundenen Proben wurde 400 µl (0.1 % v/v NP40, in PBS) hinzugefügt und es wurde in leere Säulen übertragen. Danach wurden die Proben mehrfach gewaschen, wobei ab dem zweiten Waschschrift alle Reagenzien geeignet für Massenspektrometrie (MS-Grade) sein müssen: drei Mal mit 600 µl (0.1 % v/v NP40, in PBS), drei Mal in 600 µl (PBS) und drei Mal in 600 µl (H₂O reinst). Danach wurden die Proben mit 200 µl Elutionspuffer (50 % ACN v/v, 0.1 % v/v TFA) in LoBind®-Reagiergefäße eluiert ohne zu zentrifugieren. Dieser Schritt wurde zwei Mal mit je 100 µl Elutionspuffer wiederholt. Daraufhin wurden die Säulen zentrifugiert (3 min, RT, 3000 rpm Eppendorf) um das restliche Eluat zu gewinnen. Die eluierten Proben wurden mittels Speedvac solange eingeeengt bis das Lösungsmittel gänzlich evaporierte. Das Pellet wurde in 30 µl (0.1 % v/v TFA) durch Sonifikation in einem Wasserbad gelöst.

3.7.5 Analyse der Daten der Cysteinreaktivität

Die erhaltenen Daten wurden zur Vorbereitung für die Analyse nutzbar gemacht. Dazu wurden die Rohdaten nach der Verarbeitung mit MaxQuant zuerst auf Basis zwei logarithmiert. Dann wurde innerhalb jeden Replikats der Median der Verhältnisse der Isotope aller Peptide mit dem gleichen modifizierten Cystein gebildet. Danach wurde der Mittelwert der Replikate gebildet, wobei das modifizierte Peptid zumindest in zwei Replikaten quantifiziert werden muss. Diese Analyse erlaubt es, Aussagen über das Gesamtverhältnis der zwei Isotopen zu machen, was entweder in sich selbst Informationen birgt, oder zur Normalisierung der Proben genutzt werden kann.

3.7.6 Massenspektrometrie

Abgesehen von den Messungen der Cysteinreaktivität wurden alle durchgeführten massenspektrometrischen Messungen im Tandem-Verfahren nativ gemessen, wobei die Peptide unmodifiziert identifiziert werden konnten. Eine Testreihe beinhaltete isobarenmarkierte Peptide zur Bestimmung der Cysteinreaktivität in einer CIA-Depletionsmutante. Vor der massenspektrometrischen Messung wurden alle Proben zuerst über eine Flüssigchromatographiesäule getrennt und danach mit Hilfe von Nanospray ionisiert. Die Aufspaltung der Ionen erfolgte nach der Quadrupol-Methode und die Identifikation wurde mittels Orbitrap gestaltet.

3.8 Verwendete Hefestämme

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die meisten Hefestämme hergestellt, wobei einige bereits zur Verfügung standen.

Tabelle 53: In dieser Arbeit verwendete CIA-Depletionsstämme. Gezeigt sind die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme, sowie deren Genotyp, Herkunft und Sequenzierungsdateien (falls vorhanden). Zusätzlich ist der Genotyp des ursprünglichen Hefestammes gezeigt. Die Selektion von Mutanten erfolgt über die Resistenz, wobei kanMX4 eine Resistenz gegen Geneticin vermittelt, während natNT2 eine Resistenz gegen Nourseothricin vermittelt (Sequenzierungen: Rohdaten 70).

Name	Genotyp	Zuerst beschrieben	Sequenzierung
W303-1A	<i>MATα {leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15}</i>	Wildtyp-Stamm (Mortimer & Johnston, 1986)	-
Gall-3HA-Met18	pMET18::natNT2-pGALL-3HA	(Netz <i>et al.</i> , 2010)	-
Gall-3HA-Cia1	pCIA1::natNT2-pGALL-3HA	(Netz <i>et al.</i> , 2010)	-
Gall-3HA-Cfd1	pCFD1:: natNT2-pGALL-3HA	(Netz <i>et al.</i> , 2012)	-
Gal1-10-Nbp35	pNBP35:: HIS3-pGAL1-10	(Hausmann <i>et al.</i> , 2005)	-
Gall-3HA-Nbp35	pNBP35:: kanMX4-pGALL-3HA	Diese Arbeit	DIV350

Gall-3HA-Nbp35/ Gall-3HA-Cfd1	pNBP35:: kanMX4- pGALL-3HA pCFD1:: natNT2-pGALL-3HA	Diese Arbeit	DIV359
Gall-Tah18	pTAH18:: natNT2-pGALL	Bachelorarbeit K. Krotz 2020	Siehe Arbeit
Gall-3HA-Dre2	pDRE2::KANMX4-pGALL- 3HA	Bachelorarbeit K. Krotz 2020	Siehe Arbeit
Gall-3HA-Tah18	pTAH18::KANMX4- pGALL-3HA	Diese Arbeit	DIV351
Gall-3HA-Tah18/ Gall-3HA-Dre2	pTAH18::KANMX4- pGALL-3HA pDRE2::natNT2-pGALL- 3HA	Diese Arbeit	DIV360
Gall-3HA-Cia2	pCIA2::natNT2-pGALL- 3HA	Diese Arbeit	AJP2125
Gall-3HA-Nar1	pNAR1::natNT2-pGALL- 3HA	Diese Arbeit	AJP2128
Δ Grx4	grx4::KANMX4	Diese Arbeit	DIV390
Δ Grx3	grx3::KANMX4	Diese Arbeit	AJP2130
Δ Grx4/ Gall- 3HA-Grx3	grx4::KANMX4 pGRX3::natNT2-pGALL- 3HA	Diese Arbeit	DIV426
Δ Grx3/ Gall- 3HA-Grx4	grx3::KANMX4 pGRX4::natNT2-pGALL- 3HA	Diese Arbeit	DIV339
Gall-3HA-Lto1	W303-1A, pLTO1::natNT2-pGALL- 3HA	Diese Arbeit	AJP2127
Gall-3HA-Yae1	pYAE1::natNT2-pGALL- 3HA	Diese Arbeit	AJP2126
Gall-3HA-Lto1/ Gall-3HA-Yae1	pLTO1::natNT2-pGALL- 3HA pYAE1::KANMX4- pGALL-3HA	Diese Arbeit	DIV522 DIV523

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung der galaktoseregulierbaren Hefestämme

4.1.1 Übersicht der Hefestämme

Für die folgenden Experimente wurden Galaktose-regulierbare Hefestämme benötigt. In folgender Tabelle sind die Mutanten aufgelistet. Die Regulierbarkeit ist hierbei über den GalL-Promotor gegeben, einer schwächeren Version des *GAL*-Promotors. Um die Nachweisbarkeit der Proteine mittels Western-Blots zu gewährleisten wurde zudem, falls möglich, ein N-terminaler Hämagglutinin-Tag introduziert. Durch die Modularität dieses Ansatzes konnten jeweils drei verschiedene Konstrukte pro Resistenzgen erzeugt werden. Ein promotorreguliertes Konstrukt ohne Tag, Eines mit Tag und eine Deletionsvariante (siehe Abbildung 28). Zudem wurde ein Hefestamm benötigt, in welchem das Gen *GLT1* deletiert wurde. Die als DNA-Vorlage verwendeten Plasmide wurden in Kapitel 3.1.5 beschrieben.

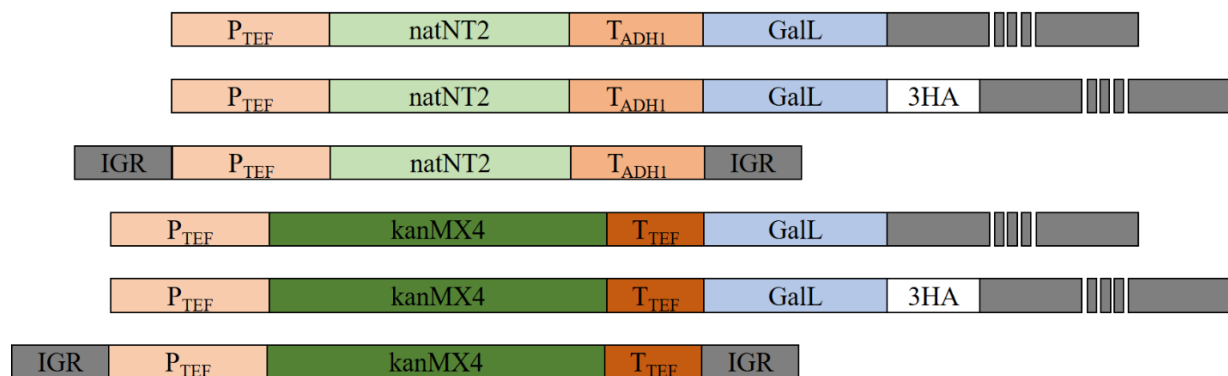


Abbildung 28: Schematische Darstellung der verschiedenen Gen-Loci in den verwendeten Hefestämmen. Gezeigt ist ein Schema der genomisch inserierten DNA-Sequenzen. Dabei gibt es vier verschiedene Konstrukte, welche sich in Selektionsmarker (grün) und Vorhandensein von HA-Tag unterscheiden. Eine Deletion ist durch Ersetzen des Gens mittels Resistenz möglich. P: Promotor, T: Terminator, 3HA: dreifacher Hämagglutintag, IGR: Inter-Gen-Region. Das Schema repräsentiert die Länge der gezeigten DNA-Sequenzen. Die variablen Größen der für das Protein von Interesse kodierenden Region in Grau wurde durch unterbrochene Balken angedeutet.

4.1.2 PCR der zur Rekombination benötigten Genkassetten

Die für die homologe Rekombination benötigte DNA wurde mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden Kassetten von Plasmiden amplifiziert, welche einen Selektionsmarker, einen GalL-Promotor, sowie falls zutreffend einen HA-Tag kodieren. Eine Agarosegelelektrophorese erlaubt die Abschätzung der Größe der amplifizierten DNA-Sequenz. Dabei wurde jedes Mal ein analytisches Gel zur Überprüfung und ein präparatives Gel zur Aufreinigung verwendet. Eine direkte Aufreinigung des PCR-Ansatzes ohne Gelelektrophorese führte nicht zu erfolgreichen homologen Rekombinationen aufgrund des Vorhandenseins von ungewollten Amplifikaten, sowie kleinen Mengen Plasmid und Primern.

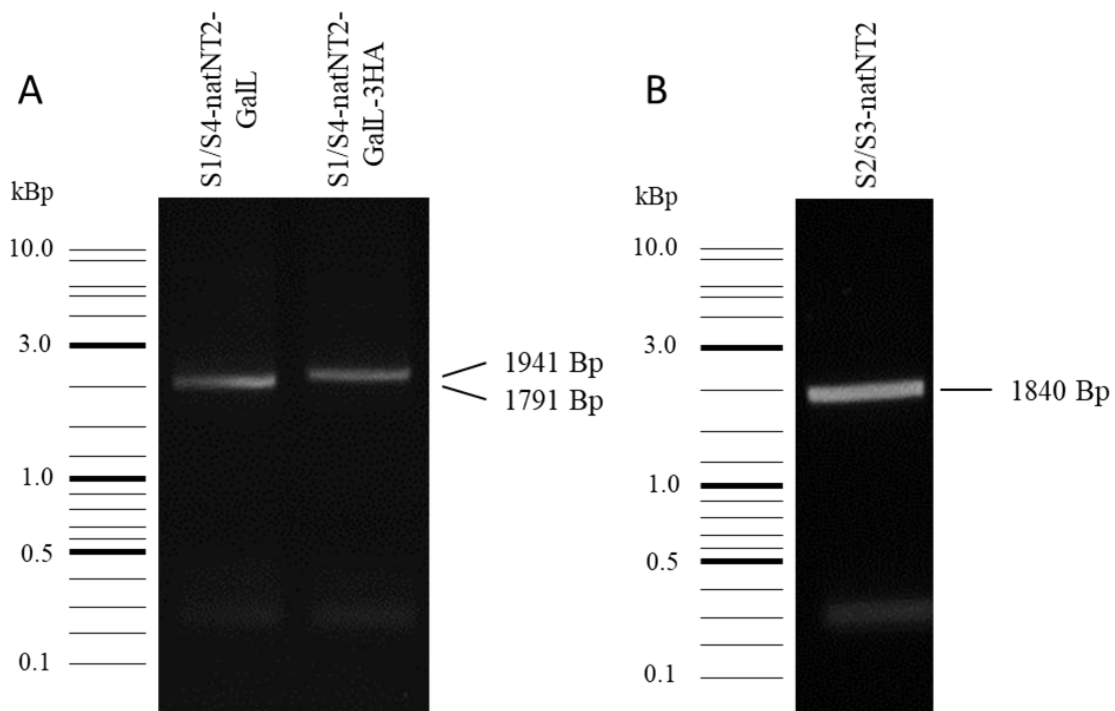


Abbildung 29: Agarosegel der PCR-Produkte für die homologe Rekombination. Gezeigt sind beispielhafte analytische Agarosegele (1%), welche zur Analyse der PCR-Produkte verwendet wurden. Zu erkennen ist, dass beide PCR-Produkte ähnlich weit durch das Gel translokieren wie die 2000 Bp-Bande des Markers, wobei das Produkt ohne 3HA-Tag die geringere Zahl an Basenpaaren der beiden PCR-Produkte aufweist. (A) Dieser PCR-Ansatz wurde verwendet um GalL-3HA-Cia2 und GalL-Cia2 Mutanten herzustellen (Rohdaten 1). (B) Dieser Ansatz wurde zur Deletion von Glt1 verwendet (Rohdaten 2). Berechnete Größen sind angedeutet.

4.2 Verifizierung der Hefestämme

4.2.1 Gelelektrophoretische Verifizierung inserierten DNA

Die durch homologe Rekombination, wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, erzeugten Hefestämme wurden auf Erfolg der Rekombination untersucht. Dazu wurde zuerst eine PCR der genomischen DNA mit Hilfe von Primern, welche kurz vor und hinter der inserierten DNA-Sequenz binden, durchgeführt und auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 31, 32 und 33).

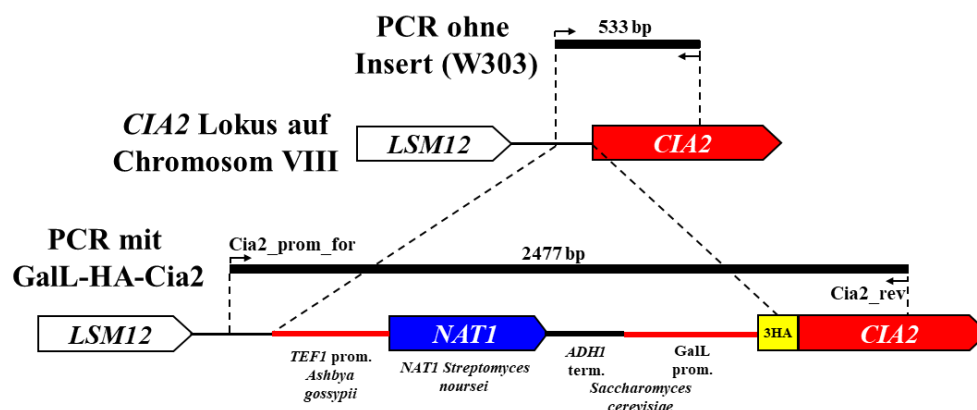


Abbildung 30: Schema einer homologen Rekombination und Überprüfung mit PCR.

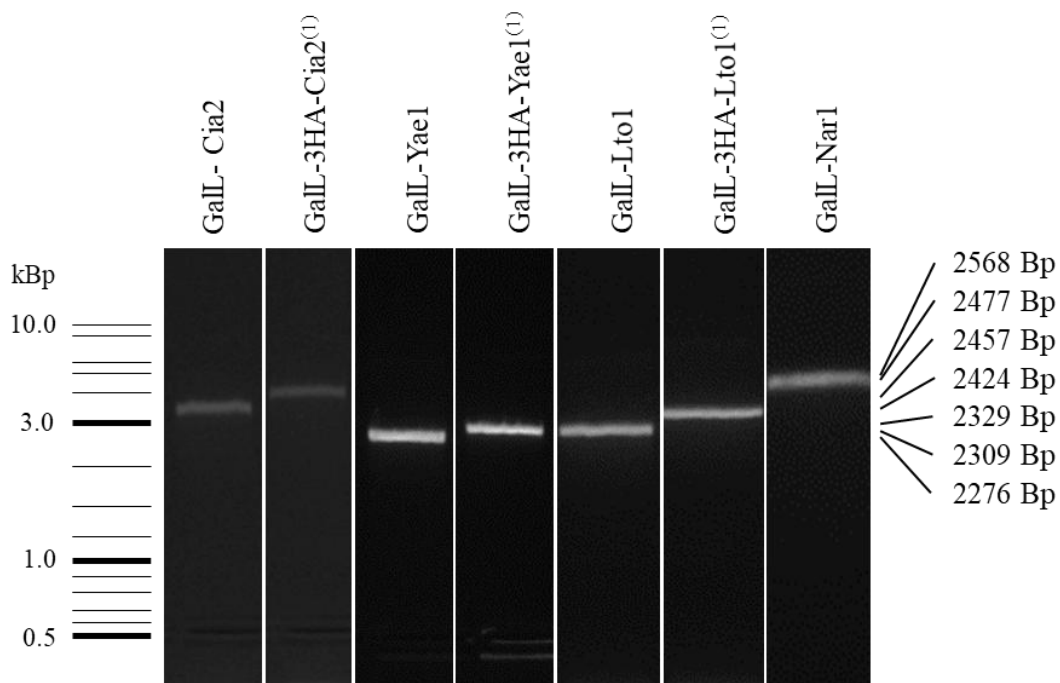


Abbildung 31: Gelelektrophorese der PCR-Produkte mit genomischer DNA der Mutanten. Gezeigt ist ein Agarosegel auf welches die PCR-Produkte auftrennt, welche durch Amplifikation genomischer DNA mit Hilfe von Primern vor und hinter der inserierten DNA erstellt wurden. Berechnete Größen sind angedeutet. Markierte Stämme wurden für MS-Experimente verwendet ⁽¹⁾ (Rohdaten 3, 4, 5, 25, 26).

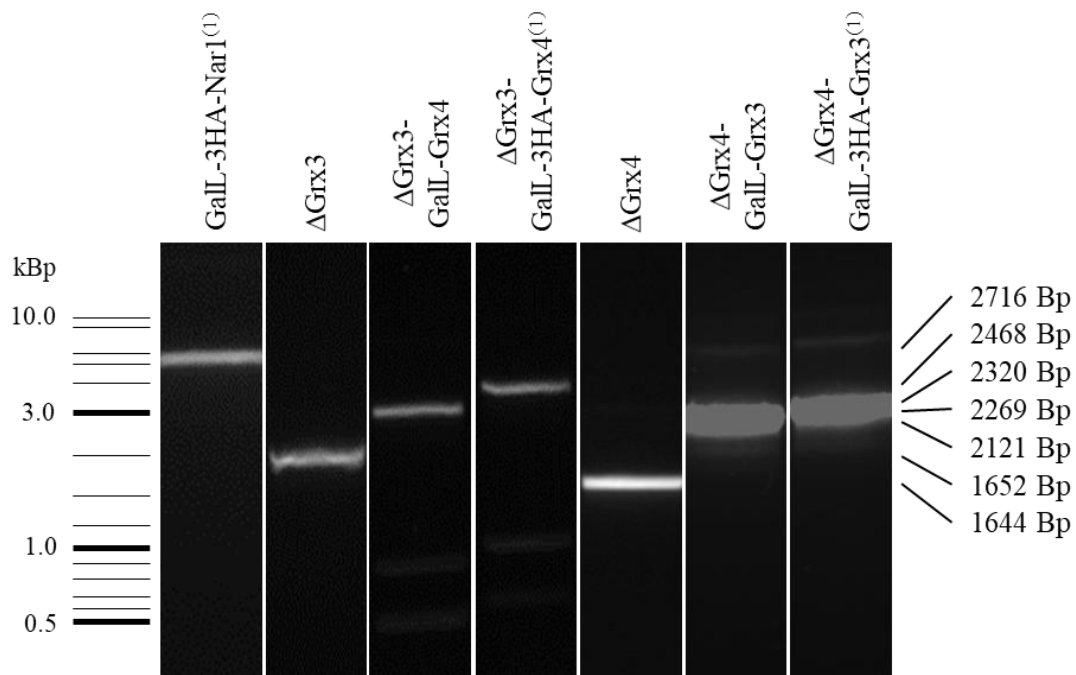


Abbildung 32: Gelelektrophorese der PCR-Fragmente mit genomischer DNA der Mutanten. Gezeigt ist ein Agarosegel auf welches die PCR-Produkte auftrennt, welche durch Amplifikation genomischer DNA mit Hilfe von Primern vor und hinter der inserierten DNA erstellt wurden (Rohdaten 3, 4, 5, 25, 26). Berechnete Größen sind angedeutet. Markierte Stämme wurden für MS-Experimente verwendet ⁽¹⁾.

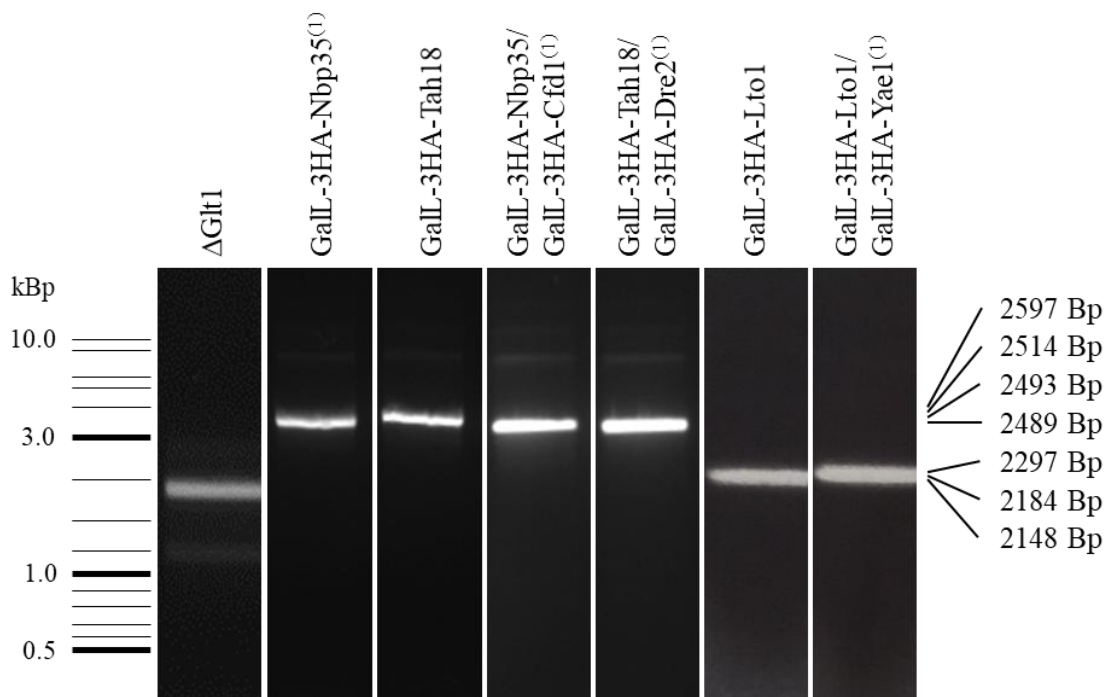


Abbildung 33: Gelelektrophorese der PCR-Fragmente mit genomischer DNA weiterer Mutanten. Gezeigt ist ein Agarosegel auf welches die PCR-Produkte auftrennt, welche durch Amplifikation genomischer DNA mit Hilfe von Primern vor und hinter der inserierten DNA erstellt wurden. Berechnete Größen sind angedeutet. Markierte Stämme wurden für MS-Experimente verwendet ⁽¹⁾ (Rohdaten 27, 28, 29, 30).

Positive PCR-Ansätze wurden daraufhin mittels präparativen Gels aufgereinigt und sequenziert (siehe Anhang Kapitel 8.10). Die Sequenzierungen konnten belegen, dass alle verwendeten Hefestämme die gewollten Mutationen aufwiesen, ohne dass dabei Leserasterverschiebungen oder ungewollte Deletionen im Gen von Interesse entstanden. Die Herstellung der Stämme wurde somit erfolgreich abgeschlossen.

4.2.2 Western Blot zur Verifizierung der CIA-Depletion von MS-Proben

Western Blots erlauben eine semi-quantitative Aussage über die Menge des vorhandenen Proteins im Zellextrakt und wurde deshalb genutzt um die Effizienz der Regulation durch den GAL-Promotor zu überprüfen. Durch die Nutzung von Proben aus denselben Kulturen wie für die Massenspektrometrie wurden sowohl die Hefestämme, als auch die spezifischen Proben für die folgende massenspektrometrische Untersuchung verifiziert.

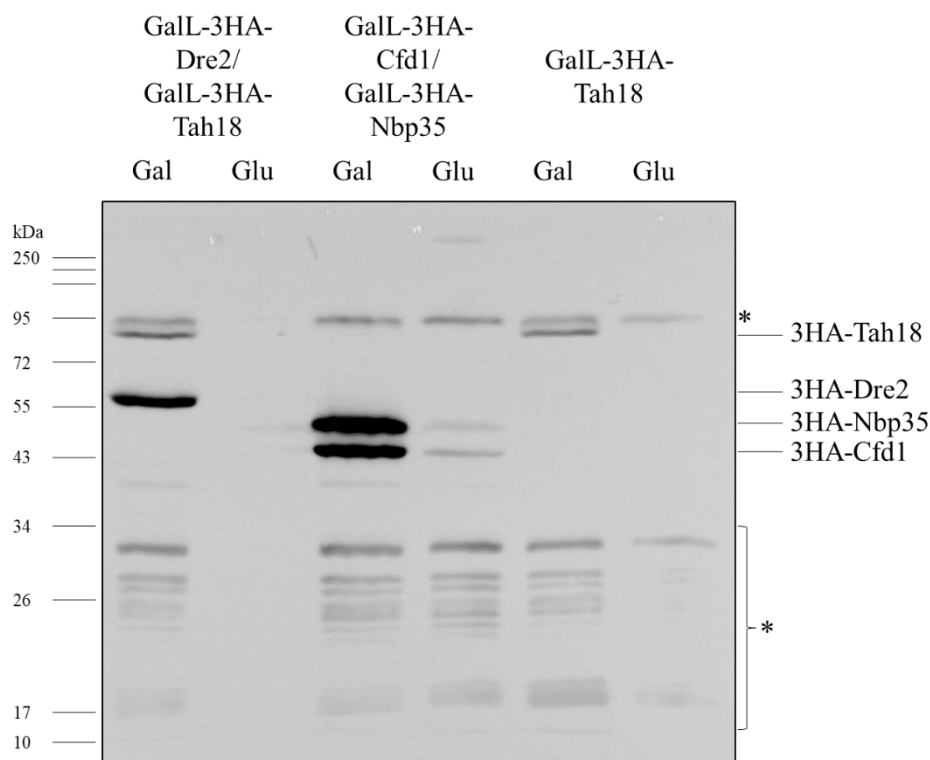


Abbildung 34: Western Blot für die Analyse der Depletion von Tah18, Dre2, Nbp35 und Cfd1. Gezeigt ist ein Western Blot mit mittels Rödel-Methode aufgeschlossenen Hefezellen. Dabei wurden abwechselnd Zellextrakte aus Anzucht mit Galaktose und Glukose im Medium (Gal und Glu) aufgetragen. Von oben nach unten: 3HA-Tah18 (77.8 kDa), 3HA-Dre2 (44.0 kDa), 3HA-Nbp35 (40.7 kDa), 3HA-Cfd1 (37.4 kDa). Unspezifische Banden wurden markiert (*). Die Membran wurde mit einem Anti-HA-Antikörper inkubiert und 10 min lang wurde die Lumineszenz detektiert (Rohdaten 10, 11).

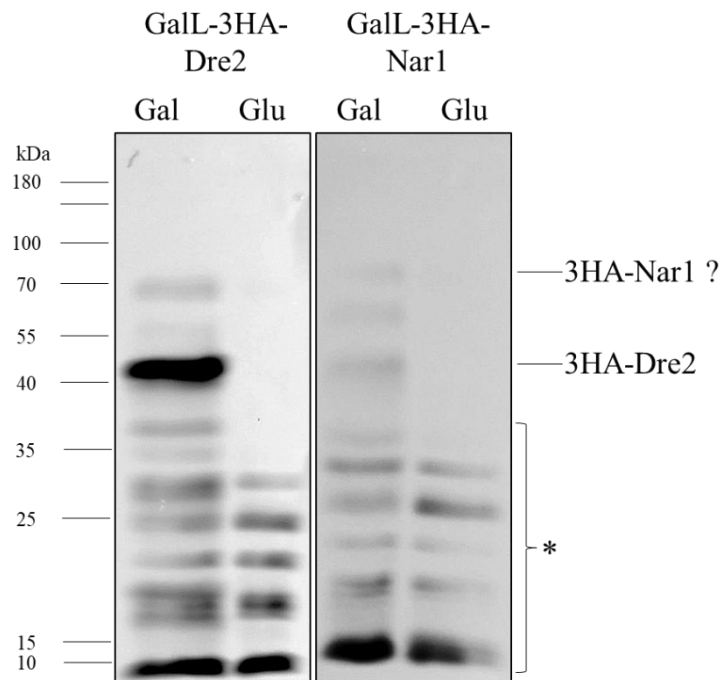


Abbildung 35: Western Blot für die Analyse der Depletion von Nar1 und Dre2. Gezeigt ist ein Western Blot mit mittels Rödel-Methode aufgeschlossenen Hefezellen. Dabei wurden abwechselnd Zellextrakte aus Anzucht mit Galaktose und Glukose im Medium (Gal und Glu) aufgetragen. Markierungen: 3HA-Nar1 (59.5 kDa), 3HA-Dre2 (44.0 kDa). Unspezifische Banden wurden markiert (*). Die Detektion von Nar1 ist unsicher (?). Die Membran wurde mit einem Anti-HA-Antikörper inkubiert und 4 min lang wurde die Lumineszenz detektiert (Rohdaten 20, 21).

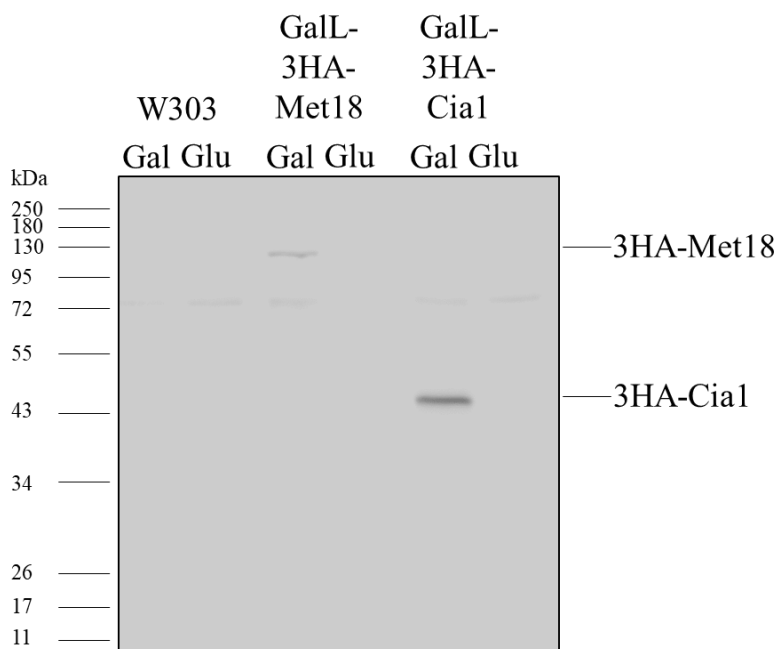


Abbildung 36: Western Blot für die Analyse der Depletion von Met18 und Cia1. Gezeigt ist ein Western Blot mit mittels Rödel-Methode aufgeschlossenen Hefezellen. Dabei wurden abwechselnd Zellextrakte aus Anzucht mit Galaktose und Glukose im Medium (Gal und Glu) aufgetragen. Von oben nach unten: 3HA-Met18 (123.3 kDa), 3HA-Cia1 (42.7 kDa). Die Membran wurde mit einem Anti-HA-Antikörper inkubiert und 2 min lang wurde die Lumineszenz detektiert (Rohdaten 12, 13).

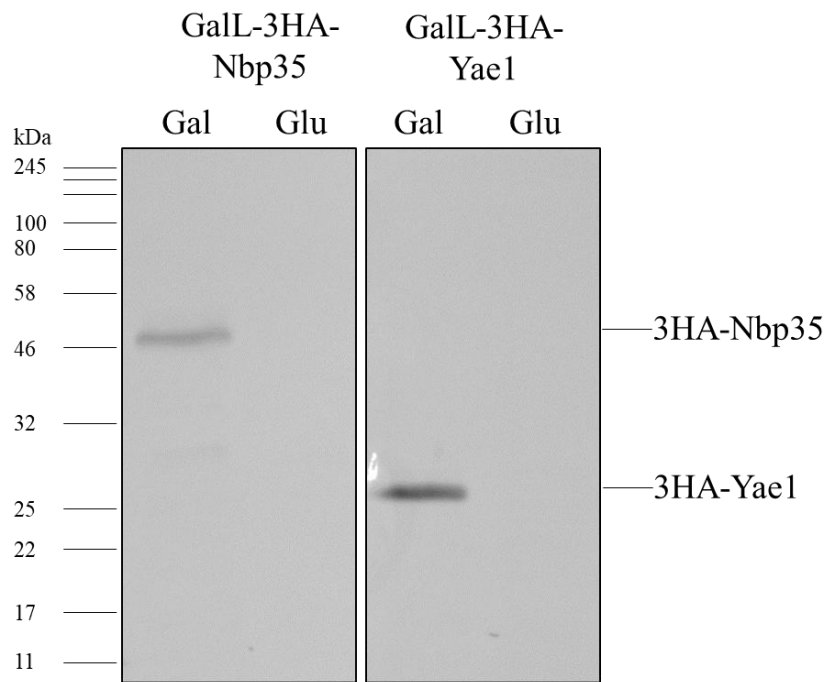


Abbildung 37: Western Blot für die Analyse der Depletion von Nbp35 und Yae1. Gezeigt ist ein Western Blot mit mittels Rödel-Methode aufgeschlossenen Hefezellen. Dabei wurden abwechselnd Zellextrakte aus Anzucht mit Galaktose und Glukose im Medium (Gal und Glu) aufgetragen. Von oben nach unten: 3HA-Nbp35 (40.7 kDa), 3HA-Yae1 (21.5 kDa). Die Membran wurde mit einem Anti-HA-Antikörper inkubiert und 11 min lang wurde die Lumineszenz detektiert (Rohdaten 14, 15).

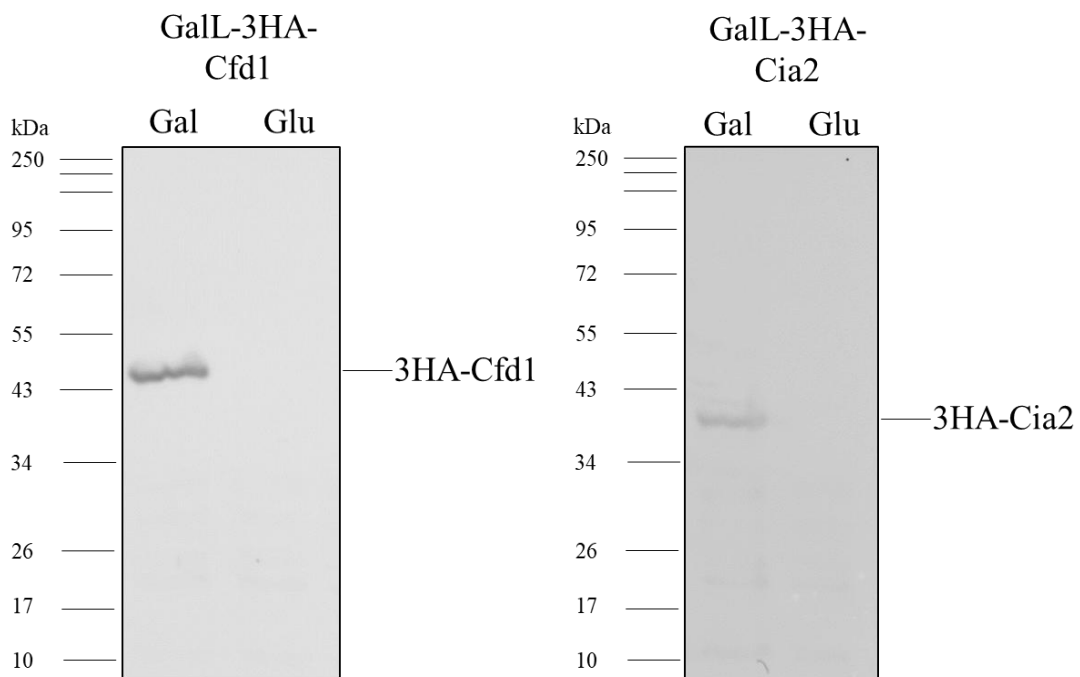


Abbildung 38: Western Blot für die Analyse der Depletion von Cfd1 und Cia2. Gezeigt ist ein Western Blot mit mittels Rödel-Methode aufgeschlossenen Hefezellen. Dabei wurden abwechselnd Zellextrakte aus Anzucht mit Galaktose und Glukose im Medium (Gal und Glu) aufgetragen. Markierung: 3HA-Cfd1 (37.4 kDa) und 3HA-Cia2 (31.5 kDa). Die Membran wurde mit einem Anti-HA-Antikörper inkubiert und 4 min lang wurde die Lumineszenz detektiert (Rohdaten 16, 17).

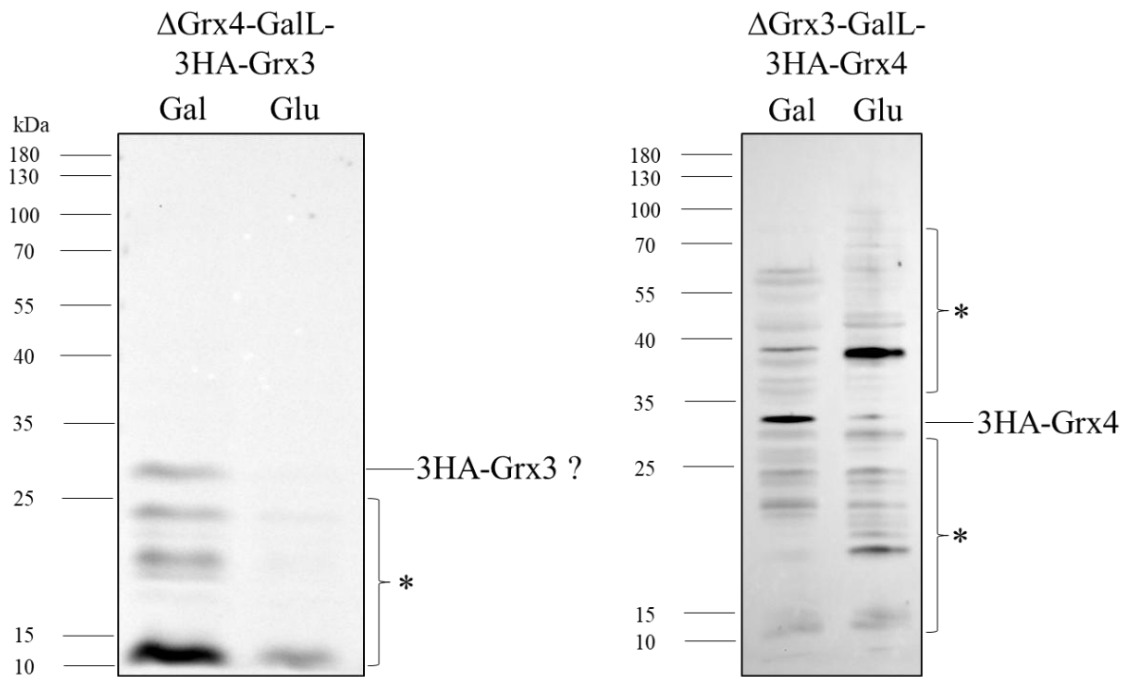


Abbildung 39: Western Blot für die Analyse der Depletion von Grx3 und Grx4. Gezeigt sind zwei Western Blots mit mittels Rödel-Methode aufgeschlossenen Hefezellen. Dabei wurden abwechselnd Zellextrakte aus Anzucht mit Galaktose und Glukose im Medium (Gal und Glu) aufgetragen. Links gezeigt wurde ein Western Blot mit 3HA-Grx3 (33.5 kDa). Die Membran wurde mit einem Anti-HA-Antikörper inkubiert und 3 min lang beleuchtet (Rohdaten Praktikumsbericht Stalp 2022). Rechts ist ein Western Blot mit 3HA-Grx4 zu sehen, (32.5 kDa). Unspezifische oder durch Abbau entstandene Banden wurden markiert (*). Die Detektion von Grx3 ist unsicher (?). Die Membran wurde mit einem Anti-HA-Antikörper inkubiert und 3 min lang wurde die Lumineszenz detektiert (Rohdaten 56, 57).

Die Zellextrakte von Hefezellen, welche mit Galaktose im Medium angezogen wurden, zeigen fast alle eine deutliche Bande auf der erwarteten Höhe. Die Ersetzung von Galaktose durch Glukose im Wachstumsmedium führt bei allen betrachteten CIA-Proteinen zu einem Verblassen oder Verschwinden der Bande, was eine Verringerung der Abundanz dieser Proteine impliziert (siehe Abbildung 34 bis 39). Während den meisten Proteinen eine Bande zuzuordnen war, konnten 3HA-Grx3 (Abbildung 39 links) und 3HA-Nar1 (Abbildung 35 rechts) nicht sicher zugeordnet werden. Dies ist ein Nachweis für die Funktionsfähigkeit der durch die Galaktosekonzentration im Medium regulierbaren Promotoren.

4.3 Überprüfung auf Viabilität und phänotypische Charakterisierung

4.3.1 Tüpfeltest

Der Tüpfeltest erlaubt einen Vergleich der Viabilität der hergestellten Hefestämme. Das beobachtbare Wachstum ist eine Mischung aus der Anzahl lebendiger Zellen in der vorbereitenden Flüssigkultur, sowie der Generationszeit oder Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen. Auch Auswirkungen auf die Lag-Phase verändern den zu beobachtenden Phänotyp. Für folgende Experimente sind Hefestämme optimal, wenn sie nach Wachstum in galaktosehaltigem Medium einen ähnlichen Phänotyp wie der Wildtyp aufweisen, da ein stark unterschiedlicher Phänotyp oft mit stark veränderten Expressionsmustern einhergeht, was es schwieriger macht den Effekt der Mutationen auf die spezifischen CIA-abhängigen Eisen-Schwefel-Proteine zu untersuchen. Ist beim Wachstum Galaktose durch Glukose ersetzt, so sind Hefestämme für die weiteren Experimente optimal, wenn ein schwacher oder moderater Phänotyp zu beobachten ist. Wünschenswert ist hierbei ein ausgeprägter Phänotyp, der aber keine Letalität hervorruft, da dies wiederum starke ungewollte Auswirkungen auf das Proteom haben kann. Die im Verlauf der Arbeit hergestellten Stämme zeigen unterschiedlich starke Auswirkungen durch die introduzierte Gensequenzen auf den Phänotyp (siehe Abbildung 40).

Die Einzelmutanten zeigten schwächere Wachstumsphänotypen als die Doppelmutanten. Während die Depletion von Tah18, Cfd1 und Nbp35 nur geringe Auswirkungen auf den Wachstumsphänotyp hatte, zeigte die Depletion von Dre2 die größte Auswirkung, gefolgt von der Depletion von Nar1. Eine Deletion des *GRX3*-, oder *GRX4*-Gens zeigte keinen Einfluss auf den Phänotyp, in Übereinstimmung mit Pujol-Carrion et al., 2006. Die Depletion der CIA-targeting-Faktoren Cia2 und Met18, sowie der Adapterproteine Yae1 und Lto1 zeigten keinen ausgeprägten Wachstumsphänotyp. Nur die Depletion von Cia1 zeigte einen Wachstumsphänotyp, welcher allerdings nur schwach ausgeprägt war.

Doppelmutanten führten im Gegensatz zu den Einzelmutanten zu stärkeren, fast letalen Phänotypen in Absenz von Galaktose, sodass diese bereits nach 16 h Wachstum getüpfelt werden mussten. Überraschenderweise führte die Kombination der Rekombination der *LTO1*- und *YAE1*-Promotoren, welche einzeln einen Wildtypphänotyp aufwiesen, zu einer synthetischen Letalität, die allerdings auch nach 64 h Depletion weniger stark ausgeprägt war als die Letalität der anderen Doppelmutationen, welche bereits nach 16 h einen deutlichen Phänotyp aufwiesen. Beim Ersetzen von zwei CIA-Promotoren durch GalL-Promotoren wird eine starke Veränderung des Wachstumsphänotyps ausgelöst, sodass die Zellen nur noch wenige Generationen mit Glukose im Medium überleben können.

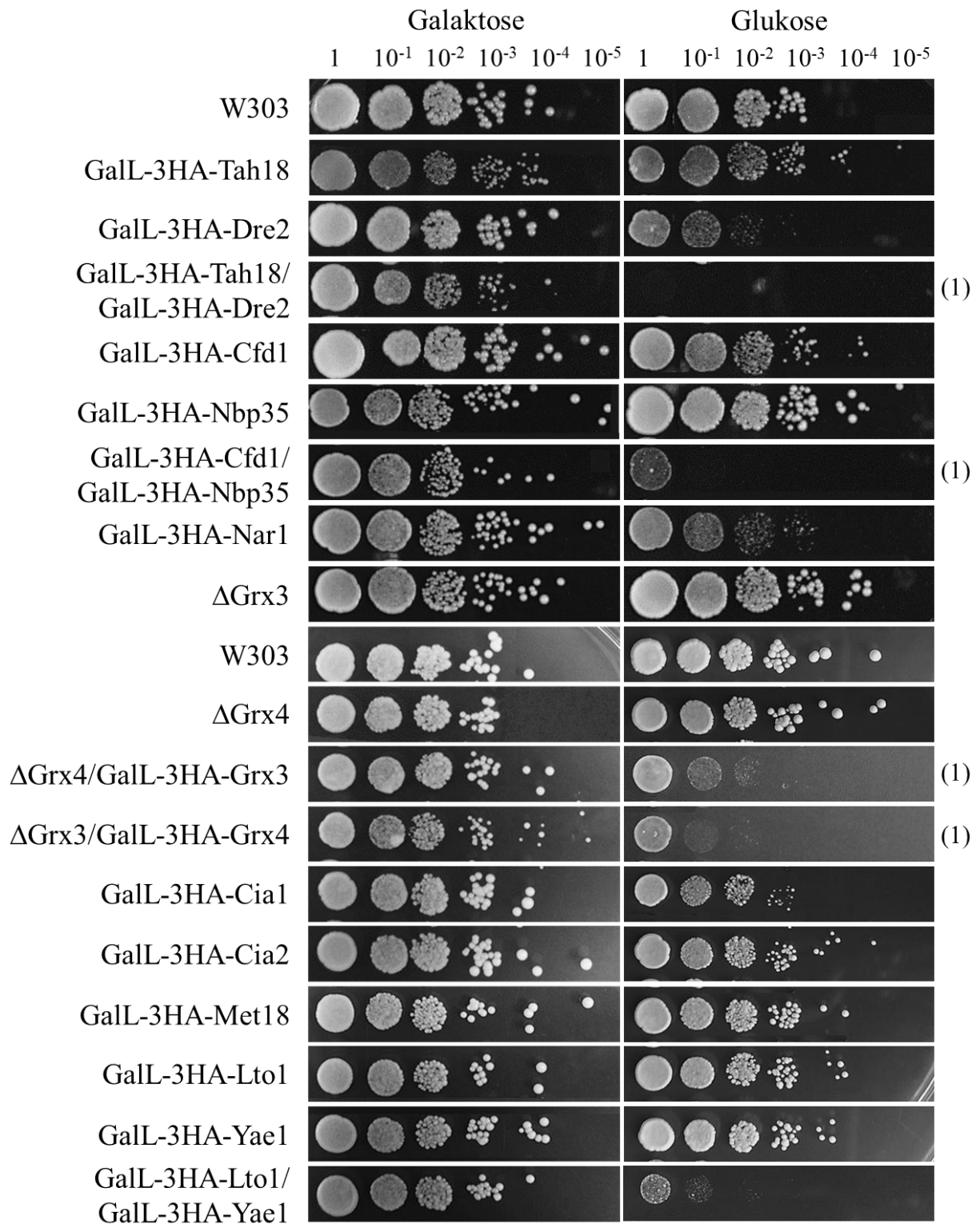


Abbildung 40: Tüpfeltests aller Hefedepletionsstämme. Gezeigt sind verschiedene Agarplatten. Darauf wurden Hefestämme in verschiedenen Verdünnungen, angefangen mit einer OD₆₀₀ = 0.5 bis hin zu einer 1:10⁵ Verdünnung getüpfelt. Links neben den Tüpfeltest wird die Art des Hefestammes beschrieben. W303 bezeichnet den Wildtyp. Aufgrund der unterschiedlichen Viabilität wurde die Flüssigkultur unterschiedlich lang mit Glukose im Medium inkubiert. Entweder 64 h (24 h, 24 h, 16 h) (ohne Markierung) oder 16 h (1). Alle Tüpfeltests wurden mindestens als Duplikat (n = 2) aus dem in Glycerin gefrorenen Vorrat der Hefestämme durchgeführt. Die inokulierten Agarplatten wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert. Siehe Anhang Kapitel 8.1 für weitere Konditionen (Rohdaten 46, 47).

Obwohl die Promotoren der CIA-Proteine alle zu genetisch gleichen GalL-Promotoren rekombiniert wurden, ist trotzdem eine Variabilität der Phänotypen von Mutanten auf Glukose-Medium feststellbar. Das zeigt, dass neben den Promotoren weitere Einflüsse auf die Expression existieren. Zum einen können manche Proteine durch andere Proteine in ihrer Funktion ersetzt oder zumindest teilweise ersetzt werden, wie bei Grx3/4 zu sehen ist (Pujol-Carrion *et al.*, 2006). Zum anderen enthalten die Gene unterschiedliche Terminatoren, welche insbesondere bei geringer Expression einen starken Einfluss auf die basale Expression haben (Curran *et al.*, 2013). Neben diesen beiden Erklärungen spielen weitere Effekte wie die Stabilität der Zielproteine und ihrer Komplexpartner eine Rolle bei der Entstehung der beobachteten Phänotypen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass sich die Hefestämme gut für eine Untersuchung der CIA-Maschinerie eignen, allerdings sollten die Einzel- und Doppelmutanten auch getrennt betrachtet werden, da die sehr starken Phänotypen der Doppelmutanten eine abweichende Expression der nicht-Fe/S-Proteine als Reaktion auf die Mutationen möglich erscheinen lassen. Das wiederum eröffnet jedoch auch die Untersuchung der Daten auf weitere Effekte der CIA-Regulation als nur den Effekt auf Eisen-Schwefel-Proteine.

4.3.2 Wachstumskurven und Verdopplungszeiten

Eine W303-Wildtyp Hefekultur in glukosehaltigem Medium wird laut Literatur eine geringere Verdopplungszeit als in galaktosehaltigem Medium aufweisen. Für den Wildtyp in glukosehaltigem Medium werden Verdopplungszeiten zwischen zwei und drei Stunden erwartet (Boubekeur *et al.*, 2001) (Bhattacharya *et al.*, 2018). Für galaktosehaltiges Medium wird eine um ca. 50 % erhöhte Verdopplungszeit beschrieben (Bhattacharya *et al.*, 2018). Diese, von Mutationen unabhängige, Zuckerabhängigkeit der Verdopplungszeiten sollte im Folgenden bei der Interpretation des Wachstums im Flüssigmedium beachtet werden.

Zur Bestimmung der Verdopplungszeit wurden zuerst Vorkulturen 16 h lang bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Daraufhin wurde das Wachstums in 96-Well-Mikrotiterplatten bestimmt. Diese Methode erlaubte eine effiziente Messung der Wachstumsparameter und gleichzeitig die Durchführung von Replikaten (n = 5), sowie Negativkontrollen.

Bei Wachstum in galaktosehaltigem Medium (siehe Abbildung 41) zeigten die Depletionsstämme und der Wildtyp mehrheitlich geringe und nicht signifikante Unterschiede. Insbesondere für Grx3/4 zeigte sich keine Wachstumsveränderung bei einer Deletion, einer Überexpression durch den GalL-Promotor, oder durch die Veränderung der Proteine durch den N-terminalen Hämagglutinin-Tag.

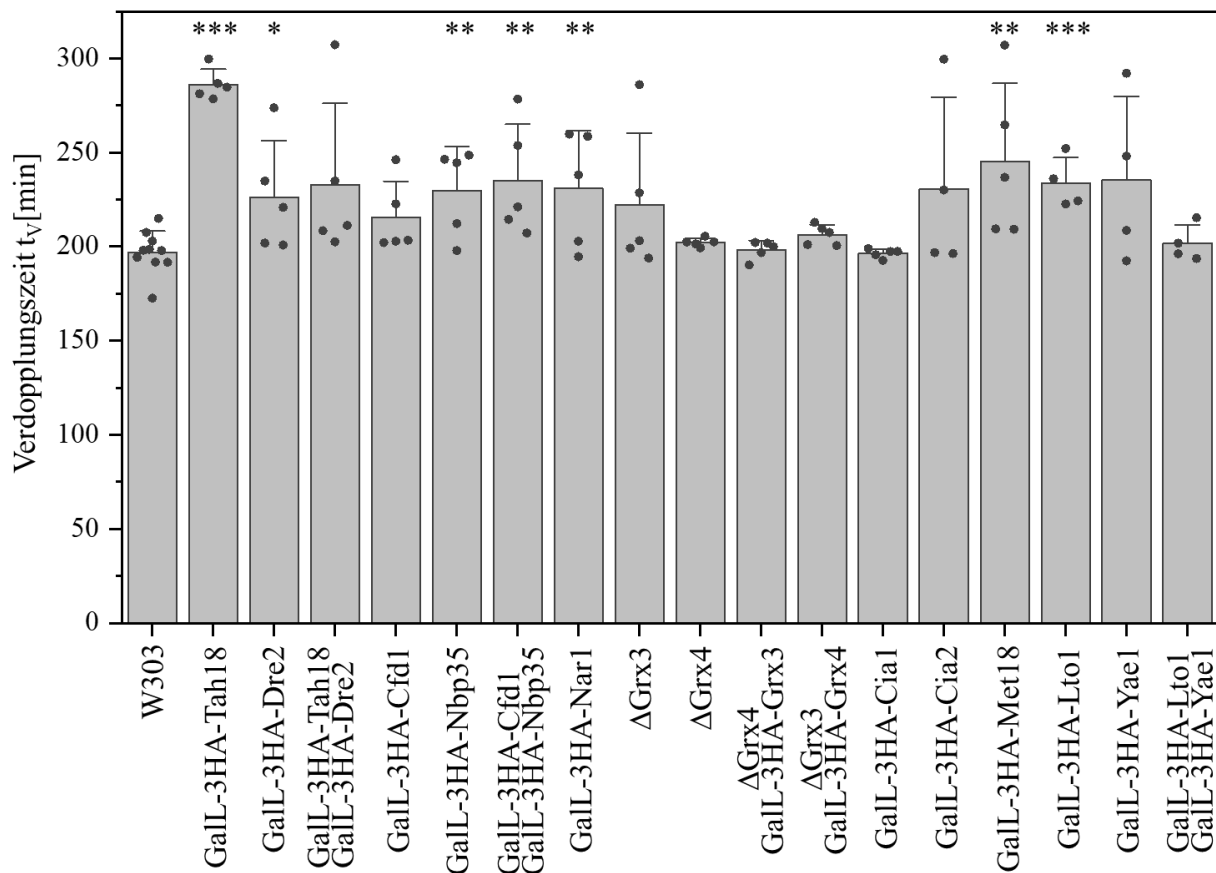


Abbildung 41: Verdopplungszeiten der mutierten Hefestämme in galaktosehaltigem Medium. Gezeigt ist die minimale Verdopplungszeit verschiedener Hefestämme in Form der einzelnen Replikate (Sterne), sowie der daraus errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Signifikanz entspricht den mittels einseitigem T-Test errechneten p-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.01, 0.005, 0.001 entspricht (Rohdaten 38, 39).

Die Verdopplungszeit betrug bei allen Hefestämmen, bis auf Gall-3HA-Tah18, zwischen 3.3 und 4 Stunden. Im Gegensatz dazu zeigte die durch den Gall-Promotor erfolgte Überexpression von 3HA-Tah18 eine signifikante ($p = 4 \cdot 10^{-10}$) Erhöhung der Verdopplungszeit um knapp 50 %. Eine Betrachtung der Kristallstruktur des humanen Homologs NDOR1 legt nahe, dass die FMN-Bindestelle sich nicht in direkter Nähe zum N-Terminus befindet (Banci *et al.*, 2013). Die FAD-Bindestelle befindet sich, basierend auf der Kristallstruktur der Cytochrom P450 Reduktase von *Candida tropicalis*, auch nicht in direkter Nähe zum N-Terminus ($> 30 \text{ Å}$ Entfernung) (Ebrecht *et al.*, 2019). Daraus lässt sich schließen, dass die signifikante Erhöhung der Verdopplungszeit wahrscheinlich nicht von einer direkten Inhibition der Elektronenübertragung durch FMN und FAD stattfindet. Möglicherweise behindert der Hämagglutinin-Tag allerdings die Interaktion von Tah18 mit Dre2. Auch die Überexpression durch den Gall-Promotor kann durch das Ungleichgewicht von Tah18 und Dre2 Ursache für den Phänotyp sein. Dies ist auch am wahrscheinlichsten, da der Phänotyp

durch eine Überexpression von Dre2 in der Doppelmutante *GalL-3HA-TAH18/GalL-3HA-DRE2* in Galaktosemedium kompensiert wird. Die Stöchiometrie dieser beiden Proteine scheint also eine wichtige Rolle in die CIA-Maschinerie zu spielen. Diese Effekte sind bei dem anderen Komplex Cfd1/Nbp35 nicht und bei Yae1/Lto1 wenig ausgeprägt zu sehen (siehe Abbildung 41). Bei dem CTC aus Cia1, Cia2 und Met18 liegt möglicherweise ein ähnlicher Effekt vor, was aber aufgrund einer fehlenden Dreifachmutante nicht geklärt werden konnte.

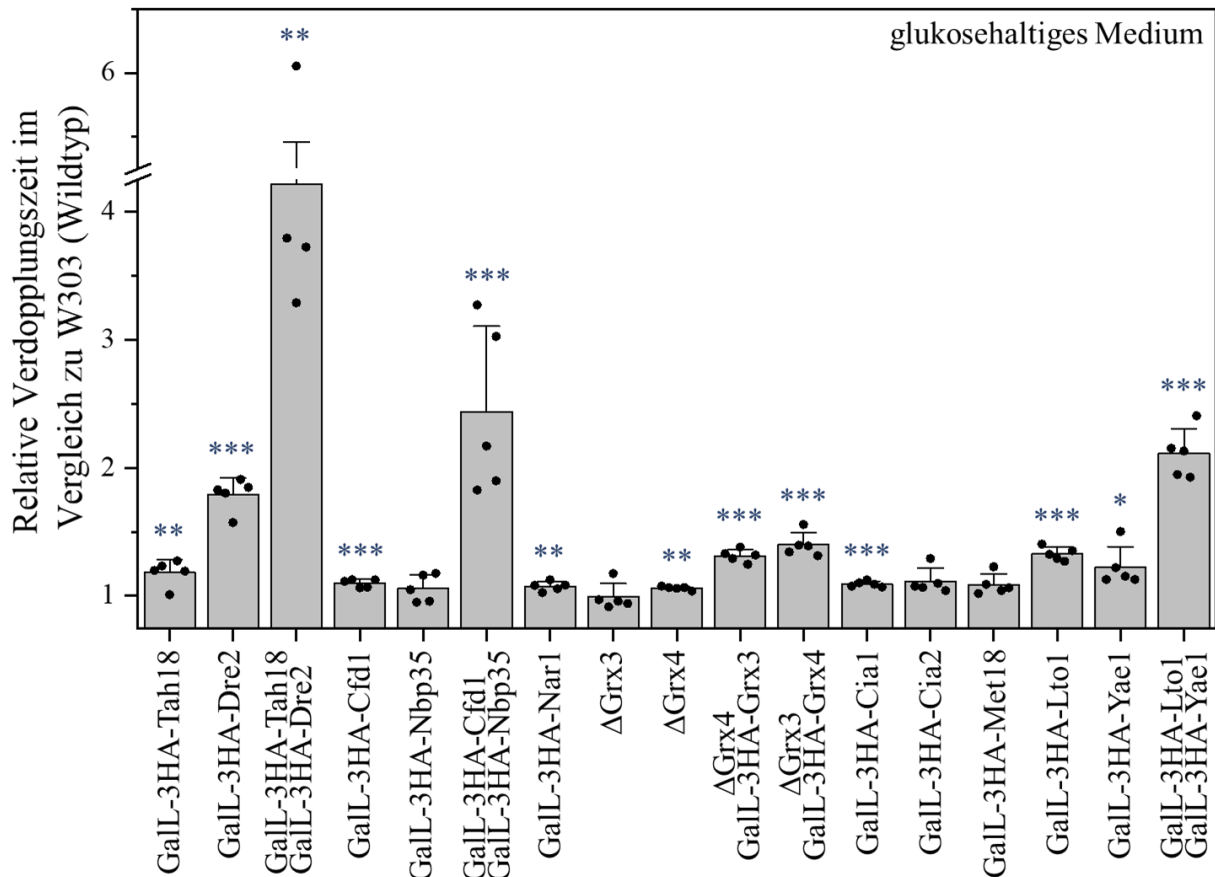


Abbildung 42: Relative Verdopplungszeiten der mutierten Hefestämme unter Depletionsbedingungen (Glukose) im Vergleich zum Wildtyp W303. Gezeigt sind relative minimale Verdopplungszeiten verschiedener Hefestämme, relativ zum Mittelwert der jeweils im gleichen Experiment festgestellten Verdopplungszeit des Wildtyps. Dabei wurden bei Stamm 3, 6, 10 und 11 die Verdopplungszeiten nach 16 h Glukose-Wachstum verwendet, bei allen anderen Stämmen die Verdopplungszeit nach 64 h Glukose-Wachstum. Es wurden die einzelnen Replikate (Sterne), sowie die daraus errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Die Signifikanz entspricht den mittels einseitigem T-Test errechneten p-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.01, 0.005, 0.001 entspricht (Rohdaten 38 - 43).

Das Wachstum in glukosehaltigem Medium zeigte deutlich größere Unterschiede zwischen den Stämmen als in galaktosehaltigem Medium, wobei Doppelstämme immer stärker beeinträchtigt sind als die jeweiligen Einzelmutanten (siehe Abbildung 42).

Neben der Verdopplungszeit als wichtigster Maßstab für die Viabilität wurde auch die Dauer der Lag-Phase des Wachstums bestimmt (siehe Anhang Abbildung 108). Hierbei sind wiederum unterschiedliche Effekte erkennbar. Die Überexpression eines Proteins der CIA-Maschinerie in galaktosehaltigem Medium führt in den meisten Fällen zu einer erhöhten Lag-Zeit, während die *Yae1/Lto1*-Mutante die signifikanteste Steigerung der Lag-Zeit bei langer Depletion zeigt. Eine genaue Auflistung der Verdopplungszeiten nach unterschiedlichen Depletionszeiten ist dem Anhang (Kapitel 8.3) zu entnehmen.

4.4 Fe/S-Enzymaktivitätsmessungen im Zellextrakt und Enzymkinetik

Die Auswirkungen der Depletion der CIA-Faktoren in glukosehaltigem Medium auf die Aktivität der Fe/S-Proteine *Leu1* und *Glt1* wurden vor den massenspektrometrischen Experimenten überprüft. Die Untersuchung der Enzymaktivität von Eisen-Schwefel-Proteinen in Zellextrakten mit depletierten CIA-Maschinerie-Komponenten erlaubt es auch, die Mutanten genauer zu charakterisieren. Neben dem bekannten Isopropylmalat-Isomerase Aktivitätsassay wurde die von der Glutamat-Synthase katalysierte Reaktion verfolgt. Dabei wurde eine bereits etablierte Methode zur Messung von aufgereinigter Glutamat-Synthase als Vorlage genommen und so optimiert, dass die Messung mit Zellextrakten durchführbar war (Roon *et al.*, 1974).

4.4.1 Etablierung des Glutamat-Synthase Aktivitäts-Assays

Die Reagenzien für das Glutamat-Synthase-Assay wurden gemäß Tabelle 46 gemischt und in einem Photometer bei $\lambda = 340$ nm eine Minute lang gemessen. Als Hintergrundmessung wurde eine identische Probe vorbereitet die L-Azaserin (4 mM) enthielt. Die Aktivitätsmessungen wurden stets bei 25 °C durchgeführt und die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte anhand von Formel 1 (Seite 63).

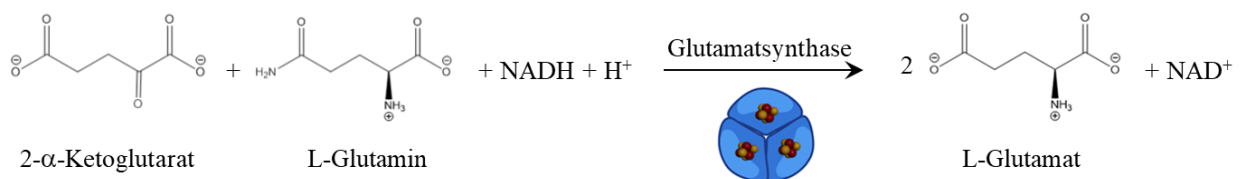


Abbildung 43: Reaktionsschema der Glutamatsynthase Glt1

4.4.1.1 Stabilität der Glutamatsynthase in Zellextrakt

Zur Etablierung eines praktisch anwendbaren Assays muss das Enzym im Zellextrakt mindestens solange stabil sein, dass in dieser Zeit mehrere Aufschlüsse und Messungen durchgeführt werden können. Von Aufschluss bis Messung vergehen mindestens 30 Minuten. Im Optimalfall ist das Enzym mehrere Stunden stabil, sodass mehrere Aufschlüsse und Messungen auf einmal durchgeführt werden können.

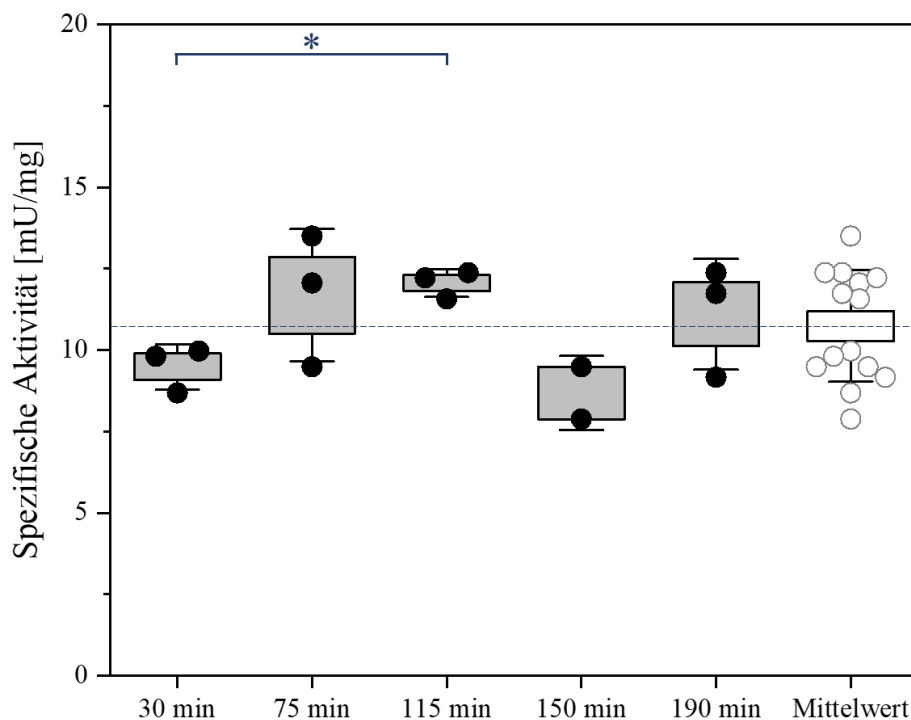


Abbildung 44: Stabilität der Glutamat-Synthase in Zellextrakt. Gezeigt ist die Glutamat-Synthase-Aktivität eines Zellextraktes zu mehreren Zeitpunkten nach Zellaufschluss wie angegeben. Die Signifikanz im Vergleich zur Messung nach 30 Minuten entspricht den mittels zweiseitigem T-Test errechneten p-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.01, 0.005, 0.001 entspricht. Der Boxplot zeigt neben den gemessenen Daten (Kreise) den Standardfehler (Box) und die Standardabweichung (Whisker). Die gestrichelte Linie entspricht dem Mittelwert aller Datenpunkte (Rohdaten 34).

Die Bestimmung der Stabilität zeigt, dass für die Dauer des Aufschlusses und der Messungen das Enzym stabil ist und keine Aktivität verliert (siehe Abbildung 44). Der laut p -Wert signifikante Unterschied zwischen 30 und 115 Minuten ($p < 0.01$) erklärt sich durch die allgemein hohe Varianz der Messung, sowie die geringe Probenzahl ($n = 3$) des Stabilitätstests.

4.4.1.2 Inhibition der Enzymkatalyse

Um einen kosteneffizienten Test zu etablieren wurde bestimmt, welche Konzentration L-Azaserin die Reaktion stark genug hemmt um einen Blindwert zu erhalten. Dazu wurde die Absorptionsänderung als Maß für die Enzymaktivität bei verschiedenen Azaserinkonzentrationen gemessen. Ein IC_{50} -Wert von 0.7 mM wurde mittels Origin bestimmt (siehe Abbildung 45).

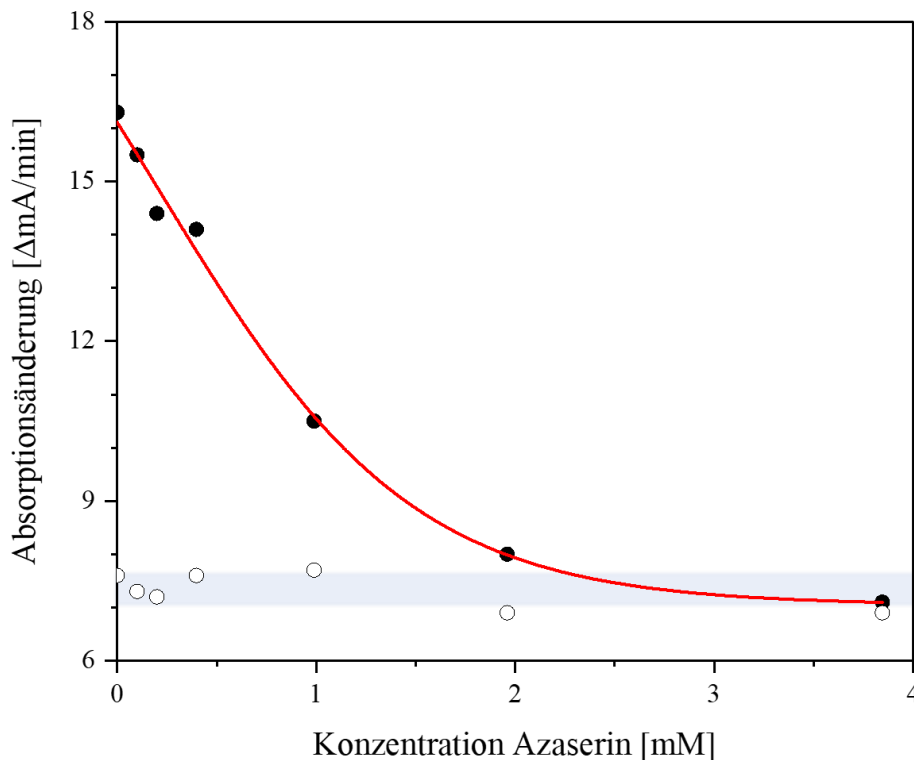


Abbildung 45: L-Azaserin hemmt Glt1-Aktivität. Gezeigt ist die Absorptionsänderung pro Minute von Glt1-Aktivitätsmessungen bei 340 nm. Es wurden verschiedene Mengen L-Azaserin in das Reaktionsgemisch gegeben. Dargestellt ist die gesamte Absorptionsänderung (volle Kreise), die Hintergrundaktivität mit L-Azaserin im Reaktionsgemisch (leere Kreise), sowie ein Dosis-Wirkungs-Fit (rote Linie). Gezeigt ist auch die Standardabweichung der Hintergrundmessungen (hellblauer Bereich). Daraus errechnet sich ein IC_{50} -Wert von 0.7 ± 0.1 mM L-Azaserin (Standardabweichung geschätzt) (Rohdaten 32).

Dabei konnte festgestellt werden, dass unter den gewählten Bedingungen eine Endkonzentration von 4 mM L-Azaserin die Aktivität des Enzyms vollständig hemmt. L-Azaserin eignet sich somit gut als Inhibitor um eine Bestimmung der Hintergrundaktivität dieser Reaktion zu ermöglichen. Alternativ ist auch Methioninsulfon zur Hemmung der Glutamat-Synthase-Aktivität verwendbar (Trotta *et al.*, 1974). Für Glt1 in Hefezell-extrakt wurde später in der Doktorarbeit ein IC_{50} -Wert von 183 μ M bestimmt (Rohdaten 35). Methioninsulfon eignet sich somit gut als kostengünstige Alternative für den Inhibitor L-Azaserin.

4.4.1.3 Kinetische Parameter der Glutamat-Synthase im Zellextrakt

Zur Optimierung des Aktivitätsassays wurden neben der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Inhibitors L-Azaserin auch die K_M -Werte für die drei Substrate untersucht (siehe Tabelle 54). Deswegen wurden alle Assays mit 0.1 mM NADH, 10 mM α -Ketoglutarat und 10 mM L-Glutamin durchgeführt.

Tabelle 54: Kinetische Parameter der Glt1-Aktivitätsmessungen. Gezeigt ist der K_M -Wert der drei Substrate der Glt1-Aktivitätsmessungen. Die Konzentrationen der nicht-variablen Komponenten der K_M -Bestimmung waren NADH (0.1 mM), α -Ketoglutarat (10 mM) und L-Glutamin (10 mM).

Variierende Konzentration	K_M -Wert [μ M]	Rohdaten
α -Ketoglutarat	251 $\pm$ 54	31
NADH	5.9 $\pm$ 0.9	32
L-Glutamin	393 $\pm$ 10	33

4.4.1.4 pH-Abhängigkeit der Glt1-Reaktion

Im Gegensatz zur Messung der Isopropylmalat-Isomerase-Aktivität (Kapitel 4.4.3) hat die Messung der Glt1-Aktivität im Zellextrakt eine hohe Hintergrundaktivität (siehe Abbildung 46), welche die Genauigkeit und Signifikanz der Messung beeinflusst. Durch die Optimierung der Bedingungen bei der Aktivitätsmessung könnte sich ein besseres Verhältnis von Gesamt- zu Hintergrundaktivität ergeben, weshalb hier die pH-Abhängigkeit untersucht wurde, wobei das Ziel eine Verringerung der Hintergrundaktivität war. Die Hintergrundaktivität verringerte sich mit steigendem pH-Wert der verwendeten Pufferlösungen, aber die Gesamtaktivität verringerte sich durch die Änderung des pH-Wertes ebenfalls, weshalb sich hier kein besseres Verhältnis von Gesamt- zu Hintergrundaktivität erzielen lies. Obwohl die Erhöhung des pH-Wertes keine Verbesserung des Verhältnisses von Hintergrund zu Messwert zeigte, lässt sich dennoch eine Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität vom pH-Wert zeigen. Diese sinkt mit zunehmender Entfernung vom physiologischen pH-Wert der Zelle. Aufgrund der Daten wurden alle Glutamat-Synthase-Assays bei pH 7.8 durchgeführt. Um das Assay zu validieren, wurden abschließend Messungen von Zellextrakten eines Δ Glt1-Stammes mit den Messungen der Hintergrundaktivität im Wildtyp-Zellextrakt verglichen, wobei ähnliche Werte beobachtet wurden.

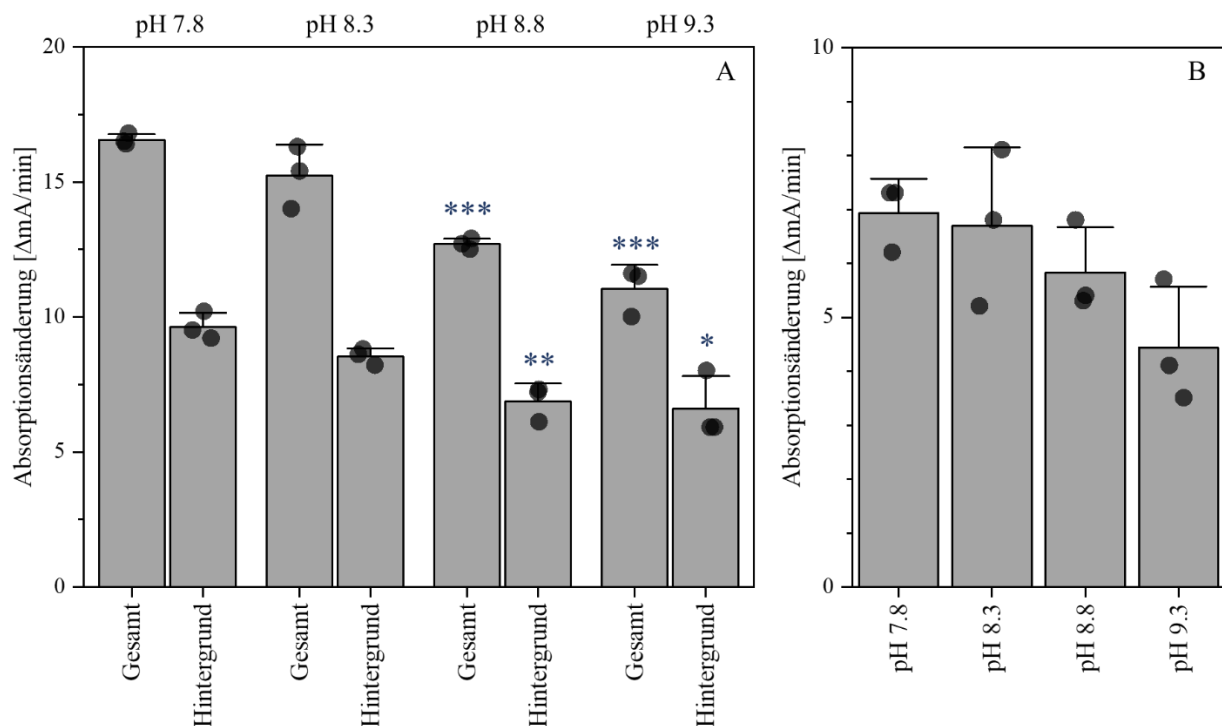


Abbildung 46: Abhängigkeit der Glt1-Aktivitätsmessung vom pH-Wert. Gezeigt sind die Absorptionsänderungen von Glt1-Aktivitätsmessungen des Zellextrakts (n=3) bei verschiedenen pH-Werten in Phosphatpuffer. Panel (A) zeigt die gesamte Absorptionsänderung und die Änderung der Absorption der Hintergrundmessungen für verschiedene pH-Werte. Panel (B) zeigt die Differenz von Gesamtänderung zur Änderung des Hintergrunds. Die Messungen „Hintergrund“ wurden wie die Aktivitätsmessungen durchgeführt, allerdings wurde dabei zusätzlich L-Azaserin (4 mM) zur Hemmung der Glutamat-Synthase hinzugegeben. Die Signifikanz bezieht sich auf den Vergleich zur Messung bei pH 7.8 und entspricht den mittels einseitigem T-Test errechneten p-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.01, 0.005, 0.001 entspricht (Rohdaten 25).

4.4.2 Glutamat-Synthase-Aktivität der Zellextrakte für die MS-Analyse

Mit Hilfe des neu etablierten Aktivitätsassays für Zellextrakte konnte die Glutamat-Synthase-Aktivität der Hefestämme bestimmt werden (siehe Abbildung 47). Da die Aktivität von Glt1 vom Fe/S-Kofaktor abhängig ist, wird dieses Assay genutzt um indirekt die Beladung mit dem Kofaktor in verschiedenen CIA-Depletionsstämmen zu untersuchen um damit eine Aussage über den Phänotyp dieser Stämme treffen zu können. Außerdem ist die Lokalisierung von Glt1 immer noch nicht endgültig geklärt. Während frühere Studien Glt1 in den Mitochondrien lokalisierten, konnte in neueren Studien keine mitochondriale Lokalisierung nachgewiesen werden (Morgenstern *et al.*, 2017). Als Erklärung für die unklare Lokalisierung wäre eine Filamentbildung von Glt1, welche bei der Fraktionierung von Mitochondrien in früheren Studien zu einem Nachweis von Glt1 in der Mitochondrienfraktion geführt haben könnte.

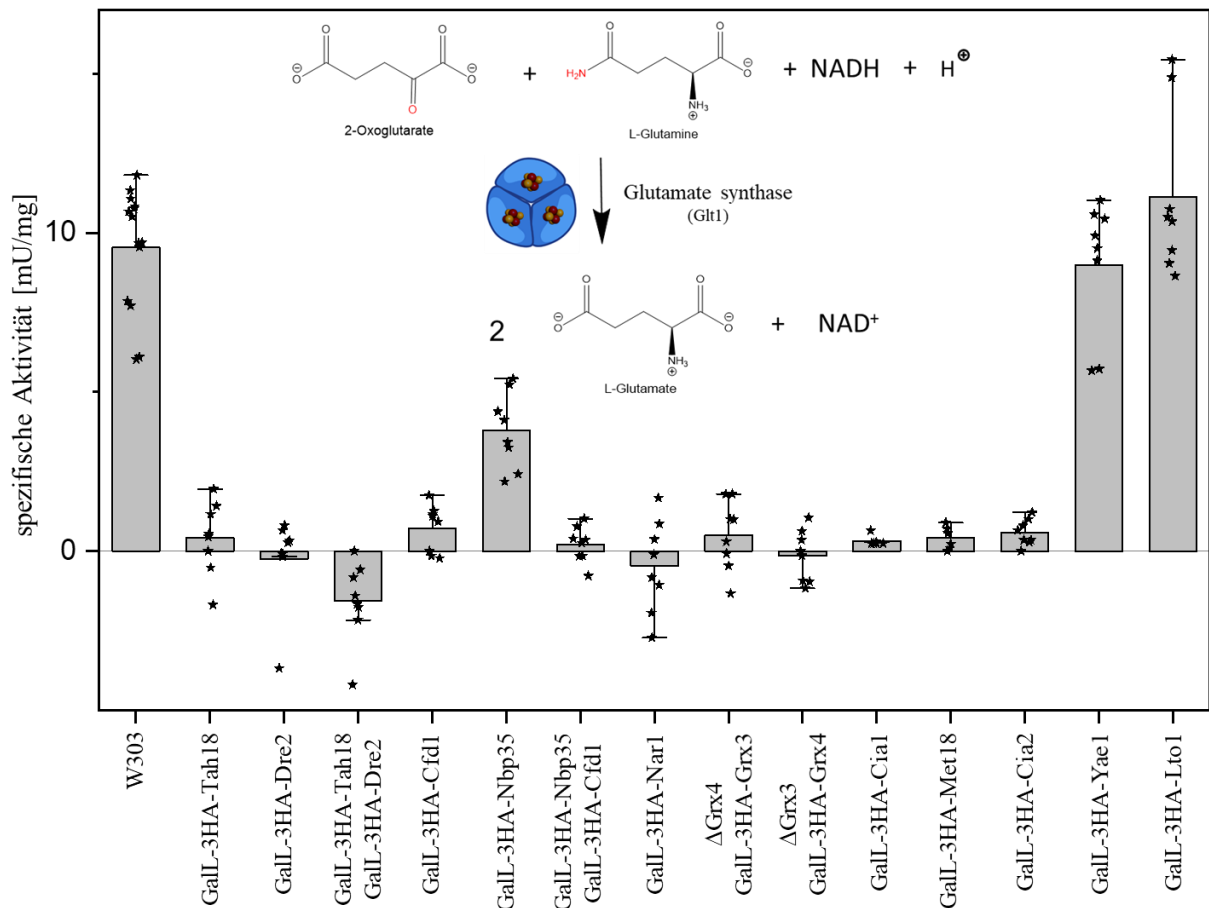


Abbildung 47: Glutamat-Synthase-Aktivität der Zellextrakte für MS-Analyse. Gezeigt ist die spezifische Aktivität in mU/mg. Dabei wurde die Aktivität bei 25°C gemessen, jeder Punkt repräsentiert eine biologische Probe, welche mindestens als Duplikat gemessen wurde (Rohdaten 24).

Die Messungen zeigen eine signifikante ($p < 0.001$) Verringerung der Glt1-Aktivität bei CIA-depletierten Stämmen mit Ausnahme der Lto1- und Yae1-Depletionsstämmen. Damit konnte eine Abhängigkeit der Glt1-Aktivität von der allgemeinen CIA-Maschinerie gezeigt werden, während die Depletion der Adaptorproteine Yae1 und Lto1 wie auch bei der Isopropylmalat-Isomerase-Aktivität keinen Einfluss auf die Aktivität haben. Andere Studien konnten bereits mittels ^{55}Fe -Einbau Rad3, Ntg2, Pol3, Nbp35, Nar1 und die Sulfireduktase als Klientenproteine von Yae1 und Lto1 ausschließen (Paul *et al.*, 2015).

4.4.3 Isopropylmalat-Isomerase-Aktivität der Zellextrakte für die MS-Analyse

Die durch das Glutamat-Synthase Aktivitätsassay erlangten Einsichten über die Auswirkungen der Depletion der CIA-Proteine in den mutierten Hefestämmen konnten durch das etablierte

Isopropylmalat Isomerase Aktivitätsassay unabhängig belegt werden (siehe Abbildung 48). Dabei wurde die Absorption des Intermediates Isopropylmaleat bei 235 nm zur photometrischen Beobachtung der Reaktion eingesetzt (siehe Kapitel 3.6.5.2).

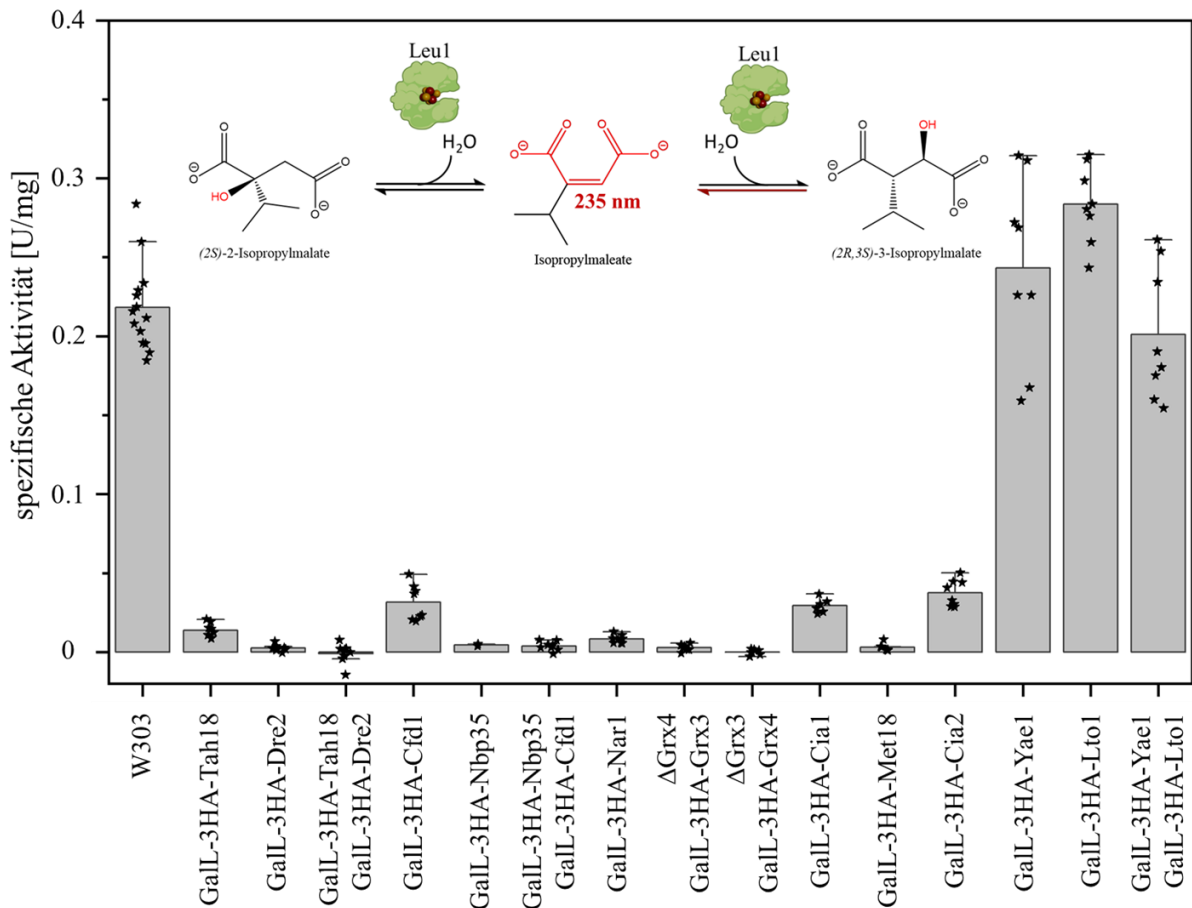


Abbildung 48: Isopropylmalat-Isomerase-Aktivität der Zellextrakte für MS-Analyse. Gezeigt ist die spezifische Aktivität in U/mg. Dabei wurde die Aktivität bei 25°C gemessen, jeder Punkt repräsentiert eine biologische Probe, welche mindestens als Duplikat gemessen wurde (Rohdaten 23).

Die Messungen zeigen eine signifikante ($p < 0.001$) Verringerung der Leu1-Aktivität bei CIA-depletierten Stämmen mit Ausnahme der Lto1- und Yae1-Depletionsstämmen, vergleichbar mit der Änderung der Glt1-Aktivität aus dem vorherigen Kapitel. Die Ergebnisse zeigen, dass die CIA-Proteine der später massenspektrometrisch untersuchten Hefestämme erfolgreich depletiert wurden.

4.5 Analyse und Verifizierung der massenspektrometrischen Daten

Massenspektrometrische Daten wurden mittels MaxQuant normalisiert und zu einer „peptides.txt“-Datei prozessiert (siehe Kapitel 3.3.4). Diese wurde mittels Perseus so transformiert, dass diese Daten für weitere Analysen in Excel und Origin auswertbar sind (siehe Kapitel 3.3.5).

4.5.1 Vergleichbarkeit der Messreihen (MS)

Da aufgrund der Anzahl der Proben die Proteome der verschiedenen Hefestämme in mehreren Messreihen zu verschiedenen Zeitpunkten massenspektrometrisch analysiert werden mussten, war es wichtig die Vergleichbarkeit der Messreihen zu überprüfen. Dazu wurde die Verteilung der Proteinabundanzen der Kontrollgruppen jeder MS-Messserie des Wildtyps (W303) mit einander verglichen. Dabei konnte beobachtet werden, dass die MS-Datenserien 3 und 4 im Durchschnitt einen 2,7-fach verringerten Median der LFQ-Werte im Vergleich zu Datenserie 1, 2 und 5 aufwies. Auch die Anzahl an Messwerten, welche unter der Nachweisgrenze liegen waren bei diesen beiden MS-Datenserien deutlich erhöht, zu erkennen an dem unteren „Bauch“ des Violinenplots, da alle nicht-detektierten Werte hierfür durch den Wert „20“ imputiert wurden (siehe Abbildung 49).

Daraufhin wurde eine mögliche weitere Normalisierung der Daten untersucht. Dabei wurden Histone als konstant exprimierte Proteine angenommen. Die fünf Histone der Hefe wurden auf ihre Abundanz untersucht und das Muster der Abundanz mit dem Muster des Mittelwertes der Abundanzen aller Proteine des jeweiligen Wildtyps verglichen. Auffällig war, dass das Linker-Histon (H1) im Vergleich zu den anderen Histonen eine durchschnittlich 13-fach geringere Abundanz zeigte. Es wurde festgestellt, dass die Abundanz von Histon H3 und Histon H2B am stärksten mit der durchschnittlichen Verteilung der Proteinabundanz in W303-Durchläufen korreliert (siehe Abbildung 50). Deshalb wurde eine Normalisierung über die Abundanz von Histon H2B untersucht. Zur Verifizierung der Normalisierungsmethode wurde zuerst ein Datensatz erstellt, der ausschließlich aus gemessenen Werten bestand, also keine imputierten Werte enthielt. Dieser Datensatz wurde daraufhin mit verschiedenen Methoden normalisiert. Es wurde festgestellt, dass eine Normalisierung über die Histonabundanz keine Vorteile gegenüber der internen Normalisierung durch die Verwendung von MaxQuant bietet.

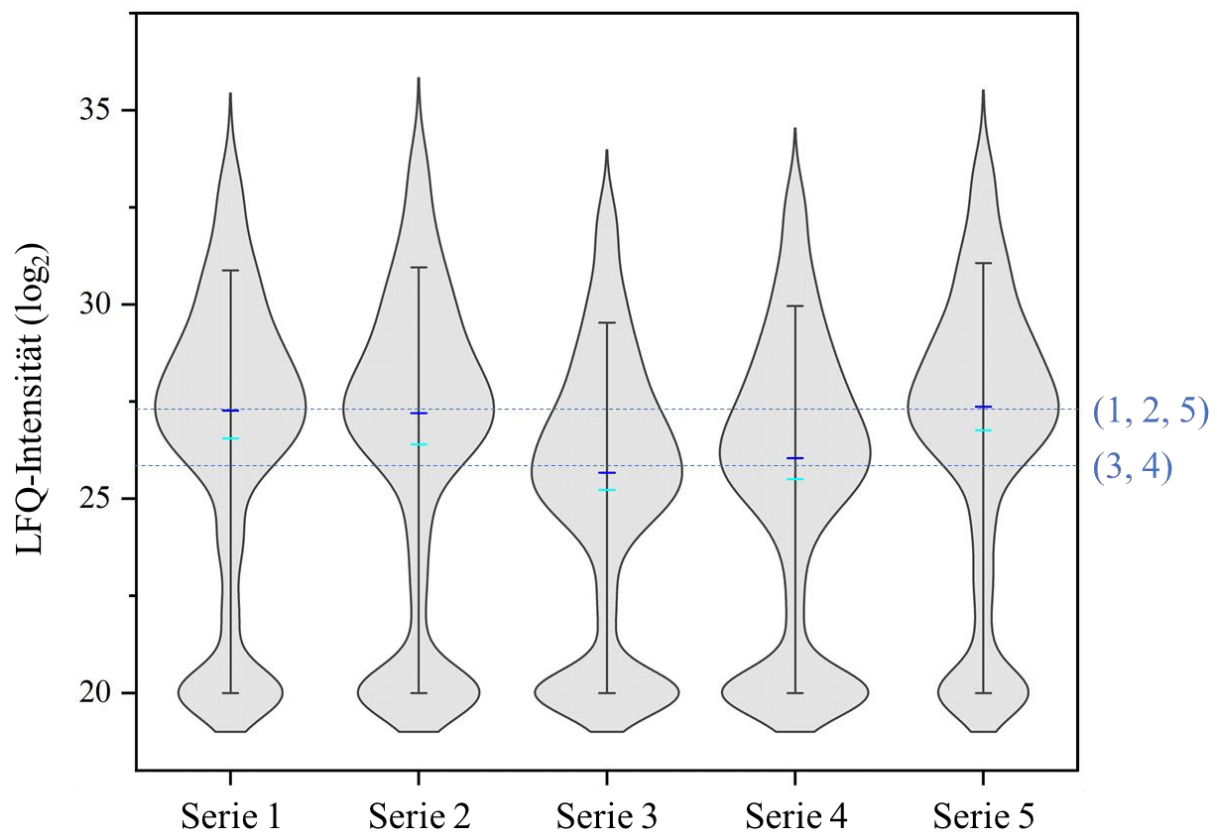


Abbildung 49: Unterschiede der durchschnittlichen Abundanzen des Wildtyps verschiedener Messdurchgänge. Gezeigt ist die Verteilung der durchschnittlichen Abundanzen der Wildtypgruppe fünf verschiedener Messreihen. Dabei ist die Stichprobengröße $n = 3$ bei Messreihe 1 und $n = 4$ bei Messreihe 2 bis 5. Angezeigt wird der Median (blau), der Mittelwert (cyan), sowie das neunzigste und zehnte Perzentil der Abundanzen aller Proteine des Wildtyps einer Messreihe. Nicht detektierbare Messwerte wurden für diesen Graphen zur besseren Erkennung pro Replikat mit dem Wert „20“ imputiert. Die gestrichelten Linien sind der Mittelwert der Medianwerte von Serie 1, 2 und 5 (1, 2, 5) und Serie 3 und 4 (3, 4) (Rohdaten 37).

Tabelle 55: Histone in *S. cerevisiae*. Beschrieben sind die fünf Histone in *S. cerevisiae* und die Namen der Gene. Dabei sind vier der fünf Histone im Genom durch zwei ähnliche Gene kodiert, welche als identische Proteine exprimiert werden.

Histon	Gen in <i>S.cerevisiae</i>
H1	<i>HHO1</i>
H2A	<i>HTA1 / HTA2</i>
H2B	<i>HTB1 / HTB2</i>
H3	<i>HHT1 / HHT2</i>
H4	<i>HHF1 / HHF2</i>

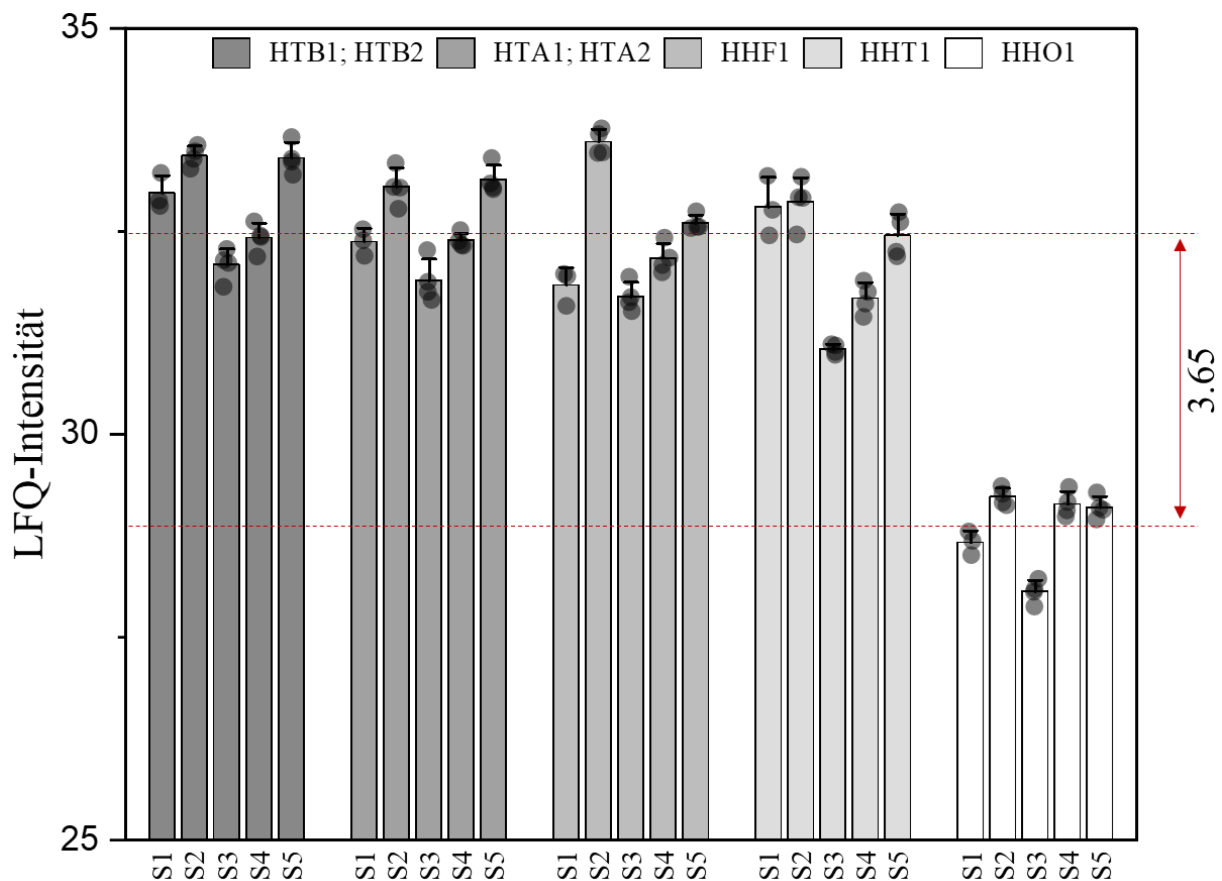


Abbildung 50: Abundanz der Histone im Wildtyp in verschiedenen Datenserien. Gezeigt sind die Abundanzen der fünf Histone der Hefe. Diese wurden getrennt für die fünf verschiedenen Wildtyp-Proben aufgetragen und die Messwerte (Kreise) der einzelnen Replikate und die Standardabweichungen sind eingezeichnet. Die Namen der Legende entsprechen den Namen im Datensatz. Die gestrichelten Linien entsprechen dem Mittelwert aller Werte der Histone H2A, H2B, H3 und H4 (obere) und dem Mittelwert der Abundanzen von Histon H1 (untere). Jeder Balken kann einer der fünf MS-Datenserien zugeordnet werden (S1 bis S5) (Rohdaten 49).

4.5.2 Verifizierung der Depletionsstämme durch MS

Die Betrachtung der gemessenen Abundanz der depletierten CIA-Proteine wurde genutzt um die Depletion genetisch veränderten Hefestämme abschließend zu verifizieren. Dabei konnte bei allen Hefestämmen nach Depletion keines der entsprechenden Proteine noch detektiert werden (siehe Tabelle 56). Dabei wurden im Wildtyp 11 von 12 bekannten CIA-Faktoren detektiert, wobei zwei weitere CIA-Proteine nahe der Nachweisgrenze waren, manche Messwerte sollten daher mit Vorsicht betrachtet werden. Nichtsdestotrotz wurde deutlich, dass die Depletion bei allen Stämmen erfolgreich war. Die Depletionsbedingungen können also als passend angesehen werden.

Tabelle 56: Verifizierung der Depletion in MS-Proben. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Abundanzen der im jeweiligen Hefestamm genetisch modifizierten Gene (Abundanz Mutante). Die Abundanz des jeweiligen Proteins im Wildtyp der jeweiligen Messserie wurde auch notiert (Abundanz W303). Bei Doppelmutanten wurde jeweils die Abundanz des in Fettdruck hervorgehobenen Proteins dokumentiert. Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze wurden als annotiert (*n.d.*) (Rohdaten 73).

Hefestamm	Abundanz W303	Abundanz Mutante
Tah18↓ (Messserie 2)	26.4 ± 0.2	<i>n.d.</i>
Dre2↓	29.3 ± 0.1	<i>n.d.</i>
Tah18 ↓/Dre2↓	24.9 ± 0.4	<i>n.d.</i>
Tah18↓/ Dre2 ↓	29.3 ± 0.1	<i>n.d.</i>
Cfd1↓	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Nbp35↓ (Messserie 5)	26.4 ± 0.4	<i>n.d.</i>
Cfd1 ↓/Nbp35↓	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Cfd1↓/ Nbp35 ↓	25.5 ± 0.1	<i>n.d.</i>
Nar1↓	30.1 ± 0.3	<i>n.d.</i>
ΔGrx3/ Grx4 ↓	26.3 ± 0.2	<i>n.d.</i>
ΔGrx4/ Grx3 ↓	28.8 ± 0.1	<i>n.d.</i>
Cia1↓	25.2 ± 0.3	<i>n.d.</i>
Cia2↓	26.7 ± 0.2	<i>n.d.</i>
Met18↓	26.9 ± 0.1	<i>n.d.</i>
Yae1↓	25.7 ± 0.2	<i>n.d.</i>
Lto1↓	25.7 ± 0.2	<i>n.d.</i>
Yae1 ↓/Lto1↓	26.8 ± 0.1	<i>n.d.</i>
Yae1↓/ Lto1 ↓	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

Cfd1 konnte in keiner Messserie nachgewiesen werden, während Lto1 in manchen Messserien nachweisbar war, bedingt durch die geringe natürliche Abundanz des Proteins (siehe Tabelle 57). Cia1 war in vielen replikaten nahe der Nachweisgrenze.

Tabelle 57: Niedrigabundante CIA-Proteine. Gezeigt ist ein nicht per MS detektierbares CIA-Protein (Lto1) und zwei niedrig abundante CIA-Proteine (Cfd1 und Cia1), sowie deren gemessene Abundanz in Experimenten anderer Veröffentlichungen (Ho *et al.*, 2018).

Proteinbezeichnung	Geschätzte Abundanz im Wildtyp [Moleküle/Zelle]
Lto1	784 ± 663
Cfd1	1285 ± 401
Cia1	3008 ± 1456

4.5.3 Vergleich Leu1-Aktivität und Leu1-Abundanz

Erstens wurde der Zusammenhang zwischen der Aktivität der Isopropylmalat-Isomerase und ihrer mittels Massenspektrometrie gemessenen Abundanz untersucht (siehe Abbildung 51). Eine Verteilung der Werte über einer Diagonalen von (0, 0) bis (100, 100) scheint notwendig, da ohne das Protein auch keine Aktivität vorliegen kann. Durch die Auftragung von Messwerten der Aktivität und Abundanz konnte beobachtet werden, dass bis zu einem Aktivitätsverlust von ca. 75 % nur eine geringfügige Abnahme der Abundanz (ca. 20 %) von Leu1 stattfindet. Unter diesen Bedingungen muss also ein Großteil (mindestens 60%) von Leu1 als Apoprotein vorliegen. Bei Messungen, die eine Aktivität von weniger als 20 % im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, konnte festgestellt werden, dass die Abundanz deutlich verringert war.

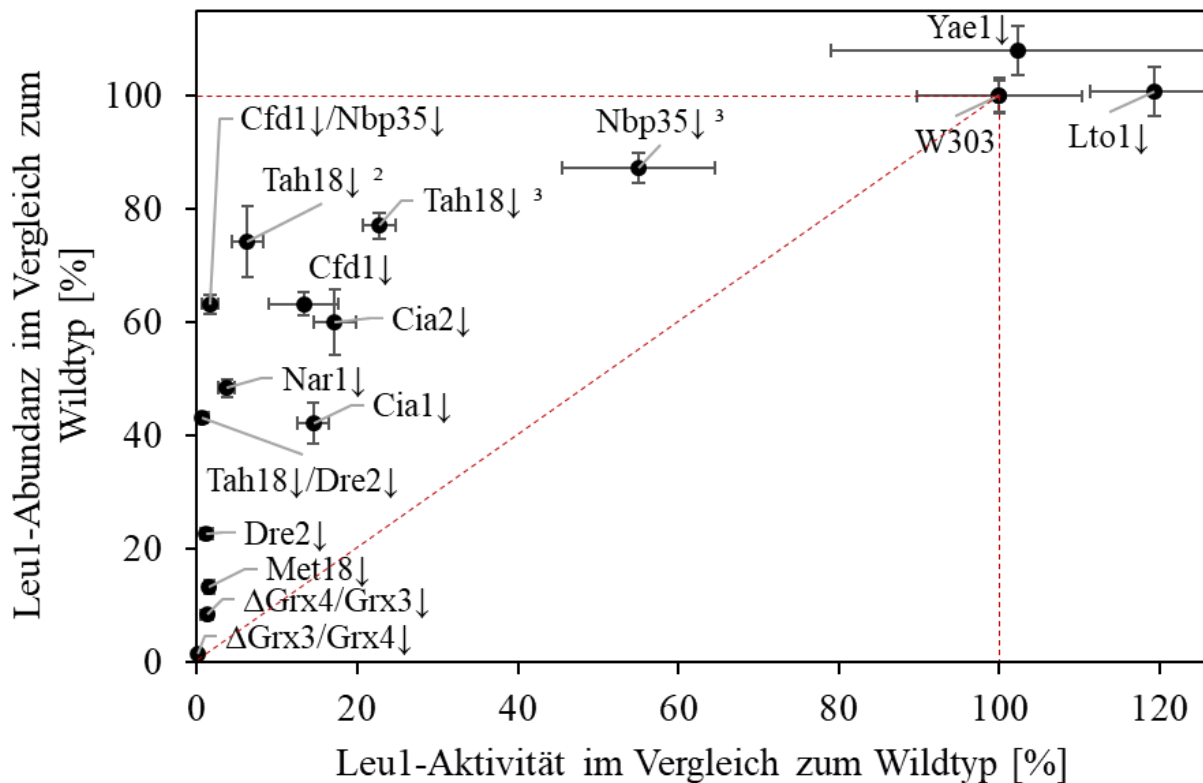


Abbildung 51: Vergleich der Isopropylmalat-Isomerase-Aktivität und Abundanz verschiedenerer Hefestämme. Gezeigt sind die Mittelwerte von Messungen verschiedener CIA-Regulationsstämme. Dabei wurden die X-Werte als Prozentsatz der Leu1-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp und die Y-Werte als Prozentsatz der Leu1-Abundanz im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Replikate, welche in mehreren MS-Datenserien gemessen wurden, sind mit der zugehörigen Zahl im Superskript gekennzeichnet. MS-Datenserie 1 beinhaltet drei Replikate, spätere Datenserien vier. Vom Wildtyp wurden Messungen von sieben Replikaten aufgetragen (Rohdaten 36).

Es wird vermutet, dass Leu1 auf die Depletion von CIA-Faktoren biphasisch reagiert: Ein geringer Mangel (Phase 1) an Fe/S-Kofaktoren ändert die Proteinabundanz kaum. Liegt

aufgrund von Fe/S-Mangel mehr als 60 % von Leu1 als Apoprotein vor (Phase 2), so verringert sich die Abundanz drastisch, sodass Leu1 nahezu vollständig verschwindet. Dabei sind sowohl Prozesse der Proteolyse, als auch eine Regulation der Expression als Begründung denkbar. Außerdem muss die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass im Wildtyp bereits Leu1 als Equilibrium aus Apo- und Holoenzym in unbekannter Relation vorliegt.

4.5.4 Vergleich Glt1-Aktivität und Glt1-Abundanz

Betrachtet man die Messungen der Glt1-Aktivität und Abundanz auf dieselbe Weise wie die der Leu1-Messungen, so ergibt sich ein anderes Gesamtbild für dieses Protein. Die höheren Messungsgenauigkeiten bei den Aktivitätsmessungen, so wie die „alles oder nichts“ Glt1-Abundanz bei der Depletion der CIA-Faktoren (außer Yae1↓ und Lto1↓) führt zu einem weniger differenzierten Bild, wodurch die Interpretation der Ergebnisse mit einer höheren Unsicherheit verbunden ist (siehe Abbildung 52).

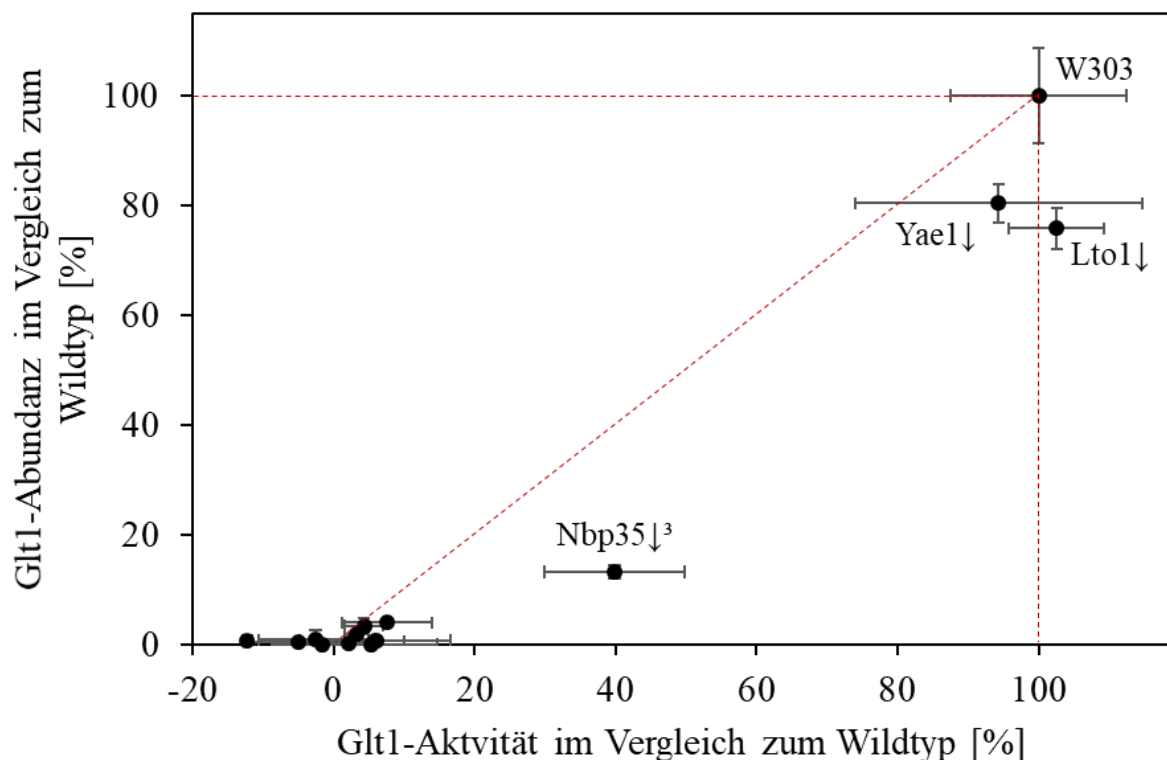


Abbildung 52: Vergleich der Glutaminsynthase-Aktivität und Abundanz verschiedenener CIA↓-Hefestämme. Gezeigt sind die Mittelwerte von Messungen verschiedener CIA-Regulationsstämmen. Dabei wurden die X-Werte als Prozentsatz der Glt1-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp und die Y-Werte als Prozentsatz der Glt1-Abundanz im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Replikate, welche in mehreren MS-Datenserien gemessen wurden, sind mit der zugehörigen Zahl im Superskript gekennzeichnet. MS-Datenserie 1 beinhaltet drei Replikate, spätere Datenserien vier. Vom Wildtyp wurden Messungen von sieben Replikaten aufgetragen (Rohdaten 36).

In beiden Fällen, sowohl bei der Auftragung der Leu1-Aktivität und der Abundanz, sowie bei der Glt1-Aktivität und der Abundanz zeigt sich eine Korrelation von Abundanz und Aktivität. Der Verlauf ist jedoch unterschiedlich. Während bei Leu1, in der Grafik von rechts nach links gelesen, zuerst die Aktivität abnimmt und danach die Abundanz, zeigt Glt1 leider nur basiert auf der Nbp35-Depletion eine im Vergleich zu Leu1 andere Abhängigkeit. Das Verhalten der Leu1-Aktivität und Abundanz lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass eine Einschränkung der CIA-Maschinerie zu einer Verringerung der Beladung von Leu1 mit dem Fe/S-Cluster führt, aber weiterhin die Proteinbiosynthese von Leu1 durchgeführt wird, wodurch Apo-Leu1 abundanter ist, welches massenspektrometrisch nachgewiesen wird, aber ohne Cluster keine Aktivität zeigt. Wird die CIA-Maschinerie stärker depletiert, so wird ab einem gewissen Punkt (etwa 80% Apo und 20% Holo-Protein) entweder die Leu1 Biosynthese verringert oder Apo-Leu1 vermehrt durch Proteolyse abgebaut. Die Klärung dieser Frage erfordert weitere Experimente. Da nicht alle Eisen-Schwefel-Proteine durch die Depletion der CIA-Maschinerie eine niedrigere Abundanz zeigen, kann hier eine Priorisierung durch die CIA-Maschinerie vermutet werden. Allerdings kann auch die Stabilität der Apo-Proteine eine entscheidende Rolle spielen.

Da der Δ Glt1-Stamm in SC-Glukosemedium keinen auffälligen Wachstumsphänotyp aufwies, ist unter diesen Bedingungen Glt1 nicht essentiell für die Zelle und kann durch andere Stoffwechselwege (z.B. über Gdh1/2) kompensiert werden. Dies ist auch ein Hinweis auf eine Priorisierung der CIA-Klienten unter Fe/S-Mangelbedingungen.

4.6 Auswirkungen auf Stoffwechselwege

4.6.1 Auswirkungen der Depletion auf die CIA-Maschinerie

Während die Abundanz der depletierten Proteine selbst in Kapitel 4.5.2 als Maß zur Verifizierung der Hefedepletionsstämme genutzt wurde, zeigen die folgenden Kapitel die weiterführenden Auswirkungen der Depletion von CIA-Proteine auf andere Proteine der CIA-Maschinerie. Da für die weitere Analyse Messwerte benötigt werden, wurden für nicht detektierbare Proteine Messwerte durch zufällige Werte aus einer Standardverteilung in der Nähe der Nachweisgrenze ersetzt, sogenannte „imputierte“ Werte.

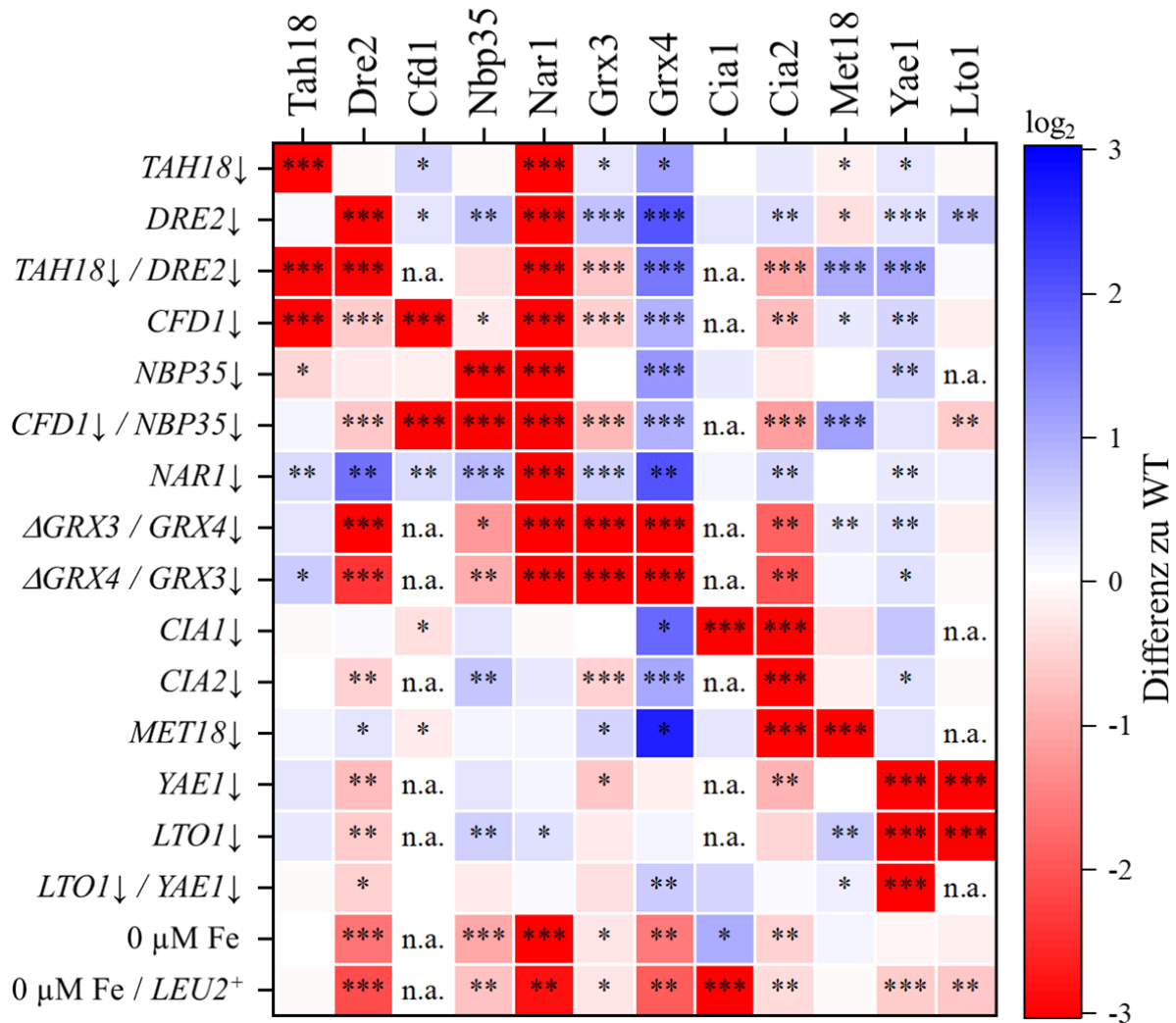


Abbildung 53: Zusammenfassung der Abundanz der CIA-Proteine unter verschiedenen Bedingungen. Gezeigt ist die Differenz der Abundanz von CIA-Proteinen zum Wildtyp derselben MS-Datenserie. Links angegeben sind die unterschiedlichen Bedingungen, denen die Zellen ausgesetzt waren, wobei die reprimierten Gene angezeigt werden (↓). Dabei wurde Die Differenz als logarithmischer Wert zur Basis 2 angegeben und aus den Werten von 3 (Experiment 1) oder 4 (andere Experimente) biologischen Replikaten errechnet. Die Signifikanz entspricht den mittels Students T-Test errechneten q-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.05, 0.01, 0.001 entspricht. Für Cfd1, Cia1 und Lto1 sind für mindestens einen Depletionsstamm sowohl Abundanzen des Wildtyps, als auch der Mutante nicht vorhanden (n.a.). Fehlten Werte bei nur einer der beiden Bedingungen wurden diese imputiert (Rohdaten 50).

4.6.1.1 Auswirkungen auf die Abundanz innerhalb der CIA-Komplexe

Die Depletion der CIA-Proteine zeigte unterschiedliche Auswirkungen auf die Abundanz von Komplexpartnern innerhalb der CIA-Maschinerie. Die Abundanz von Tah18 und Dre2 wird kaum durch die Abundanz des Komplexpartners beeinflusst. Auch die Abundanzen von Cfd1

und Nbp35 scheinen sich kaum gegenseitig zu beeinflussen. Bei Grx3 und Grx4 lässt sich keine genaue Aussage treffen, da keine Einzelmутanten gemessen wurden. Der CTC scheint eine Abhängigkeit zu zeigen, wobei die Abundanz von Met18 nicht durch seine Komplexpartner beeinflusst wird, während Cia1 und Cia2 gegenseitig abhängig von der Abundanz des Anderen sind und die Abundanz von Cia2 durch die Depletion von Met18 beeinflusst wird. Die Abundanz von Yae1 ist stark von der Lto1-Abundanz abhängig und vice versa, was auf eine Stabilisierung dieser Proteine durch Komplexbildung schließen lässt (siehe Abbildung 53).

4.6.1.2 Auswirkungen auf die Abundanz durch andere, nicht-Komplexpartner

Fe/S-haltige CIA-Proteine:

Unter der Annahme, dass die CIA-Maschinerie benötigt wird um andere CIA-Proteine mit Fe/S-Kofaktoren zu beladen wurden die Daten auf eine Abundanzverringering dieser Fe/S-haltigen CIA-Proteine untersucht. Die Depletion von Grx3 und Grx4, aber auch anderer CIA-Proteine führt zu einer starken und signifikanten Depletion von Dre2, was möglicherweise auf Effekte am 4Fe/4S- und 2Fe/2S-Cluster von Dre2 zurückzuführen ist, während Tah18 relativ wenig beeinflusst wird. Auch Nar1 zeigt eine signifikante Verringerung der Abundanz, dieser Effekt konnte bei der Depletion anderer CIA-Proteine beobachtet werden, mit Ausnahme der Depletion des CTC und der Adaptorproteine Yae1 und Lto1. Die Abundanz von Nbp35 wird trotz der Fe/S-Kofaktoren deutlich weniger von den verschiedenen Depletionsbedingungen beeinflusst. Nur die Depletion von Grx3, Grx4 und Eisen führte hier zu einer Verringerung der Abundanz.

Nicht-Fe/S-haltige CIA-Proteine:

Die Eisendepletion im Medium zeigte ähnliche Auswirkungen wie die genetisch erzeugte Depletion von CIA-Proteinen. Insbesondere ist die Ähnlichkeit zu den Auswirkungen einer Depletion von Grx3 und Grx4 zu erkennen. Die Abundanz der meisten CIA-Faktoren nahm ab, wobei die Fe/S-haltigen CIA-Proteine am stärksten betroffen waren. Da die gemessene Abundanz von Cia1 nahe der Nachweisgrenze liegt, ist dessen Abundanzänderung für einige Experimente mit Vorsicht zu interpretieren. Da manche CIA-Faktoren eine Abundanz nahe der Nachweisgrenze aufweisen ist es wichtig, die Originaldaten zu beachten um falschpositive Ergebnisse zu erkennen. Diese Daten sind im Anhang in Kapitel 8.4.1 zur besseren Übersicht dargestellt.

Es konnten zudem indirekte Einflüsse auf die Abundanzänderung gezeigt werden, die zum Beispiel auf einer regulatorischen Ebene liegen. Eine Depletion der frühen CIA-Faktoren Tah18 und Dre2 führen zu einer starken Erhöhung der Abundanz von Grx4, während sie die Abundanz von Grx3 nur leicht senken. Die Proteine Cfd1 und Nbp35 werden wenig durch die Abundanz von Tah18 und Dre2 beeinflusst. Spätere CIA-Faktoren werden von einer Depletion nicht signifikant beeinflusst.

Eine Depletion von Cfd1 und Nbp35 führen einzeln zu einer signifikanten Senkung der Tah18-Abundanz, während die Depletion beider Proteine gleichzeitig keine signifikante Änderung erzeugt. Wie bei der Depletion von Tah18, bzw. Dre2 führt die Cfd1- und Nbp35- Depletion auch zu einer erhöhten Abundanz von Grx4, sowie einer verringerten Abundanz von Grx3. Die Auswirkungen auf spätere CIA-Faktoren sind unterschiedlich und bei Depletion beider Proteine verstärkt. Die Abundanz von Cia2 sinkt, während die Abundanz von Met18 steigt.

Die Depletion von Nar1 zeigt eine deutliche Erhöhung der Abundanz der vorherigen und nachfolgenden CIA-Faktoren mit Ausnahme von Cia1 und Met18, deren Abundanz sich kaum verändert.

Eine Depletion von Cia1 und Met18 zeigte keine ausgeprägte Auswirkungen auf andere CIA-Faktoren außerhalb des CTC.

Die Depletion von Lto1 und Yae1 zeigte ebenfalls nur geringe Auswirkungen auf die Abundanz anderer CIA-Proteine.

Alle gegenseitigen Beeinflussungen (> 2-fach) bei einer CIA-Depletion wurden grafisch aufgetragen (siehe Abbildung 54). Besonders auffällig ist hierbei die Rolle von Grx4, aber nicht Grx3, welches deutlich erhöhte Abundanzen bei fast allen CIA-Depletionsstämmen, sowie bei Eisendepletion im Medium aufweist. Nar1 zeigt eine deutlich verringerte Abundanz als Antwort auf CIA-Depletion. Die Abundanzen von Cfd1 und Nbp35 sinken weniger ausgeprägt durch eine CIA-Depletion, aber Eisenmangel oder die Depletion von Grx3 und Grx4 führen zu leicht verringerten Abundanzen.

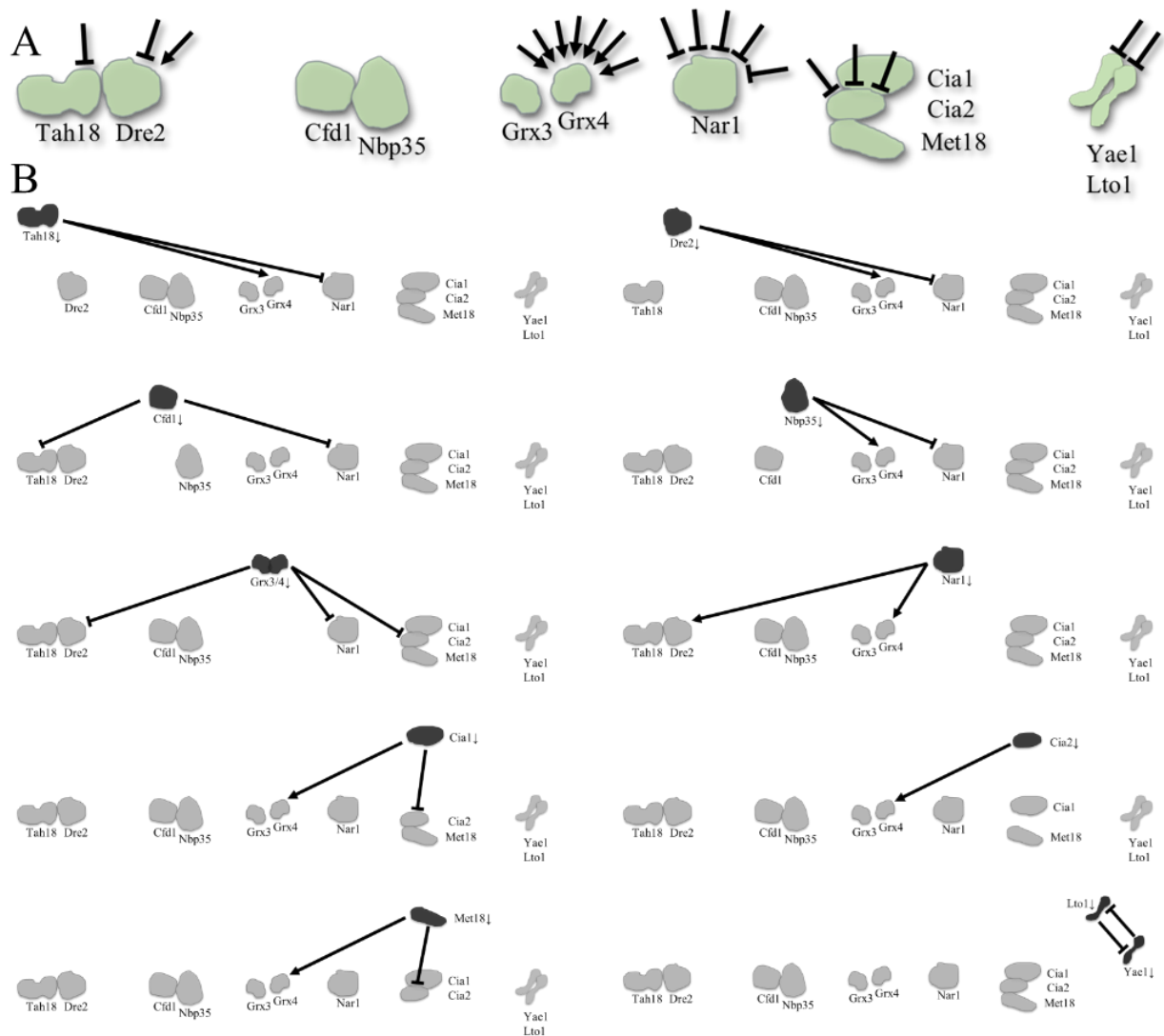


Abbildung 54: Gegenseitige Beeinflussung der CIA-Faktoren. Gezeigt sind die Abundanzänderungen der CIA-Proteine als Reaktion auf die Depletion von CIA-Faktoren. Dabei wurden nur Abundanzänderungen berücksichtigt, welche den Faktor Zwei überschreiten. Ein Pfeil zeigt eine Erhöhung der Abundanz. Eine Linie mit Balken hingegen zeigt eine verringerte Abundanz. (A) zeigt die summierten Änderungen für die in (B) dargestellten binären Interaktionen. Die Abundanz von Lto1 konnte nicht bestimmt werden (Rohdaten 50).

4.6.2 Abundanz der cytosolischen und nuklearen Fe/S-Proteine

Im Folgenden wurden die LFQ-Intensitäten als Maß für die Abundanz der nicht-CIA-Eisen-Schwefel-Proteine unter verschiedenen Depletionsbedingungen analysiert. Dabei wurden von 20 bekannten, nicht der CIA-Maschinerie angehörigen, cytosolischen und nuklearen Eisen-Schwefel-Proteinen 17 detektiert (85%). Drei Fe/S-Proteine waren in keinem Experiment

detektierbar. Pol2, Pri2, Dna2 und Ncs6 waren nur in wenigen Replikaten nachweisbar (siehe Tabelle 58).

Tabelle 58: Wildtypabundanzen zytosolischer und nuklearer Fe/S-Proteine. Gezeigt sind die im Wildtyp massenspektrometrisch detektierbaren zytosolischen Fe/S-Proteine, sowie der Mittelwert der gemessenen Abundanzen (LFQ) und der Mittelwert und die Standardabweichung der errechneten Abundanz (Moleküle pro Zelle) aus (Ho *et al.*, 2018). Die Farben zeigen, ob die gemessene Abundanz unter der Nachweisgrenze liegt (rot), in einigen Replikaten über der Nachweisgrenze (gelb) oder in einem Großteil der Replikate über der Nachweisgrenze liegt (grün). Manche Proteine sind in keinem Wildtypreplikate nachweisbar (*n.a.*).

Proteinbezeichnung	LFQ-Wert Wildtyp	Geschätzte Abundanz im Wildtyp [Moleküle/Zelle]
Ntg2	<i>n.a.</i>	90 ± 35
Chl1	<i>n.a.</i>	394 ± 336
Rev3	<i>n.a.</i>	1454 ± 1284
Pri2	<i>n.a.</i>	2390 ± 692
Pol2	<i>n.a.</i>	3153 ± 1183
Dna2	24.1	900 ± 190
Ncs6	24.7	2803 ± 977
Rad3	25.2	2505 ± 999
Tyw1	25.2	4079 ± 1124
Dph2	25.8	3129 ± 844
Pol3	25.8	3354 ± 1209
Pol1	26.1	2368 ± 1267
Dph1	26.4	2676 ± 728
Elp3	27.0	4751 ± 716
Mak16	27.3	3349 ± 984
Apd1	28.0	4289 ± 1269
Rli1	29.8	16040 ± 5930
Glt1	30.4	12015 ± 6885
Met5	31.2	6101 ± 3867
Leu1	32.8	56013 ± 24899

Obwohl die Abundanz einiger zytosolischer und nuklearer Eisen-Schwefel-Proteine eine starke Abhängigkeit von der Depletion von CIA-Proteinen zeigt, sind allerdings nicht alle Abundanzen dieser Fe/S-Proteine von der CIA-Maschinerie abhängig. Einige Eisen-Schwefel-Proteine wiesen geringe Abundanzen auf, wodurch in diesen Fällen viele fehlende Werte

entstanden sind. Die Differenzen der Eisen-Schwefel-Proteinabundanzen in Depletionsstämmen wurde im Vergleich zum Wildtyp zusammengefasst (siehe Abbildung 56).

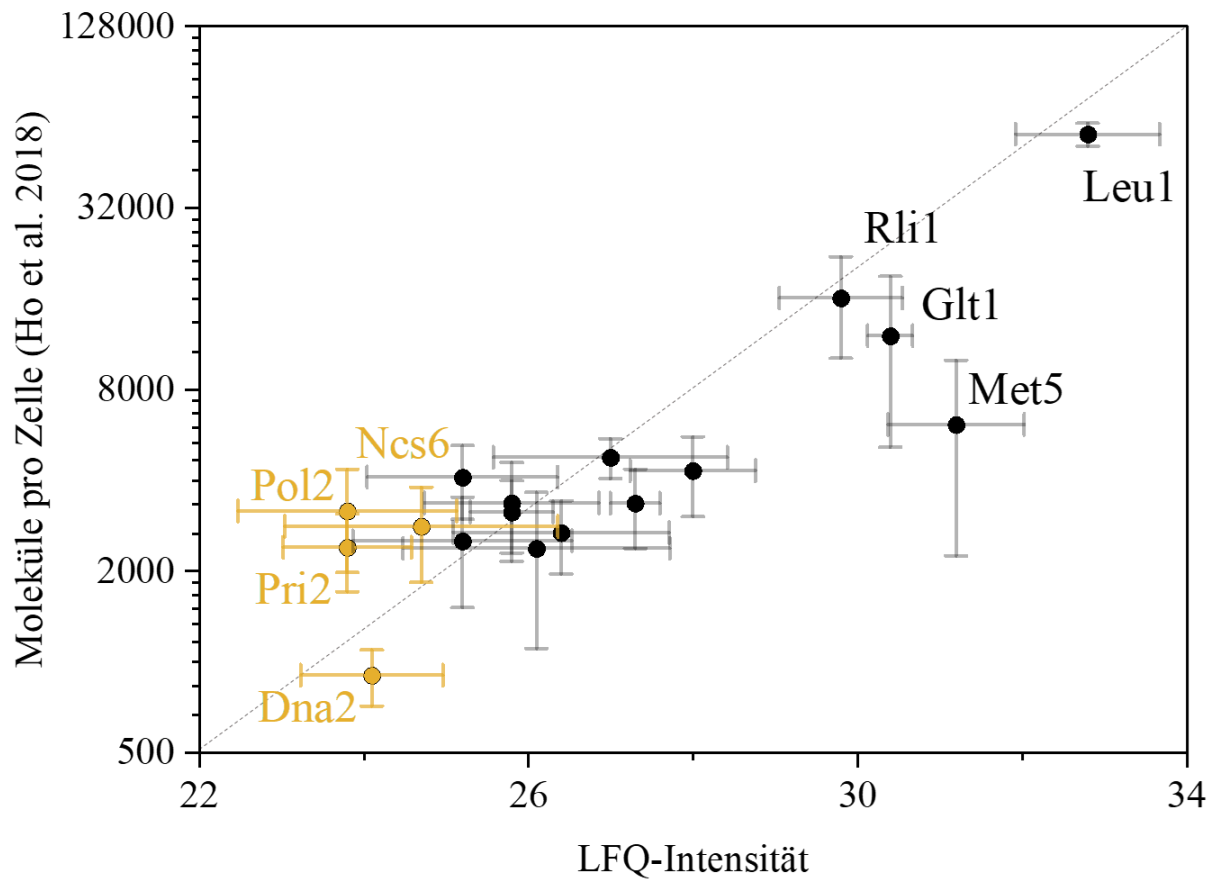


Abbildung 55: Vergleich von gemessenen Abundanzen für zytosolische und nukleare Fe/S-Proteine des Wildtyps mit Literaturwerten. Gezeigt sind die Mittelwerte der LFQ-Intensitäten aller massenspektrometrisch gemessenen zytosolischen Fe/S-Proteine der W303-Datenserien aufgetragen gegen Abundanzwerte aus einer Metastudie (Ho *et al.*, 2018). In Gelb dargestellt sind Werte für Proteine, deren Messwerte nahe am Detektionslimit lagen, weshalb teilweise imputierte Werte für die LFQ-Intensität verwendet wurden.

Der Vergleich der gemessenen Abundanzen im Wildtyp mit den Literaturwerten untermauert die Plausibilität der Daten, wobei zu beachten ist, dass die Literaturwerte nicht immer dieselben Wachstumsbedingungen zugrunde lagen.

Betrachtet man die gemessenen Abundanzen der zytosolischen und nuklearen Fe/S-Proteine in den CIA-Depletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp, so ergaben die Messreihen zuverlässige Messwerte für 13 der 20 bekannten Fe/S-Proteine, welche im Folgenden näher beschrieben werden (siehe Abbildung 56).

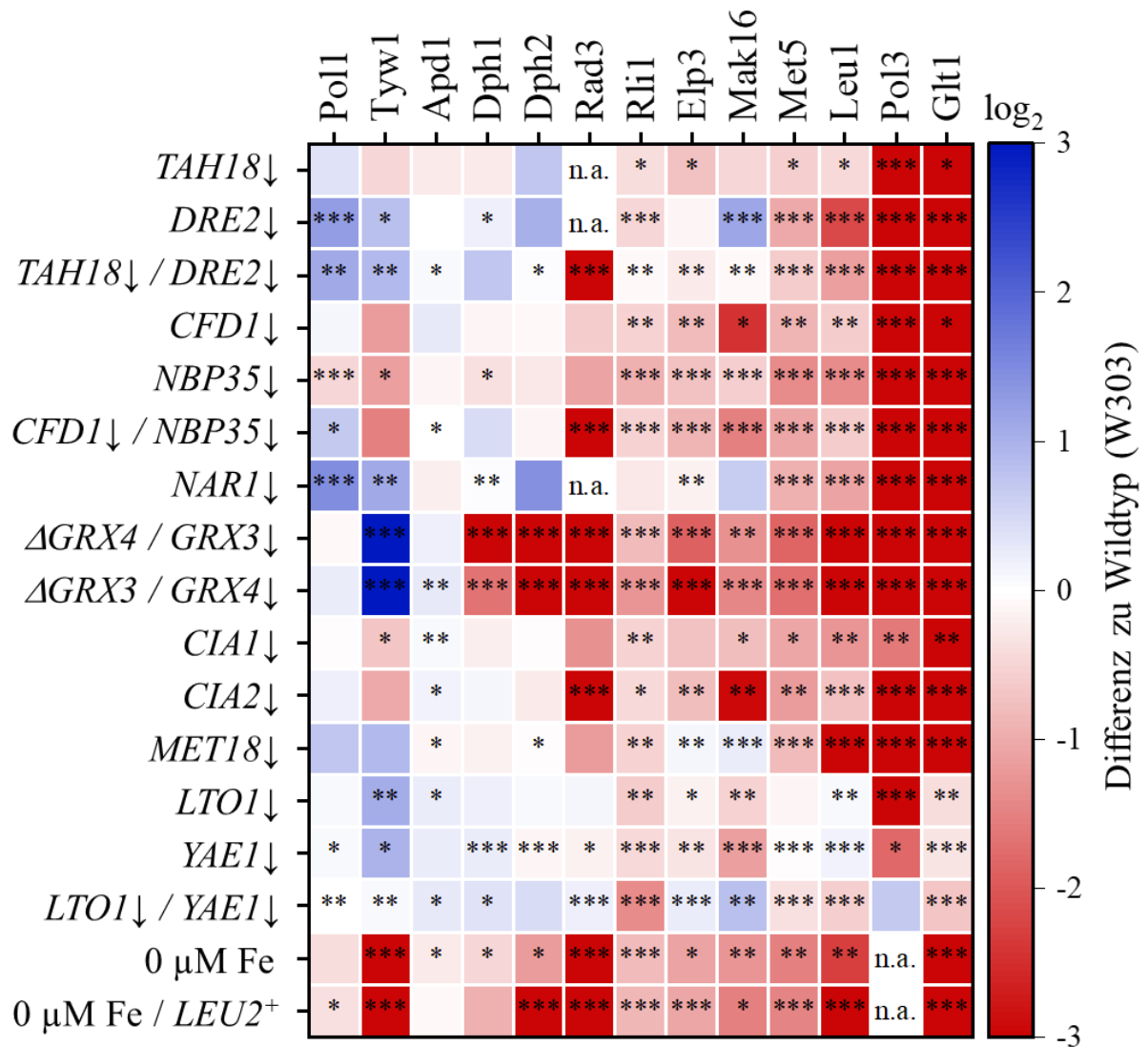


Abbildung 56: Abundanz von zytosolischen und nuklearen Eisen-Schwefel-Proteinen unter verschiedenen Depletionsbedingungen. Gezeigt ist die Veränderung der Mittelwerte der Abundanz von FeS-Proteinen (unten) unter verschiedenen Bedingungen (links) von drei (Experiment 1) oder vier (Experiment 2-5) biologischen Replikaten. Die Signifikanz entspricht den mittels Student's T-Test errechneten q-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.05, 0.01, 0.001 entspricht. Fehlende Messwerte für W303 sind gekennzeichnet (n.a.) (Rohdaten 51).

Eine Betrachtung der Abundanzen der Eisen-Schwefel-Proteine bei Depletion zeigt, dass die Abundanzen des 2Fe2S-Proteins **Apd1** nicht von der Abundanz der CIA-Maschinerie abhängig ist. Apd1 zeigt eine leicht geringere Abundanz bei Eisendepletion, während die anderen Depletionsbedingungen zu wenig signifikanten Abundanzänderungen führen.

Die Abundanz der anderen Proteine, die alle einen 4Fe4S-Kofaktor besitzen, ist stark von der Depletion der CIA-Proteine und Eisen im Medium betroffen. Dabei zeigen alle Proteine bis auf Pol1 und Tyw1 eine Verringerung der Abundanz.

Pol1 zeigte eine eher gegensätzliche Reaktion auf die Depletion, insbesondere bei starken Depletionsstämmen wie Nar1↓ konnte eine signifikante Erhöhung der Abundanz festgestellt werden (> 100 % für Dre2↓, Tah18↓/Dre2↓ und Nar1↓).

Die Depletionsstämmen zeigten auch unerwartete Auswirkungen auf die Abundanz von **Tyw1**. Besonders auffällig ist eine stark signifikante Erhöhung der Abundanz um mehr als 800 % bei der Depletion von Grx3 und Grx4, während eine Depletion von Eisen zu einer stark signifikanten Verringerung der Abundanz um mehr als 50 % führt. Dieser Effekt trat nicht bei anderen CIA-Klienten auf und ist einzigartig für das Protein Tyw1.

Dph1 und **Dph2** zeigen vor allem eine Verringerung der Abundanz um mindestens 50 % in Grx3/4-Depletionsstämmen. Dass beide Proteine ähnlich auf die Depletionsbedingungen reagieren liegt könnte auf ihrem Vorkommen als Komplexpartner basieren (Dong *et al.*, 2014).

Rad3 zeigt wie die restlichen 4Fe4S-Proteine eine Abundanzverringern bei der Depletion der meisten CIA-Proteinen (Abnahme zwischen 35 % und 60 % für Cfd1↓ und Cia1↓) und bei der Depletion von Eisen (Abnahme zwischen 50 % und 75 %).

Rli1 zeigt auch eine signifikante Abhängigkeit von CIA-Proteinen (Abnahme um bis zu 50 % für Nbp35↓), Grx3/4- (bis zu 60 % Abnahme) und Eisendepletion (bis zu 45 % Abnahme), wobei die Depletion von Yae1 und Lto1 die stärksten Auswirkungen (mehr als 60 % Abnahme für Lto1↓/Yae1↓) auf Rli1 als Klient im Vergleich zu andere Fe/S-Proteinen zeigt.

Elp3 und **Mak16** zeigen eine geringe Verringerung der Abundanz bei der Depletion von Met18, Yae1 und Lto1 (um bis zu 20 % Abnahme, bzw. 55 % für Elp3 bzw. Mak16). Die Abundanz von Mak16 wird durch die Depletion von Dre2 signifikant erhöht (2.2-fach) und durch die Depletion von Tah18 um 30 % verringert. Eine Doppelmutante führt zu einer unveränderten Abundanz von Mak16.

Die Abundanz von **Met5** wird von fast allen Depletionsbedingungen signifikant verringert (Abnahme um bis zu 72 %), wobei die geringste Auswirkung bei der Depletion von Lto1 und Yae1 zu sehen ist.

Die Abundanz von **Leu1**, **Pol3** und **Glt1** ist im Durchschnitt am stärksten durch die Depletion der CIA-Maschinerie verringert, sodass die Abundanz von Leu1, Glt1 und Pol3 durchschnittlich mindestens um eine Größenordnung abnahm. Dabei lagen die Messwerte der Abundanz von Pol3 in den meisten CIA-Depletionsstämmen unterhalb der Nachweisgrenze, welche schätzungsweise um einen Faktor Vier bis 16 von den gemessenen Wildtyp-Abundanzen entfernt lag. Die Abundanz von Pol3 weist aber durch die große Streuung der Messwerte in den eisendepletierten Proben keine signifikante Abhängigkeit von der Eisenverfügbarkeit auf.

Eine detaillierte Darstellung der gemessenen und imputierten LFQ-Werte ist dem Anhang Kapitel 8.4.2 zu entnehmen.

4.6.3 Abundanzen der mitochondrialen FeS-Proteine

Da die Regulation des Eisen-Haushaltes, sowie der Eisen-Schwefel-Proteine ein komplexer Prozess mit verschiedenen Feedback-Schleifen ist, kann eine Depletion von CIA-Faktoren im Zytosol auch eine Auswirkung auf die ISC-Maschinerie in den Mitochondrien haben, wobei in diesem Fall eher von regulatorischen und nicht von stabilitätsbedingten Abundanzänderungen auszugehen ist, da die Eisen-Schwefel-Kofaktoren in den Mitochondrien von der ISC-Maschinerie synthetisiert werden. Die Depletion des verfügbaren Eisens könnte jedoch ähnliche Auswirkungen auf die mitochondrialen wie auf die zytosolischen Eisen-Schwefel-Proteine haben. Aus einer Liste von 30 untersuchten mitochondrialen Fe/S- und ISC-Proteinen wurden 26 durch die Massenspektrometrie detektiert.

Tabelle 59: Abundanzen mitochondrialer ISC- und Fe/S-Proteine im Wildtyp. Gezeigt sind die im Wildtyp massenspektrometrisch detektierbaren mitochondrialen ISC- und Fe/S-Proteine, sowie der Mittelwert der gemessenen Abundanzen (LFQ) und der errechneten Abundanz (Moleküle pro Zelle) basierend auf einer Veröffentlichung (Ho *et al.*, 2018). Die Farben zeigen, ob die gemessene Abundanz unter der Nachweisgrenze liegt (rot), in einigen Replikaten über der Nachweisgrenze (gelb) oder in einem Großteil der Replikate über der Nachweisgrenze liegt (grün). Manche Proteine sind in fast keinem Wildtypreplikate nachweisbar (*n.a.*).

Proteinbezeichnung	LFQ-Wert Wildtyp	Geschätzte Abundanz im Wildtyp [Moleküle/Zelle]
Bol3	<i>n.a.</i>	1951 ± 1583
Exo5	<i>n.a.</i>	1680 ± 747
Yah1	<i>n.a.</i>	3358 ± 2617
Yfh1	<i>n.a.</i>	2716 ± 966
Aim32	24.5	1164 ± 782
Iba57	24.9	995 ± 709
Isa1	25.0	1070 ± 945
Ssq1	26.3	3335 ± 1014
Atm1	26.4	2092 ± 820
Bol1	26.6	3455 ± 2575
Lip5	26.8	3986 ± 289
Jac1	26.8	2464 ± 605
Arh1	26.9	1945 ± 1133

Bio2	27.2	4780 ± 1420
Isa2	27.2	2544 ± 1114
Isu2	27.6	4167 ± 2065
Isu1	28.0	5477 ± 4183
Nfs1	28.4	7365 ± 3434
Cir2	28.6	3898 ± 1439
Nfu1	28.7	7392 ± 2061
Sdh2	29.6	5512 ± 2231
Isd11	29.6	5996 ± 2990
Lys4	29.8	8761 ± 2934
Aco2	30.1	11638 ± 5060
Grx5	30.2	4976 ± 1740
Mge1	30.3	10216 ± 6150
Rip1	30.9	7801 ± 3754
Aco1	31.3	43808 ± 22386
Acp1	31.3	19522 ± 5366
Ilv3	31.5	41540 ± 24019

Ähnlich den Werten zu den zytosolischen und nuklearen Eisen-Schwefel-Proteinen wurden auch bei manchen mitochondrialen Proteinen Werte nahe der Nachweisgrenze gemessen (siehe Tabelle 59).

Die Depletion von Eisen zeigte die stärkste Auswirkung auf mitochondriale Eisen-Schwefel-Proteine. Auch die Depletion von Grx3 und Grx4 führt, wahrscheinlich über die Beeinträchtigung der Eisenhomöostase, zu ähnlichen Auswirkungen auf die Abundanz der mitochondrialen Eisen-Schwefel-Proteine. Zu erkennen ist der große Unterschied zwischen der Depletion von Grx3/4 und Eisen im Vergleich zur Depletion der restlichen CIA-Maschinerie, da die letztere eine deutlich geringere Auswirkung zeigt. Zur besseren Übersicht wurden die untersuchten mitochondrialen Proteine in drei Gruppen unterteilt (siehe Abbildung 57).

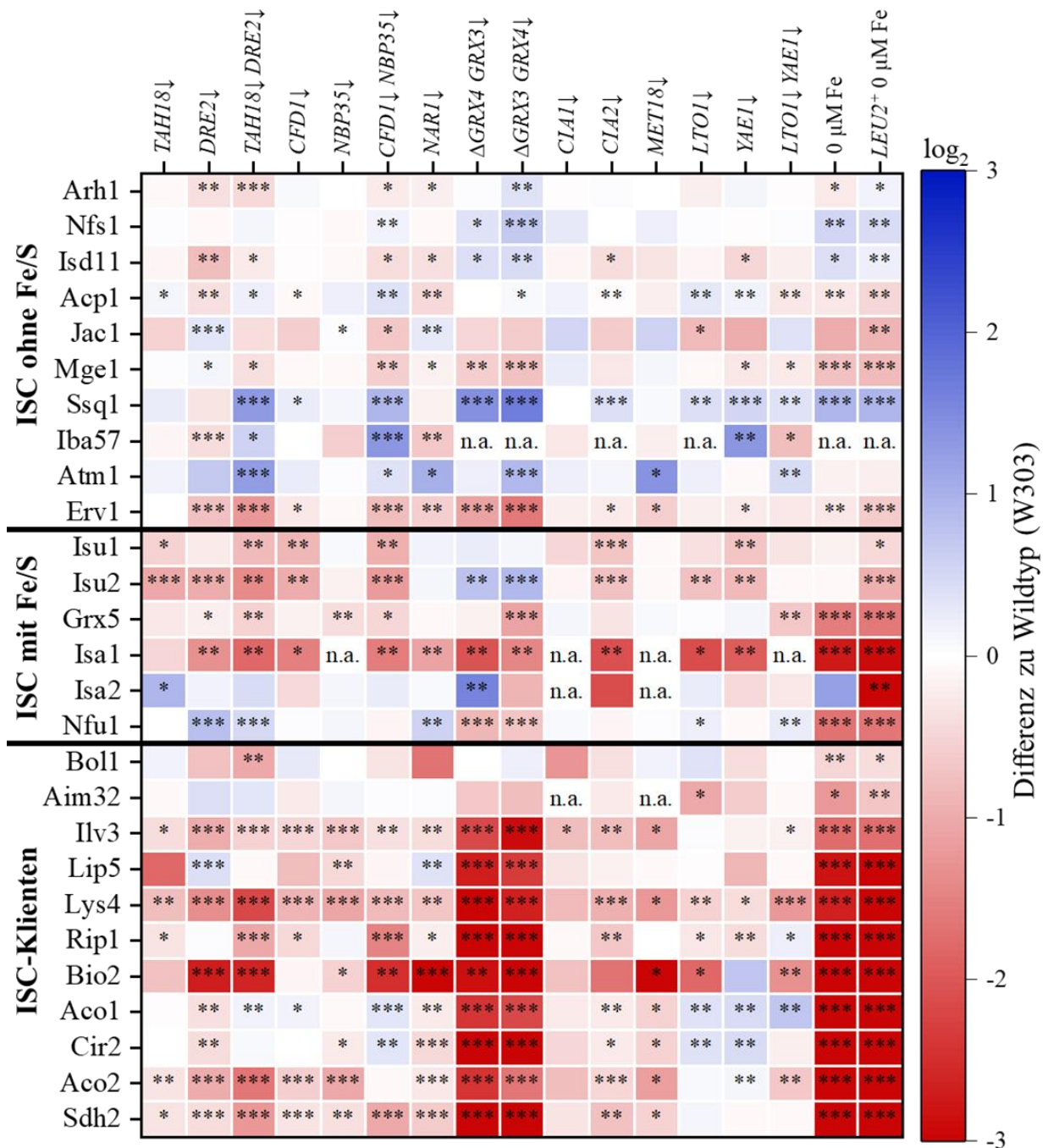


Abbildung 57: Abundanz von mitochondrialen Eisen-Schwefel- und ISC-Proteinen im Vergleich zum Wildtyp. Gezeigt sind Differenzwerte der mittleren LFQ-Intensität von Depletionsstämmen und des im selben Experiment gemessenen Wildtyps. Dabei wurden biologische Replikate (n = 3 oder 4) verwendet. Alle per Massenspektrometrie messbaren Proteine wurden aufgetragen, wobei bei fehlenden Messwerten Werte aus einer Standardverteilung imputiert wurden, solange in mindestens einem Stamm mindestens 3 Werte gemessen wurden. Die Signifikanz entspricht den mittels Students T-Test errechneten q-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.05, 0.01, 0.001 entspricht. Fehlende Messwerte für W303 sind gekennzeichnet (n.a.) (Rohdaten 45).

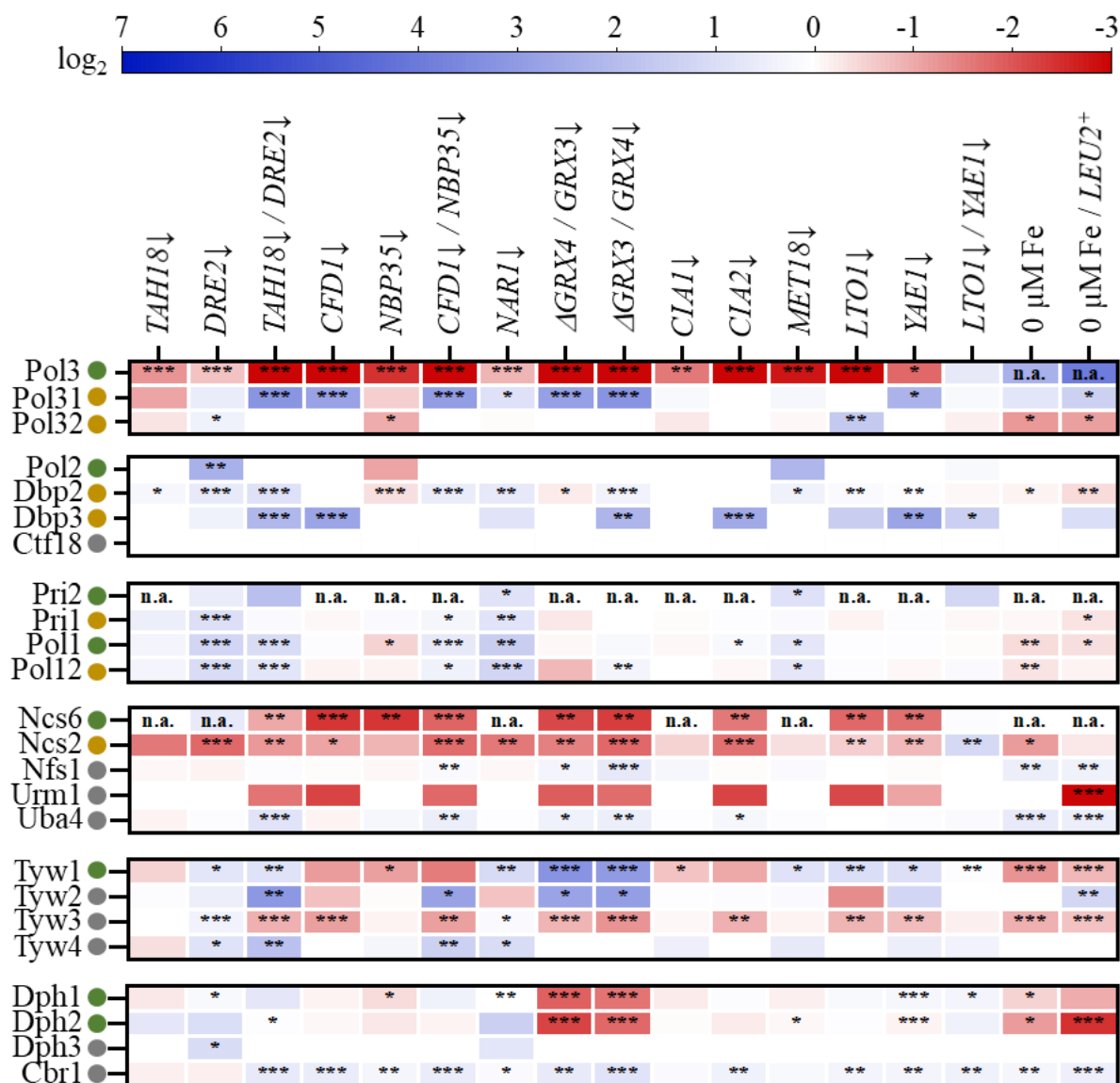
Die Abundanzen der **ISC-Proteine ohne Fe/S-Kofaktor** zeigen die geringste Abundanzänderung der drei Gruppen. Es sind sowohl erhöhte, als auch verringerte Abundanzen als Reaktion auf die CIA- und Eisendepletion feststellbar. Dabei sticht insbesondere Ssq1 mit seiner signifikant erhöhten, und Erv1 mit seiner signifikant verringerten Abundanz bei den meisten Bedingungen hervor. Möglicherweise spielen hier regulatorische Effekte die größte Rolle.

Die Abundanzen der **ISC-Proteine mit Fe/S-Kofaktor** zeigen eine homogenere Reaktion auf die CIA- und Eisendepletion. Insbesondere die Eisendepletion führt zu einer signifikanten Verringerung der Abundanz der untersuchten Proteine. Auch in den meisten anderen Depletionsbedingungen ist eine, wenn auch geringere, Abundanzverringern zu beobachten. Einen Ausreißer stellt hierbei Isu2 dar, es zeigt erhöhte Abundanz bei der Depletion von Grx3 und Grx4.

Die Abundanzen der restlichen **mitochondrialen Fe/S-Proteine** werden stark durch die Verfügbarkeit von Eisen und Grx3/4 beeinflusst. Eine Depletion führt zu einer signifikant verringerten Abundanz bei nahezu allen Fe/S-Klienten. Der Effekt ist mindestens genauso stark ausgeprägt wie die Auswirkungen von Eisen- und Grx3/4-Depletion auf zytosolische und nukleare Fe/S-Proteine. Die Depletion der restlichen CIA-Proteine zeigt eine deutlich geringere Auswirkung auf die Abundanzen der mitochondrialen Fe/S-Klienten. Dennoch ist auch hier in den meisten Fällen eine Verringerung der Klientenabundanz zu beobachten. Am stärksten wirkt sich dieser Effekt auf die Abundanz von Ilv3, Lys4, Bio2, Aco2 und Sdh2 aus. Außerdem ist zu beobachten, dass die Depletion der früheren CIA-Faktoren, insbesondere Dre2 und Nar1, die Abundanz stärker beeinflusst als die Depletion des CIA-targeting-Complex. Eine Kommunikation zwischen Zytosol (frühe CIA) und Mitochondrium (ISC) erscheint möglich.

4.6.4 Abundanzänderungen der näheren Umgebung von Fe/S-Proteinen

Nicht nur die Fe/S-Proteine selbst, sondern auch Komplexpartner und andere am selben Stoffwechselweg beteiligte Proteine können durch die Depletion der CIA-Proteine beeinflusst werden. Eine mögliche Konsequenz ist eine Destabilisierung von direkten Komplexpartnern, was sich deutlich bei den Proteinen Ncs6 und Ncs2, sowie Met5 und Met10 zeigt. Andere Proteine welche eine Ko-Destabilisierung der nächsten Komplexpartner zeigen sind Dph1 und Dph2, Rad3 und Tfb5, Mak16 und Rrp1, sowie Elp3 und Elp1.



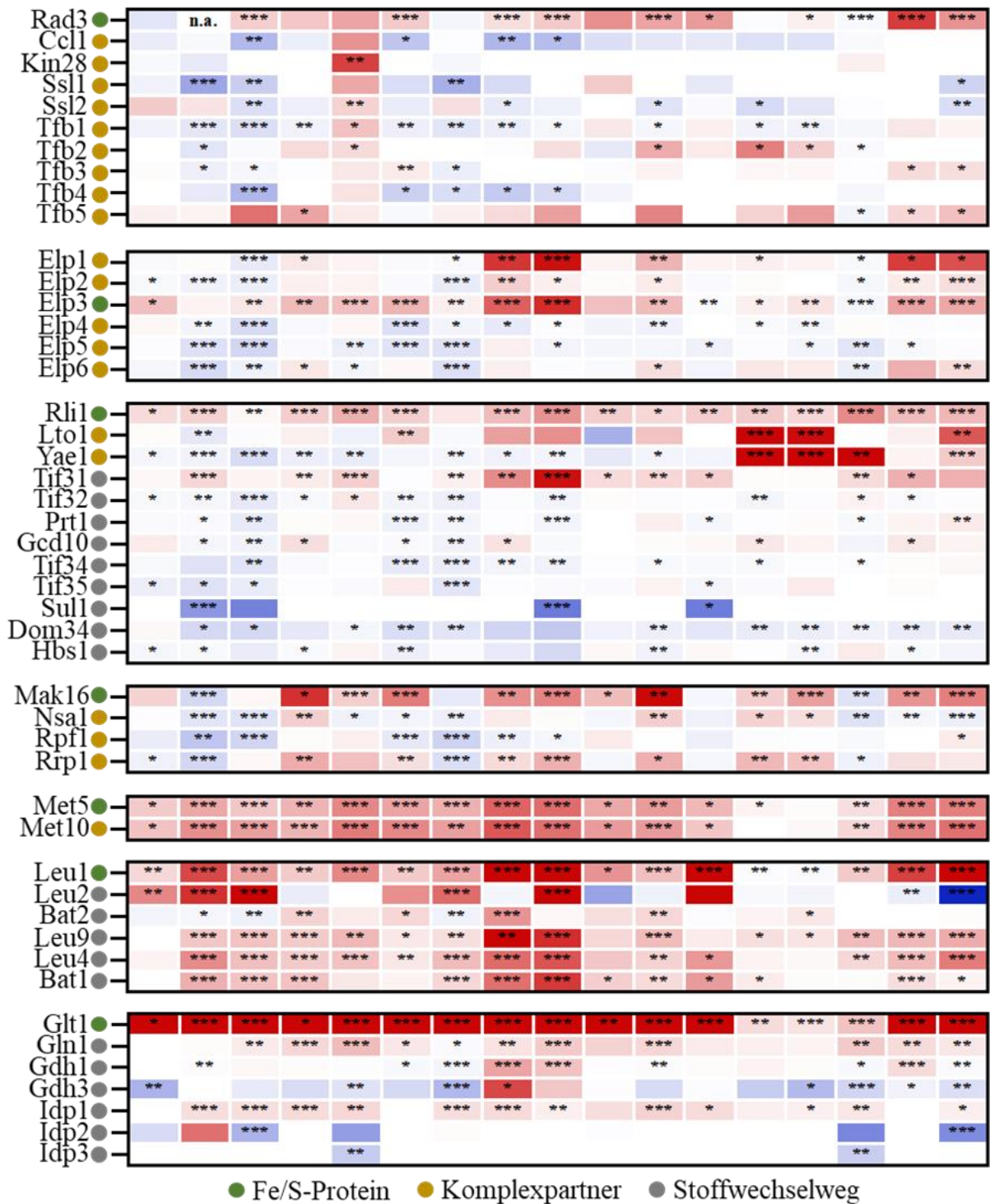


Abbildung 58: Änderungen der Abundanz von Komplexpartnern und Proteinen desselben Stoffwechselweges der zytosolischen FeS-Proteine. Gezeigt sind die Änderungen der Abundanzen der Proteine im Vergleich zum Wildtyp, wobei die Proteine nach Interaktionen gruppiert sind. Dabei markiert ein grüner Kreis die FeS-Proteine, ein gelber Kreis markiert direkte Interaktionen, vor allem in Form von Komplexbildung und ein grauer Kreis markiert Proteine desselben Stoffwechselweges. Die Signifikanz entspricht den mittels Students T-Test errechneten q-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.05, 0.01, 0.001 entspricht (Rohdaten 61).

4.6.5 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Grx3 $\downarrow$ - und Grx4 $\downarrow$ -Proteome

Die Unterschiede zwischen den Paralogen Grx3 und Grx4 sind zum jetzigen Stand der Forschung ungeklärt. Daher sollen im folgenden die Auswirkungen der Depletion von Grx3 oder Grx4 auf das Proteom der Zelle näher untersucht und verglichen werden.

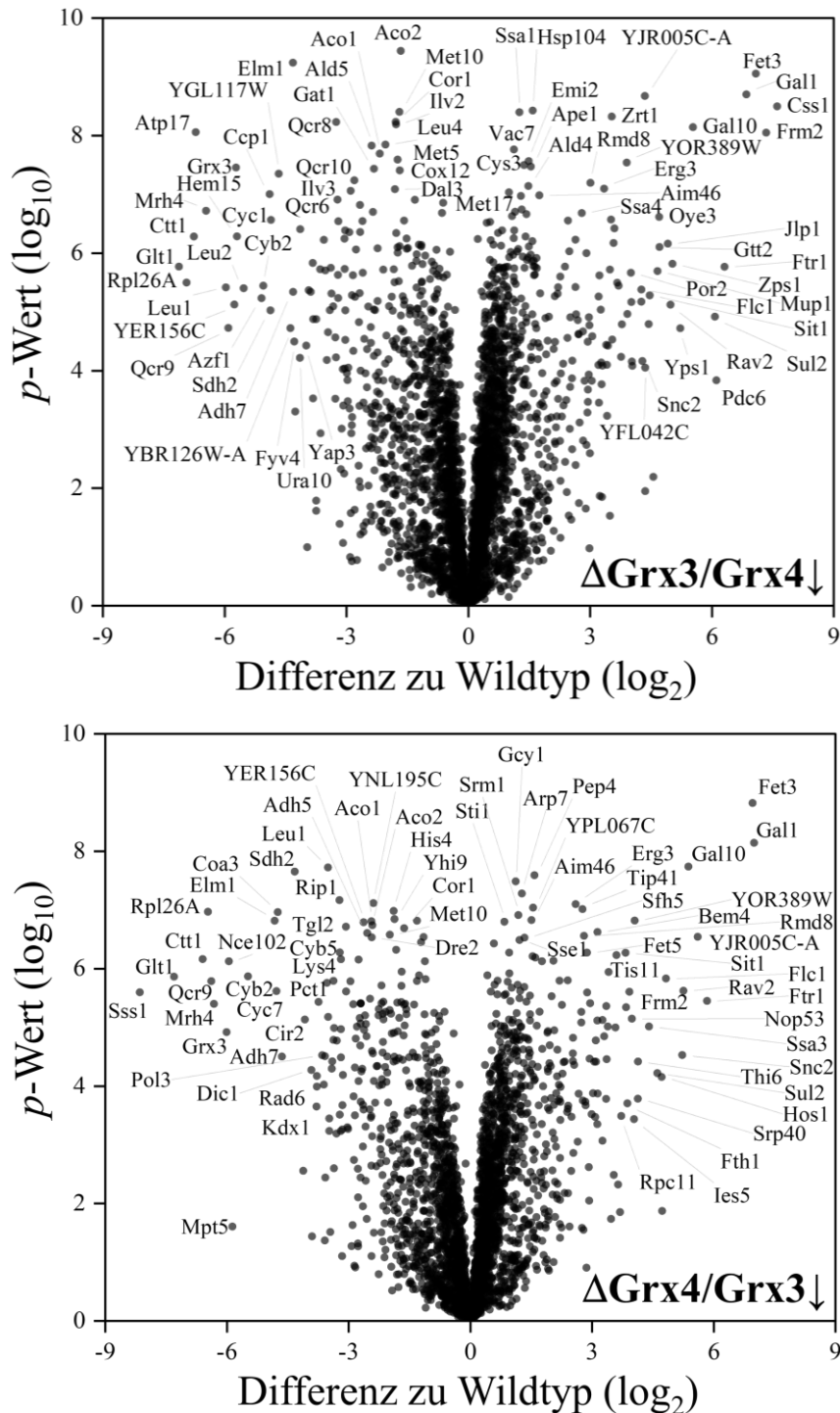


Abbildung 59: Volcano Plot der Grx3/4-Depletionsstämme. Gezeigt sind zwei Volcano Plots der gemessenen Proteome des Δ Grx3/GalL-Grx4-Stammes (oben), bzw. Δ Grx4/GalL-Grx3-Stammes (unten) im Mittelwert (n = 4) (Rohdaten 74).

Grx3 und Grx4 sind durch Genduplikation entstandene Proteine, welche eine bisher nicht vollständig geklärte Rolle in der zytosolischen Fe/S-Biogenese spielen. Während die DNA der meisten anderen Organismen nur eine Kopie dieses Proteins kodiert, deutet die Konservierung der beiden Paraloge in Hefe auf eine funktionelle Differenzierung der beiden Proteine hin. Trotzdem sind die Proteine so ähnlich, dass eine Depletion oder Deletion von nur einem der Beiden einen unveränderten Phänotyp der Zellen zeigt.

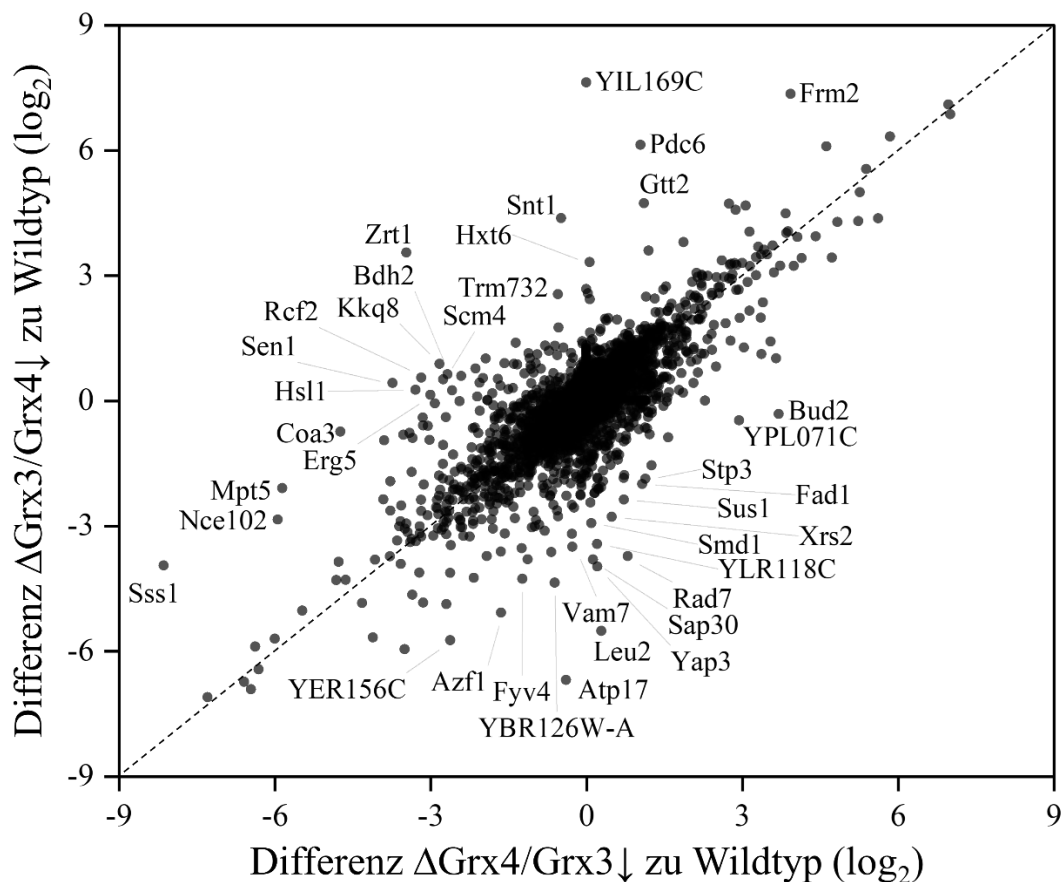


Abbildung 60: Unterschiede von Grx3↓ und Grx4↓. Gegeneinander aufgetragen wurde die Differenz der Proteinabundanzen von zwei Depletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp ($n = 4$). Die 37 Proteine mit der höchsten Differenz zwischen den beiden Depletionsstämmen wurden in der Grafik benannt (Rohdaten 74).

Ein Vergleich der Volcano Plots der gemessenen Proteome beider Stämme zeigt Ähnlichkeiten und Differenzen (siehe Abbildung 59). In beiden Hefedepletionsstämmen erhöht sich die Abundanz von Lso1, Fet3, Fet5 und Ftr1 welche bei Eisenmangel vermehrt exprimiert werden. Das möglicherweise an der Kupferhomöostase beteiligte YOR389W weist auch in beiden Stämmen eine erhöhte Abundanz auf. Desweiteren verringert sich in beiden Hefestämmen die Abundanz der zytosolischen und mitochondrialen Fe/S-Proteine, beispielsweise: Glt1, Leu1, Aco1, Aco2, Sdh2 und Ilv3. Proteine, welche an der ETC beteiligt sind, zum Beispiel Qcr9, Qcr6 zeigen auch eine verringerte Abundanz in beiden Stämmen, wie auch Cyb2, Ctt1 und die Alkohol-Dehydrogenasen Adh5 und Adh7.

Eine Auftragung der Differenzen beider Proteome zum Wildtyp erlaubt eine Betrachtung der Unterschiede zwischen den Stämmen (siehe Abbildung 60). Proteine, welche stark von einer Diagonalen abweichen, zeigen unterschiedliche Abundanzänderungen in beiden Stämmen. Die 20 größten Unterschiede (Faktor > 10) zwischen den Stämmen zeigen die Proteine YIL169C (Css1), Zrt1 (Zinktransporter), Atp17 (ATP-Synthase), Leu2 (Leucinsynthese), Pdc6 (Pyruvat-Decarboxylase), Snt1 (Histon-Deacetylase), Rad7 (NER), Yap3 (Transkriptionsfaktor), Sss1 (ER-Transporter), Sen1 (Helikase), Bud2 (Zellteilung), Coa3 (Cytochrom c-Oxidase Assemblierung), Sap30 (Histon-Deacetylase-Komplex), YBR126W-A (Meo1), Mpt5 (Glutamat-Biosynthese), Rcf2 (Cytochrom c-Oxidase Untereinheit), Kkq8 (Protein-Kinase), YLR118C (Acyl-Protein-Thioesterase), Gtt2 (Glutathion-Transferase) und Hsl1 (Protein-Kinase, Zellteilung). Auffällig ist, dass keine Fe/S- oder Fe/Cu-Homöostase-Proteine unter diesen, in beiden Stämmen unterschiedlich abundanten, Proteinen zu finden sind. Das deutet wiederum auf eine hohe Ähnlichkeit der Aufgaben beider Proteine in diesen Bereichen hin. Eine Differenzierung in anderen Funktionen kann aufgrund der Daten allerdings als wahrscheinlich angesehen werden.

4.6.6 Abundanzänderung der eisenhaltigen-Proteine

Zurückliegende Studien konnten einige Proteine der Hefe als eisenhaltig klassifizieren (siehe Einleitung Tabelle 1). Eine Betrachtung der eisenhaltigen **zytosolischen** und **nukleären** Proteine zeigt eine starke Abhängigkeit der Abundanz dieser Proteine von Eisen im Medium (siehe Abbildung 61). Dabei zeigt eine Mehrheit der eisenhaltigen Proteine eine verringerte Abundanz als Reaktion auf die verringerte Eisenverfügbarkeit. Einige Proteine zeigen allerdings einen gegenteiligen Effekt, vermutlich durch regulatorische Effekte bedingt.

Die Betrachtung der eisenhaltigen Proteine im **ER** und der **Vakuole** zeigen ein gespaltenes Bild (siehe Abbildung 62). Während eine Hälfte mit einer signifikant verringerten Abundanz auf die Depletion von Eisen reagiert, zeigt die andere Hälfte eine signifikant erhöhte Abundanz. Wieder zeigt eine Grx3/4-Depletion ein ähnliches Bild wie eine Eisendepletion. Die Proteine Erg25 (Fe), Fre8 (Häm) und Fre6 (Häm) konnten nur in manchen Proben nachgewiesen werden. Dabei ist hervorzuheben, dass Fre6, ein in der Vakuole lokalisiertes, an der Eisenhomöostase beteiligtes Protein, durch die Depletion von Grx3/4 eine erhöhte Abundanz aufwies.

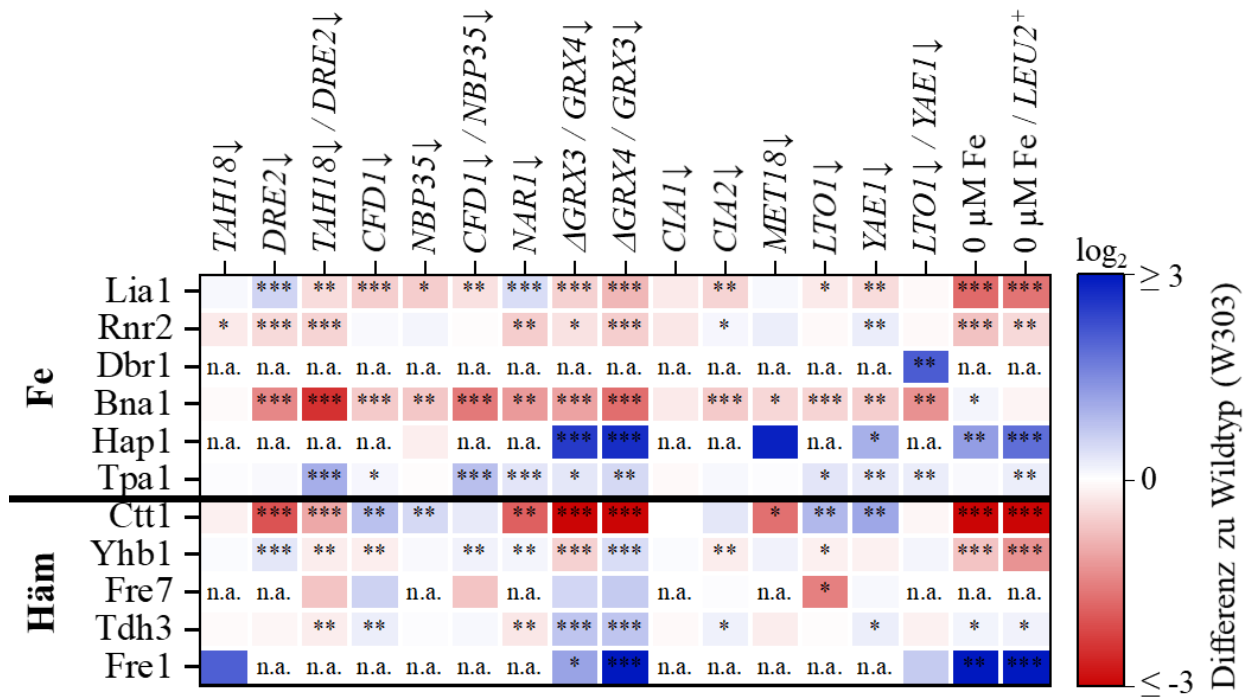


Abbildung 61: Änderung der Abundanz von zytosolischen und nukleären eisenhaltigen nicht-Fe/S Proteinen. Gezeigt sind die Änderungen der Abundanzen der Proteine im Vergleich zum Wildtyp. Die Signifikanz entspricht den mittels Students T-Test errechneten q-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.05, 0.01, 0.001 entspricht (Rohdaten 68).

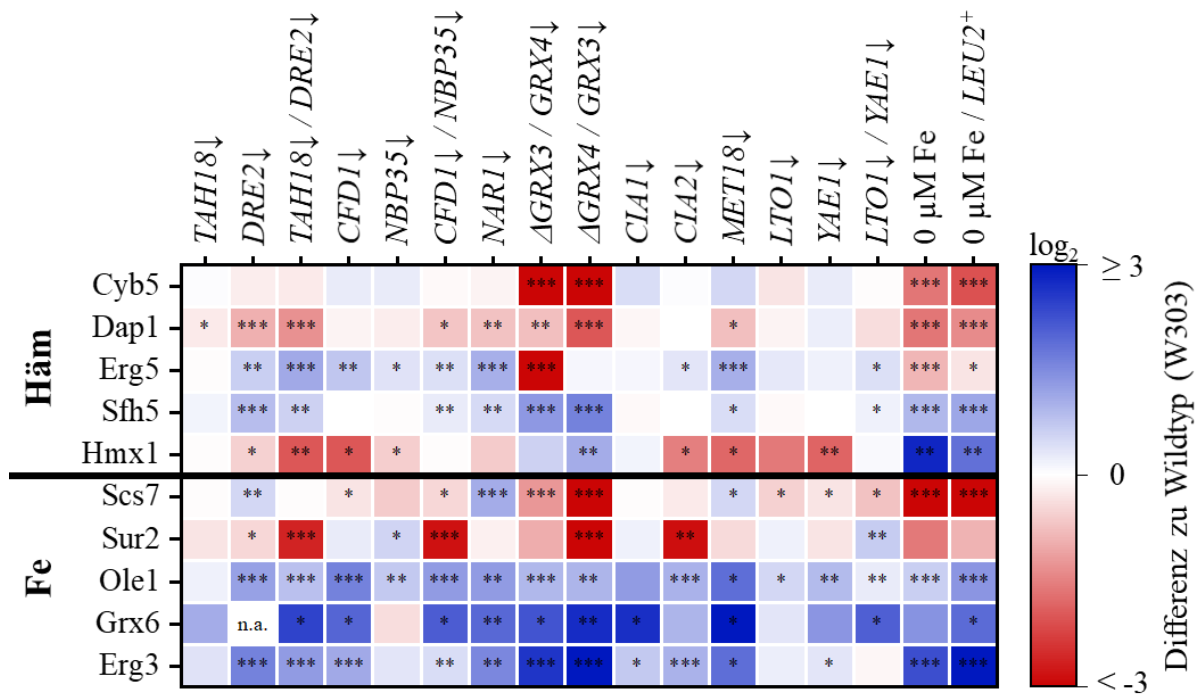


Abbildung 62: Änderung der Abundanz von eisenhaltigen Proteinen im ER und der Vakuole. Gezeigt sind die Änderungen der Abundanzen der Proteine im Vergleich zum Wildtyp. Die Signifikanz entspricht den mittels Students T-Test errechneten q-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.05, 0.01, 0.001 entspricht (Rohdaten 68).

Eine Betrachtung der **mitochondrialen** eisenhaltigen Proteine zeigt eine stärkere Abhängigkeit von Eisen und Grx3/4 als von der CIA-Maschinerie im Vergleich zu zytosolischen und nuklearen Proteinen (siehe Abbildung 63). Fast alle diese Proteine weisen eine signifikant verringerte Abundanz als Reaktion auf Eisen- und Grx3/4-Depletion auf. Die wenigen Proteine, deren Abundanz steigt, sind nahe der Nachweisgrenze mit dadurch möglicherweise nicht aussagekräftigen Werten. Währenddessen führt die Depletion der CIA-Proteine auch zu einer Verringerung der Abundanz, allerdings weniger ausgeprägt. Die einzige Ausnahme bilden die Proteine Thi4 und Fre5. Die Thiazol-Synthase Thi4, welche ein Eisenkation pro Protein bindet, zeigt signifikant erhöhte Abundanz bei Eisendepletion. Die zur Eisenaufnahme wichtige Eisen-Reduktase Fre5, welche einen Häm-Kofaktor ligiert, weist auch eine signifikant erhöhte Abundanz bei Eisendepletion auf. Zusätzlich ist die Abundanz bei Grx4-Depletion signifikant erhöht, bei Grx3-Depletion jedoch nicht. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Differenzierung der Funktion von Grx3 und Grx4. Gezeigt sind diese Daten hier nicht, da für diese beiden Proteine nur bei Eisen-, bzw. Eisen- und Grx3/4-Depletion valide, unimputierte Messwerte beobachtet werden konnten.

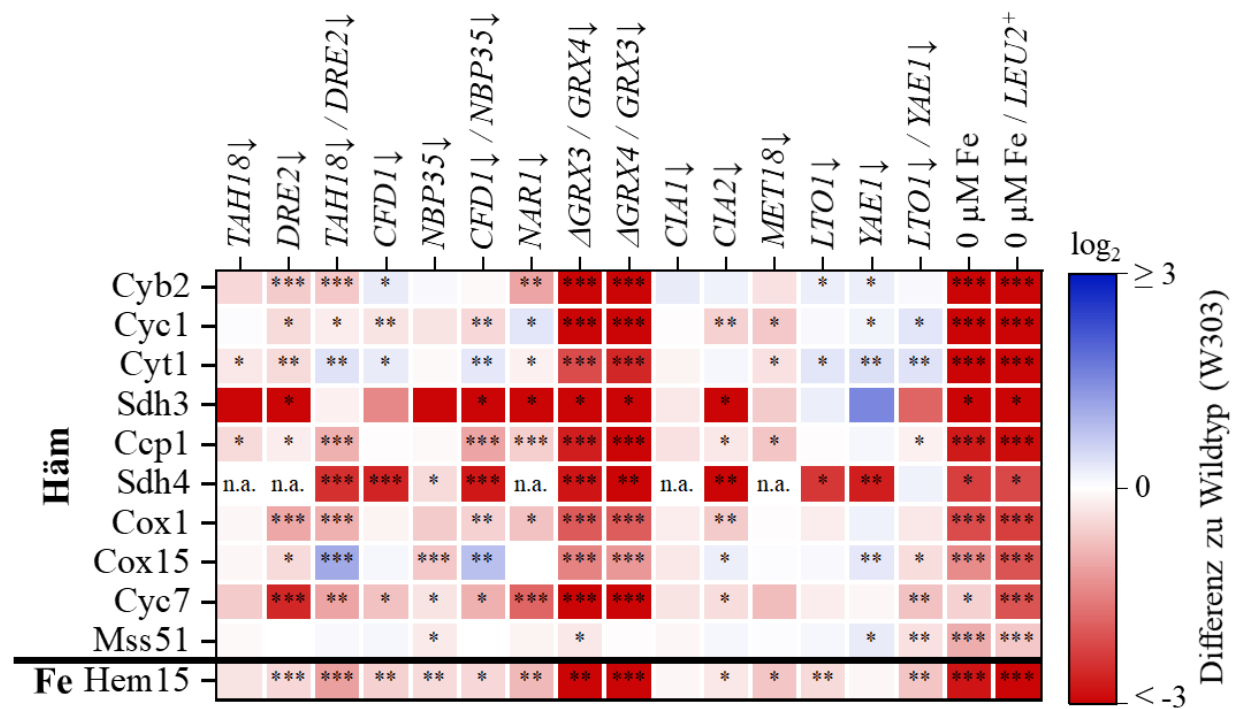


Abbildung 63: Änderung der Abundanz von mitochondrialen eisenhaltigen Proteinen. Gezeigt sind die Änderungen der Abundanzen der Proteine im Vergleich zum Wildtyp. Die Signifikanz entspricht den mittels Students T-Test errechneten q-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.05, 0.01, 0.001 entspricht (Rohdaten 68).

4.6.7 Abundanzänderung der Glykolyse

Die Glykolyse ist ein wichtiger Bestandteil des Energiehaushaltes der Hefe, weshalb eine Auswirkung der CIA-Depletion auf die Abundanz der Glykolyseproteine einen Erklärungsansatz für den Phänotyp der Depletionsmutanten liefern könnte. Während die Depletion der CIA-Proteine eine unterschiedliche Abundanzänderung auslöst gibt es dennoch Gemeinsamkeiten. Die Depletion von Tah18, Dre2 und Nar1 zeigen eine deutlich verringerte Abundanz nahezu aller Proteine der Glykolyse. Die Depletion von Grx3/4 und Eisen zeigt hingegen eine deutliche erhöhte Abundanz der Proteine der Glykolyse. Eine Korrelation mit den Verdopplungszeiten als Marker für den Zustand der Zellen ist hier nicht zu erkennen, wodurch eine Beeinträchtigung der Glykolyse als Ursache für das gehemmte Wachstum unwahrscheinlich erscheint. Die signifikante Depletion von Fba1 kann auch auf „Moonlighting“ hindeuten, wobei Proteine neben ihrer Hauptfunktion weitere Funktion in der Zelle übernehmen. Neben seiner Funktion in der Glykolyse konnten bereits weitere Interaktionen von Fba1 mit der RNA-Polymerase III beobachtet werden (Cieśła *et al.*, 2014). Proteine, welche Pyruvat als Substrat nutzen, wie Pdc1 oder der Pyruvatdehydrogenasekomplex, zeigen keine signifikante Abundanzänderung (siehe Kapitel 4.6.9). Eine genauere Auflistung kann dem Anhang entnommen werden (siehe Abbildung 122).

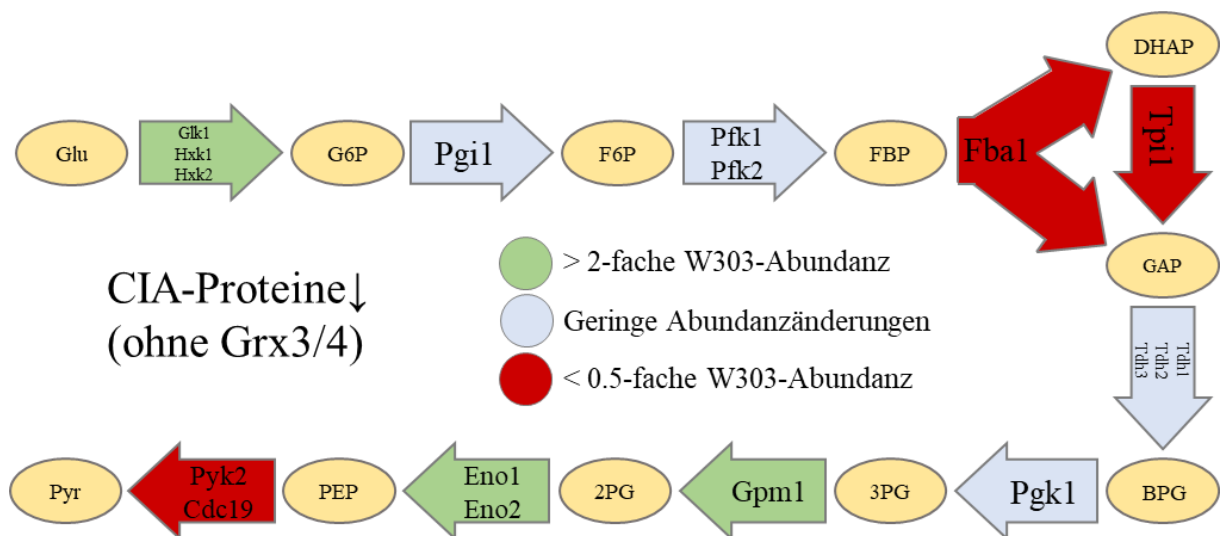


Abbildung 64: Auswirkungen der CIA-Depletion auf den Stoffwechselweg der Glykolyse. Gezeigt ist der Stoffwechselweg der Glykolyse mit den Metaboliten (gelbe Ovale) und den Enzymen, welche die Reaktionen katalysieren (Pfeile). Ein grüner Pfeil zeigt eine Anreicherung dieses Proteins im Mittelwert aller CIA-Depletionsstämme (mit Ausnahme von Grx3/4). Ein roter Pfeil zeigt eine Abnahme der Abundanz im Mittelwert aller CIA-Depletionsstämme (mit Ausnahme von Grx3/4). Alle anderen Glykolyseproteine ändern sich im Mittelwert um weniger als den Faktor 2 (Rohdaten 60).

4.6.8 Abundanzänderung im Citratzyklus

Ein weiterer zentraler Bestandteil des Energiehaushaltes der Zelle ist der Citratzyklus (siehe Abbildung 65). Geringe Änderungen können starke Auswirkungen auf den Wachstumsphänotyp haben.

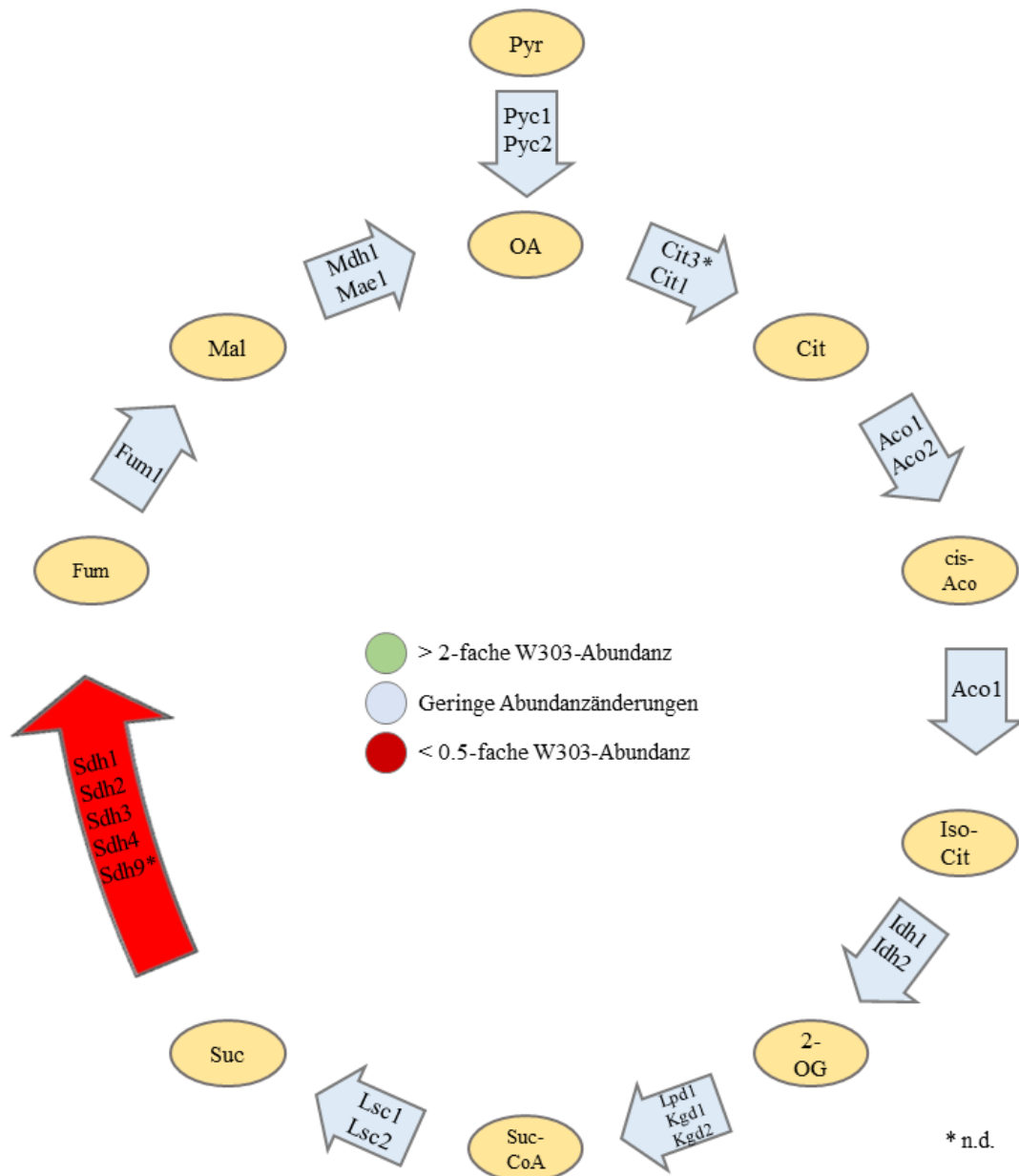


Abbildung 65: Auswirkungen der CIA-Depletion auf den Citratzyklus. Gezeigt ist der Citratzyklus mit den Metaboliten (gelbe Ovale) und den Enzymen, welche die Reaktionen katalysieren (Pfeile). Ein grüner Pfeil zeigt eine Anreicherung dieses Proteins im Mittelwert aller CIA-Depletionsstämme (mit Ausnahme von Grx3/4↓). Ein roter Pfeil zeigt eine Abnahme der Abundanz im Mittelwert aller CIA-Depletionsstämme (mit Ausnahme von Grx3/4↓). Alle anderen Citratzyklusproteine ändern sich im Mittelwert um weniger als den Faktor 2 (Rohdaten 62).

Die Abundanz der Proteine Sdh3 und Sdh4 ist um durchschnittlich 72%, bzw. 58% verringert, während die anderen Proteine dieses Komplexes auch eine signifikante Verringerung der Abundanz aufweisen. Genauere Abundanzen bei verschiedenen Depletionsbedingungen können dem Anhang entnommen (siehe Abbildung 123) werden. Komplex 2 beinhaltet neben Fe/S-Clustern auch Flavin-Kofaktoren, weshalb eine Betrachtung der Abundanzen von deren Biosynthese weitere Einblicke liefern kann. Desweiteren zeigen die Enzyme, welche α -Ketoglutarat, welches in der Glutamatbiosynthese verwendet wird, synthetisieren und verwenden eine geringe Abundanzserhöhung.

4.6.9 Abundanzänderung der Pyruvatdehydrogenase

Die Proteine des Pyruvatdehydrogenasekomplexes (PDC) synthetisieren das für den Citratzyklus benötigte Acetyl-CoA, zeigen aber nur leichte Abundanzänderung durch die Depletion der CIA-Proteine. Eine genauere Auflistung der Abundanzen ist im Anhang zu finden (siehe Abbildung 125).

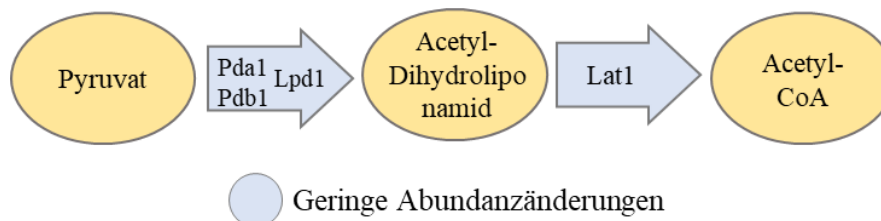


Abbildung 66: Auswirkungen der CIA-Depletion auf die Pyruvatdehydrogenase. Gezeigt ist die durch den Pyruvatdehydrogenasekomplex katalysierte Reaktion. Dabei ist keine Abundanzänderungen um mehr als den Faktor 2 erkennbar (Rohdaten 64).

4.6.10 Abundanzänderung der Atmungskette

Wie bereits im Citratzyklus zu beobachten, ist die Abundanz des Komplex 2 stark verringert, weshalb Auswirkungen auf die Atmungskette möglich erscheinen. Neben der bereits beobachteten Abnahme der Proteine aus Komplex 2 zeigt nur ein weiteres Protein der Atmungskette stark verringerte Abundanz (Qcr9), welches allerdings wahrscheinlich auf Messwerte nahe der Nachweisgrenze zurückzuführen ist (siehe Abbildung 67). Im Vergleich hierzu führt eine Depletion von Grx3/4 oder Eisen zu einer signifikanten Abundanzverringerung über die gesamte Atmungskette hinweg. Eine genauere Auflistung findet sich im Anhang (siehe Abbildung 124).

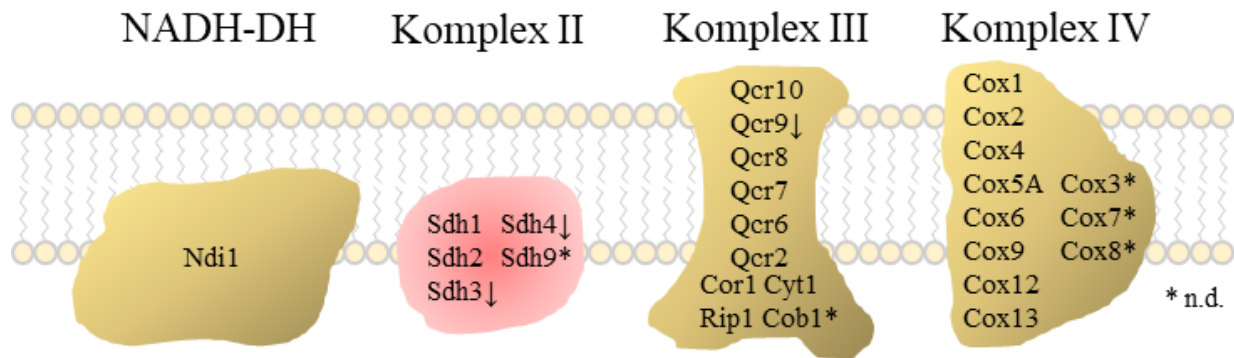


Abbildung 67: Auswirkungen der CIA-Depletion auf die Atmungskette. Gezeigt ist die Atmungskette mit den Proteinen, welche die Komplexe bilden. Ein Pfeil nach unten zeigt eine Abnahme der Abundanz im Mittelwert aller CIA-Depletionsstämme (mit Ausnahme von Grx3/4↓) um mehr als den Faktor 2. Alle anderen Proteine der Atmungskette ändern sich im Mittelwert um weniger als den Faktor 2 oder sind nicht nachweisbar (*) (Rohdaten 63).

4.6.11 Abundanzänderung der Gärung

Die Gärung in der Hefe wird extensiv zur Bereitstellung von Energie unter anaeroben Bedingungen verwendet. Während Adh5 eine deutliche Abundanzverringering bei allen CIA-Mutanten zeigt (um mehr als 63%), ist die Erhöhung der Abundanz von Adh4 (bis zu 8-fach) durch starke Schwankungen innerhalb der Messreihen weniger signifikant. Die Abundanz der Proteine, welche Pyruvat als Substrat nutzen steigt bei CIA-Depletion auch deutlich (8-fach für Pdc6, bzw. 2-fach für Pdc5) (siehe Abbildung 68). Genauere Abundanzwerte und Signifikanzen können dem Anhang entnommen werden (siehe Abbildung 125).

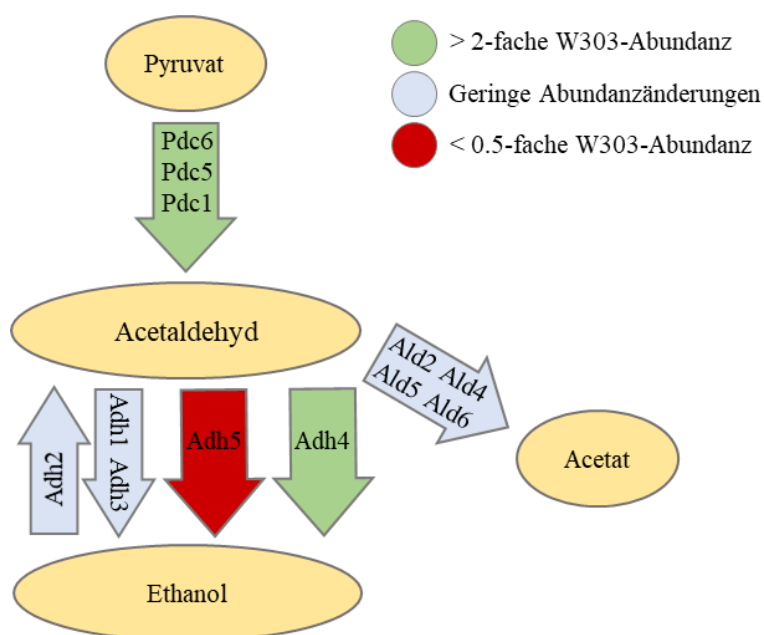


Abbildung 68: Auswirkungen der CIA-Depletion auf die Gärung. Gezeigt sind Prozesse der Glukosefermentation und die daran beteiligten Proteine. Ein roter Pfeil nach unten zeigt eine

Abnahme der Abundanz im Mittelwert aller CIA-Depletionsstämme (mit Ausnahme von Grx3/4↓) um mehr als den Faktor 2, ein grüner Pfeil zeigt eine Zunahme. Alle anderen gezeigten Proteine ändern sich im Mittelwert um weniger als den Faktor 2 (Rohdaten 64).

4.6.12 Abundanzänderung des Pentosephosphatweges

Eine weitere Möglichkeit um Energie und NADPH aus Glukose zu gewinnen ist der Pentosephosphatweg. Hierbei zeigen sich keine signifikante Veränderungen durch die Depletion der CIA-Proteine (siehe Abbildung 69). Genauere Abundanzänderungen sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Abbildung 126).

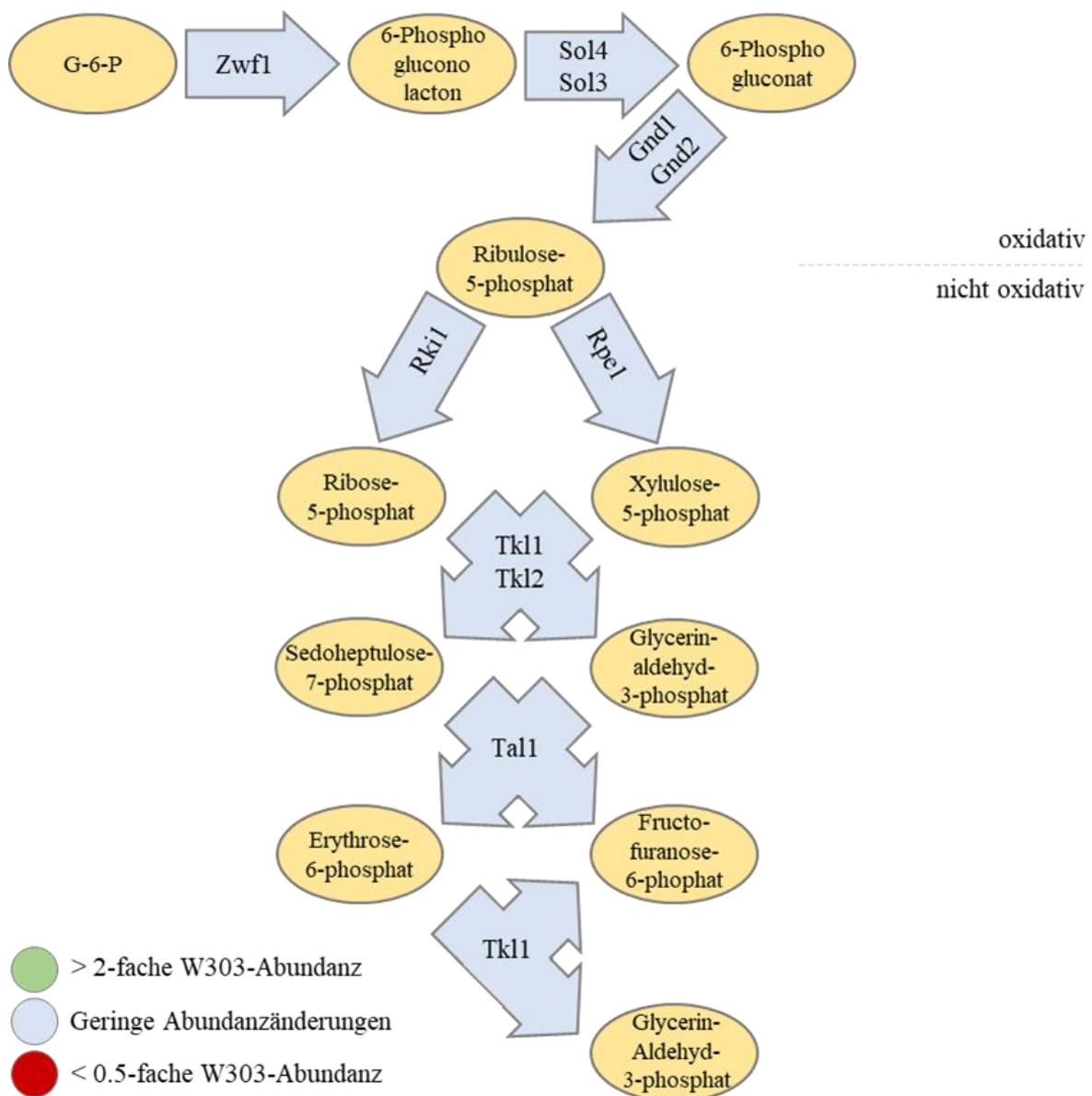


Abbildung 69: Auswirkungen der CIA-Depletion auf den Pentosephosphatweg. Gezeigt ist der Pentosephosphatweg. Die Abundanzen der beteiligten Proteine ändern sich im Mittelwert (mit Ausnahme von Grx3/4↓) um weniger als den Faktor 2 (Rohdaten 65).

4.6.13 Abundanzänderung der THF-Biosynthese und -Wiederverwertung

Die Betrachtung der THF-Biosynthese und des „Glycin-cleavage“-Systems zeigen eine maximale Abundanzänderung von 25% (siehe Abbildung 70). Genauere Abundanzwerte sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Abbildung 127).

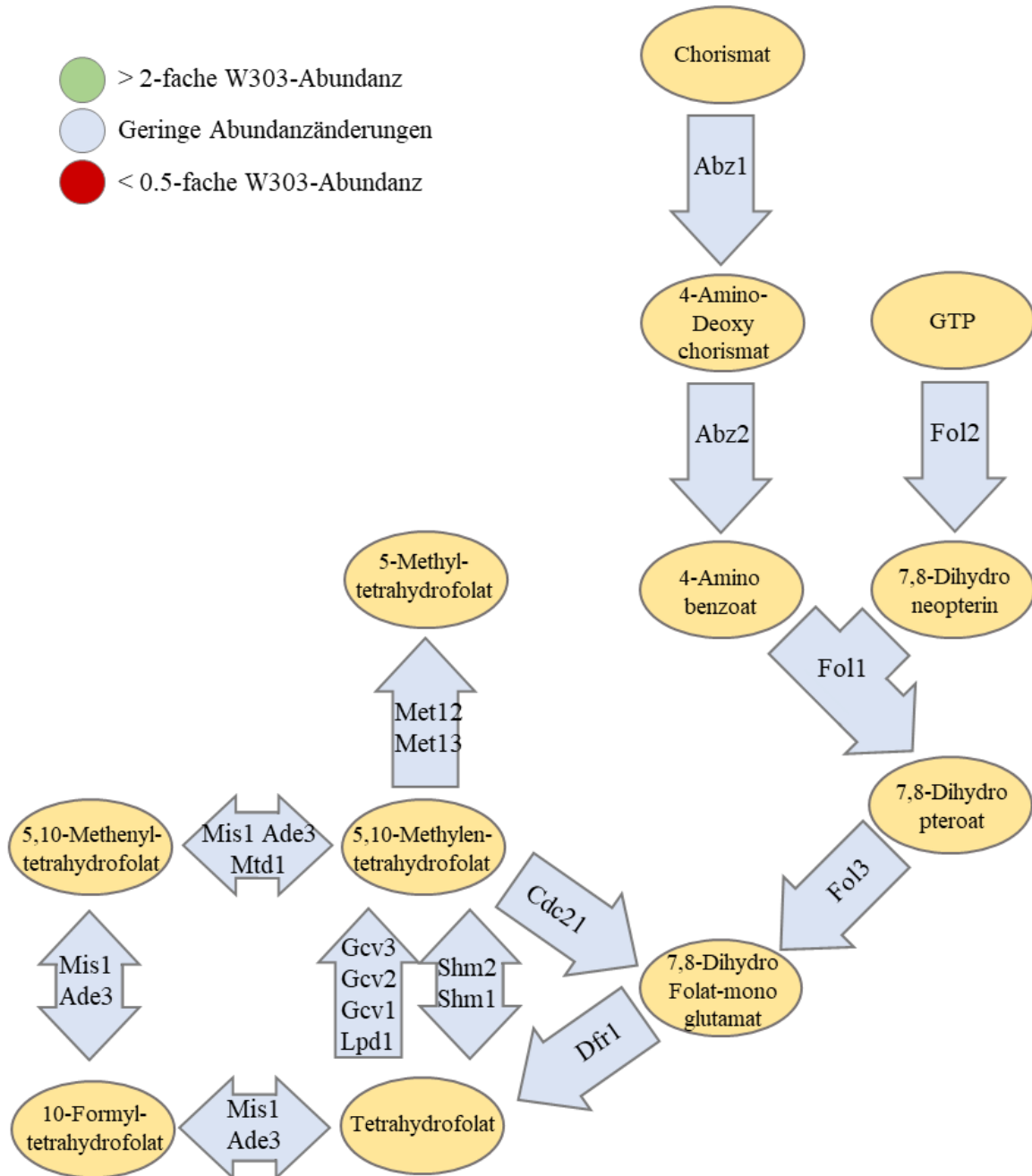


Abbildung 70: Auswirkungen der CIA-Depletion auf die THF-Biosynthese und Wiederverwertung. Gezeigt sind Prozesse der THF-Biosynthese und der daran beteiligten Proteine. Die Abundanzen der beteiligten Proteine ändern sich im Mittelwert (mit Ausnahme von Grx3/4↓) um weniger als den Faktor 2 (Rohdaten 66).

4.6.14 Abundanzänderungen der Flavoproteine und deren Synthese

Sdh1 besitzt zwar kein Eisen-Schwefel-Cluster, allerdings ist es in einem Komplex mit Sdh2 aufzufinden, welches ein Eisen-Schwefel-Protein ist. Sdh2 zeigt keine Abhängigkeit von der CIA-Maschinerie, allerdings eine starke Abhängigkeit von Eisen, wie zu erwarten für ein mitochondriales Eisen-Schwefel-Protein. Sdh1 benötigt Sdh5 zur Assemblierung (Hao *et al.*, 2009), welches auch keine Abhängigkeit von den untersuchten Depletionsbedingungen zeigt. Die anderen beiden Komplexpartner des Heterotetramers Sdh3 und Sdh4 (Kim & Winge, 2013) zeigen eine Abhängigkeit von den Depletionsbedingungen ähnlich wie sie Sdh1 zeigt, allerdings sind die Daten nah am Detektionslimit, weshalb sie nicht als signifikant erachtet werden können. Auffällig ist die erhöhte Abundanz von FAD/FMN-haltigen Proteinen, weshalb im Folgenden alle Flavoproteine in Abbildung 72, sowie die Biosynthese von Riboflavin Abbildung 71 genauer betrachtet wurde. Flavoproteine lassen sich in verschiedene Gruppen unterteilen. Die größte Gruppe beinhaltet die Eisen- und Kupfer-Reduktasen (*FRE1-8*, *AIM14*) (Gudipati *et al.*, 2014). Diese werden zum Großteil durch eine Depletion von Eisen und Grx3/4 stark induziert, um die negativen Folgen eines Eisenmangels zu beheben. Das Kupferregulierte Fre7 zeigt keine auffällige Abundanzänderung bei Eisendepletion, die Depletion von Grx3/4 führt jedoch zu einer erhöhten Abundanz des Proteins. Das Homolog Aim14 zeigt eine erhöhte Abundanz durch die Depletion einiger früher CIA-Faktoren, allerdings sind manche Messreihen nahe des Detektionslimits für diese Proteine. Laut Literatur sollte die Abundanz beider Proteine nicht von der Eisenabundanz abhängig sein (Georgatsou & Alexandraki, 1999). Die zweitgrößte Flavinprotein-Familie besteht aus vier tRNA-Dihydrouridinsynthasen (*DUS1-4*) (Gudipati *et al.*, 2014). Diese Proteine zeigen keine besondere Abhängigkeit der CIA- oder Eisen-Abundanz. Die Gruppe der flavodoxinartigen Proteine, bestehend aus Pst1 (involviert in der Regulation der Zellintegrität), Rfs1 (unbekannte Funktion) und Ycp4 (involviert in Ferroptose), zeigen unterschiedliche Reaktionen auf die verschiedenen Depletionsbedingungen. Insbesondere Rfs1 zeigt eine verringerte Abundanz bei fast allen Depletionsbedingungen. Das Heterodimer aus Aim45 und Cir1 zeigt keine Veränderung, deren Elektronenakzeptor Cir2 (ein mitochondriales Fe/S-Protein) jedoch zeigt eine stark verringerte Abundanz bei Eisendepletion.

Andere Studien stellen die These auf, dass Apo-Sdh1 ohne den FAD-Kofaktor instabil und degradiert wird (Kim & Winge, 2013). Da Riboflavin als Edukt für die Biosynthese von FAD und FMN im Zytosol gebildet wird (Gudipati *et al.*, 2014), ist es möglich, dass die Anreicherungen der signifikanten Abundanzänderung von FAD- und FMN-konjugierten Proteinen auf die Biosynthese des Kofaktors zurückzuführen ist. Allerdings zeigen diese Proteine keinen signifikanten Trend in ihrer Abundanzänderung. Nur die Proteine Flc1-3, welche FAD in das

ER transportieren, zeigen eine deutliche Erhöhung der Abundanz, welche allerdings durch fehlende Werte in den Messungen nicht als signifikant erachtet werden kann. Die Depletion unterschiedlicher CIA-Proteine zeigt nur geringe Unterschiede der Abundanzänderungen der Flavinbiosynthese. Genauere Daten und Signifikanzen der an der Flavoproteinbiosynthese beteiligten Proteine können dem Anhang entnommen werden (siehe Abbildung 128).

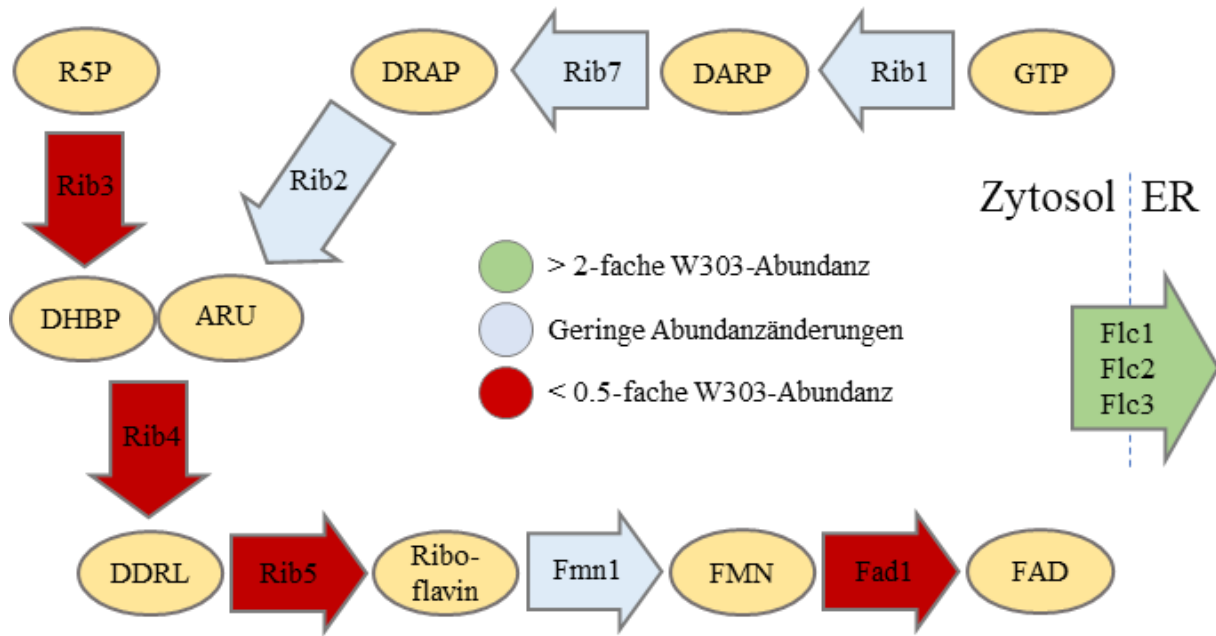


Abbildung 71: Auswirkungen der CIA-Depletion auf die Riboflavin-, FMN- und FAD-Biosynthese. Gezeigt sind Prozesse der Flavobiosynthese und die daran beteiligten Proteine sowie der Intermediate 2,5-Diamino-6-(5-phospho-D-ribosylamino)pyrimidin-4(3H)-on (DARP), 2,5-Diamino-6-(5-phospho-D-ribitylamino)pyrimidin-4-(3H)-on (DRAP), 5-Amino-6-(D-ribitylamino)uracil (ARU), 1-Deoxy-L-glycero-tetrol-4-Phosphat (DHBP) und 6,7-Dimethyl-8-(1-D-ribityl)lumazine (DDRL). Ein roter Pfeil nach zeigt eine Abnahme der Abundanz im Mittelwert aller CIA-Depletionsstämme (mit Ausnahme von Grx3/4↓) um mehr als den Faktor 2, ein grüner Pfeil zeigt eine Zunahme. Alle anderen gezeigten Proteine ändern sich im Mittelwert um weniger als den Faktor 2. Für die Intermediate wurden Abkürzungen verwendet. Die Liste der beteiligten Proteine wurde auf Basis einer Veröffentlichung erstellt (Gudipati *et al.*, 2014). Eine detaillierte Auflistung der Proteinabundanzen kann dem Anhang entnommen werden (Rohdaten 55).

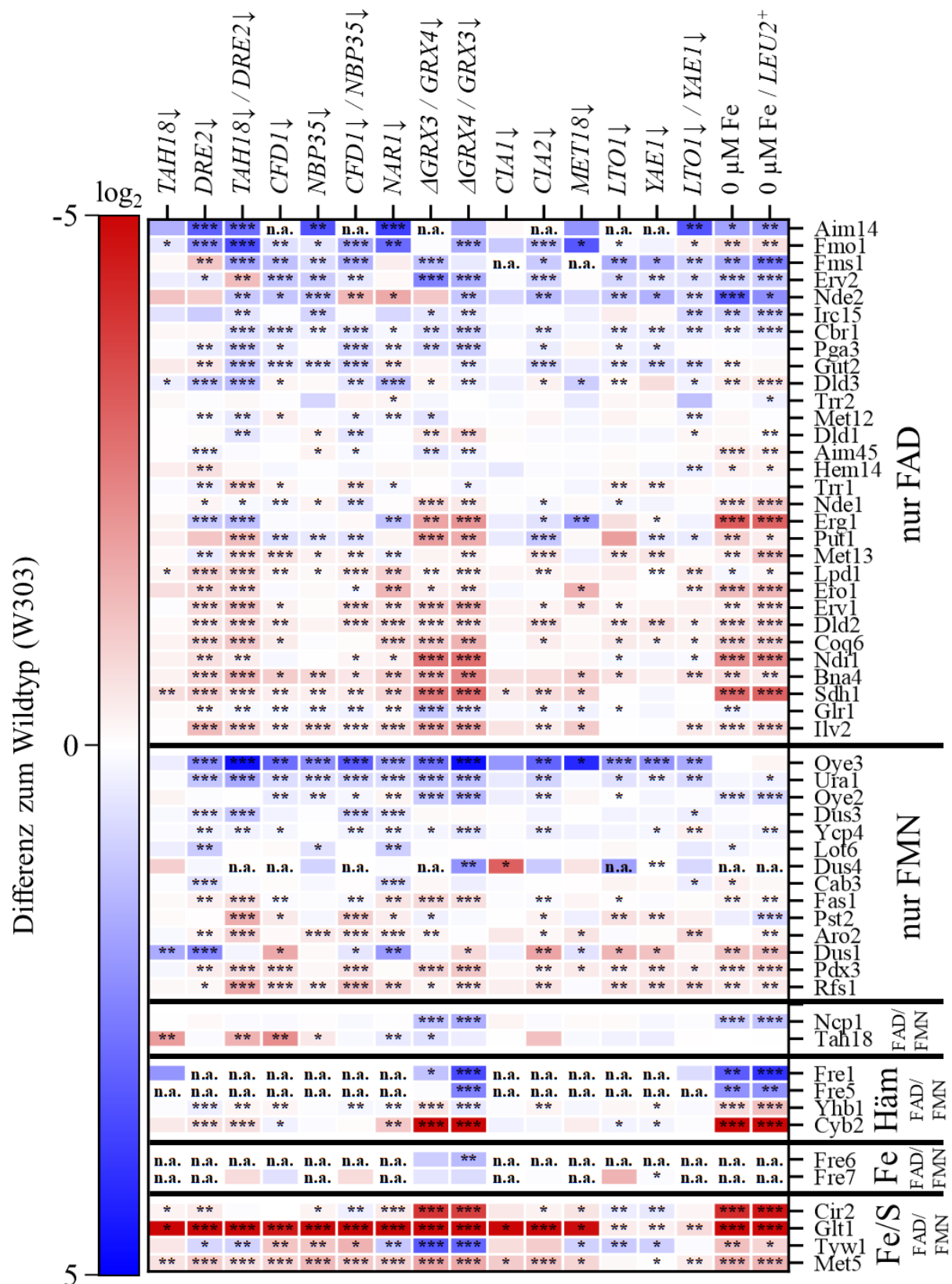


Abbildung 72: Abundanzen der Flavoproteine von *S.cerevisiae*. Gezeigt sind die Änderungen der Abundanzen der Flavoproteine im Vergleich zum Wildtyp. Die Signifikanz entspricht den mittels Students T-Test errechneten q-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.05, 0.01, 0.001 entspricht. Fehlende Messwerte bei Mutante und Wildtyp wurden gekennzeichnet (n.a.). Die Einordnung als Flavoproteine wurde auf Basis der Literatur unternommen (Gudipati *et al.*, 2014) (Rohdaten 55).

4.7 „Branching“ in der CIA-Maschinerie

4.7.1 Reifung von Fe/S-Proteinen durch Lto1 und Yae1

Lto1 und Yae1 sind bekannt als CIA-Faktoren, die für die Reifung von Rli1 benötigt werden. Dabei ist aber nicht endgültig geklärt, ob es dies die einzige Funktion ist, weshalb im Folgenden die Auswirkungen der Lto1 und Yae1-Depletion auf andere Fe/S-Proteine untersucht wird. Dazu wurden folgende Annahmen getroffen: Lto1 und Yae1 sind bei der Reifung von Rli1 als Komplex beteiligt, könnten möglicherweise bei anderen Reifungen aber auch alleine wirken, dennoch sollte im doppelmutierten Depletionsstamm immer auch eine Abundanzänderung zu sehen sein. Insbesondere sollte die Depletion beider Proteine in der Doppelmutante bei Klientenproteinen eine genauso oder wahrscheinlich noch stärker verringerte Abundanz auslösen als die Depletion eines einzelnen Adaptorproteins. Eine Beladung eines untersuchten Klientenproteins durch Yae1 und Lto1 kann also in allen Stämmen als unwahrscheinlich angesehen werden, wenn die Doppelmutante eine signifikant geringere Abundanzänderung als der Mittelwert bei der Depletion anderer CIA-Faktoren aufweist. Zweitens sollte die Abundanzverringering eines Klientenproteins auch bei der einzelnen Depletion von Yae1 oder Lto1 ähnlich stark oder stärker als bei der Depletion anderer CIA-Proteine ausfallen. Eine Betrachtung der Abundanzänderungen der bekannten Fe/S-Proteine bei der Depletion von Yae1 und Lto1 zeigt, dass nur Rli1 als bekanntes Klientenprotein dieser CIA-Faktoren die vorher genannten Bedingungen erfüllt. Pol1, Met5, Leu1 und Glt1 zeigen zwar auch eine verringerte Abundanz bei der Depletion von Yae1 und Lto1, allerdings fällt die Änderung im Gegensatz zu Rli1 deutlich geringer aus als der Mittelwert bei der Depletion anderer CIA-Faktoren. Pol3 zeigt eine signifikant verringerte Abundanz bei der Depletion der Einzelstämme. Allerdings sind die Messwerte der Einzelstämme imputiert während die Datenserie der Doppelmutante, welche keine imputierten Datenpunkte aufweist, keine verringerte Abundanz von Pol3 belegen konnte.

In Übereinstimmung mit Paul *et al.* 2015 konnte eine klare Abhängigkeit des Fe/S-Proteins Rli1 von den Adaptorproteinen Yae1 und Lto1 gezeigt werden (siehe Abbildung 73). Der Vergleich der Abundanzen mit den Abundanzen in anderen CIA-Depletionsstämmen zeigt auch, dass Rli1 von den in dieser Studie messbaren zytosolischen und nuklearen Fe/S-Proteinen als einziges Yae1 oder Lto1 als Adaptor benötigt.

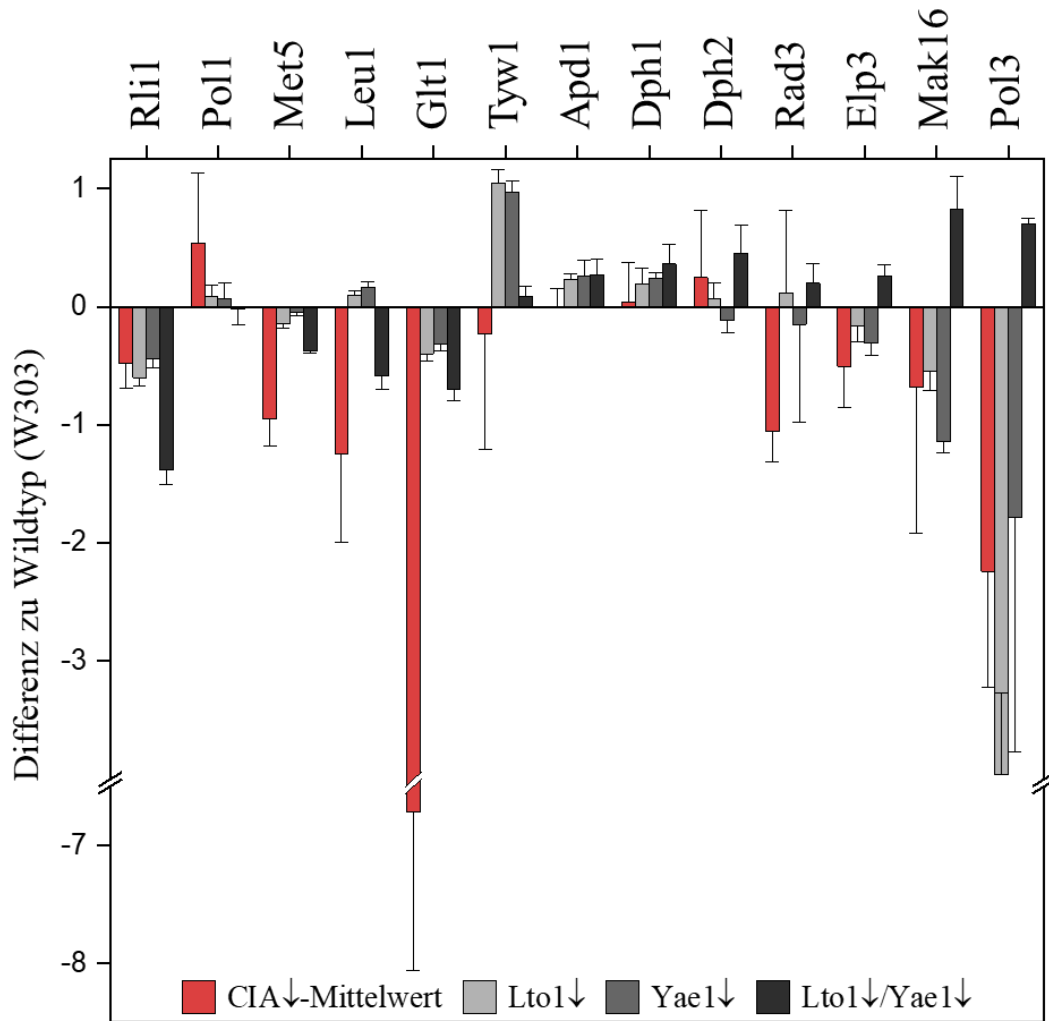


Abbildung 73: Reifung von Fe/S-Proteinen durch Yae1 und/oder Lto1. Gezeigt sind die Differenzen der Abundanzen von bekannten Fe/S-Proteinen in den Depletionsstämmen GalL-Lto1 (hellgrau), GalL-Yae1 (grau) und GalL-Lto1/GalL-Yae1 (dunkelgrau) zum Wildtyp. Zum Vergleich wurde der Mittelwert der Differenzen in allen anderen CIA-Depletionsstämmen aufgetragen (rot) (Rohdaten 51).

Ein Vergleich der Abundanzveränderungen bei Yae1- und Lto1-Depletion mit den mittels anderen Methoden gemessenen Änderungen bei Paul *et al.* 2015 zeigen eine klare Übereinstimmung der qualitativen Aussage zur Funktion von Lto1 und Yae1 Adaptorproteine (siehe Tabelle 60). Neben den acht in der Veröffentlichung untersuchten Proteinen konnte für 13 weitere Proteine eine Beladung durch die Adaptorproteine Yae1 und Lto1 als unwahrscheinlich erachtet werden, wobei nur zwei der Proteine sicher als Klient ausgeschlossen werden können (siehe Diskussion Kapitel 5.6.3). Da die letzte Messserie (Serie 5) die höchste Abdeckung des Proteoms zeigte, wurden für den Vergleich mit den Literaturwerten die Messwerte der Yae1-/Lto1-Doppelmutante, gemessen in Messserie 5, als Vergleich herangezogen.

Tabelle 60: Yae1 und Lto1 in der Fe/S-Reifung. Gezeigt sind die Veränderungen des ^{55}Fe -Einbaus und der Aktivität zytosolischer Fe/S-Proteine bei der Depletion von Yae1 und Lto1 in der Literatur im Vergleich zu den Abundanzänderungen dieser Arbeit. Die Literaturwerte wurden anhand von Grafiken der genannten Quelle bestimmt. ¹Die Werte dieser Arbeit beziehen sich auf den Mittelwert der Abundanzänderung (LFQ-Intensität) und dessen Standardabweichung der Yae1/Lto1-Doppelmutante unter Ausschluss von Datenserien ohne Messwerte (Rohdaten 71).

Protein	(Paul <i>et al.</i> , 2015)	Diese Arbeit ¹
Rli1	~ - 90 % (^{55}Fe -Einbau)	- 62 ± 9 %
Rad3	~ - 25 % (^{55}Fe -Einbau)	+ 15 ± 12 %
Ntg2	~ + 10 % (^{55}Fe -Einbau)	<i>n.d.</i>
Pol3	~ + 12 % (^{55}Fe -Einbau)	+ 63 ± 4 %
Leu1	~ - 17 % (Aktivität)	- 33 ± 8 %
Nbp35	~ + 11 % (^{55}Fe -Einbau)	- 12 ± 5 %
Met5	kein Phänotyp (Aktivität, qualitativ)	- 23 ± 2 %
Nar1	~ 0 % (^{55}Fe -Einbau)	+ 8 ± 13 %
Ncs6		+ 8 ± 8 %
Pol1		+ 0 ± 10 %
Pol2		+ 17 ± 22 %
Tyw1		+ 6 ± 6 %
Apd1		+ 21 ± 10 %
Dph1		+ 28 ± 12 %
Dph2		+ 37 ± 17 %
Elp3		+ 20 ± 7 %
Mak16		+ 77 ± 22 %
Glt1		- 38 ± 7 %
Dre2		- 30 ± 18 %
Grx3		- 20 ± 18 %
Grx4		+ 52 ± 9 %

4.7.2 Reifung der 60S- und 40S-Ribosomenuntereinheiten

Die Betrachtung der Messwerte zeigte signifikante Veränderungen ribosomalen Proteine in mutierten Hefestämmen. In Nar1↓-Hefezellen zeigten 41 ribosomale Proteine der großen Untereinheit eine verringerte Abundanz, 13 eine erhöhte Abundanz. Da ein Fe/S-haltiges Protein an der Reifung von Ribosomen beteiligt ist (Mak16), wurden die Auswirkungen der CIA-Depletion auf die Ribosomenbiogenese untersucht. Falls der fehlende Fe/S-Kofaktor von

Mak16 ursächlich für die Abundanzänderungen der ribosomalen Proteine ist, so müssten alle CIA-Depletionstämme (ohne Yae1↓/Lto1↓) ähnliche Auswirkungen auf die Ribosomenreifung haben. Entgegen dieser Hypothese zeigen unterschiedliche Depletionsstämme unterschiedliche Auswirkungen auf die Reifung der zytosolischen Ribosomen (siehe Abbildung 74). Die doppelmutierten Stämme zeigen eine addierte Wirkung der Einzelmутanten. Eine Depletion von Eisen oder von Proteinen die an der Eisenhomöostase beteiligt sind (Grx3/4) zeigen keine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung, obwohl Mak16 auch in diesen Stämmen eine verringerte Abundanz aufweist. Diese Unterschiede in der Abundanz der Ribosomenbiogenese trotz ähnlicher Abundanzänderungen des Fe/S-Proteins Mak16 kann als Hinweis auf eine (vermutlich indirekte) Regulation der Ribosomenreifung durch die CIA-Maschinerie gedeutet werden. Eine genaue Aufschlüsselung der Proteinabundanzen, geordnet nach zeitlichem Ablauf der Ribosomenbiogenese, ist im Anhang (Kapitel 8.5) zu finden.

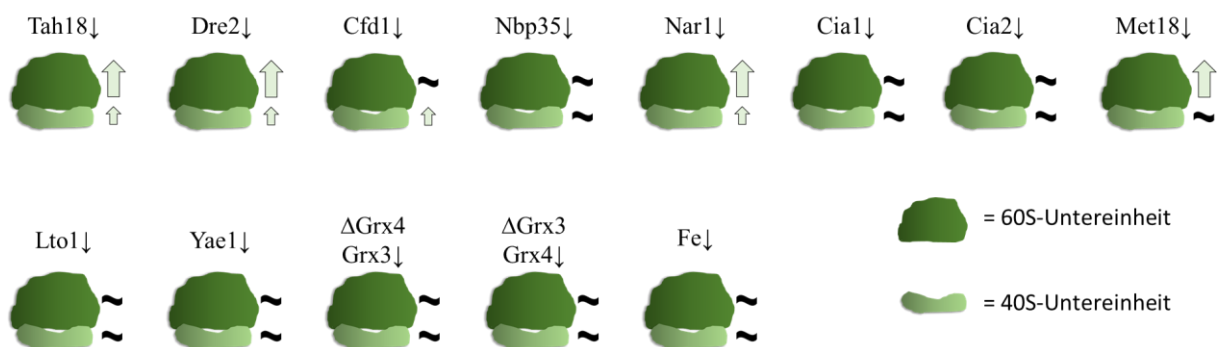


Abbildung 74: Auswirkungen der CIA-Depletion auf die Proteine der Ribosomenbiogenese für die zytosolischen Untereinheiten (60S und 40S). Gezeigt sind die depletierten CIA-Proteine und darunter die beiden Ribosomenuntereinheiten. Dabei indiziert ein grüner Pfeil eine signifikante Erhöhung der Abundanz eines Großteils der zur Biogenese dieser Untereinheit genutzten Proteine und eine schwarze Tilde eine normalverteilte Abundanzänderung der Ribosombiogenese. Gemessen wurden die Werte mittels Massenspektrometrie (n= 3 oder 4) (Rohdaten 59).

4.8 Proteomänderungen und putative Fe/S-Proteine

4.8.1 Vergleich der Mutantenproteome mittels Venn Diagramm

Ein Venn-Diagramm kann genutzt werden um Zusammenhänge zwischen verschiedenen Bedingungen zu illustrieren, es ist aber auch für die Suche nach unidentifizierten Eisen-Schwefel-Proteine nutzbar. Dazu wurde die Annahme getroffen, dass in bestimmten

Depletionsstämmen Eisen-Schwefelproteine signifikant weniger abundant sind als in der Wildtyp-Vergleichsprobe. Es müssen verschiedene Kombinationen der Depletionsbedingungen als Venn-Diagramm betrachtet werden, insbesondere wenn man Unterschiede zwischen verschiedenen CIA-Proteinen untersucht. Leider lässt sich ein Venn-Diagramm aufgrund der vielen Kombinationsmöglichkeiten nur mit wenigen Bedingungen visuell darstellen, weshalb diese visuelle Darstellung hier nur für gewisse Subgruppen präsentiert wird. Da Yae1 und Lto1 bisher nur eine bekannte Funktion als Adaptorprotein für ein Fe/S-Protein (Rli1) besitzt, wurde es in der folgenden Analyse per Venn-Diagramm nicht einbezogen. Signifikant veränderte Abundanz (mit denselben Signifikanzanforderungen) bei allen drei Yae1- und Lto1- Depletionsstämmen zeigen 417 Proteine.

Ein Venn-Diagramm aller Proteome der restlichen CIA- und Eisendepletionsstämme wurde angefertigt und zur besseren Visualisierung in kleinere Gruppen unterteilt (siehe Abbildung 75). Von 122 signifikanten Veränderungen der frühen CIA-Maschinerie konnte bei 68 Proteinen eine höhere und bei 54 Proteinen eine niedrigere Abundanz festgestellt werden. Die 386 signifikanten Veränderungen bei Depletion von Cfd1 und Nbp35 setzt sich zusammen aus 178 Proteinen mit erhöhter und 208 Proteinen mit verringerter Abundanz. Die Depletion von Nar1 und dem CTC führte zu acht Proteinen mit erhöhter und 43 Proteinen mit verringerter Abundanz. Eisen- und Grx3/4-Depletion ergab 425 Proteine mit erhöhter und 438 Proteine mit verringerter Abundanz. Verwendet man neben den untersuchten CIA-Depletionsstämmen noch Eisendepletionsstämme in der Anreicherungsanalyse, so erhält man eine Auswahl an sieben Proteinen, von denen ein Protein (Grx4) eine durchschnittlich erhöhte Abundanz aufweist, während sechs (83 %) der Proteine eine verringerte Abundanz aufweisen.

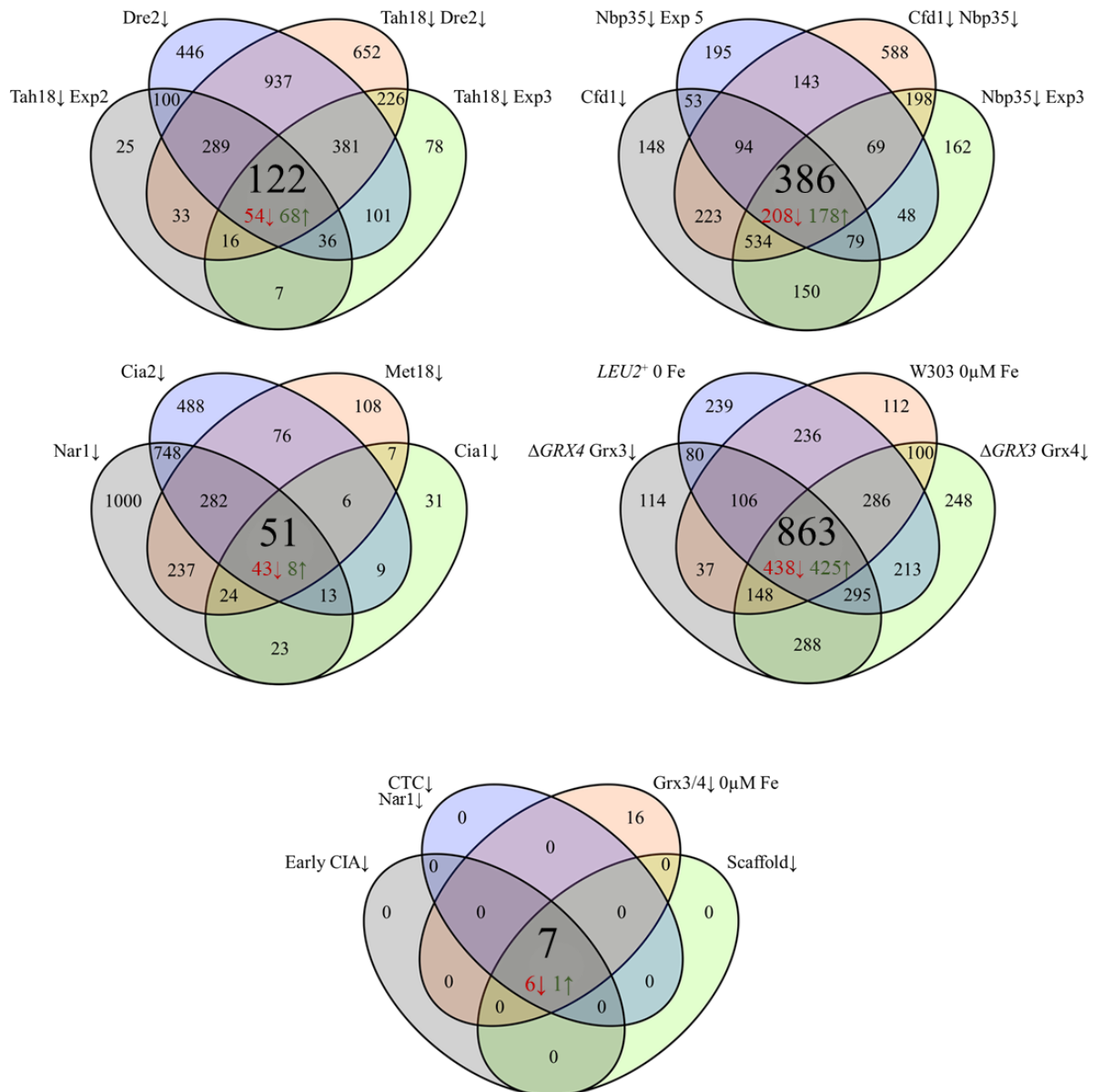


Abbildung 75: Venn-Diagramme der Depletionsstämme. Gezeigt sind fünf Venn-Diagramme, welche die Beziehung der signifikant veränderten Proteinabundanzen in verschiedenen Depletionsstämmen zeigt (p-Wert ≤ 0.05). Die oberen vier Venn-Diagramme zeigen die Überschneidungen zwischen jeweils vier verschiedenen Bedingungen, während das unterste Diagramm die Überschneidung der grauen Schnittflächen der vier anderen Diagramme (Early CIA oben links, Scaffold oben rechts, CTC + Nar1 unten links und Grx3/4 0 μM Fe unten rechts) zeigt (Rohdaten 52).

Die Proteine, welche eine starke Abundanzänderung in allen 15 Depletionsstämmen zeigten (mit Ausnahme der Lto1 und Yae1 Stämme), waren zu 57 % zytosolische Eisen-Schwefel-Cluster-haltige Proteine (siehe Abbildung 76). Zwei weitere auffällige Proteine sind *in vivo* in einem Komplex oder Stoffwechselweg, welcher Eisen-Schwefel-Cluster enthält (Met10 und Sdh1). Im Vergleich dazu ist die Prävalenz von detektierbaren Eisen-Schwefel-Cluster-Proteinen (28 mitochondriale und 22 zytosolische Proteine) im gesamten messbaren Proteom (4173 Proteine) mit 1.2 % viel geringer.

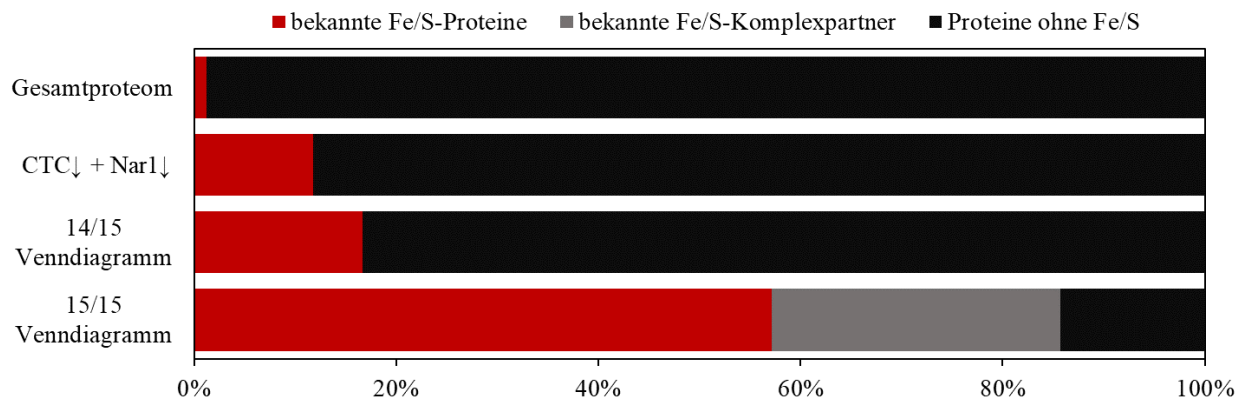


Abbildung 76: Anreicherung von Fe/S-Proteinen über Venn-Diagramme. Gezeigt ist die Zusammensetzung der Proteomdaten nach verschiedenen Filtermethoden. Nach Entfernung von nicht detektierbaren Proteinen besteht das gemessene Proteom zu 1.2 % aus Eisen-Schwefel-Proteinen. Werden alle Proteine verworfen, welche nicht mindestens in 14 von 15 Depletionsbedingungen signifikant veränderte Abundanz aufweisen, erhält man einen Anteil von 16.7 %. Bei einem Grenzwert von 15 von 15 signifikanten Veränderungen erhält man einen Anteil von 57 % Eisen-Schwefel-Proteinen und weiteren 29 % Proteine, welche in Stoffwechselwegen oder Komplexen mit Eisen-Schwefel-Proteinen vorliegen (Rohdaten 52).

Die mittels „students T-Test“ ermittelten signifikanten Treffer konnten also erfolgreich mit Hilfe des Venn-Diagramms auf eine kleine Zahl an Proteinen von Interesse reduziert werden (siehe Tabelle 61). Der erhöhte Anteil an Fe/S-Proteinen durch die Venndiagramme könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Liste weitere, noch unbekannte, Fe/S-Proteine enthält. Diese Daten wurden zur Auswahl putativer Fe/S-Kandidaten verwendet (siehe Kapitel 4.8.3).

Tabelle 61: Identifikation potentieller Fe/S-Proteine über Venn-Diagramme. Gezeigt sind Proteine, welche in mehreren CIA- und Eisendepletionsstämmen signifikante Veränderungen ($p\text{-value} \leq 0.05$, $n = 3$ (Exp1) oder 4 (Exp 2-5)) der Abundanz gegenüber dem Wildtyp aufwiesen. Die linke Spalte zeigt in wievielen Depletionsstämmen eine signifikante Veränderung zu beobachten ist, wobei insgesamt 15 verschiedene Depletionsbedingungen untersucht wurden. Dazu wurde die mittlere Abundanzänderung und ihre Standardabweichung berechnet. Die Annotation des Kofaktors und der Lokalisation basiert auf der uniprot-Datenbank (2023). Die Anzahl der Cysteine wurde der SGD-Datenbank entnommen (Engel *et al.*, 2014). ^[1] Die Lokalisierung von Glt1 ist umstritten und wird in dieser Arbeit diskutiert (Rohdaten 52).

Gruppe	Proteinname	$\Delta\text{Abundanz (log}_2\text{)}$	Kofaktor	Cys	Lokalisation
15/15	Leu1	-1.92 ± 1.58	4Fe4S	11	Zytosol
	Grx4	1.03 ± 1.20	2Fe2S	2	Zytosol
	Glt1	-6.70 ± 1.35	4Fe4S	38	Zytosol ^[1]
	Met5	-1.12 ± 0.38	4Fe4S	7	Zytosol
	Met10	-1.24 ± 0.38	FMN/FAD	2	Zytosol
	His1	-0.73 ± 0.49	Mg ²⁺	5	Zytosol
	Sdh1	-1.22 ± 1.06	FAD	11	Mitochondrien

14/15	Rli1	-0.60 ± 0.28	4Fe4S	14	Zytosol und Nukleus
	Sdh2	-1.54 ± 1.88	2/4Fe2/4S	15	Mitochondrien
	Lys4	-1.53 ± 0.96	4Fe4S	9	Mitochondrien
	Ilv3	-1.07 ± 0.75	2Fe2S	10	Mitochondrien
	Hom2	-0.43 ± 0.32	-	9	Zytosol und Nukleus
	Aat2	-0.38 ± 0.33	-	4	Zytosol und Peroxisom
	Lys9	-0.81 ± 0.44	-	4	Zytosol
	Snz1	-0.88 ± 0.63	-	5	Zytosol
	Arg7	-0.90 ± 0.40	-	7	Mitochondrien
	Pdr12	-1.70 ± 1.19	-	31	Zellmembran
	Yhi9	-1.07 ± 0.43	-	4	Zytosol
	Aro1	-0.52 ± 0.28	Zn ²⁺	23	Zytosol
	Rtk1	-1.06 ± 0.49	-	7	Zytosol
	Rps9B	-0.27 ± 0.54	-	0	Zytosol und Nukleolus
	Tpk1	0.22 ± 0.54	-	2	Zytosol und Nukleus
	Gcy1	0.16 ± 1.00	-	2	Zytosol und Nukleus
	His5	-0.65 ± 0.31	PLP	9	Zytosol
	Aim17	-0.63 ± 0.57	Fe ²⁺	7	Mitochondrien
	Kre6	1.13 ± 0.45	-	6	Golgi-Apparat
	YHR138C	0.40 ± 1.05	-	1	unbekannt

4.8.2 GO-term Analyse

Im Folgenden wurde die Anreicherung der GO-terms dieser Proteine untersucht. Diese beschreiben verschiedene Eigenschaften eines Proteins. Es existieren dabei drei große Untergruppen, der biologische Prozess, an welchem das Protein beteiligt ist (biological process), die Art der Funktion des Proteins (molecular function) und die Lokalisation des Proteins (cellular component). Dazu wurde DAVID verwendet (Da Huang *et al.*, 2009; Sherman *et al.*, 2022). Dieses webtool ermöglicht es, eine Liste von Proteinen auf ihre GO-terms zu untersuchen, zu kategorisieren und zu gruppieren. Es wurden immer nur die maximal zehn signifikantesten GO-Terms angegeben. Obwohl die geringe Anzahl von sechs GO-terms statistisch sehr wahrscheinlich eine Überrepräsentation eines GO-terms zeigt, ist die Zusammenfassung (Abbildung 77) trotzdem aussagekräftig, da sich die Ergebnisse mit denen aus Abbildung 155, welche sich nur durch die Nicht-Betrachtung der Eisendepletionsstämme auszeichnet, teilweise deckt.

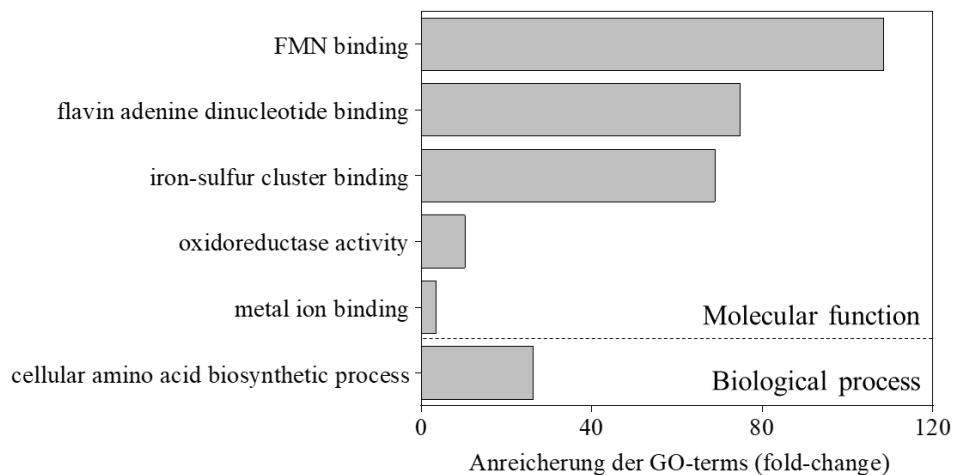


Abbildung 77: GO-terms Anreicherung von Proteinen im 15/15 Venn-Subset. Gezeigt sind GO-terms, welche bei Proteinen, deren Abundanz in allen außer *LTO1*↓, *YAE1*↓ und *LTO1*↓/ *YAE1*↓-Stämmen verringert sind, überrepräsentiert sind. Unten rechts wird die Art des GO-terms angezeigt (Rohdaten 53).

Alle weiteren Venn-Überschneidungen werden im Folgenden diskutiert und sind im Anhang als Abbildung 146 bis Abbildung 156 aufgeführt:

Die Depletion der frühen CIA-Proteine Tah18 und Dre2 zeigt eine GO-term-Anreicherung, für Proteine mit erhöhter Abundanz, von Proteinen mit Helikase und ATPase Aktivität, insbesondere Proteine, welche dem biologischen Prozess der Proteolyse, sowohl Ubiquitinabhängig als auch -unabhängig, zuzuordnen sind. Auch eine erhöhte Zahl an GO-terms für die Ribosomenbiogenese ist festzustellen. Eine GO-terms-Anreicherung von Proteinen mit verringerter Abundanz zeigt vor allem [4Fe-4S]- und FAD-bindende Proteine. Dadurch ergibt sich eine verringerte Zellatmung und Biosynthese von Aminosäuren (Abbildung 146 und Abbildung 147).

Die Hefestämme, welche zur Depletion von Cfd1 und Nbp35 genutzt wurden, wurden als CIA-Scaffold-Mutanten zusammengefasst. Besonders angereichert sind hier GO-terms, welche eine erhöhte Abundanz von GAPDH-, Enolase-, Peptidase- und Glykolyseproteinen anzeigen. Auch an der Proteinfaltung beteiligte Proteine zeigen erhöhte Abundanz und Anreicherung der GO-terms. Eine GO-term-Anreicherung der Proteine mit verringerter Abundanz zeigen [4Fe-4S]- und FAD-bindende Proteine, sowie Proteine der SDH- und ADH-Familie. Die biologischen Prozesse der Ornithin-, Arginin- und Lysin-Biosynthese sind besonders betroffen (Abbildung 148 und Abbildung 149).

Die Hefestämme, welche zur Depletion von Nar1, Cia1, Cia2 und Met18 genutzt wurden, wurden als Nar1 und CTC-Mutanten zusammengefasst. Bei der Anreicherungsanalyse wurden nur GO-terms untersucht, welche sich auf Proteine beziehen, deren Abundanz in den

oben genannten Hefestämmen verringert ist. Das begründet sich dadurch, dass als Antwort der Hefezellen auf diese Depletion nur einzelne Proteine spezifisch induziert werden. Von 52 Proteinen mit signifikant veränderter Abundanz sind acht Proteine mit erhöhter Abundanz messbar, während die restlichen 85 % eine verringerte Abundanz aufweisen. Wieder sind [4Fe-4S]- und FAD-bindende Proteine deutlich weniger abundant, aber auch Proteine mit Transaminaseaktivität und Proteine mit PLP-Bindung. Insbesondere sind die Chorismat-, Lysin-, Arginin- und Histidinbiosynthesewege beeinträchtigt, aber auch BCAA- und die Biosynthese aromatischer Aminosäuren ist beeinträchtigt (Abbildung 150 und Abbildung 151).

Da die CIA-Proteine Grx3 und Grx4 in die Eisenhomöostase involviert sind, wurden Grx3- und Grx4-Depletionsstämme zusammen mit Eisendepletionsbedingungen untersucht. Im Folgenden sollten aber auch exklusive GO-term-Anreicherungen untersucht werden, um die Rolle von Grx3 und Grx4 in der CIA-Maschinerie zu untersuchen. Eine GO-term-Anreicherung für Proteine mit erhöhter Abundanz zeigt Proteine mit einer Annotation einer Hexokinase-, Glukokinase-, Mannokinase- und Fruktokinaseaktivität. Auch Proteine des Transmembrantransports zeigen erhöhte Abundanz und GO-term-Anreicherung. Dadurch werden die Prozesse der Glukosehomöostase und des Eisen-Transmembrantransportes angeregt. Eine GO-term-Anreicherung von Proteinen mit verringerter Abundanz zeigten 4Fe4S-, Häm- und FAD-bindende Proteine, sowie Proteine des Citratzyklus und mit Superoxiddismutaseaktivität. Dadurch ist insbesondere die Zellatmung und der Citratzyklus gehemmt (siehe Anhang Abbildung 152 und Abbildung 153).

Yae1 und Lto1 erfüllen eine sehr spezifische Rolle innerhalb der CIA-Maschinerie, wobei der aktuelle Wissensstand auf eine Funktion als Adaptorprotein für Rli1 beschränkt ist. Deshalb wurden die Yae1- und Lto1-Depletionsstämme getrennt von den restlichen CTC-Proteinen untersucht. Eine GO-term-Anreicherung von Proteinen mit erhöhter Abundanz zeigten Heat-shock-Proteine und Proteine zur Bindung anderer, ungefalteter Proteine. Auch NADP-bindende Proteine sind deutlich abundanter und zeigen eine GO-term-Anreicherung. Der Prozess der pH-Regulation der Zelle, sowie die Antwort auf ungefaltete Proteine ist stark angereichert. Eine GO-term-Anreicherung von Proteinen mit verringerter Abundanz zeigen ribosomale, Metallionen- und RNA-bindende Proteine, wodurch die Prozesse der Translation und Reifung der Ribosomen stark beeinträchtigt werden (Abbildung 154 und Abbildung 155).

Untersucht man die Überschneidung aller angereicherten GO-terms in allen CIA-Stämmen mit Ausnahme von Grx3-, Grx4-, Yae1- und Lto1-Depletionsstämmen, so ist keine Anreicherung von GO-terms von Proteinen mit erhöhter Abundanz zu erkennen. Proteine mit verringerter Abundanz zeigen jedoch eine Anreicherung von GO-terms. Von 41 Proteinen mit signifikant veränderter Abundanz konnte bei 6 Proteinen eine erhöhte Abundanz und bei 85 % eine verringerte Abundanz festgestellt werden. Für Proteine mit verringerter Abundanz zeigt sich

eine starke GO-term-Anreicherung für Fe/S- und FAD-bindende Proteine. Die betroffenen Prozesse sind die Lysin- und Arginin-Biosynthese, sowie die Biosynthese von Aminosäuren allgemein (Abbildung 156).

4.8.3 Charakterisierung ausgewählter putativer Fe/S-Proteine

Im Verlauf dieser Arbeit wurden vier Proteine aufgrund ihrer Abundanzänderung bei der Depletion von CIA-Proteinen, sowie ihrer Cysteinreaktivität als putative Fe/S-Proteine ausgewählt und im Rahmen einer Bachelorarbeit heterolog exprimiert und auf ihre Kofaktoren hin untersucht. Weitere Auswahlkriterien waren die Anzahl an konservierten Cysteinen (mindestens drei), sowie eine zytosolische Lokalisierung. Die Untersuchung des an die Proteine gebundenen Eisens, sowie des säurelabilen Schwefels konnte keine Hinweise auf Fe/S-Kofaktoren in diesen Proteinen liefern. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass es möglich ist, dass in *E. coli* kein effizienter Fe/S-Einbau stattgefunden hat. Während drei der Proteine Fe- und S²⁻-Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze aufwiesen, konnte Map2 als eisenabhängiges Protein identifiziert werden (Kristin Hansen, 2023).

Tabelle 62: Fe- und S²⁻-Bestimmung putativer Fe/S-Proteine. Gezeigt sind die aus Messwerten errechneten Fe- und S-Atome pro Proteinmonomer aus Kofaktoren der gezeigten Proteine (Kristin Hansen, 2023).

Protein	Fe-Atome pro Monomer	S ²⁻ -Atome pro Monomer
YKL033W-A	0.01	0.02
Yhi9	0.09	0.03
Nce103	0.10	0.01
Map2	0.96	0.21

4.9 Reaktive Cysteine

Zur Etablierung einer neuen Methode wurde ein Pilotversuch zur massenspektrometrischen Quantifizierung der Cysteinreaktivität unternommen (Details der Methode: Einleitung Seite 35 und Material und Methoden Seite 82).

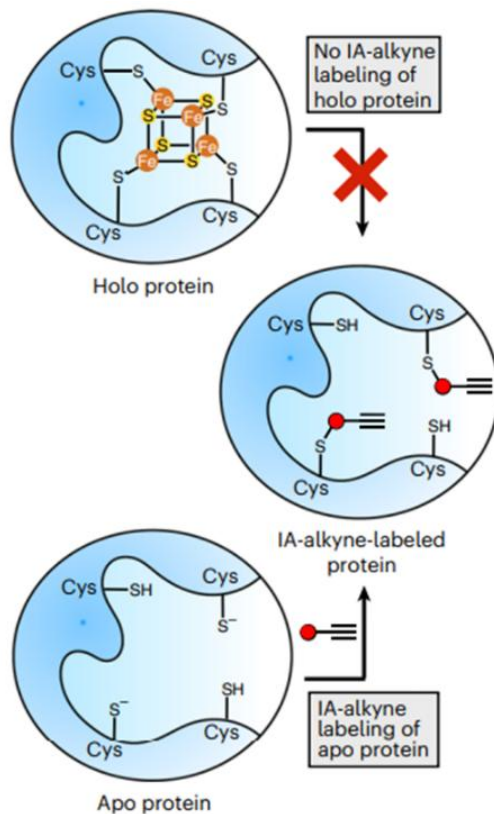


Abbildung 78: Messung der Cysteinreaktivität in Fe/S-Proteinen. Gezeigt wird das chemische Prinzip der Messung von Cysteinreaktivität von Apo- gegenüber Holo-Fe/S-Proteinen. Abbildung wurde abgeändert nach (Bak & Weerapana, 2023)

Zugrunde liegt dabei folgende **Hypothese**: Die Depletion von CIA-Proteinen führt zu einer verringerten Fe/S-Kofaktor-Biogenese. Das verringerte Angebot an Fe/S-Kofaktoren soll zu einer verringerten Beladung mancher oder aller CIA-Klienten-Proteine mit Kofaktoren führen. Dadurch erhöht sich der Anteil der Apoproteine von Fe/S-Proteinen, wobei die intrinsische Stabilität von Apoproteinen hier als Störfaktor beachtet werden muss. Die hier genutzte Methode erlaubt eine Unterscheidung von gebundenen und

ungebundenen SH-Gruppen (siehe Abbildung 78). Da Fe/S-Kofaktoren vornehmlich durch Cysteine ligiert werden, sollten sich Apoproteine und Holoenzyme durch die Reaktivität ihrer kofaktorbindenden Cysteinen unterscheiden. Die Reaktivität wird durch ein Reagenz messbar, welches an freie SH-Gruppen des Proteins bindet, falls dort nicht bereits ein Kofaktor gebunden ist. Ein Fe/S-Protein sollte also in der Kontrollgruppe, dem Wildtyp, nur wenig dieses Reagenzes binden. Im CIA-Depletionsstamm sollte dieses Fe/S-Protein mehr ungebundene Cysteingruppen aufweisen, sodass mehr Moleküle des Reagenzes pro Peptid binden können. Kurz gesagt: Fe/S-Proteine sollten eine erhöhte Cysteinreaktivität in CIA-Depletionsstämmen aufweisen. Dadurch könnten unbekannte Fe/S-Proteine identifiziert werden.

Zur Messung wurde das Zellextrakt eines Wildtyp-Stamms, sowie das Zellextrakt eines CIA-Depletionsstamms verwendet. Als Mutante wurde ein Nar1-Depletionsstamm gewählt, da dieser in früheren massenspektrometrischen Studien dieser Arbeit starke Auswirkungen auf die Fe/S-Proteinabundanz zeigte und gleichzeitig, im Gegensatz zu doppelmutierten Stämmen, einen Wildtyp-ähnlichen Wachstumsphänotyp aufwies. Durch die Verwendung von

Desthiobiotin-Tags können massenspektrometrisch Daten über das „Cysteinom“ gemessen werden, wobei nur freie Thiolgruppen mit dem Reagenz reagieren können, was hier als „Reaktivität“ bezeichnet wird. Dabei kann durch die Verwendung von leichten und schweren Isotopen zwischen den Cysteinen zwei verschiedener Proben unterschieden werden. Dadurch kann die Veränderung der Abundanz freier Thiolgruppen unter verschiedenen Bedingungen beobachtet werden. In diesem Fall sollte untersucht werden, welche Änderungen durch eine Depletion von CIA-Proteinen entstehen.

Die Messung der Cysteinreaktivität lieferte 1740 quantifizierte Cysteine. Dazu wurde im Median eine signifikant niedrigere Reaktivität der Cysteine in der CIA-Depletions-Probe festgestellt.

Interessanterweise lässt sich bei Betrachtung der Fe/S-Proteine eine **Nachweisgrenze** definieren. Es konnten in zwei von drei Replikaten Peptide des Proteins Apd1 nachgewiesen werden (Abundanz 4289 ± 1269 Moleküle pro Zelle, LFQ-Wert: 28.0), alle weniger abundanten Fe/S-Proteine konnten nicht nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze liegt also ungefähr bei 4300 Moleküle pro Zelle, was bei der massenspektrometrischen Methode „label-free-quantification“ einem Wert von 28 entspricht. Die LFQ-Methode ist mit seiner Nachweisgrenze von etwa 24 bis 25 (ca. 1000 Moleküle pro Zelle) also ungefähr um den Faktor vier bis 16 sensitiver.

4.9.1 Reaktivität cysteinhaltiger Peptide

Die Depletion von Nar1 führte zu einer signifikant ($p < 0.001$) erhöhten Reaktivität der Cysteinreste in Peptiden, welche von Fe/S-Proteinen stammen. Dabei sind sowohl die zytosolischen, als auch die mitochondrialen Fe/S-Proteine betroffen. Die Gruppe der aus den zytosolischen Fe/S-Proteinen stammenden Peptide weist dabei eine signifikant ($p < 0.005$) höhere Reaktivität als die Gruppe der aus mitochondrialen Fe/S-Proteinen stammenden Peptide (siehe Abbildung 79). Von zehn Peptiden mit der höchsten gemessenen Cysteinreaktivität des gesamten Proteoms ($n = 1740$) konnten sechs Fe/S-Proteinen zugeordnet werden. Die restlichen vier reaktivsten Cysteine sind C100 und C178 von Adh7, C137 von Sol2 und C115 von RPL40B. Viele Cysteine weisen auch eine verringerte Reaktivität auf, die geringste Reaktivität zeigen dabei C230 und C19 von Bds1 (Bereitstellung von Schwefel), C28, C57 und C58 von Cup1-2 (Metallothionein zur Kupferresistenz), sowie C207 von Apd1 (involviert in H_2O_2 -Resistenz), C206 von Gtt2 (Glutathion S-Transferase), C142 von Trx1 (Thioredoxin-Reduktase), C62 von Ahp1 (Thiolspezifisches Peroxiredoxin) und C238 von Mht1 (S-Methylmethionin-Homocystein-Methyltransferase).

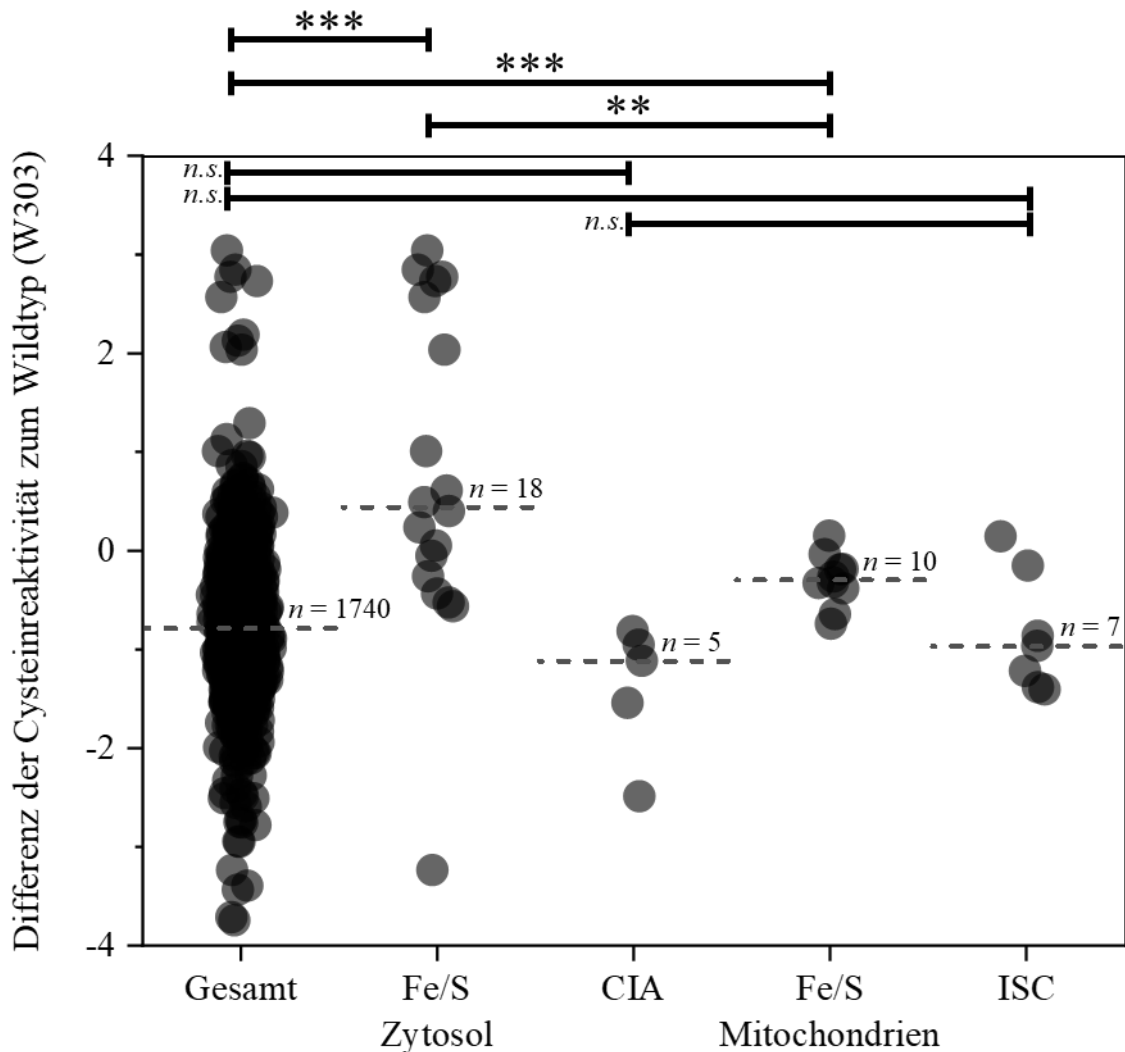


Abbildung 79: Cysteinreaktivität verschiedener Proteingruppen. Gezeigt ist eine Auftragung der Reaktivitätsänderung von cysteinhaltigen Peptiden verschiedener Proteingruppen einer Nar1-Depletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp. Die gezeigten Signifikanzen entsprechen dem p -Wert < 0.01 , < 0.005 , < 0.001 für *, **, bzw. *** (Rohdaten 72).

4.9.2 Reaktive Cysteine von Glt1 und Leu1

Die Betrachtung der reaktiven Cysteine von Glt1 und Leu1 kann zum Beispiel Aussagen darüber liefern, ob Cysteine frei an der Oberfläche liegen. Daraus lassen sich Vermutungen über die Funktion dieser funktionellen Gruppen ableiten. Eine besonders hohe Reaktivität der Cysteinpeptide im Depletionsstamm im Vergleich zum Wildtyp kann zum Beispiel auf freie Liganden der Fe/S-Kofaktoren hinweisen. Eine unveränderte Reaktivität im Vergleich zum Wildtyp kann unter anderem als eine strukturell relevante Schwefelbrücke interpretiert werden. Eine verringerte Reaktivität im Vergleich zum Wildtyp deutet wiederum auf eine Funktion des

Cysteinrestes im Zusammenhang mit dem Stressfaktor hin. Ordnet man den Cysteinen eines Proteins eine Reaktivität zu, kann dies also neue Anhaltspunkte zu deren Funktion liefern.

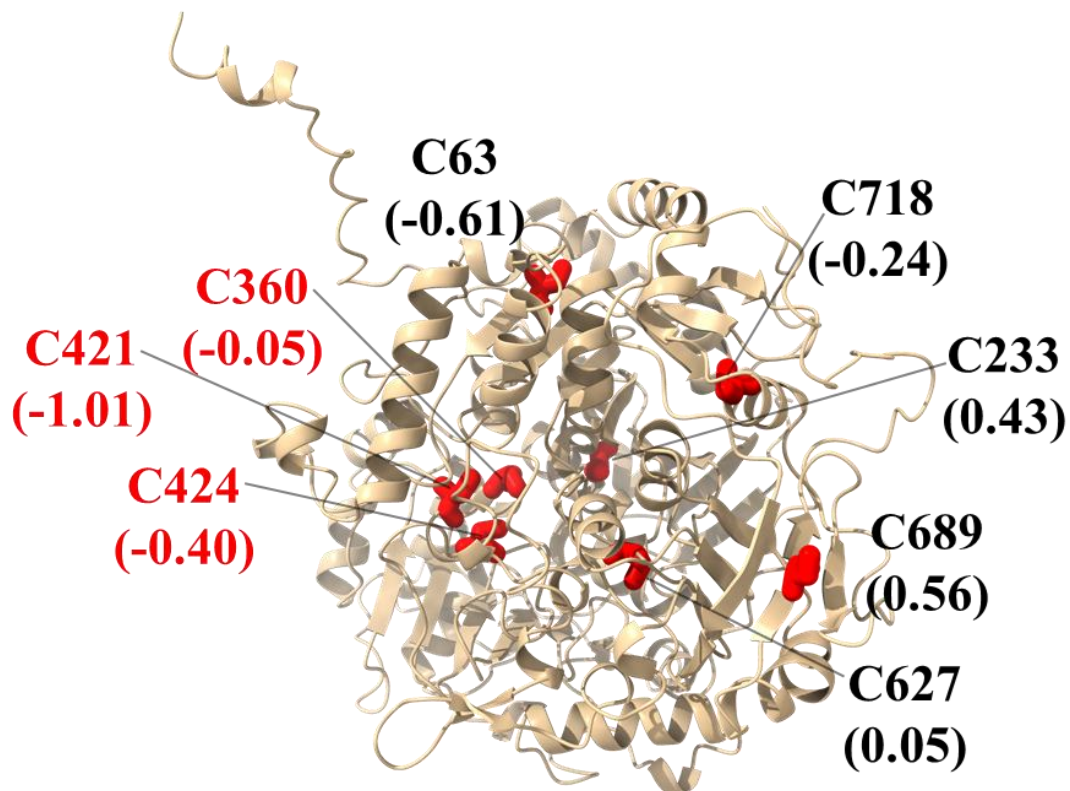


Abbildung 80: Cysteinreaktivität Leu1. Gezeigt ist eine Strukturvorhersage des Proteins Leu1 aus Hefe (AF-P07264-F1-v4). Zusätzlich sind die gemessenen mittleren Reaktivitätsänderungen (L/H, n = 3) der einzelnen Cysteine angegeben. Fe/S-Liganden sind in rot gekennzeichnet (Rohdaten 72).

Für das Fe/S-Protein Leu1 konnten die Cysteinreaktivitäten der Kofaktorliganden und weiterer cysteinhaltiger Peptide zuverlässig bestimmt werden (siehe Abbildung 80). Dabei zeigte sich, dass die Fe/S-ligierenden Cysteinreste (C360, C421 und C426) eine erhöhte Reaktivität aufwiesen. Eine Depletion des CIA-Proteins Nar1 führt also zu einer erhöhten Reaktivität der Kofaktorliganden, was auf einen Verlust des Fe/S-Kofaktors schließen lässt. Das bedeutet auch, dass der Anteil an Leu1-Apoprotein im Vergleich zu Leu1-Holoprotein in der Zelle erhöht ist. Dies setzt auch eine gewisse Stabilität des Apoproteins voraus. Auf der dem Fe/S-Kofaktor gegenüberliegenden Seite zeigte C689 eine deutlich verringerte Reaktivität, was möglicherweise mit einer Antwort auf das Vorliegen als Apoprotein darstellen kann. Denkbar wäre hier eine PTM in Form einer Ubiquitinierung des Cysteins als Mechanismus des Abbauprozesses nicht funktionaler Fe/S-Proteine.

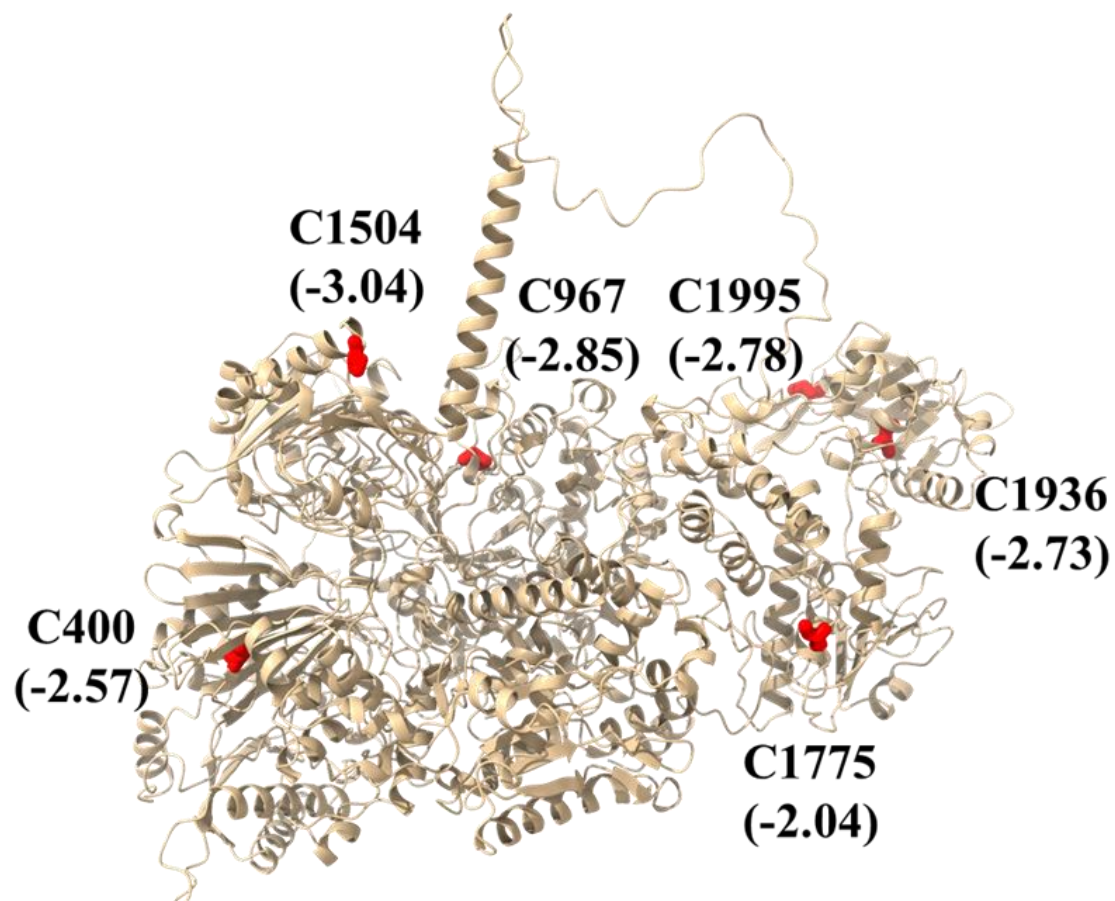


Abbildung 81: Cysteinreaktivität Glt1. Gezeigt ist eine Strukturvorhersage des Proteins Glt1 aus Hefe (AF-Q12680-F1-v4). Zusätzlich sind die gemessenen mittleren Reaktivitätsänderungen (L/H, n = 3) der einzelnen Cysteine angegeben (Rohdaten 72).

Die Betrachtung der zugeordneten Cysteinreaktivitäten in der vorhergesagten Struktur von Glt1 (siehe Abbildung 81) zeigt besonders hohe Reaktivitäten für sechs Cysteinreste. Auffällig ist, dass nur cysteinhaltige Peptide detektiert wurden, welche in der Tertiärstruktur nahe der Oberfläche liegen. Dies zeigt einen inherenten Nachteil dieser Methode: Da die Isotopenmarkierung im nativen Zustand des Proteins erfolgt, ist die Markierung von der Zugänglichkeit der Cysteinreste abhängig. Die Zugänglichkeit basiert wiederum auf der Konformation des Proteins, welche sich bei manchen Proteinen je nach Reaktionsschritt ändern kann. Zudem spielt die dreidimensionale Struktur der „Kanäle“ eine entscheidende Rolle: Bei Enzymen, die große Substrate umsetzen, kann das isotopenmarkierte Reagenz leichter zum aktiven Zentrum vordringen, da dieses besser zugänglich ist, im Gegensatz zu Enzymen, die beispielsweise Elektronen übertragen und deren aktives Zentrum keine Exposition gegenüber dem Lösungsmittel erfordert. Die besonders hohen Reaktivitätsänderungen der Cysteinreste von Glt1 könnte mit der starken Variabilität der Proteinabundanzen zusammenhängen.

4.9.3 Reaktive Cysteine und Proteinabundanz

Die Betrachtung der Cysteinreaktivität alleine kann erste Anhaltspunkte der Analyse liefern, zum Beispiel weist die gesamte Erhöhung der Reaktivität auf eine Vielzahl an Auswirkungen durch die CIA-Depletion auf das Proteom hin. Durch das Einbeziehen von Abundanzdaten derselben Zellextrakte können Effekte der Abundanzänderungen und Änderungen der Cysteinreaktivität unterschieden werden können. Dazu wird in einem Diagramm die Cysteinreaktivität auf einer Achse eingetragen (hier Y-Achse) und auf der anderen Achse wird jedem Peptid die Abundanz des Proteins zugeordnet, aus welchem das Peptid stammt (siehe Abbildung 82). Dadurch entstehen für ein Protein mehrere Datenpunkte innerhalb des Diagramms, was die unterschiedliche Reaktivität verschiedener Cysteine eines solchen Proteins darstellt.

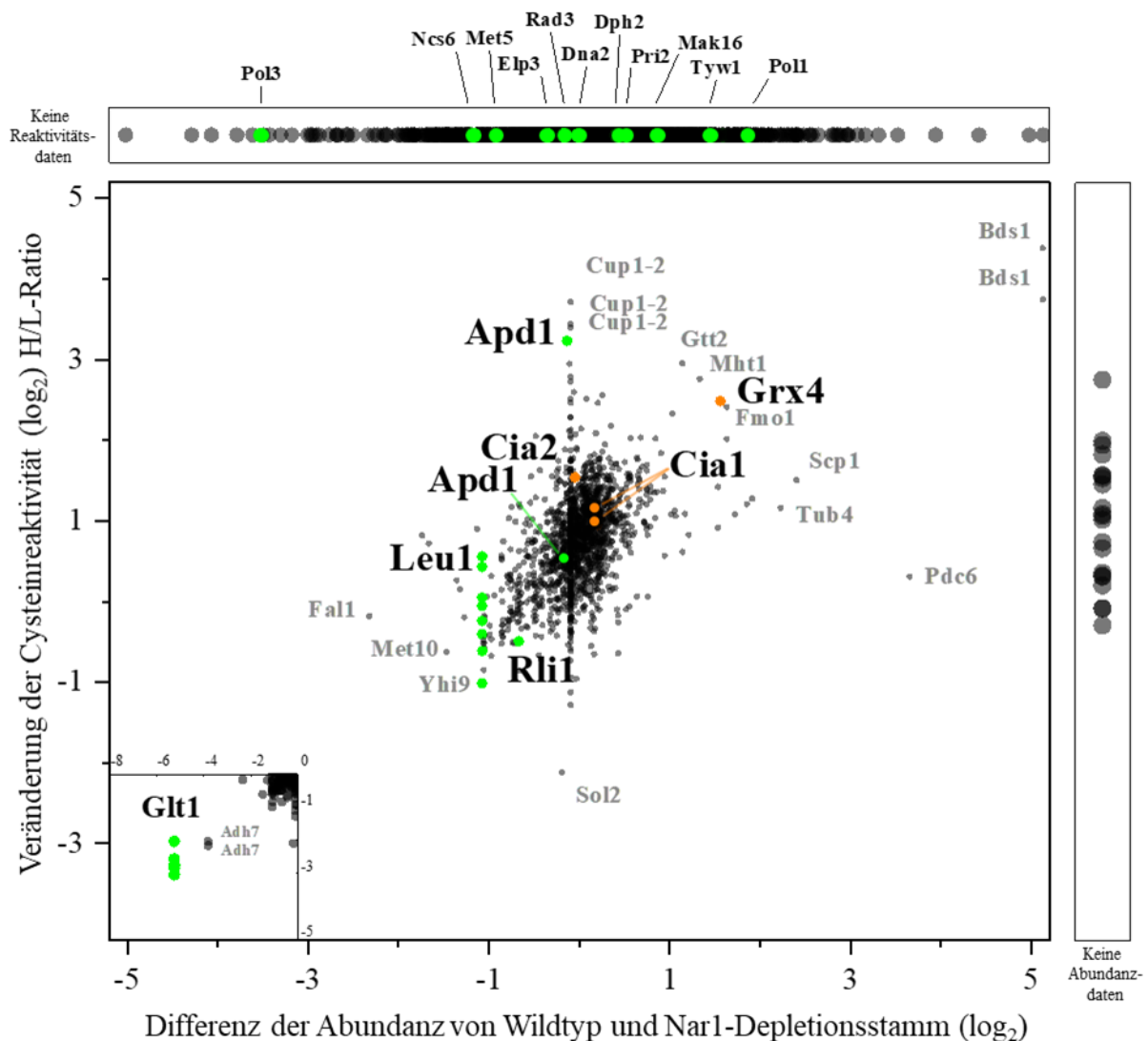


Abbildung 82: Cysteinreaktivität und Fe/S-Proteine. Gezeigt ist eine Auftragung der H/L-Ratio cysteinhaltiger Peptide gegen die LFQ-Intensitätsänderung der aus diesen cysteinhaltigen Peptide bestehenden Proteine in einem Nar1-Depletionsstamm ($n = 3$). Grün

zeigt Fe/S-Proteine, exklusive der CIA-Proteine, an. Orange sind Cia-Proteine gekennzeichnet. In Grau sind weitere Peptide angezeigt, deren Abundanzen signifikante Veränderungen zeigen (Rohdaten 58 und 59).

Das Cysteinom zeigt eine starke Abhängigkeit der Cysteinreaktivität bekannter Fe/S-Proteine von der Abundanz des CIA-Proteins Nar1 (siehe Abbildung 82). Von niedrig abundanten Fe/S-Proteinen konnten nur wenige Peptide detektiert werden, für vier Fe/S-Proteine (Glt1, Leu1, Apd1 und Rli1) liegen sowohl Abundanz-, als auch Cysteinreaktivitätsdaten vor. Es konnte gezeigt werden, dass diese zum Großteil eine erhöhte Cysteinreaktivität aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten die CIA-Proteine (Cia1, Cia2 und Grx4) eine verringerte Cysteinreaktivität, was möglicherweise auf eine erhöhte Aktivität in der Fe/S-Biogenese als Reaktion auf die beeinträchtigte CIA-Maschinerie hindeutet. Dieser Pilotversuch zeigt einen vielversprechenden Ansatz um mit einer optimierten Cysteinom-Messung neue putative Fe/S-Proteine zu charakterisieren, sowie den Mechanismus der CIA-Maschinerie und die Rolle der Cysteine genauer zu verstehen.

5. Diskussion

5.1 Rezente Erkenntnisse der humanen CIA-Forschung

Eisen-Schwefel Proteine sind ein essentieller Bestandteil des Lebens und damit ist die CIA-Maschinerie für zytosolische Fe/S-Proteine essentiell. Seit Beginn dieser Arbeit wurden in diesem belebten Forschungsgebiet viele neue Entdeckungen gemacht, was die Relevanz verdeutlicht. Neben der Forschung mit Modellorganismen wie der verwendeten Hefe *S.cerevisiae* ist auch die Forschung an dem homologen humanen CIA-System in der nahen Vergangenheit deutlich vorangeschritten. Im Laufe einer Studie wurden Patienten mit einer Mutation, die einen Funktionsverlust des humanen Homologs von Cia1, dem Protein CIAO1 hervorrief, untersucht. Dabei entwickeln diese unverwandten Patienten eine Vielzahl an Symptomen: proximale und axiale Muskelschwäche, fluktuierenden Anstieg der Kreatinkinaseaktivität, eine Insuffizienz der Atmungskette, Lernschwächen und andere neurologische Probleme, Eisenablagerungen in Hirngewebe, makrozytäre Anämie und Symptome des Gastrointestinaltraktes (Maio *et al.*, 2023). Da die CIA-Maschinerie DNA-Helikasen, Polymerasen und DNA-Reparaturenzyme bedient, sind viele der Auswirkungen der Mutationen auf einen Funktionsverlust dieser Enzyme zurückzuführen (und mittels lentiviraler DNA-Mutation von *CIAO1* umkehrbar). Das *CIAO1*-Gen wurde damit als neues, relevantes krankheitsassoziiertes Gen bestimmt (Maio *et al.*, 2023). Neben der klinischen Relevanz konnte diese Studie auch anhand von Western-Blots einen unterschiedlichen Einfluss von CIA-Depletion auf die Abundanz einer Auswahl von Eisen-Schwefel-Proteinen zeigen (Maio *et al.*, 2023).

Kurz darauf wurde eine weitere Studie über die Auswirkungen von Defekten der humanen Proteine CIAO1 und MMS19, die Homologe von Cia1 und Met18 in *S. cerevisiae*, publiziert. Dabei wurden Patienten, welche mit 19, 13 und zwei Jahren starben, untersucht und es konnten Mutationen in CIAO1 und MMS19 als Ursache für die Symptome bestimmt werden, was mit erhöhten Uracil- und Thyminkonzentrationen und Veränderungen an Stoffwechselwegen, welche mit bakteriellen und viralen Infektionen sowie dem Metabolismus assoziiert sind, einhergingen (van Karnebeek *et al.*, 2024). Die Untersuchung von Fibroblasten der Patienten zeigte, dass die Abundanz von 283 Proteinen in CIAO1-defizienten Zellen, bzw. 401 Proteinen in MMS19-defizienten Zellen signifikant verändert war, darunter auch ein Anteil an Eisen-Schwefel-Proteinen (van Karnebeek *et al.*, 2024).

Eine weitere Studie untersuchte Zellen, welche als Modell für Friedreich's Ataxia dienten, einer Krankheit, welche mit Frataxin (FXN), einem Protein der humanen mitochondrialen Eisen-

Schwefel-Biogenese (ISC), assoziiert ist und in etwa jeder fünfzigtausendsten Person vorkommt (Ast *et al.*, 2024). Das Proteom dieser humanen Leukämiezellen (K562) zeigte die Depletion von nahezu allen Eisen-Schwefel-Proteinen, was als Hinweis auf einen Stabilitätsunterschied zwischen ihrer Apo- und Holoform gewertet wurde (Ast *et al.*, 2024). Dabei wurde auch ein mitoribosomales Assemblierungsprotein (METTL17) entdeckt, welches durch seinen Eisen-Schwefel-Kofaktor die Expression von Proteinen der oxidativen Phosphorylierung auf Basis der Verfügbarkeit von Eisen-Schwefel-Clustern reguliert (Ast *et al.*, 2024).

Insgesamt lässt sich daraus schließen, dass die Forschung an Eisen-Schwefel-Proteinen und insbesondere eine phänotypische und holistische Betrachtung der Auswirkungen von Defekten der CIA-Maschinerie auf die Stabilität und Abundanz von Eisen-Schwefel-haltigen Proteinen und das Proteom ein wichtiges und durch die Verfügbarkeit von quantitativer Massenspektrometrie von ganzen Proteomen ein rezent Forschungsfeld ist.

5.2 Vergleich mit anderen MS-basierten Studien

Um eine Aussage über Massenspektrometrie als Methode zur Untersuchung der Fe/S-Biogenese in Hefe und anderer Stoffwechselwege im Allgemeinen zu treffen, wurden verschiedene Studien miteinander verglichen um folgende Fragen zu beantworten:

1. Wieviele Proteine des Hefeproteoms konnten quantifiziert werden?
2. Was ist die gängigste Anzahl an Replikaten bei der Probenvorbereitung?
3. Welche Themengebiete sind besonders geeignet für eine massenspektrometrische Untersuchung?
4. Welche Amplitude der Abundanzänderungen sind bei massenspektrometrischen Studien mit Mutanten üblich?
5. Welche Proteine und GO-terms sind allgemeine oder unspezifische Reaktionen auf veränderte Bedingungen?

5.2.1 Abdeckung des Proteoms durch MS-Detektion

Die Label-free-Quantifizierung erlaubt eine nahezu vollständige Quantifizierung des Proteoms. Durch verschiedene Prozessierung, wie zum Beispiel Unterschiede bei der Erkennung und Entfernung ungültiger Daten, können Abweichungen zwischen verschiedenen

Experimenten entstehen. Allerdings lässt sich sagen, dass bei der Label-free-Quantifizierung über 3000 Proteine in mit signifikanten Abundanzen messbar sind. Mit "lockereren" Filterregeln sind über 4000 Proteine identifizierbar (siehe Tabelle 63).

Tabelle 63: Vergleich der gemessenen Proteomgröße verschiedener Publikationen. Gezeigt ist die Anzahl der gemessenen verschiedenen Proteine eines Proteoms. ⁽¹⁾ native/label-free ⁽²⁾ Messung der Cys-reaktivität ⁽³⁾ TMT-labeled.

Größe des gemessenen Proteoms	Organismus	Referenz
898, bis zu 1424 ⁽²⁾	<i>E. coli</i>	(Bak & Weerapana, 2023)
Bis zu 4173 ⁽¹⁾	<i>S. cerevisiae</i>	Diese Arbeit
Bis zu 1718 ⁽²⁾	<i>S. cerevisiae</i>	Diese Arbeit
3600 ⁽³⁾	<i>S. cerevisiae</i>	(Navarrete-Perea <i>et al.</i> , 2021)
3927	<i>S. cerevisiae</i>	(Malina <i>et al.</i> , 2021)
2926	<i>S. cerevisiae</i>	(Backes <i>et al.</i> , 2021)
4103 ⁽¹⁾	<i>S. cerevisiae</i>	(Bertgen <i>et al.</i> , 2024)
3550 ⁽¹⁾	<i>S. cerevisiae</i>	(Koch <i>et al.</i> , 2024)
3550 ⁽¹⁾	<i>S. cerevisiae</i>	(Krämer <i>et al.</i> , 2023)
3910 ⁽¹⁾	<i>S. cerevisiae</i>	(Lenhard <i>et al.</i> , 2023)
4316 ⁽¹⁾	<i>H. sapiens</i>	(Lenhard <i>et al.</i> , 2023)
10411 ⁽¹⁾	<i>H. sapiens</i>	(Serrano <i>et al.</i> , 2024)

Saccharomyces cerevisiae besitzt ca. 6691 proteinkodierende Gene, wobei nur ca. 6051 dieser Proteine annotierte Funktionen in der SGD-Database aufweisen (Stand 2023) (Tantoso *et al.*, 2023). Somit konnte in den Experimenten ein Großteil der vorhandenen Proteine, bis zu 69 % bezogen auf funktional annotierte und Polypeptid-kodierende ORFs, identifiziert werden. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass niedrig exprimierte Proteine trotz moderner MS-Technologie nach wie vor unterrepräsentiert bleiben. Dies betrifft insbesondere regulatorische Faktoren oder Transkriptionsfaktoren mit geringer Kopiezahl pro Zelle. Derartige Proteine entziehen sich häufig der Detektion durch Label-free-Verfahren. Die Entwicklung der Technik ist allerdings schnell: Während vor 10 Jahren die Identifizierung von etwa 4000 Proteinen in Hefe innerhalb einer Stunde ein Meilenstein darstellte (Hebert *et al.*, 2014), können mit modernsten Methoden inzwischen etwa 10000 Proteine in humanen Zellen innerhalb einer Stunde identifiziert werden (Serrano *et al.*, 2024).

Die Messungen der reaktiven Cysteine waren im Vergleich zu anderen Studien auch erfolgreich, hier kann allerdings nur ein geringerer Anteil der Proteine als bei der Label-Free-Quantifizierung identifiziert werden. Dies hängt unter anderem mit der Anzahl und Exposition der Cysteine zusammen. Außerdem müssen messbare Peptide mit Cysteinen nach dem enzymatischem Verdau entstehen. Zusätzlich haben Anzahl und Positionierung von Cysteinen auch eine Auswirkung auf die Bindung des DTB-tags an die Strep-Tactin®-Säule, was wiederum die Abundanz der Messungen beeinflusst.

5.2.2 Vergleich der Anzahl der Replikate

Die Replikatanzahl ist ein zentraler Parameter für die statistische Aussagekraft massenspektrometrischer Studien. In dieser Arbeit wurden für die label-free MS-Analysen meist vier biologische Replikate pro Bedingung verwendet, bei der Untersuchung der Cystein-Reaktivität waren es drei Replikate. Ein Vergleich mit aktuellen Studien zeigt, dass Triplikate und Quadruplikate den gegenwärtigen Standard in der MS-basierten Proteomforschung darstellen. Viele proteomischen Studien mit *S. cerevisiae* arbeiteten mit vier Replikaten (Lenhard *et al.*, 2023; Koch *et al.*, 2024; Bertgen *et al.*, 2024). Einige Studien zum Proteom der Hefe wurden auch mit drei Replikaten publiziert (Koch *et al.*, 2024; Krämer *et al.*, 2023). Auch für die Forschung am humanen Proteom wurden Studien publiziert, welche vier Replikate nutzten (Lenhard *et al.*, 2023). Diese Replikatzahl ermöglicht in der Regel eine robuste statistische Auswertung, insbesondere bei explorativen Studien mit komplexem Proteomprofil.

5.2.3 Geeignete Themengebiete und Möglichkeiten für MS

Western Blots ermöglichen eine gezielte und empfindliche Detektion einzelner Proteine und sind bei sehr niedrig exprimierten Zielproteinen weiterhin eine unverzichtbare Methode, da sehr niedrig abundante Proteine mittels label-free MS bisher oft nicht nachweisbar sind. Ihre Anwendung wird jedoch durch den hohen manuellen Aufwand, sowie die limitierte Fähigkeit mehrere Analyten gleichzeitig zu messen, begrenzt. Dadurch steigt der Aufwand pro Zielprotein ungefähr linear, während der Aufwand für die Quantifizierung zusätzlicher Proteine mittels Massenspektrometrie vernachlässigbar ist.

Die Massenspektrometrie bietet hier entscheidende Vorteile: Sie erlaubt die parallele Quantifizierung tausender Proteine und eignet sich besonders für explorative Studien sowie systematische Vergleiche von Zellzuständen. In dieser Arbeit konnte dank des Label-free-

Ansatzes unter identischen Wachstumsbedingungen (Glukosemedium) ein umfassender Vergleich zwischen Wildtyp und Mutanten durchgeführt werden. Im Gegensatz dazu wird bei Western-Blots eine Anzucht des Wildtyps in Galaktose-haltigem Medium vorausgesetzt, oder die Verwendung von Stämmen ohne HA-tag und dadurch die Verwendung von polyklonalen Antikörpern erfordern, die nicht flächendeckend für das gesamte Proteom zur Verfügung stehen.

Insgesamt zeigt sich, dass Massenspektrometrie besonders für Fragestellungen geeignet ist, bei denen es um globale Proteomveränderungen, Modulation ganzer Stoffwechselwege oder die Identifikation neuer, regulierter Proteine geht. Für gezielte Validierungen von spezifischen Veränderungen kann sie durch klassische Methoden wie Western-Blots ergänzt werden.

5.2.4 Typische Abundanzänderungen in MS-basierten Experimenten

In massenspektrometrischen Studien werden Veränderungen der Proteinabundanz üblicherweise in Form von $\log_2$ -fold-changes oder linearen Amplituden dargestellt. Die beobachteten Werte hängen stark von der Fragestellung, der biologischen Systemantwort sowie von der eingesetzten Quantifizierungsmethode ab. In der vorliegenden Arbeit wurden bei der Untersuchung der Wildtyp- und Mutantenstämme überwiegend moderate Amplituden beobachtet. Die meisten signifikanten Veränderungen lagen im Bereich von 2- bis 3-fachen Änderungen. Nur einzelne Proteine zeigten stärkere Veränderungen (>10-fach), was mit bisherigen Studien übereinstimmt. In früheren Studien konnte für viele experimentelle Systeme typische Änderungen im Bereich von 2- bis 5-fach festgestellt werden (Cox & Mann, 2008; Larance & Lamond, 2015). Manche Studien berichteten hingegen von einzelnen Fällen mit Amplituden von mehr als 10-fach, insbesondere bei stark regulierten Proteinen oder unter extremen Stimuli (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Obwohl Änderungen um mehr als das Zweifache leichter detektierbar und quantifizierbar sind, können auch geringere Änderungen signifikant sein, wobei die Definition der Signifikanz auf statistischen Parametern basiert (Walther & Mann, 2011; Bandow, 2010).

Die Ergebnisse dieser Arbeit liegen damit im typischen Bereich vergleichbarer MS-Studien und zeigen, dass die gewählten Analysebedingungen geeignet waren, um sowohl moderate als auch ausgeprägte Veränderungen zuverlässig zu detektieren.

5.2.5 Bekannte unspezifische Proteomänderungen

Bei massenspektrometrischen Studien werden durch die Messung des gesamten Proteoms auch unspezifische Effekte auf die Expressionsmuster gemessen. Diese werden durch allgemeine experimentelle Bedingungen wie Zellstress oder andere Kultivierungsfaktoren beeinflusst, weshalb die Planung der Experimente diese Faktoren nach Möglichkeit berücksichtigen sollte.

Ubiquitin-Proteasom-System
unspezifische Proteomänderungen
Redoxregulation
Proteinabbau Proteinbiosynthese
Anpassung des Vesikeltransports
Antwort auf oxidativen Stress
Hefe-spezifische Stresssignalwege
Lipid-Biosynthese Ribosomen
Stressantworten Energiestoffwechsel
TOR-Signalwege

Abbildung 83: Bekannte unspezifische Proteomänderungen

Stressantworten wie eine Hochregulation von Hitzeschockproteinen oder eine Induktion von Chaperonen. Änderungen des **Energiestoffwechsels** sind oft vorhanden, allerdings sind die in dieser Arbeit untersuchten Proteine teilweise mit dem Energiestoffwechsel verwoben, weshalb diese Änderungen meistens als spezifisch betrachtet werden können. **Ribosomen** und weitere, an der **Proteinbiosynthese** beteiligte Proteine, sind auch oft betroffen, hier allerdings wiederum durch die Auswirkungen auf Fe/S-Proteine der Proteinbiosynthese wie Mak16 oder die Polymerasen als spezifische Proteomänderungen zu identifizieren. Auch Änderungen in der **Redoxregulation** und der **Antwort auf oxidativen Stress** ist als vermutlich spezifische Auswirkung zu sehen, da Fe/S-Proteine dort eine Rolle spielen. **Proteinabbau** und das **Ubiquitin-Proteasom-System** zeigt in vielen Studien eine erhöhte Abundanz und ist eine mögliche unspezifische Reaktion. Die **Lipid-Biosynthese** und **Anpassungen des Vesikeltransports** sind weitere verbreitete Änderungen, genauso wie Änderungen der **TOR-Signalwege** (target of Rapamycin) und **Hefe-spezifischen Stresssignalwegen** (z.b. HOG-MAPK). Ergebnisse, welche Änderungen der Abundanzen in den genannten Bereichen zeigen, sollten durch weitere Experimente belegt werden.

5.3 Herstellung, Depletion und Wachstum der Mutanten

Als Grundlage dieser gesamten Arbeit diente eine Auswahl von Hefestämmen, deren verschiedene CIA-Proteine depletiert wurden. Ergänzt wurden diese galaktoseregulierbaren Stämme durch genetisch unveränderte Wildtypstämme, bei denen Eisen depletiert wurde. Diese Gegenüberstellung sollte eine Trennung der Effekte durch CIA- und eisendepletion erlauben, da beides über mehrere Effekte miteinander verbunden ist, zum Beispiel sind die CIA-Proteine Grx3 und Grx4 an der Eisenhomöostase beteiligt (Chi *et al.*, 2018).

Vor der Untersuchung der Auswirkungen durch die Depletion mussten die Stämme verifiziert werden um zu garantieren, dass die zu beobachtenden Auswirkungen durch die Depletion verursacht werden. Dazu wurden verschiedene Methoden angewandt, welche zusammengekommen eine erfolgreiche Depletion belegen. Dadurch ist auch ein optimierter Arbeitsablauf als Vorlage für zukünftige genetische Veränderung durch homologe Rekombination entstanden (siehe Kapitel 3.5.2). Nach der homologen Rekombination wurde das rekombinierte DNA-Fragment von der genomischen DNA amplifiziert und per DNA-Gelelektrophorese über dessen spezifische Größe nachgewiesen (Seite 87). Die durch Gelelektrophorese approximierte Größe des inserierten Fragments liefert allerdings keine Aussage über die Sequenz oder die korrekte Inserierung in das Leseraster. Zur Überprüfung wurde daher das inserierte Fragment und eine geringe Anzahl an Basenpaaren flussabwärts des Fragments amplifiziert und daraufhin sequenziert. Diese Sequenzierung zeigte bei allen verwendeten Hefestämmen eine korrekte Inserierung des Fragments in das Leseraster des Gens von Interesse. Die Deletionsstämme zeigten wie erwartet die Absenz des Gens.

Während die Sequenzierung als Beweis für eine erfolgreiche Mutation diente, konnte eine Beeinflussung der Expression der mutierten Gene durch weitere Faktoren, neben dem veränderten Promotor, nicht durch die Sequenz alleine überprüft werden. Insbesondere werden die Gene durch unterschiedliche Terminatoren reguliert, welche bei geringer Expression einen starken Einfluss auf die basale Expression haben können (Curran *et al.*, 2013). Deshalb wurde die Expression der Proteine durch Western-Blots überprüft und festgestellt, dass die Expression erfolgreich regulierbar ist (siehe Abbildung 34 bis Abbildung 39). Diese Daten ließen sich im weiteren Verlauf auch mit den massenspektrometrisch erhaltenen Daten vergleichen, wobei eine Übereinstimmung gezeigt werden konnte. Vor dem Wachstum der Stämme für die hier gezeigten Experimente wurde die optimale Zeit für die Depletion bestimmt. Bei dieser Überprüfung wurde die minimale Depletionszeit bestimmt, nach derer die Extrakte der Hefestämme keine Änderung in Western-Blots und Leu1-Aktivitätstest mehr zeigten. Zur Verringerung der Variablen wurde danach eine möglichst einheitliche Depletionszeit (siehe Tabelle 64) gewählt. Neben der Depletion der Zielproteine wurde auch

das Wachstum der Zellen beobachtet. Dazu wurden Wachstumskurven und Tüpfeltests angefertigt (siehe Kapitel 4.3). Hiermit konnten erfolgreich die optimalen Depletionszeiten bestimmt werden, definiert durch eine maximale Depletion der Proteine von Interesse, sowie einem möglichst dem Wildtyp ähnlichen Wachstum, um andere Variablen wie zum Beispiel Effekte durch eine Ernte und Aufschluss in unterschiedlichen Wachstumsphasen in der Analyse ausschließen zu können.

Tabelle 64: Optimale Depletionszeiten der Hefestämme

Stamm	GalL-3HA-Tah18/ GalL-3HA-Dre2	GalL-3HA-Cfd1/ GalL-3HA-Nbp35	Δ Grx3/ GalL-3HA-Grx4	Δ Grx4/ GalL-3HA-Grx3	andere Stämme
Zeit	16 h	16 h	16 h	16 h	64 h

5.3.1 Wachstumsphänotyp von CIA-Depletionsmutanten

Der Wachstumsphänotyp der Mutanten kann neben der Beurteilung für die späteren Experimente auch Aussagen über die Auswirkungen der Mutationen erlauben. Die Stämme Δ Grx3 und Δ Grx4 zeigen sowohl im Tüpfeltest, bei der Länge der Lag-Phase, als auch bei der Verdopplungszeit keinen signifikanten Unterschied des Wachstumsphänotyps im Vergleich zum Wildtyp. Dies lässt auf eine Redundanz beider Proteine in ihrer Funktion schließen, da andere Mutanten der „Kern“-CIA-Maschinerie Änderungen des Wachstumsphänotyps aufwiesen. Im Gegensatz zu den Auswirkungen der Deletionen von Grx3 oder Grx4 führt die Depletion von Yae1 oder Lto1 bereits zu einer kleinen Veränderung der Verdopplungszeit. Tüpfeltests zeigten allerdings keine signifikanten Auswirkungen. Auch hier führte die Depletion beider Proteine, wie bei allen anderen Doppelmутanten auch, zu einer wesentlich stärkeren, negativen Auswirkung auf den Wachstumsphänotyp (siehe Abbildung 84).

Ein weiterer wichtiger Faktor für den Wachstumsphänotyp ist der introduzierte 3HA-Tag. Je nach Position können die zusätzlichen Aminosäuren die Aktivität, die Faltung, den Transport und weitere Eigenschaften des Proteins beeinflussen. Auch der Terminator kann die Expression im Bereich einer Größenordnung beeinflussen.

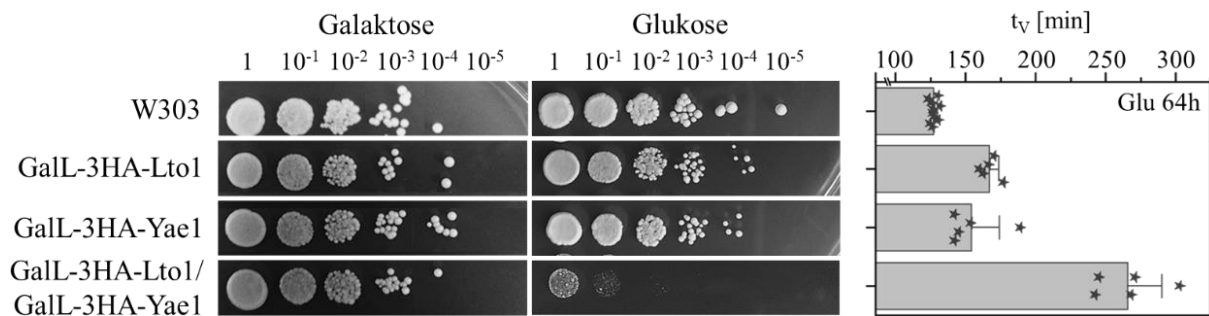


Abbildung 84: Zusammenfassung des Wachstumsphänotyps der Yae1- und Lto1-Mutanten. Gezeigt sind Tüpfeltests (links) und die Verdopplungszeit (Mitte) der drei Yae1- und Lto1-Mutanten, welche im Ergebnisteil genauer beschrieben sind.

GalL-3HA-Dre2 ist die einzige Einzelmutante, welche eine signifikante Erhöhung (fast zweifach, siehe Abbildung 42) der Verdopplungszeit zeigt. Mögliche Erklärungen hierfür sind weitere Funktionen von Dre2 im Kontext der Zelle neben seiner Funktion als CIA-Protein, eine besonders effiziente Depletion durch den GalL-Promotor oder eine essentielle Stellung in der CIA-Maschinerie.

5.4 Zytoplasmatische Lokalisierung von Glt1

Im Verlauf der Arbeit zeigte sich eine klare Abhängigkeit der Glt1-Aktivität und -Abundanz von der CIA-Maschinerie, beziehungsweise der Verfügbarkeit zytoplasmatischer Fe/S-Kofaktoren. Frühere „High-throughput“-Studien beschrieben eine Lokalisierung in den Mitochondrien (Sickmann *et al.*, 2003). Allerdings deutet die starke Abhängigkeit der Abundanz von der CIA-Maschinerie auf eine zytoplasmatische Lokalisation hin. Neben dieser Abhängigkeit sprechen auch weitere Faktoren für eine zytoplasmatische Lokalisierung. Auch eine Importsequenz für die mitochondriale Matrix ist nicht zu erkennen. Diese N-terminale Sequenz würde aus vielen positiv geladenen Aminosäuren in Form einer Alpha-helix bestehen (Bolender *et al.*, 2008). Diese Sequenz ist typischerweise zwischen 20 und 60 Aminosäuren lang (Calvo *et al.*, 2017). Glt1 zeigt keine Anhäufung von positiv geladenen Aminosäuren, beziehungsweise alpha-helikale Strukturen der ersten 20 bis 60 N-terminalen Aminosäuren (siehe Abbildung 145).

Zum anderen konnte eine Organisation von Glt1 als Filamente aufgezeigt werden (Noree *et al.*, 2019). Dies kann als Erklärung genutzt werden, um die frühere, inkorrekte Lokalisierung als mitochondriales Protein zu erklären. Die Methodik der Lokalisierung beinhaltete eine Zentrifugation zur Abtrennung von Mitochondrien von restlichen Zellbestandteilen. Der Dichteunterschied von Mitochondrien (ca. 1.2 g/cm³) im Vergleich zu Proteinen (ca. 1.3 g/cm³)

erlaubt in den meisten Fällen eine klare Trennung durch Zentrifugation. Die Organisation als Filamente, welche eine sehr hohe molekulare Masse aufweisen, kann jedoch die Auftrennung durch Zentrifugation beeinträchtigen, was auch die Glt1-Aktivität in der mitochondrialen Fraktion erklärt. Neuere Studien, welche neben einer Auftrennung durch die Zentrifugationsgeschwindigkeit auch einen Dichtegradienten zur Verbesserung der Auflösung verwendeten, wiesen Glt1 **nicht** in den Mitochondrien nach (Vögtle *et al.*, 2017). Weiterhin wird die These durch die Lokalisierung des restlichen Glutamatbiosyntheseweges gestützt, da im Zytosol alle Enzyme des Glutamatbiosyntheseweges zu finden sind. Zusammengenommen lassen die genannten Hinweise mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine **zytosolische Lokalisierung** schließen.

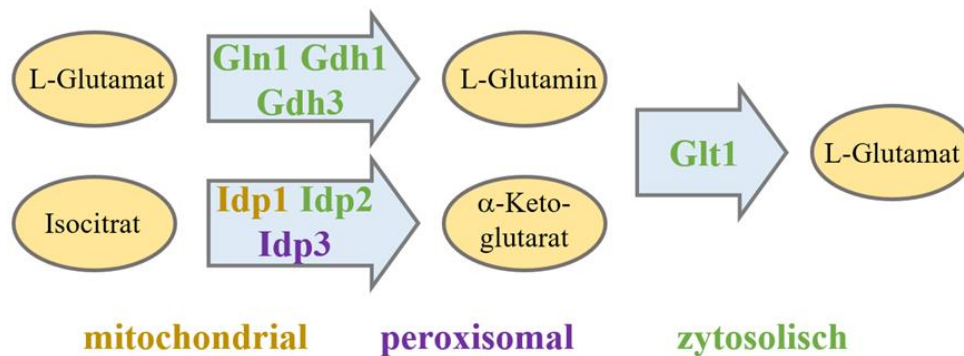


Abbildung 85: Lokalisierung des L-Glutamat-Biosynthesewegs. Gezeigt ist die Lokalisierung der Glutamatbiosynthese in Übereinstimmung mit den Daten der SGD, Uniprot und einer Veröffentlichung (Vögtle *et al.*, 2017).

5.5 Aktivitätsmessungen und Enzymkinetik

5.5.1 Kinetische Parameter von Glt1

Mit der Etablierung eines Enzymkinetikassays mit Zellextrakt statt aufgereinigtem Enzym wurden die relevanten kinetischen Parameter in Zellextrakt bestimmt. Die Stabilität der Glutaminsynthase im Zellextrakt ist für mehrere Stunden gegeben (siehe Abbildung 44). Bei höheren pH-Werten wies die Reaktion zwar eine geringere Hintergrundaktivität auf, aber die Enzymaktivität sank proportional (siehe Abbildung 46).

Tabelle 65: Kinetische Parameter von Glt1 im Zellextrakt. Gezeigt sind die Parameter von Glt1 in den Zellextrakten und die Literaturwerte ^[1].

Bestandteil	Apparenter K_M -Wert [μM]	Literaturwert [μM]
α -Ketoglutarat	251 ± 54	40 (Masters & Meister, 1982)
NADH	5.9 ± 0.9	7 (Masters & Meister, 1982)
L-Glutamin	393 ± 10	280 (Masters & Meister, 1982)

Tabelle 66: Inhibition von Glt1 im Zellextrakt. Gezeigt sind die beiden verwendeten Inhibitoren und die gemessenen IC_{50} -Werte, so wie die Literaturwerte.

Inhibitor	IC_{50} -Wert [μM]	Literaturwert K_i [μM]
L-Azaserin	700 ± 100	ca. 100 (R.M. Wallsgrove et al., 1977) bis 800 (Wang, 1985)
Methioninsulfon	180 ± 30	5 (Masters & Meister, 1982)

Die gemessenen K_M -Werte für NADH und L-Glutamin entsprechen den Literaturwerten, während α -Ketoglutarat einen nahezu 10-fachen K_M -Wert im Vergleich zur Literatur aufweist. Dies könnte durch die Messung mit Zellextrakt im Gegensatz zu dem aufgereinigten Protein zu erklären sein. Auch die Organisation als Filamente kann einen Einfluss auf die messbare Aktivität haben. Dennoch bieten die Parameter einen guten Anhaltspunkt zur Optimierung des Assays. Die Inhibition der Glutamatsynthese durch L-Azaserin entsprach dem Literaturwert für aufgereinigtes Protein. Im Gegensatz zu L-Azaserin ist L-Methioninsulfon ein mit L-Glutamin konkurrierender kompetitiver Inhibitor. Damit wird die der IC_{50} -Wert stark durch andere Stoffe wie dem L-Glutamin beeinflusst, welches in undefinierten Mengen im Zellextrakt vorliegt und bei der Durchführung des Assays in Überschuss hinzugegeben wird. Der Mechanismus der Hemmung durch L-Azaserin ist unbekannt. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass sich L-Azaserin sehr gut als Inhibitor eignet um die Hintergrundaktivität, also die Glt1-unabhängige NADH-Abnahme im Zellextrakt, zu bestimmen.

5.5.2 Unterschiede in der Beladung von Glt1 und Leu1

Der Vergleich von Enzymkinetik und Abundanz der Proteine zeigt große Unterschiede zwischen Glt1 und Leu1 (Abbildung 47 und Abbildung 48). Das Protein Leu1 verliert bei einer Depletion der CIA-Proteine zuerst seine Aktivität, bevor sich die Abundanz verringert.

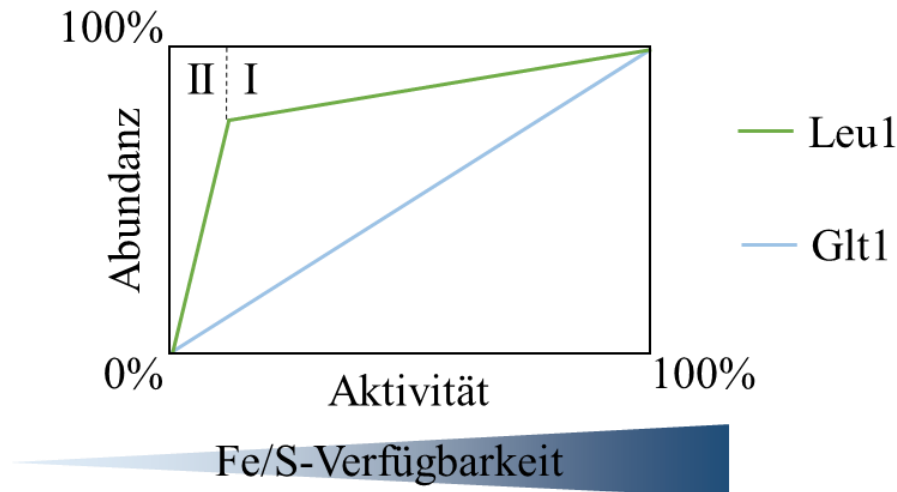


Abbildung 86: Unterschiede der Abundanz und Aktivität von Leu1 und Glt1 bei CIA-Depletion. Gezeigt ist eine vereinfachte Zusammenfassung von Abbildung 47 und Abbildung 48.

Da die Aktivität mit dem Vorhandensein des Eisen-Schwefel-Cluster korreliert, lässt diese Beobachtung darauf schließen, dass die Proteinbiosynthese von Leu1 bei einem Defekt der CIA-Maschinerie anfangs weitergeführt wird und Apo-Leu1 ein stabiles Protein darstellt, welches nicht sofort proteolysiert wird. Leider ist der genaue Mechanismus der Erkennung von nicht funktionsfähigen Proteinen nicht hinreichend untersucht um eindeutige Schlüsse zu ziehen. Eine mögliche Erklärung der Beobachtung ist, dass Apo-Leu1 keine Änderung der Sekundär- und Tertiärstrukturen gegenüber Holo-Leu1 aufweist, wodurch das Ubiquitin-Proteasom-System nicht erkennen kann, dass nicht funktionsfähiges Apo-Leu1 vorliegt. Andererseits kann dies auch darauf hinweisen, dass eine Beladung von Apo-Leu1 mit Eisen-Schwefel-Clustern auch nach längerer Zeit als Apo-Protein noch möglich ist und das Protein deshalb nicht abgebaut wird. Liegt jedoch ein zu hoher Anteil des Proteins in der Zelle als Apo-Form vor, so wird auch die Abundanz des Apo-Proteins verringert. Entweder durch Abbau des Apo-Proteins oder durch andere zelluläre Prozesse, welche die Proteinbiosynthese von Leu1 verhindern. Zusätzlich sollte beachtet werden, dass eine starke Depletion der Fe/S-Proteine zu unspezifischen Stressreaktionen führen kann, wodurch unter anderem eine vermehrte Expression des Ubiquitin-Proteasom-Systems beobachtbar ist. Glt1 hingegen zeigt eine „Alles oder Nichts“-Reaktion auf die Depletion der CIA-Maschinerie, was eine Priorisierung der Fe/S-Klientenproteine vermuten lässt. Als wichtigen Faktor ist zu bedenken, dass die Aktivitätsmessungen von Glt1 eine höhere Streuung aufweist, weshalb signifikante Änderungen seltener zu beobachten sind. Die schnelle Abnahme von Aktivität und Abundanz weist auch auf eine Instabilität des Apoproteins hin, was wiederum ein weiterer Hinweis auf eine Differenzierung der Stabilität verschiedener Apoproteine darstellt.

5.6 Auswirkungen der CIA-Depletion

5.6.1 Gegenseitige Beeinflussung der CIA-Proteine

Bisher ist die interne Regulation zwischen den CIA-Proteinen nicht ausreichend erforscht. Es ist unklar über welche Mechanismen Fe/S-Mängel auf die CIA-Maschinerie wirken oder welche Folgen Mutationen einzelner CIA-Proteine auf den Rest der CIA-Maschinerie haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen die Depletion einzelner CIA-Proteine auf andere CIA-Proteine hat.

Ohne die Ergebnisse sind folgende Szenarien möglich: Zum einen könnte eine Depletion einzelner CIA-Proteine zu einer starken Erhöhung aller anderen CIA-Abundanzen führen um den Ausfall des depletierten Proteins zu kompensieren. Der gegenteilige Effekt ist auch denkbar, um die Stöchiometrie der CIA-Proteine zu erhalten. Als dritte Möglichkeit ist auch ein Ausbleiben einer Abundanzänderung anderer Proteine denkbar. Zuletzt könnten einzelne CIA-Proteine unterschiedlich reagieren, was auf eine intrikate Regulation und möglicherweise differenzierte Funktionen der einzelnen Proteine hinweist.



Abbildung 87: Zusammenfassung Beeinflussung der CIA-Proteine. Gezeigt ist ein Ausschnitt der Abbildung 54.

Diese Arbeit zeigt, dass eine Depletion und dementsprechend auch für krankheitsrelevante Änderungen eine Mutation einzelner CIA-Proteine zu einer sehr spezifischen Antwort der CIA-Maschinerie führt. Hierbei stellen die Proteine Grx4 und Nar1 die Hauptkomponenten dar, wobei die Depletion von CIA-Proteinen vor allem zu einer verringerten Nar1-Abundanz und einer erhöhten Grx4-Abundanz führt (siehe Abbildung 87). Da Grx4 an der Eisen-Homöostase beteiligt ist, kann dieses zu einer erhöhten Eisenaufnahme der Zelle führen. Die Repression von Nar1 führte zu einer Induktion von *GRX4*, aber auch des frühen Faktors *DRE2*, wodurch die Neubildung von Eisen-Schwefel-Clustern angeregt werden könnte.

Ergebnisse anderer Autoren zeigten ähnliche Zusammenhänge. Insbesondere die verringerte Abundanz von Nar1 bei einer Depletion von fast allen anderen CIA-Proteinen, sowie die

verringerte Abundanz von Cia2 durch die Depletion seiner Komplexpartner war zu beobachten (Paul, 2014). Die Analyse mittels Massenspektrometrie lieferte jedoch detailliertere Ergebnisse und bezog auch Grx3 und Grx4 mit ein. Dadurch konnten neue Erkenntnisse zur gegenseitigen Regulation gewonnen werden, wobei Grx4, neben Nar1, als Hauptakteur dieser Effekte identifiziert wurde.

5.6.2 Instabilität von Fe/S-Apoproteinen

Eine zentrale Frage dieser Arbeit ist, inwiefern eine quantitative massenspektrometrische Analyse als Methode zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der CIA-Maschinerie möglich ist. Einige Autoren nahmen als Forschungshypothese eine nahezu unveränderte Stabilität der Apoproteine in Hefe an (Balk *et al.*, 2004; Hausmann *et al.*, 2005). Eine Erklärung für diese Beobachtungen ist, dass durch die hohe Abundanz der untersuchten Fe/S-Proteine, teils verursacht durch eine Überexpression unter der Kontrolle von *MET25*- oder *TDH3*-Promotoren, Western Blots überladen und die detektierten Signale gesättigt wurden, wodurch Unterschiede der Proteinabundanz nicht mehr messbar waren und Apoproteine stabil erschienen. Insbesondere ist das Protein Leu1 von diesem Effekt betroffen, da es in vielen Hefestämmen durch eine Mutation in *LEU2* stark überexprimiert wird, unabhängig vom Promotor. In Studien an humanen Zelllinien wird die Instabilität und damit die Abundanz von Fe/S-Proteinen, namentlich der Proteine GPAT, POLD1 und DYPD oft gezielt als funktioneller Marker für den Einbau von Fe/S-Kofaktoren in Klientenproteine eingesetzt (Stehling *et al.*, 2008; Stehling *et al.*, 2013). Die Depletion von CIAO1 zeigte in humanen Zellen eine differenzierte Auswirkung auf die Abundanz eines Subsets von zytosolischen Eisen-Schwefel-Proteinen (Maio *et al.*, 2023). Zusammengefasst wird davon ausgegangen, dass Apo-Fe/S-Proteine in humanen Zelllinien instabil sind und abgebaut werden. Damit korreliert die Abundanz umgekehrt mit der Funktionalität der CIA-Maschinerie. Diese Arbeit konnte zeigen, dass die Stabilität der Apo-Fe/S-Proteine in *S. cerevisiae* individuell ist. Manche Fe/S-Proteine zeigten eine Verringerung der Abundanz um mehrere Ordnungsgrößen, während andere Fe/S-Proteine keine oder kaum Veränderung der Abundanz bei Fe/S-Mangel aufwiesen. Diese Auflistung (siehe Abbildung 88) kann als Basis für zukünftige Experimente an der CIA-Maschinerie genutzt werden.

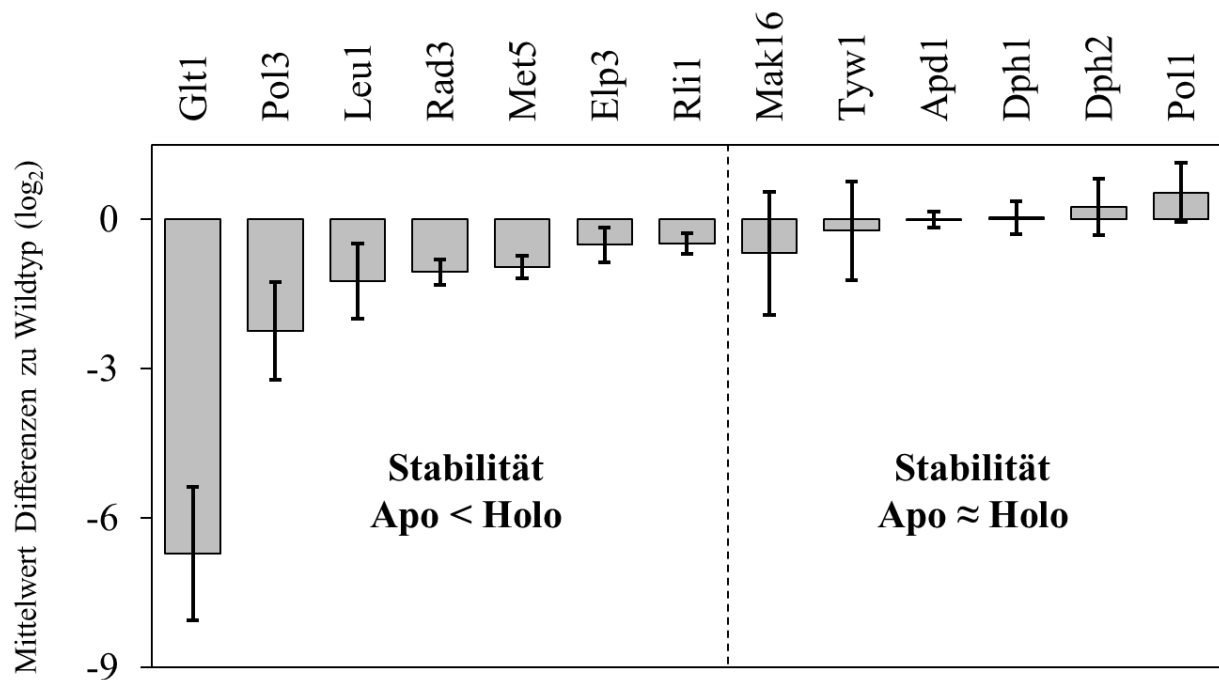


Abbildung 88: Instabilität von Apo-Fe/S-Proteinen. Gezeigt ist der Mittelwert (n = 3 oder 4) und die Standardabweichung der Differenz der CIA-abhängigen Fe/S-Proteine bei Depletion verschiedener CIA-Proteine (alle außer Grx3/4-, Yae1- und Lto1-Depletionsstämme) (Rohdaten 51).

Die Betrachtung zeigt, dass ein Vorliegen als Apoprotein einen Einfluss auf die Stabilität der Fe/S-Proteine hat, welcher für jedes Fe/S-Protein unterschiedlich ist. Mehr als die Hälfte zeigt eine deutliche Instabilisierung durch ihre verringerte Abundanz bei einer Störung der Fe/S-Biosynthese durch die CIA-Maschinerie. Insbesondere **Glt1**, **Pol3**, **Leu1**, **Rad3** und **Met5** eignen sich durch ihre relative Instabilität als Apoprotein sehr gut als Marker für die Funktionsfähigkeit der CIA-Maschinerie.

5.6.3 Betrachtung von Yae1- und Lto1-Klientenproteinen

Die Depletion von CIA-Proteinen sollte zu einem verringerten Einbau von Eisen-Schwefel-Clustern führen, was wiederum zu einer Verringerung der Abundanz von Eisen-Schwefel-Proteinen führen kann, entweder durch regulatorische Prozesse, oder durch eine Destabilisierung und damit schnelleren proteasomalen Abbau von Apo-Proteinen. Dementsprechend zeigen die CIA-depletierten Hefestämme starke, signifikante Änderungen der Fe/S-Biosynthese. Erstaunlicherweise sind diese Abundanzänderungen jedoch nicht gleichmäßig über alle Fe/S-Proteine verteilt, manche Proteine weisen eine stark verringerte

Abundanz auf, andere sind relativ stabil und wenige Fe/S-Proteine zeigen eine erhöhte Abundanz.

Es konnte klar gezeigt werden, dass Yae1 und Lto1, im Rahmen der bekannten und in dieser Arbeit detektierbaren Fe/S-Proteine, ausschließlich für die Beladung von Rli1 als Adaptorproteine dienen, da im Gegensatz zu allen anderen bekannten Fe/S-Proteinen die Depletion von Yae1 und Lto1 zu einer Verringerung der Abundanz um einen Faktor führt, der mindestens dem Mittelwert der Depletion aller CIA-Proteine entspricht (siehe Abbildung 89).

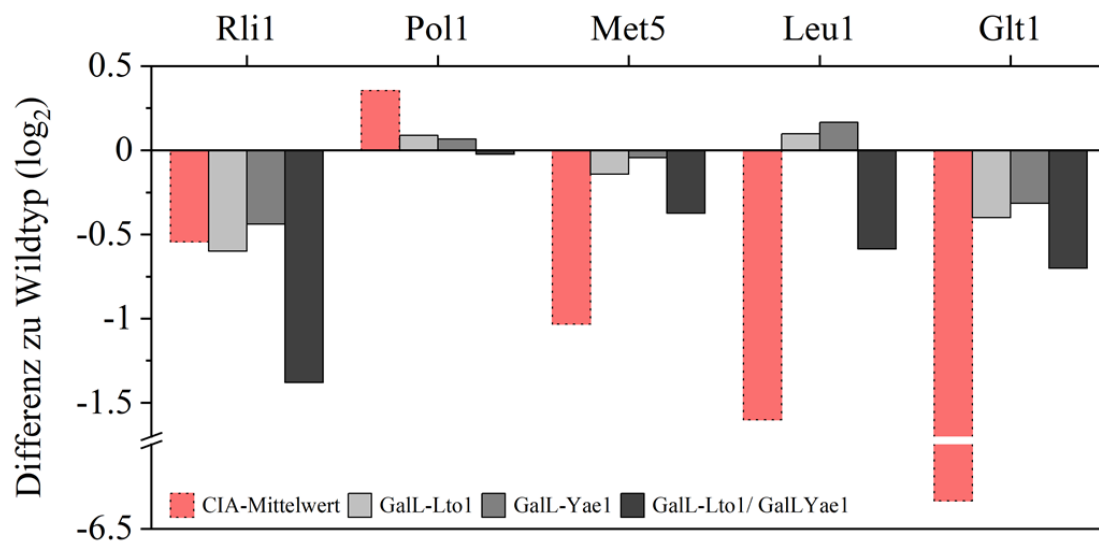


Abbildung 89: Yae1 und Lto1 als Adaptorprotein. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus Abbildung 73, wobei zu erkennen ist, dass nur Rli1 auf die Depletion von Yae1 und Lto1 eine Abundanzänderung zeigt, welche dem Durchschnitt der CIA-Proteine entspricht, oder ihn übertrifft (Doppelmutante).

Eine definitive Aussage kann nur zu Proteinen getroffen werden, welche als Apoprotein instabil sind (siehe Abbildung 88). Daher kann gesagt werden, dass die Proteine Glt1, Pol3, Leu1, Rad3, Met5 und Elp3 gesichert kein Klient der Adaptorproteine Yae1 und Lto1 sind. Die Klassifizierung von **Glt1** und **Elp3** als Nicht-Yae1/Lto1-Klienten ist bisher nicht beschrieben worden (siehe Tabelle 60 und Abbildung 73).

5.6.4 Auswirkungen auf den Metabolismus

Bereits die Wachstumskurven zeigten Unterschiede des Phänotyps der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Doppelmutanten zeigten besonders deutliche Phänotypen. Dabei kann das langsame Wachstum mehrere Ursachen haben. Eine mögliche Ursache ist eine verringerte

Expression von Proteinen, welche am Prozess der Proteinbiosynthese beteiligt sind. Das würde sich in einer allgemein verringerten Proteinbiosynthese äußern. Dieser Effekt ist allerdings nicht zu beobachten. Eine weitere Erklärung des Phänotyps kann eine Veränderung des Metabolismus darstellen. Hierbei zeigt sich, dass einige zentrale Enzyme des Energiestoffwechsels durch die Depletion der CIA-Maschinerie beeinflusst werden (siehe Abbildung 91). Insbesondere zu nennen sind bei der Glykolyse Fba1, Tpi1, Pyk2 und Cdc19. Fba1 ist ein zinkbindendes Metalloprotein. Andere Studien zeigten, dass Fba1 durch nitrosativen Stress inaktiviert wird, wodurch der Pentosephosphatweg zur Energiegewinnung und Erzeugung von NADPH gefördert wird, was zu einer Stresstoleranz führt (Shino *et al.*, 2022). Als Antwort auf Stickstoffmonooxid wird hier Cys112 modifiziert. Die in dieser Arbeit durchgeführte Bestimmung der in der CIA-Mutante verringerten Cysteinreaktivität (siehe Abbildung 90) wirft die Hypothese auf, dass ähnlich zum Mechanismus der Toleranz gegenüber nitrosativen Stress eine Modifikation von Cysteinen in Fba1 auch eine Antwort auf Defekte in der CIA-Maschinerie sein kann.

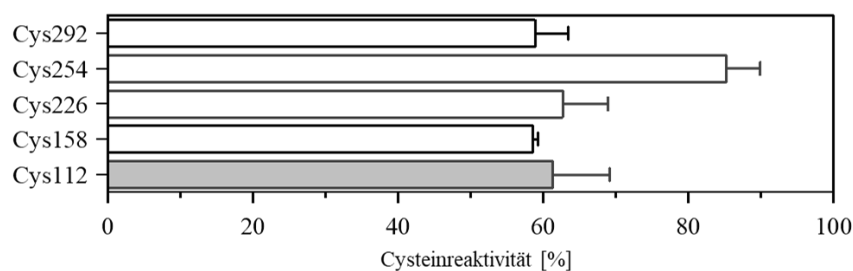


Abbildung 90: Cysteinreaktivität von Fba1 in Nar1-Mutanten. Gezeigt ist die Reaktivität von verschiedenen Cysteinresten des Glykolyseproteins Fba1 in einem Nar1-Depletionsstamm. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb von 3 Replikaten (Rohdaten 58).

Da die Cysteinreaktivität allerdings nur zeigt, dass die Cysteine eine Bindung eingegangen sind, sind hier weitere Experimente zur Bestimmung der Bindungspartner notwendig. Weiterhin sollten die Intermediate des Pentosephosphatweges und NADPH in der Zelle quantifiziert werden, da eine Störung der Glykolyse im Fall von nitrosativem Stress zu einer stärkeren Beanspruchung des Pentosephosphatweges führt. Weitere Ähnlichkeiten zur Antwort auf nitrosativen Stress wurden untersucht (Astuti *et al.*, 2016): Die Homologe der NO-Dioxygenase Yhb1, bzw. S-Nitrosoglutathionreduktase Fmd2 aus *S.pombe* (Yhb1, bzw. Sfa1 aus *S.cerevisiae*) wiesen in dieser Studie eine unveränderte Abundanz auf. Die Aktivität der Atmungskette wurde nicht bestimmt, allerdings lässt die signifikant verringerte Abundanz von Komplex II eine verringerte Aktivität vermuten, die Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} wurde auch nicht signifikant beeinflusst (siehe Anhang Abbildung 156).

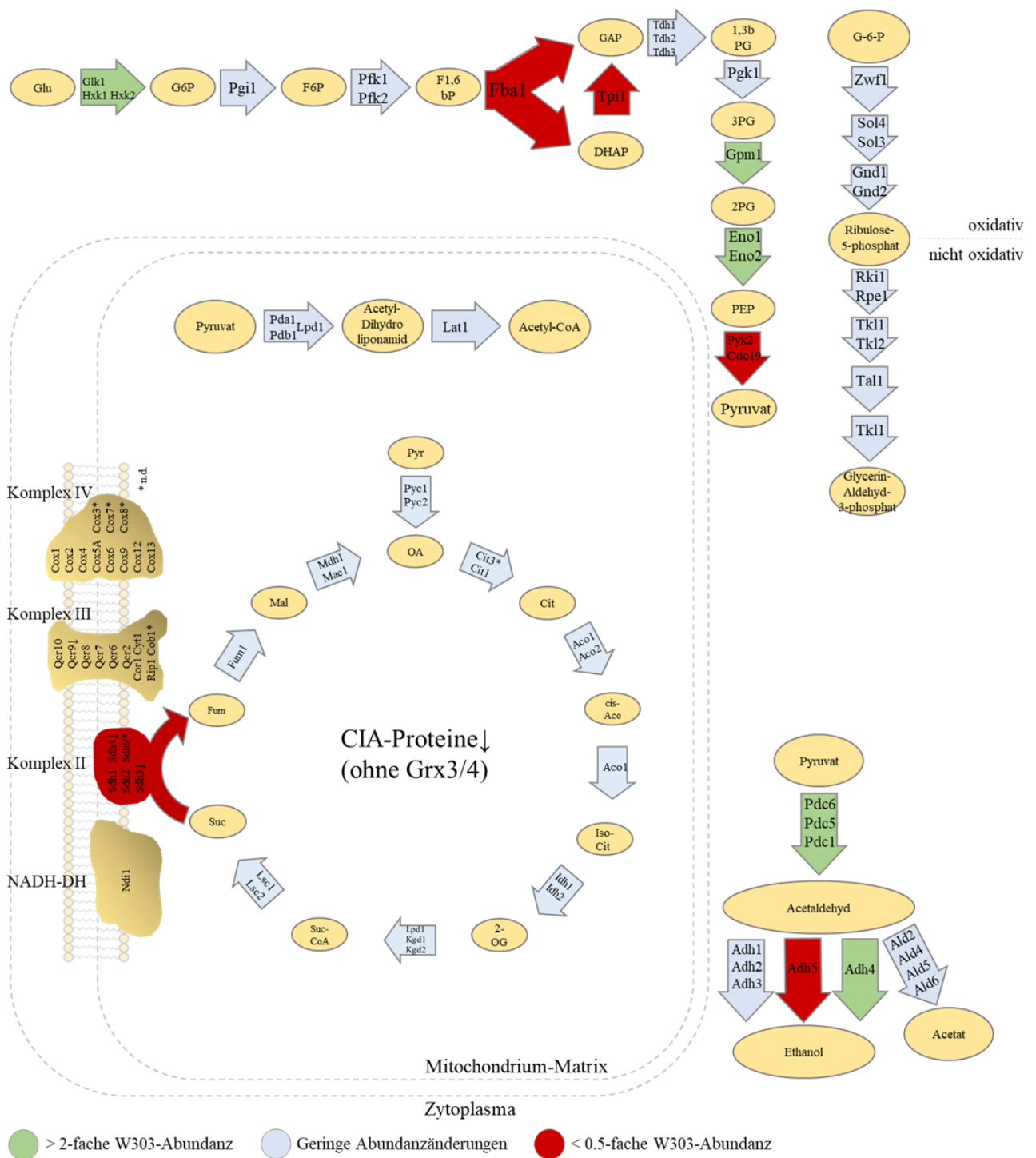


Abbildung 91: Auswirkungen der CIA-Depletion auf die wichtigsten Prozesse des Metabolismus. Gezeigt sind die Glykolyse, der Citratzyklus, die oxidative Phosphorylierung, die Fermentation, die Pyruvatdehydrogenase und der Pentosephosphatweg.

5.6.5 Auswirkungen auf Komplexstabilität

Neben der Destabilisierung der Eisen-Schwefel-Proteine selbst, könnten auch ihre Komplexpartner oder Adaptorproteine destabilisiert werden. Dementsprechend stellt sich die Frage, wie relevant die Stabilisierung von Fe/S-Proteinen durch ihre Komplexpartner, oder vice versa, ist. Dabei konnte für die Fe/S-haltigen Proteine **Met5**, **Mak16**, **Rli1**, **Ncs6**, **Elp3** und **Tyw1** eine signifikante Verringerung der Abundanz von Komplexpartnern gezeigt werden (siehe die zusammenfassende Abbildung 92). Die Interaktion dieser destabilisierten Komplexpartner ist ein spannender Ansatzpunkt um den Prozess weiter zu verstehen und Gesetzmäßigkeiten abzuleiten.

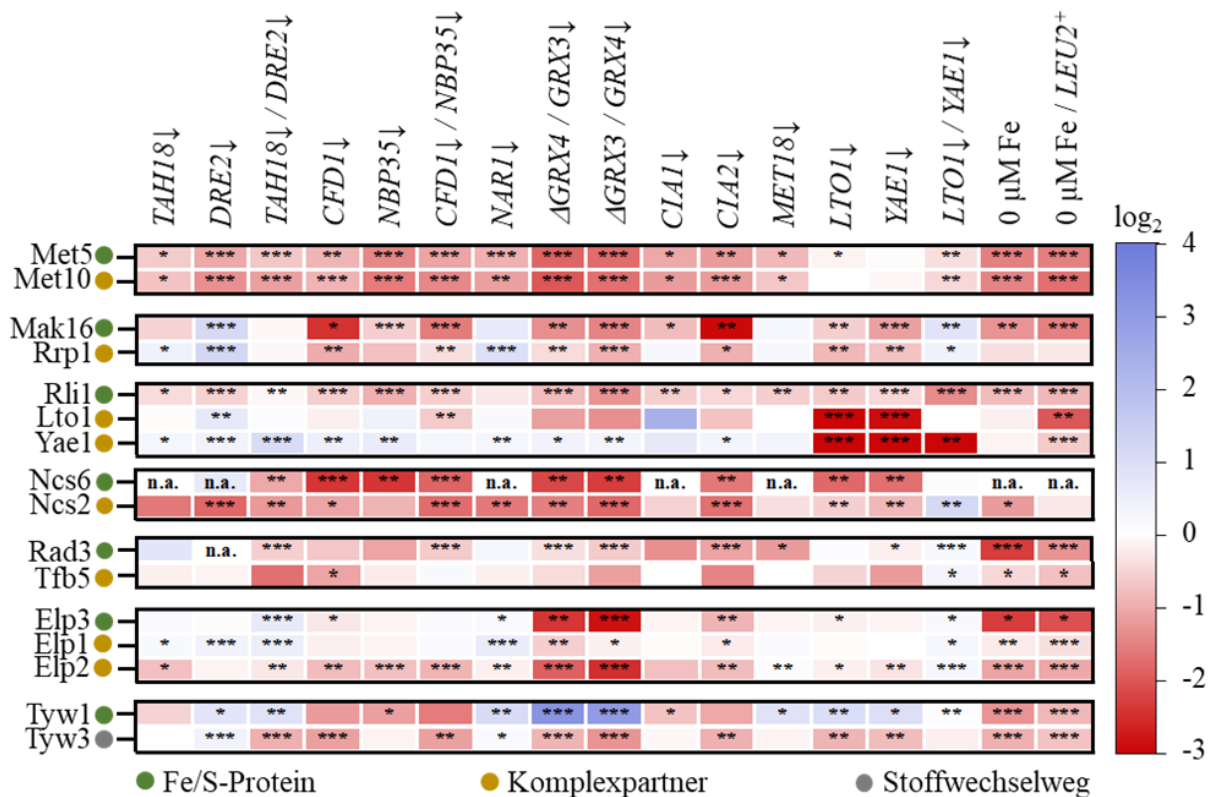


Abbildung 92: Komplexstabilität und Adaptorproteine von Eisen-Schwefel-Proteinen. Gezeigt sind die Auswirkungen verschiedener Depletionsbedingungen auf Eisen-Schwefel-Proteine (grün) und deren Komplexpartner (gelb) oder zusammenhängende Proteine (grau). Diese Zusammenfassung von Abbildung 58 beschränkt sich auf Proteine, deren Abundanz gesunken ist.

Met5 und Met10 bilden zusammen den Sulfid-Reduktasekomplex, wodurch eine gegenseitige Beeinflussung der Stabilität erklärt werden kann. Mak16 bildet einen Komplex mit vielen anderen Proteinen, darunter auch Nsa1 und Rpf1, allerdings ist nur die Abundanz und damit Stabilität von Rrp1 von einer verringerten Mak16-Abundanz beeinflusst. In Pull-Down-Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Fe/S-Kofaktor für die Stabilität dieses Komplexes (NSA-Modul) essentiell ist (Nadine Duppe, 2025). Ncs2 ist als Komplexpartner von

Ncs6, im Gegensatz zu anderen an der dieser tRNA-Modifikation beteiligten Proteinen, auch von einer Destabilisierung betroffen. Rad3 bildet im Transkriptionsfaktor IIH einen Komplex aus zehn verschiedenen Untereinheiten, wobei nur Tfb5 durch die verringerte Abundanz von Rad3 destabilisiert wird. Elp3 bildet einen Komplex aus zwei Subkomplexen, wobei einer dieser Subkomplexe aus den Proteinen Elp1, Elp2 und Elp3 besteht. Elp3 bedingt also die Stabilität des ersten Subkomplexes, der zweite Subkomplex ist jedoch nicht davon betroffen. Tyw3 bildet keinen bekannten Komplex mit Tyw1, ist jedoch das einzige messbare Protein des mit Tyw1 zusammenhängenden tRNA-Modifikationsprozesses, welches durch die verringerte Abundanz von Tyw1 destabilisiert wird.

5.6.6 Weitere Auswirkungen auf das Proteom anhand von GO-terms

Die Depletion von Proteinen der CIA-Maschinerie führte wie hier beschrieben (siehe Tabelle 67) zu einer Verringerung der Abundanz von 4Fe-4S-bindenden Proteinen (GO:0051539). Die Störung der Biosynthese von Lysin und Arginin (GO:0009085 und GO:0006526) sind in Zusammenhang mit der Auswirkung auf die Glt1-Abundanz zu setzen, da alle diese Biosynthesewege Glutamat und α -Ketoglutarat als Intermediat nutzen. Allerdings ist die Art der Beziehung genauer zu bestimmen, da die Datenlage keine Aussage über die Kausalität des Zusammenhangs erlaubt.

Tabelle 67: GO-terms Zusammenfassung. Gezeigt sind die signifikantesten GO-term Änderungen bei verschiedenen Depletionsbedingungen. Dabei sind Einzel- und Doppelmутanten in die Analyse einbezogen. Die GO-terms wurden dem Anhang Kapitel 8.8 entnommen. ¹ Die vorletzte Zeile enthält GO-terms unter CIA-Depletion, mit Ausnahme der Grx3↓, Grx4↓, Yae1↓ und Lto1↓-Depletionsbedingungen.

Stämme	Erhöhte Proteinabundanz	Verringerte Proteinabundanz
CIA↓ ¹	-	4Fe 4S cluster binding GO:0051539 Lysine biosynthesis GO:0009085 Arginine biosynthesis GO:0006526
Tah18↓ Dre2↓	Proteasomal protein catabolic process GO:0010498 Helicase activity GO:0004386 ATPase activity GO:0140657	4Fe4S cluster binding GO:0051539 FAD binding GO:0050660
Cfd1↓ Nbp35↓	Fructose metabolism GO:0006000 Glucose 6-phosphat metabolism GO:0051156 Cellular response to unfolded protein GO:0034620 GAPDH activity GO:0043878	Ornithine biosynthesis GO:0006592 Arginine biosynthesis GO:0006526 Lysine biosynthesis GO:0009085 SDH-activity GO:0008177 ADH-activity GO:0004022

Nar↓ Cia1↓ Cia2↓ Met18↓	-	Chorismate biosynthesis GO:0009423 Lysine biosynthesis GO:0009085 Arginin biosynthesis GO:0006526 Histidine biosynthesis GO:0000105 Transaminase activity GO:0008483 4Fe4S cluster binding GO:0051539
Grx3↓ Grx4↓ Fe↓	Glucose import GO:0098708 Hexokinase activity GO:0004396 Glucokinase activity GO:0004340 Mannokinase activity GO:0019158 Fructokinase activity GO:0008865	2-oxoglutarate metabolic process GO:0006103 Oxidative phosphorylation GO:0006119 Long-chain fatty acid biosynthesis GO:0042759 Oxoglutarate dehydrogenase GO:0004591
Yae1↓ Lto1↓	Regulation of intracellular pH GO:0051453 Cellular response to unfolded protein GO:0034620 Heatshockprotein binding GO:0031072 Misfolded protein binding GO:0051787	Cytoplasmic translation GO:0002181 Maturation of SSU rRNA GO:0000462 structural constituent of ribosome GO:0003735 rRNA binding GO:0019843
Dre2↓	-	Ubiquitin-protein transferase activity GO:0004842 Protein ubiquitination GO:0016567

Die Daten aus Kapitel 4.8.2 und Anhang Kapitel 8.8 zeigen außerdem ein „Branching“ der CIA-Maschinerie. Neben den betrachteten Auswirkungen, zeigen verschiedene Teile der CIA-Maschinerie unterschiedliche Auswirkungen auf die Zelle. Die GO-term-Analyse zeigt einen Einfluss der frühen CIA-Faktoren auf die Proteolyse (GO:0010498) und die Replikation oder Proteinbiosynthese (GO:0004386), also Prozesse, die Helikasen involvieren. Die Depletion der Proteine Cfd1 und Nbp35 zeigen starke Auswirkungen auf den Energiestoffwechsel (GO:0006000, GO:0051156 und GO:0043878) und die Proteolyse (GO:0034620). Die Biosynthese von Aminosäuren wird gehemmt. Die Depletion des CTC zeigt auch eine Hemmung der Aminosäurebiosynthese. Die Depletion von Eisen, Grx3 und Grx4 zeigt wiederum eine starke Auswirkung auf Prozesse, welche α -Ketoglutarat als Intermediat oder Substrat nutzen. Erstaunlicherweise hat die Depletion der Adaptorproteine Yae1 und Lto1 eine signifikante Auswirkung auf die pH-Regulation der Zelle (GO:0051453), sowie wiederum eine Auswirkung auf die Proteolyse und im Gegensatz zu den frühen CIA-Proteinen führt die Depletion von Yae1 und Lto1 zu einer Verringerung der zur Proteinbiosynthese benötigten Ribosomen (GO:0003735). Eine Depletion von Dre2 zeigt besondere Auswirkungen auf die Ubiquitin-regulierte Proteolyse (GO:0004842 und GO:0016567).

Es ist zu vermuten, dass viele der Änderungen im Bereich der Proteolyse, DNA-Replikation/-Reparatur und Proteinbiosynthese darauf zurückzuführen sind, dass ein defekter Fe/S-Einbau dazu führt, dass die Zelle nicht funktionsfähige Apo-Fe/S-Proteine über den Ubiquitin-

Proteasomweg abbaut und neu synthetisiert. Obwohl es Hinweise auf die vielfältigen Auswirkungen der CIA-Maschinerie-Defekte gibt, ist durch die weite Verbreitung von Fe/S-Proteinen in verschiedensten Stoffwechselwegen, Vorgängen und Prozessen und die dadurch entstehenden multiplen Auswirkungen auf das Proteom eine genaue Festlegung schwierig.

5.7 Proteomics der Grx3/4- und Eisendepletion

Die Fe/S- und Eisen-Homöostase ist eng verbunden. Insbesondere die Proteine Grx3 und Grx4 erfüllen eine duale Rolle, da sie sowohl direkt an der Eisenhomöostase beteiligt sind, als auch auf bisher nicht vollständig geklärte Weise mit der CIA-Maschinerie assoziiert sind. Ein Vergleich der Proteomdaten von CIA-, Eisen- und Grx3/4-depletierten Zellen zeigt eine stärkere Ähnlichkeit der Auswirkungen auf die Proteome von Eisen- und Grx3/4-depletierten Zellen als von CIA- und Grx3/4-depletierten Zellen. Da die Rolle von Grx3/4 in der CIA-Maschinerie und dem Eisenhaushalt noch nicht endgültig geklärt ist, ist ein von den Daten der CIA-Depletionsbedingungen getrennter Vergleich der Proteomdaten dieser beiden Bedingungen unerlässlich.

5.7.1 Die Sonderrolle von Tyw1

In den meisten Fällen zeigen Proteine ein ähnliches Verhalten bei Eisen- und Grx3/4-Depletion. Eine Ausnahme bildet das im Eisenhaushalt involvierte Fe/S-Protein Tyw1. Die Abundanz von Tyw1 wird besonders stark durch die Depletion von Grx3 und Grx4 beeinflusst. Tyw1, dessen Gentranskription durch hohe Eisenverfügbarkeit unter Beteiligung von Yap5 induziert werden kann, zeigt bei der Depletion von Grx3/4 eine stark erhöhte Abundanz. Die Depletion von Eisen führt im Gegenteil zu einer Verringerung der Abundanz von Tyw1 (siehe Abbildung 93). Gleichzeitig hat die Depletion anderer CIA-Proteine eine weniger ausgeprägte Auswirkung auf die Abundanz. Diese Beobachtung bestätigt eine Beteiligung von Grx3 und Grx4 in der Eisenhomöostase, allerdings über einen anderen, bisher unbekannten, Mechanismus als die Regulation durch Eisenmangel. Auszuschließen ist eine Regulation über Aft1, eine direkte Antwort auf tRNA-Modifikationen und eine Regulation über die Fe/S-Stabilität.

Andere Studien schlagen Tyw1 als Protein zur Pufferung der Eisenkonzentration im Zytosol vor (Li *et al.*, 2011). Bezieht man diese Annahme ein, ergibt sich eine Hypothese zur Erklärung der Beobachtungen. Grx3 und Grx4 wirken dabei als negative Regulatoren der Eisenaufnahme. Die Depletion führt zu einer Aktivierung von Eisenaufnahmeprozessen, was zu einem Anstieg intrazellulärer Eisenverfügbarkeit führt. Als Reaktion wird Tyw1 vermehrt

exprimiert um überschüssiges Eisen zu puffern. Bei einem echten Eisenmangel hingegen wird Tyw1 unterdrückt um Ressourcen zu schonen. Diese Hypothese kann als sehr unwahrscheinlich angesehen werden, da Tyw1 als Eisenpufferprotein ungeeignet erscheint. Zum Einen weist Tyw1 eine geringe Abundanz von etwa 4000 Molekülen pro Zelle auf, zum Anderen würde das die Pufferwirkungen an die Abundanz von Schwefel und den komplexen Prozess der Fe/S-Biogenese binden, wodurch die Speicherung mit einem hohen Energieaufwand verbunden wäre. Dennoch ist ein Erklärungsansatz, welcher die Dichotomie von echtem und wahrgenommenen Eisenmangel miteinbezieht, näher zu betrachten.

Möglicherweise kann Grx3/4 als Hemmer der Eisenaufnahme charakterisiert werden, dabei wird aber nur ein Teil der Zellantwort auf Eisenmangel beeinflusst. Möglicherweise reguliert Grx3/4 einen Prozess weiter downstream als andere Proteine die in der Eisenhomöostase wirken.

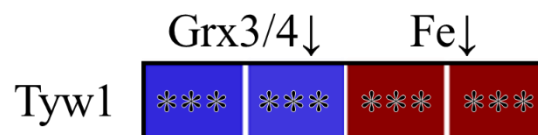


Abbildung 93: Unterschiede von Tyw1 bei verschiedenen Depletionsbedingungen. Gezeigt ist die Abundanz von Tyw1 in Grx3-, Grx4- und Eisendepletionsstämmen. Blau entspricht einer Anreicherung, Rot einer verringerten Abundanz. Die Signifikanz entspricht einem q-Wert unter 0.001 (***).

5.7.2 Unterschiede zwischen Grx3/4-, CIA- und Eisendepletion

Die CIA-Proteine Grx3 und Grx4 sind für ihre doppelte Rolle bekannt. Sie haben sowohl Verbindungen zur CIA-Maschinerie, als auch eine Rolle in der Eisenhomöostase, wobei es ein Ziel dieser Arbeit ist, diese Doppelrolle genauer zu definieren. Die Depletion dieser Proteine und von Eisen zeigt, dass die Abundanz einer kleinen Anzahl an Proteinen von der Abundanz von Grx3/4 und Eisen, nicht jedoch der restlichen CIA-Maschinerie abhängt (siehe Abbildung 94). Es gibt keine Schnittmenge, welche auf die Depletion von Grx3/4, aber nicht auf CIA- oder Eisendepletion reagiert. Auch sind keine signifikanten Änderungen bei einer Depletion von der CIA-Maschinerie inklusive Grx3/4 zu sehen, welche nicht auch unter Eisendepletion signifikante Änderungen zeigen. Die Auswahl der folgenden 16 Proteine kann also wahrscheinlich ausschließlich der Funktion von Grx3/4 in der Eisenhomöostase zugeschrieben werden und ist nicht auf die Funktion in der Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern zurückzuführen.

Untersucht man diese 16 Proteine, so fällt auf, dass die größte Gruppe (sechs) erwartungsgemäß der Eisenhomöostase zugeordnet werden können. Entgegen der Erwartung zeigten sich auch Proteine der Kupferhomöostase, sowie der Elektronentransportkette und Regulation der Zellatmung (siehe Abbildung 95).

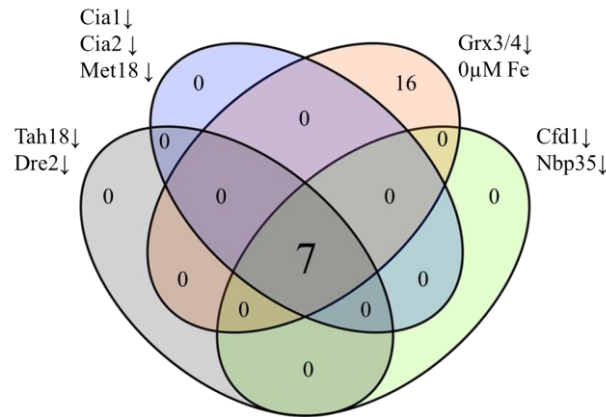


Abbildung 94: Venn-Diagramm CIA- und Eisendepletion. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus Abbildung 75, welcher die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Abundanz von Proteinen bei Depletion von CIA-Proteinen und Eisen darstellt.

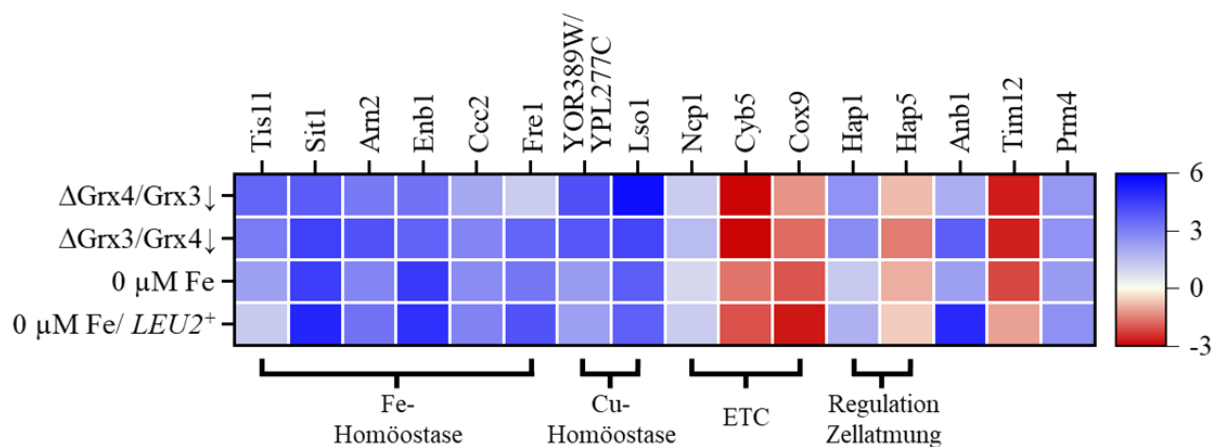


Abbildung 95: Gemeinsamkeiten von Grx3/4- und Eisendepletion. Gezeigt sind die Differenzen der Abundanzen von Proteinen in Depletionsstämmen verglichen mit dem Wildtyp. Diese 16 Proteine zeigen signifikante Veränderungen unter Grx3/4- und Eisendepletion, nicht jedoch bei der Depletion anderer CIA-Proteine.

Eine Untersuchung der nicht Grx3/4-abhängigen Abundanzänderungen bei Eisenmangel zeigt Proteine mit erhöhter und verringerter Abundanz (siehe Abbildung 96). Eine erhöhte Abundanz zeigt eine Reihe von Proteinen, welche als Stressantwort exprimiert werden können. Dabei sind zum Beispiel Q04471 und Spo14 an DNA-Instandhaltung beteiligt, während Rgi2 und Usv1 am Energiestoffwechsel beteiligt sind. Eine verringerte Abundanz zeigen Proteine,

welche in der Antwort auf ungefaltete Proteine agieren (Emp24), an der DNA-Instandhaltung (Mph1 und Dat1) und dem Energiestoffwechsel (Cox11) beteiligt sind. Diese Proteine sind also an einer Eisenmangel-spezifischen Proteomänderung beteiligt, welche nicht mit einem Defekt der Fe/S-Biogenese zusammenhängen.

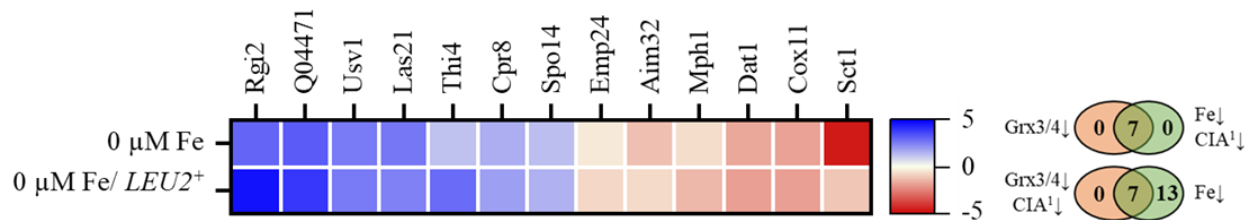


Abbildung 96: Unterschiede von Eisen- und CIA-Depletion. Gezeigt sind die Differenzen der Abundanzen von Proteinen in Depletionsstämmen verglichen mit dem Wildtyp. Diese 13 Proteine zeigen Veränderungen unter Eisendepletion, nicht jedoch bei der Depletion der CIA-Proteine inklusive Grx3/4. Rechts gezeigt ist die Schnittmenge von weiteren signifikanten Abundanzänderungen in Depletionsstämmen (¹CIA-Proteine ohne Yae1, Lto1, Grx3 und Grx4).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass Grx3/4 eine Doppelrolle erfüllt und möglicherweise die Eisenhomöostase und zytosolische Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthese regulatorisch verbindet. Insbesondere zeigt die Depletion von Grx3/4 und Eisen signifikante Abundanzänderungen desselben Vorzeichens, während gleichzeitig keine signifikanten Gemeinsamkeiten zwischen der CIA- und Grx3/4-Depletion festgestellt werden konnten, welche nicht auch bei einer Eisendepletion vorlagen. Dies führt mich zu der Annahme, dass die Hauptrolle von Grx3/4 in der Regulation der Eisenhomöostase und nicht in der Fe/S-Biogenese liegt, in Übereinstimmung mit rezenten Daten (Braymer *et al.*, 2024).

5.7.3 Export des Fe/S-Präkursors aus den Mitochondrien

Eine weitere ungeklärte Frage ist die Art des exportierten Präkursors aus den Mitochondrien, welcher als Grundlage für die zytosolische Eisen-Schwefel-Biogenese dient. Dafür gibt es verschiedene Theorien: Zum einen ist ein Export als schwefelhaltiger Stoff (X-S) naheliegend, zum anderen wäre es aber auch denkbar, dass zum Beispiel ein 2Fe/2S-Cluster direkt exportiert wird. Der Export von 2Fe/2S-Clustern würde jedoch implizieren, dass ein geringerer Fe/S-Bedarf des Zytosols für das in W303 sehr abundante Leu1 im *LEU2*⁺-Stamm (mit einem niedrigeren Leu1-Gehalt) dagegen zu einer höheren Verfügbarkeit von 2Fe/2S-Clustern der Mitochondrien bei dieser Mutante und gleichbleibenden Eisenverfügbarkeit führt. Dieser Effekt

ist jedoch nicht feststellbar (Abbildung 97). Dies festigt wiederum die Theorie des Export-Präkursors X-S.

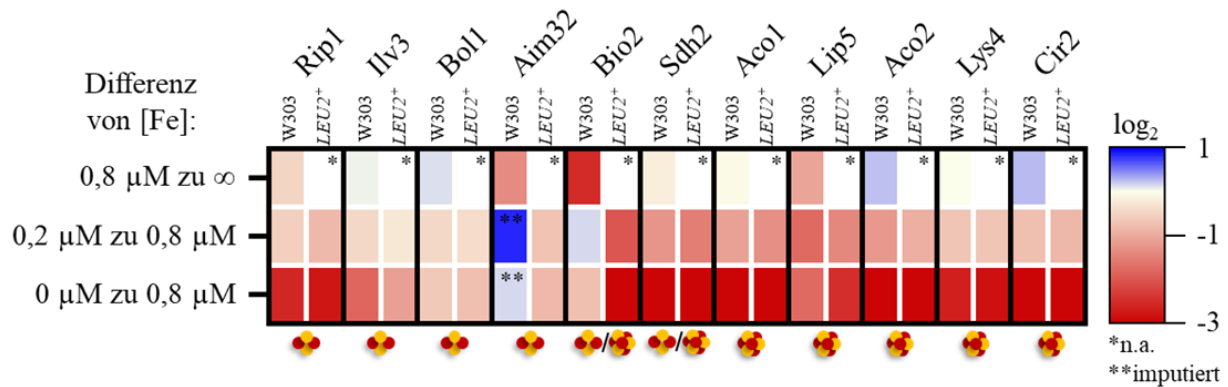


Abbildung 97: Abundanz mitochondrialer FeS-Proteine bei Eisendepletion. Gezeigt ist die Änderung der Abundanz von mitochondrialen Eisen-Schwefel-Proteinen bei Eisenmangel gegenüber ausreichendem Eisen. Unter den verschiedenen Bedingungen wurden jeweils Wildtyp (W303) und *LEU2⁺*-Zellen untersucht. Eine Versuchsreihe wurde in normalem SC-Medium unter starkem Eisenüberschuss gewachsen.

5.8 Fe/S-Screening mittels reaktiver Cysteine

5.8.1 Cysteinreaktivität bekannter Fe/S-Proteine

Die Depletion von CIA-Proteinen führt zu einem verringerten Einbau von zytosolischen Fe/S-Kofaktoren in die Zielproteine. Bei einer Depletion von CIA-Proteinen kann also ein höherer Anteil an Apoproteinen vorhanden sein, welche an den Fe/S-Bindungsstellen Cysteine mit freien SH-Gruppen, sogenannte reaktive Cysteine, aufweisen. Eine Quantifizierung dieser reaktiven Cysteine erlaubt es zu überprüfen, ob ein Fe/S-Protein als Apo- oder Holoprotein vorliegt. Proteine, welche sich ähnlich zu bekannten Eisen-Schwefel-Proteinen verhalten sind möglicherweise auch uncharakterisierte Eisen-Schwefel-Proteine. Unter den Proteinen, welche die höchste Cysteinreaktivität zeigen, sind Eisen-Schwefel-Proteine überproportional vertreten (siehe Tabelle 68). Aber auch Proteine mit Zink als Kofaktor sind überproportional abundant (siehe Abbildung 98). Mit Hilfe dieser Methode konnten mit 1700 Peptiden von 937 Proteinen ungefähr ein Fünftel des Hefeproteoms detektiert und quantifiziert werden. Da die Vermutung naheliegt, dass bisher uncharakterisierte Eisen-Schwefel-Proteine wahrscheinlich

nicht hoch abundant sind, ist diese Methode nur bedingt geeignet um das Eisen-Schwefel-Proteom zu charakterisieren.

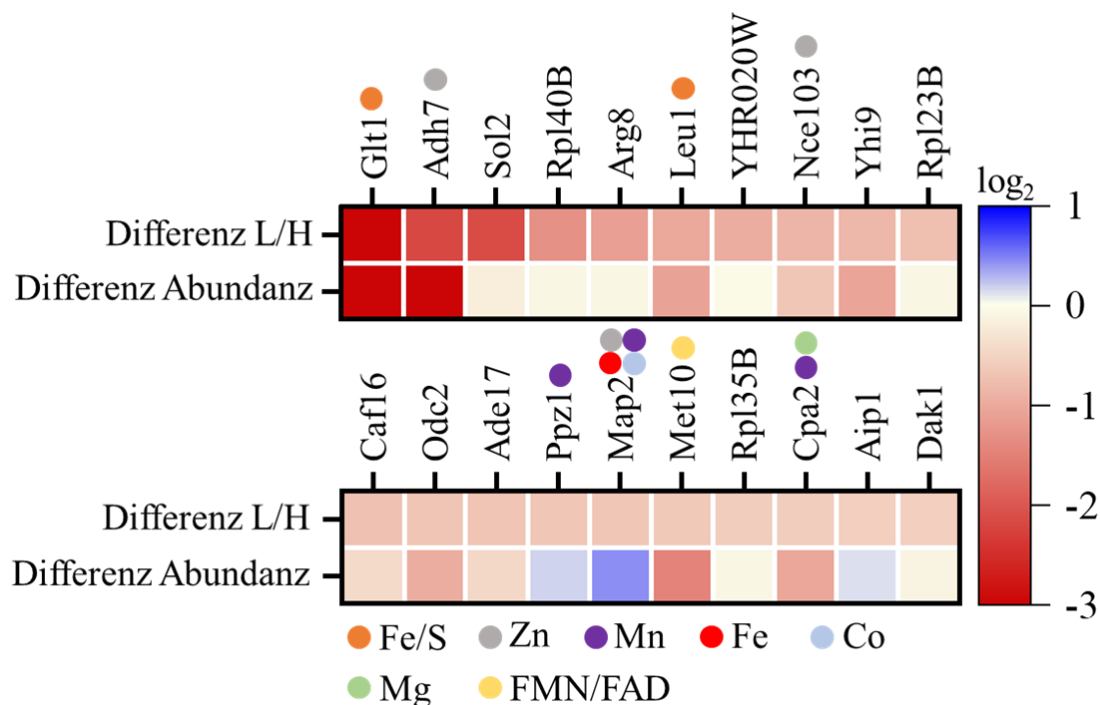


Abbildung 98: Cysteinreaktivität bei Nar1-Depletion. Gezeigt ist die Differenz von leichten zu schweren Isotopen und damit die Differenz der normalisierten Reaktivität von Cysteinen zwischen einer Nar1-Depletionsmutante und dem Wildtyp. Bei mehreren quantifizierten cysteinhaltigen Peptiden wurde der Mittelwert aufgetragen. Außerdem ist die Differenz der Abundanz der gezeigten Proteine zwischen Mutante und Wildtyp zu sehen. Eine negative Differenz zeigt eine erhöhte Cysteinreaktivität bzw. eine verringerte Abundanz der Proteine in der Mutante.

Die Betrachtung der zugeordneten Cysteinreaktivitäten (siehe Abbildung 100) in der Kristallstruktur von Glt1 (siehe Abbildung 81) zeigt besonders hohe Reaktivitäten dieser Cysteinreste. Auffällig ist, dass nur cysteinhaltige Peptide detektiert wurden, welche in der Tertiärstruktur nahe der Oberfläche liegen. Möglicherweise ist dies durch die hohe Größe dieses aus 2145 Aminosäuren zusammengesetzten Proteins bedingt, sodass das isotopenmarkierte Reagenz keine Cysteinreste im Inneren erreichen kann. Im Gegensatz dazu konnten bei dem kleineren Fe/S-Protein Leu1 die Cysteinreaktivitäten der Kofaktorliganden und weiterer cysteinhaltiger Peptide zuverlässig bestimmt werden (siehe Abbildung 80).

5.8.2 Proteine mit hoher Cysteinreaktivität

Unter den 20 Proteinen mit den reaktivsten Cysteinen konnten überdurchschnittlich viele Fe/S-Proteine identifiziert werden, weshalb eine nähere Untersuchung der anderen dort vertretenen Proteine sinnvoll erscheint.

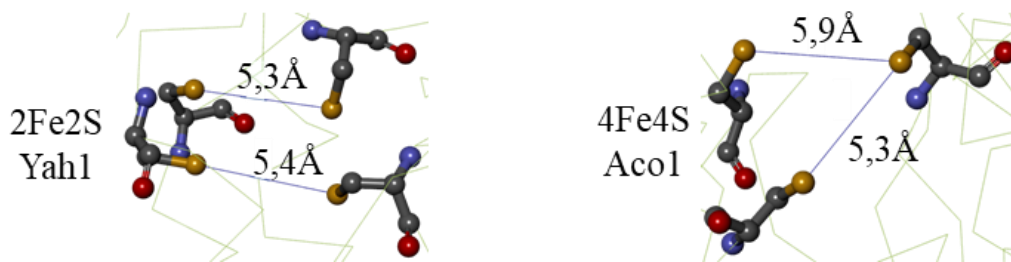


Abbildung 99: Beispiel für die Geometrie von 2Fe2S- und 4Fe4S-Kofaktoren. Gezeigt sind AlphaFold2-Modelle der kofaktorbindenden Cysteine der Proteine Yah1 (AF-Q12184-F1, links) und Aco1 (AF-P19414-F1, rechts), sowie deren Abstände.

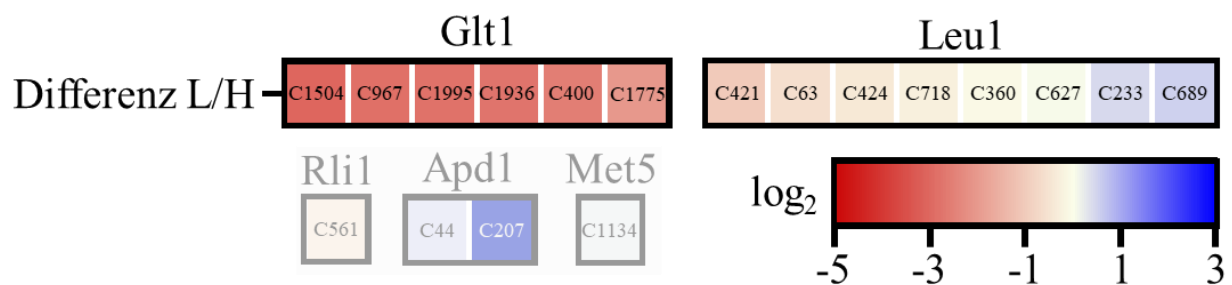


Abbildung 100: Cysteinreaktivität von Fe/S-Proteinen bei Nar1-Depletion. Gezeigt ist die Differenz von leichten zu schweren Isotopen und damit die Differenz der normalisierten Reaktivität von Cysteinen zwischen einer Nar1-Depletionsmutante und dem Wildtyp. Eine negative Differenz zeigt eine erhöhte Cysteinreaktivität der Proteine in der Mutante. Die Cysteinreaktivität ist zudem nach Position des Cystein aufgelöst.

Betrachtet man die Proteine mit reaktiven Cysteinen, so ist auffällig, dass die reaktiven Cysteine stark konserviert sind. Das legt eine integrale Funktion dieser Cysteine für die Funktion des Proteins nahe. Vergleicht man die Abstände der reaktiven Cysteine der AlphaFold-Vorhersagen mit den Abständen in bekannten FeS-Proteinen, zeigen sich keine Proteine mit Abständen zwischen den funktionellen Gruppen der Cysteine in einem Bereich von 4,5 Å bis 6,5 Å. Beispiele für Abstände Fe/S-kordinierender Cysteinreste sind Abbildung 99 zu entnehmen. Allerdings gibt es mehrere Proteine mit Abständen, welche fast diesen Abstand aufweisen. Dabei ist es denkbar, dass die Vorhersagen von AlphaFold nicht exakt sind, weshalb hier Proteine mit Abständen zwischen 3,5 Å und 7,5 Å berücksichtigt werden sollten. Auch alternative Liganden wie Histidin oder Aspartat wurden in dieser Analyse nicht betrachtet. Keines der Proteine, bis auf die bekannten Fe/S-Proteine Leu1 und Glt1, zeigt Ähnlichkeiten der Cysteinanordnung zu Fe/S-Proteinen.

Tabelle 68: Auswertung der 20 reaktivsten Cysteine bei Nar1-Depletion. Gezeigt sind die 20 reaktivsten Cysteine bei Nar1-Depletion, sowie der zugehörigen Proteine. Zudem wird die Anzahl der Cysteine und Histidine des Monomers gezeigt. ^[1] Die Konservierung der reaktiven Cysteine wird durch die niedrigste prozentuale Identität ähnlicher Proteine angegeben, bei denen noch das Cystein konserviert ist. ^[2] Bei vielen Proteinen konnten keine Homologe ohne das konservierte Cystein gefunden werden, daher wurde die Identität (in %) des am weitesten entfernten Homolog notiert. Die Cysteindistanz bezieht sich auf den Abstand zwischen dem reaktiven Cystein und dem nächstliegenden Cystein. Die Berechnung erfolgte anhand der Alphafold2-Strukturen (F1, v4).

Protein	reaktive Cysteine	Anzahl Cys/His	Konservierung Cys ¹	Distanz zum nächsten Cys (Alphafold)
Glt1	C1504 C967 C1995 C1936 C400 C1775	38/48	99% ²	15.4 Å; 20.2 Å; 21.8 Å; 21.8 Å; 7.9 Å; 20.3 Å
Adh7	C100 C178	10/14	62% ² 62% ²	3.7 Å; 11.6 Å
Sol2	C137	5/10	91%	16.5 Å
Rpl40B	C115 C91	5/2	98% ² 98% ²	3.9 Å; 3.9 Å
Arg8	C35 C95	6/12	72% 63%	31 Å; 4.5 Å
Leu1	C421 C424 C360 C63 C718 C627 C233 C689	11/17	75% ² 75% ² 75% ² 75% ² 75% ² 75% ² 75% ² 93%	6.1 Å; 4.9 Å; 4.9 Å; 14.6 Å; 21.9 Å; 15.0 Å; 15.0 Å; 21.9 Å
Yhr020W	C682	9/13	75% ²	9.4 Å
Nce103	C84 C121	9/10	60% 49%	11.0 Å; 13.2 Å
Yhi9	C88 C227 C107	4/5	39% 38% ² 38% ²	12.5 Å; 20.0 Å; 12.5 Å
Rpl23B	C122 C25	2/0	85% ² 85% ²	12.7 Å; 12.7 Å
Caf16	C60	3/7	54%	26.0 Å
Odc2	C159 C99	5/1	94% 63%	20.9 Å; 25.6 Å
Ade17	C433	6/12	83% ²	9.8 Å
Ppz1	C600 C482	12/24	66% ² 66% ²	4.9 Å; 7.6 Å
Map2	C359 C272 C171	4/14	62% ² 63% 66%	14.4 Å; 10.7 Å; 10.4 Å;
Met10	C537	2/15	99% ²	77.5 Å
Rpl35B	C53	1/0	93%	-
Cpa2	C300 C600 C657 C170 C862 C678	11/16	80% ² 80% ² 80% ² 80% ² 80% ² 82%	7.0 Å; 15.5 Å; 4.3 Å; 27.9 Å; 15.5 Å; 4.3 Å
Aip1	C166 C132 C82	8/13	64% ² 64% ² 64%	3.5 Å; 3.5 Å; 10.1 Å
Dak1	C197	5/9	68% ²	29.6 Å

5.8.3 Proteine mit geringer Cysteinreaktivität

Neben den Proteinen, welche eine erhöhte Reaktivität aufweisen, was auf einen Verlust an Kofaktor hinweist, können auch Proteine, welche eine stark verringerte Reaktivität aufweisen neue Erkenntnisse liefern. Die sechs Proteine mit der größten Verringerung sind Bds1, Cup1-2, Apd1, Gtt2, Trr1 und Ahp1.

Bds1 ist eine wenig erforschte Sulfohydrolase, welche primäre Alkylsulfate als Substrat nutzt (Waddell *et al.*, 2017). Cup1-2 ist ein Metallothionein, dessen Abundanz durch die Abundanz von Kupfer reguliert ist und an dessen Homöostase in Zytosol und Mitochondrien beteiligt ist (Kim & Lindahl, 2023). Gtt2 ist eine Glutathiontransferase, welche unter anderem zur Resistenz gegen oxidativen Stress beiträgt (Ugalde *et al.*, 2021). Trr1 ist eine Thioredoxin-Reduktase, welche zum zytosolischen Thioredoxin-System gehört (Brachmann *et al.*, 2020). Ahp1 ist ein Peroxiredoxin, welches an der Entgiftung von Peroxiden beteiligt ist und mit dem Thioredoxinsystem interagiert (Brachmann *et al.*, 2020). Das Vorkommen von Apd1 zusammen mit redoxaktiven Proteinen bestärkt die Hypothese, dass Apd1 eine Rolle in der intrazellulären Redoxhomöostase spielt (Tang *et al.*, 2015).

Bds1 zeigt auch eine deutliche Abundanzerhöhung bei der Depletion von CIA-Proteinen, aber nicht bei Eisendepletion, was eine Abhängigkeit vom CIA-System nahelegt.

Auffällig ist hierbei die Häufung von Proteinen des Thioredoxinsystems. Während die Cysteinreaktivität auf eine Aktivierung dieses Systems hinweist, zeigt die Abundanz dieser Proteine keine Änderung.

5.9 Bewertung der Aussagekraft von Proteomics

Die Normalisierung von MS-Daten ist ein Faktor, welcher Abweichungen der MS-Daten von der Realität erzeugt. Dabei funktioniert die Normalisierung von Daten über MaxLFQ so, dass davon ausgegangen wird, dass in mehreren Proben ein Großteil des Proteoms kaum Veränderung aufzeigt (Cox *et al.*, 2014). Das führt zu guten Ergebnissen bei Experimenten mit geringer Veränderung des Proteoms. Der Fehler erhöht sich dadurch jedoch mit stärker veränderten Proteinabundanzen und Proteomzusammensetzungen. Gerade bei Experimenten mit Änderungen des Metabolismus kann durch die vielfältige Antwort der Zelle

auf die Bedingungen die Normalisierung durch MaxLFQ zu ungenauen Werten führen. Allerdings ist für die hier verwendete Probenart auch keine andere Normalisierungsmethode besser geeignet, wie zum Beispiel bei der Normalisierung mittels Histon-Abundanz als „housekeeping“-Proteine in Abbildung 50 zu entnehmen ist. Eine Normalisierung mittels Quantifizierungsstandard wäre möglich um die Vergleichbarkeit der einzelnen Messserien zu verbessern, allerdings führt das wieder zu einer erhöhten Komplexität, wodurch neue Fehler entstehen können. Dennoch haben Proteomics mittels MS gegenüber alternativen Methoden viele Vorteile. Neben der Quantifizierung von nahezu allen Proteinen der Zelle in einem Experiment ist gerade bei hochabundanten Proteinen die Genauigkeit gegenüber einer Quantifizierung durch Western-Blots deutlich überlegen. Besonders gut ist dies am Beispiel von Leu1 zu erkennen, welches in Western-Blots durch die hohe Abundanz schwierig zu quantifizieren ist. Wichtig ist es weitere Experimente durchzuführen um die Daten der MS-Messungen zu interpretieren, zum Beispiel erlauben parallele Aktivitätsmessungen der Fe/S-Enzyme eine Korrelation von Kofaktorgehalt und Proteinstabilität.

6. Ausblick

Die vorliegende Arbeit bietet Einblicke in die Rolle der CIA-Maschinerie bei der Reifung von Fe/S-Proteinen und deren Auswirkungen auf zelluläre Prozesse. Die umfangreiche Datenanalyse und experimentelle Validierung öffnete neue Fragen, deren Beantwortung neue Erkenntnisse über die Regulation und Funktion dieser essenziellen Prozesse ermöglichen könnte.

In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Stöchiometrie des CTC aus Cia1, Cia2 und Met18 eine Rolle in der Fe/S-Biogenese spielt. Eine Dreifach-Depletionsmutante könnte hierbei den Datensatz vervollständigen. Alternativ wäre es auch möglich die genomischen Kopien der Gene durch plasmidbasierte Kopien zu ersetzen um die Stammherstellung zu vereinfachen.

Ein wesentliches biologisches Problem ist die eingeschränkte Nachweisbarkeit niedrigabundanter Fe/S-Proteine. Diese Proteine wie Ntg2 oder Chl1 könnten durch eine plasmidbasierte, kontrollierte und moderate Überexpression besser detektiert, charakterisiert und auf ihre Stabilität als Apoprotein hin untersucht werden. In diesem Kontext wäre es auch vielversprechend verschiedene Fe/S-Proteine in CIA-Depletionsstämmen zu überexprimieren und anhand der Abundanzänderungen der anderen zytosolischen und nuklearen Fe/S-Proteine eine Priorisierung zu untersuchen.

Proteine, welche durch die Analyse als mögliche Fe/S-Proteine identifiziert wurden, sollten exprimiert und dann auf ihre Kofaktoren hin untersucht werden, hierfür wurden bereits vier Kandidaten von Kristin Hansen im Rahmen einer Bachelorarbeit aufgereinigt.

Die Hypothese, dass Apoproteine ohne ihren Fe/S-Kofaktor instabil sind, wurde modifiziert und die Ergebnisse zeigten, dass einige Fe/S-Proteine als Apoprotein instabil werden. Eine experimentelle Validierung dieser Stabilitätshypothese, z. B. durch Inkubation aufgereinigter Proteine in Hefezell-extrakten und nachfolgende Analysen, wäre ein vielversprechender nächster Schritt. Auch der gezielte Einsatz von Proteasom-Hemmern wie MG132 oder das kombinierte Depletieren von Chaperonen und CIA-Komponenten könnte helfen, die Instabilität der Apoproteine zu untersuchen um zum Beispiel die Rolle des Proteasoms bei der Degradation instabiler Apoproteine aufzuklären. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen könnten neue Hypothesen zur Erkennung und Proteolyse von Apoproteinen gebildet werden.

Um eine stärkere Abundanzänderung der Fe/S-Proteine hervorzurufen wäre es denkbar zuerst Chaperone zu depletieren und im Anschluss CIA-Proteine zu depletieren. Dadurch könnten Proteine, deren Stabilität von ihrem Kofaktor abhängt, noch instabiler werden.

Ein weiterer Ansatzpunkt betrifft regulatorische Aspekte der Eisenhomöostase. Hier erscheint insbesondere die Rolle von Yap5 unklar, da dieses Transkriptionsfaktor-Protein unter der Nachweisgrenze lag. Eine gezielte Anreicherung oder alternative Nachweismethoden könnten hier Abhilfe schaffen.

Das Proteom der bereits vorhandenen Δ Grx3- und Δ Grx4-Hefestämme sollte massenspektrometrisch quantifiziert und zusammen mit den Daten die hier präsentiert wurden auf weitere Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Grx3 und Grx4 hin analysiert werden.

Schließlich könnten systembiologische Ansätze helfen, neue regulatorische Netzwerke zu identifizieren. Die Kombination aus RNA-Seq bei Grx3/4-Depletion und der Analyse von Ko-Expressionsmustern mit z. B. *TYW1* könnte neue transkriptionelle oder posttranslationale Regulationen aufdecken. Auch Reporter-Konstrukte mit dem *TYW1*-Promotor bieten eine Möglichkeit, Redox- und Stressantworten auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen. Ein Vergleich von Proteom- und Transkriptomdaten scheint sinnvoll.

Der in Kapitel 5.8 beschriebene Zusammenhang zwischen der CIA-Maschinerie und der Cysteinreaktivität von Proteinen des Thioredoxinsystems sollte auch genauer untersucht werden, möglicherweise in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Deponte.

Die vielversprechendste Methode zur Charakterisierung von bisher uncharakterisierten Fe/S-proteinen ist Crosslinking des CTC mit Zielproteinen und nachfolgender Analyse, zum Beispiel mittels MS.

Ein wesentliches Erkenntnisinteresse ergibt sich aus der strukturellen und funktionellen Spezialisierung innerhalb der CIA-Maschinerie. Die beobachtete Ungleichgewichtigkeit der Phänotypen bei Depletion einzelner Komponenten legt nahe, dass bestimmte CIA-Proteine eine hierarchisch übergeordnete Rolle einnehmen. Zukünftige Arbeiten könnten sich auf die detaillierte Rekonstruktion solcher Hierarchien konzentrieren, beispielsweise durch kombinierte Depletionen, zeitlich kontrollierte Expression oder durch gezielte Mutationen einzelner Funktionsdomänen.

Auf proteomischer Ebene wäre es von großem Interesse, den Einfluss der CIA-Depletion nicht nur auf Proteinmengen, sondern auch auf funktionelle Eigenschaften wie Enzymaktivität, Interaktionsnetzwerke und posttranslationale Modifikationen zu untersuchen. Die Integration weiterer omics-Methoden, wie z. B. Metabolomics oder Phosphoproteomics, könnte hier neue regulatorische Zusammenhänge sichtbar machen.

Ein weiterer Aspekt betrifft die intrazelluläre Lokalisierung von Glt1. Die eindeutige Abhängigkeit der Glutamatsynthase Glt1 von der zytosolischen CIA-Maschinerie widerspricht

früheren Annahmen einer mitochondrialen Lokalisation und sollte bevorzugt unabhängig durch Fluoreszenzmikroskopie validiert werden. Im Rahmen der Glt1-Charakterisierung sind auch Experimente zur Abhängigkeit der Aktivität von Glt1 von einer Filamentbildung vielversprechend. Da die Bildung von Filamenten (unter anderem) von der Wachstumsphase abhängig ist, wären Messungen der Aktivität im Zellextrakt in mehreren Wachstumsphasen denkbar.

Nicht zuletzt bleibt die Frage nach der molekularen Natur des vom Mitochondrium exportierten CIA-Präkursors weiterhin offen. Die Identifikation dieses Intermediats – sei es durch gezielte Metaboliten-Screenings, chemische Labeling-Ansätze oder durch die Nutzung neuer Transportdefektmutanten – stellt eine der größten Herausforderungen, aber auch Chancen für das Verständnis der zellulären Fe/S-Logistik dar.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Dissertation, dass die Reifung von Fe/S-Proteinen ein hochgradig regulierter, dynamischer Prozess ist, der weit über die bloße Einfügung eines Metallclusters hinausgeht. Die hier entwickelten experimentellen Werkzeuge und Hypothesen bieten eine solide Grundlage für zukünftige Arbeiten, die helfen könnten, zentrale Prinzipien der zellulären Metalloprotein-Biogenese zu entschlüsseln.

7. Literatur

- Adler, S. P., Purich, D. & Stadtman, E. R. (1975).** Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the PII regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylyl-removing enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 6264–6272.
- Aebersold, R. & Mann, M. (2003).** Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198–207.
- Albrecht, A. G., Netz, D. J. A., Miethke, M., Pierik, A. J., Burghaus, O., Peuckert, F., Lill, R. & Marahiel, M. A. (2010).** SufU is an essential iron-sulfur cluster scaffold protein in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **192**, 1643–1651.
- Ali, V., Shigeta, Y., Tokumoto, U., Takahashi, Y. & Nozaki, T. (2004).** An intestinal parasitic protist, *Entamoeba histolytica*, possesses a non-redundant nitrogen fixation-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 16863–16874.
- Alseth, I., Eide, L., Pirovano, M., Rognes, T., Seeberg, E. & Bjørås, M. (1999).** The *Saccharomyces cerevisiae* homologues of endonuclease III from *Escherichia coli*, Ntg1 and Ntg2, are both required for efficient repair of spontaneous and induced oxidative DNA damage in yeast. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 3779–3787.
- Alves, R., Herrero, E. & Sorribas, A. (2004).** Predictive reconstruction of the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly metabolism: I. The role of the protein pair ferredoxin-ferredoxin reductase (Yah1-Arh1). *Proteins* **56**, 354–366.
- Angelini, S., Gerez, C., Ollagnier-de Choudens, S., Sanakis, Y., Fontecave, M., Barras, F. & Py, B. (2008).** NfuA, a new factor required for maturing Fe/S proteins in *Escherichia coli* under oxidative stress and iron starvation conditions. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 14084–14091.
- Arana, M. E. & Kunkel, T. A. (2010).** Mutator phenotypes due to DNA replication infidelity. *Seminars in Cancer Biology* **20**, 304–311.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., Castro, E. de, Duvaud, S., Flegel, V. & Fortier, A. & other authors (2012).** ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research* **40**, W597–603.
- Ast, T., Itoh, Y., Sadre, S., McCoy, J. G., Namkoong, G., Wengrod, J. C., Chicherin, I., Joshi, P. R. & Kamenski, P. & other authors (2024).** METTL17 is an Fe-S cluster checkpoint for mitochondrial translation. *Molecular Cell* **84**, 359–374.
- Astuti, R. I., Watanabe, D. & Takagi, H. (2016).** Nitric oxide signaling and its role in oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nitric oxide : Biology and Chemistry* **52**, 29–40.
- Avendaño, A., DeLuna, A., Olivera, H., Valenzuela, L. & Gonzalez, A. (1997).** GDH3 encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **179**, 5594–5597.
- Backes, S., Bykov, Y. S., Flohr, T., Räschele, M., Zhou, J., Lenhard, S., Krämer, L., Mühlhaus, T. & Bibi, C. & other authors (2021).** The chaperone-binding activity of the mitochondrial surface receptor Tom70 protects the cytosol against mitoprotein-induced stress. *Cell Reports* **35**, 108936.
- Backus, K. M., Correia, B. E., Lum, K. M., Forli, S., Horning, B. D., González-Páez, G. E., Chatterjee, S., Lanning, B. R. & Teijaro, J. R. & other authors (2016).** Proteome-wide covalent ligand discovery in native biological systems. *Nature* **534**, 570–574.

- Badger, J., Sauder, J. M., Adams, J. M., Antonyamy, S., Bain, K., Bergseid, M. G., Buchanan, S. G., Buchanan, M. D. & Batiyenko, Y. & other authors (2005).** Structural analysis of a set of proteins resulting from a bacterial genomics project. *Proteins* **60**, 787–796.
- Bai, Y., Chen, T., Happe, T., Lu, Y. & Sawyer, A. (2018).** Iron-sulphur cluster biogenesis via the SUF pathway. *Metallomics : Integrated Biometal Science* **10**, 1038–1052.
- Bak, D. W. & Elliott, S. J. (2014).** Alternative FeS cluster ligands: tuning redox potentials and chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology* **19**, 50–58.
- Bak, D. W. & Weerapana, E. (2023).** Monitoring Fe-S cluster occupancy across the *E. coli* proteome using chemoproteomics. *Nature Chemical Biology* **19**, 356–366.
- Balk, J., Pierik, A. J., Netz, D. J. A., Mühlenhoff, U. & Lill, R. (2004).** The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *The EMBO Journal* **23**, 2105–2115.
- Banci, L., Bertini, I., Calderone, V., Ciofi-Baffoni, S., Giachetti, A., Jaiswal, D., Mikolajczyk, M., Piccioli, M. & Winkelmann, J. (2013).** Molecular view of an electron transfer process essential for iron-sulfur protein biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 7136–7141.
- Bandow, J. E. (2010).** Comparison of protein enrichment strategies for proteome analysis of plasma. *Proteomics* **10**, 1416–1425.
- Bartels, P. L., Stodola, J. L., Burgers, P. M. J. & Barton, J. K. (2017).** A Redox Role for the 4Fe4S Cluster of Yeast DNA Polymerase δ . *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 18339–18348.
- Barton, J. K., Silva, R. M. B. & O'Brien, E. (2019).** Redox Chemistry in the Genome: Emergence of the 4Fe4S Cofactor in Repair and Replication. *Annual Review of Biochemistry* **88**, 163–190.
- Baussier, C., Fakroun, S., Aubert, C., Dubrac, S., Mandin, P., Py, B. & Barras, F. (2020).** Making iron-sulfur cluster: structure, regulation and evolution of the bacterial ISC system. *Advances in Microbial Physiology* **76**, 1–39.
- Beek, J. ter, Parkash, V., Bylund, G. O., Osterman, P., Sauer-Eriksson, A. E. & Johansson, E. (2019).** Structural evidence for an essential Fe-S cluster in the catalytic core domain of DNA polymerase ϵ . *Nucleic Acids Research* **47**, 5712–5722.
- Beinert, H., Holm, R. H. & Münck, E. (1997).** Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science (New York, N.Y.)* **277**, 653–659.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000).** The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **28**, 235–242.
- Bertgen, L., Bökenkamp, J.-E., Schneckmann, T., Koch, C., Räschele, M., Storchová, Z. & Herrmann, J. M. (2024).** Distinct types of intramitochondrial protein aggregates protect mitochondria against proteotoxic stress. *Cell Reports* **43**, 114018.
- Bhat, P. J. & Murthy, T. V. (2001).** Transcriptional control of the GAL/MEL regulon of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of galactose-mediated signal transduction. *Molecular Microbiology* **40**, 1059–1066.
- Bhattacharya, S., Esquivel, B. D. & White, T. C. (2018).** Overexpression or Deletion of Ergosterol Biosynthesis Genes Alters Doubling Time, Response to Stress Agents, and Drug Susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *mBio* **9**.

- Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C. & Pfanner, N. (2008).** Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Reports* **9**, 42–49.
- Bonnet, A. & Lesage, P. (2021).** Light and shadow on the mechanisms of integration site selection in yeast Ty retrotransposon families. *Current Genetics* **67**, 347–357.
- Börlin, C. S., Nielsen, J. & Siewers, V. (2020).** The transcription factor Leu3 shows differential binding behavior in response to changing leucine availability. *FEMS Microbiology Letters* **367**.
- Boubekur, S., Camougrand, N., Bunoust, O., Rigoulet, M. & Guérin, B. (2001).** Participation of acetaldehyde dehydrogenases in ethanol and pyruvate metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **268**, 5057–5065.
- Bowman, G. D., O'Donnell, M. & Kuriyan, J. (2004).** Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex. *Nature* **429**, 724–730.
- Boyd, E. S., Thomas, K. M., Dai, Y., Boyd, J. M. & Outten, F. W. (2014).** Interplay between oxygen and Fe-S cluster biogenesis: insights from the Suf pathway. *Biochemistry* **53**, 5834–5847.
- Brachmann, C., Kaduhr, L., Jüdes, A., Ravichandran, K. E., West, J. D., Glatt, S. & Schaffrath, R. (2020).** Redox requirements for ubiquitin-like urmylation of Ahp1, a 2-Cys peroxiredoxin from yeast. *Redox Biology* **30**, 101438.
- Braymer, J. J. & Lill, R. (2017).** Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* **292**, 12754–12763.
- Braymer, J. J., Stehling, O., Stümpfig, M., Rösser, R., Spantgar, F., Blinn, C. M., Mühlenhoff, U., Pierik, A. J. & Lill, R. (2024).** Requirements for the biogenesis of 2Fe-2S proteins in the human and yeast cytosol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **121**, e2400740121.
- Broderick, J. B., Duffus, B. R., Duschene, K. S. & Shepard, E. M. (2014).** Radical S-adenosylmethionine enzymes. *Chemical Reviews* **114**, 4229–4317.
- Bych, K., Kerscher, S., Netz, D. J. A., Pierik, A. J., Zwicker, K., Huynen, M. A., Lill, R., Brandt, U. & Balk, J. (2008).** The iron-sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. *The EMBO Journal* **27**, 1736–1746.
- Calvo, S. E., Julien, O., Clauser, K. R., Shen, H., Kamer, K. J., Wells, J. A. & Mootha, V. K. (2017).** Comparative Analysis of Mitochondrial N-Termini from Mouse, Human, and Yeast. *Molecular & Cellular Proteomics* **16**, 512–523.
- Calzolari, L., Zhou, Z. H., Adams, M. W. W. & La Mar, G. N. (1996).** Role of Cluster-Ligated Aspartate in Gating Electron Transfer in the Four-Iron Ferredoxin from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2513–2514.
- Carvalho, F. A., Mühlenhoff, U., Braymer, J. J., Root, V., Stümpfig, M., Oliveira, C. C. & Lill, R. (2023).** Hsp90 and metal-binding J-protein family chaperones are not critically involved in cellular iron-sulfur protein assembly and iron regulation in yeast. *FEBS Letters*.
- Chanet, R., Baïlle, D., Golinelli-Cohen, M.-P., Riquier, S., Guittet, O., Lepoivre, M., Huang, M.-E. & Vernis, L. (2021).** Fe-S coordination defects in the replicative DNA polymerase delta cause deleterious DNA replication in vivo and subsequent DNA damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda, Md.)* **11**.

- Chen, D., Walsby, C., Hoffman, B. M. & Frey, P. A. (2003).** Coordination and mechanism of reversible cleavage of S-adenosylmethionine by the 4Fe-4S center in lysine 2,3-aminomutase. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11788–11789.
- Chen, O. S., Crisp, R. J., Valachovic, M., Bard, M., Winge, D. R. & Kaplan, J. (2004).** Transcription of the yeast iron regulon does not respond directly to iron but rather to iron-sulfur cluster biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 29513–29518.
- Chen, Z., Zhang, X., Li, H., Liu, H., Xia, Y. & Xun, L. (2018).** The Complete Pathway for Thiosulfate Utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **84**.
- Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., Christie, K. R., Costanzo, M. C. & Dwight, S. S. & other authors (2012).** *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research* **40**, D700-5.
- Chi, C.-B., Tang, Y., Zhang, J., Dai, Y.-N., Abdalla, M., Chen, Y. & Zhou, C.-Z. (2018).** Structural and Biochemical Insights into the Multiple Functions of Yeast Grx3. *Journal of Molecular Biology* **430**, 1235–1248.
- Cieřła, M., Mierzejewska, J., Adamczyk, M., Farrants, A.-K. Ö. & Boguta, M. (2014).** Fructose bisphosphate aldolase is involved in the control of RNA polymerase III-directed transcription. *Biochimica et Biophysica Acta* **1843**, 1103–1110.
- Cogoni, C., Valenzuela, L., González-Halphen, D., Olivera, H., Macino, G., Ballario, P. & González, A. (1995).** *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *Journal of Bacteriology* **177**, 792–798.
- Cox, J., Hein, M. Y., Lubner, C. A., Paron, I., Nagaraj, N. & Mann, M. (2014).** Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular & Cellular Proteomics* **13**, 2513–2526.
- Cox, J. & Mann, M. (2008).** MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology* **26**, 1367–1372.
- Crisp, R. J., Pollington, A., Galea, C., Jaron, S., Yamaguchi-Iwai, Y. & Kaplan, J. (2003).** Inhibition of heme biosynthesis prevents transcription of iron uptake genes in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 45499–45506.
- Curran, K. A., Karim, A. S., Gupta, A. & Alper, H. S. (2013).** Use of expression-enhancing terminators in *Saccharomyces cerevisiae* to increase mRNA half-life and improve gene expression control for metabolic engineering applications. *Metabolic Engineering* **19**, 88–97.
- Da Huang, W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. (2009).** Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* **4**, 44–57.
- Dancis, A., Pandey, A. K. & Pain, D. (2024).** Mitochondria function in cytoplasmic FeS protein biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* **1871**, 119733.
- Daniel, T., Faruq, H. M., Laura Magdalena, J., Manuela, G. & Christopher Horst, L. (2020).** Role of GSH and Iron-Sulfur Glutaredoxins in Iron Metabolism-Review. *Molecules (Basel, Switzerland)* **25**.
- DeLuna, A., Avendano, A., Riego, L. & Gonzalez, A. (2001).** NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 43775–43783.

- Dong, M., Dando, E. E., Kotliar, I., Su, X., Dzikovski, B., Freed, J. H. & Lin, H. (2019).** The asymmetric function of Dph1-Dph2 heterodimer in diphthamide biosynthesis. *Journal of Biological Inorganic Chemistry : JBIC* **24**, 777–782.
- Dong, M., Su, X., Dzikovski, B., Dando, E. E., Zhu, X., Du, J., Freed, J. H. & Lin, H. (2014).** Dph3 is an electron donor for Dph1-Dph2 in the first step of eukaryotic diphthamide biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* **136**, 1754–1757.
- Dörner, K., Ruggeri, C., Zemp, I. & Kutay, U. (2023).** Ribosome biogenesis factors-from names to functions. *The EMBO journal* **42**, e112699.
- Dos Santos, P. C., Johnson, D. C., Ragle, B. E., Unciuleac, M.-C. & Dean, D. R. (2007).** Controlled expression of nif and isc iron-sulfur protein maturation components reveals target specificity and limited functional replacement between the two systems. *Journal of Bacteriology* **189**, 2854–2862.
- Dubarry, M., Lawless, C., Banks, A. P., Cockell, S. & Lydall, D. (2015).** Genetic Networks Required to Coordinate Chromosome Replication by DNA Polymerases α , δ , and ϵ in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda, Md.)* **5**, 2187–2197.
- Dunham, M. J. & Fowler, D. M. (2013).** Contemporary, yeast-based approaches to understanding human genetic variation. *Current Opinion in Genetics & Development* **23**, 658–664.
- Dutkiewicz, R., Marszalek, J., Schilke, B., Craig, E. A., Lill, R. & Mühlenhoff, U. (2006).** The Hsp70 chaperone Ssq1p is dispensable for iron-sulfur cluster formation on the scaffold protein Isu1p. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 7801–7808.
- Duxin, J. P., Dao, B., Martinsson, P., Rajala, N., Guittat, L., Campbell, J. L., Spelbrink, J. N. & Stewart, S. A. (2009).** Human Dna2 is a nuclear and mitochondrial DNA maintenance protein. *Molecular and Cellular Biology* **29**, 4274–4282.
- Ebrecht, A. C., van der Bergh, N., Harrison, S. T. L., Smit, M. S., Sewell, B. T. & Opperman, D. J. (2019).** Biochemical and structural insights into the cytochrome P450 reductase from *Candida tropicalis*. *Scientific Reports* **9**, 20088.
- Engel, S. R., Dietrich, F. S., Fisk, D. G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Hitz, B. C. & Karra, K. & other authors (2014).** The reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: then and now. *G3 (Bethesda, Md.)* **4**, 389–398.
- Evrin, C., Maman, J. D., Diamante, A., Pellegrini, L. & Labib, K. (2018).** Histone H2A-H2B binding by Pol α in the eukaryotic replisome contributes to the maintenance of repressive chromatin. *The EMBO Journal* **37**.
- Fairman-Williams, M. E., Guenther, U.-P. & Jankowsky, E. (2010).** SF1 and SF2 helicases: family matters. *Current Opinion in Structural Biology* **20**, 313–324.
- Fan, X., Barshop, W. D., Vashisht, A. A., Pandey, V., Leal, S., Rayatpisheh, S., Jami-Alahmadi, Y., Sha, J. & Wohlschlegel, J. A. (2022).** Iron-regulated assembly of the cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis machinery. *The Journal of Biological Chemistry* **298**, 102094.
- Flint, D. H. (1996).** *Escherichia coli* Contains a Protein That Is Homologous in Function and N-terminal Sequence to the Protein Encoded by the nifS Gene of *Azotobacter vinelandii* and That Can Participate in the Synthesis of the Fe-S Cluster of Dihydroxy-acid Dehydratase. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 16068–16074.
- Froschauer, E. M., Schweyen, R. J. & Wiesenberger, G. (2009).** The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **1788**, 1044–1050.

- Fu, W., Jack, R. F., Morgan, T. V., Dean, D. R. & Johnson, M. K. (1994).** nifU gene product from *Azotobacter vinelandii* is a homodimer that contains two identical 2Fe-2S clusters. *Biochemistry* **33**, 13455–13463.
- Gakh, O., Smith, D. Y. & Isaya, G. (2008).** Assembly of the iron-binding protein frataxin in *Saccharomyces cerevisiae* responds to dynamic changes in mitochondrial iron influx and stress level. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 31500–31510.
- Garcia, P. S., Gribaldo, S. & Barras, F. (2024).** When iron and sulfur met on an anoxic planet and eventually made clusters essential for life. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* **1871**, 119730.
- Garcia, P. S., Gribaldo, S., Py, B. & Barras, F. (2019).** The SUF system: an ABC ATPase-dependent protein complex with a role in Fe-S cluster biogenesis. *Research in Microbiology* **170**, 426–434.
- Georgatsou, E. & Alexandraki, D. (1999).** Regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Fre1p/Fre2p Fe/Cu reductase related genes. *Yeast (Chichester, England)* **15**, 573–584.
- Ghaemmaghani, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K. & Weissman, J. S. (2003).** Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737–741.
- Glaser, T., Hedman, B., Hodgson, K. O. & Solomon, E. I. (2000).** Ligand K-edge X-ray absorption spectroscopy: a direct probe of ligand-metal covalency. *Accounts of Chemical Research* **33**, 859–868.
- Glazer, A. N. & Kechris, K. J. (2009).** Conserved amino acid sequence features in the alpha subunits of MoFe, VFe, and FeFe nitrogenases. *PloS One* **4**, e6136.
- Godin, S. K., Zhang, Z., Herken, B. W., Westmoreland, J. W., Lee, A. G., Mihalevic, M. J., Yu, Z., Sobol, R. W., Resnick, M. A. & Bernstein, K. A. (2016).** The Shu complex promotes error-free tolerance of alkylation-induced base excision repair products. *Nucleic Acids Research* **44**, 8199–8215.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D. & Jacq, C. & other authors (1996).** Life with 6000 genes. *Science (New York, N.Y.)* **274**, 546, 563-7.
- Gómez-Llorente, Y., Malik, R., Jain, R., Choudhury, J. R., Johnson, R. E., Prakash, L., Prakash, S., Ubarretxena-Belandia, I. & Aggarwal, A. K. (2013).** The architecture of yeast DNA polymerase ζ . *Cell Reports* **5**, 79–86.
- Greber, B. J., Toso, D. B., Fang, J. & Nogales, E. (2019).** The complete structure of the human TFIIF core complex. *eLife* **8**.
- Greenwood, C., Selth, L. A., Dirac-Svejstrup, A. B. & Svejstrup, J. Q. (2009).** An iron-sulfur cluster domain in Elp3 important for the structural integrity of elongator. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 141–149.
- Grell, T. A. J., Young, A. P., Drennan, C. L. & Bandarian, V. (2018).** Biochemical and Structural Characterization of a Schiff Base in the Radical-Mediated Biosynthesis of 4-Demethylwyosine by TYW1. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 6842–6852.
- Guan, S., Taylor, P. P., Han, Z., Moran, M. F. & Ma, B. (2020).** Data Dependent-Independent Acquisition (DDIA) Proteomics. *Journal of Proteome Research* **19**, 3230–3237.
- Gudipati, V., Koch, K., Lienhart, W.-D. & Macheroux, P. (2014).** The flavoproteome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1844**, 535–544.
- Gupta, P., Aggarwal, N., Batra, P., Mishra, S. & Chaudhuri, T. K. (2006).** Co-expression of chaperonin GroEL/GroES enhances *in vivo* folding of yeast mitochondrial aconitase and alters the growth

characteristics of *Escherichia coli*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38**, 1975–1985.

Gupta, R., Walvekar, A. S., Liang, S., Rashida, Z., Shah, P. & Laxman, S. (2019). A tRNA modification balances carbon and nitrogen metabolism by regulating phosphate homeostasis. *eLife* **8**.

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

Haber, J. E. (2012). Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**, 33–64.

Hadj-Saïd, J., Pandelia, M.-E., Léger, C., Fourmond, V. & Dementin, S. (2015). The Carbon Monoxide Dehydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1847**, 1574–1583.

Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A. & Barlow, M. (2014). Growth rates made easy. *Molecular Biology and Evolution* **31**, 232–238.

Hao, H.-X., Khalimonchuk, O., Schraders, M., Dephore, N., Bayley, J.-P., Kunst, H., Devilee, P., Cremers, C. W. R. J. & Schiffman, J. D. & other authors (2009). SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science (New York, N.Y.)* **325**, 1139–1142.

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

He, Q., Wang, F., Yao, N. Y., O'Donnell, M. E. & Li, H. (2024). Structures of the human leading strand Pole-PCNA holoenzyme. *Nature Communications* **15**, 7847.

He, Z., Duan, Y., Zhai, W., Zhang, X., Shi, J., Zhang, X. & Xu, Z. (2020). Evaluating Terminator Strength Based on Differentiating Effects on Transcription and Translation. *Chembiochem : a European Journal of Chemical Biology* **21**, 2067–2072.

Hebert, A. S., Richards, A. L., Bailey, D. J., Ulbrich, A., Coughlin, E. E., Westphall, M. S. & Coon, J. J. (2014). The one hour yeast proteome. *Molecular & Cellular Proteomics* **13**, 339–347.

Henninger, E. E. & Pursell, Z. F. (2014). DNA polymerase ϵ and its roles in genome stability. *IUBMB life* **66**, 339–351.

Heuer, A., Gerovac, M., Schmidt, C., Trowitzsch, S., Preis, A., Kötter, P., Berninghausen, O., Becker, T., Beckmann, R. & Tampé, R. (2017). Structure of the 40S-ABCE1 post-splitting complex in ribosome recycling and translation initiation. *Nature Structural & Molecular Biology* **24**, 453–460.

Heymann, P., Ernst, J. F. & Winkelmann, G. (2000). Identification and substrate specificity of a ferrichrome-type siderophore transporter (Arn1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **186**, 221–227.

Hirabayashi, K., Yuda, E., Tanaka, N., Katayama, S., Iwasaki, K., Matsumoto, T., Kurisu, G., Outten, F. W. & Fukuyama, K. & other authors (2015). Functional Dynamics Revealed by the Structure of the SufBCD Complex, a Novel ATP-binding Cassette (ABC) Protein That Serves as a Scaffold for Iron-Sulfur Cluster Biogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* **290**, 29717–29731.

Ho, B., Baryshnikova, A. & Brown, G. W. (2018). Unification of Protein Abundance Datasets Yields a Quantitative *Saccharomyces cerevisiae* Proteome. *Cell Systems* **6**, 192-205.e3.

- Hu, Y. & Ribbe, M. W. (2016).** Maturation of nitrogenase cofactor-the role of a class E radical SAM methyltransferase NifB. *Current Opinion in Chemical Biology* **31**, 188–194.
- Huergo, L. F. & Dixon, R. (2015).** The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* **79**, 419–435.
- Huet, G., Daffé, M. & Saves, I. (2005).** Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* SUF machinery as the exclusive mycobacterial system of Fe-S cluster assembly: evidence for its implication in the pathogen's survival. *Journal of Bacteriology* **187**, 6137–6146.
- Hunsicker-Wang, L. M., Heine, A., Chen, Y., Luna, E. P., Todaro, T., Zhang, Y. M., Williams, P. A., McRee, D. E. & Hirst, J. & other authors (2003).** High-resolution structure of the soluble, respiratory-type Rieske protein from *Thermus thermophilus*: analysis and comparison. *Biochemistry* **42**, 7303–7317.
- Hurley, J. K., Weber-Main, A. M., Hodges, A. E., Stankovich, M. T., Benning, M. M., Holden, H. M., Cheng, H., Xia, B. & Markley, J. L. & other authors (1997).** Iron-sulfur cluster cysteine-to-serine mutants of *Anabaena* -2Fe-2S- ferredoxin exhibit unexpected redox properties and are competent in electron transfer to ferredoxin:NADP⁺ reductase. *Biochemistry* **36**, 15109–15117.
- Ibarrola, N., Molina, H., Iwahori, A. & Pandey, A. (2004).** A novel proteomic approach for specific identification of tyrosine kinase substrates using 13Ctyrosine. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 15805–15813.
- Inoue, A., Hyle, J., Lechner, M. S. & Lahti, J. M. (2011).** Mammalian ChIR1 has a role in heterochromatin organization. *Experimental Cell Research* **317**, 2522–2535.
- Jaciuk, M., Scherf, D., Kaszuba, K., Gaik, M., Rau, A., Kościelniak, A., Krutyhołowa, R., Rawski, M. & Indyka, P. & other authors (2023).** Cryo-EM structure of the fully assembled Elongator complex. *Nucleic Acids Research* **51**, 2011–2032.
- Jain, R., Vanamee, E. S., Dzikovski, B. G., Buku, A., Johnson, R. E., Prakash, L., Prakash, S. & Aggarwal, A. K. (2014).** An iron-sulfur cluster in the polymerase domain of yeast DNA polymerase ϵ . *Journal of Molecular Biology* **426**, 301–308.
- Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G. & Schwob, E. & other authors (2004).** A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast (Chichester, England)* **21**, 947–962.
- Johnson, A. & O'Donnell, M. (2005).** Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annual Review of Biochemistry* **74**, 283–315.
- Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D. & Johnson, M. K. (2005).** Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry* **74**, 247–281.
- Johnson, D. C., Dos Santos, P. C. & Dean, D. R. (2005).** NifU and NifS are required for the maturation of nitrogenase and cannot replace the function of isc-gene products in *Azotobacter vinelandii*. *Biochemical Society Transactions* **33**, 90–93.
- Jozwiakowski, S. K., Kummer, S. & Gari, K. (2019).** Human DNA polymerase delta requires an iron-sulfur cluster for high-fidelity DNA synthesis. *Life Science Alliance* **2**.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R. & Židek, A. & other authors (2021).** Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589.

- Kalli, A., Smith, G. T., Sweredoski, M. J. & Hess, S. (2013).** Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers. *Journal of Proteome Research* **12**, 3071–3086.
- Kang, Y.-H., Lee, C.-H. & Seo, Y.-S. (2010).** Dna2 on the road to Okazaki fragment processing and genome stability in eukaryotes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **45**, 71–96.
- Karlsborn, T., Tükenmez, H., Mahmud, A. K. M. F., Xu, F., Xu, H. & Byström, A. S. (2014).** Elongator, a conserved complex required for wobble uridine modifications in eukaryotes. *RNA Biology* **11**, 1519–1528.
- Kassube, S. A. & Thomä, N. H. (2020).** Structural insights into Fe-S protein biogenesis by the CIA targeting complex. *Nature Structural & Molecular Biology* **27**, 735–742.
- Kater, L., Thoms, M., Barrio-Garcia, C., Cheng, J., Ismail, S., Ahmed, Y. L., Bange, G., Kressler, D. & Berninghausen, O. & other authors (2017).** Visualizing the Assembly Pathway of Nucleolar Pre-60S Ribosomes. *Cell* **171**, 1599-1610.e14.
- Katharina Krotz (2020).** Proteom-Analyse von *S. cerevisiae* Stämmen nach Depletion der frühen CIA-Faktoren Tah18 und Dre2. *Bachelorarbeit*. Kaiserslautern: TUK.
- Kesti, T., Flick, K., Keränen, S., Syväoja, J. E. & Wittenberg, C. (1999).** DNA polymerase epsilon catalytic domains are dispensable for DNA replication, DNA repair, and cell viability. *Molecular Cell* **3**, 679–685.
- Kim, H. J. & Winge, D. R. (2013).** Emerging concepts in the flavinylation of succinate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1827**, 627–636.
- Kim, J. E. & Lindahl, P. A. (2023).** CUP1 Metallothionein from Healthy *Saccharomyces cerevisiae* Colocalizes to the Cytosol and Mitochondrial Intermembrane Space. *Biochemistry* **62**, 62–74.
- Kim, K.-D., Chung, W.-H., Kim, H.-J., Lee, K.-C. & Roe, J.-H. (2010).** Monothiol glutaredoxin Grx5 interacts with Fe-S scaffold proteins Isa1 and Isa2 and supports Fe-S assembly and DNA integrity in mitochondria of fission yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **392**, 467–472.
- Kispal, G., Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Bedekovics, T., Janáky, T., Bassler, J., Aguilar Netz, D. J. & Balk, J. & other authors (2005).** Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *The EMBO Journal* **24**, 589–598.
- Klassen, R., Grunewald, P., Thüring, K. L., Eichler, C., Helm, M. & Schaffrath, R. (2015).** Loss of anticodon wobble uridine modifications affects tRNA(Lys) function and protein levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS One* **10**, e0119261.
- Klinge, S., Núñez-Ramírez, R., Llorca, O. & Pellegrini, L. (2009).** 3D architecture of DNA Pol alpha reveals the functional core of multi-subunit replicative polymerases. *The EMBO Journal* **28**, 1978–1987.
- Kobayashi, K. & Yoshimoto, A. (1982).** Studies on yeast sulfite reductase. IV. Structure and steady-state kinetics. *Biochimica et Biophysica Acta* **705**, 348–356.
- Koch, C., Lenhard, S., Räsche, M., Prescianotto-Baschong, C., Spang, A. & Herrmann, J. M. (2024).** The ER-SURF pathway uses ER-mitochondria contact sites for protein targeting to mitochondria. *EMBO Reports* **25**, 2071–2096.
- Kohlhaw, G. B. (2003).** Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* **67**, 1-15, table of contents.

- Krämer, L., Dalheimer, N., Räsche, M., Storchová, Z., Pielage, J., Boos, F. & Herrmann, J. M. (2023).** MitoStores: chaperone-controlled protein granules store mitochondrial precursors in the cytosol. *The EMBO Journal* **42**, e112309.
- Kristin Hansen (2023).** Expression, Reinigung und Charakterisierung von fünf potenziellen Fe- oder Fe/S-Proteinen der Bäckerhefe. *Bachelorarbeit*. Kaiserslautern: RPTU.
- Kruger, N. J. (2009).** The Bradford Method For Protein Quantitation. In *The protein protocols handbook*, pp. 17–24. Edited by J. M. Walker, 3rd edn. New York, N.Y.: Humana Press.
- Kulak, N. A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N. & Mann, M. (2014).** Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nature Methods* **11**, 319–324.
- Kumar, C., Igarria, A., D'Autreaux, B., Planson, A.-G., Junot, C., Godat, E., Bachhawat, A. K., Delaunay-Moisan, A. & Toledano, M. B. (2011).** Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *The EMBO Journal* **30**, 2044–2056.
- Kwast, K. E., Burke, P. V. & Poyton, R. O. (1998).** Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *The Journal of Experimental Biology* **201**, 1177–1195.
- Larance, M. & Lamond, A. I. (2015).** Multidimensional proteomics for cell biology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **16**, 269–280.
- Lasserre, J.-P., Plissonneau, J., Velours, C., Bonneu, M., Litvak, S., Laquel, P. & Castroviejo, M. (2013).** Biochemical, cellular and molecular identification of DNA polymerase α in yeast mitochondria. *Biochimie* **95**, 759–771.
- Lee, J. Y. & Yang, W. (2006).** UvrD helicase unwinds DNA one base pair at a time by a two-part power stroke. *Cell* **127**, 1349–1360.
- Lee, Y.-J., Huang, X., Kropat, J., Henras, A., Merchant, S. S., Dickson, R. C. & Chanfreau, G. F. (2012).** Sphingolipid signaling mediates iron toxicity. *Cell Metabolism* **16**, 90–96.
- Lenhard, S., Gerlich, S., Khan, A., Rödl, S., Bökenkamp, J.-E., Peker, E., Zarges, C., Faust, J. & Storchova, Z. & other authors (2023).** The Orf9b protein of SARS-CoV-2 modulates mitochondrial protein biogenesis. *The Journal of Cell Biology* **222**.
- Lénon, M., Arias-Cartín, R. & Barras, F. (2022).** The Fe-S proteome of *Escherichia coli*: prediction, function, and fate. *Metallomics : Integrated Biometal Science* **14**.
- 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. & 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, L., Jia, X., Ward, D. M. & Kaplan, J. (2011).** Yap5 protein-regulated transcription of the TYW1 gene protects yeast from high iron toxicity. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 38488–38497.
- Li, L. & Kaplan, J. (2004).** A mitochondrial-vacuolar signaling pathway in yeast that affects iron and copper metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 33653–33661.
- Li, L., Kaplan, J. & Ward, D. M. (2017).** The glucose sensor Snf1 and the transcription factors Msn2 and Msn4 regulate transcription of the vacuolar iron importer gene CCC1 and iron resistance in yeast. *The Journal of Biological Chemistry* **292**, 15577–15586.
- Li, Y.-L. & Liu, J.-L. (2025).** Cytoophidium complexes resonate with cell fates. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* **82**, 54.

- Lill, R., Dutkiewicz, R., Freibert, S. A., Heidenreich, T., Mascarenhas, J., Netz, D. J., Paul, V. D., Pierik, A. J. & Richter, N. & other authors (2015).** The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *European Journal of Cell Biology* **94**, 280–291.
- Lill, R. & Freibert, S.-A. (2020).** Mechanisms of Mitochondrial Iron-Sulfur Protein Biogenesis. *Annual Review of Biochemistry* **89**, 471–499.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A. J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M. A., Webert, H., Wilbrecht, C. & Mühlenhoff, U. (2012).** The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* **1823**, 1491–1508.
- Lillig, C. H., Berndt, C. & Holmgren, A. (2008).** Glutaredoxin systems. *Biochimica et Biophysica Acta* **1780**, 1304–1317.
- Lindahl, P. A. & Vali, S. W. (2022).** Mössbauer-based molecular-level decomposition of the *Saccharomyces cerevisiae* ironome, and preliminary characterization of isolated nuclei. *Metallomics : Integrated Biometal Science* **14**.
- Liti, G. (2015).** The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae*. *eLife* **4**.
- Liu, Y., Vinyard, D. J., Reesbeck, M. E., Suzuki, T., Manakongtreecheep, K., Holland, P. L., Brudvig, G. W. & Söll, D. (2016).** A 3Fe-4S cluster is required for tRNA thiolation in archaea and eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 12703–12708.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L. & Randall, R. (1951).** PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265–275.
- Ludwig, C., Gillet, L., Rosenberger, G., Amon, S., Collins, B. C. & Aebersold, R. (2018).** Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular Systems Biology* **14**, e8126.
- Macherey-Nagel (2022a).** Nucleo-Spin Gel and PCR Clean-up. <https://www.mn-net.com/media/pdf/02/1a/74/Instruction-NucleoSpin-Gel-and-PCR-Clean-up.pdf>.
- Macherey-Nagel (2022b).** Nucleo-Spin Plasmid. <https://www.mn-net.com/media/pdf/45/51/02/Instruction-NucleoSpin-Plasmid.pdf>.
- MacKenzie, E. L., Iwasaki, K. & Tsuji, Y. (2008).** Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & Redox Signaling* **10**, 997–1030.
- Maio, N., Orbach, R., Zaharieva, I., Töpf, A., Donkervoort, S., Munot, P., Mueller, J., Willis, T. & Verma, S. & other authors (2023).** Loss of Function of the Cytoplasmic Fe-S Assembly Protein CIAO1 Causes a Neuromuscular Disorder with Compromise of Nucleocytoplasmic Fe-S Enzymes. *medRxiv : the preprint server for health sciences*.
- Malina, C., Yu, R., Björkeröth, J., Kerkhoven, E. J. & Nielsen, J. (2021).** Adaptations in metabolism and protein translation give rise to the Crabtree effect in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118**.
- Mara, P., Fragiadakis, G. S., Gkountromichos, F. & Alexandraki, D. (2018).** The pleiotropic effects of the glutamate dehydrogenase (GDH) pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* **17**, 170.
- Marquez, M. D., Greth, C., Buzuk, A., Liu, Y., Blinn, C. M., Beller, S., Leiskau, L., Hushka, A. & Wu, K. & other authors (2023).** Cytosolic iron-sulfur protein assembly system identifies clients by a C-terminal tripeptide.

- Martins, T. S., Costa, V. & Pereira, C. (2018).** Signaling pathways governing iron homeostasis in budding yeast. *Molecular Microbiology* **109**, 422–432.
- Martins, T. S., Pereira, C., Canadell, D., Vilaça, R., Teixeira, V., Moradas-Ferreira, P., Nadal, E. de, Posas, F. & Costa, V. (2018).** The Hog1p kinase regulates Aft1p transcription factor to control iron accumulation. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids* **1863**, 61–70.
- Mashruwala, A. A. & Boyd, J. M. (2018).** Investigating the role(s) of SufT and the domain of unknown function 59 (DUF59) in the maturation of iron-sulfur proteins. *Current Genetics* **64**, 9–16.
- Mashruwala, A. A., Pang, Y. Y., Rosario-Cruz, Z., Chahal, H. K., Benson, M. A., Mike, L. A., Skaar, E. P., Torres, V. J., Nauseef, W. M. & Boyd, J. M. (2015).** Nfu facilitates the maturation of iron-sulfur proteins and participates in virulence in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* **95**, 383–409.
- Masters, D. S. & Meister, A. (1982).** Inhibition of homocysteine sulfonamide of glutamate synthase purified from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 8711–8715.
- McSkimming, A. & Suess, D. L. M. (2021).** Dinitrogen binding and activation at a molybdenum-iron-sulfur cluster. *Nature Chemistry* **13**, 666–670.
- Meadows, K. L., Song, B. & Doetsch, P. W. (2003).** Characterization of AP lyase activities of *Saccharomyces cerevisiae* Ntg1p and Ntg2p: implications for biological function. *Nucleic Acids Research* **31**, 5560–5567.
- Melo, R. G. M., Leitão, A. C. & Pádula, M. (2004).** Role of OGG1 and NTG2 in the repair of oxidative DNA damage and mutagenesis induced by hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*: relationships with transition metals iron and copper. *Yeast (Chichester, England)* **21**, 991–1003.
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L. & Raj, S. & other authors (2021).** Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research* **49**, D412–D419.
- Monfort, B., Want, K., Gervason, S. & D'Autréaux, B. (2022).** Recent Advances in the Elucidation of Frataxin Biochemical Function Open Novel Perspectives for the Treatment of Friedreich's Ataxia. *Frontiers in Neuroscience* **16**, 838335.
- Morgenstern, M., Stiller, S. B., Lübbert, P., Peikert, C. D., Dannenmaier, S., Drepper, F., Weill, U., Höß, P. & Feuerstein, R. & other authors (2017).** Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *Cell Reports* **19**, 2836–2852.
- Mortimer, R. K. & Johnston, J. R. (1986).** Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**, 35–43.
- Mullins, E. A., Salay, L. E., Durie, C. L., Bradley, N. P., Jackman, J. E., Ohi, M. D., Chazin, W. J. & Eichman, B. F. (2024).** A mechanistic model of primer synthesis from catalytic structures of DNA polymerase α -primase. *Nature Structural & Molecular Biology* **31**, 777–790.
- Mumberg, D., Müller, R. & Funk, M. (1994).** Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Research* **22**, 5767–5768.
- Muzi Falconi, M., Piseri, A., Ferrari, M., Lucchini, G., Plevani, P. & Foiani, M. (1993).** *De novo* synthesis of budding yeast DNA polymerase alpha and POL1 transcription at the G1/S boundary are not required for entrance into S phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10519–10523.

- Nachin, L., Loiseau, L., Expert, D. & Barras, F. (2003).** SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for Fe-S biogenesis under oxidative stress. *The EMBO Journal* **22**, 427–437.
- Nadine Duppe (2025).** Dissertation: Untersuchung und Charakterisierung des ribosomalen Reifungsproteins Mak16 mit seinem Bindungspartner Rpf1. Kaiserslautern: RPTU.
- Nasta, V., Suraci, D., Gourdoupis, S., Ciofi-Baffoni, S. & Banci, L. (2020).** A pathway for assembling 4Fe-4S²⁺ clusters in mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis. *The FEBS Journal* **287**, 2312–2327.
- Navarrete-Perea, J., Guerra-Moreno, A., van Vranken, J., Isasa, M., Paulo, J. A. & Gygi, S. P. (2021).** Iron Deficiency and Recovery in Yeast: A Quantitative Proteomics Approach. *Journal of Proteome Research* **20**, 2751–2761.
- Nehlin, J. O. & Ronne, H. (1990).** Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *The EMBO Journal* **9**, 2891–2898.
- Netz, D. J. A., Pierik, A. J., Stümpfig, M., Bill, E., Sharma, A. K., Pallesen, L. J., Walden, W. E. & Lill, R. (2012).** 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. *The Journal of Biological Chemistry* **287**, 12365–12378.
- Netz, D. J. A., Pierik, A. J., Stümpfig, M., Mühlenhoff, U. & Lill, R. (2007).** The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nature Chemical Biology* **3**, 278–286.
- Netz, D. J. A., Stith, C. M., Stümpfig, M., Köpf, G., Vogel, D., Genau, H. M., Stodola, J. L., Lill, R., Burgers, P. M. J. & Pierik, A. J. (2011).** Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nature Chemical Biology* **8**, 125–132.
- Netz, D. J. A., Stümpfig, M., Doré, C., Mühlenhoff, U., Pierik, A. J. & Lill, R. (2010).** Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nature Chemical Biology* **6**, 758–765.
- New England Biolabs (2022a).** High Efficiency Transformation Protocol. <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/high-efficiency-transformation-protocol-c2987>.
- New England Biolabs (2022b).** P7710 Marker. www.neb.com, accessed November 15, 2022.
- New England Biolabs (2022c).** P7712 Marker. www.neb.com, accessed November 15, 2022.
- New England Biolabs (2022d).** P7719 Marker. www.neb.com, accessed November 15, 2022.
- New England Biolabs (2022e).** Q5 Polymerase. <https://international.neb.com/protocols/2013/12/13/pcr-using-q5-high-fidelity-dna-polymerase-m0491>, accessed November 28, 2022.
- Nick McElhinny, S. A., Gordenin, D. A., Stith, C. M., Burgers, P. M. J. & Kunkel, T. A. (2008).** Division of labor at the eukaryotic replication fork. *Molecular Cell* **30**, 137–144.
- Nir Heyman, S., Golan, M., Liefshitz, B. & Kupiec, M. (2023).** A Role for the Interactions between Polδ and PCNA Revealed by Analysis of pol3-01 Yeast Mutants. *Genes* **14**.
- Noma, A., Kirino, Y., Ikeuchi, Y. & Suzuki, T. (2006).** Biosynthesis of wybutosine, a hyper-modified nucleoside in eukaryotic phenylalanine tRNA. *The EMBO Journal* **25**, 2142–2154.
- Noree, C., Begovich, K., Samilo, D., Broyer, R., Monfort, E. & Wilhelm, J. E. (2019).** A quantitative screen for metabolic enzyme structures reveals patterns of assembly across the yeast metabolic network. *Molecular Biology of the Cell* **30**, 2721–2736.

- O'Brien, E., Holt, M. E., Thompson, M. K., Salay, L. E., Ehlinger, A. C., Chazin, W. J. & Barton, J. K. (2017).** The 4Fe4S cluster of human DNA primase functions as a redox switch using DNA charge transport. *Science (New York, N.Y.)* **355**.
- O'Brien, E., Salay, L. E., Epum, E. A., Friedman, K. L., Chazin, W. J. & Barton, J. K. (2018).** Yeast require redox switching in DNA primase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, 13186–13191.
- Ojeda, L., Keller, G., Muhlenhoff, U., Rutherford, J. C., Lill, R. & Winge, D. R. (2006).** Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 17661–17669.
- Olson, J. W., Agar, J. N., Johnson, M. K. & 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.
- Paeschke, K., McDonald, K. R. & Zakian, V. A. (2010).** Telomeres: structures in need of unwinding. *FEBS Letters* **584**, 3760–3772.
- Pallesen, L. J., Solodovnikova, N., Sharma, A. K. & Walden, W. E. (2013).** Interaction with Cfd1 increases the kinetic lability of FeS on the Nbp35 scaffold. *The Journal of Biological Chemistry* **288**, 23358–23367.
- Pandey, A. K., Pain, J., J, B., Dancis, A. & Pain, D. (2023).** Essential mitochondrial role in iron-sulfur cluster assembly of the cytoplasmic isopropylmalate isomerase Leu1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mitochondrion* **69**, 104–115.
- Pandey, A. K., Yoon, H., Pain, J., Dancis, A. & Pain, D. (2024).** Mitochondrial acyl carrier protein, Acp1, required for iron-sulfur cluster assembly in mitochondria and cytoplasm in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mitochondrion* **79**, 101955.
- Paraskevopoulou, C., Fairhurst, S. A., Lowe, D. J., Brick, P. & Onesti, S. (2006).** The Elongator subunit Etp3 contains a Fe4S4 cluster and binds S-adenosylmethionine. *Molecular Microbiology* **59**, 795–806.
- Paul, V. D. (2014).** Dissertation: Identifizierung und Charakterisierung neuer Faktoren der zytosolischen Fe-S Proteinbiogenese. Marburg.
- Paul, V. D. & Lill, R. (2014).** SnapShot: eukaryotic Fe-S protein biogenesis. *Cell Metabolism* **20**, 384-384.e1.
- Paul, V. D. & Lill, R. (2015).** Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochimica et Biophysica Acta* **1853**, 1528–1539.
- Paul, V. D., Mühlenhoff, U., Stümpfig, M., Seebacher, J., Kugler, K. G., Renicke, C., Taxis, C., Gavin, A.-C., Pierik, A. J. & Lill, R. (2015).** The deca-GX3 proteins Yae1-Lto1 function as adaptors recruiting the ABC protein Rli1 for iron-sulfur cluster insertion. *eLife* **4**, e08231.
- Peleh, V., Riemer, J., Dancis, A. & Herrmann, J. M. (2014).** Protein oxidation in the intermembrane space of mitochondria is substrate-specific rather than general. *Microbial Cell (Graz, Austria)* **1**, 81–93.
- Peng, B., Wood, R. J., Nielsen, L. K. & Vickers, C. E. (2018).** An Expanded Heterologous GAL Promoter Collection for Diauxie-Inducible Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology* **7**, 748–751.
- Peters, J. W., Stowell, M. H., Soltis, S. M., Finnegan, M. G., Johnson, M. K. & Rees, D. C. (1997).** Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. *Biochemistry* **36**, 1181–1187.

- Petrovic, A., Davis, C. T., Rangachari, K., Clough, B., Wilson, R. J. M. I. & Eccleston, J. F. (2008).** Hydrodynamic characterization of the SufBC and SufCD complexes and their interaction with fluorescent adenosine nucleotides. *Protein Science : a Publication of the Protein Society* **17**, 1264–1274.
- Pierik, A. J., Netz, D. J. A. & Lill, R. (2009).** Analysis of iron-sulfur protein maturation in eukaryotes. *Nature Protocols* **4**, 753–766.
- Pinto, M. N., Beek, J. ter, Ekanger, L. A., Johansson, E. & Barton, J. K. (2021).** The 4Fe4S Cluster of Yeast DNA Polymerase ϵ Is Redox Active and Can Undergo DNA-Mediated Signaling. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 16147–16153.
- Pokharel, S. & Campbell, J. L. (2012).** Cross talk between the nuclease and helicase activities of Dna2: role of an essential iron-sulfur cluster domain. *Nucleic Acids Research* **40**, 7821–7830.
- Poor, C. B., Wegner, S. V., Li, H., Dlouhy, A. C., Schuermann, J. P., Sanishvili, R., Hinshaw, J. R., Riggs-Gelasco, P. J., Outten, C. E. & He, C. (2014).** Molecular mechanism and structure of the *Saccharomyces cerevisiae* iron regulator Aft2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 4043–4048.
- Porcella, S. Y., Koussa, N. C., Tang, C. P., Kramer, D. N., Srivastava, P. & Smith, D. J. (2020).** Separable, Ctf4-mediated recruitment of DNA Polymerase α for initiation of DNA synthesis at replication origins and lagging-strand priming during replication elongation. *PLoS Genetics* **16**, e1008755.
- Protchenko, O., Ferea, T., Rashford, J., Tiedeman, J., Brown, P. O., Botstein, D. & Philpott, C. C. (2001).** Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 49244–49250.
- Pugh, R. A., Honda, M., Leesley, H., Thomas, A., Lin, Y., Nilges, M. J., Cann, I. K. O. & Spies, M. (2008).** The iron-containing domain is essential in Rad3 helicases for coupling of ATP hydrolysis to DNA translocation and for targeting the helicase to the single-stranded DNA-double-stranded DNA junction. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 1732–1743.
- Puig, S., Vergara, S. V. & Thiele, D. J. (2008).** Cooperation of two mRNA-binding proteins drives metabolic adaptation to iron deficiency. *Cell Metabolism* **7**, 555–564.
- Pujol-Carrion, N., Belli, G., Herrero, E., Nogues, A. & La Torre-Ruiz, M. A. de (2006).** Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science* **119**, 4554–4564.
- Qi, W., Li, J., Chain, C. Y., Pasquevich, G. A., Pasquevich, A. F. & Cowan, J. A. (2012).** Glutathione complexed Fe-S centers. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 10745–10748.
- R.M. Wallsgrove, E. Harel, P.J. Lea & B.J. Mifflin (1977).** Studies on Glutamate Synthase from the Leaves of Higher Plants. *Journal of Experimental Botany*, 588–596.
- Ralser, M., Kuhl, H., Ralser, M., Werber, M., Lehrach, H., Breitenbach, M. & Timmermann, B. (2012).** The *Saccharomyces cerevisiae* W303-K6001 cross-platform genome sequence: insights into ancestry and physiology of a laboratory mutt. *Open Biology* **2**, 120093.
- Ramos-Alonso, L., Romero, A. M., Martínez-Pastor, M. T. & Puig, S. (2020).** Iron Regulatory Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology* **11**, 582830.
- Rogowska-Wrzesinska, A., Larsen, P. M., Blomberg, A., Görg, A., Roepstorff, P., Norbeck, J. & Fey, S. J. (2001).** Comparison of the proteomes of three yeast wild type strains: CEN.PK2, FY1679 and W303. *Comparative and Functional Genomics* **2**, 207–225.

- Roon, R. J., Even, H. L. & Larimore, F. (1974).** Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **118**, 89–95.
- Roske, J. J. & Yeeles, J. T. P. (2024).** Structural basis for processive daughter-strand synthesis and proofreading by the human leading-strand DNA polymerase Pol ϵ . *Nature Structural & Molecular Biology* **31**, 1921–1931.
- Rothstein, R. J. (1983).** One-step gene disruption in yeast. *Methods in Enzymology* **101**, 202–211.
- RPTU FB Biologie (2023).** Q Exactive HF - Fachbereich Biologie an der RPTU. <https://bio.rptu.de/center-ms-analytics/instruments/q-exactive-hf>, accessed June 21, 2023.
- Rudolf, J., Makrantonis, V., Ingledew, W. J., Stark, M. J. R. & White, M. F. (2006).** The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Molecular Cell* **23**, 801–808.
- Rudra, S. & Skibbens, R. V. (2013).** Chl1 DNA helicase regulates Scc2 deposition specifically during DNA-replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **8**, e75435.
- Rutherford, J. C., Ojeda, L., Balk, J., Mühlenhoff, U., Lill, R. & Winge, D. R. (2005).** Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 10135–10140.
- Salay, L. E., Blee, A. M., Raza, M. K., Gallagher, K. S., Chen, H., Dorfeuille, A. J., Barton, J. K. & Chazin, W. J. (2022).** Modification of the 4Fe-4S Cluster Charge Transport Pathway Alters RNA Synthesis by Yeast DNA Primase. *Biochemistry* **61**, 1113–1123.
- Santos, P. C. D. & Dean, D. R. (2011).** FeS Cluster Assembly: NIF System in Nitrogen-Fixing Bacteria. In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, pp. 1–13. Edited by R. A. Scott. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Satyanarayana, T., Umbarger, H. E. & Lindgren, G. (1968).** Biosynthesis of branched-chain amino acids in yeast: correlation of biochemical blocks and genetic lesions in leucine auxotrophs. *Journal of Bacteriology* **96**, 2012–2017.
- Sauguet, L., Klinge, S., Perera, R. L., Maman, J. D. & Pellegrini, L. (2010).** Shared Active Site Architecture between the Large Subunit of Eukaryotic Primase and DNA Photolyase. *PLoS One* **5**, e10083.
- Schaedler, T. A., Thornton, J. D., Kruse, I., Schwarzländer, M., Meyer, A. J., van Veen, H. W. & Balk, J. (2014).** A conserved mitochondrial ATP-binding cassette transporter exports glutathione polysulfide for cytosolic metal cofactor assembly. *The Journal of Biological Chemistry* **289**, 23264–23274.
- Scheltema, R. A., Hauschild, J.-P., Lange, O., Hornburg, D., Denisov, E., Damoc, E., Kuehn, A., Makarov, A. & Mann, M. (2014).** The Q Exactive HF, a Benchtop mass spectrometer with a pre-filter, high-performance quadrupole and an ultra-high-field Orbitrap analyzer. *Molecular & Cellular Proteomics* **13**, 3698–3708.
- Schmidt, F. V., Schulz, L., Zarzycki, J., Prinz, S., Oehlmann, N. N., Erb, T. J. & Rebele, J. G. (2024).** Structural insights into the iron nitrogenase complex. *Nature Structural & Molecular Biology* **31**, 150–158.
- Schothorst, J., Zeebroeck, G. V. & Thevelein, J. M. (2017).** Identification of Ftr1 and Zrt1 as iron and zinc micronutrient transceptors for activation of the PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell (Graz, Austria)* **4**, 74–89.

- Seeberg, E., Eide, L. & Bjørås, M. (1995).** The base excision repair pathway. *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 391–397.
- Serrano, L. R., Peters-Clarke, T. M., Arrey, T. N., Damoc, E., Robinson, M. L., Lancaster, N. M., Shishkova, E., Moss, C. & Pashkova, A. & other authors (2024).** The One Hour Human Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics* **23**, 100760.
- Shen, Q.-J., Kassim, H., Huang, Y., Li, H., Zhang, J., Li, G., Wang, P.-Y., Yan, J., Ye, F. & Liu, J.-L. (2016).** Filamentation of Metabolic Enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Genetics and Genomics = Yi chuan xue bao* **43**, 393–404.
- Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., Imamichi, T. & Chang, W. (2022).** DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research* **50**, W216–W221.
- Sherman, F. (2002).** Getting started with yeast. *Methods in Enzymology* **350**, 3–41.
- Shi, R., Proteau, A., Villarroya, M., Moukadiri, I., Zhang, L., Trempe, J.-F., Matte, A., Armengod, M. E. & Cygler, M. (2010).** Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions. *PLoS Biology* **8**, e1000354.
- Shigi, N., Horitani, M., Miyauchi, K., Suzuki, T. & Kuroki, M. (2020).** An ancient type of MnmA protein is an iron-sulfur cluster-dependent sulfurtransferase for tRNA anticodons. *RNA (New York, N.Y.)* **26**, 240–250.
- Shino, S., Nasuno, R. & Takagi, H. (2022).** S-glutathionylation of fructose-1,6-bisphosphate aldolase confers nitrosative stress tolerance on yeast cells via a metabolic switch. *Free Radical Biology & Medicine* **193**, 319–329.
- Shivji, M. K., Podust, V. N., Hübscher, U. & Wood, R. D. (1995).** Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. *Biochemistry* **34**, 5011–5017.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schönfisch, B., Perschil, I. & Chacinska, A. & other authors (2003).** The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 13207–13212.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H. & Remmert, M. & other authors (2011).** Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* **7**, 539.
- Singh, A., Kaur, N. & Kosman, D. J. (2007).** The metalloreductase Fre6p in Fe-efflux from the yeast vacuole. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 28619–28626.
- Singleton, M. R., Dillingham, M. S. & Wigley, D. B. (2007).** Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annual Review of Biochemistry* **76**, 23–50.
- Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Ullmann, P., Lill, R. & Kispal, G. (2002).** Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 26944–26949.
- Srinivasan, V., Netz, D. J. A., Webert, H., Mascarenhas, J., Pierik, A. J., Michel, H. & Lill, R. (2007).** Structure of the yeast WD40 domain protein Cia1, a component acting late in iron-sulfur protein biogenesis. *Structure (London, England : 1993)* **15**, 1246–1257.
- Srinivasan, V., Pierik, A. J. & Lill, R. (2014).** Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1. *Science (New York, N.Y.)* **343**, 1137–1140.

- Stearman, R., Yuan, D. S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R. D. & Dancis, A. (1996).** A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science (New York, N.Y.)* **271**, 1552–1557.
- Stegmaier, K., Blinn, C. M., Bechtel, D. F., Greth, C., Auerbach, H., Müller, C. S., Jakob, V., Reijerse, E. J. & Netz, D. J. A. & other authors (2019).** Apd1 and Aim32 Are Prototypes of Bishistidinyl-Coordinated Non-Rieske 2Fe-2S Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 5753–5765.
- Stehling, O., Mascarenhas, J., Vashisht, A. A., Sheftel, A. D., Niggemeyer, B., Röscher, R., Pierik, A. J., Wohlschlegel, J. A. & Lill, R. (2013).** Human CIA2A-FAM96A and CIA2B-FAM96B integrate iron homeostasis and maturation of different subsets of cytosolic-nuclear iron-sulfur proteins. *Cell Metabolism* **18**, 187–198.
- Stehling, O., Netz, D. J. A., Niggemeyer, B., Röscher, R., Eisenstein, R. S., Puccio, H., Pierik, A. J. & Lill, R. (2008).** Human Nbp35 is essential for both cytosolic iron-sulfur protein assembly and iron homeostasis. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 5517–5528.
- Su, X., Lin, Z. & Lin, H. (2013).** The biosynthesis and biological function of diphthamide. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **48**, 515–521.
- Szwajczak, E., Fijalkowska, I. J. & Suski, C. (2017).** The CysB motif of Rev3p involved in the formation of the four-subunit DNA polymerase ζ is required for defective-replisome-induced mutagenesis. *Molecular Microbiology* **106**, 659–672.
- Tang, H.-M. V., Pan, K., Kong, K.-Y. E., Hu, L., Chan, L.-C., Siu, K.-L., Sun, H., Wong, C.-M. & Jin, D.-Y. (2015).** Loss of APD1 in yeast confers hydroxyurea sensitivity suppressed by Yap1p transcription factor. *Scientific Reports* **5**, 7897.
- Tantoso, E., Eisenhaber, B., Sinha, S., Jensen, L. J. & Eisenhaber, F. (2023).** Did the early full genome sequencing of yeast boost gene function discovery? *Biology Direct* **18**, 46.
- Thayer, M. M., Ahern, H., Xing, D., Cunningham, R. P. & Tainer, J. A. (1995).** Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *The EMBO Journal* **14**, 4108–4120.
- Thermo Fischer. BCA-Assay.** https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf, accessed December 5, 2022.
- Thermo Fischer (2022).** Zeba Spin. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSG/brochures/1602753-Zeba-Desalting-Brochure.pdf>, accessed December 8, 2022.
- Thomas, P. D., Ebert, D., Muruganujan, A., Mushayahama, T., Albou, L.-P. & Mi, H. (2022).** PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein science : a publication of the Protein Society* **31**, 8–22.
- Trotta, P. P., Platzer, K. E., Haschemeyer, R. H. & Meister, A. (1974).** Glutamine-binding subunit of glutamate synthase and partial reactions catalyzed by this glutamine amidotransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**, 4607–4611.
- Tyanova, S., Temu, T. & Cox, J. (2016).** The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols* **11**, 2301–2319.
- Ueta, R., Fujiwara, N., Iwai, K. & Yamaguchi-Iwai, Y. (2007).** Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 2980–2990.

- Ugalde, J. M., Lamig, L., Herrera-Vásquez, A., Fuchs, P., Homagk, M., Kopriva, S., Müller-Schüssele, S. J., Holuigue, L. & Meyer, A. J. (2021).** A dual role for glutathione transferase U7 in plant growth and protection from methyl viologen-induced oxidative stress. *Plant Physiology* **187**, 2451–2468.
- (2023).** UniProt: the Universal Protein Knowledgebase. *Nucleic Acids Research* **51**, D523–D531.
- Urzica, E., Pierik, A. J., Mühlenhoff, U. & Lill, R. (2009).** Crucial role of conserved cysteine residues in the assembly of two iron-sulfur clusters on the CIA protein Nar1. *Biochemistry* **48**, 4946–4958.
- Ütkür, K., Mayer, K., Liu, S., Brinkmann, U. & Schaffrath, R. (2024).** Functional Integrity of Radical SAM Enzyme Dph1•Dph2 Requires Non-Canonical Cofactor Motifs with Tandem Cysteines. *Biomolecules* **14**.
- Valenzuela, L., Ballario, P., Aranda, C., Filetici, P. & González, A. (1998).** Regulation of expression of GLT1, the gene encoding glutamate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **180**, 3533–3540.
- van Karnebeek, C. D. M., Tarailo-Graovac, M., Leen, R., Meinsma, R., Correard, S., Jansen-Meijer, J., Prykhodzhiy, S. V., Pena, I. A. & Ban, K. & other authors (2024).** CIAO1 and MMS19 deficiency: A lethal neurodegenerative phenotype caused by cytosolic Fe-S cluster protein assembly disorders. *Genetics in Medicine : official Journal of the American College of Medical Genetics* **26**, 101104.
- Vanoni, M. A. (2021).** Iron-sulfur flavoenzymes: the added value of making the most ancient redox cofactors and the versatile flavins work together. *Open Biology* **11**, 210010.
- Vanoni, M. A., Dossena, L., van den Heuvel, R. H. H. & Curti, B. (2005).** Structure-function studies on the complex iron-sulfur flavoprotein glutamate synthase: the key enzyme of ammonia assimilation. *Photosynthesis Research* **83**, 219–238.
- Veronesi, G., Pérard, J., Clémancey, M., Gerez, C., Duverger, Y., Kieffer, I., Barras, F., Gambarelli, S., Blondin, G. & Ollagnier de Choudens, S. (2024).** Multimodal Spectroscopic Analysis of the Fe-S Clusters of the as-Isolated *Escherichia coli* SufBC2D Complex. *Inorganic Chemistry* **63**, 8730–8738.
- Vögtle, F.-N., Burkhart, J. M., Gonczarowska-Jorge, H., Kücüköke, C., Taskin, A. A., Kopczynski, D., Ahrends, R., Mossmann, D. & Sickmann, A. & other authors (2017).** Landscape of submitochondrial protein distribution. *Nature Communications* **8**, 290.
- Waddell, G. L., Gilmer, C. R., Taylor, N. G., Reveral, J. R. S., Forconi, M. & Fox, J. L. (2017).** The eukaryotic enzyme Bds1 is an alkyl but not an aryl sulfohydrolase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **491**, 382–387.
- Walther, D. M. & Mann, M. (2011).** Accurate quantification of more than 4000 mouse tissue proteins reveals minimal proteome changes during aging. *Molecular & Cellular Proteomics* **10**, M110.004523.
- Wang, R. (1985).** Some properties of glutamine synthetase and glutamate synthase from *Derxia gummosa*. *Phytochemistry* **24**, 1133–1139.
- Wang, W., Daley, J. M., Kwon, Y., Xue, X., Krasner, D. S., Miller, A. S., Nguyen, K. A., Williamson, E. A. & Shim, E. Y. & other authors (2018).** A DNA nick at Ku-blocked double-strand break ends serves as an entry site for exonuclease 1 (Exo1) or Sgs1-Dna2 in long-range DNA end resection. *The Journal of Biological Chemistry* **293**, 17061–17069.
- Weerapana, E., Wang, C., Simon, G. M., Richter, F., Khare, S., Dillon, M. B. D., Bachovchin, D. A., Mowen, K., Baker, D. & Cravatt, B. F. (2010).** Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* **468**, 790–795.

- White, M. F. (2009).** Structure, function and evolution of the XPD family of iron-sulfur-containing 5'--3' DNA helicases. *Biochemical Society Transactions* **37**, 547–551.
- Wiedemann, N., Urzica, E., Guiard, B., Müller, H., Lohaus, C., Meyer, H. E., Ryan, M. T., Meisinger, C. & Mühlenhoff, U. & other authors (2006).** Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *The EMBO Journal* **25**, 184–195.
- Wiśniewski, J. R. & Mann, M. (2016).** A Proteomics Approach to the Protein Normalization Problem: Selection of Unvarying Proteins for MS-Based Proteomics and Western Blotting. *Journal of Proteome Research* **15**, 2321–2326.
- Wong, E. D., Miyasato, S. R., Aleksander, S., Karra, K., Nash, R. S., Skrzypek, M. S., Weng, S., Engel, S. R. & Cherry, J. M. (2023).** *Saccharomyces* genome database update: server architecture, pan-genome nomenclature, and external resources. *Genetics* **224**.
- Woolford, J. L. & Baserga, S. J. (2013).** Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **195**, 643–681.
- Wu, Y. & Brosh, R. M. (2012).** DNA helicase and helicase-nuclease enzymes with a conserved iron-sulfur cluster. *Nucleic Acids Research* **40**, 4247–4260.
- Xu, X. M. & Møller, S. G. (2011).** Iron-sulfur clusters: biogenesis, molecular mechanisms, and their functional significance. *Antioxidants & Redox Signaling* **15**, 271–307.
- Yadav, P. K. & Rajasekharan, R. (2016).** Misregulation of a DDHD Domain-containing Lipase Causes Mitochondrial Dysfunction in Yeast. *The Journal of Biological Chemistry* **291**, 18562–18581.
- Yarunin, A., Panse, V. G., Petfalski, E., Dez, C., Tollervey, D. & Hurt, E. C. (2005).** Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *The EMBO Journal* **24**, 580–588.
- Young, A. P. & Bandarian, V. (2015).** Mechanistic Studies of the Radical S-Adenosyl-L-methionine Enzyme 4-Demethylwyosine Synthase Reveal the Site of Hydrogen Atom Abstraction. *Biochemistry* **54**, 3569–3572.
- Young, A. P. & Bandarian, V. (2021).** Eukaryotic TYW1 Is a Radical SAM Flavoenzyme. *Biochemistry* **60**, 2179–2185.
- Young, D. J., Guydosh, N. R., Zhang, F., Hinnebusch, A. G. & Green, R. (2015).** Rli1/ABCE1 Recycles Terminating Ribosomes and Controls Translation Reinitiation in 3'UTRs In Vivo. *Cell* **162**, 872–884.
- Yu, Y., Pham, N., Xia, B., Papusha, A., Wang, G., Yan, Z., Peng, G., Chen, K. & Ira, G. (2018).** Dna2 nuclease deficiency results in large and complex DNA insertions at chromosomal breaks. *Nature* **564**, 287–290.
- Yuan, Z., Georgescu, R., Li, H. & O'Donnell, M. E. (2023).** Molecular choreography of primer synthesis by the eukaryotic Pol α -primase. *bioRxiv : the preprint server for biology*.
- Yuan, Z., Georgescu, R., Schauer, G. D., O'Donnell, M. E. & Li, H. (2020).** Structure of the polymerase ϵ holoenzyme and atomic model of the leading strand replisome. *Nature Communications* **11**, 3156.
- Yuda, E., Tanaka, N., Fujishiro, T., Yokoyama, N., Hirabayashi, K., Fukuyama, K., Wada, K. & Takahashi, Y. (2017).** Mapping the key residues of SufB and SufD essential for biosynthesis of iron-sulfur clusters. *Scientific Reports* **7**, 9387.
- Zanon, P. R. A., Lewald, L. & Hacker, S. M. (2020).** Isotopically Labeled Desthiobiotin Azide (isoDTB) Tags Enable Global Profiling of the Bacterial Cysteinome. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **59**, 2829–2836.

Zhang, L. & Vertes, A. (2018). Single-Cell Mass Spectrometry Approaches to Explore Cellular Heterogeneity. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **57**, 4466–4477.

Zhang, Y., Su, D., Dzikovski, B., Majer, S. H., Coleman, R., Chandrasekaran, S., Fenwick, M. K., Crane, B. R. & Lancaster, K. M. & other authors (2021). Dph3 Enables Aerobic Diphthamide Biosynthesis by Donating One Iron Atom to Transform a 3Fe-4S to a 4Fe-4S Cluster in Dph1-Dph2. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 9314–9319.

Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H. & Dean, D. R. (1998). Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 13264–13272.

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

Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F. & Dean, D. R. (1993). Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 2754–2758.

8. Anhang

8.1 Tüpfeltests

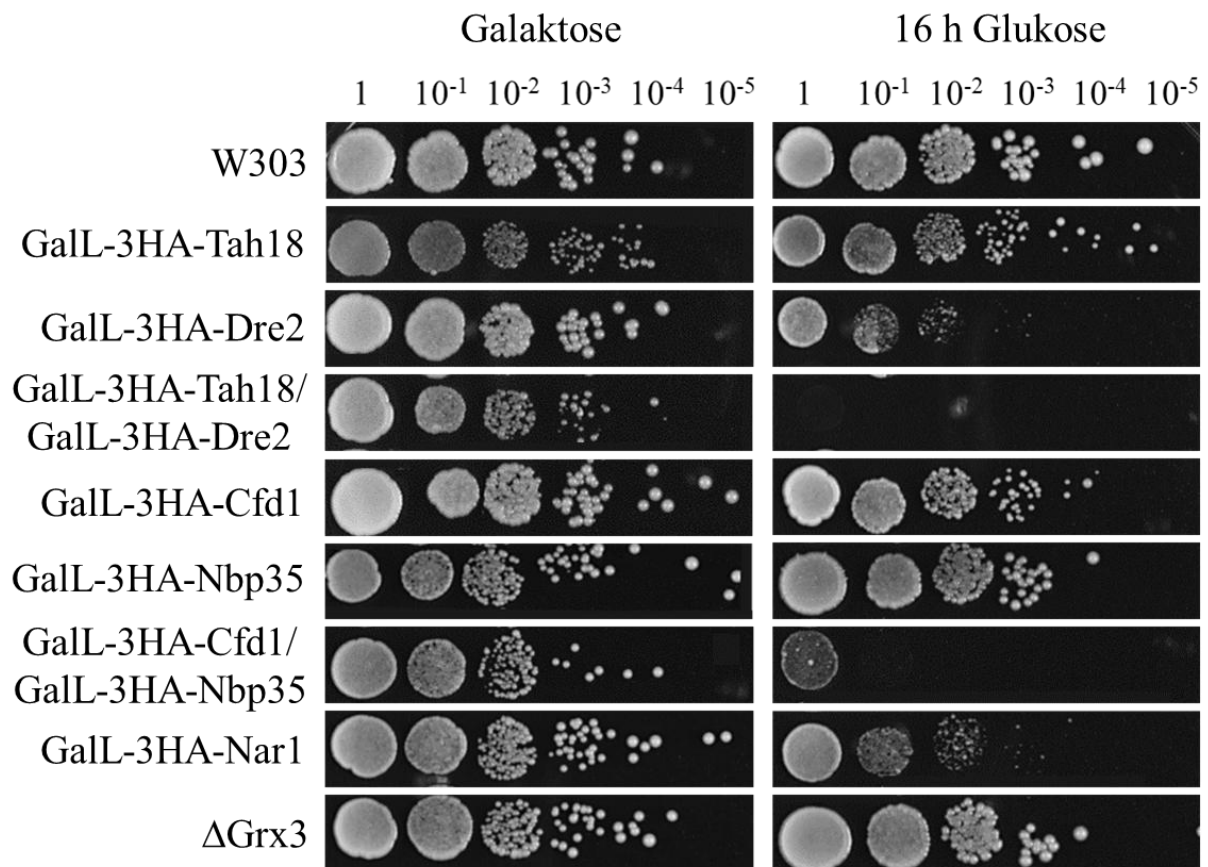


Abbildung 101: Tüpfeltests verschiedener Hefedepletionsstämme. Gezeigt sind verschiedene Vollmedium-Agarplatten. Darauf wurden Hefestämme in verschiedenen Verdünnungen, angefangen mit einer OD₆₀₀ = 0.5 bis hin zu einer 1:100,000 Verdünnung getüpfelt. Links neben den Tüpfeltest wird die Art des Hefestammes beschrieben. W303 ist der Wildtyp, mittels GalL-Promotor depletierbare Hefestämme wurden über das depletierbare Protein links beschrieben und bei Hefestämmen mit Deletionen wurde das deletierte Gen links beschrieben. Alle Tüpfeltest wurden mindestens als Duplikat (n = 2) durchgeführt. Die Platten wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert. Über der Spalte ist der im Vollmedium verwendete Zucker, sowie die Wachstumsdauer in dem jeweiligen Flüssigmedium vor dem Tüpfeltest beschrieben (Rohdaten 46).

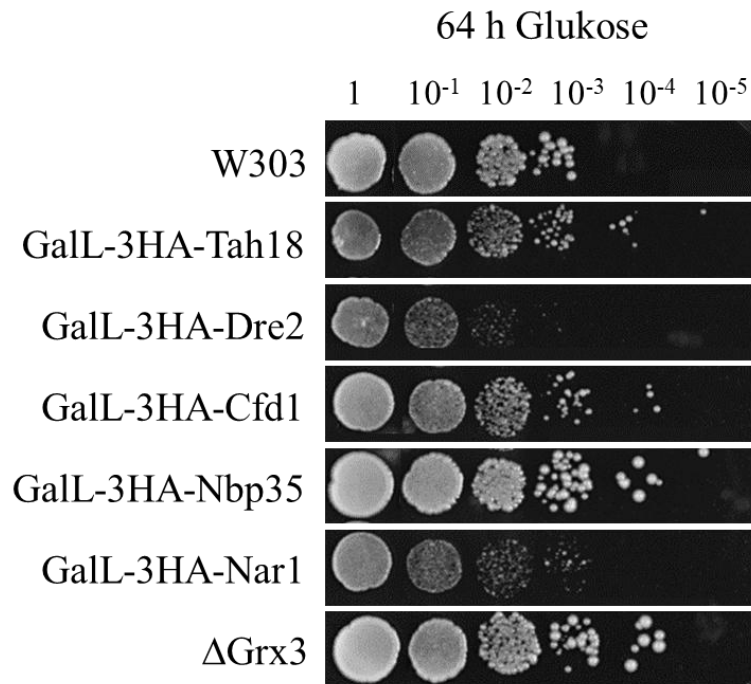


Abbildung 102: Tüpfeltests verschiedener Hefedepletionsstämme. Gezeigt sind verschiedene Vollmedium-Agarplatten. Darauf wurden Hefestämme in verschiedenen Verdünnungen, angefangen mit einer OD₆₀₀ = 0.5 bis hin zu einer 1:100,000 Verdünnung getüpfelt. Links neben den Tüpfeltest wird die Art des Hefestammes beschrieben. W303 ist der Wildtyp, mittels GalL-Promotor depletierbare Hefestämme wurden über das depletierbare Protein links beschrieben und bei Hefestämmen mit Deletionen wurde das deletierte Gen links beschrieben. Alle Tüpfeltest wurden mindestens als Duplikat (n = 2) durchgeführt. Die Platten wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert. Vor Durchführung des Tüpfeltests wurden die Hefestämme für 64 h in Flüssigkulturen mit Glukose als Zucker inkubiert (Rohdaten 46).

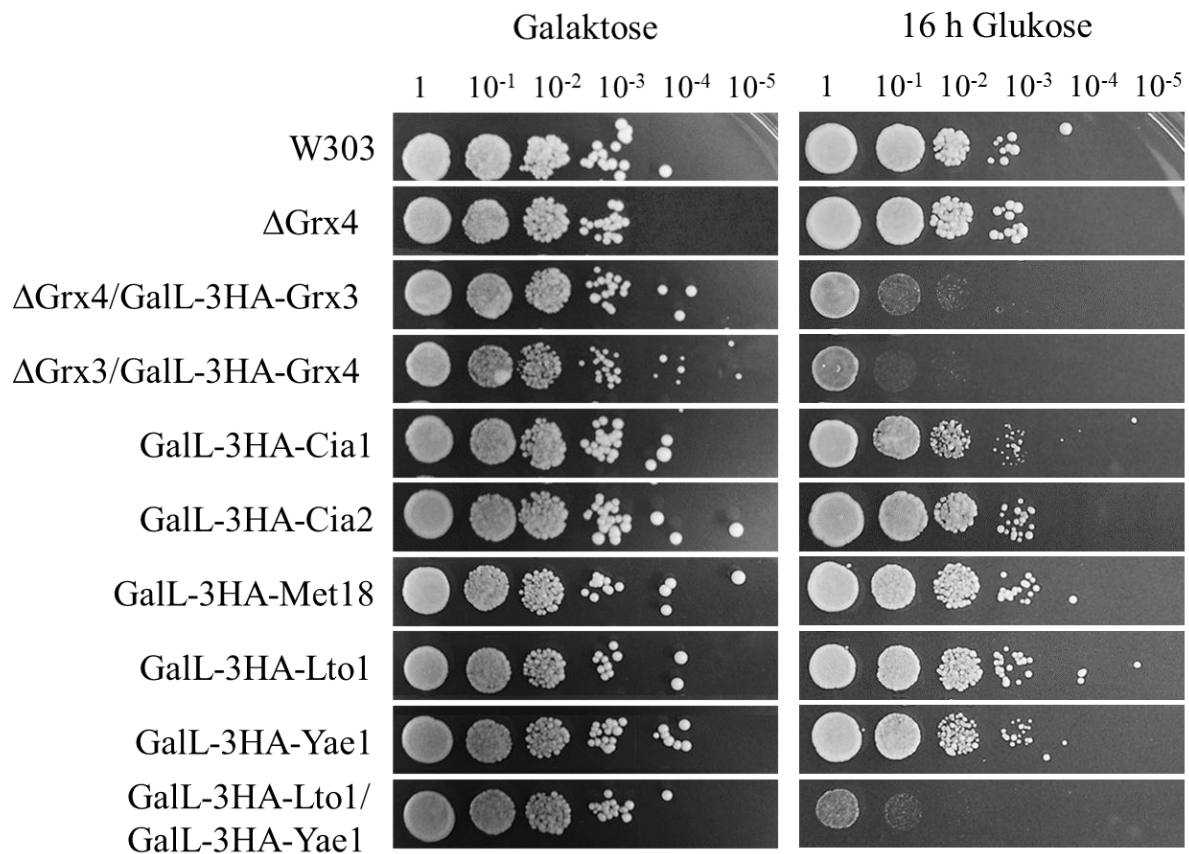


Abbildung 103: Tüpfeltests Verschiedener Hefedepletionsstämme. Gezeigt sind verschiedene Vollmedium-Agarplatten. Darauf wurden Hefestämme in verschiedenen Verdünnungen, angefangen mit einer OD₆₀₀ = 0.5 bis hin zu einer 1:100,000 Verdünnung getüpfelt. Links neben den Tüpfeltest wird die Art des Hefestammes beschrieben. W303 ist der Wildtyp, mittels GalL-Promotor depletierbare Hefestämme wurden über das depletierbare Protein links beschrieben und bei Hefestämmen mit Deletionen wurde das deletierte Gen links beschrieben. Alle Tüpfeltest wurden mindestens als Duplikat (n = 2) durchgeführt. Die Platten wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert. Über der Spalte ist der im Vollmedium verwendete Zucker, sowie die Wachstumsdauer in dem jeweiligen Flüssigmedium vor dem Tüpfeltest beschrieben (Rohdaten 47).

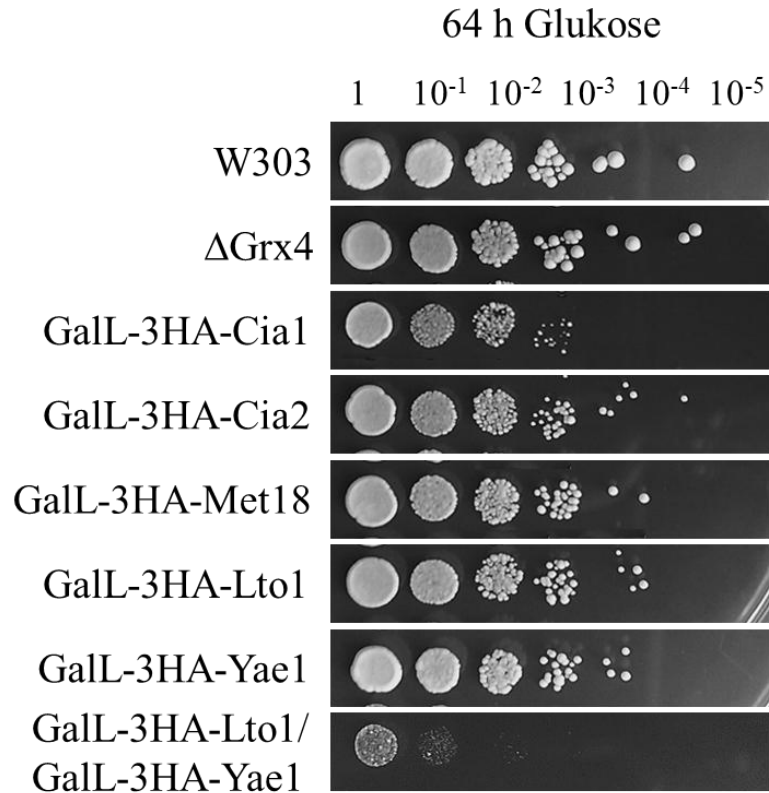


Abbildung 104: Tüpfeltests verschiedener Hefestämme. Gezeigt sind verschiedene Vollmedium-Agarplatten. Darauf wurden Hefestämme in verschiedenen Verdünnungen, angefangen mit einer OD₆₀₀ = 0.5 bis hin zu einer 1:100,000 Verdünnung getüpfelt. Links neben den Tüpfeltest wird die Art des Hefestammes beschrieben. W303 ist der Wildtyp, mittels GalL-Promotor depletierbare Hefestämme wurden über das depletierbare Protein links beschrieben und bei Hefestämmen mit Deletionen wurde das deletierte Gen links beschrieben. Alle Tüpfeltest wurden mindestens als Duplikat (n = 2) durchgeführt. Die Platten wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert. Vor Durchführung des Tüpfeltests wurden die Hefestämme für 64 h in Flüssigkulturen mit Glukose als Zucker inkubiert (Rohdaten 47).

8.2 Western Blots

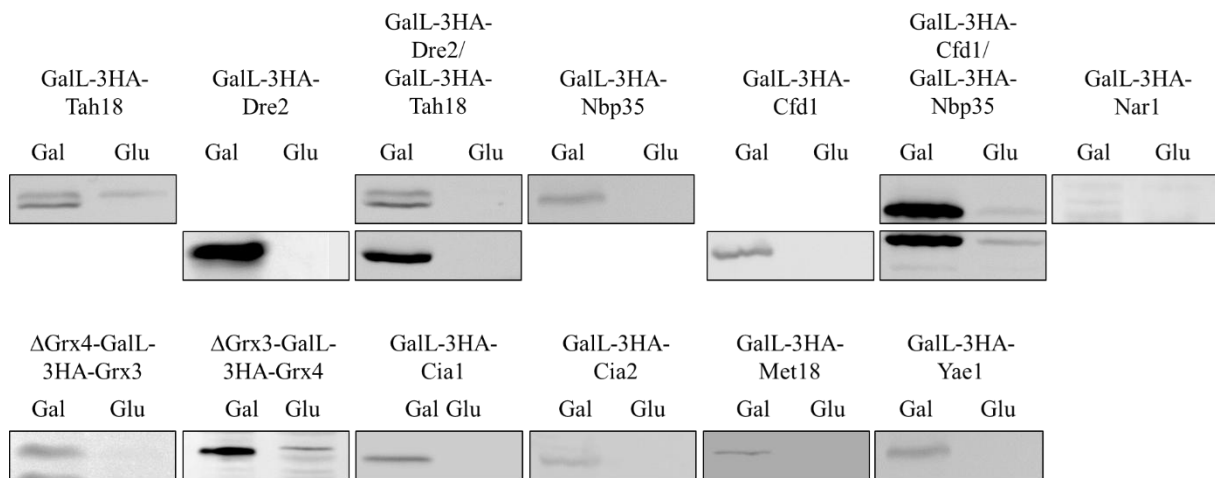


Abbildung 105: Zusammenfassung der Western Blots von Zellextrakten mutierter Hefestämme. Gezeigt ist eine Zusammenstellung von Western Blots von mittels Rödel-Methode aufgeschlossenen Hefezellen. Dabei wurden abwechselnd Zellextrakte aus Wachstum mit Galaktose und Glukose im Medium (Gal und Glu) aufgetragen. Die Membranen wurden mit HA-Antikörpern inkubiert und mit unterschiedlichen Belichtungsängen aufgenommen.

8.3 Wachstumskurven

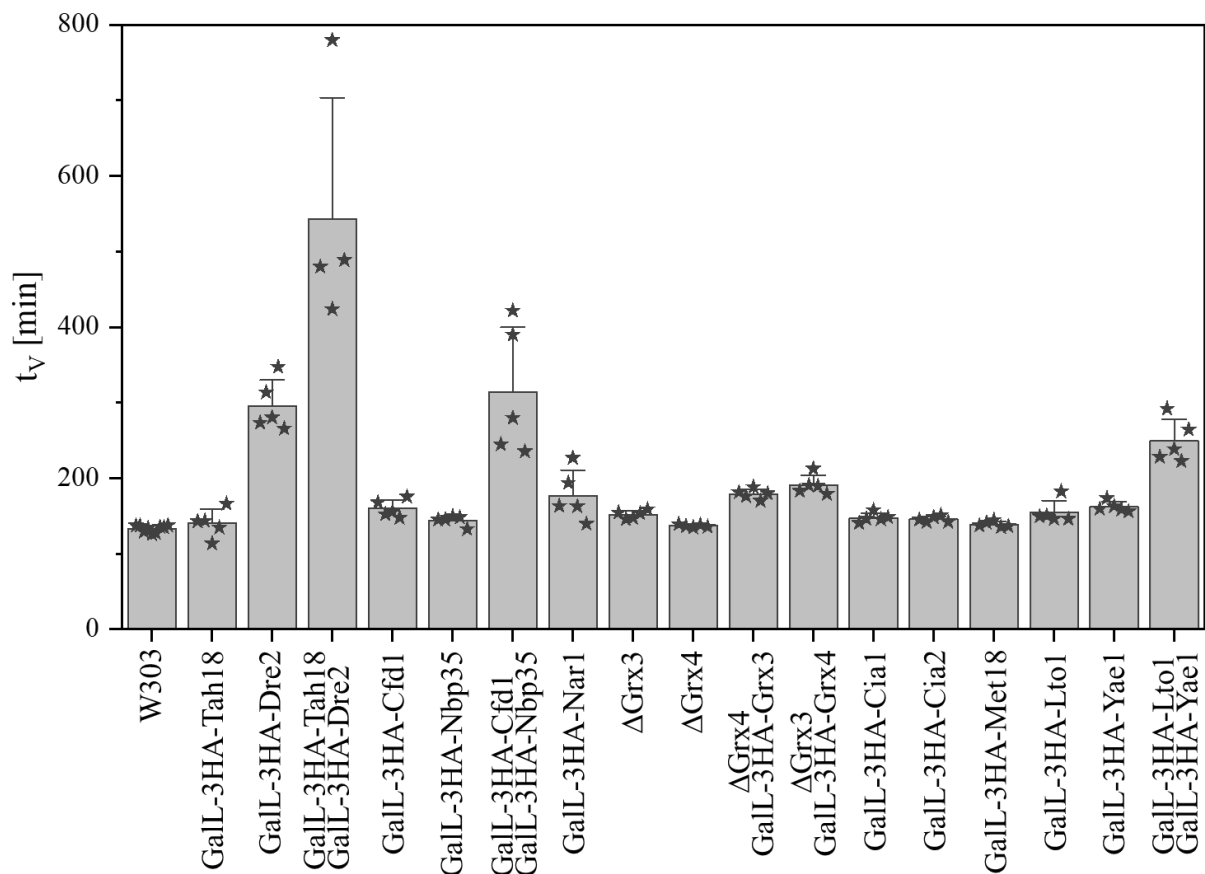


Abbildung 106: Verdopplungszeiten der mutierten Hefestämme nach 16 Stunden Wachstum mit Glukose als Kohlenstoffquelle. Gezeigt ist die minimale Verdopplungszeit verschiedener Hefestämme in Form der einzelnen Replikate (Sterne), sowie der daraus errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen (Rohdaten 40, 41).

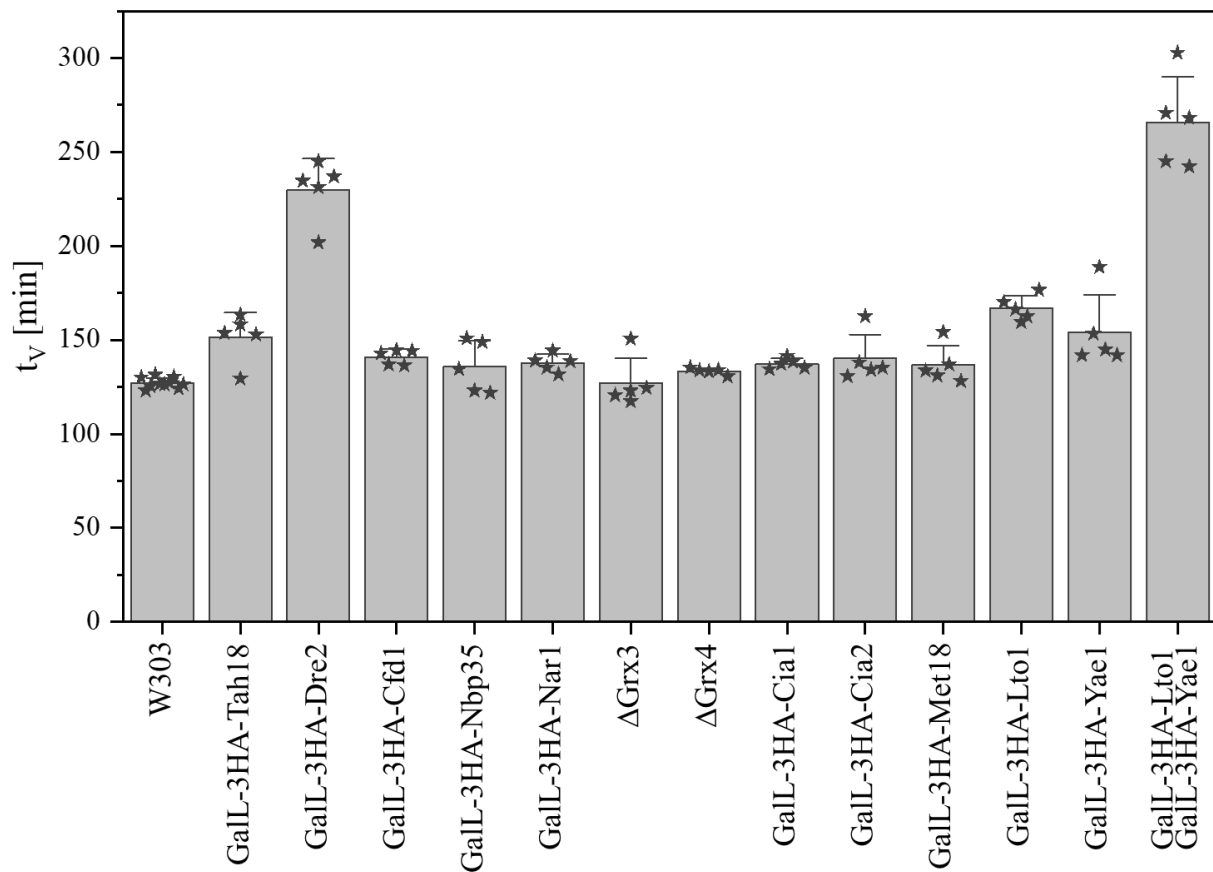


Abbildung 107: Verdopplungszeiten der mutierten Hefestämme nach 64 Stunden Wachstum mit Glukose als Kohlestoffquelle. Gezeigt ist die minimale Verdopplungszeit verschiedener Hefestämme in Form der einzelnen Replikate (Sterne), sowie der daraus errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen (Rohdaten 42, 43).

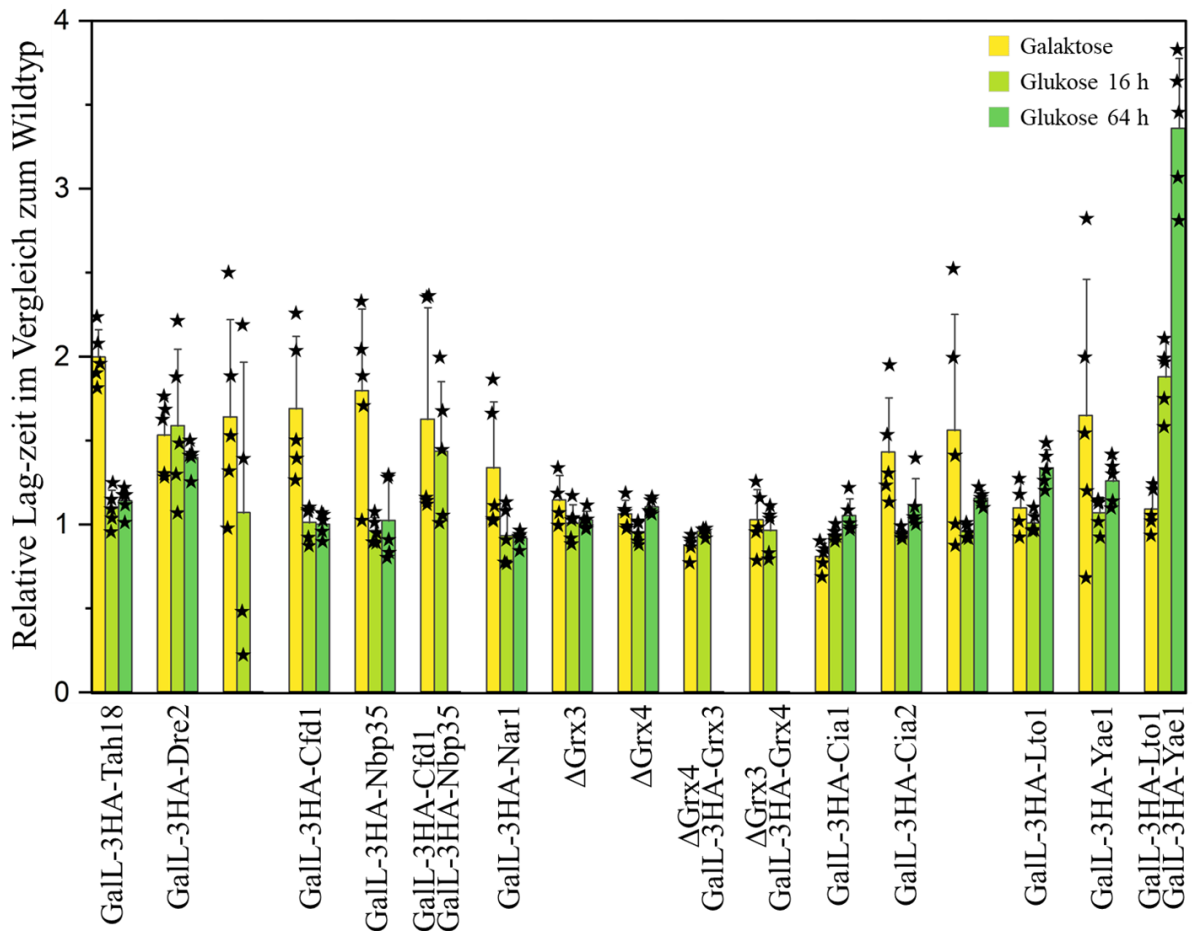


Abbildung 108: Relative Lag-Zeit der mutierten Hefestämme im Vergleich zum Wildtyp W303. Gezeigt ist die Veränderung der Lag-Zeit der verschiedenen Hefestämme relativ zu dem im selben Experiment gemessenen Wildtyp. Angegeben sind bei allen Stämmen die einzelnen Messwerte der Replikate (Sterne), deren Mittelwerte, sowie die Standardabweichung. Die Farbe der Balken weist auf die Zeit des Wachstums mit einem spezifischen Zucker vor Ausführung dieses Experiments hin. Die Lag-Zeit wurde automatisiert durch das Messprogramm errechnet (Rohdaten 48).

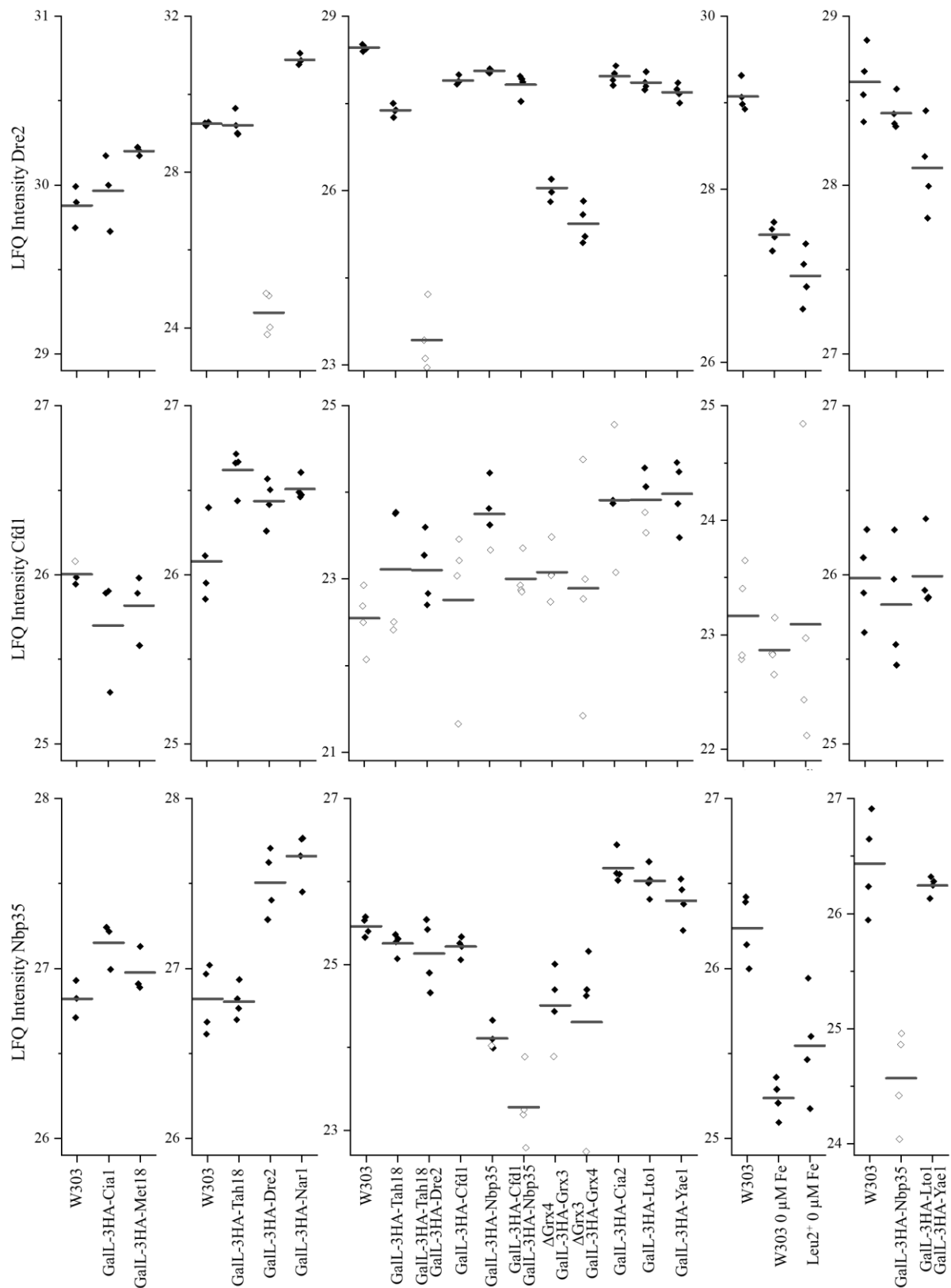


Abbildung 110: Abundanzen der CIA-Proteine in verschiedenen Depletionsstämmen. Gezeigt ist die gemessene LFQ-Intensität von Dre2, Cfd1 und Nbp35 in verschiedenen Hefe-Zellextrakten verschiedener Depletionsstämmen. Dabei wurden biologische Replikate gemessen (n = 3 oder 4) und deren Mittelwert aufgetragen. Volle Vierecke zeigen Messwerte, ungefüllte Vierecke zeigen imputierte Werte (Rohdaten 44).

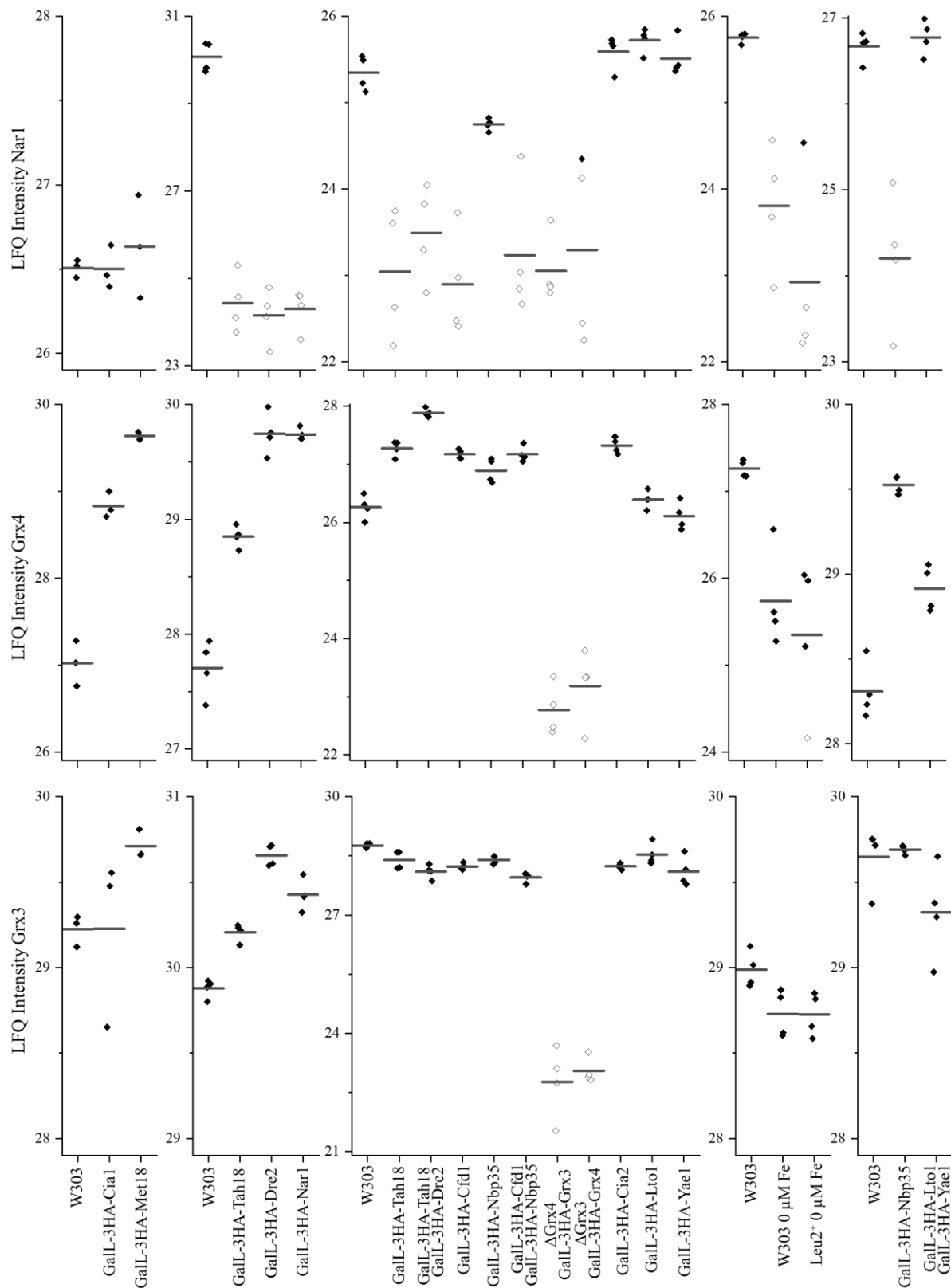


Abbildung 111: Abundanzen der CIA-Proteine in verschiedenen Depletionsstämmen. Gezeigt ist die gemessene LFQ-Intensität von Nar1, Grx4 und Grx3 in verschiedenen Hefe-Zell-extrakten verschiedener Depletionsstämmen. Dabei wurden biologische Replikate gemessen (n = 3 oder 4) und deren Mittelwert aufgetragen. Volle Vierecke zeigen Messwerte, ungefüllte Vierecke zeigen imputierte Werte (Rohdaten 44).

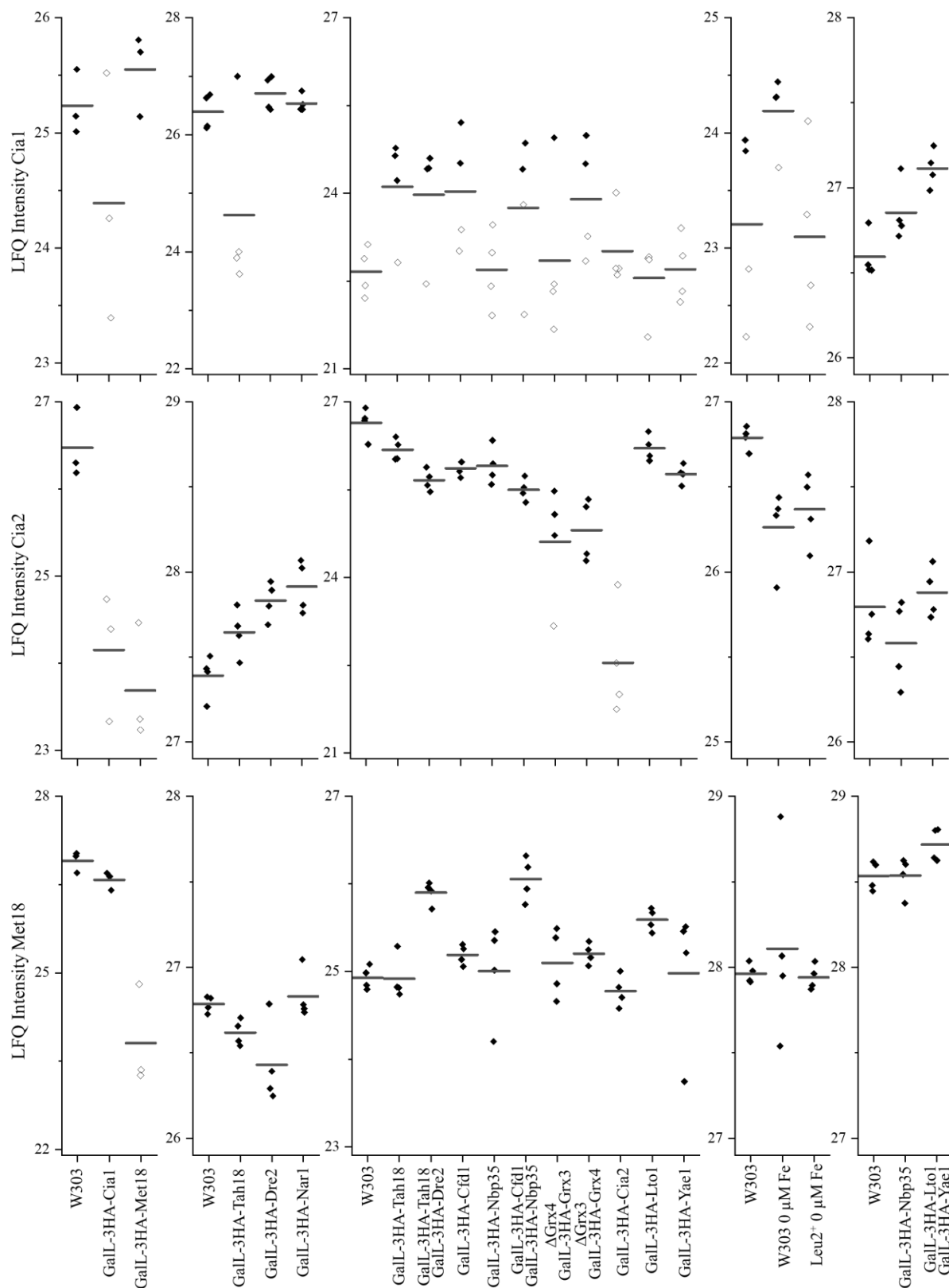


Abbildung 112: Abundanz der CTC-Proteine in verschiedenen Depletionsstämmen. Gezeigt ist die gemessene LFQ-Intensität von Cia1, Cia2 und Met18 in verschiedenen Hefe-Zell-extrakten verschiedener Depletionsstämmen. Dabei wurden biologische Replikate gemessen ($n = 3$ oder 4) und deren Mittelwert aufgetragen. Volle Vierecke zeigen Messwerte, ungefüllte Vierecke zeigen imputierte Werte (Rohdaten 44).

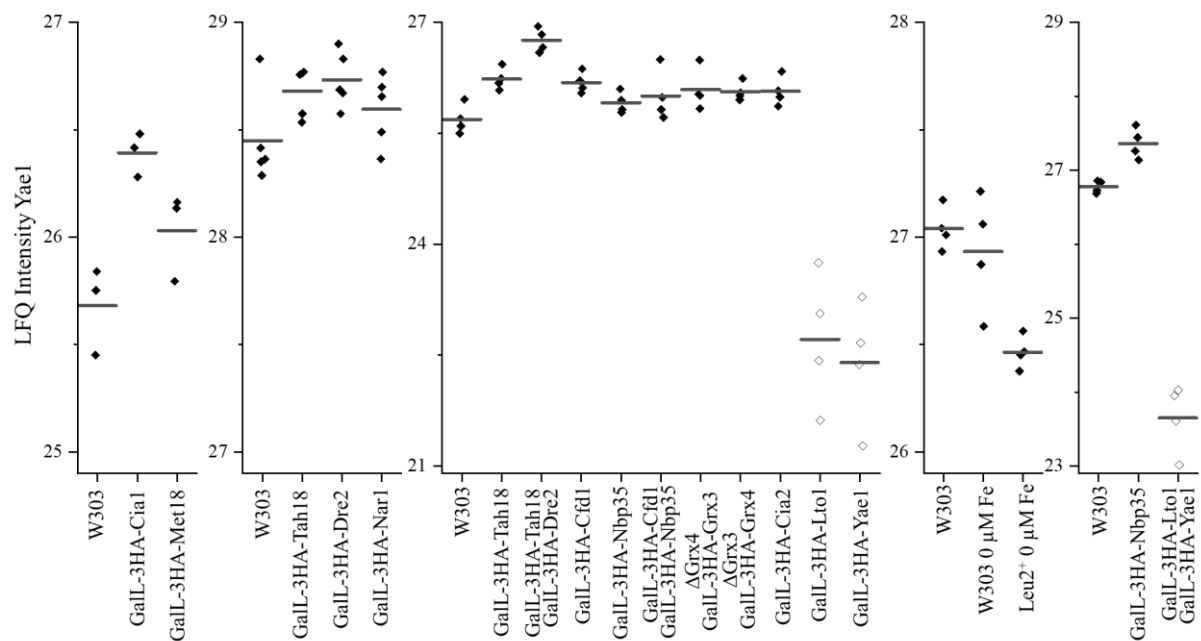


Abbildung 113: Abundanz von Yae1 in verschiedenen Depletionsstämmen. Gezeigt ist die gemessene LFQ-Intensität von Yae1 in verschiedenen Hefe-Zellextrakten verschiedener Depletionsstämmen. Dabei wurden biologische Replikate gemessen ($n = 3$ oder 4) und deren Mittelwert aufgetragen. Volle Vierecke zeigen Messwerte, ungefüllte Vierecke zeigen imputierte Werte (Rohdaten 44).

8.4.2 Zytoplasmische Fe/S-Proteine

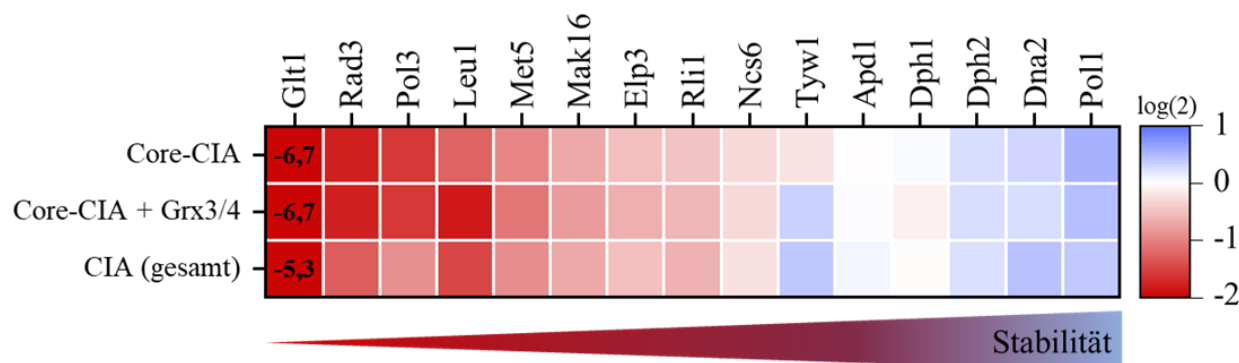


Abbildung 114: Stabilität der zytoplasmischen Eisen-Schwefel-Proteine unter Fe/S-limitierenden Bedingungen. Gezeigt sind die Abundanzveränderung im Vergleich zum Wildtyp bei verschiedenen Bedingungen welche die zytoplasmische Fe/S-Verfügbarkeit limitieren. Die gezeigten Werte stellen dabei den Mittelwert der links angegebenen Depletionsstämme dar. Dabei ist diese Abbildung eine Zusammenfassung von Abbildung 56, wobei „Core-CIA“ die Depletionsstämme der CIA-Faktoren Grx3/4, Yae1 und Lto1 ausschließt.

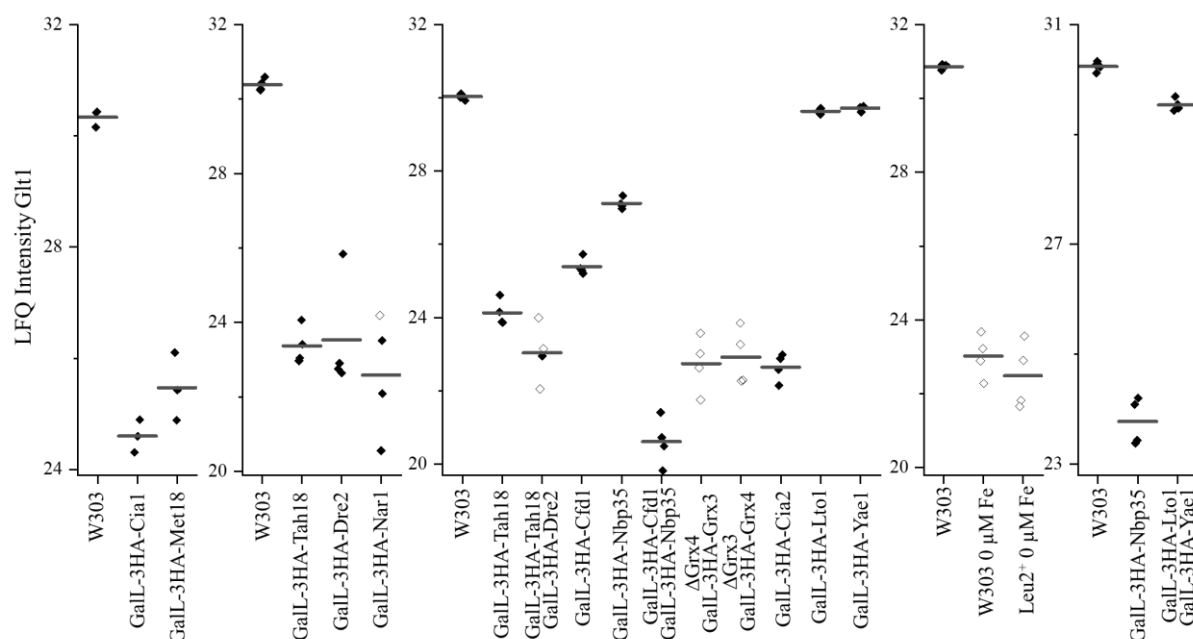


Abbildung 115: Abundanz von Glt1 in verschiedenen Depletionsstämmen. Gezeigt ist die gemessene LFQ-Intensität von Glt1 in verschiedenen Hefe-Zell-extrakten verschiedener Depletionsstämme. Dabei wurden biologische Replikate gemessen ($n = 3$ oder 4) und deren Mittelwert aufgetragen. Volle Vierecke zeigen Messwerte, ungefüllte Vierecke zeigen imputierte Werte (Rohdaten 44).

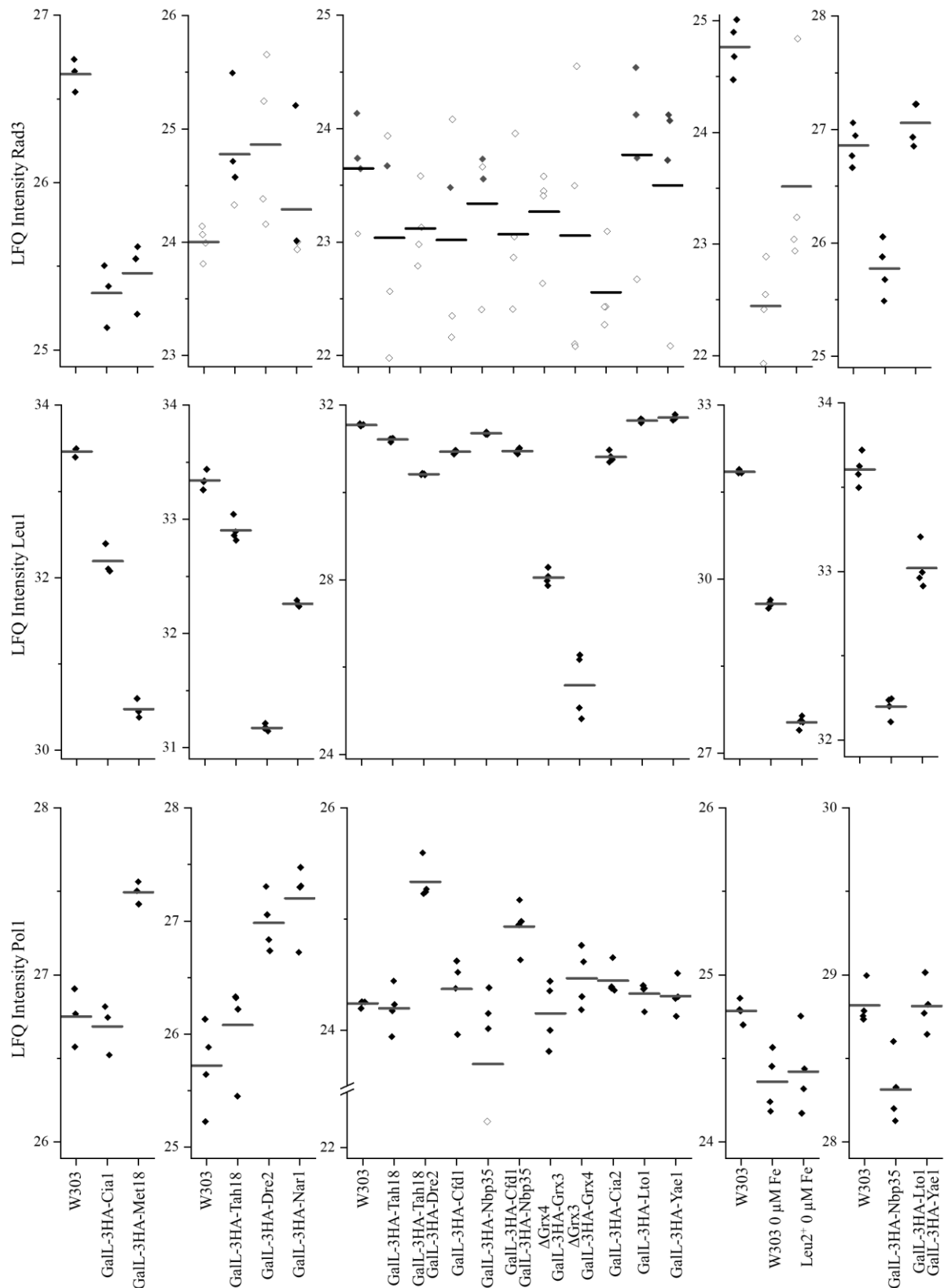


Abbildung 116: Abundanz von Rad3, Leu1 und Pol1 in verschiedenen Depletionsstämmen. Gezeigt ist die gemessene LFQ-Intensität von Rad3, Leu1 und Pol1 in verschiedenen Hefe-Zellextrakten verschiedener Depletionsstämmen. Dabei wurden biologische Replikate gemessen (n = 3 oder 4) und deren Mittelwert aufgetragen. Volle Vierecke zeigen Messwerte, ungefüllte Vierecke zeigen imputierte Werte (Rohdaten 44).

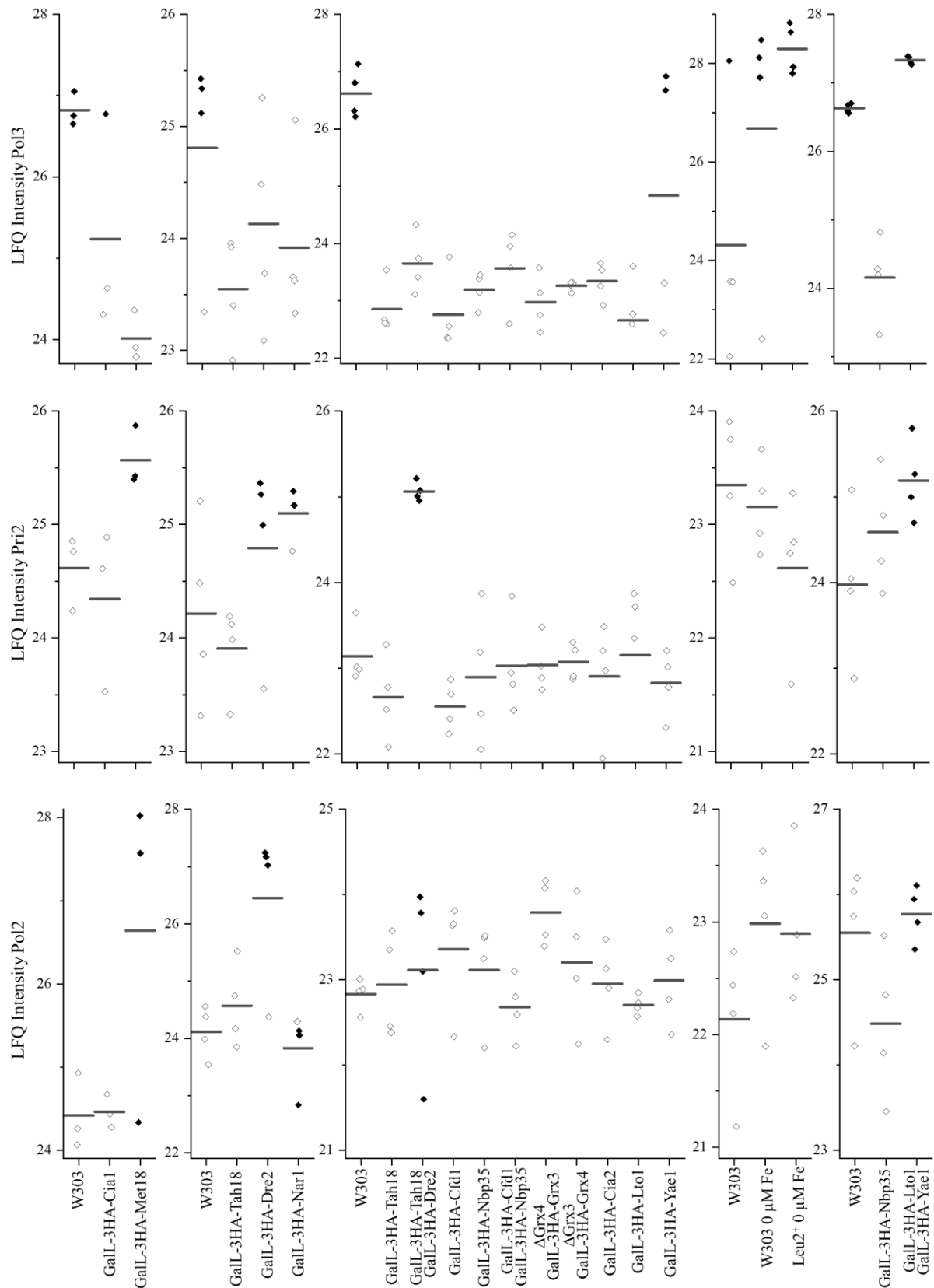


Abbildung 117: Abundanz von Pol3, Pri2 und Pol2 in verschiedenen Depletionsstämmen. Gezeigt ist die gemessene LFQ-Intensität von Pol3, Pri2 und Pol2 in verschiedenen Hefe-Zell-extrakten verschiedener Depletionsstämmen. Dabei wurden biologische Replikate gemessen (n = 3 oder 4) und deren Mittelwert aufgetragen. Volle Vierecke zeigen Messwerte, ungefüllte Vierecke zeigen imputierte Werte (Rohdaten 44).

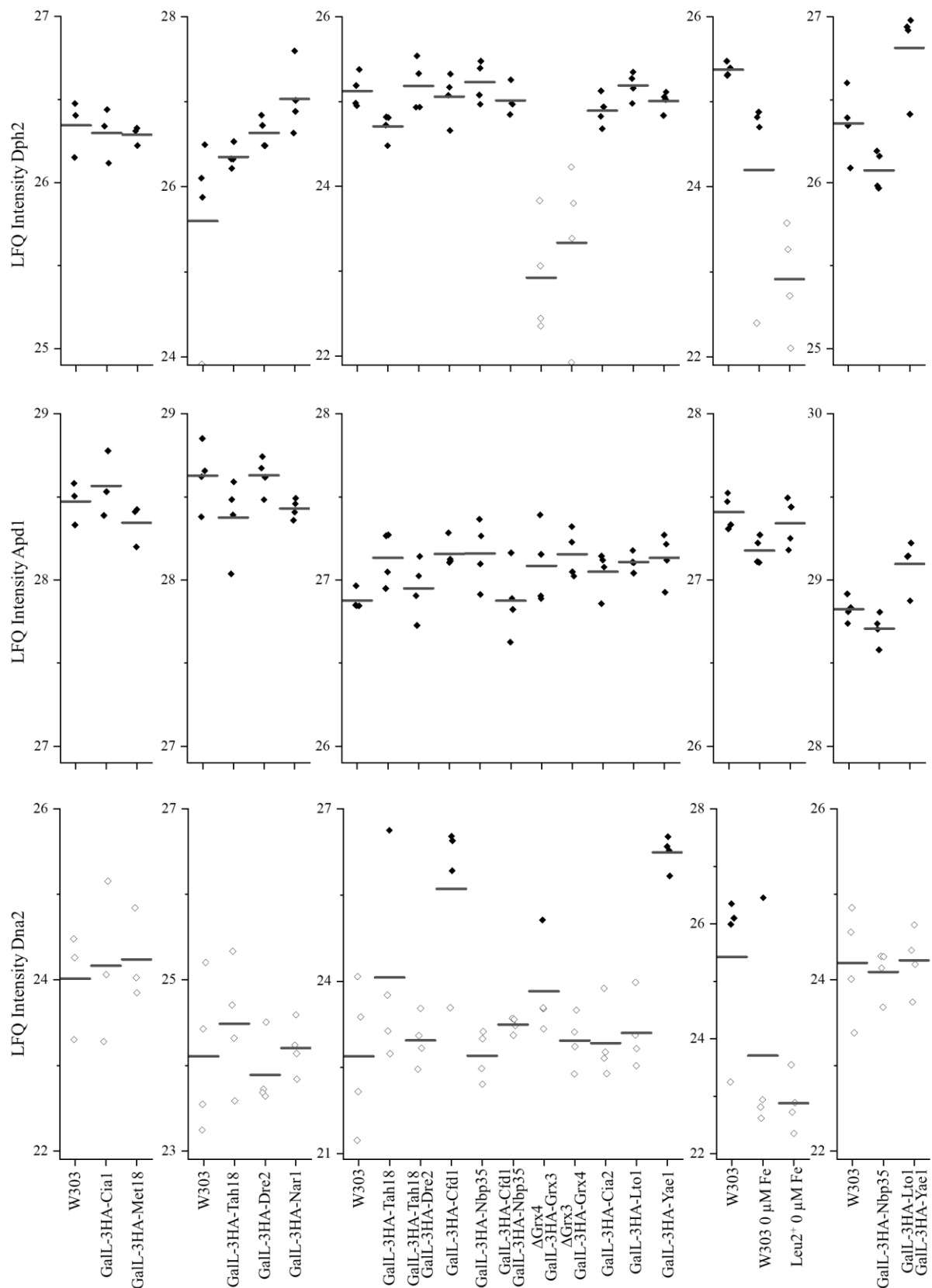


Abbildung 118: Abundanz von Dph2, Apd1 und Dna2 in verschiedenen Depletionsstämmen . Gezeigt ist die gemessene LFQ-Intensität von Dph2, Apd1 und Dna2 in verschiedenen Hefe-Zellextrakten verschiedener Depletionsstämmen. Dabei wurden biologische Replikate gemessen (n = 3 oder 4) und deren Mittelwert aufgetragen. Volle Vierecke zeigen Messwerte, ungefüllte Vierecke zeigen imputierte Werte (Rohdaten 44).

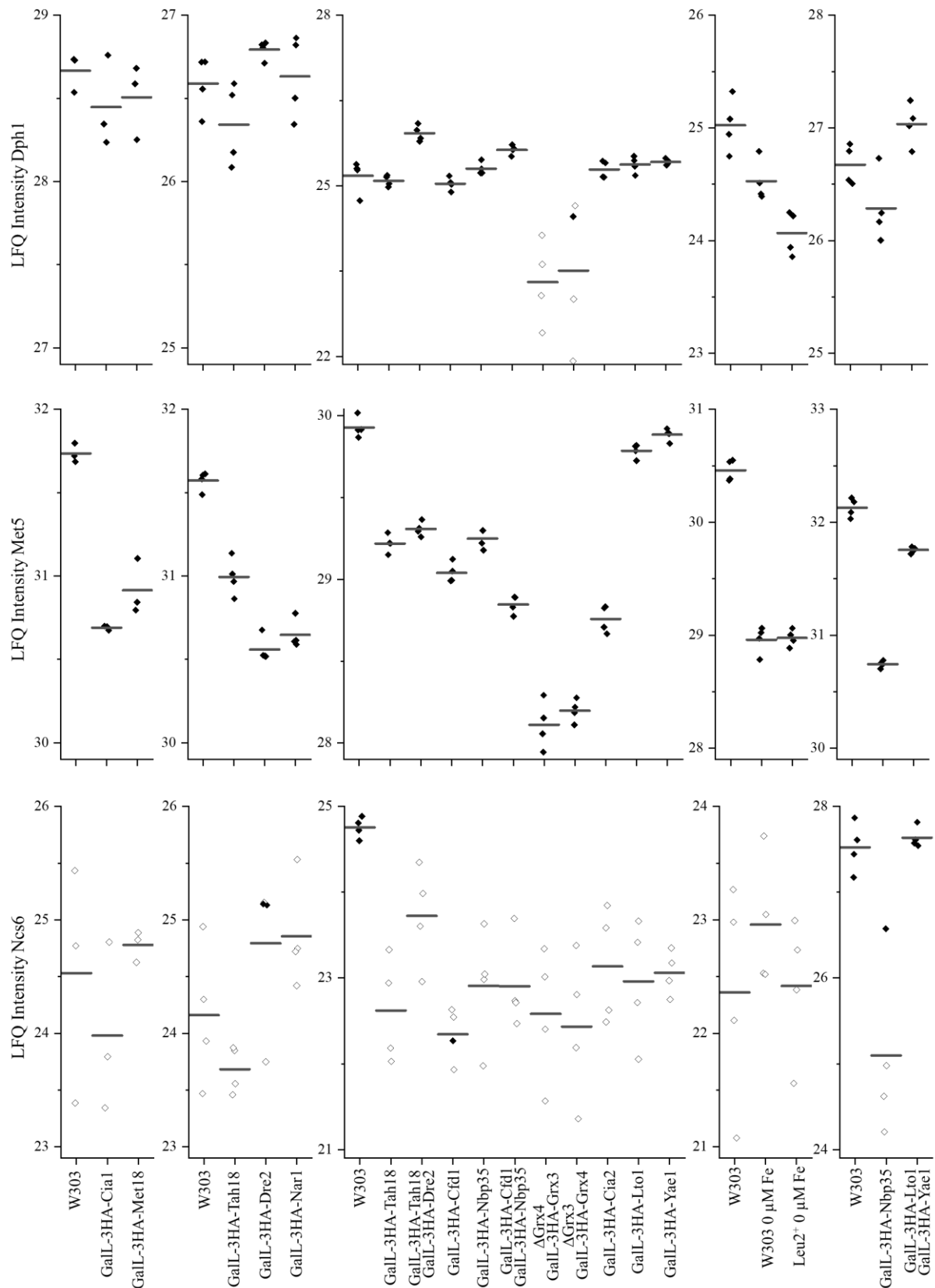


Abbildung 119: Abundanz von Dph1, Met5 und Ncs6 in verschiedenen Depletionsstämmen. Gezeigt ist die gemessene LFQ-Intensität von Dph1, Met5 und Ncs6 in verschiedenen Hefe-Zellextrakten verschiedener Depletionsstämmen. Dabei wurden biologische Replikate gemessen (n = 3 oder 4) und deren Mittelwert aufgetragen. Volle Vierecke zeigen Messwerte, ungefüllte Vierecke zeigen imputierte Werte (Rohdaten 44).

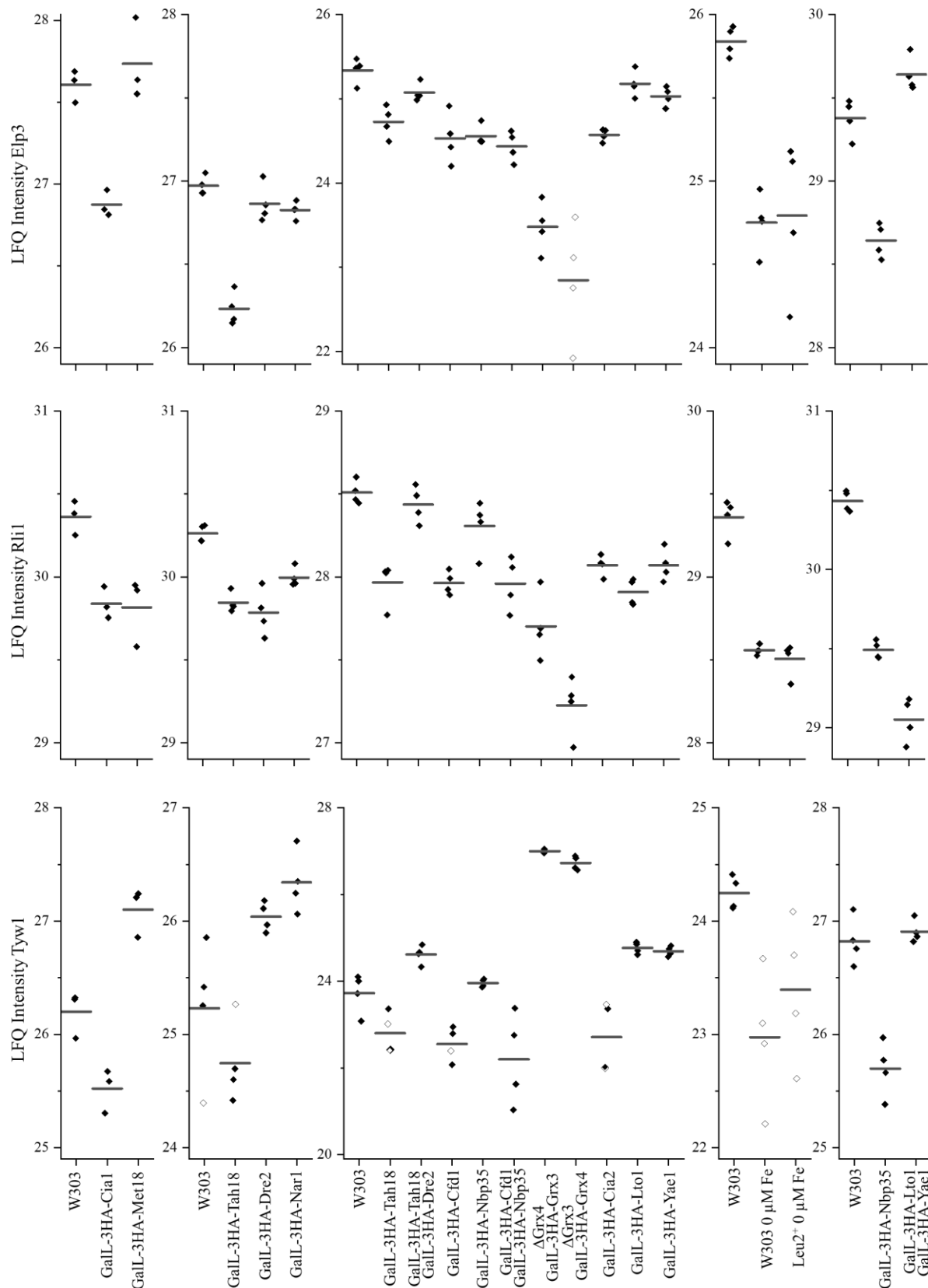


Abbildung 120: Abundanz von Elp3, Rli1 und Tyw1 in verschiedenen Depletionsstämmen. Gezeigt ist die gemessene LFQ-Intensität von Elp3, Rli1 und Tyw1 in verschiedenen Hefe-Zellextrakten verschiedener Depletionsstämmen. Dabei wurden biologische Replikate gemessen (n = 3 oder 4) und deren Mittelwert aufgetragen. Volle Vierecke zeigen Messwerte, ungefüllte Vierecke zeigen imputierte Werte (Rohdaten 44).

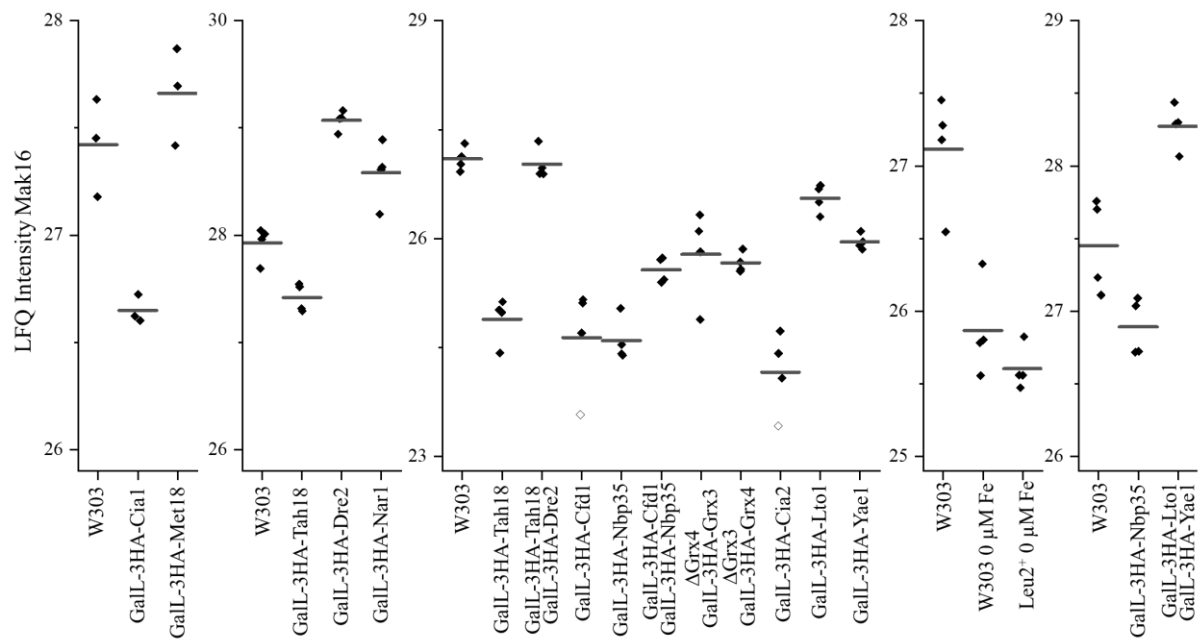


Abbildung 121: Abundanz von Mak16 in verschiedenen Depletionsstämmen. Gezeigt ist die gemessene LFQ-Intensität von Mak16 in verschiedenen Hefe-Zell-extrakten verschiedener Depletionsstämmen. Dabei wurden biologische Replikate gemessen ($n = 3$ oder 4) und deren Mittelwert aufgetragen. Volle Vierecke zeigen Messwerte, ungefüllte Vierecke zeigen imputierte Werte (Rohdaten 44).

8.4.3 Glykolyseproteine

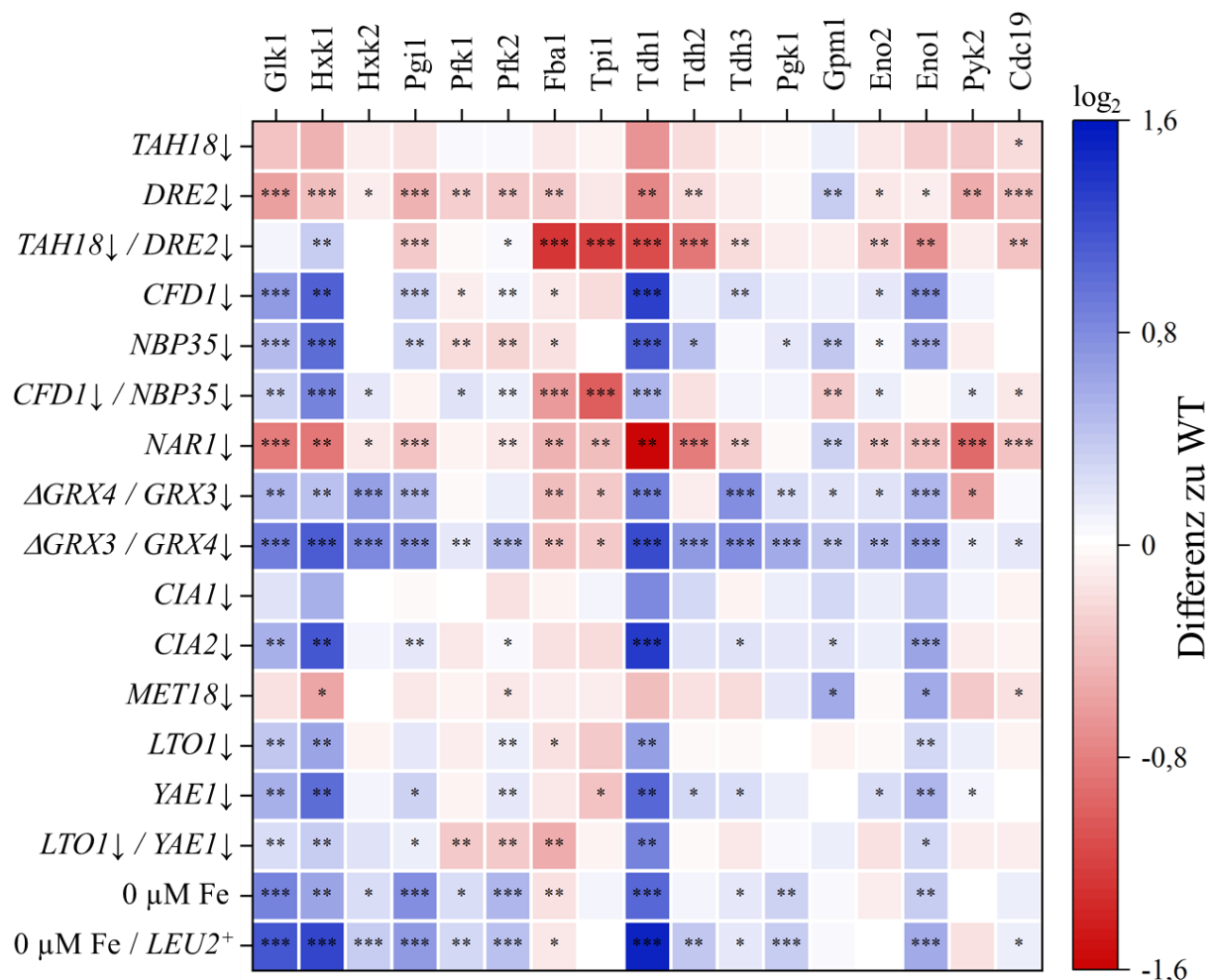


Abbildung 122: Änderungen an den Proteinabundanz der Glykolyse. Gezeigt sind die Differenzen der Abundanz der Glykolyseproteine in chronologischer Reihenfolge in Depletionsstämmen, verglichen mit dem Wildtyp. Errechnet wurde die Differenz aus dem Mittelwert von drei (Experiment 1) oder vier (Experiment 2-5) biologischen Replikaten. Die Signifikanz entspricht den mittels Students T-Test errechneten q-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.05, 0.01, 0.001 entspricht (Rohdaten 60).

8.4.4 Citratzyklusproteine

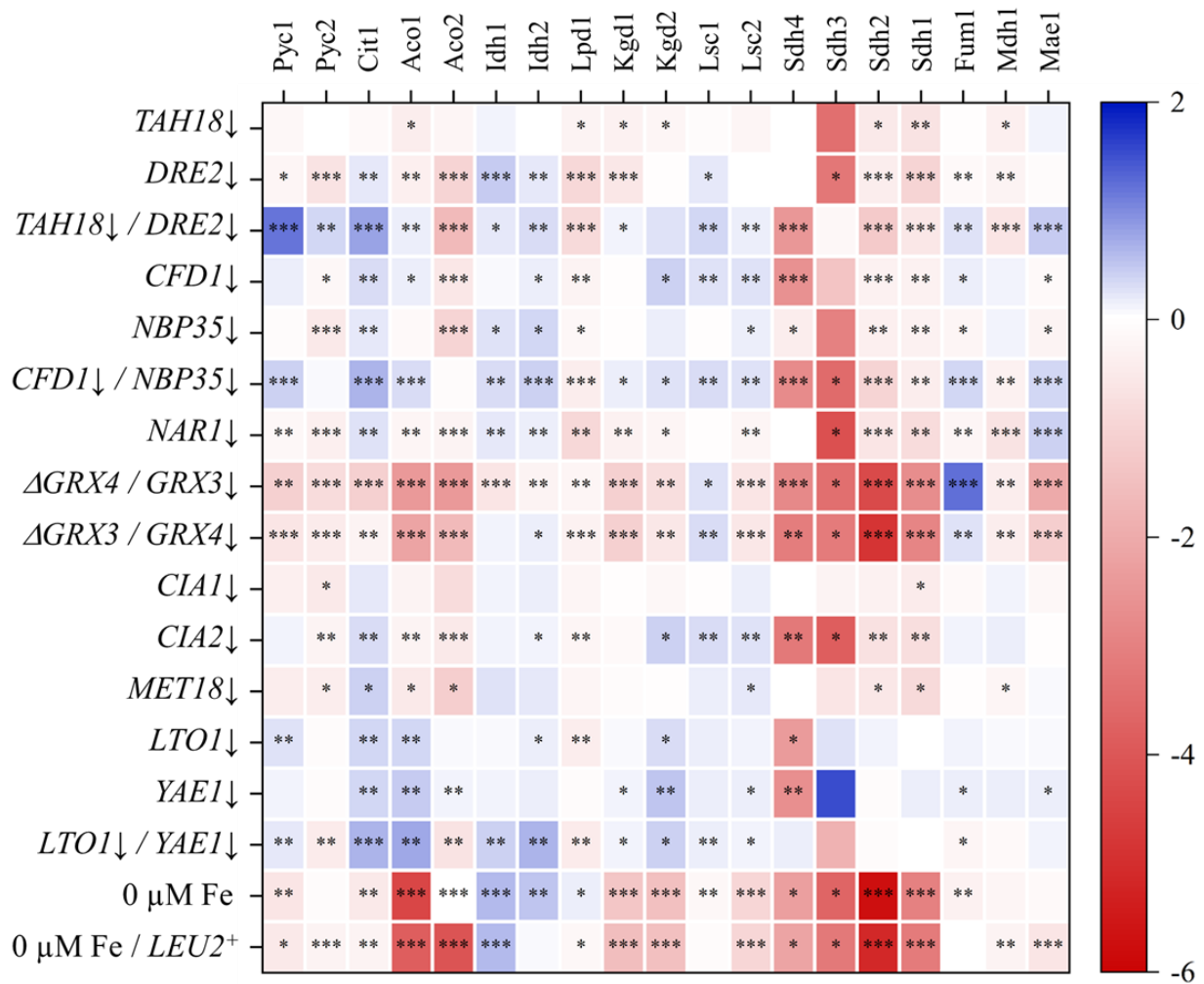


Abbildung 123: Abundanzen der Krebs-Zyklus-Proteine von *S.cerevisiae*. Gezeigt sind die Differenzen der Mittelwerte der (z.T. imputierten) Proteinabundanzen von Proteinen des Citratzyklus in Depletionsstämmen und dem Wildtyp. Errechnet wurde die Differenz aus dem Mittelwert von drei (Experiment 1) oder vier (Experiment 2-5) biologischen Replikaten. Die Signifikanz entspricht den mittels Students T-Test errechneten q-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.05, 0.01, 0.001 entspricht (Rohdaten 62).

8.4.5 Atmungskette

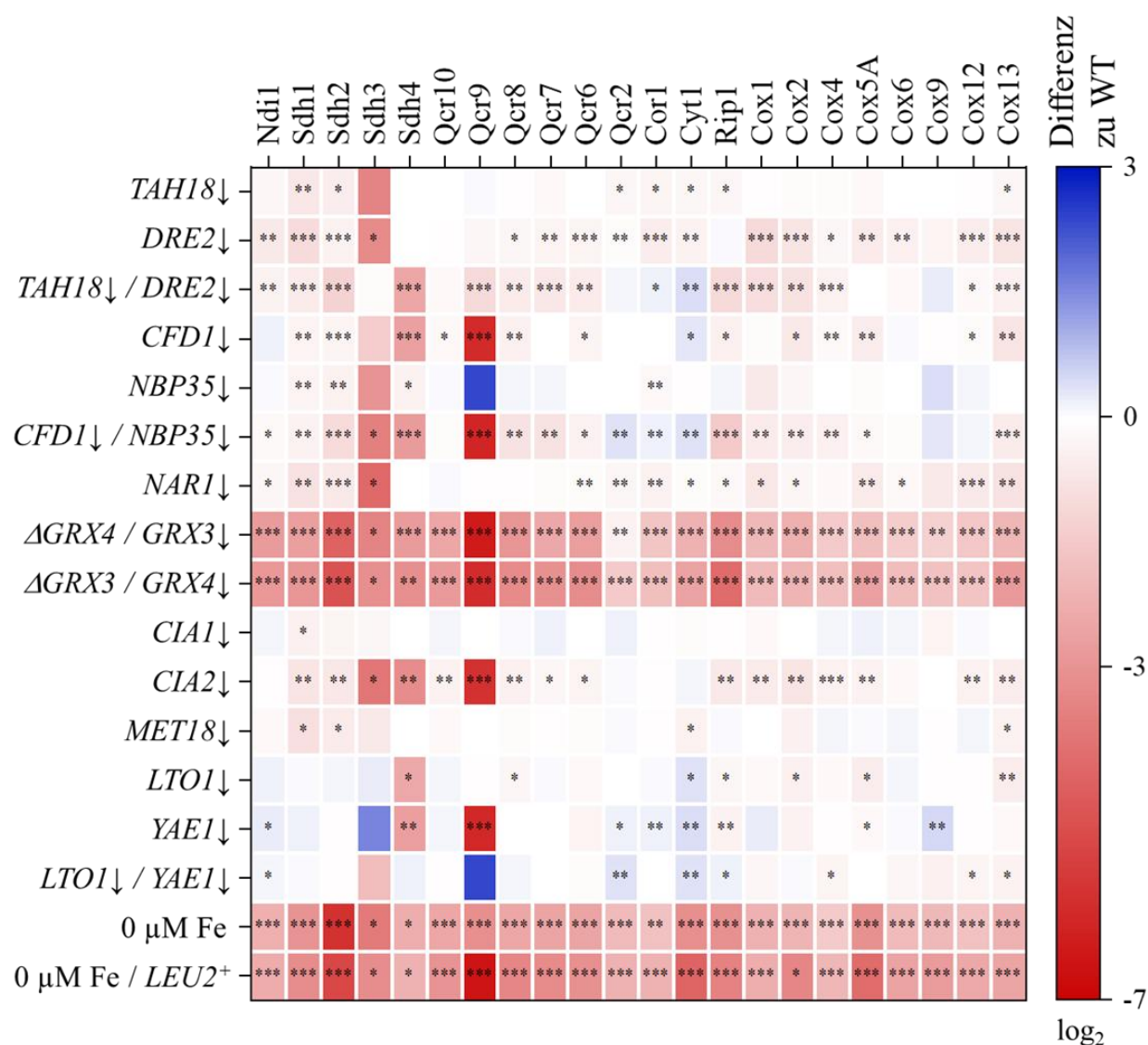


Abbildung 124: Änderungen an den Proteinabundanz der Atmungskette. Gezeigt sind die Differenzen der Abundanz der Atmungskette in chronologischer Reihenfolge in Depletionsstämmen, verglichen mit dem Wildtyp. Errechnet wurde die Differenz aus dem Mittelwert von drei (Experiment 1) oder vier (Experiment 2-5) biologischen Replikaten. Die Signifikanz entspricht den mittels Students T-Test errechneten q-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.05, 0.01, 0.001 entspricht (Rohdaten 63).

8.4.6 Glukosefermentation und Pyruvatdehydrogenase

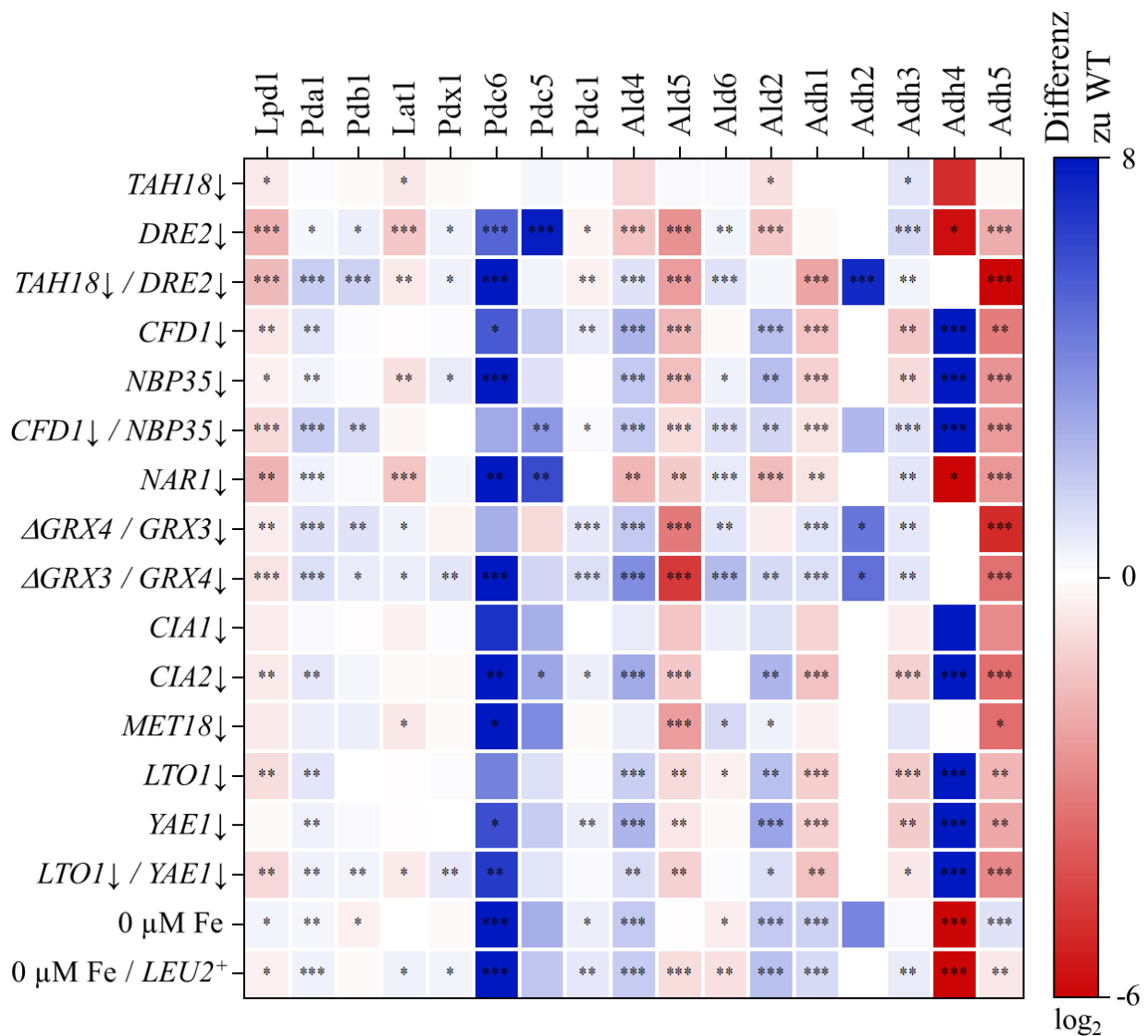


Abbildung 125: Änderungen an den Proteinabundanz von Stoffwechselwegen mit Pyruvat als Substrat. Gezeigt sind die Differenzen der Proteinabundanz in chronologischer Reihenfolge in Depletionsstämmen, verglichen mit dem Wildtyp. Errechnet wurde die Differenz aus dem Mittelwert von drei (Experiment 1) oder vier (Experiment 2-5) biologischen Replikaten. Die Signifikanz entspricht den mittels Students T-Test errechneten q-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.05, 0.01, 0.001 entspricht (Rohdaten 64).

8.4.7 Pentosephosphatweg

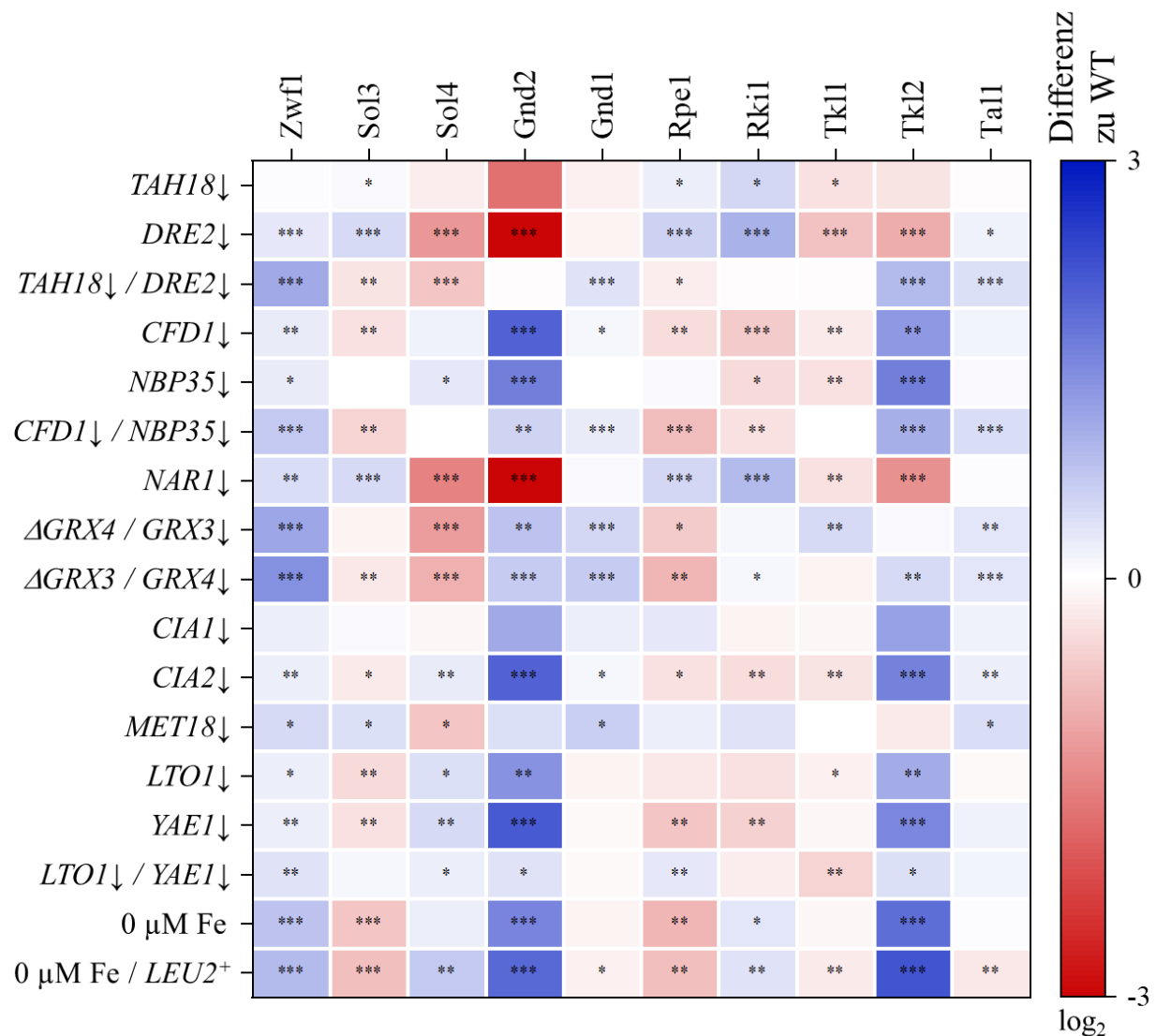


Abbildung 126: Änderungen an den Proteinabundanz des Pentosephosphatwegs. Gezeigt sind die Differenzen der Proteinabundanz in chronologischer Reihenfolge in Depletionsstämmen, verglichen mit dem Wildtyp. Errechnet wurde die Differenz aus dem Mittelwert von drei (Experiment 1) oder vier (Experiment 2-5) biologischen Replikaten. Die Signifikanz entspricht den mittels Students T-Test errechneten q-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.05, 0.01, 0.001 entspricht (Rohdaten 65).

8.4.8 THF-Syntheseweg

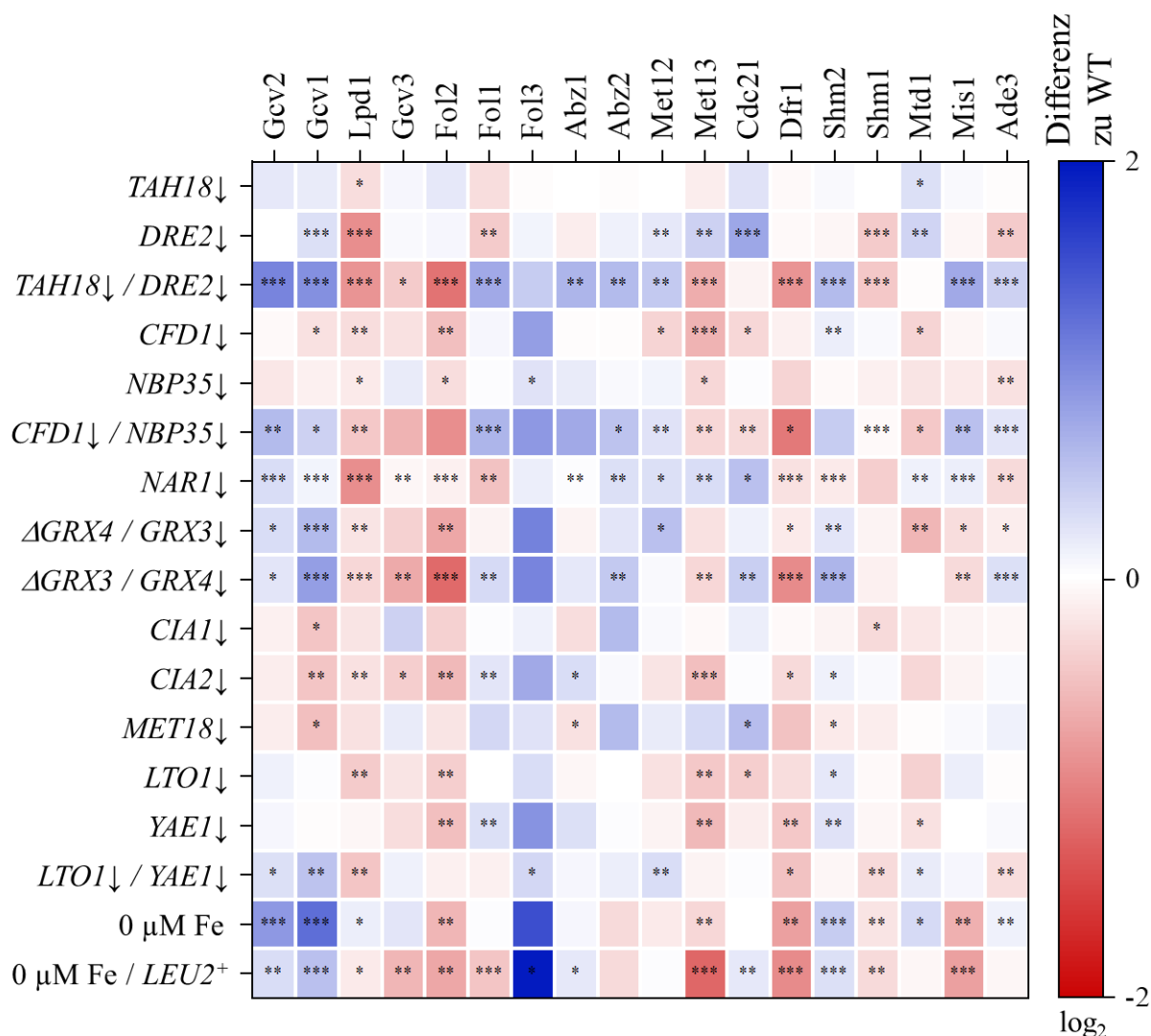


Abbildung 127: Änderungen an den Proteinabundanz der Tetrahydrofolatbiosynthese und -wiederverwertung. Gezeigt sind die Differenzen der Proteinabundanz in chronologischer Reihenfolge in Depletionsstämmen, verglichen mit dem Wildtyp. Errechnet wurde die Differenz aus dem Mittelwert von drei (Experiment 1) oder vier (Experiment 2-5) biologischen Replikaten. Die Signifikanz entspricht den mittels Students T-Test errechneten q-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.05, 0.01, 0.001 entspricht (Rohdaten 66).

8.4.9 Flavoproteine

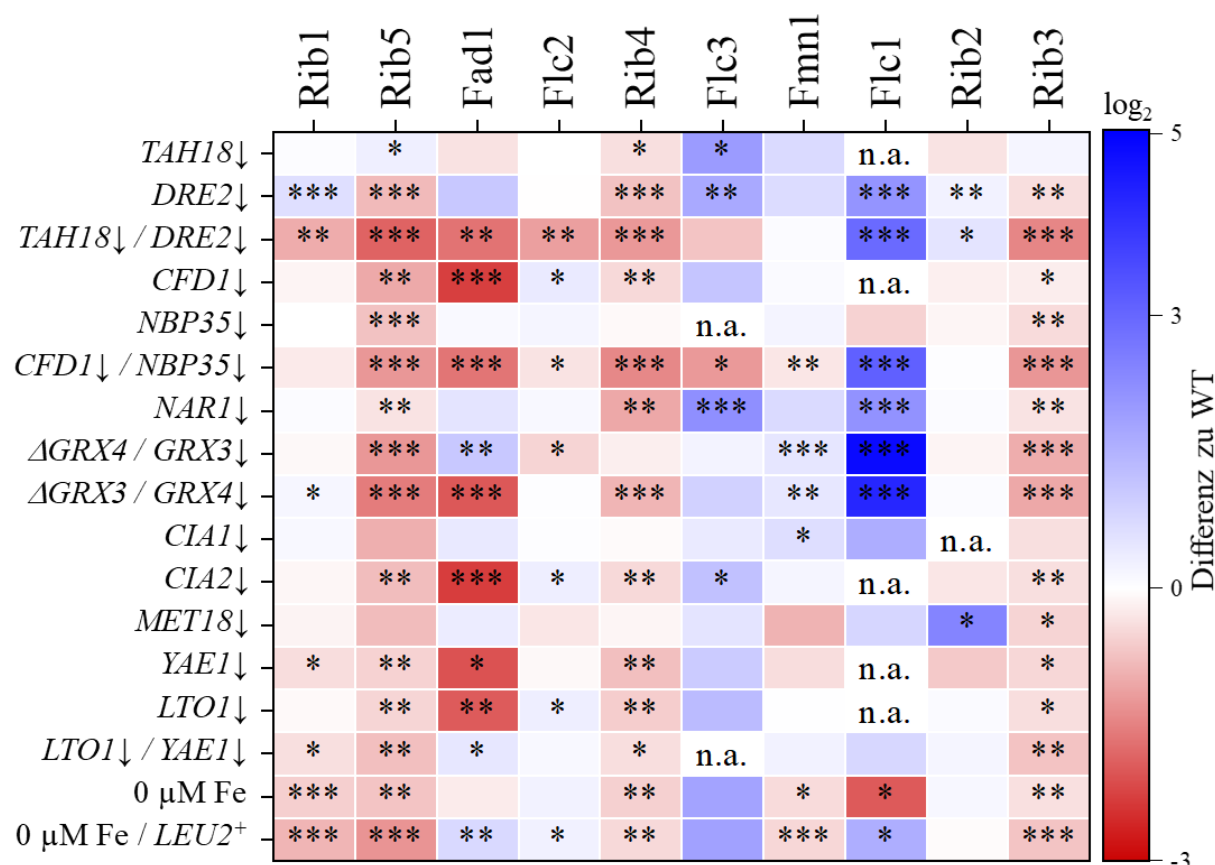


Abbildung 128: Änderungen an den Proteinabundanz der Flavobiosynthese. Gezeigt sind die Differenzen der Proteinabundanz in chronologischer Reihenfolge in Depletionsstämmen, verglichen mit dem Wildtyp. Errechnet wurde die Differenz aus dem Mittelwert von drei (Experiment 1) oder vier (Experiment 2-5) biologischen Replikaten. Die Signifikanz entspricht den mittels Students T-Test errechneten q-Werten, wobei *, **, *** respektive weniger als 0.05, 0.01, 0.001 entspricht (Rohdaten 55).

8.5 Ribosombiogenese

Gall-3HA-Tah18

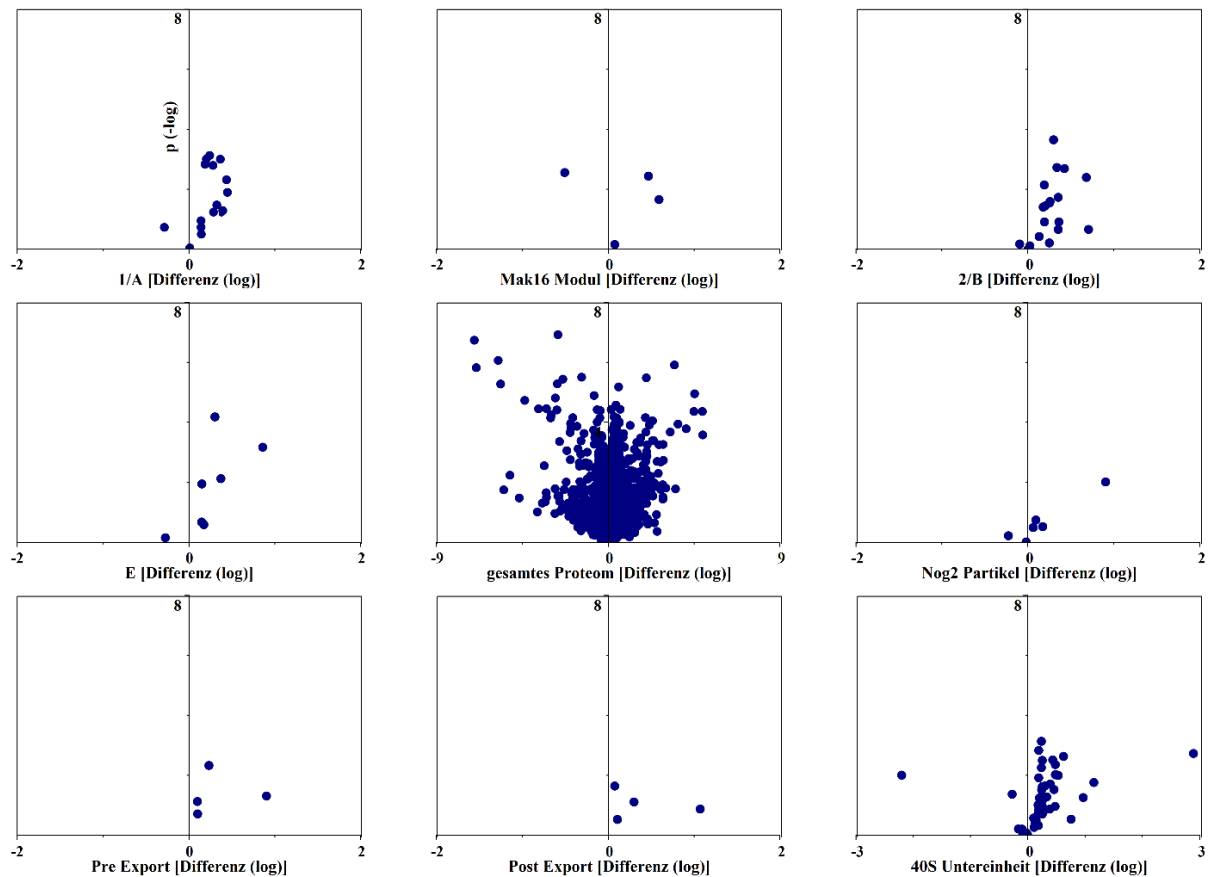


Abbildung 129: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Tah18-Depletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

GalL-3HA-Dre2

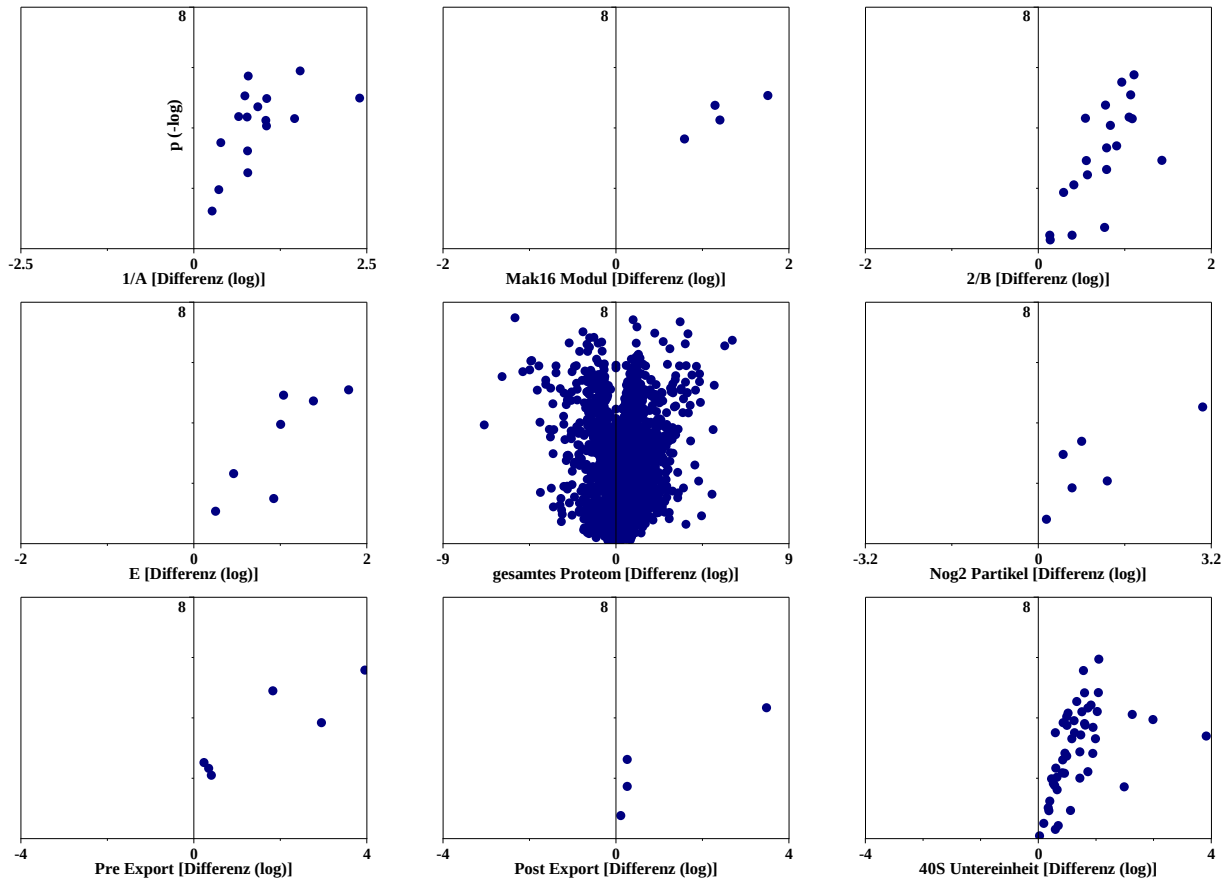


Abbildung 130: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Dre2-Depletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

Gall-3HA-Tah18/Gall-3HA-Dre2

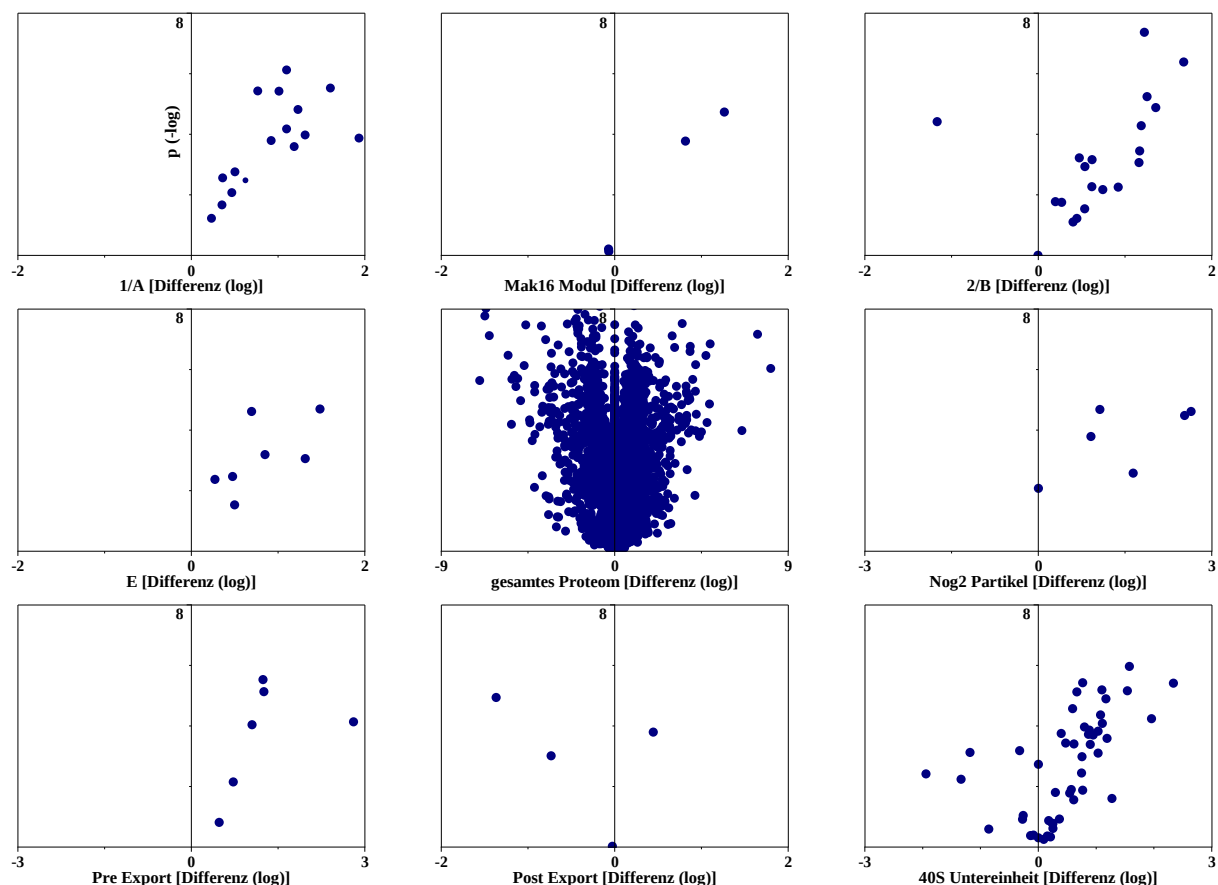


Abbildung 131: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Dre2/Tah18-Depletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

GalL-3HA-Cfd1

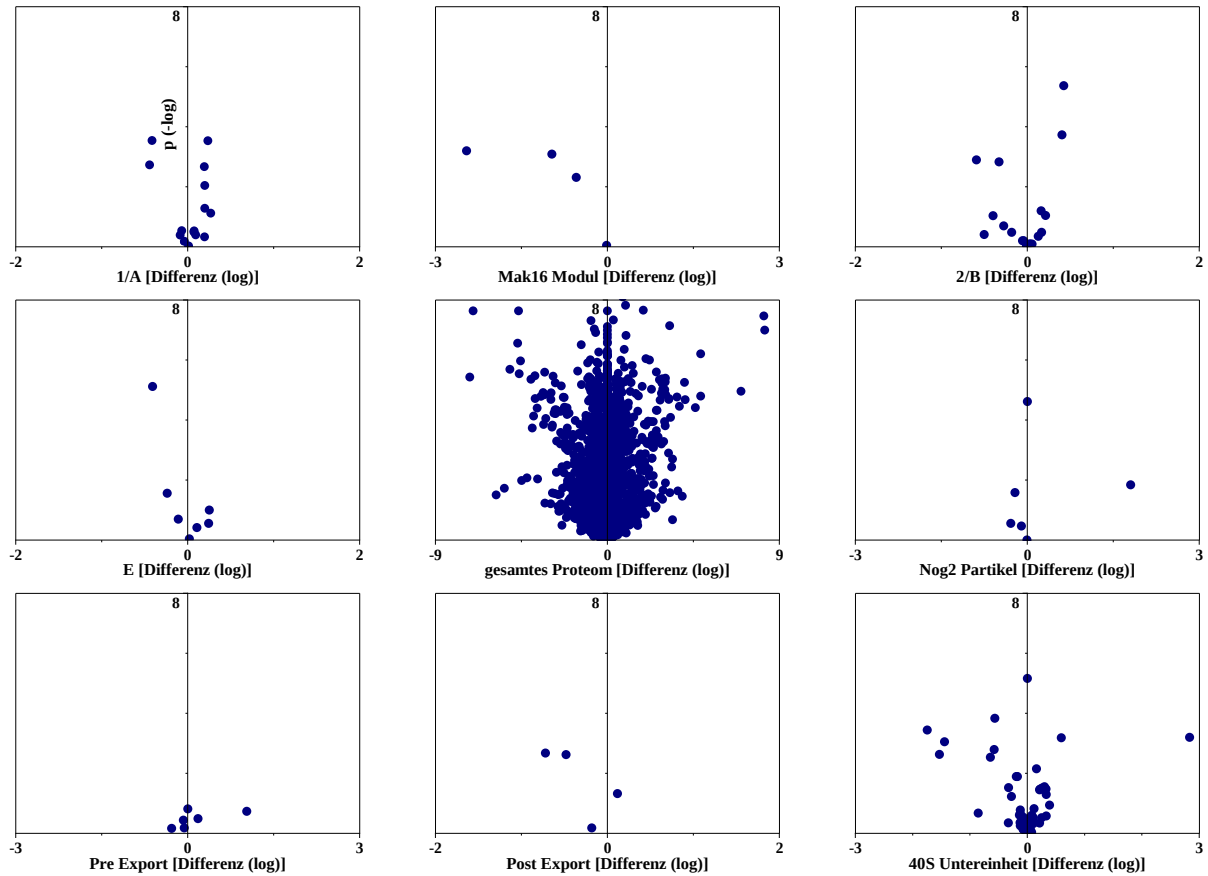


Abbildung 132: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Cfd1-Depletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

Gall-3HA-Nbp35

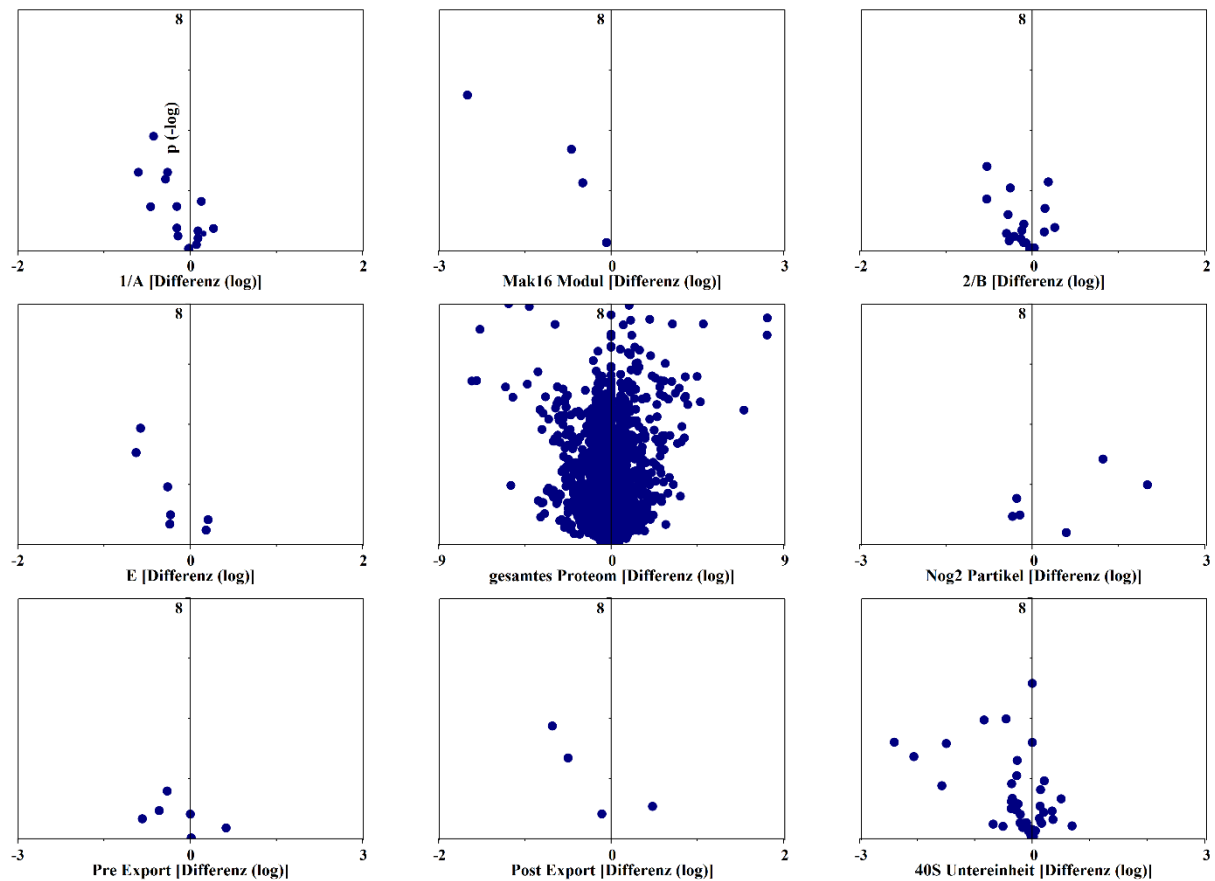


Abbildung 133: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Nbp35-Depletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

Gall-3HA-Cfd1/Gall-3HA-Nbp35

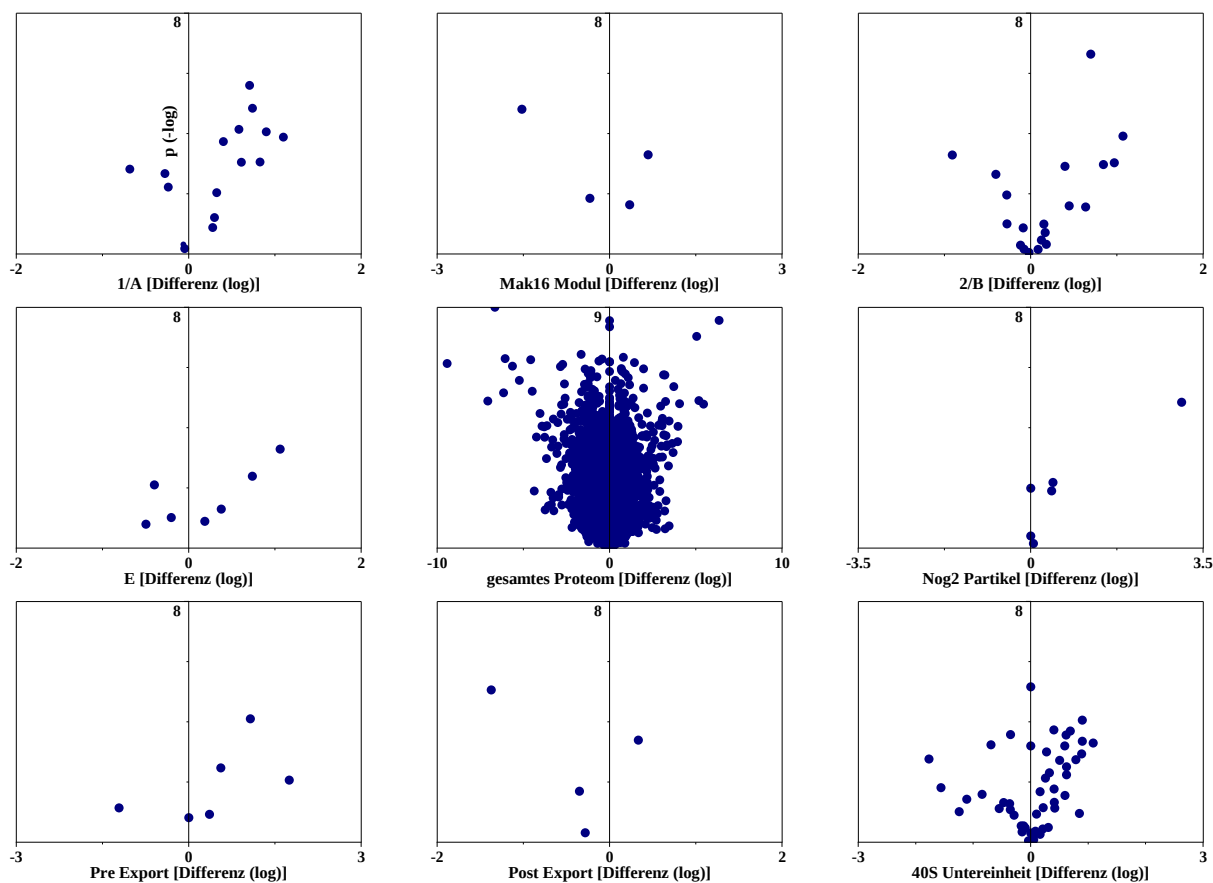


Abbildung 134: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Cfd1/Nbp35-Depletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

GalL-3HA-Nar1

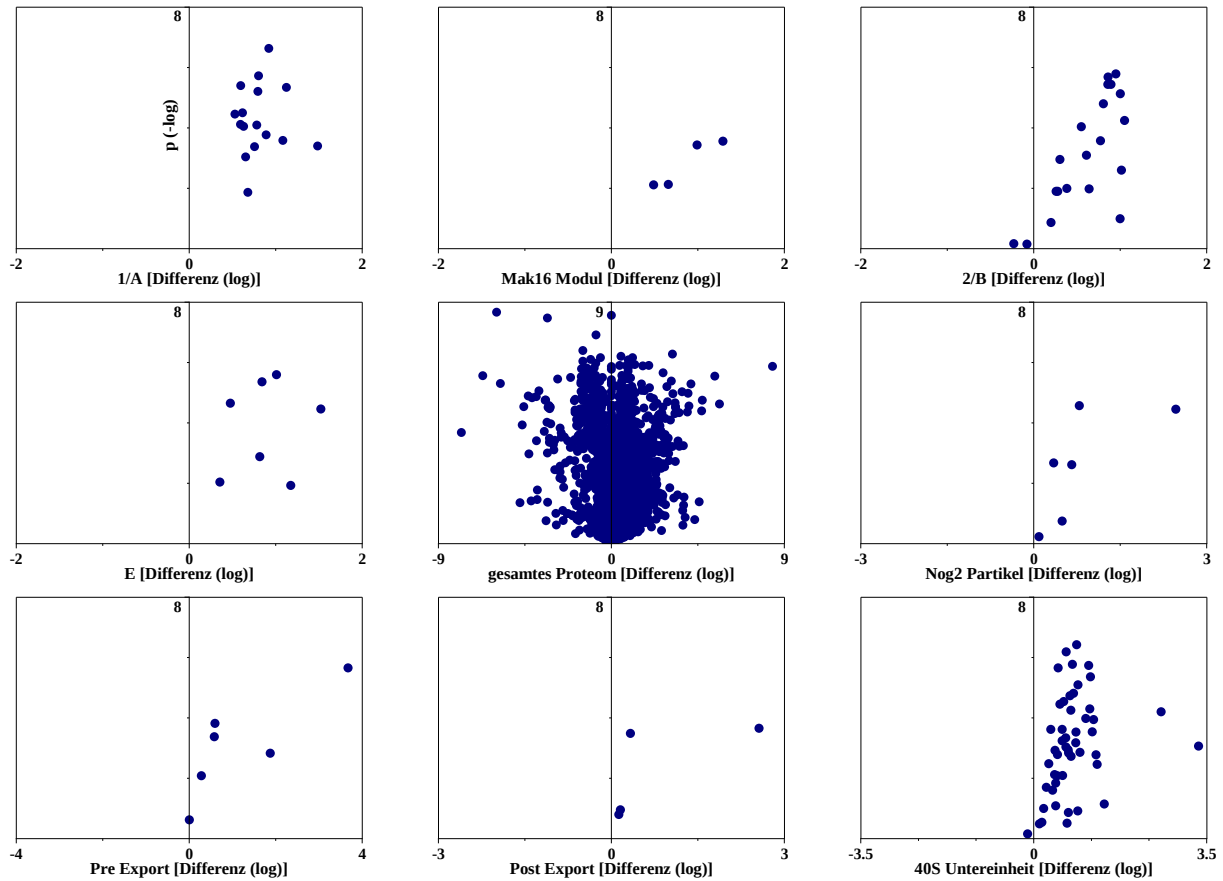


Abbildung 135: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Nar1-Depletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

GalL-3HA-Cia1

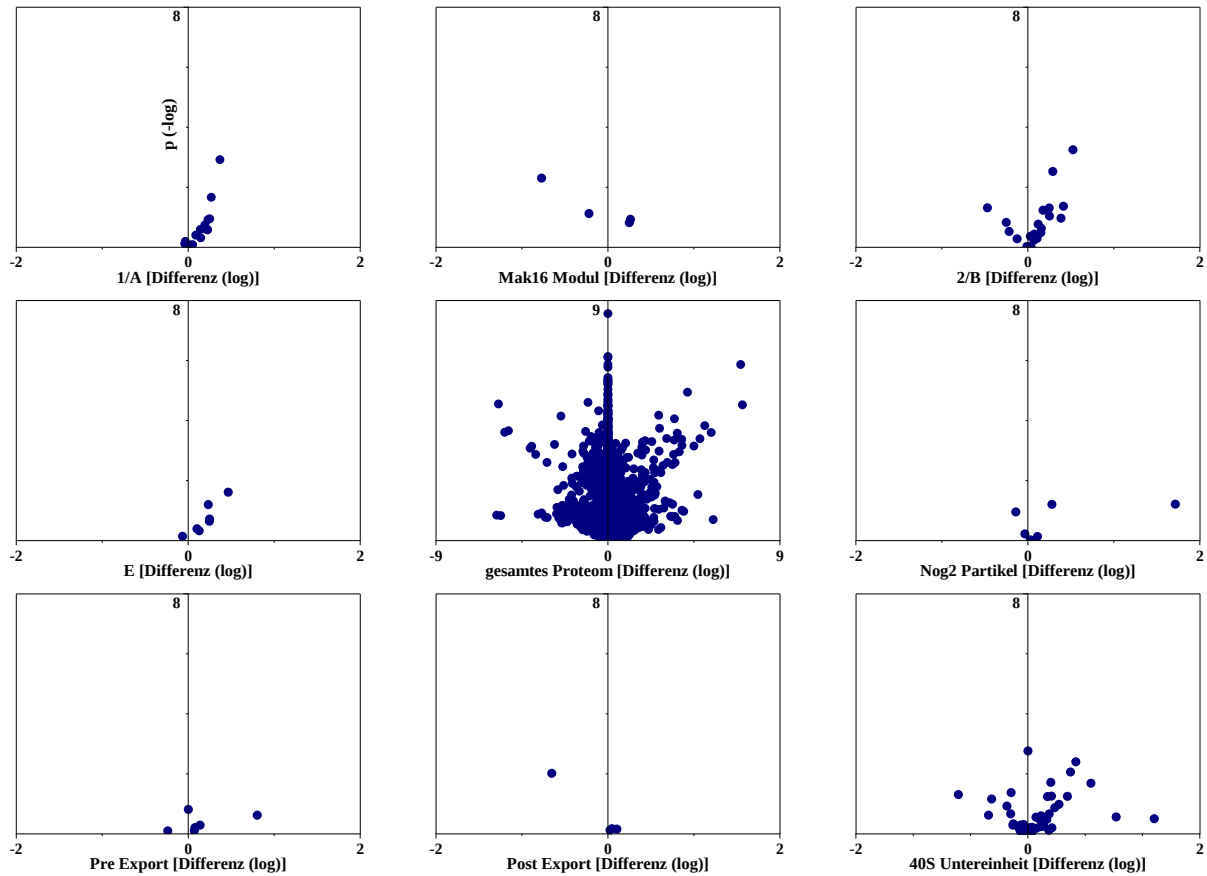


Abbildung 136: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Cia1-Depletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

GalL-3HA-Cia2

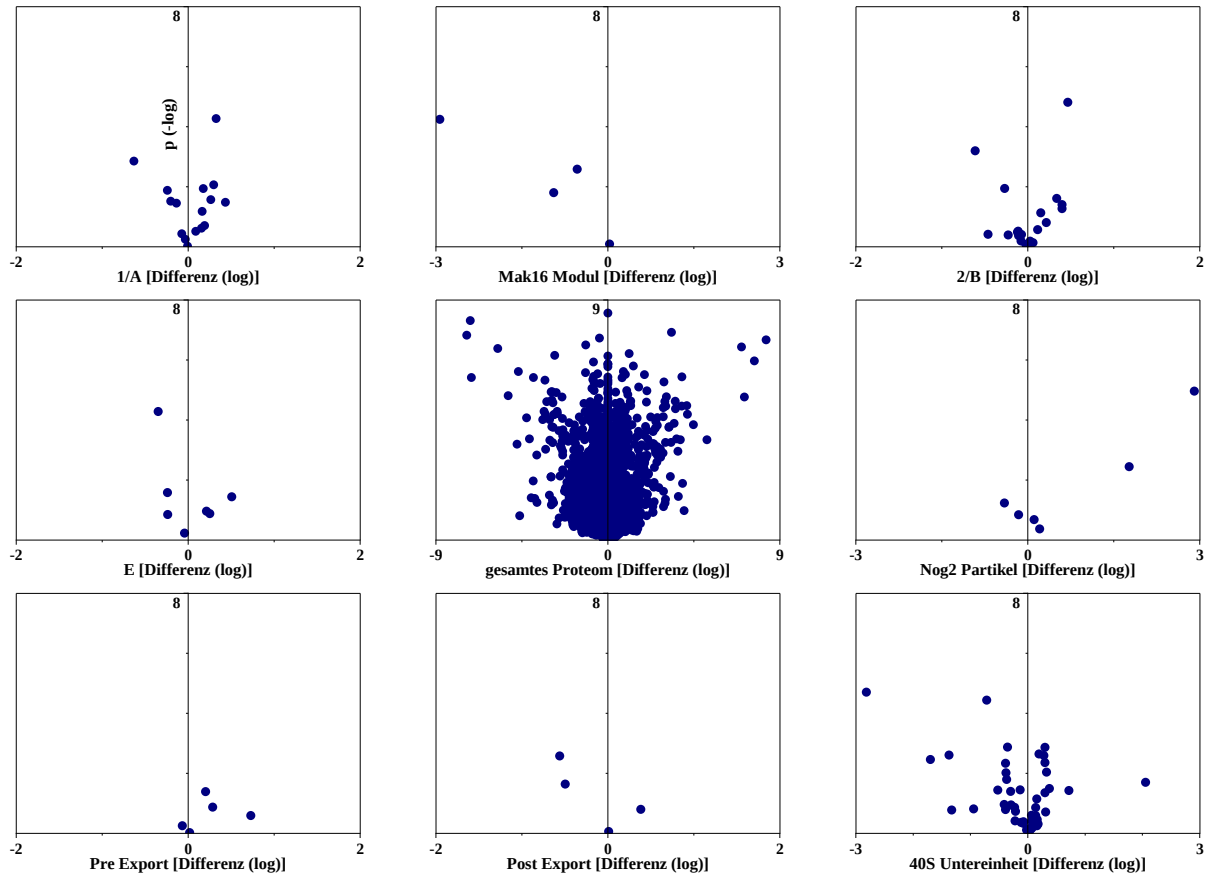


Abbildung 137: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Cia2-Depletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

Gall-3HA-Met18

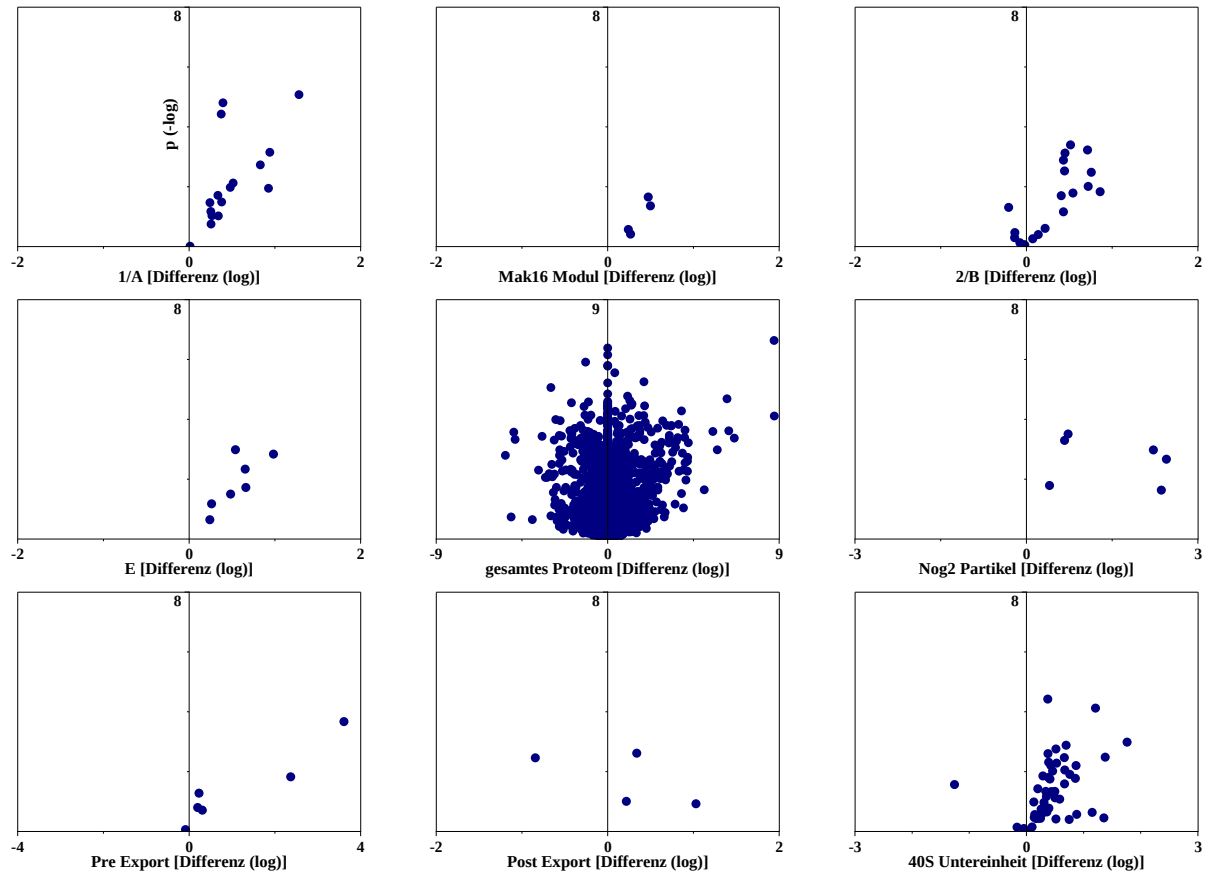


Abbildung 138: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Met18-Depletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

GalL-3HA-Lto1

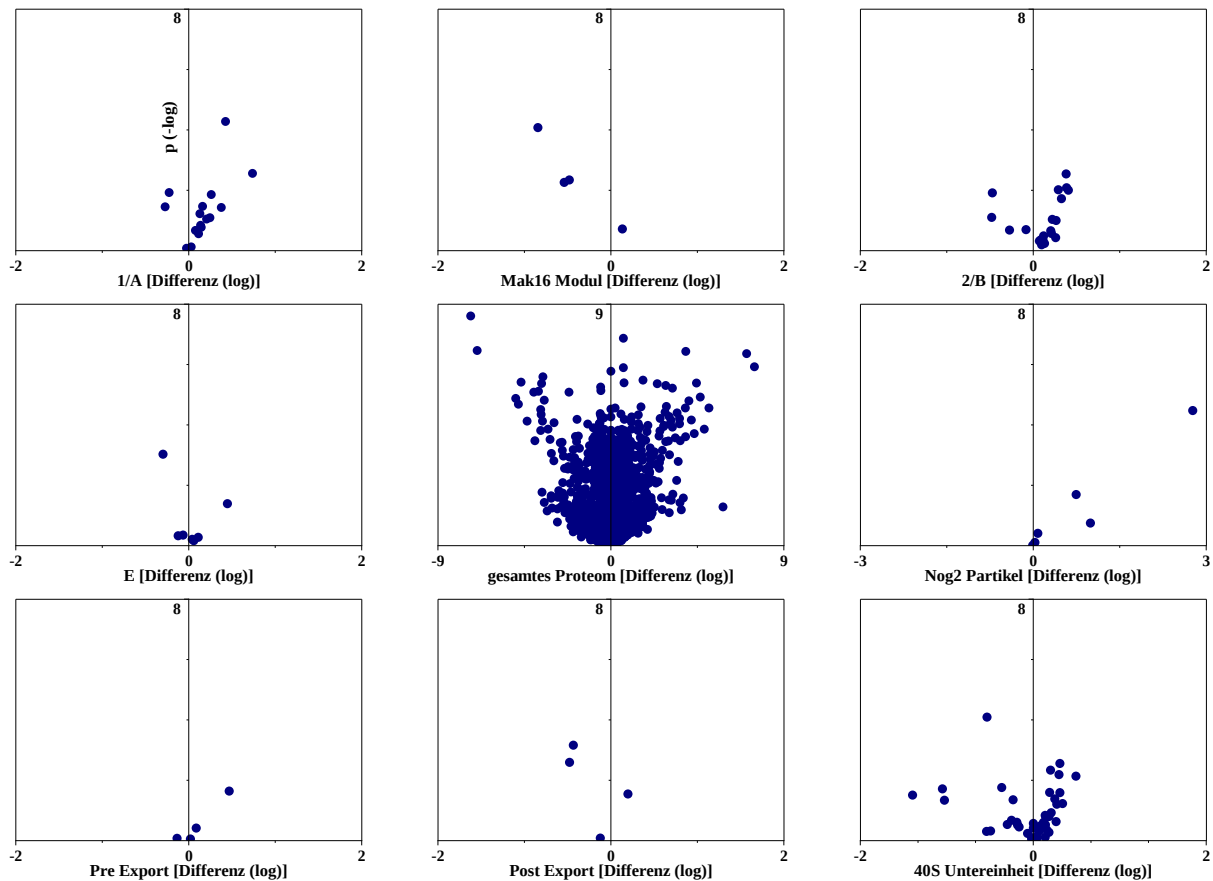


Abbildung 139: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Lto1-Depletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

GalL-3HA-Yae1

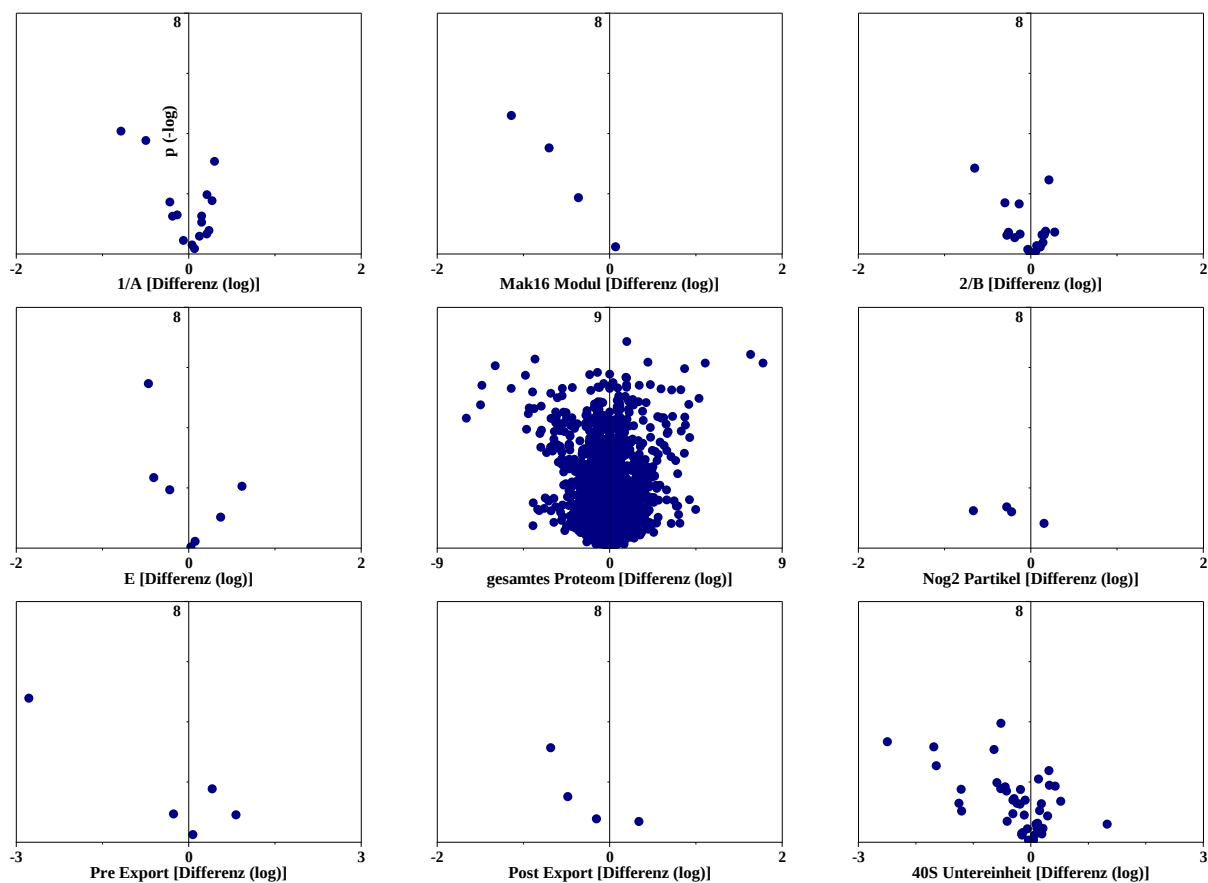


Abbildung 140: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Yae1-Depletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

GalL-3HA-Lto1/ GalL-3HA-Yae1

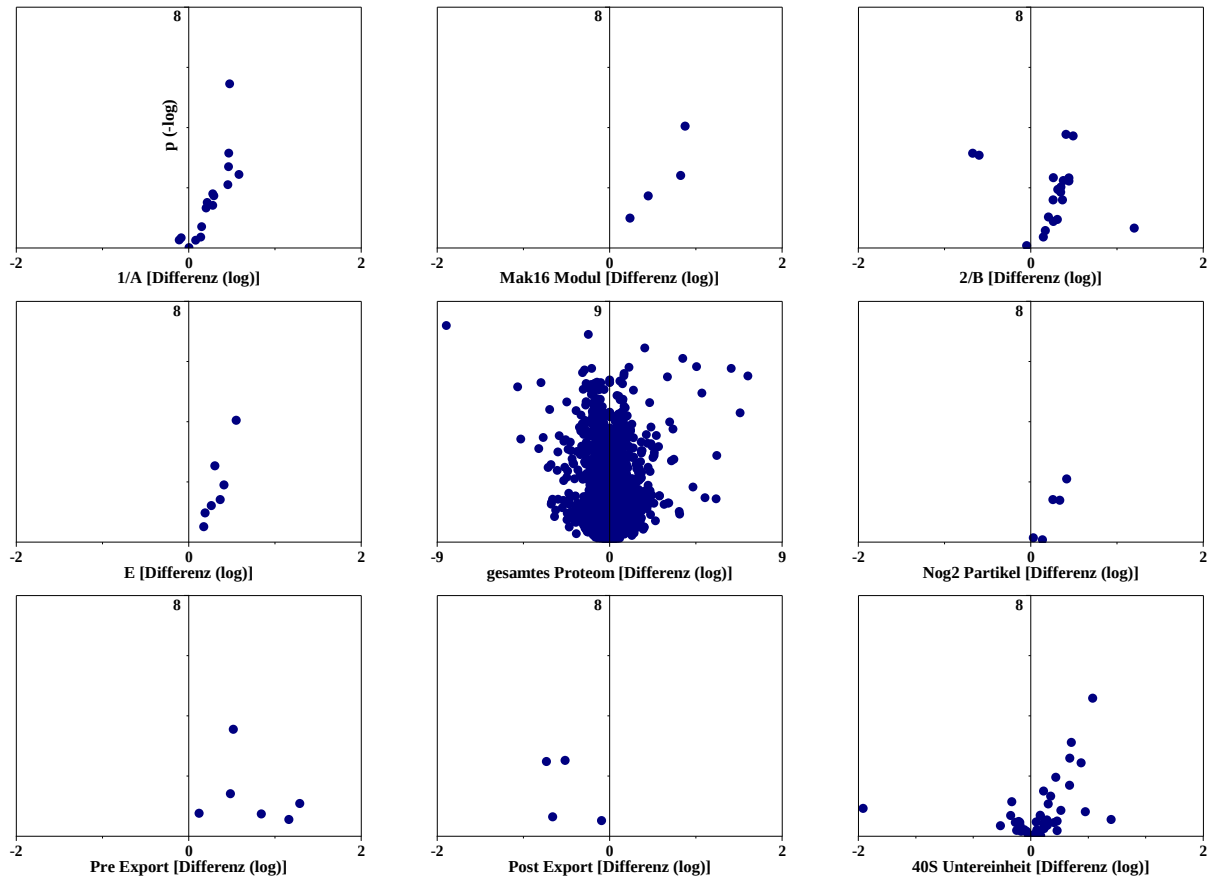


Abbildung 141: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Lto1/Yae1-Depletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

Δ Grx4/GalL-3HA-Grx3

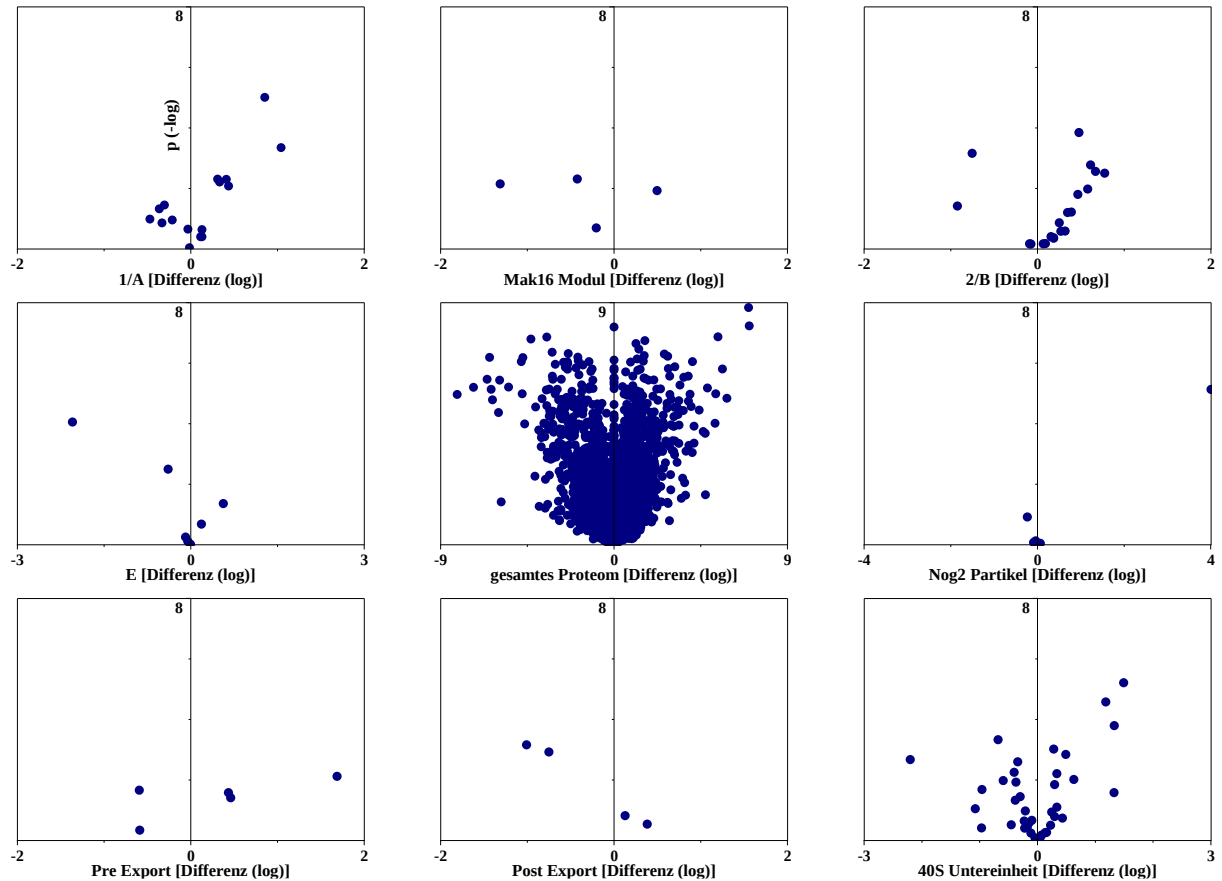


Abbildung 142: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Δ Grx4/Grx3-Depletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

Δ Grx3/GalL-3HA-Grx4

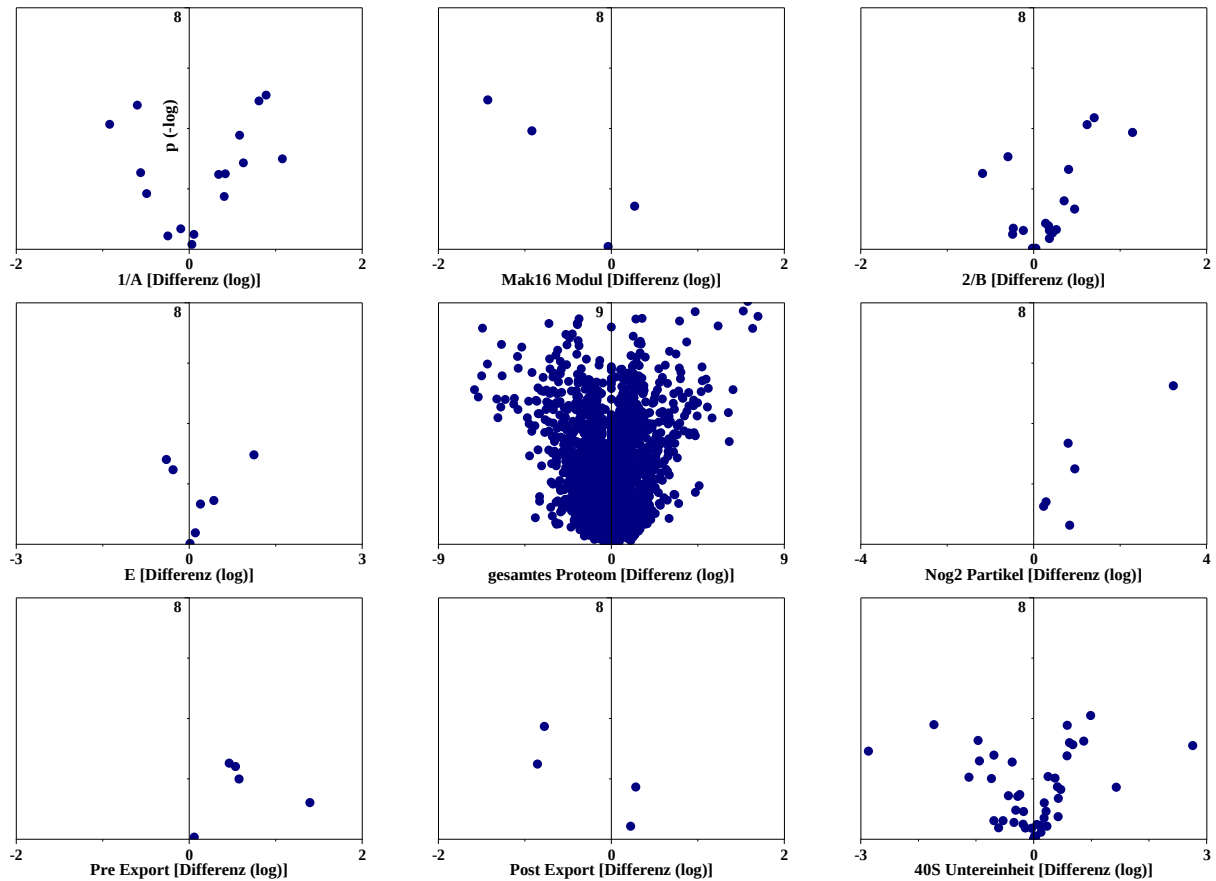


Abbildung 143: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem Δ Grx3/Grx4-Depletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

Eisendepletion

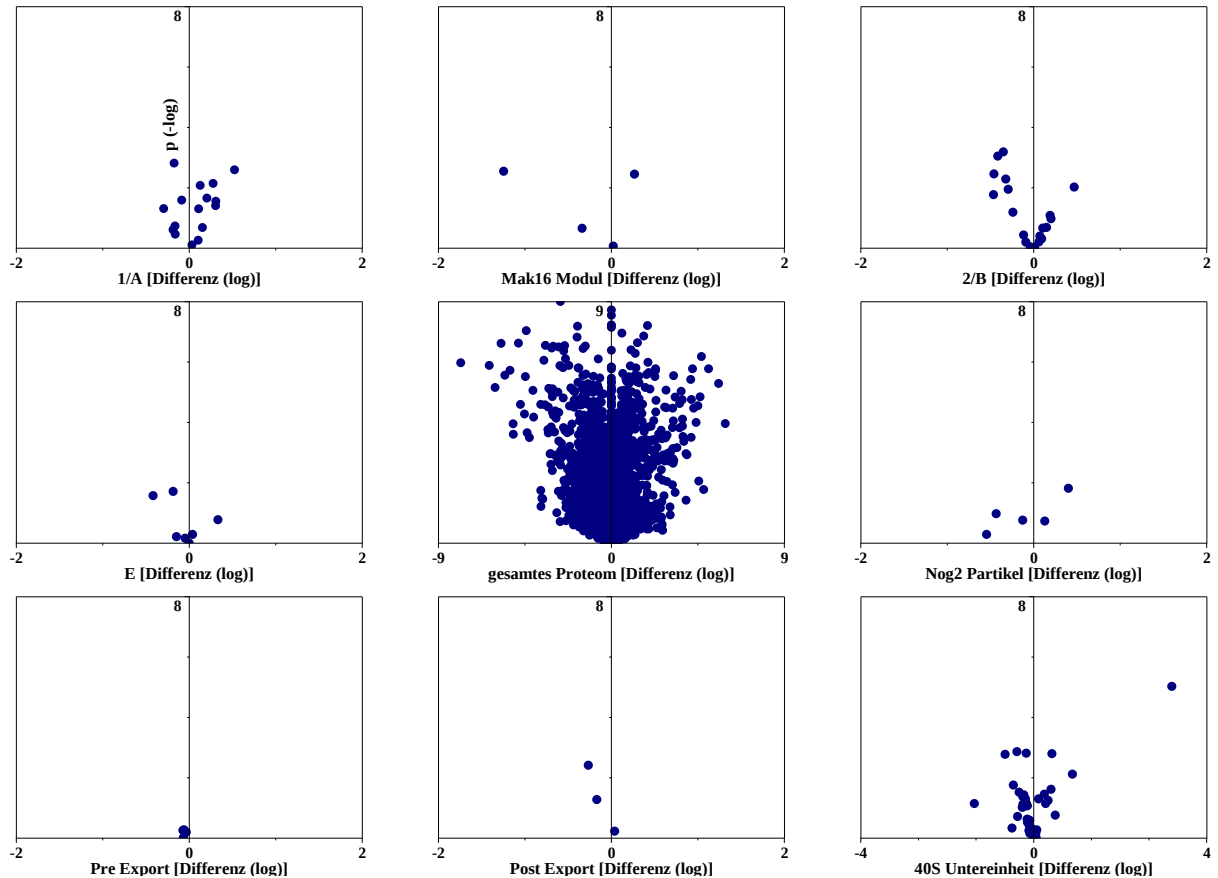


Abbildung 144: Volcano Plots der Proteine der Ribosombiogenese in einem eisendepletionsstamm. Gezeigt sind Differenz zum Wildtyp, sowie der negative Logarithmus der p-Werte der verschiedenen Stadien der Ribosombiogenese. Mittig ist ein Volcano Plot des gesamten Proteoms als Referenz gezeigt (Rohdaten 59).

8.6 Gruppierung mittels Venn-Diagramm

Hier gehören die Zahlen des Venn-Diagramms als Tabelle rein

8.7 N-Terminus von Glt1

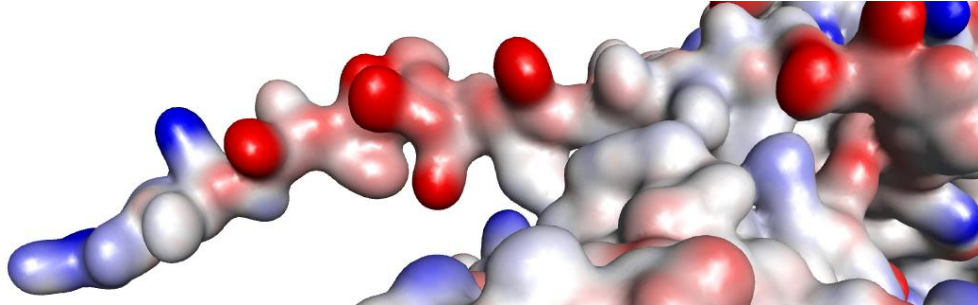


Abbildung 145: N-Terminus von Glt1. Gezeigt ist der N-Terminus einer mittels AlphaFold2 berechneten Struktur von Glt1 (Jumper *et al.*, 2021). Dabei wird die Ladung von der Farbe symbolisiert. Rot zeigt eine negative Ladung und Blau eine positive Ladung (Rohdaten 54).

8.8 GO-term-Analyse

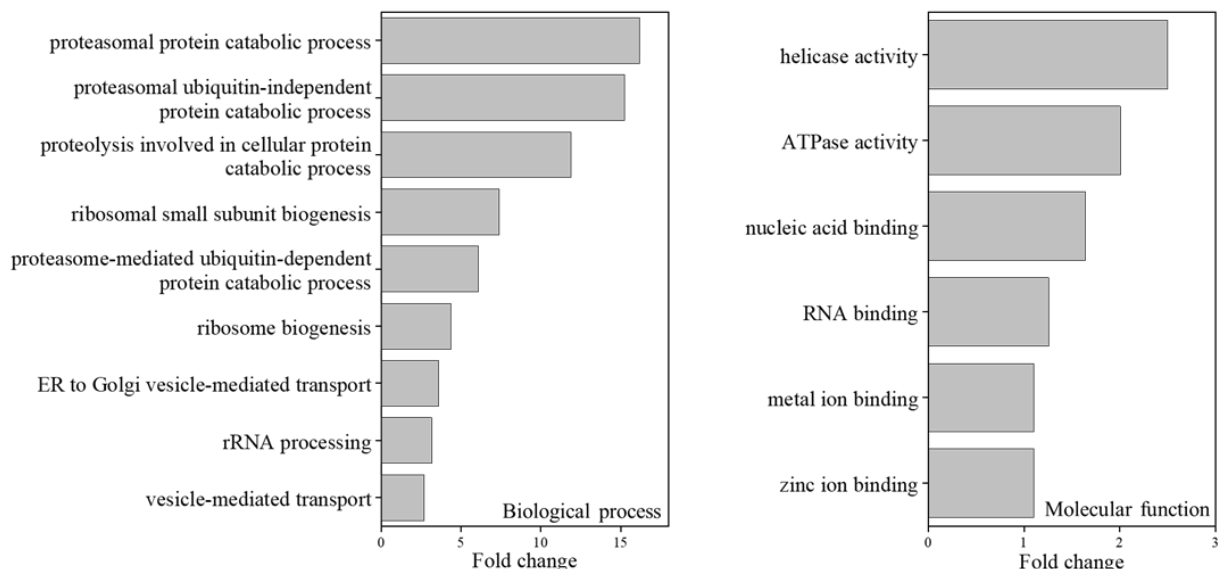


Abbildung 146: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion der frühen CIA-Proteine ihre Abundanz erhöhen. Gezeigt sind GO-terms, welche bei Proteinen, deren Abundanz in *TAH18*↓, *DRE2*↓ und *TAH18*↓/*DRE2*↓-Stämmen erhöht sind, überrepräsentiert sind. Unten rechts wird die Art des GO-terms angezeigt (Rohdaten 53).

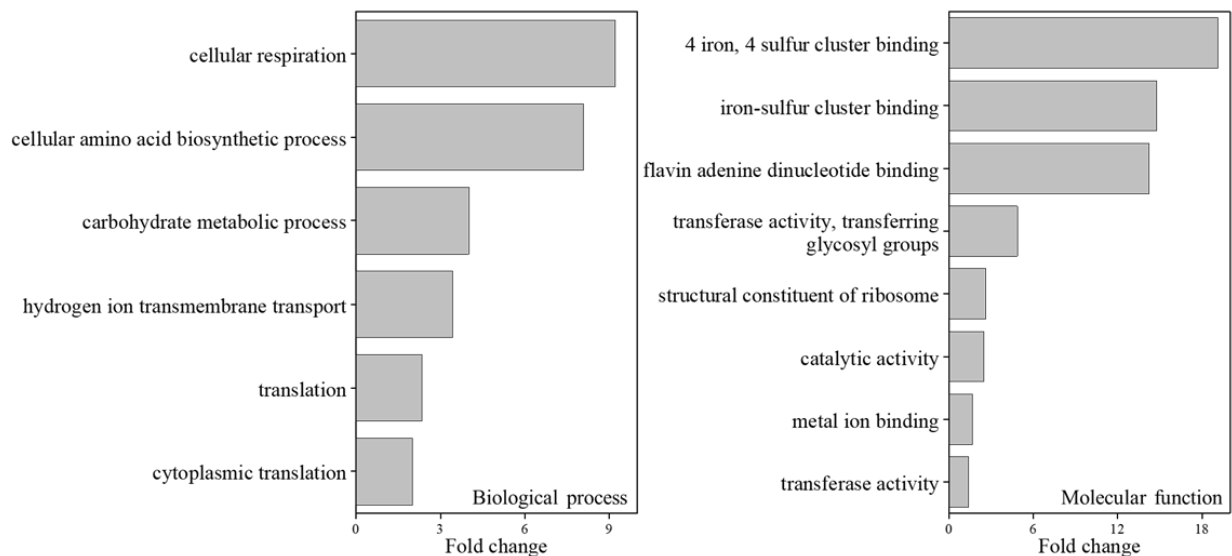


Abbildung 147: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion der frühen CIA-Proteine ihre Abundanz verringern. Gezeigt sind GO-terms, welche bei Proteinen, deren Abundanz in *TAH18*↓, *DRE2*↓ und *TAH18*↓/*DRE2*↓-Stämmen verringert sind, überrepräsentiert sind. Unten rechts wird die Art des GO-terms angezeigt (Rohdaten 53).

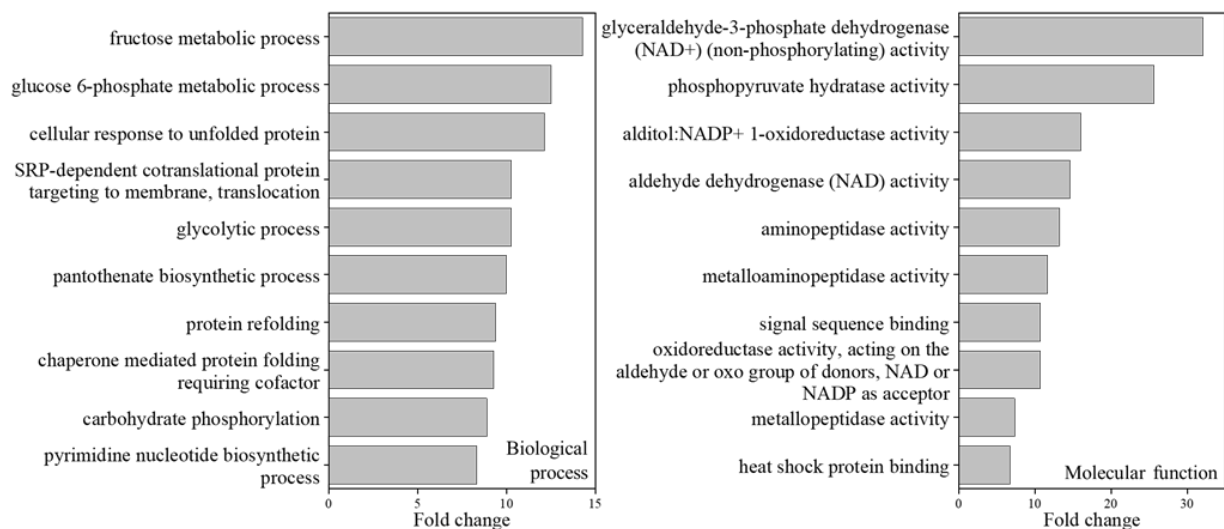


Abbildung 148: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion der CIA-Scaffold-Proteine ihre Abundanz erhöhen. Gezeigt sind GO-terms, welche bei Proteinen, deren Abundanz in *CFD1*↓, *NBP35*↓ und *Cfd1*↓/*NBP35*↓-Stämmen erhöht sind, überrepräsentiert sind. Unten rechts wird die Art des GO-terms angezeigt (Rohdaten 53).

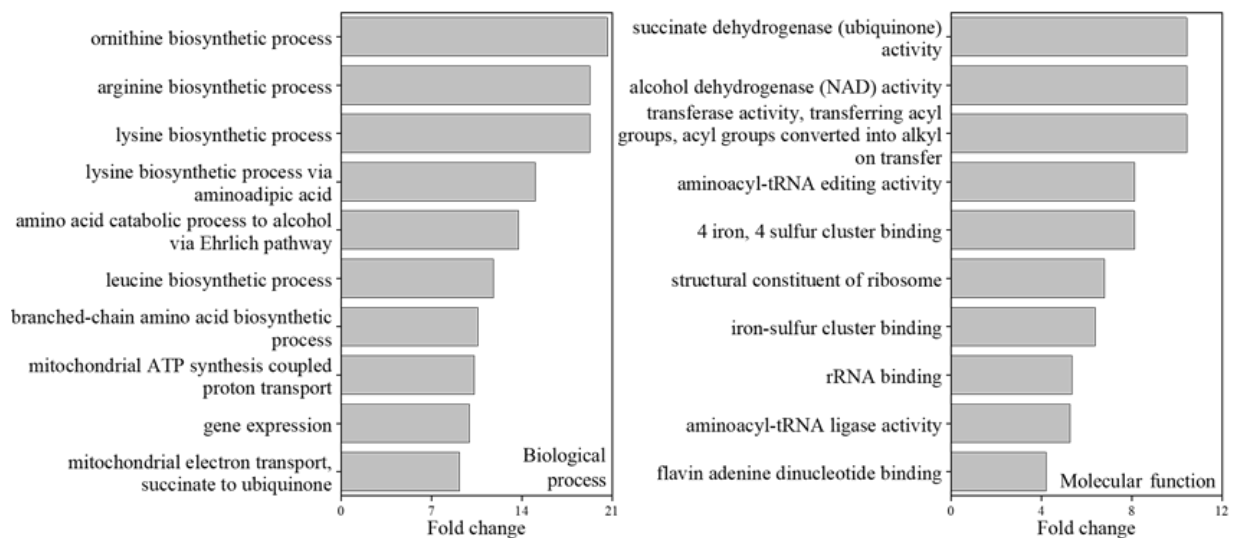


Abbildung 149: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion der CIA-Scaffold-Proteine ihre Abundanz verringern. Gezeigt sind GO-terms, welche bei Proteinen, deren Abundanz in *CFD1*↓, *NBP35*↓ und *Cfd1*↓/*NBP35*↓-Stämmen verringert sind, überrepräsentiert sind. Unten rechts wird die Art des GO-terms angezeigt (Rohdaten 53).

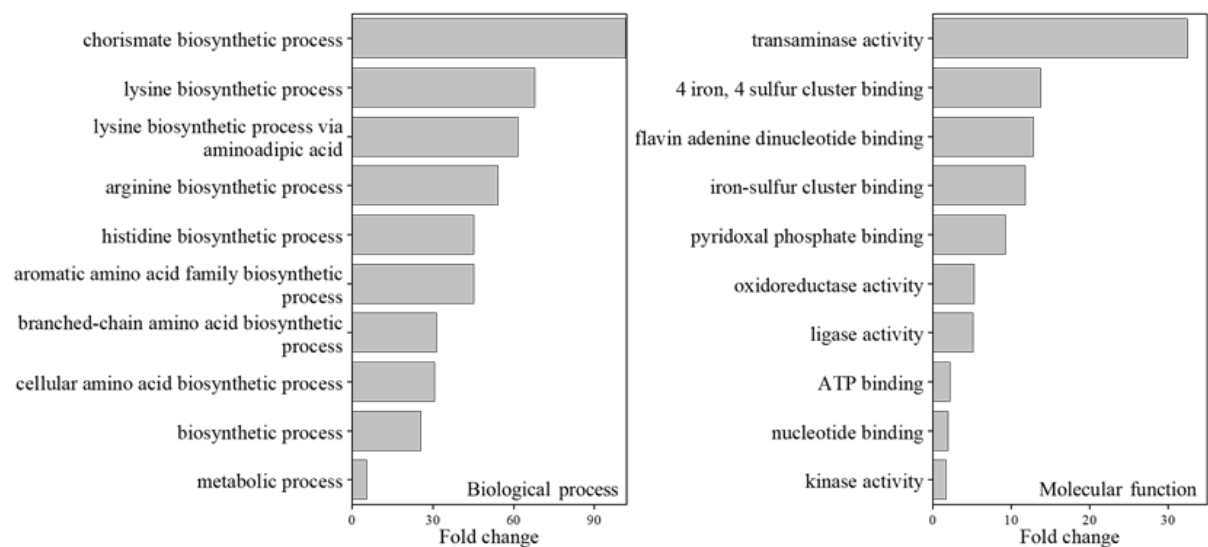


Abbildung 150: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion von Nar1 und der CTC-Proteine ihre Abundanz verringern. Gezeigt sind GO-terms, welche bei Proteinen, deren Abundanz in *NAR1*↓, *CIA1*↓, *CIA2*↓ und *MET18*↓-Stämmen verringert sind, überrepräsentiert sind. Unten rechts wird die Art des GO-terms angezeigt (Rohdaten 53).

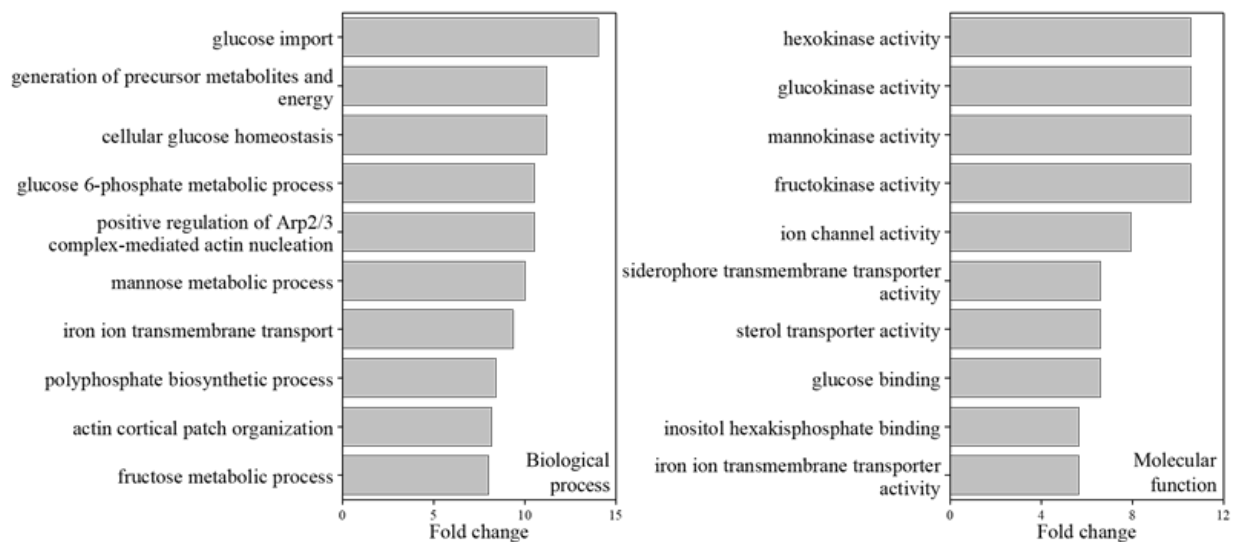


Abbildung 151: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion von Eisen und Grx3/4 ihre Abundanz erhöhen. Gezeigt sind GO-terms, welche bei Proteinen, deren Abundanz in $\Delta GRX4/GRX3\downarrow$, $\Delta GRX3/GRX4\downarrow$, $Fe\downarrow$ und $LEU2^+/Fe\downarrow$ -Stämmen erhöht sind, überrepräsentiert sind. Unten rechts wird die Art des GO-terms angezeigt (Rohdaten 53).

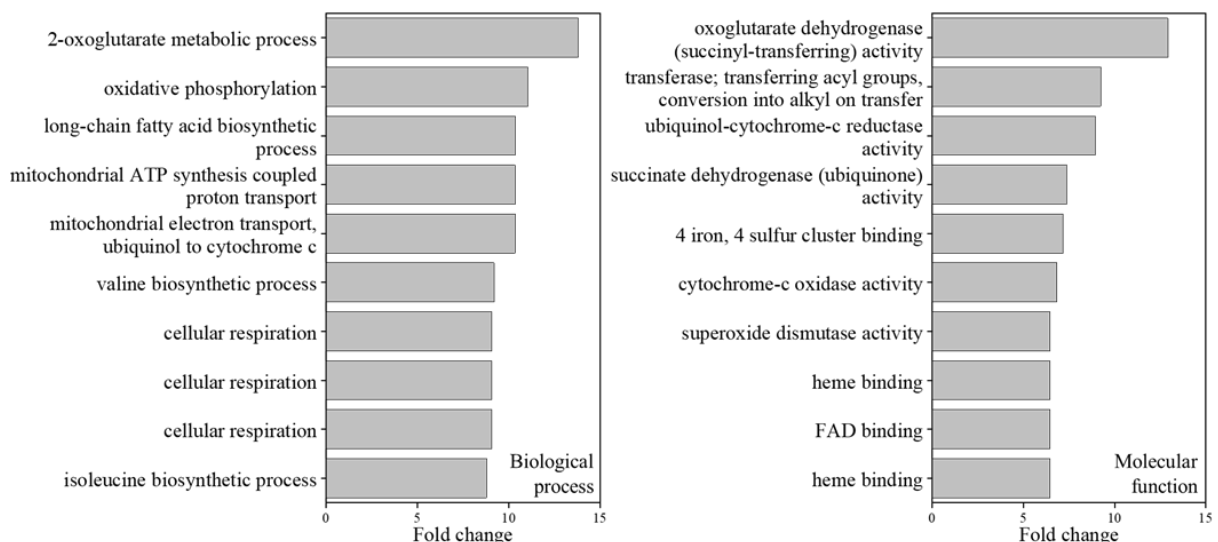


Abbildung 152: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion von Eisen und Grx3/4 ihre Abundanz verringern. Gezeigt sind GO-terms, welche bei Proteinen, deren Abundanz in $\Delta GRX4/GRX3\downarrow$, $\Delta GRX3/GRX4\downarrow$, $Fe\downarrow$ und $LEU2^+/Fe\downarrow$ -Stämmen verringert sind, überrepräsentiert sind. Unten rechts wird die Art des GO-terms angezeigt (Rohdaten 53).

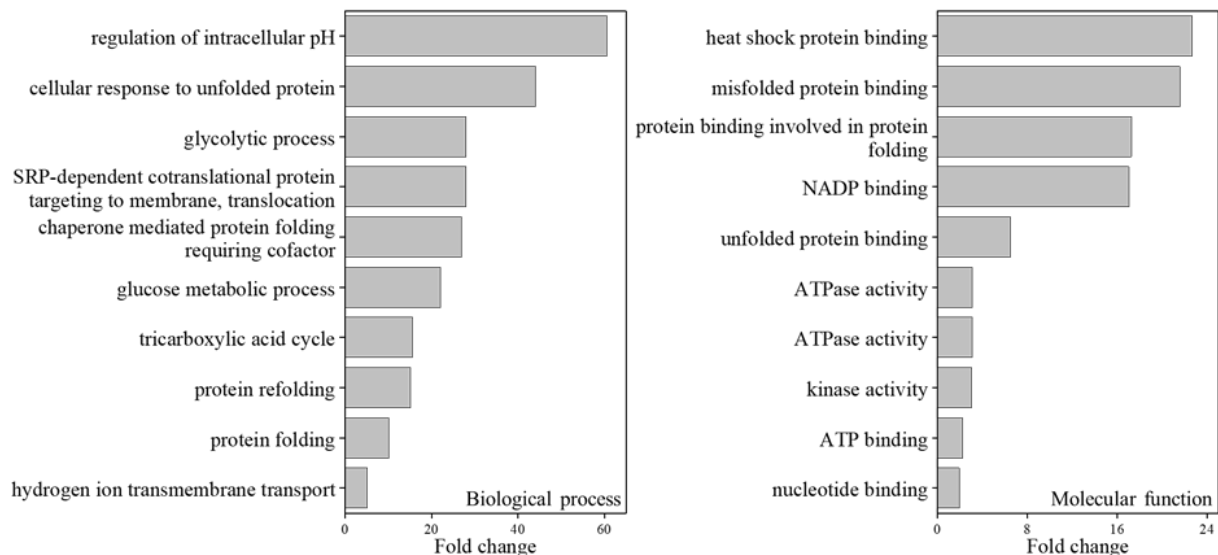


Abbildung 153: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion von Yae1 und Lto1 ihre Abundanz erhöhen. Gezeigt sind GO-terms, welche bei Proteinen, deren Abundanz in *LTO1*↓, *YAE1*↓ und *LTO1*↓/ *YAE1*↓-Stämmen erhöht sind, überrepräsentiert sind. Unten rechts wird die Art des GO-terms angezeigt (Rohdaten 53).

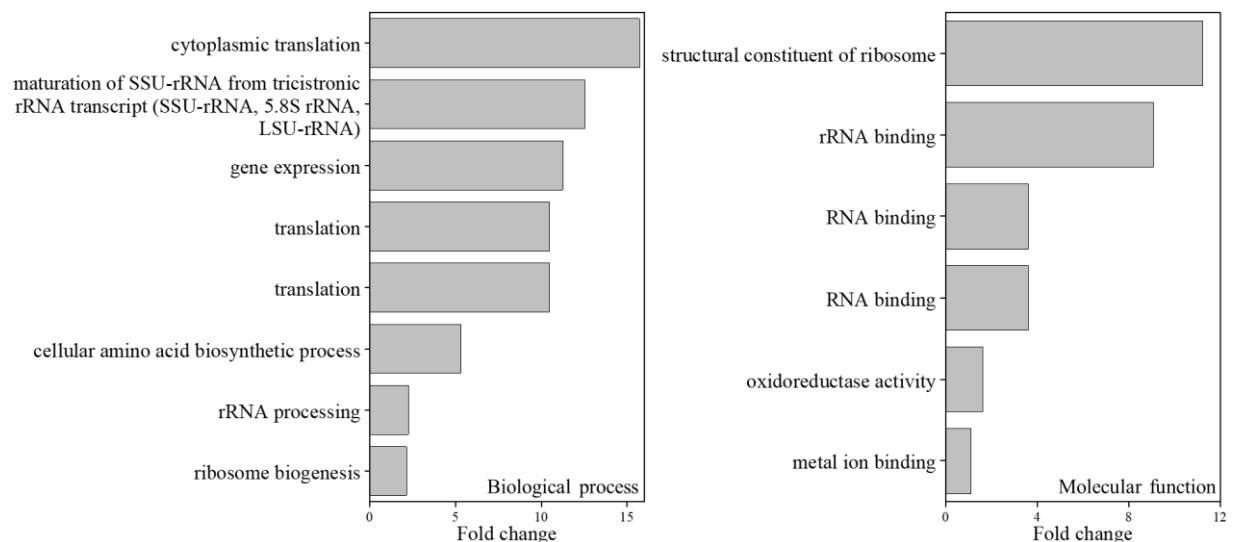


Abbildung 154: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion von Yae1 und Lto1 ihre Abundanz verringern. Gezeigt sind GO-terms, welche bei Proteinen, deren Abundanz in *LTO1*↓, *YAE1*↓ und *LTO1*↓/ *YAE1*↓-Stämmen verringert sind, überrepräsentiert sind. Unten rechts wird die Art des GO-terms angezeigt (Rohdaten 53).

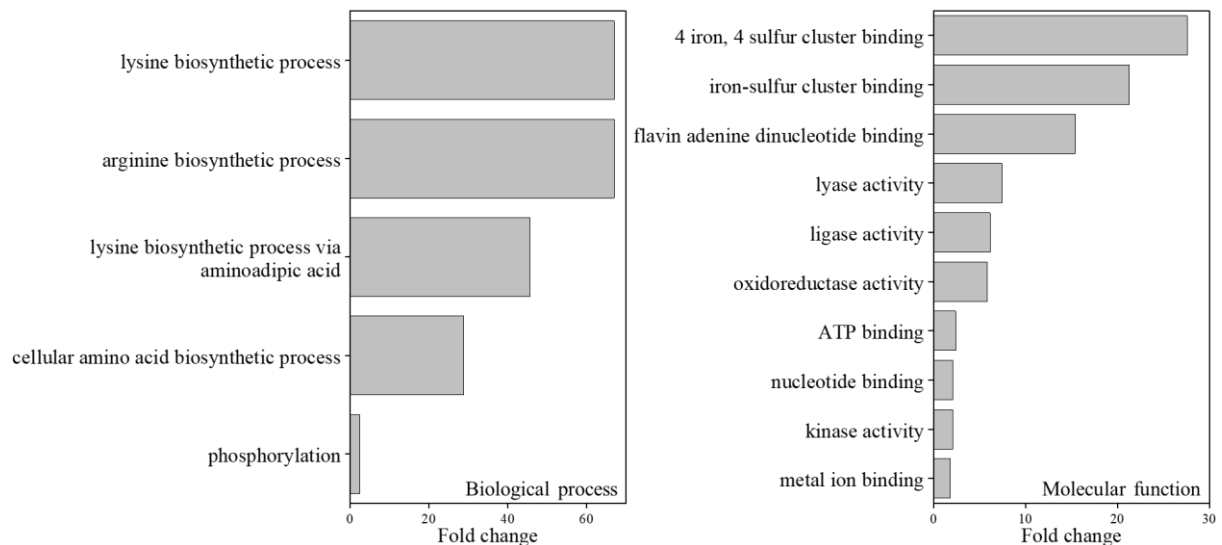


Abbildung 155: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion von CIA-Proteinen, ohne Grx3/4, Yae1 und Lto1 ihre Abundanz verringern. Gezeigt sind GO-terms, welche bei Proteinen, deren Abundanz in *TAH18*↓, *DRE2*↓, *CFD1*↓, *NBP35*↓, *NAR1*↓, *CIA1*↓, *CIA2*↓ und *MET18*↓-Stämmen verringert sind, überrepräsentiert sind. Unten rechts wird die Art des GO-terms angezeigt (Rohdaten 53).

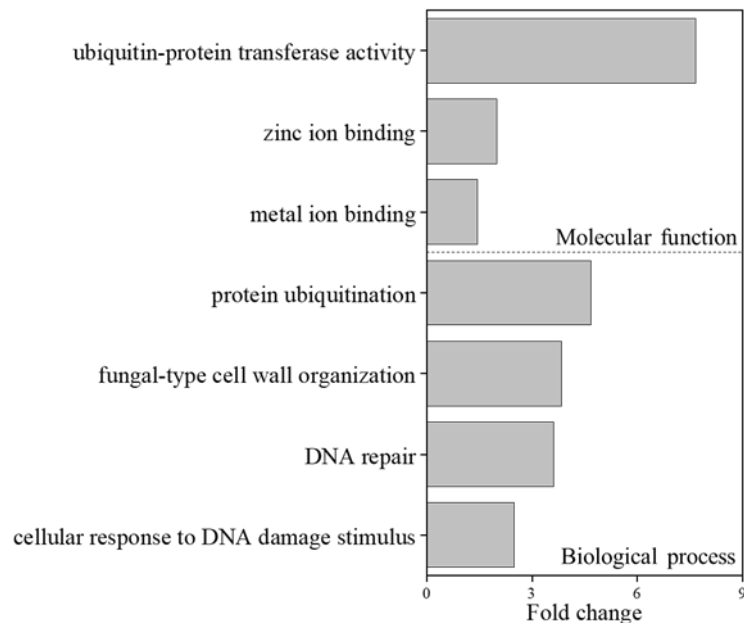


Abbildung 156: GO-terms Anreicherung von Proteinen, welche durch Depletion von Dre2 ihre Abundanz verringern. Gezeigt sind GO-terms, welche bei Proteinen, deren Abundanz ausschließlich im *DRE2*↓-Stamm, aber nicht in anderen Depletionsstämmen verringert sind, überrepräsentiert sind. Unten rechts wird die Art des GO-terms angezeigt (Rohdaten 53).

8.9 Strukturen der Top 20-Hits des Screenings nach reaktiven Cysteinen

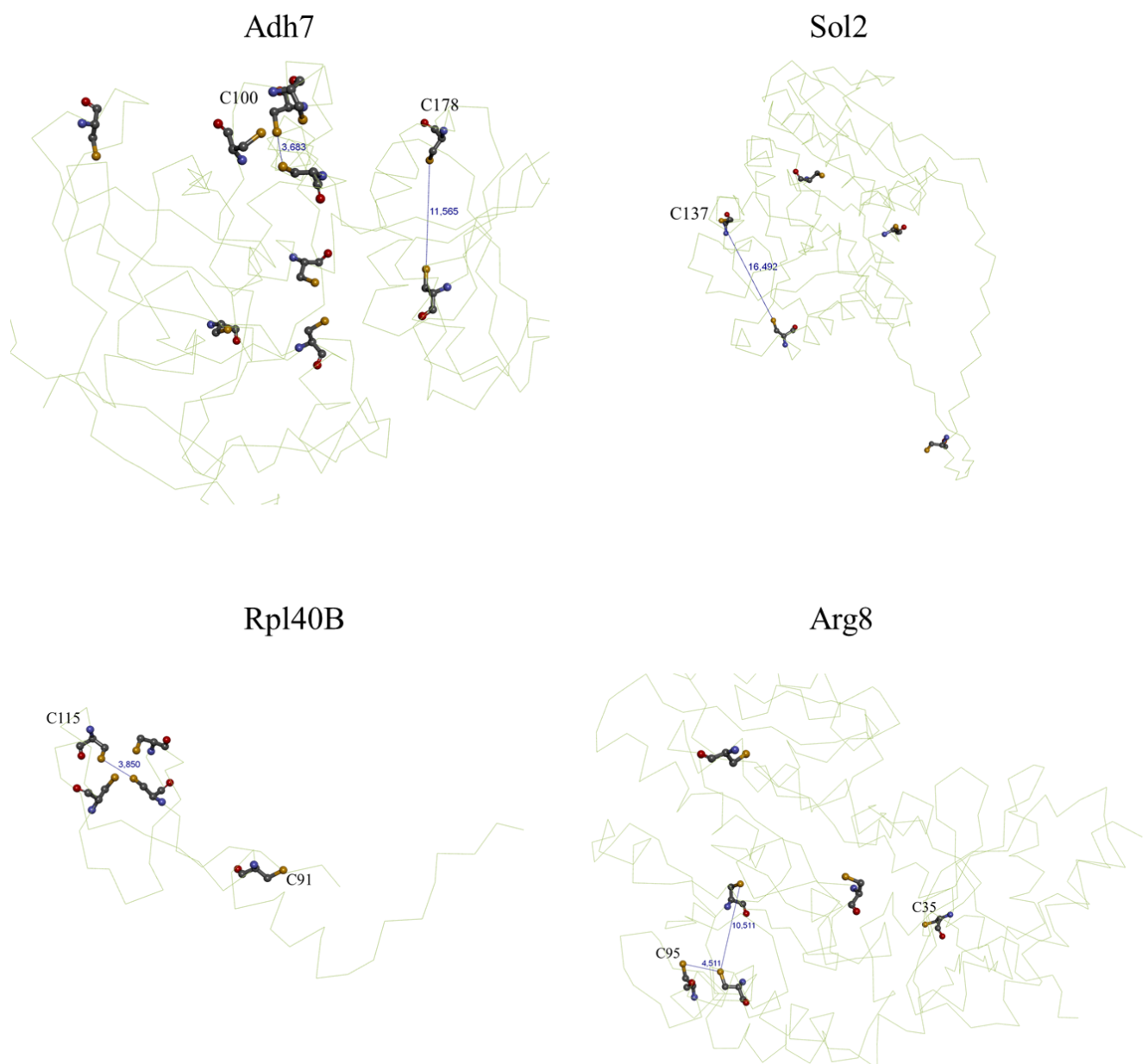
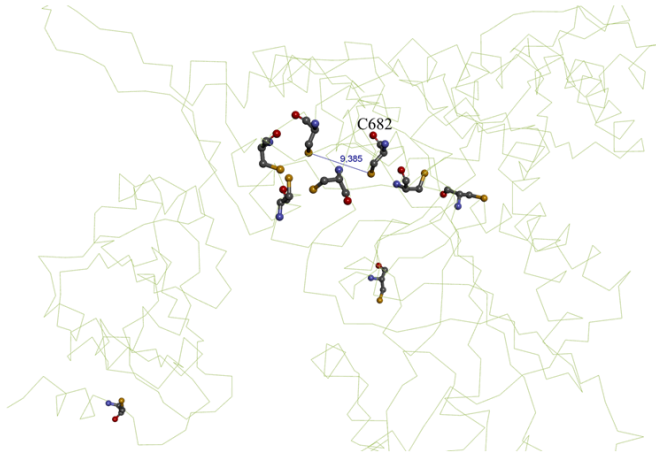
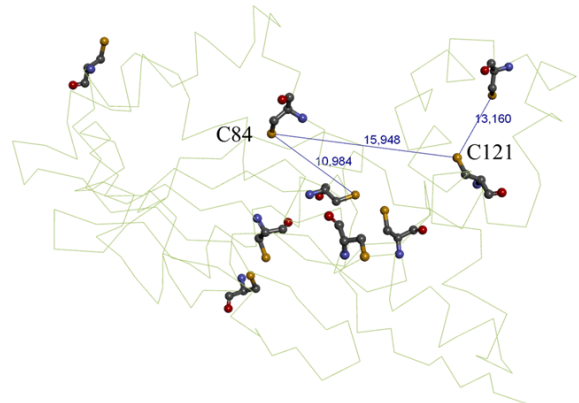


Abbildung 157: Reaktive Cysteine von Adh7, Sol2, Rpl40B und Arg8

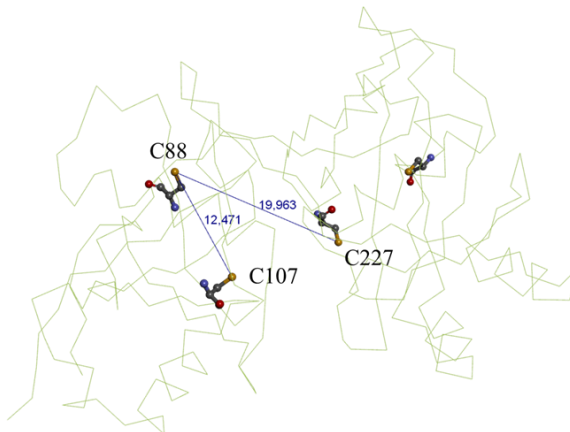
YHR020W



Nce103



Yhi9



Rpl23B

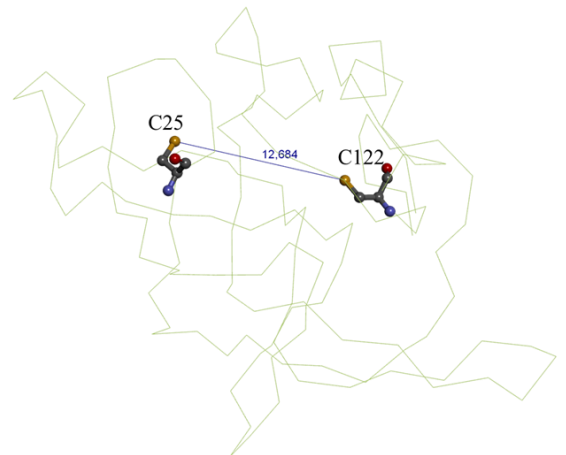


Abbildung 158: Reaktive Cysteine von YHR020W, Nce103, Yhi9 und Rpl23B

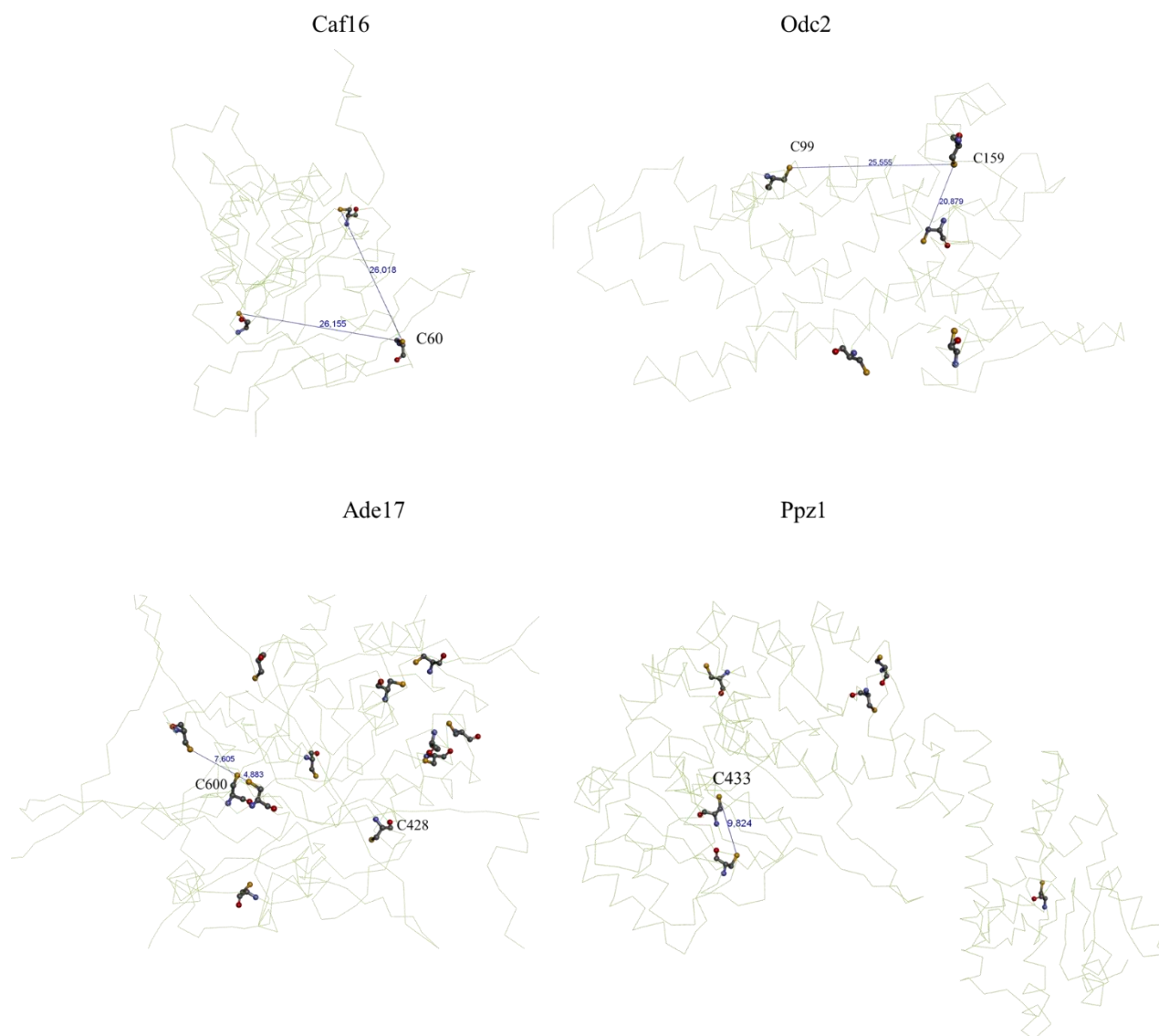


Abbildung 159: Reaktive Cysteine von Caf16, Odc2, Ade17 und Ppz1

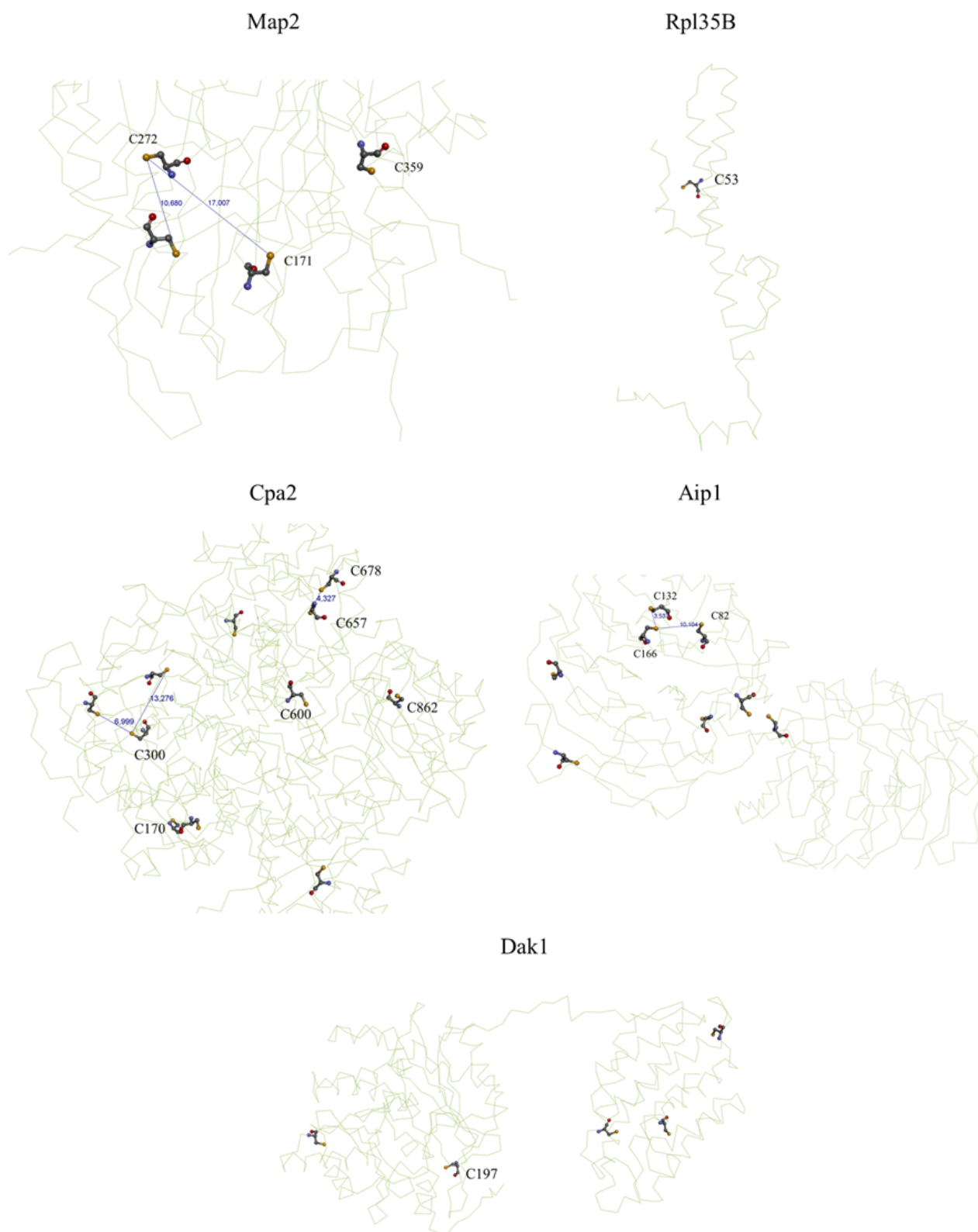


Abbildung 160: Reaktive Cysteine von Map2, Rpl35B, Cpa2, Aip1 und Dak1

8.10 Sequenzalignment der Sequenzierungen neuer Stämme

Das Startkodon (ATG) des jeweiligen Gens wurde zur Orientierung farblich markiert (grün) (Rohdaten 99).

Gall-Tah18 (kanMX)

Gall-3HA-Tah18 DIV351rev	TGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCTCTGCTTCACCGGTCGCGTTCC TGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCTCTGCTTCACCGGTCGCGTTCC *****	60 60
Gall-3HA-Tah18 DIV351rev	TGAAACGCAGATGTGCCTCGCGCCGCACTGCTCCGAACAATAAAGATTCTACAATACTAG TGAAACGCAGATGTGCCTCGCGCCGCACTGCTCCGAACAATAAAGATTCTACAATACTAG *****	120 120
Gall-3HA-Tah18 DIV351rev	CTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAAACCTTCAAATGA CTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAAACCTTCAAATGA *****	180 180
Gall-3HA-Tah18 DIV351rev	ACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTCTTCTGG ACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTCTTCTGG *****	240 240
Gall-3HA-Tah18 DIV351rev	GGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAAATGCAAAAAC GGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAAATGCAAAAAC *****	300 300
Gall-3HA-Tah18 DIV351rev	TGCATAACCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAAA TGCATAACCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAAA *****	360 360
Gall-3HA-Tah18 DIV351rev	TGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGA TGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGA *****	420 420
Gall-3HA-Tah18 DIV351rev	AAAAACCCCGGATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTTACCCATACGATGTT AAAAACCCCGGATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTTACCCATACGATGTT *****	480 480
Gall-3HA-Tah18 DIV351rev	CCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGACTATGCAGGATCCTATCCATATGAC CCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGACTATGCAGGATCCTATCCATATGAC *****	540 540
Gall-3HA-Tah18 DIV351rev	GTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGT GTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGT *****	600 600
Gall-3HA-Tah18 DIV351rev	GCTGGTCCGACAGAGAATTCATCGATGTCATCGAGCAAGAAAATCGTCATCCTCTATGGA GCTGGTCCGACAGAGAATTCATCGATGTCATCGAGCAAGAAAATCGTCATCCTCTATGGA *****	660 660
Gall-3HA-Tah18 DIV351rev	TCGGAGACAGGTAACGCGCATGATTTTGCTACAATCTTATCCCATCGACTACATCGCTGG TCGGAGACAGGTAACGCGCATGATTTTGCTACAATCTTATCCCATCGACTACATCGCTGG *****	720 720
Gall-3HA-Tah18 DIV351rev	CATTTCTCCCATACATTTTGCTCCATTGGTGATTATGACCCACAGGATATCTTGAAATGC CATTTCTCCCATACATTTTGCTCCATTGGTGATTATGACCCACAGGATATCTTGAAATGC *****	780 780

GalL-3HA-Tah18	AGGTACCTTTTTATTATATGCTCCACAACAGGCCAAGGTGAATTACCAAGGAATGTCAAT	840
DIV351rev	AGGTACCTTTTTATTATATGCTCCACAACAGGCCAAGGTGAATTACCAAGGAATCAAAC	840
	***** * * *	

GalL-3HA-Tah18/GalL-3HA-Dre2

GalL-3HA-Dre2	ACACCTCTACCGGCATGCCGAGCAAATGCCTGCAAATCGCTCCCCATTTACCCCAATTGT	60
DIV360rev	--ACCTCTACCGGCATGCCGAGCAAATGCCTGCAAATCGCTCCCCATTTACCCCAATTGT	58

GalL-3HA-Dre2	AGATATGCTAACTCCAGCAATGAGTTGATGAATCTCGGTGTGTATTTTATGTCCTCAGAG	120
DIV360rev	AGATATGCTAACTCCAGCAATGAGTTGATGAATCTCGGTGTGTATTTTATGTCCTCAGAG	118

GalL-3HA-Dre2	GACAACACCTGTTGTAATCGAGCTCGTGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGC	180
DIV360rev	GACAACACCTGTTGTAATCGAGCTCGTGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGC	178

GalL-3HA-Dre2	GTCTCTGCTTTCACCGGTGCGTTCTGAAACGCAGATGTGCTCGCGCCGCACTGCTCC	240
DIV360rev	GTCTCTGCTTTCACCGGTGCGTTCTGAAACGCAGATGTGCTCGCGCCGCACTGCTCC	238

GalL-3HA-Dre2	GAACAATAAAGATTCTACAATACTAGCTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTA	300
DIV360rev	GAACAATAAAGATTCTACAATACTAGCTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTA	298

GalL-3HA-Dre2	ACCTGGCCCCACAAACCTTCAAATGAACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGC	360
DIV360rev	ACCTGGCCCCACAAACCTTCAAATGAACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGC	358

GalL-3HA-Dre2	GATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCT	420
DIV360rev	GATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCT	418

GalL-3HA-Dre2	ATTAACGGATATATAAATGCAAAAACCTGCATAACCACTTTAACTAATACTTTCAACATTT	480
DIV360rev	ATTAACGGATATATAAATGCAAAAACCTGCATAACCACTTTAACTAATACTTTCAACATTT	478

GalL-3HA-Dre2	TCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATAT	540
DIV360rev	TCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATAT	538

GalL-3HA-Dre2	ACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAACCCCGATTCTAGAACTAGTGGATCCCCC	600
DIV360rev	ACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAACCCCGATTCTAGAACTAGTGGATCCCCC	598

GalL-3HA-Dre2	CCGGAATGGGTTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGG	660
DIV360rev	CCGGAATGGGTTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGG	658

GalL-3HA-Dre2	ACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTG	720
DIV360rev	ACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTG	718

GalL-3HA-Dre2	GTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTCCGACAGAGAATTCATCGATGCACAAT	780
DIV360rev	GTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTCCGACAGAGAATTCATCGATGCACAAT	778

GalL-3HA-Dre2	ACAAAACCTGGTTTACTTTTAATACATCCGGCGGTGACTACAACGCCAGAGCTAGTAGAGA	840
DIV360rev	ACAAAACCTGGTTTACTTTTAATACATCCGGCGGTGACTACAACGCCAGAGCTAGTAGAGA	838

GalL-3HA-Dre2 DIV360rev	ACACTAAGGCTCAAGCTGCATCAAAGAAAGTCAAGTTCGTGGACCAGTTTTTAATCAACA	900
	ACACTAAGGCTCAAGCTGCATCAAAGAAAGTCAAGTTCGTGGACCAGTTTTTAATCAACA	898

GalL-3HA-Dre2 DIV360rev	AACTAAACGATGGGTCCATAAAGTTTGGAAAACGCAAAATATGAAACAGTACACTATTTGA	960
	AACTAAACGATGGGTCCATAAAGTTTGGAAAACGCAAAATATGAAACAGTACACTATTTGA	958

GalL-3HA-Dre2 DIV360rev	CGCCAGAAGCCCAGACTGATATTAAGTTTCCGAAAAAGTTAATTTCTGTCTTAGCTGACT	1020
	CGCCAGAAGCCCAGACTGATATTAAGTTTCCGAAAAAGTTAATTTCTGTCTTAGCTGACT	1018

GalL-3HA-Dre2 DIV360rev	CATTGAAACCAAACGGCTCACTAATTGGTTTAAAGTGATATTTATAAAGTAGATGCATTAA	1080
	CATTGAAACCAAACGGCTCACTAATTGGTTTAAAGTGATATTTATAAAGTAGATGCATTAA	1078

GalL-3HA-Dre2 DIV360rev	TCAATGGGTTTGAATAATTAACGAACCAGATTATTGCTGGATTAA	1126
	TCAATGGTGAAATC-----	1092

GalL-3HA-Nbp35 (kanMX)

GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	-TGATGAATCTCGGTG-TGTATTTTATGTCCTCAGAGGACAACACCTGTTGTAATCGAGC	58
	CTGGTCGCTATACTGCTGTCGATTTCGATACTAACGCCGCCATCCAGTGTGAAAACGAGC	60
	* * * * *	
GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	TCGTGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTCGTCTTCACCGGTGCGGT	118
	TCGTGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTCGTCTTCACCGGTGCGGT	120

GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	TCCTGAAACGCAGATGTGCCTCGCGCCGCACTGCTCCGAACAATAAAGATTCTACAATAC	178
	TCCTGAAACGCAGATGTGCCTCGCGCCGCACTGCTCCGAACAATAAAGATTCTACAATAC	180

GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	TAGCTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAAACCTTCAAA	238
	TAGCTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAAACCTTCAAA	240

GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	TGAACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTTC	298
	TGAACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTTC	300

GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	TGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAAATGCAAA	358
	TGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAAATGCAAA	360

GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	AACTGCATAACCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTC	418
	AACTGCATAACCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTC	420

GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	AAATGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGG	478
	AAATGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGG	480

GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	AGAAAAAACCCCGATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTTACCCATACGAT	538
	AGAAAAAACCCCGATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTTACCCATACGAT	540

GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	GTTCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATAT	598
	GTTCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATAT	600

GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	GACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCC	658
	GACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCC *****	660
GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	GGTGCTGGTCCGACAGAGAATTTCATCGATGACTGAGATACTACCACATGTAAACGACGAA	718
	GGTGCTGGTCCGACAGAGAATTTCATCGATGACTGAGATACTACCACATGTAAACGACGAA *****	720
GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	GTGCTACCAGCAGAGTATGAACCTTAATCAGCCGGAACCAAGCAACTGTCTGGTCCAGAA	778
	GTGCTACCAGCAGAGTATGAACCTTAATCAGCCGGAACCAAGCAACTGTCTGGTCCAGAA *****	780
GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	TCAGACATGGCAGGTAAGTCCGATGCTTGTGGTGGCTGCGCCAATAAAGAAATATGTGAA	838
	TCAGACATGGCAGGTAAGTCCGATGCTTGTGGTGGCTGCGCCAATAAAGAAATATGTGAA *****	840
GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	AGTCTTCCGAAAGGCCCTGATCCAGATATTCCATTGATCACAGATAACTTGTCAAGGAATA	898
	AGTCTTCCGAAAGGCCCTGATCCAGATATTCCATTGATCACAGATAACTTGTCAAGGAATA *****	900
GalL-3HA-Nbp35 DIV350rev	GAACATAAAATATTGGTTTTATCAGGCAAAGGTGGCGTAGGCAAGTCGACATTGCGCGCA	958
	GAACATAAAATATTGGTTTTATCAGGCAAAGGTGGCGTAGGCAAGTCGACATTGCGCGC -- ***** *	958

GalL-3HA-Nbp35/GalL-3HA-Cfd1

GalL-3HA-Cfd1 DIV359rev	TCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCGGATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCCCG	60
	-AACTACTTGGTCATCAAGGAGAAACACCCCGGATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCCCG *****	59
GalL-3HA-Cfd1 DIV359rev	GAATGGGTTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACT	120
	GAATGGGTTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACT *****	119
GalL-3HA-Cfd1 DIV359rev	ATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTG	180
	ATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTG *****	179
GalL-3HA-Cfd1 DIV359rev	CCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTCCGACAGAGAATTTCATCGATGAGGAACAGG	240
	CCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTCCGACAGAGAATTTCATCGATGAGGAACAGG *****	239
GalL-3HA-Cfd1 DIV359rev	AGATAGGCGTTCTGCGGCCTCTTTGGCAGGAATAAAACATATCATATTGATCCTTTCCG	300
	AGATAGGCGTTCTGCGGCCTCTTTGGCAGGAATAAAACATATCATATTGATCCTTTCCG *****	299
GalL-3HA-Cfd1 DIV359rev	GAAAAGGTGGTGTCGGTAAAAGTTCGGTAACGACACAGACTGCGCTGACTCTTTGCAGTA	360
	GAAAAGGTGGTGTCGGTAAAAGTTCGGTAACGACACAGACTGCGCTGACTCTTTGCAGTA *****	359
GalL-3HA-Cfd1 DIV359rev	TGGGCTTCAAAGTTGGAGTTTTAGATATTGATTTAACAGGGCCATCCTTACCGAGGATGT	420
	TGGGCTTCAAAGTTGGAGTTTTAGATATTGATTTAACAGGGCCATCCTTACCGAGGATGT *****	419
GalL-3HA-Cfd1 DIV359rev	TTGGCCTAGAGAACGAATCTATATATCAAGGTCTGAAGGTTGGCAACCTGTGAAAGTGG	480
	TTGGCCTAGAGAACGAATCTATATATCAAGGTCTGAAGGTTGGCAACCTGTGAAAGTGG *****	479
GalL-3HA-Cfd1 DIV359rev	AGACAAACTCTACTGGCTCTCTTAGTGTAATATCATTGGGGTTTCTACTAGGTGATAGAG	540
	AGACAAACTCTACTGGCTCTCTTAGTGTAATATCATTGGGGTTTCTACTAGGTGATAGAG *****	539

GalL-3HA-Cfd1 DIV359rev	GGAACAGCGTGATATGGAGGGGTCCTAAGAAGACTTCTATGATAAAACAATTCATCTCTG GGAACAGCGTGATATGGAGGGGTCCTAAGAAGACTTCTATGATAAAACAATTCATCTCTG *****	600 599
GalL-3HA-Cfd1 DIV359rev	ACGTCGCCTGGGGTGAAC TGATTACTTACTGATCGATACCCCTCCGGGAACGTCGGATG ACGTCGCCTGGGGTGAAC TGATTACTTACTGATCGATACCCCTCCGGGAACGTCGGATG *****	660 659
GalL-3HA-Cfd1 DIV359rev	AACATAT----- AACATATATCGATGCAGAGG *****	667 679
GalL-3HA-Nar1		
GalL-3HA-Nar1 AJP2128rev	---GGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAACCTTCAAATGAACGAATC-AAATTA GAGGAAAAAATTCGGCAGTAACCTGGCCCCACAACCTCAATGAACGAATCAAATTA **** * ***** * ** * * * ***** * * *	55 60
GalL-3HA-Nar1 AJP2128rev	ACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTTCTGGGGTAATTAATC CAACCCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTCTAGCCTTAATTTCTGGGGTAATTTAATC * ***** * * * * *	113 120
GalL-3HA-Nar1 AJP2128rev	AGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAAATGCAAAACTGCATAACCAC AGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAAATGCAAAACTGCATAACCAC *****	173 180
GalL-3HA-Nar1 AJP2128rev	TTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAAAG TTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAAAG *****	233 240
GalL-3HA-Nar1 AJP2128rev	TATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCGG TATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCGG *****	293 300
GalL-3HA-Nar1 AJP2128rev	ATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTTACCCATACGATGTTCTCTGACTATGC ATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTTACCCATACGATGTTCTCTGACTATGC *****	353 360
GalL-3HA-Nar1 AJP2128rev	GGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTA GGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTA *****	413 420
GalL-3HA-Nar1 AJP2128rev	CGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTCCGAC CGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTCCGAC *****	473 480
GalL-3HA-Nar1 AJP2128rev	AGAGAATTCATCGATGAGTGCTCTACTGTCCGAGTCTGACCTAAACGATTTTATCAGTCC AGAGAATTCATCGATGAGTGCTCTACTGTCCGAGTCTGACCTAAACGATTTTATCAGTCC *****	533 540
GalL-3HA-Nar1 AJP2128rev	CGCCCTTGCGTGCGTCAAACCTACCAGGTGAGCGGGGGCAAGAAGGATAACGTTAACAT CGCCCTTGCGTGCGTCAAACCTACCAGGTGAGCGGGGGCAAGAAGGATAACGTTAACAT *****	593 600
GalL-3HA-Nar1 AJP2128rev	GAACGGAGAATACGAGGTGAGCACGGAACCACTGGAGAAGGTCTCTATTACCCT GAACGGAGAATACGAGGTGAGCACGGAACCACTGGAGAAGGTCTCTATTACCCT *****	653 660
GalL-3HA-Nar1 AJP2128rev	ATCAGACTGCCTCGCGTGTCTGGTTGTATAACGTCTAGTGAAGAAATCTTGTTGAGTAG ATCAGACTGCCTCGCGTGTCTGGTTGTATAACGTCTAGTGAAGAAATCTTGTTGAGTAG *****	713 720

GalL-3HA-Nar1 AJP2128rev	CCAAAGTCACTCGGTTTTCTGAAAACTGGGGGAAGCTTTCGCAGCAGCAAGACAAATT CCAAAGTCACTCGGTTTTCTGAAAACTGGGGGAAGCTTTCGCAGCAGCAAGACAAATT *****	773 780
GalL-3HA-Nar1 AJP2128rev	CCTCGTTGTGAGTGTCTCGCCACAATGCAGACTATCTCTTGCGCAGTACTACGGCTTAAC CCTCGTTGTGAGTGTCTCGCCACAATGCAGACTATCTCTTGCGCAGTACTACGGCTTAAC *****	833 840
GalL-3HA-Nar1 AJP2128rev	ATTGGAGGCGGCCGATTTGTGTTTGATGAATTTTTTCCAAAAGCATTTCAGT ATTGGAGGCGGCCGATTTGTGTT----- *****	886 863

ΔGrx3/GalL-3HA-Grx4

Dgrx3/GalL-3HA-Grx4 DIV339rev	AAATTTCTGTGCTCTTCCTCCAATAAATCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAA -----ATCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAA *****	60 34
Dgrx3/GalL-3HA-Grx4 DIV339rev	ATGCAAAAACGCATAACCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGATTACTT ATGCAAAAACGCATAACCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGATTACTT *****	120 94
Dgrx3/GalL-3HA-Grx4 DIV339rev	CTTATTCAAATGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAAC CTTATTCAAATGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAAC *****	180 154
Dgrx3/GalL-3HA-Grx4 DIV339rev	GTC AAGGAGAAAAACCCCGGATTCTAGAAGTCTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTTACCC GTC AAGGAGAAAAACCCCGGATTCTAGAAGTCTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTTACCC *****	240 214
Dgrx3/GalL-3HA-Grx4 DIV339rev	ATACGATGTTCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGACTATGCAGGATCCTA ATACGATGTTCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGACTATGCAGGATCCTA *****	300 274
Dgrx3/GalL-3HA-Grx4 DIV339rev	TCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGC TCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGC *****	360 334
Dgrx3/GalL-3HA-Grx4 DIV339rev	CGGTGCCGGTGCTGGTCCGACAGAGAATTCATCGATGACTGTGGTTGAAATAAAAGCCA CGGTGCCGGTGCTGGTCCGACAGAGAATTCATCGATGACTGTGGTTGAAATAAAAGCCA *****	420 394
Dgrx3/GalL-3HA-Grx4 DIV339rev	GGACCAATTTACGCAACTAACCACTACAAACGCTGCTAATAAACTCATTGTCTTATATT GGACCAATTTACGCAACTAACCACTACAAACGCTGCTAATAAACTCATTGTCTTATATT *****	480 454
Dgrx3/GalL-3HA-Grx4 DIV339rev	TAAAGCTCAATGGGCTGATCCTTGCAAACTATGAGCCAGGTGCTAGAAGCTGTTAGTGA TAAAGCTCAATGGGCTGATCCTTGCAAACTATGAGCCAGGTGCTAGAAGCTGTTAGTGA *****	540 514
Dgrx3/GalL-3HA-Grx4 DIV339rev	AAAAGTTAGGCAAGAGGATGTCCGGTTTTTATCAATAGATGCAGACGAACATCCAGAAAT AAAAGTTAGGCAAGAGGATGTCCGGTTTTTATCAATAGATGCAGACGAACATCCAGAAAT *****	600 574
Dgrx3/GalL-3HA-Grx4 DIV339rev	ATCAGACCTTTTTGAGATTGCAGCCGTACCATACTTCGTCTTCATTCAAAATGGTACTAT ATCAGACCTTTTTGAGATTGCAGCCGTACCATACTTCGTCTTCATTCAAAATGGTACTAT *****	660 634
Dgrx3/GalL-3HA-Grx4 DIV339rev	TGTAAGAGAAATATCAGCCGCAGATCCTAAGGAGTTTGTGAAAAGCTTAGAAATTCCTTC TGTAAGAGAAATATCAGCCGCAGATCCTAAGGAGTTTGTGAAAAGCTTAGAAATTCCTTC *****	720 694
Dgrx3/GalL-3HA-Grx4 DIV339rev	GAATGCTTCTGCCTCACTAGCGAACAATGCCAAGGGTCCTAAATCTACGTCTGATGAGGA GAATGCTTCTGCCTCACTAGCGAACAATGCCAAGGGTCCTAAATCTACGTCTGATGAGAA *****	780 754

Dgrx3/GalL-3HA-Grx4	AAGCAGCGGGTCTTCCGATGATGAAGAGGACGAAACTGAAGAAGAAATAAATGC	834
DIV339rev	GCGCTC-----	760
	**	

ΔGrx4/GalL-3HA-Grx3

Dgrx4/GalL-3HA-Grx3	CCAAGCAAGATATTACACAGCAGCAAACTTTTTCAGGAAAAATTTCTGTGCTCTTCCTC	60
DIV426rev	--AACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGGTAATTAAT	58
	** * ** *	
Dgrx4/GalL-3HA-Grx3	CAATAAATCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAAATGCAAAAACCTGCATAACCA	120
DIV426rev	CAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAAATGCAAAAACCTGCATAACCA	118
	** ** *	
Dgrx4/GalL-3HA-Grx3	CTTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAAA	180
DIV426rev	CTTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAAA	178

Dgrx4/GalL-3HA-Grx3	GTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCG	240
DIV426rev	GTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCG	238

Dgrx4/GalL-3HA-Grx3	GATTCTAGAAGTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTACCCATACGATGTTCTGACTATG	300
DIV426rev	GATTCTAGAAGTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTACCCATACGATGTTCTGACTATG	298

Dgrx4/GalL-3HA-Grx3	CGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGACGAGTCTATCCATATGACGTTCAGATT	360
DIV426rev	CGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGACGAGTCTATCCATATGACGTTCAGATT	358

Dgrx4/GalL-3HA-Grx3	ACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTGCCGA	420
DIV426rev	ACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTGCCGA	418

Dgrx4/GalL-3HA-Grx3	CAGAGAATTCATCGATGCTGTTATTGAAATTAACGATCAAGAGCAATTTACTTACCTAA	480
DIV426rev	CAGAGAATTCATCGATGCTGTTATTGAAATTAACGATCAAGAGCAATTTACTTACCTAA	478

Dgrx4/GalL-3HA-Grx3	CTACCACTGCGGCCGGCGACAAGTTAATCGTGCTTTATTTCCATACCAAGTTGGGCAGAAC	540
DIV426rev	CTACCACTGCGGCCGGCGACAAGTTAATCGTGCTTTATTTCCATACCAAGTTGGGCAGAAC	538

Dgrx4/GalL-3HA-Grx3	CATGCAAAGCATTAAAGCAGGTTTTTGAGGCCATTAGTAATGAGCCTTCCAATTCCAACG	600
DIV426rev	CATGCAAAGCATTAAAGCAGGTTTTTGAGGCCATTAGTAATGAGCCTTCCAATTCCAACG	598

Dgrx4/GalL-3HA-Grx3	TCTCTTTCTTATCCATTGATGCGGACGAAACTC	634
DIV426rev	TTTTTC-----	604
	* * *	

GalL-3HA-Cia2

GalL-3HA-Cia2	-----AATACTTTCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAAA	52
AJP2125rev	TTTAAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAAA	60

GalL-3HA-Cia2	GTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCG	112
AJP2125rev	GTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCG	120

GalL-3HA-Cia2 AJP2125rev	GATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCCGGAATGGGTTACCCATACGATGTTCTGACTATG GATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCCGGAATGGGTTACCCATACGATGTTCTGACTATG *****	172 180
GalL-3HA-Cia2 AJP2125rev	CGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATT CGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATT *****	232 240
GalL-3HA-Cia2 AJP2125rev	ACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTCCGA ACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTCCGA *****	292 300
GalL-3HA-Cia2 AJP2125rev	CAGAGAATTCATCGATGTCTGAGTTTTTGAATGAAAATCCCGACATTTTAGAGGAGAACC CAGAGAATTCATCGATGTCTGAGTTTTTGAATGAAAATCCCGACATTTTAGAGGAGAACC *****	352 360
GalL-3HA-Cia2 AJP2125rev	AACTTCCCACTAGAAAAGAAGATAGTACCAAGGACCTTTTGTTAGGCGGGTTCAGCAACG AACTTCCCACTAGAAAAGAAGATAGTACCAAGGACCTTTTGTTAGGCGGGTTCAGCAACG *****	412 420
GalL-3HA-Cia2 AJP2125rev	AAGCTACGCTGGAAAGGAGAAGCCTTTTGCTGAAAATAGACCATTCTTTAAAGTCTCAGG AAGCTACGCTGGAAAGGAGAAGCCTTTTGCTGAAAATAGACCATTCTTTAAAGTCTCAGG *****	472 480
GalL-3HA-Cia2 AJP2125rev	TATTGCAAGATATAGAGGTCTTAGACAAGCTTCTTTCCATTGGAATCCACCAGAACTGA TATTGCAAGATATAGAGGTCTTAGACAAGCTTCTTTCCATTGGAATCCACCAGAACTGA *****	532 540
GalL-3HA-Cia2 AJP2125rev	CTTCCGATGAGGATAGTTTGCCAGCAGAAAGCGAGGATGAATCCGTAGCGGGTGGAGGAA CTTCCGATGAGGATAGTTTGCCAGCAGAAAGCGAGGATGAATCCGTAGCGGGTGGAGGAA *****	592 600
GalL-3HA-Cia2 AJP2125rev	AGGAGGAGGAAGAGCCTGATCTCATTGATGCTCAAGAAATATATGATTTGATAGCTCAT AGGAGGAGGAAGAGCCTGATCTCATTGATGCTCAAGAAATATATGATTGATGCCTACGCC ***** *	652 660
GalL-3HA-Cia2 AJP2125rev	TTTCCGACCCTGAGCACCCGTTAAGTCTGGGACA 686 T----- 661 *	

GalL-3HA-Yae1

GalL-3HA-Yae1 AJP2126rev	-TTCTTGTTCTTGAGT-AACTCTTCTCTGAGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGTATAGCATG ATTCTTATTCTTGAGTAACCTCTTCTCTGAGGTCAGTTGCTTTCTCAGGTATAGCATG ***** *	58 60
GalL-3HA-Yae1 AJP2126rev	AGGTCGCTCTTATTGAC-----CACACCTCTACCGGCATGCCGAGCAAATGCCTGCAAA AGGTCGCTCTTATTGACCACCACCTTCTTACCGGCATGCCGAGCAAATGCCTGCAAA ***** * *	112 120
GalL-3HA-Yae1 AJP2126rev	TCGC---TCCCCATTTACCCAATTGTAGATATGCTAACTCCAGCAATGAGTTGATGAAT TCGCCTCCCCATTTACCCAATTGTAGATATGCTAACTCCAGCAATGAGTTGATGAAT **** ** *	169 180
GalL-3HA-Yae1 AJP2126rev	CTCGGTGTGATTTTATGTCCTCAGAGGACAACACCTGTTGTAATCGAGCTCGTGACAGC CTCGGTGTGATTTTATGTCCTCAGAGGACAACACCTGTTGTAATCGAGCTCGTGACAGC *****	229 240

GalL-3HA-Yae1	CCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTCGTCTTCACCGGTCGCGTTCTCTGAAACG	289
AJP2126rev	CCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTCGTCTTCACCGGTCGCGTTCTCTGAAACG *****	300
GalL-3HA-Yae1	CAGATGTGCCTCGCGCCGACTGCTCCGAACAATAAAGATTCTACAATACTAGCTTTTAT	349
AJP2126rev	CAGATGTGCCTCGCGCCGACTGCTCCGAACAATAAAGATTCTACAATACTAGCTTTTAT *****	360
GalL-3HA-Yae1	GGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAAACCTTCAAATGAACGAATC	409
AJP2126rev	GGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAAACCTTCAAATGAACGAATC *****	420
GalL-3HA-Yae1	AAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGTAATT	469
AJP2126rev	AAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGTAATT *****	480
GalL-3HA-Yae1	AATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAAACGGATATATAAATGCAAAAACCTGCATAA	529
AJP2126rev	AATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAAACGGATATATAAATGCAAAAACCTGCATAA *****	540
GalL-3HA-Yae1	CCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGATTACTTCTTATTCAAATGTAATA	589
AJP2126rev	CCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGATTACTTCTTATTCAAATGTAATA *****	600
GalL-3HA-Yae1	AAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAAACGTCAAGGAGAAAAAAC	649
AJP2126rev	AAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAAACGTCAAGGAGAAAAAAC *****	660
GalL-3HA-Yae1	CCGGATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTTACCCATACGATGTTCTTGACT	709
AJP2126rev	CCGGATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTTACCCATACGATGTTCTTGACT *****	720
GalL-3HA-Yae1	ATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAG	769
AJP2126rev	ATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAG *****	780
GalL-3HA-Yae1	ATTACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTC	829
AJP2126rev	ATTACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTC *****	840
GalL-3HA-Yae1	CGACAGAGAATTCATCGATGTCGAATACTTGGGACGATGTATGGGCATCAGACAGTGATG	889
AJP2126rev	CGACAGAGAATTCATCGATGTCGAATACTTGGGACGATGTATGGGCATCAGACAGTGATG *****	900
GalL-3HA-Yae1	TCGAAACTGAACGATCTCCAGATTTAGTGAAGTTAAG-----	926
AJP2126rev	TCGAAACTGAACGATCTCCAGATTTAGTGAAGTAAGAGAGATCCTGACGGG ***** *	951

GalL-3HA-Lto1

GalL-3HA-Lto1	AAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCGGATTCTAG	60
AJP2127rev	-----TTTCCTCTTATTTAAAAAGTAAAAACAACCAACATAAATTCAAACGTACCC * * * * * * * * * * * * * * * *	51
GalL-3HA-Lto1	AACTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGGCTAT	120
AJP2127rev	ACGCGATCGGTGCCCCAGGAATGGGTTTCCCATACGATGTTCTGACTATGCGGGCTAT * * * * * * * * * * * * * * * *	111
GalL-3HA-Lto1	CCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCT	180
AJP2127rev	CCCTAGGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCT *****	171

GalL-3HA-Lto1 AJP2127rev	CAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTCCGACAGAGAAT CAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTCCGACAGAGAAT *****	240 231
GalL-3HA-Lto1 AJP2127rev	TCATCGATGGATTTTGATAATTTACTAAACCTAGAAGAACAGTATTACCAAGAAGGTTTT TCATCGATGGATTTTGATAATTTACTAAACCTAGAAGAACAGTATTACCAAGAAGGTTTT *****	300 291
GalL-3HA-Lto1 AJP2127rev	CTGGAGGGCCAGAATGAGAATATAAAGCAGAGCTTTCTAGAAGGTAAACAGTATGGTTTA CTGGAGGGCCAGAATGAGAATATAAAGCAGAGCTTTCTAGAAGGTAAACAGTATGGTTAC *****	360 351
GalL-3HA-Lto1 AJP2127rev	CAAGTGGGATTCCAAAGATTTACGCT 386 AAGTGATCCAACGATCGA----- 369 * * * **	

GalL-3HA-Yae1(kanMX)

GalL-3HA-Yae1(kanMX) DIV523rev	-TTTTATGTCCTCAGAGGACAACACCTGTTGTAATCGAGCTCGTGACAGCCCTCCGAAGG GATTCGATACTAACGCCGCCATCCAGTGTGAAAACGAGCTCGTGACAGCCCTCCGAAGG ** * * * * * ** * * *****	59 60
GalL-3HA-Yae1(kanMX) DIV523rev	AAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTCGTCTTACC GGTCGCGTTCCTGAAACGCAGATGTGCC AAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTCGTCTTACC GGTCGCGTTCCTGAAACGCAGATGTGCC *****	119 120
GalL-3HA-Yae1(kanMX) DIV523rev	TCGCGCCGCACTGCTCCGAACAATAAAGATTCTACAATACTAGCTTTTATGGTTATGAAG TCGCGCCGCACTGCTCCGAACAATAAAGATTCTACAATACTAGCTTTTATGGTTATGAAG *****	179 180
GalL-3HA-Yae1(kanMX) DIV523rev	AGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAAACCTTCAAATGAACGAATCAAATTAACAA AGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAAACCTTCAAATGAACGAATCAAATTAACAA *****	239 240
GalL-3HA-Yae1(kanMX) DIV523rev	CCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGGTAATTAATCAGCGAA CCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGGTAATTAATCAGCGAA *****	299 300
GalL-3HA-Yae1(kanMX) DIV523rev	GCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAAATGCAAAAACGCATAACCACTTTAAC GCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAAATGCAAAAACGCATAACCACTTTAAC *****	359 360
GalL-3HA-Yae1(kanMX) DIV523rev	TAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAAGTATCAA TAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAAGTATCAA *****	419 420
GalL-3HA-Yae1(kanMX) DIV523rev	CAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACCTTAAACGTCAAGGAGAAAAACCCCGGATTCTA CAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACCTTAAACGTCAAGGAGAAAAACCCCGGATTCTA *****	479 480
GalL-3HA-Yae1(kanMX) DIV523rev	GAACTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGGCTA GAACTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGGCTA *****	539 540
GalL-3HA-Yae1(kanMX) DIV523rev	TCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGC TCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGC *****	599 600
GalL-3HA-Yae1(kanMX) DIV523rev	TCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTCCGACAGAGAA TCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGGTCCGACAGAGAA *****	659 660
GalL-3HA-Yae1(kanMX) DIV523rev	TTATCGATCTCGAATACTTGGGACGATGTATGGGCATCAGACAGTGATGTCGAAACTGA TTATCGATCTCGAATACTTGGGACGATGTATGGGCATCAGACAGTGATGTCGAAACTGA *****	719 720

GalL-3HA-Yae1(kanMX)	ACGATCTCCAGATTTAGTGAAGTTAAGAGAGAATCATAGCAAGAGGG	766
DIV523rev	ACGATCTCCAGATTTAGTGAAGTTAAGAGAGATCACAGG-----	759
	***** *	

GalL-3HA-Yae1/GalL-3HA-Lto1

GalL-3HA-Lto1	-----TTCTTGTTCTTGAGTAACCTTTTCTGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCA	47
DIV522rev	TTTAAACGAAAATCTTATTCTTGAGTAACCTTTTCTGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCA	60

GalL-3HA-Lto1	GGTATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTACCGGCATGCCGAGCAAATGCCT	107
DIV522rev	GGTATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTACCGGCATGCCGAGCAAATGCCT	120

GalL-3HA-Lto1	GCAAATCGCTCCCCATTTACCCAATTGTAGATATGCTAACTCCAGCAATGAGTTGATGA	167
DIV522rev	GCAAATCGCTCCCCATTTACCCAATTGTAGATATGCTAACTCCAGCAATGAGTTGATGA	180

GalL-3HA-Lto1	ATCTCGGTGTGTATTTTATGTCCTCAGAGGACAACACCTGTTGTAATCGAGCTCGTGACA	227
DIV522rev	ATCTCGGTGTGTATTTTATGTCCTCAGAGGACAACACCTGTTGTAATCGAGCTCGTGACA	240

GalL-3HA-Lto1	GCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTCGTCTTACCGGTCGCGTTCCTGAAA	287
DIV522rev	GCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTCGTCTTACCGGTCGCGTTCCTGAAA	300

GalL-3HA-Lto1	CGCAGATGTGCCTCGCGCCGCACTGCTCCGAACAATAAGATTCTACAATACTAGCTTTT	347
DIV522rev	CGCAGATGTGCCTCGCGCCGCACTGCTCCGAACAATAAGATTCTACAATACTAGCTTTT	360

GalL-3HA-Lto1	ATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAAACCTTCAAATGAACGAA	407
DIV522rev	ATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCACAAACCTTCAAATGAACGAA	420

GalL-3HA-Lto1	TCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGGTAA	467
DIV522rev	TCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGGTAA	480

GalL-3HA-Lto1	TTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAAATGCAAAAACCTGCAT	527
DIV522rev	TTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACGGATATATAAATGCAAAAACCTGCAT	540

GalL-3HA-Lto1	AACCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAA	587
DIV522rev	AACCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAA	600

GalL-3HA-Lto1	TAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAA	647
DIV522rev	TAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAA	660

GalL-3HA-Lto1	CCCCGGATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTTACCCATACGATGTTCTCTGA	707
DIV522rev	CCCCGGATTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGAATGGGTTACCCATACGATGTTCTCTGA	720

GalL-3HA-Lto1	CTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCC	767
DIV522rev	CTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCC	780

GalL-3HA-Lto1	AGATTACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGG	827
DIV522rev	AGATTACGCTGCTCAGTGCTCTGGTGCTGGTGCCGGTGCTGGTGCCGGTGCCGGTGCTGG	840

GalL-3HA-Lto1	TCCGACAGAGAATTCATCGATGGATTTTGATAATTTACTAAACCTAGAAGAACAGTATTA	887
DIV522rev	TCCGACAGAGAATTCATCGATGGATTTTGATAATTTACTAAACCTAGAAGAACAGTATTA	900

GalL-3HA-Lto1	CCAAGAAGGTTTTCTGGAGGGCCAGAATGAGAATATAAAGCAGAGCTTTCTAGAAGGTAA	947
DIV522rev	CCAAGAAGGTTTTCTGGAGGGCCAGAATGAGAATATAAAGCAGAGCTTTCTAGAAGGTAA	960

GalL-3HA-Lto1	ACAGTATGGTTTACAAGTGGGATTCCAAAGATTTACGCT	986
DIV522rev	ACAGTATGGTTACAAGTGGATTCCAAGTTCGG-----	992
	***** * *	

Lebenslauf - Lukas Philipp Hewener

Akademischer Werdegang

07/2019 - 07/2025 **Promotion** im Fachbereich **Biochemie**

RPTU Kaiserslautern/Landau - Campus Kaiserslautern

- Titel der Arbeit: "Veränderungen des Proteoms von *Saccharomyces cerevisiae* infolge einer Beeinträchtigung der Fe/S-Biosynthese durch CIA- und Eisen-Depletion"

01/2017 - 05/2019 **Master of Education** im Bereich **Biologie und Chemie**

TUK - Kaiserslautern

- Titel der Arbeit: "Expression und Charakterisierung der Cytochrom b₅-Reduktasen Pga3, Aim33, Cbr1 und Mcr1 aus *Saccharomyces cerevisiae*"

10/2013 – 12/2016 **Bachelor of Education** im Bereich **Biologie und Chemie**

TUK - Kaiserslautern

- Titel der Arbeit: "Etablierung einer Methode zur Quantifizierung von Phycobilinen in verschiedenen Cyanobakterienstämmen"