

Funktion des C-terminalen Tryptophans cytosolischer Eisen-Schwefel-Proteine bei deren Assemblierung

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte

Dissertation

D386

vorgelegt von
Dipl. Chem. Carina Greth

Betreuer: Prof. Dr. A. J. Pierik

Technische Universität Kaiserslautern

30. Oktober 2018

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von April 2014 bis September 2018 im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. J. Pierik an der Technischen Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Biochemie.

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 10.01.2018

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 30.10.2018

Promotionskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Thiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. J. Pierik

2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Herrmann

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1 Hefe als Modellorganismus	1
1.2 Eisen-Schwefel (Fe/S)-Proteine.....	1
1.2.1 Eisen-Schwefel-Cluster	1
1.2.2 Funktionen von Fe/S-Proteinen	2
1.3 Biogenese von Fe/S-Proteinen	4
1.3.1 Einführung in die Biogenese von Fe/S-Proteinen	4
1.3.2 Die Biogenese cytosolischer Fe/S-Proteine	5
1.3.3 Cia1	9
1.3.4 Cia2	9
1.3.5 Met18	10
1.4 Die Isopropylmalat-Isomerase	10
1.4.1 Die Leucinbiosynthese	11
1.4.2 Spezieshomologie	12
1.4.3 Aconitase-Proteinfamilie	14
1.4.4 Struktur	14
1.5 Cytosolische und nucleäre Fe/S-Proteine mit C-terminalem Tryptophan	16
1.5.1 Apd1	21
1.5.2 Viperin	22
1.6 Ziel der Arbeit	23
2. Material	27
2.1 Geräte	27
2.2 Softwares	28
2.3 Verbrauchsmaterialien	29
2.4 Chemikalien	29
2.5 Enzyme	32
2.6 Antikörper	32
2.7 Größenstandards	33
2.8 Säulenmaterialien	33
2.9 Peptide	34
2.10 Komplettsysteme	34
2.11 Oligonucleotide	35

2.12	Synthetische Gene	44
2.13	Plasmide	44
2.14	Bakterien- und Hefestämme.....	51
2.14.1	Bakterienstämme.....	51
2.14.2	Hefestämme	51
2.14.3	GAL-Promotor	53
2.14.4	Tet-Promotor	54
3.	Methoden	57
3.1	Mikrobiologische Arbeiten	57
3.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	57
3.1.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	57
3.1.3	Glycerinkultur von <i>S. cerevisiae</i>	59
3.1.4	Messung der optischen Dichte.....	59
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	59
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	59
3.2.2	Agarosegelelektrophorese	60
3.2.3	Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen und Agarosegelen	61
3.2.4	Restriktionsverdau	61
3.2.5	Ligation	62
3.2.6	Transformation von <i>E. coli</i>	62
3.2.7	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	62
3.2.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	63
3.2.9	Sequenzierung	64
3.2.10	Gezielte Mutagenese	64
3.2.11	Kolonie-PCR	65
3.3	Zellbiologische Methoden	66
3.3.1	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> und homologe Rekombination.....	66
3.3.2	DNA-Isolation aus <i>S. cerevisiae</i>	67
3.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	68
3.3.4	Zellextraktpräparation von <i>S. cerevisiae</i>	68
3.3.5	Mitochondrienpräparation von <i>S. cerevisiae</i>	69
3.3.6	Zellextraktpräparation von <i>E. coli</i>	71
3.3.7	Tüpfeltest	72
3.3.8	X-Gal-Methode	73
3.3.9	⁵⁵ Fe-Einbau	74
3.4	Biochemische Arbeitsmethoden	75
3.4.1	Reinigung von Proteinen mittels His-Tag.....	75
3.4.2	Denaturierende Aufreinigung von Proteinen	77
3.4.3	Reinigung von Proteinen mittels MBP-Tag	78
3.4.4	Proteinbestimmung mittels Micro-Biuret-Methode	79

3.4.5	Proteinbestimmung nach Bradford	80
3.4.6	TCA-Präzipitation	80
3.4.7	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	81
3.4.8	Western Blot	82
3.4.9	Leu1-spezifische Aktivitätsmessung	84
3.4.10	Direkte Aconitase-spezifische Aktivitätsmessung.....	85
3.4.11	Indirekte Aconitase-spezifische Aktivitätsmessung	86
3.4.12	Succinat-Dehydrogenase-spezifische Aktivitätsmessung	87
3.4.13	ONPG-Methode	88
3.4.14	Rekonstitution von Fe/S-Clustern	89
3.4.15	Kopplung von Immunobeads	90
3.4.16	(Co)Immunpräzipitation	90
3.4.17	Präzipitation mittels magnetischer Beads	91
3.4.18	Fluoreszenzanisotropie.....	92
3.4.19	Isotherme Titrationskalorimetrie	94
3.4.20	Chemische Quervernetzung mittels EDC	95
4.	Ergebnisse.....	97
4.1	Untersuchungen zum Einfluss des C-terminalen Tryptophans	97
4.1.1	Einfluss auf die Funktion von Nar1.....	97
4.1.2	Einfluss auf die Funktion von Apd1	101
4.1.3	Einfluss auf die Funktion der IPMI.....	103
4.1.4	Einfluss auf die Reifung der Hefe-IPMI in <i>E. coli</i>	109
4.2	Protein-Protein-Interaktionsstudien mit dem CIA-Targeting-Komplex	113
4.2.1	Hefe-Two-Hybrid-System	113
4.2.2	(Co)Immunpräzipitation	129
4.2.3	Nachbarschafts-abhängige Biotin-Identifizierung (BioID).....	135
4.2.4	Fluoreszenzanisotropie-Messungen	141
4.2.5	Chemische Quervernetzung mittels EDC	147
4.2.6	Abhängigkeit von der CIA-Maschinerie	149
4.3	Biotechnologische Anwendung der Tryptophan-Hypothese	157
4.3.1	Expression einer <i>E. coli</i> -Aconitase in <i>S. cerevisiae</i>	157
4.3.2	Expression der <i>E. coli</i> -IPMI in <i>S. cerevisiae</i>	160
5.	Diskussion und Ausblick.....	169
5.1	Ist L(D/E)W eine C-terminale Signalsequenz?	169
5.2	Interaktionen mit dem CIA-Targeting-Komplex	184
5.3	Biotechnologische Anwendung	208
6.	Literaturverzeichnis.....	217
7.	Anhang	249
7.1	Sequenzvergleich	249
7.2	Sekundärstrukturvorhersage des Leu1-C-Terminus.....	251

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	253
Lebenslauf	255
Eidesstattliche Erklärung	257

Zusammenfassung

Eisen-Schwefel (Fe/S)-Cluster sind als essentielle Cofaktoren zahlreicher Proteine in allen Domänen des Lebens vertreten. In eukaryotischen Zellen sind ca. 50 cytosolische und nucleäre Fe/S-Proteine an lebenswichtigen Prozessen, wie der DNA-Replikation und Reparatur, Transkription, tRNA-Modifizierung, Ribosomenassemblierung und metabolischen Stoffwechselwegen, beteiligt. Die Biosynthese und die Insertion der Fe/S-Cluster in Apoproteine erfolgt durch die cytosolische Eisen-Schwefel-Protein-Assemblierungsmaschinerie (CIA). Daran sind nach aktuellem Kenntnisstand elf Faktoren beteiligt. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind auf molekularer Ebene jedoch noch nicht aufgeklärt. So ist die Erkennung der Apoproteine durch den CIA-Targeting-Komplex bisher nahezu unerforscht. Molekulare Erkennungsfaktoren, eingebettet in der Primärsequenz der cytosolischen und nucleären Targetproteine, wurden bisher nicht beschrieben.

In bioinformatischen Analysen wurde das Tripeptid L(D/E)W am C-Terminus von cytosolischen und nucleären Fe/S-Proteinen identifiziert. Vor allem der Tryptophanrest ist auffällig hoch konserviert. Auf Grund des geringen Vorkommens dieser Aminosäure im eukaryotischen Proteom ist dieses frequente Auftreten von Interesse. Zunächst wurde der Einfluss des C-terminalen Tripeptides auf den Einbau des Fe/S-Clusters in die cytosolischen Apoproteine Leu1, Nar1 und Apd1 im Modellorganismus *S. cerevisiae* untersucht. C-terminal gekürzte bzw. mutierte Proteinvarianten zeigen in Enzymaktivitätsmessungen, ⁵⁵Fe-Einbau-Experimenten und Wachstumsuntersuchungen einen Defekt im Clustereinbau. Im Gegensatz dazu hat das Tryptophan bei der Reifung der Isopropylmalat-Isomerase (IPMI, Leu1) in *E. coli* bzw. bei der chemischen Rekonstitution gereinigter Proteine keine Bedeutung, sodass eine Verbindung des Peptidmotives zur CIA-Maschinerie postuliert wird. Im zweiten Teil wurden Interaktionsstudien zwischen Targetproteinen bzw. Peptiden und den Proteinen des CIA-Targeting-Komplexes Cia1, Cia2 und Met18 durchgeführt. Als *in vivo* Verfahren wurden das Y2H- bzw. Y3H-System sowie die BioID angewendet. Neben Coimmunpräzipitation wurden auch Peptid-basierte *in vitro* Methoden wie Fluoreszenzanisotropie-Messungen, ITC und chemische Quervernetzung analysiert. Durch Depletionsstudien konnte gezeigt werden, dass das C-terminale Tryptophan insbesondere bei niedriger Cia1-Konzentration essentiell ist. Im dritten Teil war es möglich, die *E. coli*-IPMI durch Fusion mit der C-terminalen Sequenz der Hefe-IPMI im Hefecytosol funktionell zu exprimieren. Dieser Funktionstransfer ist abhängig von der CIA-Maschinerie. Dies ist von Bedeutung für die biotechnologische Anwendung von prokaryotischen Fe/S-Proteinen im Cytosol eukaryotischer Organismen. Diese Arbeit liefert, durch die Identifizierung des C-terminalen Tryptophans als Signalsequenz cytosolischer und nucleärer Fe/S-Proteine, einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Erkennung der Targetproteine durch die CIA-Maschinerie.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Strukturen des [2Fe-2S]- und des [4Fe-4S]-Clustertyps.	1
Abbildung 1.2: Prinzip der Fe/S-Cluster-Assemblierung.....	4
Abbildung 1.3: CIA-Maschinerie.....	6
Abbildung 1.4: Die Leucinbiosynthese.	11
Abbildung 1.5: Vergleich des Aufbaus der IPMI verschiedener Reiche.....	13
Abbildung 1.6: Postulierte Clusterbindung der <i>S. cerevisiae</i> IPMI.....	16
Abbildung 1.7: Sequenzlogos von Fe/S-Proteinen mit C-terminalem Tryptophan.....	19
Abbildung 2.1: Grundlage des <i>GAL1-10</i> -Promotors.....	54
Abbildung 2.2: Grundlage des <i>TetO₇</i> -Promotors.	55
Abbildung 3.1: Pipettierschema Tüpfeltest.	72
Abbildung 3.2: Die Umsetzung von X-Gal durch die β -Galactosidase.	73
Abbildung 3.3: Vergleich der Koordination der Säulenmaterialien Ni-IDA und Ni-NTA.	76
Abbildung 3.4: Die Reaktion der Isopropylmalat-Isomerase.	84
Abbildung 3.5: Die Reaktion der Aconitase.	85
Abbildung 3.6: Die Reaktion der gekoppelten Aconitase-Aktivitätsmessung.	86
Abbildung 3.7: Vereinfachte Darstellung der SDH-basierten Cytochrom <i>c</i> -Reduktion.	87
Abbildung 3.8: Die Umsetzung von ONPG durch die β -Galactosidase.....	88
Abbildung 3.9: Prinzip der (Co)Immunpräzipitation.	91
Abbildung 3.10: Prinzip der Fluoreszenzanisotropie-Messung.	93
Abbildung 3.11: Quervernetzungsreaktion mittels EDC.	96
Abbildung 4.1: Tüpfeltest der C-terminalen Nar1-Mutanten	99
Abbildung 4.2: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der C-terminalen Nar1-Mutanten.....	100
Abbildung 4.3: Tüpfeltest und Wachstumsmessung der C-terminalen Apd1-Mutanten....	102
Abbildung 4.4: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der C-terminalen Leu1-Mutanten.....	105
Abbildung 4.5: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der Leu1-Cluster-Cystein-Mutanten	108
Abbildung 4.6: ⁵⁵ Fe-Einbau in C-terminal verkürzte Leu1-Mutanten	109
Abbildung 4.7: Mutanten des Leu1-C-Terminus im Vergleich zur <i>E. coli</i> -LeuD-Sequenz. .	110
Abbildung 4.8: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der verkürzten Leu1-Mutanten in <i>E. coli</i> ..	110
Abbildung 4.9: SDS-PAGE des Ni-IDA-gereinigten Leu1-Proteins.	111
Abbildung 4.10: Leu1-spez. Aktivitätsmessung gereinigter Proteine nach Rekonstitution	112
Abbildung 4.11: Prinzip des Hefe-Two-Hybrid-Systems.	114
Abbildung 4.12: Positivkontrolle des Y2H-Systems.	117
Abbildung 4.13: Y2H-Studie des Hefe-CIA-Targeting-Komplexes mit Targetproteinen....	118
Abbildung 4.14: Tüpfeltest zur Wachstumskontrolle der regulierten Tet-Y2H-Stämme ...	120
Abbildung 4.15: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der regulierten Tet-Y2H-Stämme.....	121
Abbildung 4.16: Positivkontrolle des Y2H-Systems in Stamm Y187_ <i>TetO₇</i> _NAR1.	122
Abbildung 4.17: Y2H-Studie unter Depletion von <i>NAR1</i>	123

Abbildung 4.18: Positivkontrolle des Y2H-Systems mit humanen Proteinen.	125
Abbildung 4.19: Y2H-Studie des CIA-Targeting-Komplexes mit humanen Proteinen	126
Abbildung 4.20: Prinzip des Hefe-Three-Hybrid-Systems.....	127
Abbildung 4.21: Y3H-Studie des CIA-Targeting-Komplexes mit Targetproteinen	128
Abbildung 4.22: Kontrolle der CIA-Targeting-Komplex-Faktoren-spez. Antikörperseren.	130
Abbildung 4.23: CoIP der C-terminalen Leu1-Mutanten.....	131
Abbildung 4.24: CoIP der Leu1-Clustermutante	132
Abbildung 4.25: CoIP nach Überexpression der CIA-Targeting-Komplex-Faktoren	134
Abbildung 4.26: Prinzip der BioID.	135
Abbildung 4.27: BioID mit fusioniertem Leu1-C-Terminus	138
Abbildung 4.28: BioID mit fusioniertem Cia1	140
Abbildung 4.29: Tüpfeltest des Biotin-Ligase-Cia1-Fusionskonstruktes	141
Abbildung 4.30: SDS-Page des gereinigten CIAO1- bzw. FAM96B-Proteins.....	143
Abbildung 4.31: SDS-PAGE der Reinigungsversuche von MMS19.	144
Abbildung 4.32: Fluoreszenzanisotropie-Messungen der Protein-Peptid-Bindestudie	146
Abbildung 4.33: Chemische Quervernetzung von Cia1 mit FITC-markierten Peptiden	148
Abbildung 4.34: Leu1-spez. Aktivitätsmessung des Wildtypstammes	149
Abbildung 4.35: Leu1-spez. Aktivitätsmessung bei regulierter Cia1-Konzentration	151
Abbildung 4.36: Leu1-spez. Aktivitätsmessung in regulierbaren CIA-Stämmen.....	154
Abbildung 4.37: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der Cia1-Mutanten	156
Abbildung 4.38: Tüpfeltest der AcnA aus <i>E. coli</i>	159
Abbildung 4.39: Aconitase-spez. Aktivitätsmessung der <i>E. coli</i> -AcnA in Hefezelleextrakt..	160
Abbildung 4.40: Strukturmodellierung der IPMI.	161
Abbildung 4.41: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der <i>E. coli</i> -IPMI in Hefezelleextrakt.....	163
Abbildung 4.42: Leu1- und SDH-spez. Aktivitätsmessung isolierter Mitochondrien	166
Abbildung 4.43: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der <i>E. coli</i> -IPMI bei CIA-Depletion.....	167

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Komponenten der CIA-Maschinerie.....	6
Tabelle 1.2: Cytosolische und nucleäre Fe/S-Proteine im Menschen und in <i>S. cerevisiae</i> . .	17
Tabelle 2.1: Geräte	27
Tabelle 2.2: Softwares	28
Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 2.4: Chemikalien und Reagenzien	29
Tabelle 2.5: Enzyme	32
Tabelle 2.6: Antikörper und Konjugate	33
Tabelle 2.7: Größenstandards	33
Tabelle 2.8: Säulenmaterialien	33
Tabelle 2.9: Peptide.....	34
Tabelle 2.10: Komplettsysteme	34
Tabelle 2.11: Oligonucleotide zur klassischen Klonierung.....	35
Tabelle 2.12: Oligonucleotide zur Klonierung mittels homologer Rekombination.....	37
Tabelle 2.13: Oligonucleotide zur Klonierung mittels NEBuilder	38
Tabelle 2.14: Oligonucleotide zur Klonierung mittels Overlap Extension	39
Tabelle 2.15: Oligonucleotide zur Mutagenese	39
Tabelle 2.16: Oligonucleotide für die Sequenzierung von Plasmiden.....	41
Tabelle 2.17: Oligonucleotide zur Erzeugung und Überprüfung von Hefestämmen	43
Tabelle 2.18: Synthetische Gene	44
Tabelle 2.19: Ausgangsplasmide.....	44
Tabelle 2.20: Plasmide zur Expression in <i>S. cerevisiae</i>	46
Tabelle 2.21: Plasmide zur Expression in <i>E. coli</i>	50
Tabelle 2.22: <i>E. coli</i> -Stämme	51
Tabelle 2.23: Hefestämme.....	52
Tabelle 3.1: Pipettierschema PCR	60
Tabelle 3.2: PCR-Programm zur Amplifikation.....	60
Tabelle 3.3: Pipettierschema gezielte Mutagenese	65
Tabelle 3.4: PCR-Programm gezielte Mutagenese	65
Tabelle 3.5: Pipettierschema Kolonie-PCR	66
Tabelle 3.6: PCR-Programm Kolonie-PCR	66
Tabelle 3.7: Pipettierschema Micro-Biuret-Methode	79
Tabelle 3.8: Pipettierschema Bradford-Methode	80
Tabelle 3.9: Zusammensetzung des Trenn- & Sammelgels	81
Tabelle 4.1: Konstruierte Mutanten des C-Terminus des Hefe-Leu1-Proteins	104
Tabelle 5.1: Bekannte eukaryotische C-terminale SLiMs.....	173
Tabelle 5.2: PPI des Targeting-Komplexes, identifiziert in High-Throughput-Studien.....	189

Tabelle 5.3: Bekannte PPI zwischen CIAO1, FAM96B & MMS19 mit Fe/S-Proteinen 191
Tabelle 5.4: Probleme durch Fe/S-Enzyme bei metabolischem Engineering 209

Abkürzungsverzeichnis

∅	Ohne Insert
Ac	Acetat
AcnA	Aconitase A aus <i>E. coli</i>
Aco1	Aconitase 1 aus <i>S. cerevisiae</i>
AD	Aktivator-domäne
<i>ADH1</i>	Alkohol-Dehydrogenase, Promotor
Amp	Ampicillin
Apd1	<i>Actin patches distal</i> , Fe/S-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCAA	<i>Branched-chain amino acid</i>
BD	Bindedomäne
BioID	Nachbarschafts-abhängige Biotin-Identifizierung
BirA*	Promiskuitive Biotin-Ligase
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cam	Chloramphenicol
CIA	<i>Cytosolic iron sulfur protein assembly</i>
Cia1	<i>Cytosolic iron sulfur protein assembly 1</i> , Protein des Targeting-Komplexes
Cia2	<i>Cytosolic iron sulfur protein assembly 2</i> , Protein des Targeting-Komplexes
Ciao1	Cia1-Homolog aus <i>H. sapiens</i>
Cfd1	<i>Cytosolic Fe/S cluster deficient</i> , Gerüstprotein
Cmo1	Cholin-Monooxygenase, Fe/S-Protein
DEG	Degradierungs-Motiv
DHAD	Dihydroxysäure-Dehydratase, Fe/S-Protein
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DOC	Natriumdeoxycholat
DOG	Docking-Motiv
Doxy	Doxycyclin
Dre2	<i>Derepressed for ribosomal protein S14 expression</i> , Elektronentransfer
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescent</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Abkürzungsverzeichnis

EDA	Entner-Doudoroff-Aldolase
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid
EDD	Entner-Doudoroff-Dehydratase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELM	Eukaryotisches lineares Motiv
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FAM96B	<i>family with sequence similarity 96 member B</i> , Cia2-Homolog aus <i>H. sapiens</i>
FBA	Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase, Promotor
Fe/S	Eisen-Schwefel
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fn	<i>flanking N-terminal amino acids</i>
Gal	Galactose
Gallo	2,3,4-Trihydroxybenzophenon
Glu	Glucose
GOI	<i>Gene of interest</i>
GPAT	Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase, Fe/S-Protein
HEAT	Akronym aus: Huntingtin, EF3, PP2A, TOR1
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
ICDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IDA	Iminodiessigsäure
IP	Immunpräzipitation
IPMI	Isopropylmalat-Isomerase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRE	<i>Iron regulatory element</i>
IRP	<i>Iron regulatory protein</i>
ISC	<i>Iron sulfur cluster</i>
ITC	<i>Isothermal titration calorimetry</i>
Kan	Kanamycin
K _D	Dissoziationskonstante
Kpi	Kaliumphosphat-Puffer
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LDH	Lactat-Dehydrogenase
Leu1	Leucinbiosynthese, Isopropylmalat-Isomerase aus <i>S. cerevisiae</i>
LEU2	Isopropylmalat-Dehydrogenase, Markergen
LeuC	Große Untereinheit der Isopropylmalat-Isomerase aus <i>E. coli</i>
LeuD	Kleine Untereinheit der Isopropylmalat-Isomerase aus <i>E. coli</i>
LEW	Lyse-Equilibrierung-Waschpuffer
LIG	Ligand-Motiv

Lto1	<i>Required for biogenesis of the large ribosomal subunit and initiation of translation in oxygen</i> , Adapterprotein
LYRM	LYR-Motiv
Mak16	<i>Maintenance of killer 16</i> , Fe/S-Protein
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MET	Methionin
Met18	<i>Methionine requiring 18</i> , Protein des Targeting-Komplexes
<i>MET25</i>	O-Acetylhomoserin-/ O-acetylserin-Sulfhydrylase, Promotor
Mia40	Mitochondrialer Intermembranraum Import und Assemblierung
Mitos	Mitochondrien
MMS19	Methylmethansulfonat-sensitiv 19, Met18-Homolog aus <i>H. sapiens</i>
MOD	Modifizierungs-Motiv
N-Terminus	Amino-Terminus
NADP	Nicotinamidadeninucleotidphosphat
Nar1	<i>Nuclear prelamina A recognition factor</i> , Bindeglied der CIA-Maschinerie
<i>Nat</i>	Gen, welches der Zelle eine Resistenz gegenüber Nourseothricin verleiht
Nbp35	<i>Nucleotide-binding protein of 35 kDa</i> , Gerüstprotein
NEB	New England Biolabs Inc.
Nfs1	<i>NiFS-like</i> , Cystein-Desulfurase
NIF	<i>Nitrogen fixation</i>
Nir1	Nitrit-Reduktasen, Fe/S-Protein
NP	Natürlicher Promotor
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PD	<i>Pulldown</i>
PDB	Protein-Datenbank
PDZ	Akronym aus: PSD95, Dlg1, Zo-1
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POL δ	Polymerase δ , Fe/S-Protein
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PTM	Posttranslationale Modifizierung
PTS	Peroxisomales Targeting-Signal
Rev3	Katalytische Untereinheit der DNA-Polymerase ζ , Fe/S-Protein
Rli1	RNase L Inhibitor, Fe/S-Protein
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur

Abkürzungsverzeichnis

SAM	Radikal-S-Adenosylmethionin
SC	<i>Synthetic complete</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLiM	<i>Short linear motif</i>
SOCT	<i>Statistically over-represented C-terminal tripeptide</i>
SOB	<i>Super optimal broth</i>
SOD1	Superoxid-Dismutase
sP	Starker Promotor
SUF	<i>Sulfur formation</i>
Tah18	<i>Top1T722A mutant hypersensitive</i> , Elektronentransfer
TAP	<i>Tandem affinity purification</i>
TCA	Trichloressigsäure
<i>TDH3</i>	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Promotor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TetR	Tetracyclinrepressor
TF	Transkriptionsfaktor
TFB	<i>Transformation buffer</i>
TPR	<i>Tetratricopeptid repeat</i>
TRG	Transport-Motiv
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>TRP1</i>	Phosphoribosylanthranilat-Isomerase, Markergen
tTA	Tetracyclinabhängiger Transaktivator
UAS	<i>Upstream activation sequence</i>
<i>URA3</i>	Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase, Markergen
verd	Verdünnt
Viperin	<i>virus-inhibitory protein, ER-associated, interferon-inducible</i> , Fe/S-Protein
v/v	<i>Volume per volume</i>
WD40	Sequenzmotiv aus ca. 40 AS mit einem Tryptophan-Aspartat-Dipeptid
wP	<i>Weak promotor</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>Weight per volume</i>
X- α -Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- α -D-galactopyranosid
Y2H	Yeast Two-Hybrid System
Y3H	Yeast Three-Hybrid System
Yae1	Adapterprotein
ZE	Zellextrakt

1. Einleitung

1.1 Hefe als Modellorganismus

In der vorliegenden Arbeit wird mit *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), im Folgenden auch Hefe genannt, als Modellorganismus gearbeitet. Hefe stellt den „Pionier Organismus“ bei der Erforschung eukaryotischer Zellen dar (Botstein & Fink, 2011). Auf Grund des schnellen Wachstums auf chemisch definierbaren Medien, der praktischen günstigen Handhabung und der einfachen genetischen Manipulierbarkeit ist es der Organismus der Wahl (Feldmann, 2012). Die vollständig aufgeklärte Sequenz der ca. 6340 Gene auf 16 Chromosomen bildet die Grundlage für Vergleiche und Rückschlüsse auf das humane Genom (Goffeau *et al.*, 1996).

1.2 Eisen-Schwefel (Fe/S)-Proteine

1.2.1 Eisen-Schwefel-Cluster

Die enzymatische Wirkung von Proteinen ist häufig abhängig von Cofaktoren. Unter diesen stellen Eisen-Schwefel (Fe/S)-Cluster die wohl älteste und vielseitigste Klasse dar (Lill *et al.*, 2015a; Wächtershauser, 2007). Entdeckt wurden sie in den 1960er Jahren bei der Aufreinigung von Elektronen-übertragenden Proteinen und Enzymen mit charakteristischem ESR-Signal einer Nicht-Häm-Eisen-Spezies (Johnson *et al.*, 2005; Beinert & Lee, 1961). Wenig später konnte Schwefel als weiterer Bestandteil dieses neu entdeckten Cofaktortyps identifiziert werden (King, 1964).

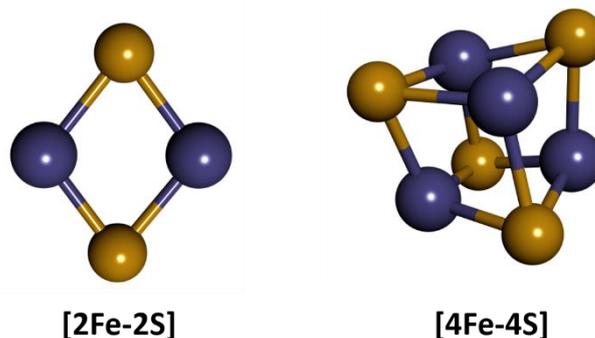


Abbildung 1.1: Strukturen des [2Fe-2S]- und des [4Fe-4S]-Clustertyps. Die Darstellung entspricht einem Kugel-Stab-Modell, wobei die Eisenkationen lilafarben und die Sulfidationen gelb-gold eingefärbt sind.

Die einfachsten und am häufigsten vorkommenden Fe/S-Cluster sind der rhombische [2Fe-2S]- und der kubische [4Fe-4S]-Clustertyp (siehe Abbildung 1.1) (Beinert *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2005). Hierbei liegt $\text{Fe}^{2+/3+}$ tetraedrisch von Cysteinat und säurelabilem

Schwefel (S^{2-}) koordiniert vor (Rees & Howard, 2003). Die anorganischen Cluster sind in der Regel über die Thiolgruppe der Cysteinreste an das Protein gebunden, jedoch treten auch Histidin, selten Serin, Glutamat, Aspartat oder Arginin bzw. CN^- oder CO als Liganden auf (Meyer, 2008; Bak & Elliott, 2014; Lill, 2009).

1.2.2 Funktionen von Fe/S-Proteinen

Fe/S-Proteine partizipieren bei einer Vielzahl essentieller Prozesse in verschiedenen Kompartimenten einer eukaryotischen Zelle (Paul & Lill, 2015). In den Mitochondrien wirken sie bei der Atmungskette, Aminosäuren- oder Cofaktoren-Synthese mit. Im Nucleus sind sie bei der DNA-Replikation oder -Reparatur, im Cytosol bei der Eisenregulation, Translation oder am Nucleotidmetabolismus beteiligt.

Die wohl wichtigste Funktion von Fe/S-Proteinen stellt der Transport von Elektronen dar. Dies beruht auf der Fähigkeit der Eisenionen, zwischen den Oxidationsstufen +II und +III zu wechseln (Beinert *et al.*, 1997). Zu den bekanntesten Vertretern mit solchen redoxaktiven Gruppen gehören die Komplexe I, II und III der bakteriellen und mitochondrialen Atmungskette, das Photosystem I und Ferredoxine (Lill *et al.*, 2006).

Eine weitere Funktion von Fe/S-Clustern ist die direkte Beteiligung an einer enzymatischen Reaktion. Hierzu zählen wichtige Enzyme des Stoffwechsels und der Aminosäurenbiosynthese. Klassische Beispiele hierfür sind die Aconitase bzw. die Isopropylmalat-Isomerase (IPMI). Ein nicht an das Proteingerüst koordiniertes Eisenion des [4Fe-4S]-Clusters fungiert hierbei als Lewis-Säure und katalysiert unter Abspaltung und direkter Wiederanlagerung von H_2O die Isomerisierung des Substrates Citrat bzw. 2-Isopropylmalat zu Isocitrat bzw. 3-Isopropylmalat (Beinert *et al.*, 1996). Weitere Vertreter sind die Fumarase, 6-Phosphogluconat-Dehydratase und andere Dihydroxysäure-Dehydratasen (Flint & Allen, 1996).

Auch zu erwähnen sind die Radikal-S-Adenosylmethionin (SAM)-Enzyme, deren [4Fe-4S]-Cluster ein 5'-Deoxyadenosylradikal erzeugt, welches imstande ist, schwer zu spaltende Bindungen zu aktivieren, sodass das entsprechende Substrat modifiziert werden kann (Sofia *et al.*, 2001; Broderick *et al.*, 2014). Als Beispiel dient zum einen die Biotin-Synthase, welche über zwei Fe/S-Cluster verfügt, wobei einer möglicherweise als Schwefeldonor fungiert, was eine weitere Funktion von Fe/S-Proteinen darstellt. Zum anderen ist Viperin (*virus-inhibitory protein, ER-associated, interferon-inducible*) ein antiviral wirkendes Protein, welches durch einen SAM-abhängigen Mechanismus die virale RNA-Replikation inhibieren kann (Upadhyay *et al.*, 2014; Mattijssen & Pruijn, 2012). Im Menschen sind acht SAM-Enzyme bekannt (Landgraf *et al.*, 2016). Neben Viperin sind dies MOCS1, ein Faktor der Molybdän-Cofaktorbiosynthese, die Lipoyl-Synthase LIAS, RSAD1, ein Protein unbekannter Funktion und vier Enzyme der tRNA-Modifikation: CDK5RAP1, CDKAL1, TYW1 und ELP3. Dysfunktionen dieser Enzyme führen zu Krankheiten (Landgraf *et al.*, 2016).

Des Weiteren gibt es Fe/S-Proteine mit regulatorischer Funktion. So können sie als Transkriptionsfaktor (TF) fungieren, indem sie mit Hilfe ihres Fe/S-Cofaktors intra- und extrazelluläre Bedingungen wahrnehmen und darauf entsprechend Gene regulieren. Beispielsweise kann IRP1 (*iron regulatory protein 1*) posttranskriptional die Eisen-Homöostase beeinflussen. Ist in der Zelle Eisen in ausreichender Menge vorhanden, ist das Protein mit einem [4Fe-4S]-Cluster beladen und fungiert als cytosolische Aconitase (Tong & Rouault, 2007). Unter eisenarmen Bedingungen verliert das Protein seinen Cluster (oder bleibt in der Apo-Form) und bindet an sogenannte IREs (*iron regulatory elements*), Haarnadelstrukturen verschiedener mRNAs von Proteinen, welche für Eisenaufnahme, Transport und Lagerung verantwortlich sind. Durch IRP1-IRE-Bindung wird die mRNA des Transferrinrezeptors stabilisiert und somit die Eisenaufnahme verstärkt, sowie durch Blockade der Translation der Ferritin-mRNA die Eisenspeicherung herunterreguliert (Wallander *et al.*, 2006; Rouault, 2006).

Bei manchen Fe/S-Proteinen ist die Funktion des Clusters nicht direkt durch die Funktion des Proteins ersichtlich. Er könnte zum Beispiel die Stabilität und Ausbildung der Struktur unterstützen. So ist es beispielsweise bei der Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase (GPAT) (Makaroff *et al.*, 1986). Dieses Enzym katalysiert den ersten Schritt der *de novo* Synthese von Purin-Nucleotiden, die gekoppelte Reaktion von 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat und Glutamin zu 5-Phosphoribosyl-1-amin und Glutaminsäure (Smith, 1998). Die zwei Halbreaktionen finden hierbei in zwei verschiedenen katalytischen Domänen statt. Ein [4Fe-4S]-Cluster ist zwischen der Glutaminase- und der Phosphoribosyltransferase-Domäne lokalisiert (Smith *et al.*, 1994). Ein Verlust des Clusters führt zu Denaturierung und anschließendem Abbau des Proteins in *Bacillus subtilis* (Grandoni *et al.*, 1989). Dies wird möglicherweise als Regulation genutzt, indem der Cluster als O₂-Sensor dient.

Auch bei Fe/S-Proteinen, welche mit Nucleinsäuren interagieren, wie Helicase, Primase oder Glycosylase, wird eine strukturgebende Funktion angenommen (White & Dillingham, 2012). Die replikative DNA-Polymerase δ enthält eine cysteinreiche Region am Carboxy-Terminus (C-Terminus) ihrer katalytischen Untereinheit Pol3 (Prindle & Loeb, 2012). Das CysB-Motiv koordiniert einen [4Fe-4S]-Cluster, welcher für die Komplexstabilität essentiell ist (Netz *et al.*, 2011). In Abwesenheit dieses Clusters ist die C-terminale Domäne derart destabilisiert, dass keine essentielle Interaktion mit den Untereinheiten Pol31 und Pol32 möglich ist.

Die Relevanz von Fe/S-Proteinen wird auch dadurch deutlich, dass immer mehr Krankheiten aufgeklärt werden, die mit diesen bzw. deren Biosynthese in Verbindung stehen, wie Friedreich-Ataxie, Myopathie und XLSA/A (X-linked sideroblastische Anämie und Ataxie) (Beilschmidt & Puccio, 2014; Sheftel *et al.*, 2010; Rouault, 2012).

1.3 Biogenese von Fe/S-Proteinen

1.3.1 Einführung in die Biogenese von Fe/S-Proteinen

Auf Grund der Möglichkeit Fe/S-Proteine unter anaeroben Bedingungen mit reduziertem Eisen (Fe^{2+}) und Sulfidionen rekonstituieren zu können, glaubte man lange, die Assemblierung von Fe/S-Clustern *in vivo* erfolge spontan (Netz *et al.*, 2014; Malkin & Rabinowitz, 1966). Ende der 1990er Jahre jedoch setzte sich die Erkenntnis durch, auch auf Grund der Toxizität hoher Konzentrationen an Eisen- und Sulfidionen (Lill & Mühlenhoff, 2006; Sheftel *et al.*, 2010), dass der Einbau der Cofaktoren katalysiert wird (Lill, 2009). NifS von *Azotobacter vinelandii* war die erste entdeckte Komponente einer Fe/S-Cluster-Assemblierungsmaschinerie (Zheng *et al.*, 1993). In Anbetracht der Einfachheit der Cluster ist deren Biogenese sehr komplex. Sie stellt einen essentiellen Prozess in allen Formen des Lebens dar (Sharma *et al.*, 2010). In Prokaryoten sind drei verschiedene Assemblierungswege bekannt. Das ISC (*iron sulfur cluster*)-System, die SUF (*sulfur formation*)-Maschinerie, welche unter Stressbedingungen zum Tragen kommt und das NIF (*nitrogen fixation*)-System, welches spezifisch der Assemblierung von Nitrogenasen dient (Roche *et al.*, 2013; Ayala-Castro *et al.*, 2008; Dos Santos *et al.*, 2004). Im Zuge der Endosymbiose erhielten Mitochondrien die ISC-Maschinerie, während Homologe des SUF-Systems in Chloroplasten zu finden sind (Stehling *et al.*, 2014; Roche *et al.*, 2013; Balk & Pilon, 2011). Eukaryoten verfügen darüber hinaus über die CIA (*cytosolic iron sulfur protein assembly*)-Maschinerie zum Einbau von Fe/S-Cluster in cytosolische und nucleäre Proteine (Paul & Lill, 2015). Die Komponenten der ISC- und CIA-Maschinerie sind strukturell nicht verwandt, die Biogenese verläuft jedoch nach ähnlichen Prinzipien (siehe Abbildung 1.2) (Lill, 2009).

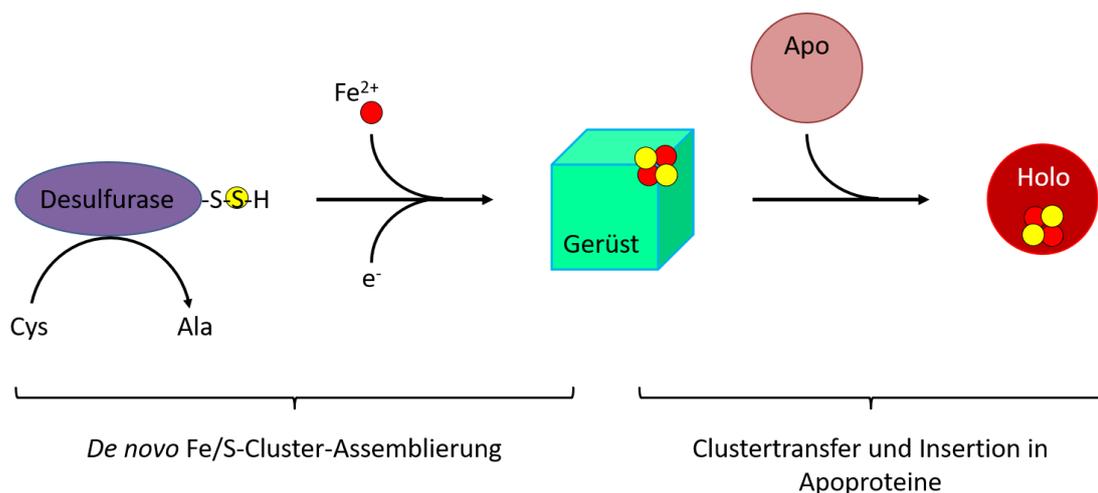


Abbildung 1.2: Prinzip der Fe/S-Cluster-Assemblierung. Allen bekannten Assemblierungswegen von Fe/S-Clustern liegt ein einheitliches Prinzip zu Grunde. Dieses kann in zwei Stufen unterteilt werden. Zunächst wird unter Beteiligung einer Desulfurase zur Bereitstellung eines Persulfides als Schwefeldonor, Redoxäquivalenten (e^-) zur Reduktion von S^0 zu S^{2-} und eines Eisendonors (Fe^{2+}), ein Fe/S-Cluster *de novo* auf einem Gerüstprotein(komplex) assembliert. Im zweiten Schritt wird der Cluster mittels Transferproteinen vom Gerüstprotein zu den entsprechenden Apoproteinen gebracht und in diese inseriert. Quelle: eigene Darstellung, nach (Lill, 2009).

Generell sind die Assemblierungswege in zwei Stufen unterteilt: Zuerst erfolgt die *de novo* Assemblierung des Clusters auf einem Gerüstprotein. Hierzu werden eine Cystein-Desulfurase zur Bereitstellung eines Persulfides, ein Eisendonator und Redoxäquivalente benötigt. Der zweite Schritt besteht aus dem Transfer des Clusters und dem Einbau in Targetproteine (Sharma *et al.*, 2010; Lill *et al.*, 2006).

1.3.2 Die Biogenese cytosolischer Fe/S-Proteine

An der Synthese von Fe/S-Cofaktoren und deren Einbau in cytosolische und nucleäre Apoproteine sind eine Vielzahl von Komponenten beteiligt. Eingeleitet wird sie durch die ISC-Maschinerie, welche für alle zellulären eukaryotischen Proteine wichtig ist (Lill *et al.*, 2015b; Kispal *et al.*, 1999). An der mitochondrialen Maschinerie sind 17 Proteine beteiligt. Sie kann in drei Hauptschritte unterteilt werden (Stehling *et al.*, 2014). Im ersten Schritt wird ein [2Fe-2S]-Cluster *de novo* auf dem Gerüstprotein Isu1 (*IscU homolog*) synthetisiert. Essentiell ist hierbei das Protein Nfs1 (*NiFS-like*), eine Cystein-Desulfurase (Mühlenhoff *et al.*, 2004; Biederbick *et al.*, 2006). Dieses Pyridoxalphosphat-abhängige Enzym generiert ein Persulfidintermediat bei der Umwandlung von L-Cystein zu L-Alanin und dient somit als Schwefeldonor (Zheng *et al.*, 1994). Stabilisiert wird dieses Protein durch Komplexbildung mit Isd11 (*iron-sulfur protein biogenesis, desulfurase-interacting protein*). Weiterhin sind das Ferredoxin Yah1 (*yeast adrenodoxin homolog*) und die Ferredoxin-Reduktase Arh1 (*adrenodoxin reductase homolog*) für den Elektronentransport, sowie das Frataxin Yfh1 (*yeast frataxin homolog*) an der Assemblierung beteiligt (Stehling *et al.*, 2014). Im zweiten Schritt wird durch Hilfe des Chaperonsystems, bestehend aus dem Hsp70-Protein Ssq1 (*stress-seventy subfamily q*), dem Cochaperon Jac1 (*j-type accessory chaperone*) und dem Austauschfaktor Mge1 (*mitochondrial GrpE*), der Cluster von Isu1 freigesetzt und auf das Monothiol Grx5 (Glutaredoxin) übertragen. Dieses übernimmt die Funktion eines transienten Cluster-Carriers, welcher den Cluster an [2Fe-2S]-Apoproteine oder ISC-Faktoren des dritten Schrittes übergibt. Dieser beinhaltet die Assemblierung von [4Fe-4S]-Cofaktoren unter Beteiligung der Proteine Isa1 (*iron sulfur assembly*), Isa2 und Iba57 (*iron-sulfur cluster assembly factor for biotin synthase and aconitase-like mitochondrial proteins*) (Stehling *et al.*, 2014). Darüber hinaus sind weiter spezialisierte Targeting-Faktoren für die Reifung bestimmter Fe/S-Proteine bekannt.

Die beschriebene Bildung des mitochondrialen [2Fe-2S]-Clusters stellt das Kernstück der ISC-Maschinerie dar. Nur diese zwei Schritte sind für die Biogenese cytosolischer und nucleärer Fe/S-Proteine wichtig. Im Anschluss wird eine noch immer unbekannt schwefelhaltige Spezies X-S aus den Mitochondrien ins Cytosol transportiert (Lill *et al.*, 2015b). Der Export durch die innere Mitochondrienmembran wird durch den ABC-Transporter Atm1 (*ABC Transporter, mitochondrial*) vermittelt (Kispal *et al.*, 1999). Daneben wird Glutathion für den Exportprozess benötigt (Netz *et al.*, 2014).

Bis heute sind elf Mitglieder der CIA-Maschinerie bekannt. Die acht „Hauptproteine“ (siehe Abbildung 1.3) sind evolutionär von einzelligen Eukaryoten bis zum Menschen konserviert und bereits im spätesten gemeinsamen eukaryotischen Vorfahr präsent (Tsaousis *et al.*, 2014; Lukeš & Basu, 2015). Die Proteine Nbp35, Nar1, Cia1 und Cia2 sind in nahezu allen bekannten phylogenetischen Linien vorhanden, wohingegen andere (Cfd1 oder Met18) nur rudimentär auftreten. Da im Rahmen dieser Arbeit mit dem Modellorganismus *S. cerevisiae* gearbeitet wird, wird die entsprechende Nomenklatur der Hefegene verwendet. Tabelle 1.1 zeigt die beteiligten Proteine jeweils mit Hefe- und humaner Bezeichnung, sowie deren Funktion innerhalb der Maschinerie.

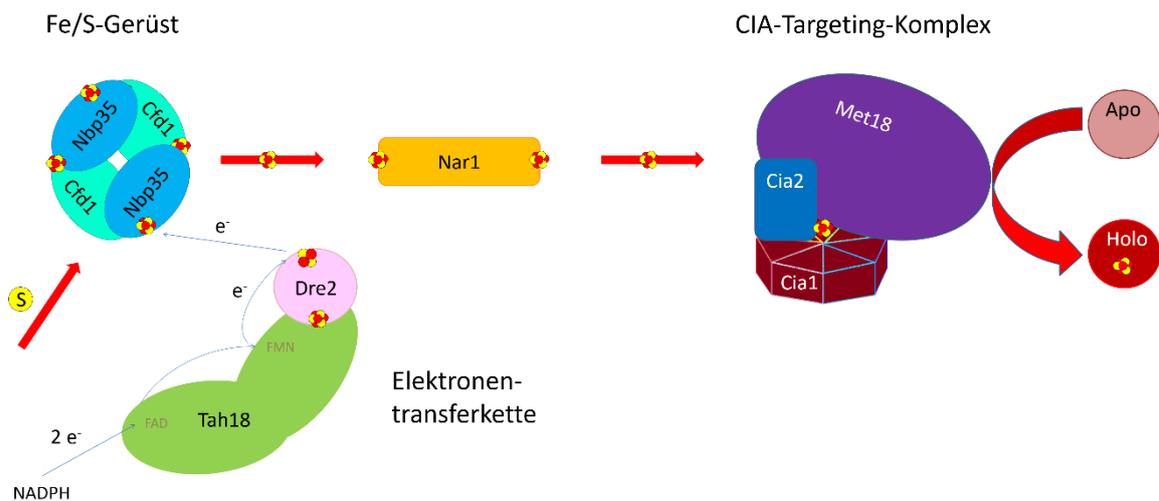


Abbildung 1.3: CIA-Maschinerie. Die *de novo* Assemblierung des Fe/S-Clusters erfolgt auf dem tetrameren Gerüstkomplex aus Cfd1 und Nbp35. Eine schwefelhaltige Spezies X-S wird aus den Mitochondrien ins Cytosol transportiert. Redoxäquivalente werden über eine Elektronentransferkette ausgehend von NADPH über Tah18 und Dre2 zur Verfügung gestellt. Der labil gebundene, assemblierte Cluster wird im Folgenden von Nar1 zum CIA-Targeting-Komplex transportiert. Dieser setzt sich aus den Proteinen Cia1, Cia2 und Met18 zusammen und vermittelt die Insertion des Clusters in Apoproteine.

Tabelle 1.1: Komponenten der CIA-Maschinerie.

* Im Menschen gibt es ein zweites Cia2-Homolog: FAM96A, welches eine Funktion in der Eisenhomöostase übernimmt.

Hefe	Mensch	Funktion	Funktionelle Gruppe bzw. Cofaktoren
Cfd1	CFD1	Gerüstprotein	Verbrückender [4Fe-4S]-Cluster
Nbp35	NBP35	Gerüstprotein	[4Fe-4S]- & Verbrückender [4Fe-4S]-Cluster
Dre2	CIAPIN1	Elektronentransfer	[2Fe-2S]- & [4Fe-4S]-Cluster
Tah18	NDOR1	Elektronentransfer	FMN, FAD, NADPH
Nar1	IOP1	Bindeglied	2 x [4Fe-4S]-Cluster
Cia1	CIAO1	Targeting-Komplex	WD40-Repeats
Cia2*	FAM96B	Targeting-Komplex	DUF59, hyperreaktives Cys
Met18	MMS19	Targeting-Komplex	HEAT-Repeats
Lto1	ORAOV1	Adapter, Rli1-spez.	-
Yae1	YAE1D1	Adapter, Rli1-spez.	-

Die Charakterisierung der P-loop ATPase Cfd1 (*cytosolic Fe/S cluster deficient*) lieferte den ersten Beleg für das Vorhandensein einer cytosolischen Fe/S-Cluster-Assemblierungsmaschinerie (Roy *et al.*, 2003). Die Disruption des essentiellen Genes *CFD1* in Hefe führte zu einer Verminderung der spezifischen Aktivität des cytosolischen Proteins IPMI um 90 %, wohingegen die Aktivitäten mitochondrialer Proteine unverändert blieben. Der gleiche Effekt konnte für Nbp35 (*nucleotide-binding protein of 35 kDa*), ebenfalls eine P-loop NTPase, gezeigt werden (Hausmann *et al.*, 2005), sodass beide Proteine notwendig sind, um aktive cytosolische Fe/S-Proteine zu erhalten. Die Bindung bzw. Hydrolyse von Nucleotiden scheint wichtig für diese Aufgabe zu sein, die genaue Funktion wird jedoch noch diskutiert (Netz *et al.*, 2012; Camire *et al.*, 2015; Stehling *et al.*, 2018). Nbp35 und Cfd1 bilden *in vivo* einen heterotetrameren Komplex. Dieser trägt zwei verschieden gebundene Paare von Fe/S-Clustern (Netz *et al.*, 2007). Zum einen trägt Nbp35 einen Ferredoxin-ähnlich gebundenen [4Fe-4S]-Cluster stabil an seinem Amino (N)-Terminus. Zum anderen zeigen biochemische Studien und die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur von Cfd1 einen [4Fe-4S]-Cluster, welcher die C-terminalen Seiten der Komplexpartner verbrückt (Netz *et al.*, 2012; Stehling *et al.*, 2018). Da dieser Cluster nur transient gebunden ist, kann er leicht an Apoproteine abgegeben werden. So wurde gezeigt, dass die Übertragung auf IPMI *in vitro* schnell und stöchiometrisch erfolgt (Netz *et al.*, 2007). Des Weiteren legen Kinetikstudien nahe, dass die Interaktion mit Cfd1 die Labilität des C-terminal gebundenen Clusters auf Nbp35 verstärkt und damit den Transfer begünstigt (Pallesen *et al.*, 2013). Somit stellt die Assemblierung eines labil gebundenen Fe/S-Clusters auf dem heterotetrameren Gerüstkomplex den ersten Schritt der cytosolischen Fe/S-Clusterbiogenese dar.

Für diese Assemblierung werden Elektronen benötigt, welche von NADPH über Tah18 (*top1T722A mutant hypersensitive*) und Dre2 (*derepressed for ribosomal protein S14 expression*) transportiert werden (Netz *et al.*, 2010). Tah18 ist eine Diflavin-Reduktase mit zwei Domänen zur Bindung von FMN und FAD. Dre2 verfügt über eine SAM-Methyltransferase-ähnliche N-terminale Domäne und eine C-terminale Domäne mit einem [2Fe-2S]- und einem [4Fe-4S]-Cluster (Zhang *et al.*, 2008; Netz *et al.*, 2016). UV/Vis- und ESR-spektroskopische Untersuchungen zeigen einen Elektronentransfer von NADPH über die FAD- und FMN-Domäne von Tah18 auf den [2Fe-2S]-Cluster des Dre2 (Netz *et al.*, 2010). Die genaue Verwendung der Elektronen innerhalb der CIA-Maschinerie ist jedoch noch ungeklärt.

Der zweite Schritt der cytosolischen Fe/S-Proteinbiogenese beinhaltet die Übertragung und den Einbau des assemblierten Fe/S-Clusters in dafür vorgesehene Apoproteine durch den CIA-Targeting-Komplex. Die Verknüpfung des ersten mit dem zweiten Schritt der Biogenese wird von Nar1 übernommen. Nar1 (*nuclear prelamin A recognition factor*) weist Sequenzhomologie zu bakteriellen [Fe-Fe]-Hydrogenasen auf, verfügt jedoch nicht über deren Aktivität (Barton & Worman, 1999; Nicolet *et al.*, 2002). N-terminal besitzt das Protein eine Ferredoxin-ähnliche Domäne mit vier konservierten Cysteinen. Die C-terminale Domäne entspricht dem aktiven Zentrum der [Fe-Fe]-Hydrogenasen, ebenfalls mit vier konservierten

Cysteinen (Balk *et al.*, 2004). Beide Cys-Motive koordinieren jeweils einen [4Fe-4S]-Cluster, wobei der C-terminale Cluster stabil gebunden, der N-terminale jedoch auf Grund seiner Position nahe an der Proteinoberfläche nur labil assoziiert ist (Urzica *et al.*, 2009). Beide Fe/S-Cluster sind unerlässlich für die Funktion des Proteins innerhalb der CIA-Maschinerie. Des Weiteren wird der schwach gebundene Cluster für den Einbau des Clusters der C-terminalen Domäne benötigt (Urzica *et al.*, 2009). Mittels Depletionsstudien lässt sich die Position von Nar1 innerhalb der CIA-Maschinerie einordnen. Die Depletion von *CFD1*, *NBP35*, *TAH18* und *DRE2* beeinträchtigt die Reifung von Nar1 *in vivo*, das Ausschalten von *CIA1* des CIA-Targeting-Komplexes hingegen nicht (Netz *et al.*, 2007; Netz *et al.*, 2010; Balk *et al.*, 2005b). Somit kann Nar1 eine Funktion in der Mitte der CIA-Maschinerie zugeordnet werden. Auf molekularer Ebene bleibt die genaue Rolle von Nar1 als Transporter des Fe/S-Clusters zwischen den Gerüstproteinen und dem Targeting-Komplex noch ungeklärt. Da Nar1 selbst ein Target der CIA-Maschinerie und somit an seiner eigenen Reifung beteiligt ist, ergibt sich hieraus ein Henne-Ei-Problem (Balk *et al.*, 2005a; Seki *et al.*, 2013). Im Menschen existieren zwei Orthologe des Hefeproteins Nar1: NARFL (auch IOP1), ein cytosolisches Protein mit Funktion in der cytosolischen Fe/S-Clusterbiogenese und NARF (auch IOP2), ein nucleäres Protein, welches diese Funktion nicht erfüllt (Song & Lee, 2008).

Der CIA-Targeting-Komplex setzt sich aus dem WD40 (Sequenzmotiv aus ca. 40 AS mit einem Tryptophan-Aspartat-Dipeptid)-Protein Cia1 (*cytosolic iron-sulfur protein assembly 1*), Cia2 und dem HEAT (Akronym aus: Huntingtin, EF3, PP2A, TOR1)-Repeat-Protein Met18 (*methionine requiring 18*) zusammen und stellt den direkten Kontakt mit den Targetproteinen her (Netz *et al.*, 2014). Diese Proteine werden in den Kapiteln 1.3.3 - 1.3.5 näher erläutert. Der molekulare Mechanismus der Übertragung des Fe/S-Clusters auf die Zielproteine, sowie die strukturelle Organisation des komplexen CIA-Targeting-Komplexes sind noch ungeklärt. Humane Zellkulturstudien weisen auf eine verbrückende Rolle von Cia2 zwischen Cia1 und Met18 hin (Seki *et al.*, 2013; Odermatt & Gari, 2017). Des Weiteren ist nicht bekannt wie die Erkennung potentieller Targetproteine erfolgt. Tandem-Affinity-Purification-Studien registrierten Yae1 und Lto1 (*required for biogenesis of the large ribosomal subunit and initiation of translation in oxygen*) als neue CIA-Faktoren. Diese sind jedoch, soweit bisher bekannt, nur an der Reifung des ABC-Proteins Rli1 (RNase L Inhibitor) beteiligt, einem Fe/S-Protein, das bei der Ribosomen-Biogenese sowie der Initiation und Termination der Translation von Bedeutung ist (Paul *et al.*, 2015; Kispal *et al.*, 2005). Da die zwei neu identifizierten Faktoren zwischen dem CIA-Targeting-Komplex und dem Substrat auftreten, wird eine Funktion als Adapter zur Erkennung des Fe/S-Proteins diskutiert.

Daneben wird eine Rolle der Monothiol-Glutaredoxine Grx3-Grx4 an der Biogenese nucleärer und cytosolischer Fe/S-Proteine diskutiert (Mühlenhoff *et al.*, 2010). Es ist jedoch weder eine genaue Funktion noch der Interaktionspunkt innerhalb der Maschinerie bekannt. Auf Grund der Beteiligung am Eisen-Transport und den damit verbundenen vielfältigen Aspekten des zellulären Eisen-Metabolismus werden Grx3-Grx4 nicht als CIA-Faktor angesehen.

1.3.3 Cia1

Cia1 wurde in Two-Hybrid-Studien zur Identifizierung von Interaktionspartnern des Tumorsuppressorproteins WT1 erstmals beschrieben (Johnstone *et al.*, 1998). Das essentielle Protein wird ubiquitär exprimiert und ist evolutionär stark konserviert (Johnstone *et al.*, 1999). Als erster Bestandteil des CIA-Targeting-Komplexes wurde Cia1 identifiziert, als man bei der Suche nach weiteren CIA-Faktoren auf ein Fusionsprotein zwischen Cfd1 und Cia1 in *Schizosaccharomyces pombe* stieß. Da Cia1 für die Assemblierung aller untersuchten cytosolischen Fe/S-Proteine benötigt wird, jedoch nicht für die Fe/S-Proteine der CIA-Maschinerie selbst, ist dieser Faktor in die späte CIA-Maschinerie einzuordnen. Des Weiteren konnte mittels Coimmunopräzipitation eine spezifische Interaktion zwischen Cia1 und Nar1, nicht aber von Cia1 mit Cfd1 oder Nbp35 nachgewiesen werden (Balk *et al.*, 2005b). Cia1 stellt ein Mitglied der WD40-Proteinfamilie dar. Die Kristallstruktur zeigt sieben Propellerblätter, welche pseudosymmetrisch um eine zentrale Achse angeordnet sind (Srinivasan *et al.*, 2007). β -Propellerproteine dienen in eukaryotischen Proteinkomplexen oft der Interaktion und vermitteln eine Erkennung auf molekularer Ebene, sodass auch hier eine Funktion als Dockingstation angenommen werden kann (Xu & Min, 2011). Da Cia1 sowohl im Nucleus als auch cytosolisch vorliegt und die zelluläre Konzentration im Vergleich zu anderen CIA-Faktoren zehnfach erhöht ist, könnte das Protein im Nucleus eine weitere Funktion erfüllen (Johnstone *et al.*, 1998; Ghaemmaghami *et al.*, 2003).

1.3.4 Cia2

Cia2 ist ein kleines saures Protein mit einer C-terminalen DUF59-Domäne (*domain of unknown function 59*). Verschiedene High-Throughput-Screenings zeigten bereits eine Interaktion zwischen Cia1 und Cia2 bevor Cia2 als Bestandteil der CIA-Maschinerie eingeordnet werden konnte (Weerapana *et al.*, 2010). Eine Mutation des *Arabidopsis thaliana* Homologs AE7 zeigt verringerte Aktivitäten cytosolischer und nucleärer Fe/S-Proteine (Luo *et al.*, 2012), sodass die Funktion von Cia2 in der cytosolischen Fe/S-Protein-Biogenese in Eukaryoten konserviert zu sein scheint. Einen Unterschied zwischen der humanen und der CIA-Maschinerie in Hefe stellt das Auftreten zweier humaner Homologe von Cia2 dar. Beide Homologe FAM96A und B (*family with sequence similarity 96 member B*) können unabhängig voneinander mit CIAO1 interagieren, jedoch erfüllt nur FAM96B eine Funktion im CIA-Targeting-Komplex. FAM96A hingegen wird für die Reifung von IRP1 benötigt und kann mit IRP2 interagieren, wodurch eine Verbindung zwischen der Fe/S-Protein-Biogenese und dem zellulärem Eisenmetabolismus hergestellt wird (Stehling *et al.*, 2013). Obwohl eine Kristallstruktur von FAM96A existiert, welche das Protein als Dimer zeigt, können aus dieser strukturellen Information keine Rückschlüsse auf die molekulare Funktion von Cia2 gezogen werden (Chen *et al.*, 2012). Ein hyperreaktives Cystein wurde an Position 161 identifiziert, dessen Mutation letal ist (Weerapana *et al.*, 2010). Die Aufklärung der molekularen Funktion

dieses Cysteinrestes könnte wichtig für das Verständnis des gesamten CIA-Targeting-Komplexes sein (Netz *et al.*, 2014).

1.3.5 Met18

Met18 ist das einzige nicht essentielle Protein der CIA-Maschinerie. Seine Deletion in Hefe, als auch des humanen Homologs MMS19, zeigt eine Vielzahl verschiedener Phänotypen, welche lange Zeit in keinen Zusammenhang mit einer molekularen Funktion gebracht werden konnten. Erstmals beschrieben wurde es in Untersuchungen Methionin-auxotropher Stämme, bzw. in Deletionsstämmen, welche besonders anfällig gegenüber DNA-Schädigung in Form von UV-Strahlung oder Methylmethansulfonat (MMS) sind (Massetot & de Robichon-Szulmajster, 1975; Prakash & Prakash, 1977). Im Folgenden wurde eine Funktion in der DNA-Reparatur durch Beeinflussung des Transkriptionsfaktors TFIIH angenommen (Prakash & Prakash, 1979; Lauder *et al.*, 1996; Seroz *et al.*, 2000; Kou *et al.*, 2008). Auch eine Beeinflussung der Telomerlänge wurde festgestellt (Askree *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde dem Komplex aus MMS19, FAM96B und CIAO1 eine Rolle bei der Segregation von Chromosomen nachgewiesen (Ito *et al.*, 2010). Mit der Identifizierung als Bestandteil der CIA-Maschinerie konnten alle beschriebenen Phänotypen erklärt werden (Gari *et al.*, 2012; Stehling *et al.*, 2012). Met18 unterstützt die Biogenese von Fe/S-Proteinen, die an den verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind, an welchen Met18 eine Funktion zugesprochen wurde. Das Größte aller CIA-Proteine besteht aus drei Domänen. Die Domänen A und B N-terminal, sowie die C-terminale Domäne C sind evolutionär konserviert, die zentrale Region dazwischen jedoch divergiert zwischen den Spezies (Hatfield *et al.*, 2006). Die C-terminale Domäne beinhaltet vier HEAT-Repeats, ein eukaryotisches Strukturmotiv aus je zwei anti-parallelen α -Helices (Queimado *et al.*, 2001; Andrade & Bork, 1995; Andrade *et al.*, 2001). Immunpräzipitationsstudien verschieden gekürzter Polypeptide von MMS19 zeigen, dass Domäne C für die Interaktion mit Fe/S-Targetproteinen benötigt wird. Die Bindung von Apoproteinen und CIAO1 bzw. FAM96B erfolgt simultan durch verschiedene Domänen (van Wietmarschen *et al.*, 2012).

1.4 Die Isopropylmalat-Isomerase

Die Isopropylmalat-Isomerase ist ein cytosolisches [4Fe-4S]-Cluster-Enzym, welches die Umwandlung von α -Isopropylmalat in β -Isopropylmalat katalysiert (Ryan *et al.*, 1973; Kispal *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 1963; Kohlhaw, 1988). Diese Reaktion stellt den zweiten Schritt der Leucinbiosynthese dar (siehe 1.4.1). In Hefe wird das Protein durch das Gen *LEU1* codiert (Satyanarayana *et al.*, 1968; Hsu & Schimmel, 1984). Dieses ist auf dem linken Arm des Chromosoms VII lokalisiert (systematischer Name: YGL0009C) und besteht aus 2340 bp (Tettelin *et al.*, 1997). Folglich setzt sich das Protein aus 779 Aminosäuren zusammen und hat eine molekulare Masse von 85,8 kDa (Cherry *et al.*, 2012; Skala *et al.*, 1991).

1.4.1 Die Leucinbiosynthese

Für den Menschen ist die proteinogene Aminosäure L-Leucin (im Folgenden nur Leucin genannt) essentiell, sie wird nur in Mikroorganismen und Pflanzen synthetisiert. Zusammen mit Valin und Isoleucin gehört Leucin zu den unpolaren verzweigt-kettigen Aminosäuren (BCAA: *branched-chain amino acids*). Auf dem Biosyntheseweg von Pyruvat zu Valin zweigt aus dem Intermediat α -Ketoisovalerat der Syntheseweg von Leucin ab (siehe Abbildung 1.4) (Kohlhaw, 2003). 1956 postulierten Strassman *et al.* auf Grund von ^{14}C -Labelling-Versuchen in *Torulopsis utilis* einen Mechanismus der Leucinbiosynthese, ausgehend von einer Kondensation von α -Ketoisovalerat mit Acetyl-CoA (Strassman *et al.*, 1956). Durch den Nachweis von 3-Isopropylmalat als Intermediat in *Neurospora* konnte dieser Weg bestätigt werden (Gross *et al.*, 1962).

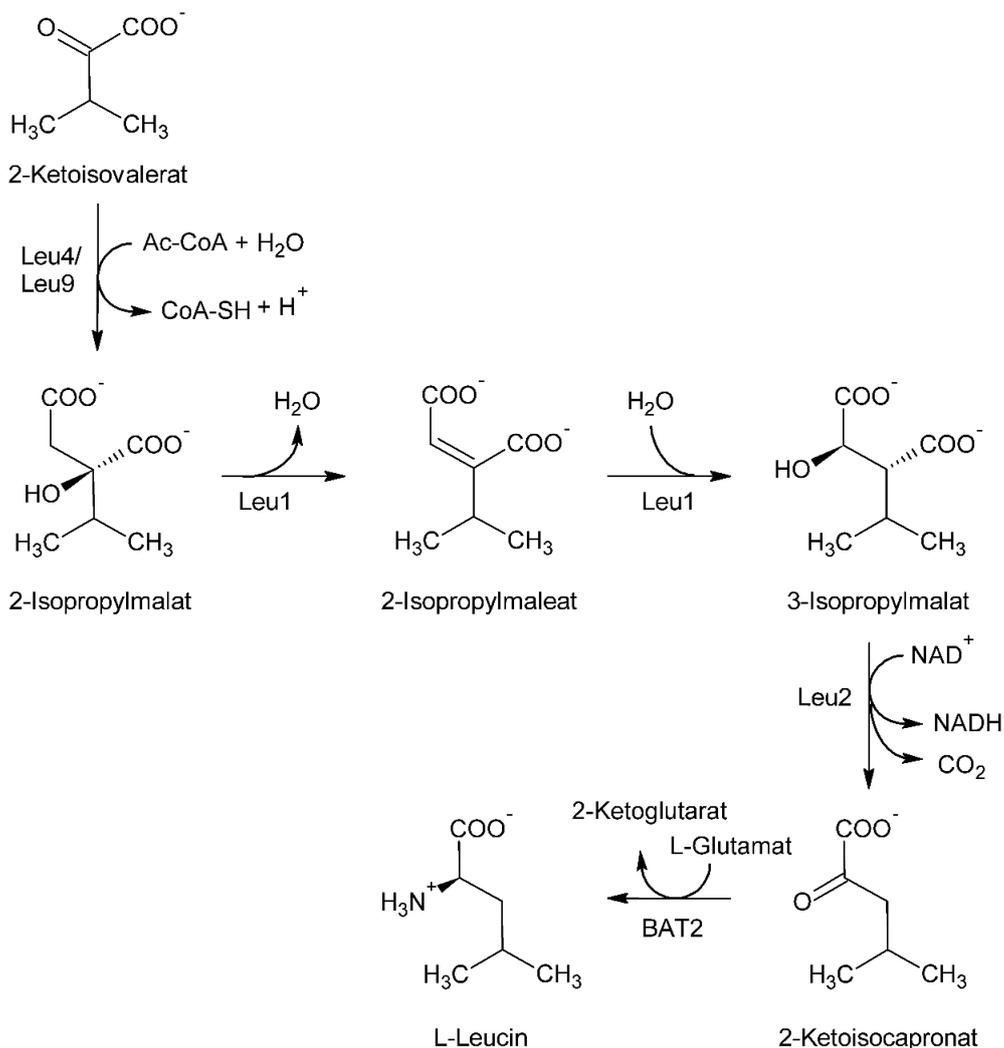


Abbildung 1.4: Die Leucinbiosynthese. Gezeigt sind die chemischen Strukturen der Intermediate des Biosyntheseweges sowie die beteiligten Cofaktoren und Enzyme in *S. cerevisiae*. Dabei stellen Leu4 und Leu9 Isopropylmalat-Synthasen dar, Leu1 codiert die IPMI, Leu2 die Isopropylmalat-Dehydrogenase und BAT2 eine BCAA-Aminotransferase. Die Kondensationsreaktion von 2-Ketoisovalerat mit Acetyl-CoA zu 2-Isopropylmalat wird in den Mitochondrien durchgeführt. Die folgende Isomerisierung zu 3-Isopropylmalat, sowie die Oxidation zu 2-Ketoisocapronat und die abschließende Transaminierung finden im Cytosol statt.

Der erste Schritt der Leucinbiosynthese, die Umwandlung von 2-Ketoisovalerat zu 2-Isopropylmalat, wird von der α -Isopropylmalat-Synthase katalysiert. *S. cerevisiae* besitzt zwei verschiedene Isoformen dieses Enzyms, Leu4 und Leu9 (Kohlhaw, 2003). In Hefe findet dieser Syntheseschritt innerhalb der Mitochondrien statt, wohingegen die folgenden Reaktionen im Cytosol ablaufen. 2-Isopropylmalat wird auf noch nicht geklärte Weise durch die Mitochondrienmembran transportiert. Im Cytosol erfolgt die Isomerisierung zu 3-Isopropylmalat, katalysiert durch die Isopropylmalat-Isomerase Leu1 (Gross *et al.*, 1963). Anschließend entsteht aus 3-Isopropylmalat, in einer oxidativen Decarboxylierungsreaktion mittels der β -Isopropylmalat-Dehydrogenase (Leu2), 2-Ketoisocapronat. Im letzten Syntheseschritt erfolgt eine Transaminierung zu Leucin durch die BCAA-Aminotransferase BAT2 (Prohl *et al.*, 2000).

Die Regulation der Leucinbiosynthese erfolgt auf zweierlei Weise. Zum einen gibt es eine Feedback-Inhibierung der Synthase durch das Endprodukt Leucin (Satyanarayana *et al.*, 1968). Zum anderen werden *LEU1* und *LEU2* auf transkriptionellem Level durch 2-Isopropylmalat und das regulatorische Protein Leu3 beeinflusst (Hsu & Schimmel, 1984; Baichwal *et al.*, 1983). In Anwesenheit von 2-Isopropylmalat wirkt Leu3 als Aktivator, in Abwesenheit jedoch als Repressor.

1.4.2 Spezieshomologie

Die Gene der Leucinbiosynthese sind in *S. cerevisiae* auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert und somit über das gesamte Genom verteilt (Kohlhaw, 2003). In Bakterien wie *Escherichia coli* (*E. coli*) oder *Salmonella typhimurium* werden die Gene *leuA*, *leuB*, *leuC* und *leuD* gemeinsam reguliert (Somers *et al.*, 1973; Margolin, 1963; Tamakoshi *et al.*, 1998). Die vier strukturellen Gene des *leu*-Operons werden als eine Einheit transkribiert (Burns *et al.*, 1966). Hierbei entspricht *leuA* der α -Isopropylmalat-Synthase, *leuB* der β -Isopropylmalat-Dehydrogenase und *leuC* und *leuD* codieren die Isopropylmalat-Isomerase (Yang & Kessler, 1974). In Prokaryoten setzt sich das Enzym IPMI aus zwei verschiedenen Untereinheiten zu einem Heterodimer zusammen: einer größeren Untereinheit LeuC mit ca. 54 kDa und einer kleineren Untereinheit LeuD mit ca. 23,5 kDa bei *E. coli* (Fultz & Kemper, 1981). Die IPMI aus Hefe stellt ein Monomer mit einer geschätzten molekularen Masse von 86 kDa (90 kDa bestimmt mit Gelfiltration) dar (Bigelis & Umbarger, 1975, 1976).

Es kann angenommen werden, dass die monomere Form evolutionär aus einer Fusion der beiden prokaryotischen Gene hervorgegangen ist (Skala *et al.*, 1991). Hierfür spricht eine mit 57% hohe Sequenzidentität bei einer Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen der IPMI von *S. cerevisiae* (Stamm W303) und *E. coli* (Stamm K12) (Ebert, 2014; Tettelin *et al.*, 1997; Keseler *et al.*, 2011). Die Primärsequenz der Hefe IPMI ist aus 779 Aminosäuren aufgebaut, wohingegen die Summe beider Untereinheiten des *E. coli* Proteins 667 Aminosäuren ergibt (siehe Diplomarbeit A. Ebert). Aus dieser Differenz lässt sich zum einen ein 63 Aminosäure langer „Linker“, die Verbindung der zwei Untereinheiten zwischen

der LeuC- und LeuD-homologen Sequenz, ableiten. Zum anderen fällt eine 28 Aminosäuren umfassende C-terminale Verlängerung auf (siehe Abbildung 1.5).

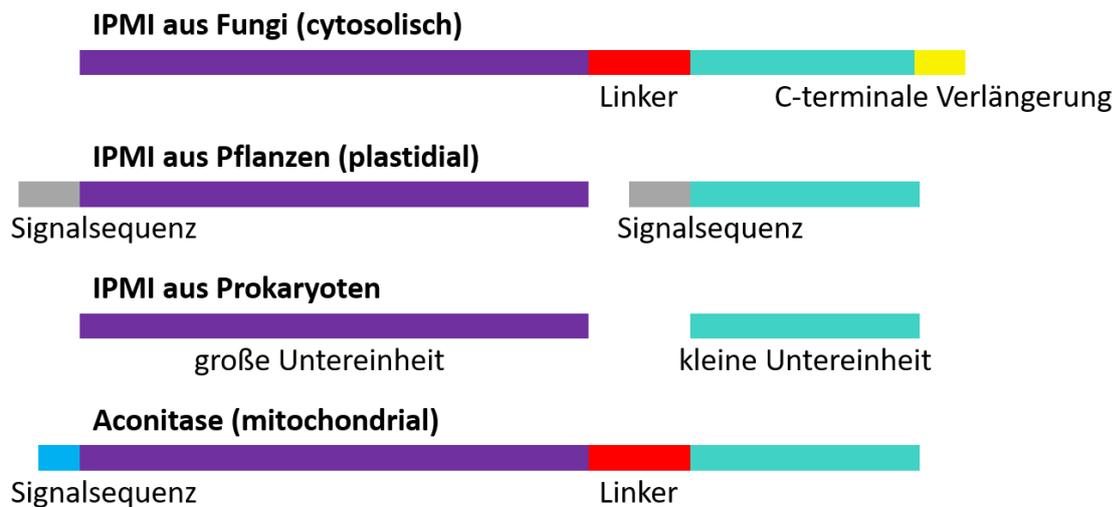


Abbildung 1.5: Vergleich des Aufbaus der IPMI verschiedener Reiche. In Bakterien und Archaea setzt sich die IPMI aus zwei Untereinheiten zusammen. Die große Untereinheit LeuC (lila) umfasst drei Domänen und trägt den Fe/S-Cluster. Die kleine Untereinheit LeuD (türkis) entspricht einer Domäne und ist wichtig für die Substraterkennung. In Pflanzen liegt die IPMI in Plastiden vor und beide Untereinheiten verfügen über eine entsprechende Signalsequenz. Die IPMI aus Fungi liegt als Monomer im Cytosol vor. Vergleichbar mit dem Aufbau der mitochondrialen Aconitase sind die zwei Untereinheiten durch einen Linker fusioniert. Auffällig ist eine C-terminale Verlängerung, welche ausschließlich in Fungi auftritt.

Bei Pflanzen findet die BCAA-Biosynthese in den Chloroplasten statt (Binder *et al.*, 2007). Bei Untersuchungen der Leucinbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* konnten Gemeinsamkeiten zu dem Methionin-Ketten-Verlängerungszyklus zur Synthese von Glucosinolaten festgestellt werden (Knill *et al.*, 2009). Sogenannte Senfölglycoside sind sekundäre Pflanzenstoffe, welche verantwortlich sind für den charakteristischen Geschmack verschiedener Gemüsesorten wie Kohl oder Rettich (Binder *et al.*, 2007). Diese zwei Synthesewege sind evolutionär verwandt. Auf eine Kondensation mit Acetyl-CoA folgt eine Isomerisierung und eine oxidative Decarboxylierung, bevor durch Starten eines neuen Zyklus eine weitere Kettenverlängerung erfolgt oder durch Transaminierung das Endprodukt entsteht. In *Arabidopsis thaliana* liegt die IPMI, wie bei den Prokaryoten, als Heterodimer vor (siehe Abbildung 1.5), jedoch existieren neben einem Gen der großen Untereinheit *LSU1* drei verschiedene Gene der kleinen Untereinheit *SSU1*, *SSU2*, und *SSU3* (Knill *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die große Untereinheit sowohl in die Leucin- als auch in die Glucosinolatbiosynthese involviert ist. Ein Dimer aus IPMI *LSU1* und IPMI *SSU1* katalysiert die Isomerisierung von 2-Isopropylmalat, wohingegen IPMI *LSU1* mit IPMI *SSU2* oder *SSU3* bei der Methionin-Ketten-Verlängerung beteiligt sind (He *et al.*, 2010; Imhof *et al.*, 2014).

1.4.3 Aconitase-Proteinfamilie

Die IPMI bildet zusammen mit den verschiedenen Formen der Aconitase und der Homoaconitase die Aconitase-Proteinfamilie (Gruer *et al.*, 1997). Alle Mitglieder bewirken eine Umwandlung einer α -Hydroxysäure in eine β -Hydroxysäure (Jeyakanthan *et al.*, 2010).

Die Aminosäuresequenz der Aconitase AcnA aus *E. coli* zeigt 21% Identität zur Isopropylmalat-Isomerase aus verschiedenen Organismen (Prodromou *et al.*, 1992). Aconitase katalysiert die Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat. Dies geschieht unter De- und Rehydratisierung, mit der Bildung von *cis*-Aconitat als Intermediat, wobei ein Eisenion des [4Fe-4S]-Clusters als Lewis-Säure fungiert (Beinert *et al.*, 1996; Rose & O'Connell, 1967). *E. coli* besitzt zwei genetisch verschiedene Aconitasen, AcnA und AcnB, welche zu 17% identisch sind (Bradbury *et al.*, 1996). Das hauptkatabole Enzym ist AcnB, AcnA ist ein Überlebensenzym und wichtig unter Stressbedingungen (Jordan *et al.*, 1999).

In Säugetieren existieren zwei verschiedene Formen der Aconitase mit ca. 30% Aminosäuresequenzidentität, welche auf unterschiedlichen Chromosomen codiert werden (Beinert & Kennedy, 1993). Zum einen ist die mitochondriale Aconitase ein Enzym des Citratzyklus, zum anderen fungiert die cytosolische Aconitase alias IRP1 als Regulator der Eisen-Homöostase (siehe 1.2) (Tong & Rouault, 2007). In *S. cerevisiae* fehlt IRP1, jedoch ist ein anderes Aconitaseenzyme vorhanden. Das Protein Aco1 ist die Hauptaconitase und beteiligt am Citratzyklus und der Glutaminsäuresynthese (Gangloff *et al.*, 1990). Aco2 ist ausschließlich an der Lysinbiosynthese beteiligt (Fazius *et al.*, 2012). In der Lysinbiosynthese von Pilzen katalysiert die Homoaconitase Lys4 die Isomerisierung von Homocitrat zu Homoisocitrat unter Ausbildung des Intermediates Homoaconitat (Xu *et al.*, 2006).

Die Mitglieder der Aconitaseproteinfamilie sind strukturell sehr ähnlich aufgebaut (siehe 1.4.4). Das aktive Zentrum, inklusive der drei Cysteinreste des [4Fe-4S]-Clusters, ist bei allen Proteinen vollständig konserviert (Gruer *et al.*, 1997). Phylogenetische Analysen erlauben die Hypothese eines gemeinsamen Vorfahren, welcher an diversen Synthesewegen beteiligt war und sich im Laufe der Evolution in verschiedene spezifischere Enzyme entwickelt hat (Irvin & Bhattacharjee, 1998; Jensen, 1976). Diese These wird auch durch das Auftreten in Archaea wie *Pyrococcus horikoshii* gestützt, deren IPMI neben der Leucinbiosynthese ebenfalls in der Lysinbiosynthese die Isomerisierung von Homocitrat bewirkt (Yasutake *et al.*, 2004; Nishida *et al.*, 1999). Des Weiteren existiert in methanogenen Archaea ein zur Threonin-Dehydratase alternativer Syntheseweg von Isoleucin. Auf dem Weg von Pyruvat zu 2-Oxobutyrat katalysiert die IPMI aus *Methanocaldococcus jannaschii* die Umsetzung von *R*-Citramalat zu β -Methylmalat über Citraconat (Drevland *et al.*, 2007).

1.4.4 Struktur

Bisher liegen in der Protein-Datenbank (PDB) keine Strukturdaten der IPMI aus *S. cerevisiae* oder einem vergleichbaren Organismus mit monomerem Protein vor (Berman *et al.*, 2000).

Annahmen zum Aufbau des Enzyms leiten sich auf Grund der großen Ähnlichkeit von Kristallstrukturen der mitochondrialen Aconitase bzw. von den Untereinheiten der dimeren Proteine aus Prokaryoten ab (Lloyd *et al.*, 1999). Die mitochondriale Aconitase aus Schweineherz ist ein Monomer von 83 kDa aus 754 Aminosäuren (Zheng *et al.*, 1990). Sie faltet sich in vier Domänen, wobei die N-terminalen drei Domänen dicht gepackt um das aktive Zentrum liegen (Robbins & Stout, 1989b). Die größere C-terminale Domäne hingegen ist durch einen Linker verbunden (siehe Abbildung 1.5). In der dritten Domäne befinden sich drei Cysteine (C358, C421, C424), welche den Fe/S-Cluster ligieren. In der inaktiven Form des Enzyms stellt dieser einen [3Fe-4S]-Cluster dar. Zur Aktivierung der Enzymfunktion wird ein Eisenion unter Ausbildung eines kubischen [4Fe-4S]-Clusters ergänzt (Robbins & Stout, 1989a). Dieses Eisenion wird nicht von einem Cysteinrest koordiniert. In Abwesenheit von Substrat weist es eine tetraedrische Geometrie auf, wobei ein Hydroxid als vierter Ligand dient. Bei Substratbindung wird die Koordinationszahl von vier auf sechs erhöht, Citrat bzw. Isocitrat koordinieren direkt durch Carboxyl- und Hydroxyl-Sauerstoffatome (Lloyd *et al.*, 1999; Beinert *et al.*, 1996).

Die prokaryotische größere Untereinheit LeuC der IPMI entspricht den Domänen 1–3, wohingegen die kleinere Untereinheit LeuD Domäne 4 repräsentiert (Yasutake *et al.*, 2004). Kristallstrukturen von LeuD aus *Mycobacterium tuberculosis* bzw. *Methanocaldococcus jannaschii* zeigen eine $\beta/\beta/\alpha$ -Sandwich-Faltung aus einer Ebene antiparalleler Stränge, einer perpendicularen Ebene paralleler Stränge sowie einer Ebene aus α -Helices (Manikandan *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). Eine C-terminale α -Helix könnte für die Heterodimerisierung von Bedeutung sein. Die kleine Untereinheit ist verantwortlich für die Substraterkennung (Lee *et al.*, 2012). Hierfür spricht auch die Existenz dreier unterschiedlicher kleiner Untereinheiten der IPMI in *Arabidopsis thaliana*, welche in Kombination mit der großen Untereinheit verschiedene Substrate umsetzen (Knill *et al.*, 2009). Essentiell für die Substraterkennung ist ein GSSR-Sequenz-Motiv, welches in allen Mitgliedern der Aconitase-Proteinfamilie vorkommt (Manikandan *et al.*, 2011; Yasutake *et al.*, 2004). In *S. cerevisiae* entspricht es den Aminosäuren 628-631.

Eine Kristallstruktur (der Apo-Form) von LeuC ist bisher nur aus dem Archaeon *Methanocaldococcus jannaschii* verfügbar (Lee *et al.*, 2014b). Sie weist eine dreieckige Struktur aus drei Domänen auf, wobei Domäne 1 aus einem dreischichtigen $\alpha/\beta/\alpha$ -Sandwich besteht und Domäne 2 aus zwei Schichten mit α/β -Konformation. Vergleichbar zur Aconitase sind alle drei Domänen dicht um das aktive Zentrum arrangiert. Bei der heterodimeren Form des Enzyms liegt das aktive Zentrum an der Schnittstelle zwischen großer und kleiner Untereinheit, sodass Aminosäuren beider Untereinheiten daran beteiligt sind (Lee *et al.*, 2012). Innerhalb des aktiven Zentrums befinden sich die Cysteinreste, welche den [4Fe-4S]-Cluster koordinieren können.

Sequenzvergleiche deuten darauf hin, dass in der IPMI aus *S. cerevisiae* die Cysteine 360, 421 und 424 drei Eisenzentren des Clusters ligieren (siehe Anhang 7.1; Ebert, 2014). Das vierte, nicht durch das Proteingerüst gebundene Eisenion, wird durch den Sauerstoff einer Carboxy- und einer Hydroxygruppe des Substrates ligiert (Lloyd *et al.*, 1999). Abbildung 1.6 veranschaulicht die postulierte Clusterbindung der *S. cerevisiae* IPMI.

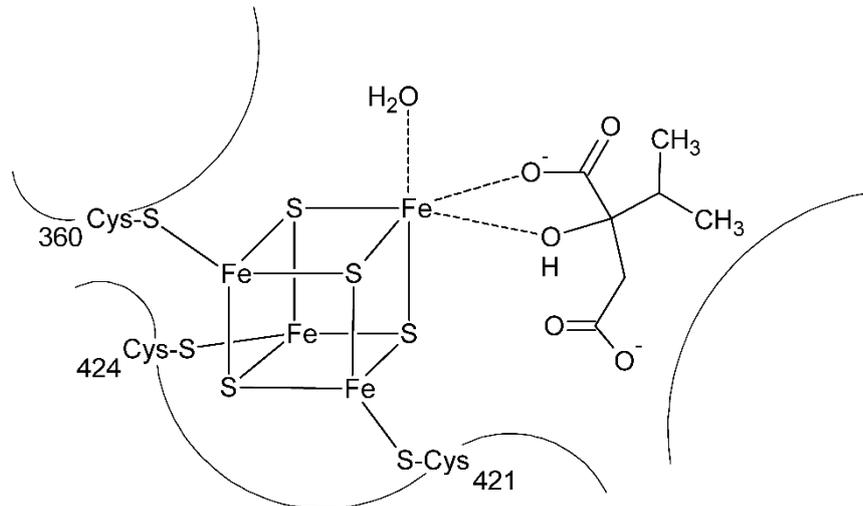


Abbildung 1.6: Postulierte Clusterbindung der *S. cerevisiae* IPMI. Gezeigt ist die aktive Form mit einem [4Fe-4S]-Cluster. Aus Sequenzvergleichen mit der mitochondrialen Aconitase aus Schweineherz lassen sich die Cysteine 360, 421 und 424 der *S. cerevisiae* IPMI als Clusterliganden ableiten. Das vierte, nicht durch das Proteingerüst gebundene Eisenion, zeigt eine quadratisch bipyramidale Koordination. Neben den drei Sulfidionen des Clusters dienen ein Wassermolekül sowie eine Hydroxy- und eine Carboxygruppe des Isopropylmalats als Liganden. Quelle: eigene Darstellung, abgeleitet nach (Beinert *et al.*, 1996).

1.5 Cytosolische und nucleäre Fe/S-Proteine mit C-terminalem Tryptophan

Tryptophan ist die proteinogene Aminosäure, welche mit 1,09 % am wenigsten im gesamten bekannten Proteom vorkommt (UniProt Consortium, 2017). Wären alle 20 proteinogenen Aminosäuren gleichmäßig in einem Protein verteilt, entspräche dies einem Auftreten von 5%. In *S. cerevisiae* beträgt die Häufigkeit von Tryptophan (W) innerhalb aller ORFs (*open reading frames*) 1,0 %; im Menschen 1,2 % (Gatto & Berg, 2003). Bioinformatische Analysen mit einer Motivsuche nach einem C-terminalen W im *S. cerevisiae*-Proteom ergeben 106 aus 6.002 untersuchten Proteinen, was 1,77 % entspricht (MOTIF Search). Im menschlichen Proteom weisen 1,14 % (232 von 20.338 untersuchten Proteinen) ein C-terminales Tryptophan auf (Stand 03.2018). Diese Werte stimmen mit publizierten Ergebnissen von 1,7 % (Hefe) bzw. 1,4 % (Mensch) überein (Gatto & Berg, 2003). Auffällig ist, dass sich unter den Proteinen mit C-terminalem Tryptophan mehrere cytosolische Fe/S-Proteine befinden.

Das menschliche Genom codiert 70 Fe/S-Proteine; dies entspricht 0,35 % aller humanen Gene (Andreini *et al.*, 2016). Davon tragen 55 Proteine einen [4Fe-4S]- und 37 einen [2Fe-2S]-Cluster. Die [4Fe-4S]-Proteine sind gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt; 33 % befinden sich im Cytosol; 33 % in den Mitochondrien und 34 % im Nucleus. Von den [2Fe-2S]-Proteinen hingegen sind 60 % in den Mitochondrien lokalisiert; 29 % im Cytosol und 11 % im Nucleus. Der Modellorganismus *S. cerevisiae* codiert mindestens 48 Fe/S-Proteine (Andreini *et al.*, 2016). Die Tabelle 1.2 listet alle mir bekannten cytosolischen und nucleären Fe/S-Proteine, sowohl von *S. cerevisiae*, als auch aus *Homo sapiens* (*H. sapiens*), auf.

Tabelle 1.2: Cytosolische und nucleäre Fe/S-Proteine im Menschen und in *S. cerevisiae*. Die Auflistung erfolgt alphabetisch. Blau markierte Proteine verfügen über ein C-terminales Tryptophan, grün markierte über eine andere aromatische Aminosäure. Mit * gekennzeichnete Referenzen beziehen sich auf homologe Proteine.

Hefe	Mensch	Clustertyp	Hauptfunktion	Referenz
-	AOX1	2x [2Fe-2S]	Aldehydoxidase	Hartmann <i>et al.</i> , 2012
Apd1	-	[2Fe-2S]	unbekannt	Stegmaier, 2017
-	CDKAL1	2x [4Fe-4S]	tRNA-Biosynthese	Arragain <i>et al.</i> , 2010
-	CDKRAP1	2x [4Fe-4S]	tRNA-Biosynthese	Reiter <i>et al.</i> , 2012
Cfd1	CFD1	[4Fe-4S]	CIA-Maschinerie	Roy <i>et al.</i> , 2003
Chl1	CHLR1	[4Fe-4S]	Helikase	Rudolf <i>et al.</i> , 2006*
-	CHLR2	[4Fe-4S]	Helikase	Rudolf <i>et al.</i> , 2006*
-	CPSF30	[2Fe-2S]	pre-mRNA Prozessierung	Shimberg <i>et al.</i> , 2016
Dna2	DNA2	[4Fe-4S]	Helikase	Pokharel & Campbell, 2012
Dph1- Dph2	DPH1- DPH2	[4Fe-4S]	Diphthamidbiosynthese	Dong <i>et al.</i> , 2014
-	DPYD	4x [4Fe-4S]	Dihydropyrimidin- Dehydrogenase	Schnackerz <i>et al.</i> , 2004
Dre2	CIAPIN1	[4Fe-4S] + [2Fe-2S]	CIA-Maschinerie	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Ecm17	-	[4Fe-4S]	Sulfit-Reduktase	Rutherford <i>et al.</i> , 2005
Elp3	ELP3	2x [4Fe-4S]	Elongatorprotein 3	Paraskevopoulou <i>et al.</i> , 2006
-	Exo5	[4Fe-4S]	Exonuclease	Sparks <i>et al.</i> , 2012
-	FANCI	[4Fe-4S]	Helikase, DNA-Reparatur	Wu <i>et al.</i> , 2010
Glt1	-	[3Fe-4S]	Glutamat-Synthase	Filetici <i>et al.</i> , 1996
-	GPAT	[4Fe-4S]	Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase	Smith <i>et al.</i> , 1994
Grx3- Grx4	GRX3	[2Fe-2S]	Eisen-Homöostase	Li <i>et al.</i> , 2009
-	IREB2	[4Fe-4S]	Eisen-Homöostase	Samaniego <i>et al.</i> , 1994
-	IRP1	[4Fe-4S]	Eisen-Homöostase	Dupuy <i>et al.</i> , 2006
-	KIF4A	[4Fe-4S]	Mitose	Ben-Shimon <i>et al.</i> , 2018
Leu1	-	[4Fe-4S]	Isopropylmalat-Isomerase	Kispal <i>et al.</i> , 1999
Mak16	MAK16	[4Fe-4S]	Ribosomenreifung	Wittmaack, 2018
-	MOCS1	2x [4Fe-4S]	Mo-Cofaktor-Biosynthese	Hänzelmann <i>et al.</i> , 2004
-	MUTYH	[4Fe-4S]	DNA-Glykosylase	Engstrom <i>et al.</i> , 2014
Nar1	IOP1	2x [4Fe-4S]	CIA-Maschinerie	Balk <i>et al.</i> , 2004

-	IOP2	2x [4Fe-4S]	Lamin-Bindung	Song & Lee, 2008
Nbp35	NBP35	[4Fe-4S]	CIA-Maschinerie	Hausmann <i>et al.</i> , 2005
Ntg2	NTHL1	[4Fe-4S]	DNA-Glykosylase	You <i>et al.</i> , 1998
Pol1	POLA	[4Fe-4S]	DNA-Replikation	Netz <i>et al.</i> , 2011
Pol2	POLE1	[4Fe-4S]	DNA-Replikation	Netz <i>et al.</i> , 2011
Pol3	POLD1	[4Fe-4S]	DNA-Replikation	Netz <i>et al.</i> , 2011
Pri2	PRIM2	[4Fe-4S]	DNA-Primase	Klinge <i>et al.</i> , 2007
Rad3	XPD	[4Fe-4S]	Helikase	Rudolf <i>et al.</i> , 2006
Rev3	REV3L	[4Fe-4S]	DNA-Reparatur	Netz <i>et al.</i> , 2011
Rli1	ABCE1	2x [4Fe-4S]	Ribosomenbiogenese	Kispal <i>et al.</i> , 2005
-	RTEL1	[4Fe-4S]	Helikase	Landry & Ding, 2014
-	RPC39	[4Fe-4S]	RNA-Polymerase C	Blombach <i>et al.</i> , 2015
Tyw1	TYW1	2x [4Fe-4S]	tRNA-Biosynthese	Noma <i>et al.</i> , 2006
-	Viperin	[4Fe-4S]	Antivirale Aktivität	Duschene & Broderick, 2010
-	XDH	2x [2Fe-2S]	Xanthin-Dehydrogenase	Yamaguchi <i>et al.</i> , 2007

Von den 38 humanen identifizierten, nicht mitochondrialen Fe/S-Proteinen weisen fünf ein C-terminales Tryptophan auf (blau markiert), zwei weitere verfügen über die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin oder Tyrosin (grün markiert). Dies entspricht 13 bzw. 18 %. In Hefe liegen 23 bekannte Fe/S-Proteine im Cytosol bzw. Nucleus lokalisiert vor. Davon haben fünf ein C-terminales W, bzw. ein sechstes eine weitere aromatische Aminosäure. Damit tragen 22 % aller cytosolischen und nucleären Fe/S-Proteine in *S. cerevisiae* ein C-terminales Tryptophan und 26 % eine aromatische Aminosäure. Der Vergleich dieser 22 % mit den 1,7 % W-tragender Proteine des gesamten Proteoms lässt eine bedeutende zelluläre Funktion vermuten.

Die Beobachtung eines konservierten C-terminalen Tryptophans wurde 2003 erstmals erwähnt (Stejskal *et al.*, 2003). Stejskal *et al.* bemerkten dies bei einem Sequenzvergleich der [Fe]-Hydrogenase-artigen homologen NARF-Proteine verschiedener Eukaryoten. Die Bedeutung und Funktion blieb jedoch unklar. Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde eine Studie über das humane Protein Viperin publiziert, welche erste Erkenntnisse über eine Verbindung zur CIA-Maschinerie lieferte. Das C-terminale Tryptophan ist essentiell für eine Interaktion mit dem Assemblierungsfaktor CIAO1 (Upadhyay *et al.*, 2014). In gekürzten Versionen des Proteins wurde signifikant weniger Eisen eingebaut. Verstärkt wurde der Hinweis auf eine Beziehung zu der CIA-Maschinerie durch die Identifizierung des Adapter-Proteinkomplexes Yae1-Lto1 (Paul *et al.*, 2015). Lto1 bindet mit seinem konservierten C-terminalen W an den CIA-Targeting-Komplex. Mittels eines Deca-GX₃-Motivs erfolgt eine Interaktion mit Yae1, welches wiederum das Fe/S-Protein Rli1 rekrutiert. Die Adapterproteine scheinen wichtig für die Reifung des ABC-Proteins zu sein, jedoch nicht für weitere Targets.

Abbildung 1.7 zeigt sogenannte Seqlogos einer Auswahl an cytosolischen und nucleären Fe/S-Proteinen mit C-terminalem Tryptophan aus Fungi und höheren Eukaryoten. Ein Sequenzlogo ist eine grafische Veranschaulichung eines multiplen Alignments von Amino- oder Nucleinsäuresequenzen (Schneider & Stephens, 1990). Dabei entspricht jeder Balken im Logo einer Position der Sequenz. Alle Sequenzen des Vergleichs (Anzahl \pm n) werden übereinandergelegt, sodass die Höhe eines Buchstabens im Logo proportional der Häufigkeit des Vorkommens dieses Charakters (Amino- bzw. Nucleinsäure) an dieser Position der Sequenz ist. Die Anordnung des Charakters innerhalb eines Balkens erfolgt nach Größe, der Häufigste steht oben. Die Höhe eines Buchstabens ist folglich ein Maß für die Konservierung. Somit ist ein Sequenzlogo eine geeignete Möglichkeit signifikante Reste oder Motive zu verdeutlichen.

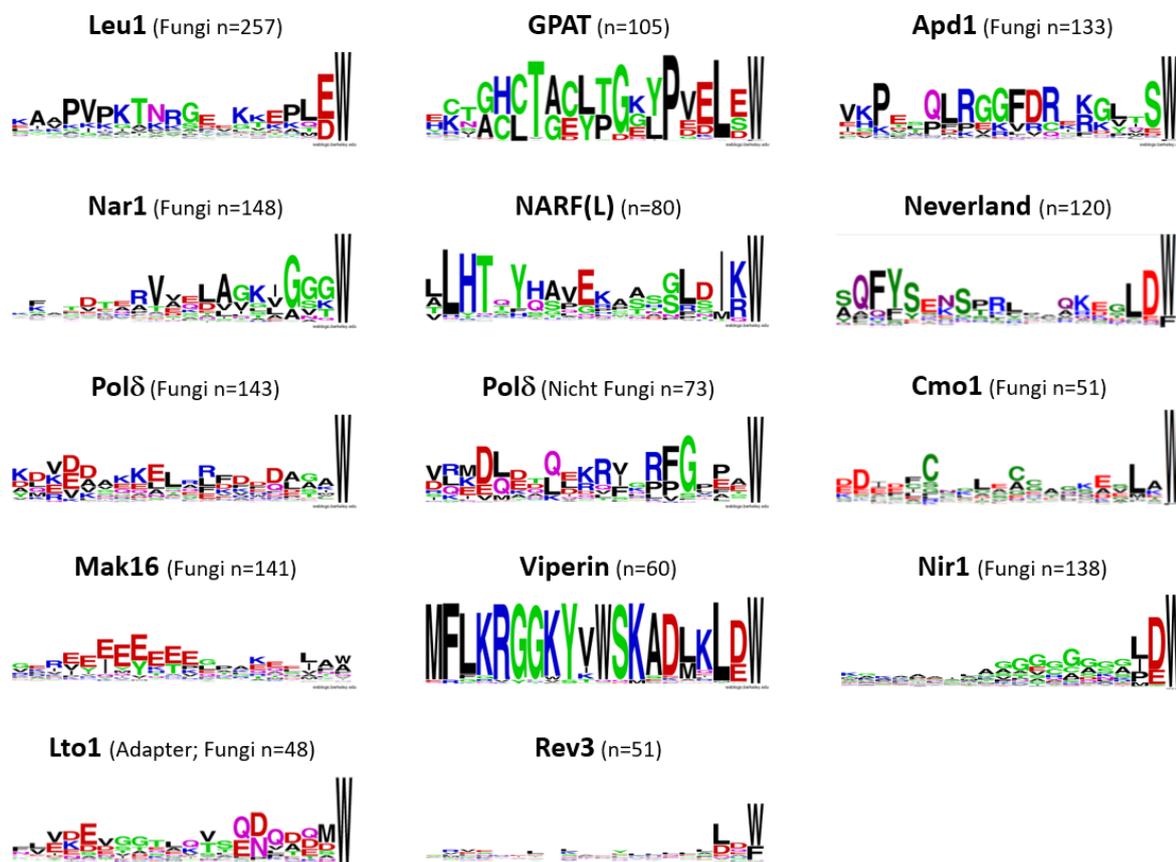


Abbildung 1.7: Sequenzlogos von Fe/S-Proteinen mit C-terminalem Tryptophan. Dargestellt sind die Sequenzen der zwanzig C-terminalen Aminosäuren einer Auswahl cytosolischer und nucleärer Fe/S-Proteine als Sequenzlogos. Dabei entspricht n der Anzahl der jeweils zu Grunde liegenden verglichenen Organismen. Es wurden sowohl Fungi als auch höhere Eukaryoten betrachtet. Die Höhe eines Buchstabens ist dabei proportional zur Häufigkeit des Auftretens dieser Aminosäure an dieser Position des Proteins bei den verschiedenen Organismen. Quelle: Sequenzvergleiche überlassen von Prof. A. J. Pierik.

Dargestellt sind die zwanzig C-terminalen Aminosäuren der Isopropylmalat-Isomerase Leu1 (siehe 1.4), Apd1 (siehe 1.5.1), Viperin (siehe 1.5.2), der Glutamin-Phosphoribosyl-

pyrophosphat-Amidotransferase GPAT (siehe 1.2.2), Nar1 bzw. NARF(L) (siehe 1.3.2) und der katalytischen Untereinheit der Polymerase δ (siehe 1.2.2). Ebenfalls abgebildet ist die Sequenz von Mak16 (*maintenance of killer 16*), einem Assemblierungsfaktor der 60 S großen Ribosomenuntereinheit (Pellett & Tracy, 2006; Kater *et al.*, 2017). Rev3 stellt die katalytische Untereinheit der an der DNA-Reparatur beteiligten DNA-Polymerase ζ dar (Makarova & Burgers, 2015). Einen Sonderfall in dieser Aufzählung nimmt das Protein Lto1 ein, welches selbst kein Fe/S-Protein ist, jedoch gemeinsam mit Yae1 als Adapter für den Fe/S-Clustereinbau in das ABC-Protein Rli1 wichtig ist (Paul *et al.*, 2015).

Bei cytosolischen und nucleären Fe/S-Proteinen mit C-terminalem Tryptophan handelt es sich vorrangig um Proteine mit einem [4Fe-4S]-Cluster. Interessanterweise weisen alle identifizierten Proteine mit einem [2Fe-2S]-Cluster eine Koordination durch zwei Histidinreste auf.

Rieske-Proteine bilden eine Gruppe innerhalb der [2Fe-2S]-Proteine und unterscheiden sich von den Ferredoxinen durch eine Koordination des Fe/S-Clusters durch zwei Cysteine und zwei Histidine. Dabei wird ein Eisenion von den beiden Cysteinresten und das zweite von den beiden Histidinresten ligiert (Link, 2006). Sie sind Bestandteile des Cytochrom *bc₁*-Komplexes der Plasmamembran von Bakterien bzw. der inneren Mitochondrienmembran und des Cytochrom *b_{6f}*-Komplexes in der Thylakoidmembran von Chloroplasten. Ihre Funktion beruht auf dem Elektronentransport während der Oxidation von Ubihydrochinon (bzw. Plastohydrochinon) im Q-Zyklus der Atmungskette. Als Rieske-artige Cluster werden verwandte Dioxygenasen bezeichnet, welche nicht mit Chinon interagieren (Link, 1999).

Vertreter Rieske-artiger Proteine mit C-terminalem Tryptophan sind Neverland, Cmo1 und Nir1. Neverland ist eine in Nematoden und Insekten vorkommende Cholesterol-7,8-Dehydrogenase (Yoshiyama-Yanagawa *et al.*, 2011). Die Cholin-Monooxygenase Cmo1 aus Fungi (z. B. *Scheffersomyces stipitis*) ermöglicht die Nutzung von Cholin als Stickstoffquelle durch Spaltung von Cholin in Trimethylamin und Glyceraldehyd (Linder, 2014). Im Vergleich zu Nitrit-Reduktasen aus Pflanzen weist die Nitrit-Reduktase Nir1 aus Fungi (z. B. *Neurospora crassa*) neben dem charakteristischen Fe/S-Sirohäm-Cofaktor eine C-terminale Rieske-artige Domäne auf (Exley *et al.*, 1993; Swamy *et al.*, 2005). Diese wurde bisher nicht untersucht.

Die Sequenzlogos verdeutlichen die Konservierung des C-terminalen Tryptophans. Dies weist auf eine essentiell wichtige Funktion dieser Aminosäure an dieser Position hin. Besonders deutlich wird dies bei Rev3 und Cmo1. Während die übrigen Positionen kaum konserviert sind, tritt das C-terminale W sehr häufig auf.

Bei sechs der abgebildeten eukaryotischen Proteinen ist gar ein Tripeptid L(D/E)W, aus Leucin, einer negativ geladenen Aminosäure Glutaminsäure oder Asparaginsäure und Tryptophan, am C-Terminus konserviert. Das Auftreten eines Tripeptides kann ein Hinweis

auf eine Funktion als Signalpeptid sein, ähnlich dem N-terminalen LYR-Motiv oder dem SKL-Motiv für den peroxisomalen Import (Austin *et al.*, 2007; Gibson *et al.*, 2015).

Anstelle des C-terminalen Tryptophans tragen Spezieshomologe von Rev3 und Neverland ein Phenylalanin F, ebenfalls eine aromatische Aminosäure, an dieser Position.

Interessanterweise besitzt auch das Elektronentransportprotein der CIA-Maschinerie Tah18 ein C-terminales Tryptophan, genauso wie die strukturell verwandte Cytochrom-P450-Reduktase. Die Bedeutung dieser Aminosäure bei den Diflavin-Reduktasen ist jedoch nicht geklärt.

Bei einem Vergleich der gezeigten Proteine wird auch deutlich, dass sich diese nicht in eine Gruppe einteilen lassen. Diese Proteine sind sowohl cytosolisch als auch im Nucleus lokalisiert. Es sind vorrangig [4Fe-4S]-Proteine, aber auch welche mit [2Fe-2S]-Cluster mit zwei Histidinliganden sind vertreten. Die Funktion reicht von DNA-Polymerase über Ribosomenassemblierung zu Aminosäurebiosynthesen und anderen metabolischen Prozessen. Dabei hat der Fe/S-Cluster sowohl eine stabilisierende, als auch eine katalytische Bedeutung.

Apd1 und Viperin werden auf Grund der Bedeutung innerhalb dieser Arbeit nun ausführlicher beschrieben.

1.5.1 Apd1

Apd1 wurde in einem High-Throughput-Screening von Genen mit unbekannter Funktion aus *S. cerevisiae* erstmals erwähnt (Entian *et al.*, 1999). Der Deletionsstamm $\Delta apd1$ zeigte hierbei eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Kupfer sowie eine Abnormität in der Verteilung von Aktinfilamenten. Da die Aktinfilamente während der Zellteilung hauptsächlich distal von der Mutterzelle gefunden wurden, führte dies zur Benennung Apd1 (*Actin patches distal*). Des Weiteren zeigen $\Delta apd1$ -Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Hydroxyharnstoff und 2,3,4-Trihydroxybenzophenon (Tang *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2014a). Das 316 Aminosäuren lange Apd1 (36 kDa) wird als ein [2Fe-2S]-Protein der thiothioninartigen Ferredoxin-Proteinfamilie beschrieben. Mittels UV/VIS-, ESR- und Mössbauerspektroskopie konnte eine Clusterkoordination aus zwei Cysteinen und zwei Histidinen (His255 & His259) nachgewiesen werden (Stegmaier, 2017). Das Protein zeigt keine Rieske-Faltung; es weist ein hochkonserviertes HXGGH-Motiv auf, sodass es einer neuartigen Proteinklasse mit einer Konsensussequenz C-X₈-C-X₂₄₋₇₅-H-X₃-H (im Vergleich zu Rieske C-X-H-X₁₅₋₄₇-C-X₂-H) zugeordnet werden muss. In Mutagenesestudien konnten die Cysteine Cys207 und Cys216 als weitere Clusterliganden identifiziert werden (C. Blinn, persönliche Mitteilung). In *S. cerevisiae* ist Apd1 im Cytosol lokalisiert und dessen Clustereinbau abhängig von der CIA-Maschinerie (C. Blinn, persönliche Mitteilung). Die Funktion des Proteins ist jedoch weiterhin ungeklärt.

1.5.2 Viperin

Viperin wurde erstmals in Fibroblasten als Gen entdeckt, welches durch Humane-Cytomegalovirus-Infektion induziert wird (Zhu *et al.*, 1997). Durch Chin & Crosswell wurde es als antivirales Protein identifiziert und auf Grund seiner Eigenschaften (induzierbar durch Typ I Interferone und verschiedenste Virenarten; an das Endoplasmatische Retikulum (ER) bzw. in Lipid Rafts assoziiert) *Viperin* (*virus-inhibitory protein, ER-associated, interferon-inducible*) genannt (Chin & Crosswell, 2001; Fitzgerald, 2011). Das von kleinen Wirbeltieren bis hin zum Menschen hoch konservierte Protein ist 361 Aminosäuren lang (42 kDa) und aus drei Domänen aufgebaut (Mattijssen & Pruijn, 2012; Seo *et al.*, 2011). Die N-terminale Domäne mit amphipathischer α -Helix ist für die Membran-Assoziation verantwortlich. Vier charakteristische Motive eines Radikal-SAM-Enzyms weist die zentrale Domäne auf, welche auch den [4Fe-4S]-Cluster trägt (Duschene & Broderick, 2010; Shaveta *et al.*, 2010). Die C-terminale Domäne spielt eine Rolle bei der Dimerisierung des Proteins. Von großer Wichtigkeit für diese Arbeit ist ein hochkonserviertes Tryptophan W361 am C-terminalen Ende. In Mutagenesestudien von Jiang *et al.* wurde diese Aminosäure durch Alanin, Asparaginsäure, Tyrosin, Phenylalanin oder Prolin ersetzt. Bei W361A, W361D und W361P verlor das Protein seine antivirale Funktion komplett, gemessen an der relativen Koloniebildungseffizienz im Vergleich zum Wildtyp. Bei Ersetzen durch F oder Y blieb diese vermindert erhalten (Jiang *et al.*, 2008). Daraus lässt sich schließen, dass *Viperin* eine aromatische Aminosäure am C-Terminus für seine Funktion benötigt. Durch Verminderung des intrazellulären SAM-Spiegels wurde klar belegt, dass die antivirale Funktion von der Aktivität der Radikal-SAM-Domäne abhängig ist (Upadhyay *et al.*, 2014). Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unbekannt (Mattijssen & Pruijn, 2012). Für das Protein aus dem thermophilen Pilz *Thielavia terrestris* (58% Identität zum humanen Homolog) konnte Uridindiphosphat-Glucose als Substrat bestimmt werden (Honarmand Ebrahimi *et al.*, 2017). Daneben werden auch Isopentenylpyrophosphat oder CTP als Substrate diskutiert (Chakravarti *et al.*, 2018). Die Bedeutung des C-terminalen Tryptophans für die Funktion des Proteins ergibt sich durch die Vermittlung des essentiellen [4Fe-4S]-Clusters. W361 wird für die Bindung von *Viperin* an CIAO1 benötigt und stellt die Verknüpfung zur CIA-Maschinerie und somit zur erfolgreichen Beladung des Apoproteins mit dem essentiellen Cofaktor her (Upadhyay *et al.*, 2014).

1.6 Ziel der Arbeit

Fe/S-Cluster sind in allen Domänen des Lebens als bedeutende Cofaktoren zu finden. Sie üben in einer Vielzahl lebenswichtiger Prozesse eine essentielle Funktion aus. So sind Fe/S-Proteine an der DNA-Synthese und -Reparatur, der Proteintranslation, Aminosäurebiosynthesen und weiteren metabolischen Reaktionen beteiligt. Dabei ist der Fe/S-Cluster am Elektronentransport oder direkt an der enzymatischen Katalyse beteiligt, er vollführt jedoch auch regulatorische und stabilisierende Aufgaben. Auf Grund der elementaren Bedeutung dieser Proteine ist das Verständnis deren Biogenese, auch mit Hinblick auf Krankheiten, welche durch deren Dysfunktion begründet sind, von höchstem Interesse.

Das Prinzip der Fe/S-Clusterassemblierung ist in allen bekannten Biogenesewegen gleich und heutzutage allgemein akzeptiert. Es kann in zwei Abschnitte unterteilt werden, beginnend mit der *de novo* Assemblierung des Clusters auf einem Gerüstprotein(komplex), gefolgt von einem Transport und der Insertion in das Zielprotein (Lill, 2009). Es kann angenommen werden, dass die daran beteiligten Proteine weitestgehend identifiziert sind. In Eukaryoten sind heute über 30 Komponenten der verschiedenen Maschinerien bekannt (17 Mitglieder der ISC-, drei der ISC-Export- und elf der CIA-Maschinerie) (Lill *et al.*, 2015b). Trotz der Kenntnis der beteiligten Faktoren ist der genaue Ablauf der Biogenese noch unzulänglich erfasst. Beispielsweise gibt es keine genauen Erkenntnisse über die Quelle der eingebauten Eisenionen. Auch viele Jahre nach der Identifizierung der Cystein-Desulfurase ist die Natur der schwefelhaltigen Spezies, welche aus den Mitochondrien exportiert wird und der CIA-Maschinerie als Schwefelquelle dient, unklar. Des Weiteren ist der Transport des Clusters, von den Gerüstproteinen bis zur Insertion in die Targetproteine, noch nicht ausreichend beschrieben. Die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen auf molekularer Ebene ist jedoch unerlässlich für das Verständnis der Assemblierung von Fe/S-Clustern.

Neben den zu klärenden Abläufen der Funktionsweise der Fe/S-Clusterassemblierungsmaschinerien stellt sich auch die Frage nach der Erkennung der entsprechenden Zielproteine. Wie erkennt eine eukaryotische Zelle, bei einer Genomgröße von 6.000 - 30.000, dass in 25 - 40 cytosolische und nucleäre Proteine ein Fe/S-Cluster eingebaut werden muss? Bisher wird ein spontaner Clustertransfer, angetrieben durch eine thermodynamisch begünstigte Bindestelle am Targetprotein, angenommen. Dies galt auch für die Assemblierung mitochondrialer Fe/S-Proteine, bis Maio *et al.* erstes Licht ins Dunkel brachten, indem sie eine Verbindung zwischen der mitochondrialen ISC-Maschinerie und einem konservierten LYR-Motiv nahe dem N-Terminus in Targetproteinen herstellten (Maio *et al.*, 2014). Solch ein hochselektiver, Protein-geleiteter Prozess sollte auch für den cytosolischen Biogeneseweg angenommen werden.

Eine molekulare Determinante für die Erkennung könnte das Tripeptid L(D/E)W am C-Terminus von cytosolischen Fe/S-Proteinen sein. Bei bioinformatischen Analysen stellte

Prof. A. J. Pierik fest, dass Targets der CIA-Maschinerie gehäuft dieses Motiv, vor allem aber ein C-terminales Tryptophan, konserviert aufweisen. Tryptophan ist die Aminosäure mit dem geringsten Vorkommen im gesamten Proteom. Das Auftreten dieser Aminosäure am C-Terminus eukaryotischer Proteinen beträgt lediglich 1,4 - 1,7 % (Gatto & Berg, 2003). Bei cytosolischen bzw. nucleären Fe/S-Proteinen ist jedoch bei 22 % ein C-terminales Tryptophan zu finden. Es ist schwer vorstellbar, dass diese Begebenheit ein Zufall ist. Die Tatsache, dass sich die Fe/S-Proteine mit C-terminalem Motiv nicht in eine bestimmte Gruppe einteilen lassen, deutet darauf hin, dass dieses Tripeptid keine Funktion des jeweiligen Proteins ausübt, sondern vielmehr eine Signalsequenz sein könnte. Diese Annahme wird von Prof. A. J. Pierik als „Tryptophan-Hypothese“ bezeichnet und sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Als erste Aufgabe sollte der Einfluss des C-terminalen Tripeptides auf den Einbau des Fe/S-Clusters in Apoproteine im Modellorganismus *S. cerevisiae* näher beleuchtet werden. Hierzu wurden drei cytosolische Fe/S-Proteine ausgewählt. Nar1 ist ein Fe-Hydrogenasen-homologes Protein, welchem eine Funktion des Clustertransportes innerhalb der CIA-Maschinerie selbst zugesprochen wird (Balk *et al.*, 2004). Auf Grund der Henne-Ei-Problematik stellte Nar1 ein sehr interessantes Untersuchungsobjekt dar. Apd1 wurde mit Hilfe der Tryptophan-Hypothese bei der Analyse des Genoms von *S. cerevisiae* als mögliches Fe/S-Protein identifiziert und im Arbeitskreis von Prof. A. J. Pierik als solches charakterisiert (Stegmaier, 2017). Die Isopropylmalat-Isomerase wird im verwendeten Modellorganismus, trotz Zugabe von Leucin im Medium, sehr stark exprimiert, weshalb ihre enzymatische Aktivität einfach zu verfolgen ist (Kispal *et al.*, 1999). Das Mitglied der Aconitaseproteinfamilie kann sehr gut mit verwandten Proteinen verglichen werden und stellte daher einen hervorragenden Gegenstand für die geplanten Untersuchungen dar. Dieses Enzym wurde bereits in Vorversuchen zu dieser Arbeit von A. Ebert eingesetzt (Ebert, 2014). Mittels gezielter Mutagenese sollte der C-Terminus der genannten Proteine verändert und durch zellbiologische und biochemische Methoden der daraus resultierende Effekt analysiert werden. Anschließend sollten die mutierten Varianten der IPMI in *E. coli* exprimiert und deren enzymatische Aktivität bestimmt werden. Aus den gewonnenen Erkenntnissen könnten Rückschlüsse auf einen Zusammenhang mit der CIA-Maschinerie gezogen werden, falls sich die Ergebnisse der eukaryotischen von den prokaryotischen Studien unterscheiden.

Im Falle eines festgestellten Einflusses des C-terminalen Tripeptides auf die Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine sollte in einem zweiten Abschnitt nach einem möglichen Interaktionspartner gesucht werden. Hierzu sollten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Bindestudien durchgeführt werden (Gibson *et al.*, 2015). Als mögliche Interaktionspartner des Peptidmotives sollten die Proteine des CIA-Targeting-Komplexes Cia1, Cia2 und Met18 betrachtet werden. Massenspektroskopisch-basierte Bindungsstudien mit dem Targeting-Komplex zur Identifikation unbekannter Fe/S-Proteine waren im humanen System weitaus erfolgreicher als in Hefe (Stehling *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2015). Da diese Proteinkomplexe

im Menschen möglicherweise stabiler und daher einfacher nachzuweisen sind, sollten ebenfalls deren humane Homologe eingesetzt werden.

In einem dritten Schritt sollte die Tryptophan-Hypothese angewendet werden, um prokaryotische Fe/S-Proteine in *S. cerevisiae* funktionell zu exprimieren. Hierzu sollte eine Sequenz mit einem C-terminalen Tryptophan an bakterielle Proteine fusioniert und deren Einfluss auf die enzymatische Aktivität untersucht werden. Im Falle einer erhöhten Enzymaktivität durch effizienteren Fe/S-Clustereinbau sollte festgestellt werden, ob diese Steigerung abhängig von der CIA-Maschinerie ist. Die Erkenntnisse aus diesen Studien sind für zukünftige biotechnologische Anwendungen von größtem Interesse.

2. Material

2.1 Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit fanden die in Tabelle 2.1 aufgeführten Laborgeräte Verwendung.

Tabelle 2.1: Geräte

Gerät	Hersteller, Modell
Agarosegelkammer	Biostep, HU10
Anaerobe Kammer	Coy Laboratory, Type B
Autoklav	Systemec, V-65
Biofreezer	Sanyo, Vip
Chromatographiesystem	GE Healthcare, ÄKTA start
Destille	QCS, Destomat Bi 18E
Digitalkamera	Canon, IXUS 132
DLS	Malvern, Zetasizer Nano
Dounce Homogenisator	Sartorius, Größe S & L
Eismaschine	CMM
Elektrophoresesystem	VWR, TV 100; BioRad, Mini-PROTEAN® Tetra System
Feinwaage	Mettler Toledo, XS 205 Dual Range
Fluoreszenz Lifetime Spektrometer	Pico Quant, Fluo Time 300
French Press	SLM Instruments, Aminco
Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat, Fusion SL
Inkubatoren	Thermo Scientific, Heratherm IGS100; Thermo Scientific, Heratherm IMC 18
ITC	GE Healthcare, MicroCal iTC200; VP-ITC
Kühlgefrierkombination	Beko, K6330-HC
Lamina	Heraeus, LaminAir HB 2448
Magnetisches Rack	GE Healthcare, MagRack 6
Magnetrührer	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik KMO2 electronic
Mikrowelle	Privileg, M401
Peristaltikpumpe	Pharma Fine Chemicals, P-1
pH-Meter	WTW, pH 522
Pipette	Eppendorf, Research plus 10; 20; 100; 200; 1000 µl; Brand, Transferpipette S 10 ml
Pipettierhilfe	Brand, accu-jet pro
Rotator	Stuart, SB3; neoLab, D-6050; Heidolph, Reax 2
Schüttelinkubator	Infors, HAT Multitron Pro; Thermo Scientific, Max Q 4000; New Brunswick Scientific, innova 4000

Material

Spannungsquelle	VWR, Power Source 300 V; BioRad, Power PAC 300
Spülmaschine	Miele, Mielabor Automatic G7733
Szintillationszähler	Beckman Coulter, LS 6500
Thermocycler	Hybaid, PCR Sprint
Thermomixer	CellMedia, Thermomixer pro; Eppendorf, Thermomixer comfort
Trockenschrank	Heraeus, T 5050; KTG 800
Ultrazentrifuge	Beckman, Optima LE-80K (Rotor: Type 70 Ti)
UV/Vis-Spektrophotometer	Thermo Scientific, Genesys 10 UV Scanning; Eppendorf, BioPhotometer plus
Vortexer	Phoenix Instrument, RS-VA 10; Heidolph, Reax 1 D
Waagen	Sartorius, 1413
Wippschüttler	VWR, Rocking Plattform 444-0145; IKA, Rocker 3D
Zentrifugen	VWR, Micro Star 17; Micro Star 17 R; VWR, Galaxy 16 DH; Sigma, 1-16; Eppendorf, 5810 R (Rotoren: A-4-62; F-45-30-11); Beckman Coulter, Avanti J-26S XP (Rotoren: JLA-8.1; JA-25.50)

2.2 Softwares

In der nachstehenden Tabelle 2.2 sind die genutzten Softwares aufgelistet.

Tabelle 2.2: Softwares

Software	Anwendung	Firma
Chromas	DNA-Sequenz-Analyse	Technelysium
Discovery Studio	Proteinstruktur-Simulation	Accelrys
Easy Tau	Fluoreszenz Lifetime Spektrometer	Pico Quant
ITC200	iTC200	MicroCal
Unicorn	Chromatographiesystem	GE Healthcare
Vision Capt	Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat
VISIONlite	UV/Vis-Spektrophotometer	Thermo Scientific
VPViewer	VP-ITC	MicroCal
Zetasizer Software	DLS	Malvern

2.3 Verbrauchsmaterialien

Der folgenden Tabelle 2.3 sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien zu entnehmen.

Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Drigalskispatel	Assistent
Falcons	Greiner Bio-One 15 ml; Sarstedt 50 ml
Filterpapier	Schleicher & Schnell
Glasperlen	Roth Ø 0,75-1,0 mm
Impfösen	Sarstedt
Kanülen	Braun
Konzentrator	Sartorius Vivaspin 10 MWCO PES
Kryoröhrchen	Sarstedt 2,0 ml
Küvetten	Sarstedt; Brand UV; Eppendorf 50 µl
Mikroplatte	TPP 96-Well
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare 0,45 µm
Petrischalen	Sarstedt 60 x 15 mm; 92 x 16 mm
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One 10 µl; Sarstedt 200 µl; 1000 µl
Reaktionsgefäße	Sarstedt 1,5 ml; Greiner Bio-One 0,2 ml; 2,0 ml
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One 5 ml; 10 ml
Spritzen	Braun 10 ml; 50 ml
Sterilfilter	Sarstedt 0,2 µm; VWR 0,2 µm
Verschlussfolie	Parafilm M

2.4 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Fertiglösungen sowie deren Bezugfirmen sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie bzw. Reagenz	Bezugsfirma
Aceton	VWR Chemicals
<i>cis</i> -Aconitat	Sigma-Aldrich
Adeninsulfat	Sigma-Aldrich
Agar-Agar Kobe I	Roth
Agarose LE	Biozym
Ammoniumacetat	AppliChem
Ammoniumeisen(III)-citrat	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	AppliChem
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich

Material

D(+)-Biotin	Roth
Bradford-Reagenz	AppliChem
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl α -D-galactopyranosid (X- α -Gal)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Fluka
BSA Fraction V (bovines Serumalbumin)	Roche
Calciumchlorid	Roth
<i>p</i> -Coumarsäure	Sigma-Aldrich
Cytochrom <i>c</i> aus Rinderherz	Sigma-Aldrich
Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs)	New England Biolabs Inc.
<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich
<i>N,N</i> -Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
1,4-Dithio-D,L-threitol (DTT)	Gerbu
Doxycyclin	Sigma-Aldrich
⁵⁵ Fe-Eisen(III)-chlorid	Perkin Elmer
Essigsäure	Roth
Ethanol (EtOH)	Sigma-Aldrich
Ethanol mit Butanol vergällt	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-di-Natriumsalz-Dihydrat	AppliChem
Fluorescein	Santa Cruz Biotechnology
Formiergas Arcal F5	AirLiquide
D(+)-Galactose	Roth
Gel Loading Dye Purple 6x	New England Biolabs Inc.
GelRed (Nucleinsäure-Färbung)	Biotium
D(+)-Glucose	Roth
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich
Glycerin	Roth
Glycin	AppliChem
Guanidinhydrochlorid	Roth
Harnstoff	Merck
Hefeextrakt	Roth
Hexaammincobalt(III)-trichlorid	Fluka
L-Histidin	USB
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem
Imidazol	AppliChem
Instant Blue (SDS-PAGE-Färbelösung)	Expedeon
Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	AppliChem
3-Isopropylmalat (threo Form)	Sigma-Aldrich
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumacetat	AppliChem
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumcyanid	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat	AppliChem
Kaliumhydroxid	AppliChem

Kanamycin	AppliChem
Kupfersulfat-Pentahydrat	AppliChem
Lachssperma-DNA	Invitrogen
LB-Medium Luria/Miller	Roth
L-Leucin	Sigma-Aldrich
Lithiumacetat-Dihydrat	Fluka
Lithiumsulfid	Sigma-Aldrich
Luminol	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
D(+)-Maltose-Monohydrat	Roth
Mangan(II)-chlorid	Fluka
β -Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Sigma-Aldrich
L-Methionin	USB
2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Serva
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Roth
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth
Natriumdeoxycholat (DOC)	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Natriumhydroxid	J.T. Baker
DL-tri-Natriumisocitrat	Sigma-Aldrich
Natriummalonat-Monohydrat	Sigma-Aldrich
Natriumsuccinat-Hexahydrat	Sigma-Aldrich
Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADP)	Biomol
2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG)	Sigma-Aldrich
Nourseothricin	Werner BioAgents
Pepton	Roth
pH-Eichlösungen	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Polyethylenglycol (PEG) 4000	Roth
Ponceau S	AppliChem
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid-Bisacrylamidlösung)	Roth
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich
Salzsäure	Sigma-Aldrich
Schwefelsäure	Fluka
Sorbitol	Roth
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich
Triethanolaminhydrochlorid	Merck
2,3,4-Trihydroxybenzophenon (Gallo)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem

Material

Triton X-100	Serva
Trypton	AppliChem
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Ultima Gold TM (Szintillationsflüssigkeit)	Perkin Elmer
Uracil	Sigma-Aldrich
<i>Yeast nitrogen base</i>	Formedium
<i>Yeast nitrogen base ohne Eisen</i>	Formedium
Wasserstoffperoxid	AppliChem

2.5 Enzyme

Die genutzten Enzyme sind in Tabelle 2.5 aufgeführt. Es wurden stets die vom Hersteller angegebenen Puffer eingesetzt und die empfohlenen Reaktionsbedingungen umgesetzt.

Tabelle 2.5: Enzyme

Enzym	Hersteller
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs Inc.
DNase A	AppliChem
NEBuilder HIFI DNA Assembly Master Mix	New England Biolabs Inc.
Phusion DNA-Polymerase	New England Biolabs Inc.
Restriktionsendonucleasen (<i>Bam</i> HI-HF, <i>Bgl</i> II, <i>Dpn</i> I, <i>Eco</i> RI-HF, <i>Hind</i> III-HF, <i>Kpn</i> I-HF, <i>Nco</i> I, <i>Nde</i> I, <i>Nhe</i> I, <i>Not</i> I-HF, <i>Sac</i> I-HF, <i>Sal</i> I-HF, <i>Sma</i> I, <i>Spe</i> I-HF, <i>Xho</i> I, <i>Xma</i> I)	New England Biolabs Inc.
RNAse A	AppliChem
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs Inc.
Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs Inc.
Zymolyase 20 T (<i>Arthrobacter luteus</i>)	Nacalai Tesque

2.6 Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Seren von immunisierten Kaninchen als Primärantikörper eingesetzt, welche uns von Prof. J. Herrmann und Prof. R. Lill überlassen wurden (siehe Tabelle 2.6). Die Herstellung von α -Leu1 erfolgte durch Immunisierung mit rekombinantem Hefe-Leu1-Protein (isoliert aus *E. coli*) am Tierhaus der TU Kaiserslautern unter der Verantwortung von Prof. J. Herrmann.

Tabelle 2.6: Antikörper und Konjugate

Antikörper (Konjugat)	eingesetzte Verdünnung	Quelle
α -Leu1	1:1000; 1:2000	Prof. J. Herrmann; Prof. R. Lill
α -Porin	1:2000	Prof. R. Lill
α -Nar1	1:1000	Prof. R. Lill
α -Cia1	1:500	Prof. R. Lill
α -Cia2	1:1000	Prof. R. Lill
α -Met18	1:1000	Prof. R. Lill
α -Mia40	1:10.000	Prof. J. Herrmann
α -SOD1	1:1000	Prof. J. Herrmann
Goat anti-rabbit IgG-HRP	1:5000	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit anti-FITC IgG-HRP-Konjugat	1:200	BioRad
Streptavidin-HRP-Konjugat	1:10.000	GE Healthcare

2.7 Größenstandards

Die Tabelle 2.7 beinhaltet die verwendeten Größenstandards.

Tabelle 2.7: Größenstandards

Standard	Größe	Hersteller
2-Log DNA Ladder	0,1-10,0 kb	New England Biolabs Inc.
Blue Prestained Protein Standard	11-190 kDa	New England Biolabs Inc.
Protein Marker III	6,5-212 kDa	AppliChem
Roti®-Mark Standard	14-212 kDa	Roth

2.8 Säulenmaterialien

Das verwendete Säulenmaterial ist der Tabelle 2.8 zu entnehmen.

Tabelle 2.8: Säulenmaterialien

Säulenmaterial	Hersteller
Amylose Resin High Flow	New England Biolabs Inc.
Ni-IDA Resin	Macherey-Nagel
Ni-NTA Agarose	Cube Biotech
Protein A Sepharose CL-4B	GE Healthcare
Sephadex G-25 M PD10 Columns	GE Healthcare
Strep-Tactin Superflow high capacity	IBA
Streptavidin Mag Sepharose	GE Healthcare

2.9 Peptide

Die verwendeten Peptide (siehe Tabelle 2.9) wurden von der Firma Sulfotools GmbH bezogen. Sie wurden HPLC-gereinigt und umlyophilisiert geliefert. Alle Peptide verfügen N-terminal über einen β -Alaninrest (dargestellt als β), welcher bei der Hälfte der synthetisierten Peptide als Linker für die Modifikation mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) dient.

Tabelle 2.9: Peptide. β entspricht einem β -Alaninrest

Peptidsequenz	Nr.	Organismus, Protein
β -ADLKLDW		<i>H. sapiens</i> , Viperin
β -ADLK LDA		<i>H. sapiens</i> , Viperin, W1A
β -PPGPEAW		<i>H. sapiens</i> , POL δ
β -PPGPEAA		<i>H. sapiens</i> , POL δ , W1A
β -DKVHQDW		<i>S. cerevisiae</i> , Leu1
β -DKVHQDA		<i>S. cerevisiae</i> , Leu1, W1A
β -YQSKL		<i>H. sapiens</i> , PTS1
(FITC)- β -ADLKLDW	1	<i>H. sapiens</i> , Viperin
(FITC)- β -ADLK LDA	2	<i>H. sapiens</i> , Viperin, W1A
(FITC)- β -PPGPEAW	3	<i>H. sapiens</i> , POL δ
(FITC)- β -PPGPEAA	4	<i>H. sapiens</i> , POL δ , W1A
(FITC)- β -DKVHQDW	5	<i>S. cerevisiae</i> , Leu1
(FITC)- β -DKVHQDA	6	<i>S. cerevisiae</i> , Leu1, W1A
(FITC)- β -YQSKL	7	<i>H. sapiens</i> , PTS1

2.10 Komplettsysteme

Zur Aufreinigung von DNA und zur Isolation von Plasmiden wurden folgende Kits verwendet (siehe Tabelle 2.10).

Tabelle 2.10: Komplettsysteme

Kit	Hersteller
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid (NoLid)	Macherey-Nagel

2.11 Oligonucleotide

Alle verwendeten Oligonucleotide wurden von der Firma Metabion bezogen. Sie lagen entsalzt und lyophilisiert vor, ab einer Länge von > 60 Basen wurden sie HPLC-gereinigt bestellt. Gemäß Herstellerangaben wurden 100 µM Stammlösungen in H₂O_{dd} angefertigt. Für die Anwendung wurden diese zehnfach verdünnt. Nachfolgend sind sie nach Verwendung sortiert aufgelistet.

In der folgenden Tabelle 2.11 sind die Oligonucleotide aufgeführt, welche für eine klassische Klonierung verwendet wurden (Scharf *et al.*, 1986). In der Regel erfolgte die Gestaltung nach diesem Schema:

ATG GTA – Restriktionsschnittstelle – 20-25 Nucleotide zur Hybridisierung.

Tabelle 2.11: Oligonucleotide zur klassischen Klonierung

Name	Sequenz (5'→3')	zur Klonierung von
Nar1_NP_SacI	ATG GTA GAG CTC TTT TTA AAA CAA TTT GTG GTG CTC G	p416_NP_Nar1, p414_NP_Nar1
Nar1_NT_KpnI	ATG GTA GGT ACC TTG CCT TAT GTG GTT TTC TAT TC	p416_NP_Nar1, p416_MET25_Nar1
Nar1_SpeI	ATG GTA ACT AGT ATG AGT GCT CTA CTG TCC GAG TCT G	p416_MET25_Nar1
NP_Nbp35_SacI	ATG GTA GAG CTC CCG TAA AGA TTC GCA AAT CAT TG	p416_Nbp35P_Nar1
NP_Nbp35_SpeI_rev	ATG GTA ACT AGT CTT GGA TAT CAC TTA TGT ATA CTG	p416_Nbp35P_Nar1
Leu1_CT_EcoRI	ATG GTA GAA TTC ATG AAG CCA TTT TTG ACT TTG G	pGADT7_Leu1D, pGBKT7_Leu1D
Leu1_CT_BamHI	ATG GTA GGA TCC TAC CAA TCC TGG TGG ACT TTA	pGADT7_Leu1D, pGBKT7_Leu1D
BirA_Leu1CT_for	ATG GTT CTC GAG GTC GAC GAA TTC CCC GGG	p426_FBA_BirA_Leu1CT
BirA_Leu1CT_rev	ATG GTA CTC GAG GTC GAC CAC TGT CTA CCA	p426_FBA_BirA_Leu1CT
LeuC_SpeI	ATG GTA CTA GTA TGG CTA AGA CGT TAT ACG AA	p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_Leu1CT p424_FBA_LeuC
LeuC_XhoI	ATG GTA CTC GAG TTA TTT AAT GTT GCG AAT GTC GGC	p424_FBA_LeuC
LeuD_SpeI	ATG GTA CTA GTA TGG CAG AGA AAT TTA TCA AAC ACA C	p426_FBA_LeuD_Leu1CT
LeuD_XhoI	ATG GTA CTC GAG ATT CAT AAA CGC AGG TTG TTT TGC	p426_FBA_LeuD_Leu1CT
Leu1LK_Spe_rev	ATG GTA ACT AGT GCT AGG TTT AGC AGG TGT ATC	p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_Leu1CT
Ecoli_XhoI_+10_f	ATG GTA CTC GAG ACT ACT TTC GAT AAA GTC CAC C	p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_+10
Ecoli_LeuD_XhoI_r	TCC ACC CTC GAG ATT CAT AAA CGC AGG	p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_+10
TH_Apd1_Nco1	ATG GTA CCA TGG CTT TTT TGA ATA TTT TCA AGC AAA AAC G	pGADT7_Apd1, pGBKT7_Apd1

Material

TH_Apd1_BamHI	ATG GTA GGA TCC TAC CAG CTT TGA TAT TTC TTA ATA C	pGADT7_Apd1, pGBKT7_Apd1
Cia1_NP_SacI	ATG GTA GAG CTC TTC CTT GTA AAA GAT AGT GTA AAT	p414_NP_Cia1
Cia1_NT_KpnI	ATG GTA GGT ACC TAA TTC TTG AAA AGA AGT ATA GCC	p414_NP_Cia1
Cia1_NcoI	ATG GTA CCA TGG CGT CTA TCA ATC TGA TTA AGT CT	pGADT7_Cia1, pGBKT7_Cia1
Cia1_XmaI	ATG GTA CCC GGG CTA CGC TGC TTT TTC TAG AGA CC	pGADT7_Cia1, pGBKT7_Cia1
SaccerCia1_BamHI	GGT AGG ATC CGC GTC TAT CAA TCT GAT TAA GTC	pET28aHisTEV_Cia1
SaccerCia1_SalI	TGG TAG TCG ACT ACG CTG CTT TTT CTA GAG ACC	pET28aHisTEV_Cia1, pBridge_Cia1_Cia2
Cia1_SmaI_for	ATG GTA CCC GGG ATG GCG TCT ATC AAT CTG ATT AAG	p426_FBA_BirA*_Cia1, pBridge_Cia1_Cia2
Cia1_XhoI_rev	ATG GTA CTC GAG CTA CGC TGC TTT TTC TAG AGA CC	p426_FBA_BirA*_Cia1, p426_FBA_Cia1, p424_FBA_Cia1
Cia1_SpeI_for	ATG GTA ACT AGT ATG GCG TCT ATC AAT CTG ATT AAG	p426_FBA_Cia1, p424_FBA_Cia1
CIAO1_NcoI_TH_for	ATG GTA CCA TGG ATG AAG GAC TCG CTG GTG CTG CTG	pGADT7_CIAO1, pGBKT7_CIAO1
CIAO1_SmaI_TH_rev	ATG GTA CCC GGG TCA GAG GCC TTC AGG CCG CTG ATA C	pGADT7_CIAO1, pGBKT7_CIAO1
Ciao1_NotI_for	ATG GTA GCG GCC GCA TGA AGG ACT CGC TGG TGC TGC TG	pBridge_Ciao1
Ciao1_BglII_rev	ATG GTA AGA TCT TCA GAG GCC TTC AGG CCG CTG ATA C	pBridge_Ciao1
Ciao1_KpnI_for	ATG GTA GGT ACC ATG AAG GAC TCG CTG GTG CTG CTG	pET28aHisTEV_CIAO1
Ciao1_SalI_rev	ATG GTA GTC GAC TCA GAG GCC TTC AGG CCG CTG ATA C	pET28aHisTEV_CIAO1
Cia2_NcoI	ATG GTA CCA TGG CTG AGT TTT TGA ATG AAA ATC CCG	pGADT7_Cia2, pGBKT7_Cia2
Cia2_XmaI	ATG GTA CCC GGG TTA CTT ACA AGT CAC TAA CAT CTT	pGADT7_Cia2, pGBKT7_Cia2
Cia2_NotI_for	TGG TAG CGG CCG CAT GTC TGA GTT TTT GAA TGA AAA TC	pBridge_Cia2
Cia2_BglII_rev	ATG GTA AGA TCT TTA CTT ACA AGT CAC TAA CAT C	pBridge_Cia2
Cia2_130_Kpn1_for	CTA ATC GGT ACC ATG GAT CTC ATT GAT GCT CAA G	pET28aHisTEV_Cia2_130
Cia2_130_Sal1_rev	ATG GTA GTC GAC TTA CTT ACA AGT CAC TAA CAT CTT	pET28aHisTEV_Cia2_130
FAM96B_EcoRI_TH_for	ATG GTA GAA TTC ATG GTA GGC GGC GGC GGG GT	pGADT7_FAM96B, pGBKT7_FAM96B, pBridge_Fam96B_Ciao1
FAM96B_BamHI_TH_rev	ATG GTA GGA TCC TCA GGA GCG GGC TGA CAG GCA CTG	pGADT7_FAM96B, pGBKT7_FAM96B
Fam96B_KpnI_for	CTA ATC GGT ACC ATG GTA GGC GGC GGC GGG GT	pET28aHisTEV_FAM96B
Fam96B_SalI_rev	ATG GTA GTC GAC TCA GGA GCG GGC TGA CAG GCA CTG A	pET28aHisTEV_FAM96B, pBridge_Fam96B_Ciao1
MMS19_360_KpnI_for	ATG GTA GGT ACC GAG TTA GCT GCC CAG AGT GTG ACA C	pET28aHisTEV_MMS19_360

MMS19_590_KpnI_for	ATG GTA GGT ACC AAG GAC CAG CTG TGC TCA CTG GTA T	pET28aHisTEV_MMS19_590
MMS19_SalI_rev	ATG GTA GTC GAC TCA GCT GCC AGG GCT CCC CAA CAG A	pET28aHisTEV_MMS19_360/590, pMAL_c5X_MMS19_360/590
MMS19_360_NotI_for	GGT AGC GGC CGC GAG TTA GCT GCC CAG AGT GTG ACA C	pMAL_c5X_MMS19_360
MMS19_590_NotI_for	GGT AGC GGC CGC AAG GAC CAG CTG TGC TCA CTG GTA T	pMAL_c5X_MMS19_590
Viperin_EcoRI_TH_for	ATG GTA GAA TTC ATG TGG GTG CTT ACA CCT GCT GC	pGADT7_Viperin, pGBKT7_Viperin
Viperin_BamHI_TH_rev	ATG GTA GGA TCC CTA CCA ATC CAG CTT CAG ATC AGC C	pGADT7_Viperin, pGBKT7_Viperin
GPAT_NcoI_TH_for	ATG GTA CCA TGG AGC TGG AGG AGT TGG GGA TCC GC	pGADT7_GPAT, pGBKT7_GPAT
GPAT_SmaI_TH_rev	ATG GTA CCC GGG CTA CCA TTC CAG CTC CAC AGG GTA	pGADT7_GPAT, pGBKT7_GPAT
hPex5_KpnI_for	ATG GTA GGT ACC ATG GAA TTT GAA CGT GCA AAA AGC	pET28aHisTEV_hPEX5
hPex5_SalI_rev	ATG GTA GTC GAC TTA CTG CGG CAG ACC AAA CAT GG	pET28aHisTEV_hPEX5
TAP_Nterm	ATG GTA ACT AGT ATG CTT GCG CAA CAC GAT GAA GC	p426_FBA_TAP_TEV_Leu1CT
TEV_TAP_Cterm	ATG GTA CTC GAG GCC ACC TTG AAA ATA TAA ATT TTC AGA GTC TAC TTT CGG CGC CTG	p426_FBA_TAP_TEV_Leu1CT
GSSLinker_QDW_for	ATG GTA CTC GAG GGT TCT TCC GGA TCA TCG GG	p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_ GSS
GSSLinker_QDW_rev	ATG GTA GAA TTC TTT GCA GGA AAG TTT TGA CC	p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_ GSS
TDH_KpnI_for	ATG GTA GGT ACC AGT TTA TCA TTA TCA ATA CTG CC	pBridge_Cia1_TDH_Cia2

Die Tabelle 2.12 beinhaltet Oligonucleotide, welche zur Klonierung mittels homologer Rekombination verwendet wurden. Die Gestaltung der Primer erfolgte nach Oldenburg *et al.*, 1997. Sie sind 50 Nucleotide lang, wobei die 30 Nucleotide am 5'-Ende identisch zum Vektorgerüst an der Stelle sind, an welcher das Gen eingefügt werden soll. Die 20 Nucleotide am 3'-Ende dienen der Hybridisierung mit den PCR-Amplifikaten. Um die Überprüfung zu erleichtern, beinhaltet die identische Region nach Möglichkeit eine Restriktionsschnittstelle.

Tabelle 2.12: Oligonucleotide zur Klonierung mittels homologer Rekombination

Name	Sequenz (5'→3')	zur Klonierung von
YC01_AD_Met18_for	GAC GTA CCA GAT TAC GCT CAT ATG GCC ATG ACA CCA GAC GAA CTA AAT TC	pGADT7_Met18
YC02_AD_Met18_rev	CGA TGG ATC CCG TAT CGA TGC CCA CCC GGG TTA CTC GAA CGG GAT TTG G	pGADT7_Met18
YC03_BK_Met18_for	ATC TCA GAG GAG GAC CTG CAT ATG GCC ATG ACA CCA GAC GAA CTA AAT TC	pGBKT7_Met18
YC04_BK_Met18_rev	CGG CCG CTG CAG GTC GAC GGA TCC CCG GGT TAC TCG AAC GGG ATT TGG	pGBKT7_Met18

Material

YC08_AD_Leu1_for	GAC GTA CCA GAT TAC GCT CAT ATG GCC ATG GTT TAC ACT CCA TCC AAG GG	pGADT7_Leu1
YC09_AD_Leu1_rev	CGA TGG ATC CCG TAT CGA TGC CCA CCC GGG CTA CCA ATC CTG GTG GAC T	pGADT7_Leu1
YC10_BK_Leu1_for	ATC TCA GAG GAG GAC CTG CAT ATG GCC ATG GTT TAC ACT CCA TCC AAG GG	pGBKT7_Leu1
YC11_BK_Leu1_rev	CGG CCG CTG CAG GTC GAC GGA TCC CCG GGC TAC CAA TCC TGG TGG ACT	pGBKT7_Leu1
YC12_AD_MMS19_for	GAC GTA CCA GAT TAC GCT CAT ATG GCC ATG GCC GCT GCC GCG GCT GTG GA	pGADT7_MMS19
YC13_AD_MMS19_rev	CGA TGG ATC CCG TAT CGA TGC CCA CCC GGG TCA GCT GCC AGG GCT CCC C	pGADT7_MMS19
YC14_BK_MMS19_for	ATC TCA GAG GAG GAC CTG CAT ATG GCC ATG GCC GCT GCC GCG GCT GTG GA	pGBKT7_MMS19
YC15_BK_MMS19_rev	CGG CCG CTG CAG GTC GAC GGA TCC CCG GGT CAG CTG CCA GGG CTC CCC	pGBKT7_MMS19
YC16_426FBA_MMS19_re	CTA TAT CAA TTA ATT TGA ATT AAC TCG AGT CAG CTG CCA GGG CTC CCC	p426_FBA_His ₈ TEV _MMS19
YC17_426_8_MMS19_for	CGA CCG AAA ACT TGT ATT TCC AGG GCC ATA TGG CCG CTG CCG CGG CTG TG	p426_FBA_His ₈ TEV _MMS19
YC18_426_Met18_for	ACC GAA AAC TTG TAT TTC CAG GGC CAT ATG ACA CCA GAC GAA CTA AAT TC	p426_FBA_His ₈ TEV _Met18
YC19_426_Met18_rev	CTA TAT CAA TTA ATT TGA ATT AAC TCG AGT TAC TCG AAC GGG ATT TGG CC	p426_FBA_His ₈ TEV _Met18
YC20_426FBA_AcnA_for	CAT AAC CAA GTA ATA CAT ATT CAA ACT AGT ATG TCG TCA ACC CTA CGA G	p426_FBA_AcnA
YC21426FBAAcnALeuCTr	CAA ATT TTA ATA ATT TTG ATC CAC CCT CGA GTT ACT TCA ACA TAT TAC GAA TG	p426_FBA_AcnA_ Leu1CT
YC22_426FBA_AcnA_rev	CTA TAT CAA TTA ATT TGA ATT AAC TCG AGT TAC TTC AAC ATA TTA CGA ATG AC	p426_FBA_AcnA

Zur Klonierung mit Hilfe des NEBuilder HiFi DNA Assembly Kits wurden die in Tabelle 2.13 aufgeführten Oligonucleotide verwendet. Die Primer wurden nach Vorgabe der Firma New England Biolabs Inc. gestaltet. 25 Nucleotide der 50 Nucleotid-langen Primer am 3'-Ende dienen der Hybridisierung mit der DNA-Vorlage zur Amplifikation. Die 25 Nucleotide am 5'-Ende sind identisch zum Vektorgerüst, an welcher Stelle das Gen eingefügt werden soll; oder identisch zu einem weiteren PCR-Fragment, bei Klonierung mehrerer Fragmente in einem Schritt. Zur leichteren Überprüfung des klonierten Plasmids wurden Restriktionsschnittstellen mit eingefügt, deren Sequenz sich in der Mitte der Primer befindet.

Tabelle 2.13: Oligonucleotide zur Klonierung mittels NEBuilder

Name	Sequenz (5'→3')
NB_Cia2_1for	TCA CTA AAG GGA ACA AAA GCT GGA GCT CTT ACT TAC AAG TCA CTA ACA TC
NB_Cia2_2rev	GAA TTT TTG AAA ATT CAA TAT AAG TCG ACA TGT CTG AGT TTT TGA ATG AA
NB_Gal110_for	TTC ATT CAA AAA CTC AGA CAT GTC GAC TTA TAT TGA ATT TTC AAA AAT TC
NB_Gal110_rev	TTA GTT CGT CTG GTG TCA TCC CGG GTA TAG TTT TTT CTC CTT GAC GTT AA

Die Oligonucleotide, welche zum Splicing mittels Overlap Extension PCR eingesetzt wurden, werden in Tabelle 2.14 gezeigt. Es sind chimäre Primer, deren 3'-Ende der DNA-Amplifikation dient. Am 5'-Ende wird ein 20 Nucleotid-langer Überhang erzeugt, welcher in einer zweiten PCR-Reaktion mit dem zu fusionierenden DNA-Fragment hybridisiert (Geiser *et al.*, 2001).

Tabelle 2.14: Oligonucleotide zur Klonierung mittels Overlap Extension

Name	Sequenz (5'→3')
LeuC_Leu1_rev	CTT GAT CCT TAT ATT TAA TGT TGC GAA TGT CGG CG
LeuC_Leu1LK_for	TCG CAA CAT TAA ATA TAA GGA TCA AGA CCA AAG

Oligonucleotide, welche zur Mutagenese eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2.15 aufgelistet. Die Gestaltung der Mutagenese-Primer erfolgte nach Zheng *et al.*, 2004. Die teilkomplementären Primer sind in der Regel 33 Nucleotide lang. Der komplementäre Bereich (ca. 22 Basen) beinhaltet die einzuführende Mutation sowie gegebenenfalls eine stille Mutation, welche eine Kontrolle mittels Restriktionsverdau ermöglicht. Des Weiteren enthalten die Primer jeweils einen ca. 11 Nucleotide langen 3'-Überhang, welcher mit der DNA-Vorlage hybridisiert.

Tabelle 2.15: Oligonucleotide zur Mutagenese

Name	Sequenz (5'→3')
Zur Mutagenese von Nar1:	
Nar1_W_stopf	GAG CAC CTG ACT AGT AAG GTG TAG TTT TGC ACC
Nar1_W_stopr	CCT TAC TAG TCA GGT GCT CCC AAC AGA GAC GAG
Zur Mutagenese von Leu1:	
Leu1_mut_D1_for	ACC AGG ATT GAT AAC TAG TGA AAA ACA ACG TCC
Leu1_mut_D1_rev	TTC ACT AGT TAT CAA TCC TGG TGG ACT TTA TCG
Leu1_mut_D2_for	ACC AGT AGT ACT AGT CAG TGA AAA ACA ACG TCC
Leu1_mut_D2_rev	CTG ACT AGT ACT ACT GGT GGA CTT TAT CGA AAG
Leu1_mut_D10_for	ACA TAG ACT AGT GAT AAA GTC CAC CAG GAT TGG
Leu1_mut_D10_rev	GGA CTT TAT CAC TAG TCT ATG TAA CAG CTT TTC
Leu1_mut_D17_for	AAC GTT TAA ACT AGT AAA GCT GTT ACA TGT TAC
Leu1_mut_D17_rev	CAG CTT TAC TAG TTT AAA CGT TGT CAA ATT TTA
Leu1_mut_D26_for	GTG GAT AAA AAC TAG TAA AAT TTG ACA ACG TTC
Leu1_mut_D26_rev	TTT ACT AGT TTT TAT CCA CCT TCC AAG AAT GAG
Leu1_mut_D34_for	AAG AGA GTA ATA CTA GTT CTT GGA AGG TGG ATC
Leu1_mut_D34_rev	AAG AAC TAG TAT TAC TCT CTT CTC AAA GCT TCG
Leu1_mut_D+3_for	GAT TGG TCG ACA GTG TAA AAC AAC GTC CAA ACC
Leu1_mut_D+3_rev	TAC ACT GTC GAC CAA TCC TGG TGG ACT TTA TCG

Material

Leu1_mut_WA1_for	ACC AGG ATG CGT AAC TAG TGA AAA ACA ACG TCC
Leu1_mut_WA1_rev	TTC ACT AGT TAC GCA TCC TGG TGG ACT TTA TCG
Leu1_mut_DA2_for	ACC AGG CTT GGT AAC TAG TGA AAA ACA ACG TCC
Leu1_mut_DA2_rev	TTC ACT AGT TAC CAA GCC TGG TGG ACT TTA TCG
Leu1_mut_DWAA12_for	ACC AGG CTG CGT AAC TAG TGA AAA ACA ACG TCC
Leu1_mut_DWAA12_rev	TTC ACT AGT TAC GCA GCC TGG TGG ACT TTA TCG
Leu1_mut_HW4D3_for	GTC TGG TAG GAC TAG TAG ACA GTG AAA AAC AAC
Leu1_mut_HW4D3_rev	TCT ACT AGT CCT ACC AGA CTT TAT CGA AAG TAG
Leu1_mut_+4W_for	CGA CAG TGT GGT AGA ACG TCC AAA CCT GGC GTC
Leu1_mut_+4W_rev	GAC GTT CTA CCA CAC TGT CGA CCA ATC CTG GTG
Leu1_mut_+4W1WG_for	TGG GTC GAC AGT GTG GTA GAA CGT CCA AAC CTG
Leu1_mut_+4W1WG_rev	TCT ACC ACA CTG TCG ACC CAT CCT GGT GGA CTT
Leu1_mut_W1F_for	ACC AGG ATT TCT AAC TAG TGA AAA ACA ACG TCC
Leu1_mut_W1F_rev	TTC ACT AGT TAG AAA TCC TGG TGG ACT TTA TCG
Leu1_mut_W1Y_for	ACC AGG ATT ATT AAC TAG TGA AAA ACA ACG TCC
Leu1_mut_W1Y_rev	TTC ACT AGT TAA TAA TCC TGG TGG ACT TTA TCG
Leu1_mut_C360A_for	GGA TCT GCT ACC AAT GGC CGT ATT GAA GAT TTA
Leu1_mut_C360A_rev	TAC GGC CAT TGG TAG CAG ATC CAA TAA AGA CTT
Leu1_mut_C421A_for	CTG GTG CTT CAA TAT GTT TAG GTA TGA ACC CTG
Leu1_mut_C421A_rev	CCT AAA CAT ATT GAA GCA CCA GCT TCT CTC CAT
Leu1_mut_C424A_for	CTG GTT GTT CAA TAG CTT TAG GTA TGA ACC CTG
Leu1_mut_C424A_rev	CCT AAA GCT ATT GAA CAA CCA GCT TCT CTC CAT
Leu1_mut_C421A/C424A_for	CTG GTG CTT CAA TAG CTT TAG GTA TGA ACC CTG
Leu1_mut_C421A/C424A_rev	CCT AAA GCT ATT GAA GCA CCA GCT TCT CTC CAT
Leu1_mut_D3_pET_for	GTC CAC TAG TAT TGG TAG CTC GAG GAT CCG GC
Leu1_mut_D3_pET_rev	GCT ACC AAT ACT AGT GGA CTT TAT CGA AAG TAG
LeuD_Stopp_Leu1CTf	CGT TTA TGA ATT AAG AGG GTG GAT CAA AAT TAT
LeuD_Stopp_Leu1CTr	CCA CCC TCT TAA TTC ATA AAC GCA GGT TGT TTT
LeuD_QDW_for	GAA TCA GGA CTG GTG ATC AAA ATT ATT AAA ATT TGA CAA CG
LeuD_QDW_rev	GAT CAC CAG TCC TGA TTC ATA AAC GCA GGT TGT TTT GC
Leu1CT_mutWStop_for	TTA GTA GTC GAG CTC ATT CAA ATT AAT TGA TA
Leu1CT_mutWStop_rev	GAA TGA GCT CGA CTA CTA ATC CTG GTG GAC TTT
Leu1CT_mutWStop_for2	CCA GGA TTA GTA GTC GAG TTA ATT CAA ATT AAT TGA TAT AG
Leu1CT_mutWStop_rev2	AAC TCG ACT ACT AAT CCT GGT GGA CTT TAT CGA AAG

Zur Mutagenese von Apd1:

426_Apd1_D1for	CAA AGC TGA TAA GTC GAC CTC GAG GTT AAT TC
426_Apd1_D1rev	CGA GGT CGA CTT ATC AGC TTT GAT ATT TCT TA
426_Apd1_W316Afor	CAA AGC GCG TAA GTC GAC CTC GAG GTT AAT TC

426_Apd1_W316Arev	CGA GGT CGA CTT ACG CGC TTT GAT ATT TCT TA
426_Apd1_D3for	GAA ATA TTG AAG CTG ATA AGT CGA CCT CGA GG
426_Apd1_D3rev	GAC TTA TCA GCT TCA ATA TTT CTT AAT ACA GCG
426_Apd1_D6for	GCT GTA TTT AGT AAT AGC AAA GCT GGT AAG TCG
426_Apd1_D6rev	CTT TGC TAT TAC TAA ATA CAG CGA ACT TTT TCG

Zur Mutagenese von Cia1:

Cia1_mutR127E_for	GTT CCG AAG ATA AAA GCG TGT GGA TAT GGG AAA C
Cia1_mutR127E_rev	CAC ACG CTT TTA TCT TCG GAA CAG GTT GCT AGG
Cia1_mutY173A_for	CAA GTT CTG CTG ATG ACA CCG TCA GGA TAT GG
Cia1_mutY173A_rev	CGG TGT CAT CAG CAG AAC TTG AAG CCA GTA ATG

Zur Insertion von Restriktionsschnittstellen für den Austausch des Promotors der MCSII des Vektors pBridge:

Mut_KpnI_for	CAG GTA CCT CCG AGG CCT AGC TTC TAA TTC TTC
Mut_KpnI_rev	GCT AGG CCT CGG AGG TAC CTG GCA CGA CAG GT
Mut_SpeI_for	CAT CAC TAG TAT GGG CCA TAT GGC TTC TAG CTA
Mut_SpeI_rev	CAT ATG GCC CAT ACT AGT GAT GGG GGT AAT AGA

Zur Mutagenese von BirA:

BirA_mutR40G_for	TAG AGG TGG ATT GGG TAG AAA GTG GTT GTC TCA
BirA_mutR40G_rev	ACT TTC TAC CCA ATC CAC CTC TAC CTT TTG TTT
BirA_mut_Stop_for	ATC TTA GTA ATC CGG TTC TTC AGG TAG TTC TGG
BirA_mut_Stop_rev	TGA AGA ACC GGA TTA CTA AGA TCT TCT CAA GGA

Zum Austausch der Restriktionsschnittstellen im Vektor pET28aHisTEV:

NdeI_KpnI_for	TTT CCA GGG CGG TAC CGC TAG CAT GAC TGG TGG
NdeI_KpnI_rev	GCT AGC GGT ACC GCC CTG GAA ATA CAA GTT TTC

Zur Korrektur von p426_FBA_AcnA_Leu1CT:

AcnA_Leu1CT_for	GTT GAA GTT CCT CGA GGG TGG ATC AAA ATT ATT
AcnA_Leu1CT_rev	CCA CCC TCG AGG AAC TTC AAC ATA TTA CGA ATG

Die Tabelle 2.16 beinhaltet Oligonucleotide, welche zur Überprüfung von Plasmiden mittels Sequenzierung eingesetzt wurden.

Tabelle 2.16: Oligonucleotide für die Sequenzierung von Plasmiden

Name	Sequenz (5'→3')
pRS_4xx_SacI	GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG
pRS4xx_SeqTerm	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CG
MET-50_for	CTC TCT TGT CTT TTC ATC TAC
TDH3_new	GTA GGT ATT GAT TGT AAT TCT G

Material

Cyc-50_rev	GGA CCT AGA CTT CAG GTT G
FBAprom_seq-50	GTT ATT GTT CTT CCT TGC G
Fba_termseq	CTT CAG AAG AAA AGA GCC GAC
T7_seq_for	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC
TH_AD_seq_rev	AGA TGG TGC ACG ATG CAC AG
TH_BK_seq_rev1	ATC ATA AAT CAT AAG AAA TTC GCC
TH_BD_seq_for	TCA TCG GAA GAG AGT AG
MCSIIProm_seq_for	GCG CTC ACT GCC CGC TTT C
T7_forward	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
T7_reverse	TGC TAG TTA TTG CTC AGC GG
Mbp_seq_1004for	CGC AGA TGT CCG CTT TCT GG
pMal_c5x_for	ACT CAG GAG AGC GTT CAC
M13_pUC_rev(-48)	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG
His_seq310	CTC ACA GAC GCG TTG AAT TG
His_seq1439rev	GAG GCA CAT CTG CGT TTC AG
Nar1_seq148	GAG AAG GTC TCT ATT ACC C
Nar1_seq702	GAA ACT AGA AGC GTC AAG G
Leu1_seq_934for	CCA ATT ACT GGT TCC GTA CC
Leu1_seq_1090rev	GGC CAT TGG TAC AAG ATC C
Leu1_seq_1650f	TTT GGA AGG TAT TAG CGC ACC
Cia1_seq657rev	GTC GCT TCC ACT GCA CAG TC
Met18_seq_731for	CAG CTT TGC GAT CAG CAA
Met18_seq_1504 for	CCA GAG GAA GTT TCA CTA
MMS19_seq_718for	GAC CTC ATC CTG AGT CTT
MMS19_seq_1516for	GCA CTG GAA GCA TCA GGA
MMS19_seq_6293rev	AGC TCC TCA GCG AGC TTG
GPAT_seq_579for	CAT TTA CGC GGT GCG AGA
seq_cia2/Gal_688for	CTC AGA CAT GTC GAC TTA T
Leu1LK_seq	GCC ATA CTA GTG CTA GGT TTA G
AcnA_seq_1382rev	GCT TTG ACC CAT GGT TGC C
AcnA_seq1332f	GAT GGC CGC AGG CTT GCT G

Nachfolgend sind in Tabelle 2.17 Oligonucleotide aufgeführt, welche zur Modifizierung von Hefestämmen durch homologe Rekombination mit einer Gen-Kassette verwendet wurden. Die Primer wurden nach Janke *et al.*, 2004 entworfen. Sie sind 70 Nucleotide lang, wovon die 20 Nucleotide am 3'-Ende der DNA-Amplifikation der Gen-Kassette dienen und 50 Nucleotide am 5'-Ende identisch zu der DNA-Sequenz sind, an welcher Stelle die Kassette

in das Genom inseriert werden soll. Des Weiteren sind die Oligonucleotide zur PCR-Überprüfung der generierten Stämme enthalten.

Tabelle 2.17: Oligonucleotide zur Erzeugung und Überprüfung von Hefestämmen

Name	Sequenz (5'→3')	Stamm
Leu1_S1	GAA ATT GAC AGT TTT TGT CGC TAT CGA TTT TTA TTA TTT GCT GTT TTA AAT CAT GCG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>Δleu1</i>
Leu1_S2	CGC TGA GAC ACA TGT TAT TGA CGC CAG GTT TGG ACG TTG TTT TTC ACT GTC TAA TCG ATG AAT TCG AGC TCG	<i>Δleu1</i>
Aco1_S1	CAT AGT AGA ACG AAG GTA ATA AAT ACT ACC ATT ATT ACT ATA GAT ATA CAA TGC GTA CGC TGC AGG TCG AC	Gal_CIA1_Δ <i>aco1</i>
Aco1_S2	CAG AAG ACA AAA TAA ATA ATA ACC TTT AAA AGA TTA TAA CAA TGT TTT CAT TAA TCG ATG AAT TCG AGC TCG	Gal_CIA1_Δ <i>aco1</i>
GalCia2_S1	AGT CGA ATA TAA AAT CTT GCT ACT GCA TTA TTC TAC GAT TTC CTG TTA TCG TAC GCT GCA GGT CGA C	GalL_CIA2
GalCia2_S4	AGT TGG TTC TCC TCT AAA ATG TCG GGA TTT TCA TTC AAA AAC TCA GAC ATC GAT GAA TTC TCT GTC G	GalL_CIA2
TetO7_Nar1_for	TTT TAT GGT GAT GAC TAA GAA ACT TGT CTT GTC AGC TGG AAA GAT AAG AGC AGC TGA AGC TTC GTA CGC	Y187_TetO ₇ _NAR1
TetO7_Nar1_rev	GCG GGA CTG ATA AAA TCG TTT AGG TCA GAC TCG GAC AGT AGA GCA CTC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG	Y187_TetO ₇ _NAR1
TetO7_Nbp35_for	TAA ATA ACA TGT TTG TCC AAC AAC TCG TAG GCT AGG CTA AAC GTG AAG TCC AGC TGA AGC TTC GTA CGC	Y187_TetO ₇ _NBP35
TetO7_Nbp35_rev	TAC TCT GCT GGT AGC ACT TCG TCG TTT ACA TGT GGT AGT ATC TCA GTC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG	Y187_TetO ₇ _NBP35
Cia1_S1	GTA GAA ACG TTT GAA TTT AAG GAA TCT GAC TCT GAT GTG CAT AGC AGT GTC GTA CGC TGC AGG TCG AC	Gal_CIA1
Cia_S4	CAT ATC TTT TCC TTG TAA AGT TTC AAA GAC TTA ATC AGA TTG ATA GAC GCC ATC GAT GAA TTC TCT GTC G	Gal_CIA1
Nat_Nterm_rev	TGT CGT CAA GAG TGG TAC C	Nat-Kassette
Nat_Cterm	CCT AAT CTC GAG GCG AAT TTC	Nat-Kassette
Leu1_-122	CTC ACT CAT CAC GCT GTT TCC	<i>Δleu1</i>
Leu1_term	GCA TGC ATT AAC AAG GGC TAG C	<i>Δleu1</i>
Aco1_-110	GGA GGA GTA TGT TGC TTA ATT CC	Gal_CIA1_Δ <i>aco1</i>
Aco1_term	GTA CGT ACA ATA GGG GTA CTT	Gal_CIA1_Δ <i>aco1</i>
Cia2_prom_for	CGC AAT GCT TGG GTG TAC GG	GalL_CIA2
Cia2_rev	GAC TTA ACG GGT GCT CAG GG	GalL_CIA2
c_TetO7_449rev	CTA CAA AAG CCC TCC TAC CC	Y187_TetO ₇ _NAR1/NBP35
c_TetO7_3353for	GAC CAC ACC TCT ACC GGC	Y187_TetO ₇ _NAR1/NBP35
c_Nar1P_-359for	CCA CAT GCA ACC CCA TTG	Y187_TetO ₇ _NAR1
c_Nar1_521rev	GAA ATC CCG GAC ACA CAG CAG	Y187_TetO ₇ _NAR1
c_Nbp35P_-326for	CCA ACA TAG CGC CAT CTT C	Y187_TetO ₇ _NBP35
c_Nbp35_460rev	TGG CGG AAT CGT CTT CTG G	Y187_TetO ₇ _NBP35
Cia1_-350_rev	CTA GGT AAT ATC CAT CAT TCG	Gal_CIA1

2.12 Synthetische Gene

Als Template-DNA verwendete synthetische Gene, lineare doppelsträngige DNA Fragmente, werden in Tabelle 2.18 genannt. Sie wurden Codon-optimiert für den entsprechenden Expressionsorganismus bestellt und nach Herstellerangaben für die Verwendung in einem PCR-Ansatz vorbereitet.

Tabelle 2.18: Synthetische Gene

Synthetisches Gen	Organismus	Optimiert für	Hersteller
BirA_Leu1Cterm	<i>Aquifex aeolicus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Thermo Fisher
GSSLinker_and_pyrfur	fiktiv	<i>S. cerevisiae</i>	Thermo Fisher
<i>PEX5</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>E. coli</i>	Thermo Fisher

2.13 Plasmide

Die Sequenzen aller im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Plasmide wurden vor ihrer Verwendung mittels DNA-Sequenzierung durch die Firma SeqIT überprüft (siehe 3.2.9), um deren Korrektheit zu gewährleisten. Tabelle 2.19 bietet eine Übersicht über alle verwendeten Ausgangsplasmide. Die Vektoren p4xx werden auch als pRS4xx bezeichnet. Die p41x-Serie stellt Niedrigkopiezahlplasmide dar. Sie verfügen über einen centromeren Replikationsursprung, sodass pro Zelle nur eine Kopie vorliegt. Die p42x-Plasmide besitzen einen 2 μ -Replikationsursprung und sind Hochkopiezahlplasmide. Es liegen 10-30 Kopien pro Zelle vor (Mumberg *et al.*, 1995). Neben den typischen Hefevektorpromotoren *ADH1* (Alkohol-Dehydrogenase), *TDH3* (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und *MET25* (O-Acetylhomoserin-/ O-Acetylserin-Sulfhydrylase), wurden auch der *FBA*-Promotor (Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase) und die natürlichen Promotoren (NP) der zu untersuchenden Gene eingesetzt. Als auxotrophe Marker dienen *URA3* (Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase), *TRP1* (Phosphoribosylanthranilat-Isomerase) und *Leu2* (Isopropylmalat-Dehydrogenase). Genutzt wurden Resistenzgene gegen die Antibiotika Ampicillin (Amp) und Kanamycin (Kan).

Tabelle 2.19: Ausgangsplasmide

Name	Beschreibung	Promotor	Marker	Referenz/Quelle
p416_MET25	ohne Insert	<i>MET25</i>	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i>	Mumberg <i>et al.</i> , 1995
p426_TDH	ohne Insert	<i>TDH3</i>	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i>	Mumberg <i>et al.</i> , 1995
p414_MET25	ohne Insert	<i>MET25</i>	<i>Amp^R</i> , <i>TRP1</i>	Mumberg <i>et al.</i> , 1995
p424_TDH	ohne Insert	<i>TDH3</i>	<i>Amp^R</i> , <i>TRP1</i>	Mumberg <i>et al.</i> , 1995
p426_FBA	ohne Insert	<i>FBA</i>	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i>	Bechtel, 2015

p426_FBA_Leu1CT	ohne Insert, mit C-terminaler Verlängerung um 30 AS des <i>S. cerevisiae</i> Leu1-C-Terminus	<i>FBA</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	Bechtel, 2015
p424_FBA	ohne Insert	<i>FBA</i>	<i>Amp^R, TRP1</i>	diese Arbeit
pET28aHisTEV	ohne Insert, His ₆ -Tag, Spaltstelle für TEV-Protease	<i>T7</i>	<i>Kan^R</i>	Novagen
pET28aHisTEV_KpnI	ohne Insert, Mutation <i>NdeI</i> Schnittstelle zu <i>KpnI</i>	<i>T7</i>	<i>Kan^R</i>	diese Arbeit
pMAL_c5X	ohne Insert, MBP-Tag, Spaltstelle für Xa-Protease	<i>T7</i>	<i>Amp^R</i>	New England Biolabs Inc.
pGADT7	ohne Insert, Prey-Vektor für Y2H, mit GAL4 AD	<i>ADH1</i>	<i>Amp^R, LEU2</i>	Clontech, Singh <i>et al.</i> , 2014
pGBKT7	ohne Insert, Bait-Vektor für Y2H, mit GAL4 BD	<i>ADH1</i>	<i>Kan^R, TRP1</i>	Clontech, Singh <i>et al.</i> , 2014
pGBKT7-53	Plasmid zur Positivkontrolle für Y2H	<i>ADH1</i>	<i>Kan^R, TRP1</i>	Clontech, Singh <i>et al.</i> , 2014
pGADT7-T	Plasmid zur Positivkontrolle für Y2H	<i>ADH1</i>	<i>Amp^R, LEU2</i>	Clontech, Singh <i>et al.</i> , 2014
pGBKT7-Lam	Plasmid zur Negativkontrolle für Y2H	<i>ADH1</i>	<i>Kan^R, TRP1</i>	Clontech, Singh <i>et al.</i> , 2014
pBridge	ohne Inserts, Bait-Vektor für Y3H, mit GAL4 BD	<i>ADH1, MET25</i>	<i>Amp^R, TRP1</i>	Clontech, Tirode <i>et al.</i> , 1997
pASK_IBA43_Met18	zur Amplifikation von <i>S. cerevisiae</i> <i>MET18</i>		<i>Amp^R</i>	Antonio Pierik unveröffentlicht
pCMV-neo-Bam_CIAO1	zur Amplifikation von humanem <i>CIAO1</i>		<i>Amp^R</i>	Johnstone <i>et al.</i> , 1998
pOTB7_CIA2B	zur Amplifikation von humanem <i>FAM96B</i>		<i>Cam^R</i>	imaGenes GmbH Berlin GeneID: 51647
pCR4-Topo_MMS19	zur Amplifikation von humanem <i>MMS19</i>		<i>Amp^R</i>	Antonio Pierik Clone MHS4p426-99239063
pl.18_Viperin	zur Amplifikation von humanem <i>Viperin</i>		<i>Amp^R</i>	Upadhyay <i>et al.</i> , 2014
pcDNA3-GPAT	zur Amplifikation von murinem <i>GPAT</i>		<i>Amp^R</i>	Martelli <i>et al.</i> , 2007
pFA6a_natNT2	zur Amplifikation der <i>Nat</i> -Kassette		<i>Amp^R, natNT2</i>	Janke <i>et al.</i> , 2004
pYM15	zur Amplifikation der <i>HIS3MX6</i> -Kassette		<i>Amp^R, HIS3MX6</i>	Janke <i>et al.</i> , 2004
pYM-N27	zur Amplifikation des <i>GALL</i> -Promotors	<i>GALL</i>	<i>Amp^R, natNT2</i>	Janke <i>et al.</i> , 2004
pYM-N27_His	zur Amplifikation des <i>GALL</i> -Promotors	<i>GALL</i>	<i>Amp^R, HIS3MX6</i>	diese Arbeit
pCM225His	zur Amplifikation der <i>TetO₇-His</i> -Kassette		<i>Amp^R, HIS3MX6</i>	Netz <i>et al.</i> , 2010
pYM-N23	zur Amplifikation des <i>GAL1-10</i> -Promotors	<i>GAL1-10</i>	<i>Amp^R, natNT2</i>	Janke <i>et al.</i> , 2004
pYM13	zur Amplifikation des TAP-Tags		<i>Amp^R</i>	Janke <i>et al.</i> , 2004
p424_TDH_Met18	<i>S. cerevisiae</i> Met18	<i>TDH3</i>	<i>Amp^R, TRP1</i>	Antonio Pierik unveröffentlicht
p414_MET25_Myc_Nbp35	<i>S. cerevisiae</i> Nbp35, N-terminal Myc-Tag	<i>MET25</i>	<i>Amp^R, TRP1</i>	Netz <i>et al.</i> , 2012
p426_FBA_His ₈ TEV_Apd1	<i>S. cerevisiae</i> Apd1, N-terminal His ₈ -Tag	<i>FBA</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	Catharina Blinn unveröffentlicht

Die folgende Tabelle 2.20 enthält alle Plasmide zur Expression in *S. cerevisiae*, inklusive der Vektoren für Y2H bzw. Y3H.

Tabelle 2.20: Plasmide zur Expression in *S. cerevisiae*

Name	Beschreibung	Promotor	Marker	Referenz
p416_Nbp35P	ohne Insert	<i>NBP35</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_NP_Nar1	<i>S. cerevisiae</i> Nar1	<i>NAR1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_MET25_Nar1	<i>S. cerevisiae</i> Nar1	<i>MET25</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_Nbp35P_Nar1	<i>S. cerevisiae</i> Nar1	<i>NBP35</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_NP_Nar1_Δ1	<i>S. cerevisiae</i> Nar1, C-terminal 1 AS gekürzt, W491Stopp	<i>NAR1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_MET25_Nar1_Δ1	<i>S. cerevisiae</i> Nar1, C-terminal 1 AS gekürzt, W491Stopp	<i>MET25</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_Nbp35P_Nar1_Δ1	<i>S. cerevisiae</i> Nar1, C-terminal 1 AS gekürzt, W491Stopp	<i>NBP35</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p414_NP_Nar1	<i>S. cerevisiae</i> Nar1	<i>NAR1</i>	<i>Amp^R, TRP1</i>	diese Arbeit
p416_NP_Leu1	<i>S. cerevisiae</i> Leu1	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	Ebert, 2014
p416_NP_Leu1_Δ1	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C-terminal 1 AS gekürzt, W779Stopp	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_Δ2	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C-terminal 2 AS gekürzt, D778Stopp	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_Δ3	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C-terminal 3 AS gekürzt, Q777Stopp	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	Ebert, 2014
p416_NP_Leu1_Δ10	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C-terminal 10 AS gekürzt, T769Stopp	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_Δ17	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C-terminal 17 AS gekürzt, P762Stopp	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_Δ26	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C-terminal 26 AS gekürzt, S753Stopp	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_Δ34	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C-terminal 34 AS gekürzt, K745Stopp	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_+3	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C-terminal 3 AS verlängert, Stopp780STV	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_W1A	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, W779A	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_D2A	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, D778A	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_DW21AA	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, D778A_W779A	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_+4W	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C-terminal 4 AS verlängert, Stopp780STVW	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_W1G+4W	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C-terminal 4 AS verlängert, W779G_Stopp780STVW	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_H4WΔ3	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C-terminal 3 AS gekürzt, H776W_Q777Stopp	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_W1F	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, W779F	<i>LEU1</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit

p416_NP_Leu1_W1Y	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, W779Y	LEU1	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_C360A	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C360A	LEU1	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_C421A	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C421A	LEU1	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_C424A	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C424A	LEU1	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_C421A_C424A	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C421A_C424A	LEU1	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p416_NP_Leu1_C421A_C424A_Δ1	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, C421A_C424A, C-terminal 1 AS gekürzt, W779Stopp	LEU1	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p424_FBA_LeuC	<i>E. coli</i> LeuC	FBA	Amp ^R , TRP1	diese Arbeit
p426_FBA_LeuD	<i>E. coli</i> LeuD	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_LeuD_Leu1CT	<i>E. coli</i> LeuD, mit C-terminaler Verlängerung um 30 AS des <i>S. cerevisiae</i> Leu1-C-Terminus	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD	<i>E. coli</i> LeuC & LeuD, fusioniert durch <i>S. cerevisiae</i> Leu1 AS 481-541	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_Leu1CT	<i>E. coli</i> LeuC & LeuD, fusioniert durch <i>S. cerevisiae</i> Leu1 AS 481-541, mit C-terminaler Verlängerung um 30 AS des <i>S. cerevisiae</i> Leu1-C-Terminus	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_QDW	<i>E. coli</i> LeuC & LeuD, fusioniert durch <i>S. cerevisiae</i> Leu1 AS 481-541, C-terminal 3 AS QDW verlängert	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_+10	<i>E. coli</i> LeuC & LeuD, fusioniert durch <i>S. cerevisiae</i> Leu1 AS 481-541, mit C-terminaler Verlängerung um 10 AS des <i>S. cerevisiae</i> Leu1-C-Terminus	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_GSSLinker	<i>E. coli</i> LeuC & LeuD, fusioniert durch <i>S. cerevisiae</i> Leu1 AS 481-541, C-terminal verlängert um 25 AS synthetischer GSS-Linker + 3 AS QDW	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_Leu1CT_Δ1	<i>E. coli</i> LeuC & LeuD, fusioniert durch <i>S. cerevisiae</i> Leu1 AS 481-541, mit C-terminaler Verlängerung um 30 AS des <i>S. cerevisiae</i> Leu1-C-Terminus, C-terminal 1 AS gekürzt WStopp	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_Wstop	<i>E. coli</i> LeuC & LeuD, fusioniert durch <i>S. cerevisiae</i> Leu1 AS 481-541, mit mehrfachem Stopp-Codon	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_TAP_TEV_Leu1CT	30 AS des <i>S. cerevisiae</i> Leu1-C-Terminus, N-terminal TAP-Tag	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p416_NP_Apd1	<i>S. cerevisiae</i> Apd1	APD1	Amp ^R , URA3	Blinn, 2014
p416_NP_Apd1_Δ1	<i>S. cerevisiae</i> Apd1, C-terminal 1 AS gekürzt, W316Stopp	APD1	Amp ^R , URA3	Catharina Blinn unveröffentlicht
p416_NP_Apd1_Δ3	<i>S. cerevisiae</i> Apd1, C-terminal 3 AS gekürzt, Q314Stopp	APD1	Amp ^R , URA3	Catharina Blinn unveröffentlicht
p416_NP_Apd1_Δ6	<i>S. cerevisiae</i> Apd1, C-terminal 6 AS gekürzt, K311Stopp	APD1	Amp ^R , URA3	Catharina Blinn unveröffentlicht
p416_NP_Apd1_W1A	<i>S. cerevisiae</i> Apd1, W316A	APD1	Amp ^R , URA3	Catharina Blinn unveröffentlicht

Material

p426_FBA_His ₈ TEV_Apd1_Δ1	<i>S. cerevisiae</i> Apd1, N-terminal His ₈ -Tag, C-terminal 1 AS gekürzt, W316Stopp	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_His ₈ TEV_Apd1_Δ3	<i>S. cerevisiae</i> Apd1, N-terminal His ₈ -Tag, C-terminal 3 AS gekürzt, Q314Stopp	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_His ₈ TEV_Apd1_Δ6	<i>S. cerevisiae</i> Apd1, N-terminal His ₈ -Tag, C-terminal 6 AS gekürzt, K311Stopp	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_His ₈ TEV_Apd1_W1A	<i>S. cerevisiae</i> Apd1, N-terminal His ₈ -Tag, W316A	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_AcnA	<i>E. coli</i> AcnA	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_AcnA_Leu1CT	<i>E. coli</i> AcnA, mit C-terminaler Verlängerung um 31 AS des <i>S. cerevisiae</i> Leu1-C-Terminus	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p414_NP_Cia1	<i>S. cerevisiae</i> Cia1	CIA1	Amp ^R , TRP1	diese Arbeit
p414_NP_Cia1_R127E	<i>S. cerevisiae</i> Cia1, R127E	CIA1	Amp ^R , TRP1	diese Arbeit
p414_NP_Cia1_R127E_Y173A	<i>S. cerevisiae</i> Cia1, R127E, Y173A	CIA1	Amp ^R , TRP1	diese Arbeit
p424_Cia2_Gal1-10_Met18	<i>S. cerevisiae</i> Cia2, <i>S. cerevisiae</i> Met18	GAL1-10	Amp ^R , TRP1	diese Arbeit
p426_FBA_His ₈ TEV_MMS19	humanes MMS19, N-terminal His ₈ -Tag	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_His ₈ TEV_Met18	<i>S. cerevisiae</i> Met18, N-terminal His ₈ -Tag	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_BirA	<i>Aquifex aeolicus</i> BirA, 12 AS GSS-Linker, ohne Stopp-Codon zur weiteren Klonierung	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_BirA_Leu1CT	<i>Aquifex aeolicus</i> BirA, durch 12 AS GSS-Linker fusioniert mit 30 AS des <i>S. cerevisiae</i> Leu1-C-Terminus	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_BirA_Stopp	<i>Aquifex aeolicus</i> BirA	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_BirA*	<i>Aquifex aeolicus</i> BirA, R40G, 12 AS GSS-Linker, ohne Stopp-Codon zur weiteren Klonierung	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_BirA*_Leu1CT	<i>Aquifex aeolicus</i> BirA, R40G, durch 12 AS GSS-Linker fusioniert mit 30 AS des <i>S. cerevisiae</i> Leu1-C-Terminus	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_BirA*_Stopp	<i>Aquifex aeolicus</i> BirA, R40G	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_BirA*_Cia1	<i>Aquifex aeolicus</i> BirA, R40G, durch 12 AS GSS-Linker fusioniert mit <i>S. cerevisiae</i> Cia1	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_FBA_Cia1	<i>S. cerevisiae</i> Cia1	FBA	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p424_FBA_Cia1	<i>S. cerevisiae</i> Cia1	FBA	Amp ^R , TRP1	diese Arbeit
p426_MET25_BirA*_Stopp	<i>Aquifex aeolicus</i> BirA, R40G	MET25	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p426_MET25_BirA*_Cia1	<i>Aquifex aeolicus</i> BirA, R40G, durch 12 AS GSS-Linker fusioniert mit <i>S. cerevisiae</i> Cia1	MET25	Amp ^R , URA3	diese Arbeit
p424_MET25_Cia1	<i>S. cerevisiae</i> Cia1	MET25	Amp ^R , TRP1	diese Arbeit

p424_MET25	ohne Insert	<i>MET25</i>	<i>Amp^R, TRP1</i>	diese Arbeit
p416_MET25_BirA*_Stop	<i>Aquifex aeolicus</i> BirA, R40G	<i>MET25</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p416_MET25_BirA*_Cia1	<i>Aquifex aeolicus</i> BirA, R40G, durch 12 AS GSS-Linker fusioniert mit <i>S. cerevisiae</i> Cia1	<i>MET25</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p414_MET25_Cia1	<i>S. cerevisiae</i> Cia1	<i>MET25</i>	<i>Amp^R, TRP1</i>	diese Arbeit
p416_MET25_BirA*_Leu1CT	<i>Aquifex aeolicus</i> BirA, R40G, durch 12 AS GSS-Linker fusioniert mit 30 AS des <i>S. cerevisiae</i> Leu1-C-Terminus	<i>MET25</i>	<i>Amp^R, URA3</i>	diese Arbeit
p414_MET25_TAP_Leu1CT	30 AS des <i>S. cerevisiae</i> Leu1-C-Terminus, N-terminal TAP-Tag	<i>MET25</i>	<i>Amp^R, TRP1</i>	diese Arbeit

Expressionsplasmide für Y2H und Y3H:

pGADT7_Cia1	<i>S. cerevisiae</i> Cia1, mit GAL4 AD	<i>ADH1</i>	<i>Amp^R, LEU2</i>	diese Arbeit
pGBKT7_Cia1	<i>S. cerevisiae</i> Cia1, mit GAL4 BD	<i>ADH1</i>	<i>Kan^R, TRP1</i>	diese Arbeit
pGADT7_Cia2	<i>S. cerevisiae</i> Cia2, mit GAL4 AD	<i>ADH1</i>	<i>Amp^R, LEU2</i>	diese Arbeit
pGBKT7_Cia2	<i>S. cerevisiae</i> Cia2, mit GAL4 BD	<i>ADH1</i>	<i>Kan^R, TRP1</i>	diese Arbeit
pGADT7_Met18	<i>S. cerevisiae</i> Met18, mit GAL4 AD	<i>ADH1</i>	<i>Amp^R, LEU2</i>	diese Arbeit
pGBKT7_Met18	<i>S. cerevisiae</i> Met18, mit GAL4 BD	<i>ADH1</i>	<i>Kan^R, TRP1</i>	diese Arbeit
pGADT7_Leu1D	C-terminale 234 AS von <i>S. cerevisiae</i> Leu1, mit GAL4 AD	<i>ADH1</i>	<i>Amp^R, LEU2</i>	diese Arbeit
pGBKT7_Leu1D	C-terminale 234 AS von <i>S. cerevisiae</i> Leu1, mit GAL4 BD	<i>ADH1</i>	<i>Kan^R, TRP1</i>	diese Arbeit
pGADT7_Leu1	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, mit GAL4 AD	<i>ADH1</i>	<i>Amp^R, LEU2</i>	diese Arbeit
pGBKT7_Leu1	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, mit GAL4 BD	<i>ADH1</i>	<i>Kan^R, TRP1</i>	diese Arbeit
pGADT7_Apd1	<i>S. cerevisiae</i> Apd1, mit GAL4 AD	<i>ADH1</i>	<i>Amp^R, LEU2</i>	diese Arbeit
pGBKT7_Apd1	<i>S. cerevisiae</i> Apd1, mit GAL4 BD	<i>ADH1</i>	<i>Kan^R, TRP1</i>	diese Arbeit
pGADT7_CIAO1	humanes CIAO1, mit GAL4 AD	<i>ADH1</i>	<i>Amp^R, LEU2</i>	diese Arbeit
pGBKT7_CIAO1	humanes CIAO1, mit GAL4 BD	<i>ADH1</i>	<i>Kan^R, TRP1</i>	diese Arbeit
pGADT7_FAM96B	humanes FAM96B, mit GAL4 AD	<i>ADH1</i>	<i>Amp^R, LEU2</i>	diese Arbeit
pGBKT7_FAM96B	humanes FAM96B, mit GAL4 BD	<i>ADH1</i>	<i>Kan^R, TRP1</i>	diese Arbeit
pGADT7_MMS19	humanes MMS19, mit GAL4 AD	<i>ADH1</i>	<i>Amp^R, LEU2</i>	diese Arbeit
pGBKT7_MMS19	humanes MMS19, mit GAL4 BD	<i>ADH1</i>	<i>Kan^R, TRP1</i>	diese Arbeit
pGADT7_Viperin	humanes Viperin, mit GAL4 AD	<i>ADH1</i>	<i>Amp^R, LEU2</i>	diese Arbeit

Material

pGBKT7_Viperin	humanes Viperin, mit GAL4 BD	<i>ADH1</i>	<i>Kan^R</i> , <i>TRP1</i>	diese Arbeit
pGADT7_GPAT	murines GPAT, mit GAL4 AD	<i>ADH1</i>	<i>Amp^R</i> , <i>LEU2</i>	diese Arbeit
pGBKT7_GPAT	murines GPAT, mit GAL4 BD	<i>ADH1</i>	<i>Kan^R</i> , <i>TRP1</i>	diese Arbeit
pBridge_Ciao1	MCSII humanes CIAO1	<i>ADH1</i>	<i>Amp^R</i> , <i>TRP1</i>	diese Arbeit
pBridge_Fam96B_Ciao1	MCSI humanes FAM96B, mit GAL4 BD; MCSII humanes CIAO1	<i>ADH1</i> , <i>MET25</i>	<i>Amp^R</i> , <i>TRP1</i>	diese Arbeit
pBridge_Cia2	MCSII <i>S. cerevisiae</i> Cia2	<i>ADH1</i>	<i>Amp^R</i> , <i>TRP1</i>	diese Arbeit
pBridge_Cia1_Cia2	MCSI <i>S. cerevisiae</i> Cia1, mit GAL4 BD; MCSII <i>S. cerevisiae</i> Cia2	<i>ADH1</i> , <i>MET25</i>	<i>Amp^R</i> , <i>TRP1</i>	diese Arbeit
pBridge_Cia1_Cia2_KpnI	MCSI <i>S. cerevisiae</i> Cia1, mit GAL4 BD; MCSII <i>S. cerevisiae</i> Cia2, <i>KpnI</i> - Schnittstelle vor <i>MET25</i> -Promotor	<i>ADH1</i> , <i>MET25</i>	<i>Amp^R</i> , <i>TRP1</i>	diese Arbeit
pBridge_Cia1_Cia2_KpnI _SpeI	MCSI <i>S. cerevisiae</i> Cia1, mit GAL4 BD; MCSII <i>S. cerevisiae</i> Cia2, <i>KpnI</i> - Schnittstelle vor und <i>SpeI</i> -Schnittstelle nach <i>MET25</i> -Promotor	<i>ADH1</i> , <i>MET25</i>	<i>Amp^R</i> , <i>TRP1</i>	diese Arbeit
pBridge_Cia1_TDH_Cia2	MCSI <i>S. cerevisiae</i> Cia1, mit GAL4 BD; MCSII <i>S. cerevisiae</i> Cia2	<i>ADH1</i> , <i>TDH3</i>	<i>Amp^R</i> , <i>TRP1</i>	diese Arbeit

In Tabelle 2.21 sind alle verwendeten Plasmide zur Expression in *E. coli* aufgelistet. Es wurden ausschließlich Vektoren mit *T7lac*-Promotor eingesetzt, welche nur in Anwesenheit eines Inducers durch die T7-RNA-Polymerase transkribiert werden können.

Tabelle 2.21: Plasmide zur Expression in *E. coli*

Name	Beschreibung	Promotor	Marker	Referenz
pET15b_His-Leu1	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, N-terminal His ₆ -Tag	<i>T7</i>	<i>Amp^R</i>	Netz <i>et al.</i> , 2007
pET15b_His-Leu1_Δ3	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, N-terminal His ₆ -Tag, C-terminal 3 AS gekürzt durch Insertion Stopp-Codon	<i>T7</i>	<i>Amp^R</i>	diese Arbeit
pET15b_His-Leu1_Δ10	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, N-terminal His ₆ -Tag, C-terminal 10 AS gekürzt durch Insertion Stopp-Codon	<i>T7</i>	<i>Amp^R</i>	diese Arbeit
pET15b_His-Leu1_Δ17	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, N-terminal His ₆ -Tag, C-terminal 17 AS gekürzt durch Insertion Stopp-Codon	<i>T7</i>	<i>Amp^R</i>	diese Arbeit
pET15b_His-Leu1_Δ34	<i>S. cerevisiae</i> Leu1, N-terminal His ₆ -Tag, C-terminal 34 AS gekürzt durch Insertion Stopp-Codon	<i>T7</i>	<i>Amp^R</i>	diese Arbeit
pET28aHisTEV_CIAO1	humanes CIAO1, N-terminal His ₆ -Tag	<i>T7</i>	<i>Kan^R</i>	diese Arbeit
pET28aHisTEV_FAM96B	humanes FAM96B, N-terminal His ₆ -Tag	<i>T7</i>	<i>Kan^R</i>	diese Arbeit
pET28aHisTEV_MMS19_360	C-terminale 360 AS von humanem MMS19, N-terminal His ₆ -Tag	<i>T7</i>	<i>Kan^R</i>	diese Arbeit
pET28aHisTEV_MMS19_590	C-terminale 590 AS von humanem MMS19, N-terminal His ₆ -Tag	<i>T7</i>	<i>Kan^R</i>	diese Arbeit

pMAL_c5X_MMS19_360	C-terminale 360 AS von humanem MMS19, N-terminal MBP-Tag	T7	<i>Amp^R</i>	diese Arbeit
pMAL_c5X_MMS19_590	C-terminale 590 AS von humanem MMS19, N-terminal MBP-Tag	T7	<i>Amp^R</i>	diese Arbeit
pET28aHisTEV_Cia1	<i>S. cerevisiae</i> Cia1, N-terminal His ₆ -Tag	T7	<i>Kan^R</i>	diese Arbeit
pET28aHisTEV_Cia2_130	C-terminale 130 AS von <i>S. cerevisiae</i> Cia2, N-terminal His ₆ -Tag	T7	<i>Kan^R</i>	diese Arbeit
pET28aHisTEV_hPEX5	humanes PEX5, N-terminal His ₆ -Tag	T7	<i>Kan^R</i>	diese Arbeit

2.14 Bakterien- und Hefestämme

2.14.1 Bakterienstämme

Die verwendeten *E. coli*-Stämme und deren Eigenschaften werden in Tabelle 2.22 gezeigt. Klonierungen, Mutagenesen und Vervielfältigungen von Plasmiden mit einem Ampicillin-Resistenzgen wurden vorwiegend mit dem Laborstamm DH5 α durchgeführt. Bei Plasmiden mit einem Resistenzgen gegenüber Kanamycin oder bei schwierigen Klonierungen, wie auch bei aus Hefe präparierten Plasmiden, wurde auf NEB 10- β zurückgegriffen.

Zur heterologen Proteinexpression wurden BL21-Zellen herangezogen. Diese tragen das Gen T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lac*-Promotors und sind fähig, Plasmide mit T7-Promotor zu exprimieren.

Tabelle 2.22: *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Bemerkungen
NEB 5- α (DH5 α)	fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 ϕ 80 Δ (lacZ)M15 gryA96 recA1 endA1 thi-1 hsdR17	hohe Transformations- und Replikationseffizienz, hohe Plasmidstabilität
NEB 10- β	Δ (ara-leu)7697 araD139 fhuA Δ lacX74 galK16 galE15 e14- ϕ 80dlacZ Δ M15 recA1 endA1 nupG rpsL (Str ^R) rph spoT1 Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)	wie NEB 5-a, erhöhte Resistenz gegenüber Kanamycin, höhere Transformationseffizienz großer Plasmide
BL21(DE)	fhuA2[lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS λ DE3 = λ sBamHI ϕ Δ EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 Gen 1) i21 Δ ini5	Proteasen-defizient, T7-Expressionsstamm

2.14.2 Hefestämme

Die eingesetzten Hefestämme sind der Tabelle 2.23 zu entnehmen. Der *S. cerevisiae* Laborstamm W303-1A, im Verlauf nur als W303 bezeichnet, dient in der vorliegenden Arbeit als Wildtyp (WT).

Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Hefestämme wurden mit einer Genkassette konstruiert. Diese wurde mittels PCR amplifiziert und durch homologe Rekombination an der

gewünschten Stelle in das Genom integriert. Die Selektion erfolgte durch einen in der Gen-Kassette enthaltenen Marker (Histidin (His)) oder Antibiotikum-Resistenz (Nat).

Die aus W303 hergestellten Deletionsstämme $\Delta leu1$ und $\Delta apd1$ verfügen über das *natNT2*-Gen als Selektionsmarker. Um Genkonversion und Wachstums- bzw. Phänotypeneffekte zu vermeiden, werden heterologe Marker auxotrophen vorgezogen. Auf Grund eines stabilen Phänotyps und dem WT vergleichbare Wachstumszeiten auf YP-Medium, hat sich der Einsatz des *nat* Gens, welches die Nourseothricin-N-acetyl-Transferase aus *Streptomyces noursei* codiert, bewährt (Goldstein & McCusker, 1999). Dieses Gen verleiht seinem Träger eine Resistenz gegenüber dem aminoglycosidischen Antibiotikum Nourseothricin (Nat) (Krügel *et al.*, 1993).

Der Stamm Y187 der Firma Clontech bildet die Grundlage des Y2H-Screenings. Die daraus generierten Tet-Stämme tragen das *HIS3MX*-Gen als Selektionsmarker. *HIS3MX6* entspricht dem *HIS5*-Gen aus *Schizosaccharomyces pombe*, welches fähig ist einen *HIS3*-auxotrophen *S. cerevisiae*-Stamm zu komplementieren (Wach *et al.*, 1997).

Sofern nicht anders angegeben, wird die Bezeichnung *GAL*-Promotor für den *GAL1-10*-Promotor verwendet.

Tabelle 2.23: Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
W303-1A	MATa leu2-3, 112 his3-11, 15 trp1-1 can1-100 ade2-1 ura3-1	Thomas & Rothstein, 1989
$\Delta leu1$	W303-1A leu1::natNT2	Ebert, 2014
$\Delta apd1$	W303-1A apd1::natNT2	Blinn, 2014
Δaco	W303-1A aco1::HIS3MX6	Hausmann <i>et al.</i> , 2008
Gal_NAR1	W303-1A pNAR1::HIS3-pGAL1-10	Balk <i>et al.</i> , 2004
Gal_CIA1	W303-1A pCIA1::HIS3-pGAL1-10	Balk <i>et al.</i> , 2005b
Gal_CFD1	W303-1A pCFD1::HIS3-pGAL1-10	Balk <i>et al.</i> , 2005b
Gal_NFS1	W303-1A pNFS1::HIS3-pGAL1-10	Mühlenhoff <i>et al.</i> , 2003
Gal_MET18	W303-1A pMET18::natNT2-pGALL	Stehling <i>et al.</i> , 2012
Gal_CIA2	W303-1A pCIA2::HIS3MX6-pGALL	diese Arbeit
Gal_NAR1_ $\Delta leu1$	Gal_NAR1 leu1::natNT2	diese Arbeit, Dittrich-Motzki, 2016
Gal_CIA1_ $\Delta leu1$	Gal_CIA1 leu1::natNT2	diese Arbeit, Dittrich-Motzki, 2016
Gal_CFD1_ $\Delta leu1$	Gal_CFD1 leu1::natNT2	diese Arbeit, Dittrich-Motzki, 2016
Gal_NFS1_ $\Delta leu1$	Gal_NFS1 leu1::natNT2	diese Arbeit, Dittrich-Motzki, 2016
Gal_CIA2_ $\Delta leu1$	$\Delta leu1$ pCIA2::HIS3MX6-pGALL	diese Arbeit

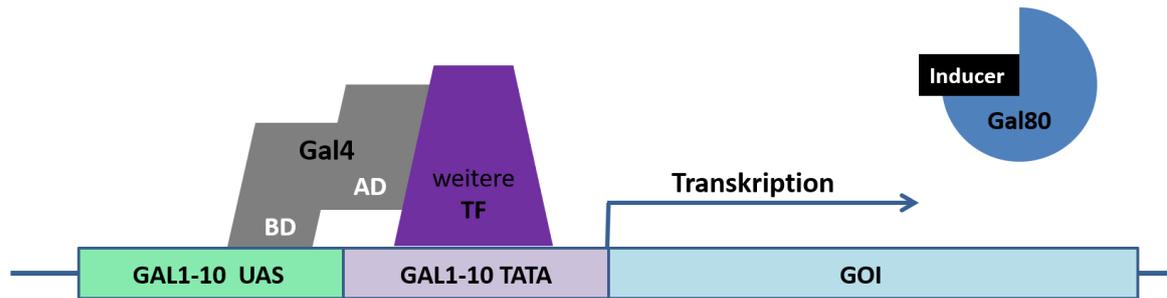
Gal_MET18_Δ <i>leu1</i>	Gal_MET18 <i>leu1::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
Gal_CIA1_Δ <i>aco1</i>	Gal_CIA1 <i>aco1::natNT2</i>	diese Arbeit
AH109	MATα <i>trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2 URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	Clontech
Y187	MATα <i>ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-3, 112 gal4Δ met⁻ gal80Δ URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993
Y187_TetO ₇ _NAR1	Y187 <i>pNAR1::HIS3MX6-pTetO7</i>	diese Arbeit
Y187_TetO ₇ _NBP35	Y187 <i>pNBP35::HIS3MX6-pTetO7</i>	diese Arbeit

2.14.3 GAL-Promotor

Da es nicht möglich ist, ein essentielles Gen zu deletieren, muss auf eine effektive Runterregulation dieses Gens zurückgegriffen werden. Hierfür bestens geeignet ist der starke *GAL1-10*-Promotor, eine Sequenz, die sowohl den Promotor der Kinase *GAL1* als auch der Epimerase *GAL10* des Galactosestoffwechsels enthält (Johnston & Davis, 1984). Beide Gene sind benachbart, werden jedoch divergent transkribiert, sodass sich die Promotorregionen überschneiden. Die Expression der zu regulierenden Gene ist durch die Wachstumsbedingungen beeinflussbar. Dient Glucose als Kohlenstoffquelle wird die Transkription nahezu vollständig unterdrückt; wird hingegen Galactose eingesetzt, wird die Expression tausendfach gesteigert (Mumberg *et al.*, 1994; Yocum *et al.*, 1984). Verantwortlich hierfür ist das Protein Gal4, welches an die UAS (*upstream activation sequence*), eine spezifische Bindesequenz innerhalb der DNA des *GAL1-10*-Promotors, bindet (Johnston, 1987). In Anwesenheit von Glucose erfolgt keine Aktivierung der Transkription, da die Funktion von Gal4 durch direkte Interaktion mit Gal80 antagonisiert wird. In Anwesenheit von Galactose jedoch bindet ein Inducer an Gal80 und verhindert so die Inhibierung von Gal4, die Transkription wird aktiviert; Abbildung 2.1 veranschaulicht dies.

Der ebenfalls eingesetzte *GALL*-Promotor ist eine verkürzte Variante des *GAL1-10*-Promotors (Mumberg *et al.*, 1994). Hierbei ist eine der drei UAS des *GAL1-10*-Promotors deletiert. Somit stellt der *GALL*-Promotor, im Vergleich zu *GAL1-10*, einen schwächeren Promotor dar.

Induktion mittels Galactose:



Repression mittels Glucose:

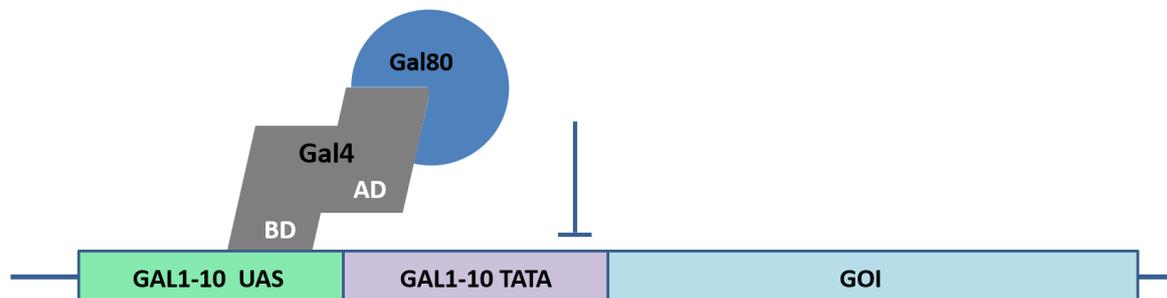


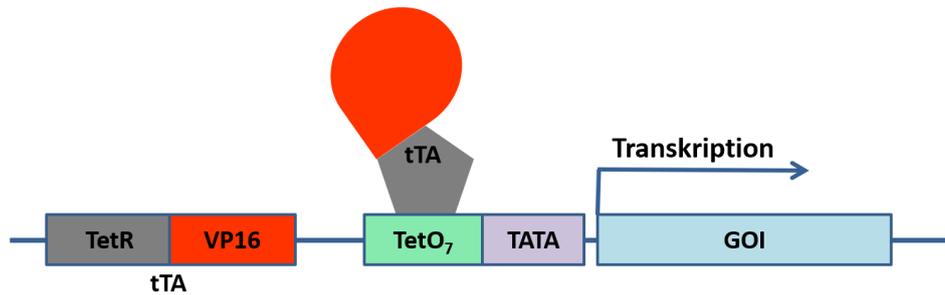
Abbildung 2.1: Grundlage des *GAL1-10*-Promotors. Die DNA-Bindedomäne BD des Transkriptionsfaktors Gal4 bindet an die UAS des *GAL1-10*-Promotors. In Anwesenheit von Galactose erfolgt eine Interaktion der Aktivator-domäne AD mit weiteren Transkriptionsfaktoren (TF). Dies führt zur Expression des zu regulierenden Zielgens GOI (*gene of interest*). Bei der Präsenz von Glucose wird die Interaktion der AD mit weiteren Transkriptionsfaktoren durch Gal80 inhibiert, es erfolgt keine Transkription.

2.14.4 *Tet*-Promotor

Eine Alternative zum *GAL1-10*-Promotor stellt der *Tet*-Promotor dar. Durch Zugabe des Antibiotikums Tetracyclin, bzw. dessen Derivaten, lässt sich ein Zielgen regulieren. Die Grundlage bildet ein tetracyclinabhängiger Transaktivator (tTA), welcher eine Fusion aus dem Tetracyclinrepressor (TetR) aus *E. coli* und der Aktivator-domäne des Virionproteins 16 (VP16) aus dem Herpes-Simplex-Virus darstellt (Gossen & Bujard, 1992). Des Weiteren befindet sich ein Tetracyclin-Response-Element (TRE), bestehend aus einer repetitiven Sequenz des Tetracyclinoperators (*TetO₇*) und einem Minimalpromotor (TATA), vor dem zu regulierenden Zielgen. Der TetR verfügt über ein TetO-Bindemotiv und verstärkt in Abwesenheit des Antibiotikums die Expression des Zielgens. Bei Anwesenheit von Tetracyclin wird tTA inhibiert; es erfolgt keine Bindung an TetO und damit einhergehend eine Runterregulation der Expression (siehe Abbildung 2.2). Bei dieser Anordnung handelt es sich um das direkte System, auch Tet-Off genannt, welches nicht mit dem reversen System, das durch Antibiotikumzugabe angeschaltet wird, verwechselt werden darf (Bellí *et al.*, 1998a). In *S. cerevisiae* zeigt das Tetracyclinderivat Doxycyclin (Doxy) die höchste Effektivität, sodass es auch in dieser Arbeit verwendet wurde (Garí *et al.*, 1997). Diese

Antibiotikumzugabe sollte keinen Einfluss auf das Wachstum bzw. die Wachstumsbedingungen der Hefezellen haben.

Induktion ohne Zugabe:



Repression mittels Doxycyclin:

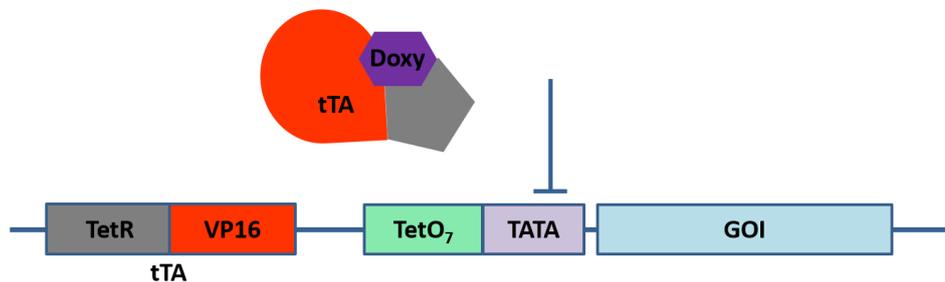


Abbildung 2.2: Grundlage des *TetO₇*-Promotors. Der tetracyclinabhängige Transaktivator tTA stellt ein Fusionsprotein aus dem Tetracyclinrepressor TetR aus *E. coli* und der Aktivator-domäne des Virionproteins 16 (VP16) aus dem Herpes-Simplex-Virus dar. In Abwesenheit eines Tetracyclinderivates bindet TetR an den Tetracyclinoperator *TetO₇* und ermöglicht so die Expression des Zielgens GOI. Durch Zugabe des Antibiotikums wird tTA inhibiert und somit die Transkription unterdrückt.

3. Methoden

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten mit lebenden Organismen erfolgten unter Berücksichtigung der Sicherheitsstufe S1 der Verordnung des Gentechnikgesetzes. Kontaminierte Medien, Lösungen und Materialien wurden nach Gebrauch ordnungsgemäß mittels Autoklavieren unschädlich gemacht.

Verwendete Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, in H₂O_{dd} gelöst. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte, unter Beachtung der eingesetzten Salze, mit HCl bzw. NaOH, Abweichungen hiervon werden angegeben.

3.1 Mikrobiologische Arbeiten

Alle zur Kultivierung von Zellen verwendeten Medien und Zusätze wurden in H₂O_{dd} gelöst und vor Gebrauch autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

3.1.1 Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium	
Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	10 g/l
NaCl	10 g/l
Ampicillin (1000x)	100 mg/ml
Kanamycin (1000x)	30 mg/ml

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB (lysogeny broth)-Medium (25 g/l) im Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 rpm (*revolutions per minute*). Als Antibiotikum wurde, in Abhängigkeit der verwendeten Plasmide, Ampicillin (Amp) mit einer Konzentration von 100 µg/ml oder Kanamycin (Kan) mit 30 µg/ml eingesetzt.

Zur Kultivierung auf Festmedium (LB-Agar-Platten) wurde das Nährmedium mit 15 g/l Agar und dem entsprechenden Antibiotikum in oben genannter Konzentration versetzt.

3.1.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

YP-Medium	
Hefeextrakt	10 g/l
Pepton	20 g/l
Adeninsulfat	80 mg/l
Kohlenstoffquelle	20 g/l

SC-Medium	
„yeast nitrogen base“	1,9 g/l
Ammoniumsulfat	5 g/l
Kohlenstoffquelle	20 g/l
Eisenarmes Medium	
„yeast nitrogen base“ ohne Fe	1,9 g/l
Ammoniumsulfat	5 g/l
Kohlenstoffquelle	20 g/l
Nourseothricin (1000x)	50 mg/ml
Doxycyclin	2,5 mg/ml in 75 % EtOH
2,3,4-Trihydroxybenzophenon (1000x)	100 mM
D(+)-Biotin (1000x)	10 mM in 0,1 M NaOH

Marker	Für 150 ml Marker-Mix	
L-Tryptophan	W	300 mg
L-Histidin	H	200 mg
Adeninsulfat	A	600 mg
L-Leucin	L	450 mg
Uracil	U	150 mg
L-Methionin	M	200 mg
L-Glutaminsäure	E	750 mg

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte in Vollmedium (YP) oder Minimalmedium (SC (synthetic complete)) im Schüttelinkubator bei 30 °C und 150 rpm (Sherman, 1991). Als Kohlenstoffquelle diente Glucose (Glu) bzw. Galactose (Gal) in Abhängigkeit des verwendeten Stammes oder Promotors bzw. der Erfordernisse des durchgeführten Experimentes. Um eine Karamellisierung zu vermeiden, wurden die Zuckerlösungen separat autoklaviert und vor Gebrauch mit dem Medium gemischt. Die Wahl des Mediums ist davon abhängig, ob bei dem Experiment ein Selektionsdruck benötigt wird. In diesem Fall wurde Minimalmedium verwendet, welchem, je nach Auxotrophie des Stammes, verschiedene Markersubstanzen (Einsatz 1 ml passender Marker-Mix pro 50 ml SC-Medium) zugesetzt werden mussten. Diente ein Antibiotikum als Selektionsdruck, waren sowohl Voll- als auch Minimalmedium möglich.

Zur Kultivierung auf Agarplatten wurde das Medium mit 20 g/l Agar und gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum bzw. den entsprechenden Markern versetzt.

3.1.3 Glycerinkultur von *S. cerevisiae*

Um eine Langzeitlagerung hergestellter Hefestämme zu ermöglichen, wurden Glycerinkulturen hergestellt. Hierzu wurden jeweils 1,2 ml einer YP-Übernachtskultur mit 400 µl Glycerin (70 % v/v (*volume per volume*)) versetzt, invertiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.1.4 Messung der optischen Dichte

Als Maß für das Wachstum von *E. coli*- und *S. cerevisiae*-Kulturen diente die Messung der optischen Dichte (OD) bei $\lambda = 600$ nm (Thermo Scientific, Genesys 10 UV Scanning Spektrophotometer), da bei dieser Wellenlänge die Extinktion nur von der Anzahl der Zellen in der Kultur abhängig ist. Auf diese Weise konnten Zellmengen abgeschätzt oder die Wachstumsfähigkeit verschiedener Stämme miteinander verglichen werden.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Mitte der 1980er Jahre von Kary Mullis entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase-chain-reaction, PCR*) ist ein *in-vitro*-Verfahren zur Vervielfältigung beliebiger DNA-Sequenzen (Saiki *et al.*, 1985). Es beruht auf der Fähigkeit der DNA-Polymerase, mit Hilfe passender Oligonucleotide (Primer), einzelsträngige DNA mit den entsprechenden komplementären Desoxyribonucleosidtriphosphaten (dNTPs) zu Doppelsträngen zu ergänzen. Die Reaktion wird in mehreren Zyklen wiederholt, wobei die synthetisierte DNA als Template in den weiteren Zyklen fungiert (Kettenreaktion). Ein Zyklus besteht aus drei Schritten. Beginnend mit der Denaturierung wird der Doppelstrang bei 98 °C in zwei Einzelstränge getrennt. Im nächsten Schritt, der Primerhybridisierung, erfolgt die Anlagerung (*annealing*) der Primer an komplementäre Sequenzen. Die Temperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur der Oligonucleotide. Bei der Elongation verlängert die DNA-Polymerase bei 72 °C das 3'-Ende der Primer zu einem neuen Doppelstrang. Somit wird der gewünschte DNA-Abschnitt exponentiell amplifiziert.

In dieser Arbeit wurde die PCR hauptsächlich präparativ zur Amplifikation von Genen für die Klonierung verwendet, aber auch analytisch zur Detektion von Genen nach homologer Rekombination bzw. von positiven Klonen im Rahmen einer Kolonie-PCR. Im ersten Fall wurde stets Phusion-Polymerase (NEB) verwendet, welche sich durch eine sehr geringe Fehlerrate auszeichnet. Im zweiten Fall wurde auf die Taq-Polymerase (NEB) zurückgegriffen (siehe 3.2.11).

Tabelle 3.1 zeigt ein Pipettierschema eines typischen PCR-Ansatzes. Das zugehörige PCR-Programm ist in Tabelle 3.2 dargestellt. Diente synthetische DNA (1 ng) oder Plasmid-DNA als Template (1-3 µl einer 1:100 Verdünnung (verd.)), betrug die Dauer der Denaturierung

3 min, wurde genomische DNA (1 µl 1:10 verd.) eingesetzt, erhöhte sich diese auf 5 min. In der Regel erfolgte die Hybridisierung bei $X = 56\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Elongationsdauer wurde der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes angepasst.

Tabelle 3.1: Pipettierschema PCR

PCR-Ansatz	
Template-DNA	1-3 µl
HF-Puffer	10 µl
Forward Primer	2,5 µl
Reverse Primer	2,5 µl
dNTPs	1 µl
DMSO (optional)	2,5 µl
Phusion-Polymerase	0,5 µl
H ₂ O _{dd}	ad 50 µl

Tabelle 3.2: PCR-Programm zur Amplifikation

Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
98 °C	3-5 min	1 Zyklus
98 °C	10 s	
X °C	30 s	35 Zyklen
72 °C	15-30 s/kb	
72 °C	10 min	1 Zyklus
4 °C	∞	

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird eingesetzt um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Durch Anlegen einer Spannung bewegt sich die auf das Gel geladene DNA zur Anode. Größere DNA-Fragmente werden hierbei stärker retardiert als kleinere. Ein Farbstoff (GelRed), welcher nach Bindung an die DNA unter UV-Licht fluoresziert, wird zur Visualisierung verwendet. Mit Hilfe des Größenstandards 2 log DNA-ladder (0,1 - 10 kb) können Größe und Menge der zu untersuchenden DNA-Fragmente auf Grund der Lage und Intensität der Banden abgeschätzt werden.

TAE-Puffer (50x)	
Tris	2 M
CH ₃ COOH	0,9 M
EDTA	0,1 M
pH-Wert auf 8,0 einstellen mit CH ₃ COOH	

Für die Agarosegelelektrophorese wurden stets 1%-ige (w/v (*weight per volume*)) Agarosegele eingesetzt. Hierzu wurde Agarose in TAE-Puffer 3 min in der Mikrowelle erhitzt und zu einem homogenen Gel gegossen. In dieser Arbeit wurden sowohl analytische als auch präparative Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Bei einer analytischen Probe betrug das Gesamtvolumen 10 µl, bei einer präparativen Probe bis zu 75 µl. Dabei wurde die DNA mit 1/6 Ladepuffer (Purple Loading Dye) und 1/10 DNA-Fluoreszenzfarbstoff (GelRed 1:100 verd.) angesetzt. Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 100 V angelegt, welcher die zu untersuchende DNA für 35 min bzw. die zu reinigende DNA für maximal 20 min ausgesetzt war.

3.2.3 Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen und Agarosegelen

Zur Trennung von DNA und Kontaminationen wie Agarose, Enzyme oder Nucleotide wurde das Kit „NucleoSpin® Gel and PCR clean up“ von Macherey-Nagel verwendet (Vogelstein & Gillespie, 1979). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben inklusive aller Waschschritte, jedoch ohne Vorheizen der Puffer. Eluiert wurde in 15 µl Elutionspuffer (TE).

3.2.4 Restriktionsverdau

Die biochemische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonucleasen wird als Verdau bezeichnet. Hierzu werden Typ IIP Restriktionsenzyme verwendet, welche spezifische, meist palindromische Schnittstellen erkennen und innerhalb dieser Sequenz schneiden. Die hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindung kann sowohl zu glatten Enden (*blunt ends*) als auch zu 3'- bzw. 5'-Überhängen (*sticky ends*) führen.

In dieser Arbeit wurde der Restriktionsverdau zur Klonierung oder zur Überprüfung positiver Klone eingesetzt. Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs Inc. bezogen. Pro Doppelverdau kamen 1,5 µl Enzym bei einem Gesamtvolumen von 50 µl zum Einsatz. Die Menge der zu spaltenden DNA betrug 0,5-1,5 µg. Bei einem analytischen Verdau wurden die Mengen um die Hälfte reduziert. Die Inkubationsbedingungen wurden nach den Angaben des Herstellers an das entsprechende Enzym angepasst. Nach erfolgter Restriktion wurde in schwierigen Fällen, zur Vermeidung einer Selbstligation, eine 5'-Dephosphorylierung mit antarktischer Phosphatase durchgeführt. Hierzu wurde dem Ansatz 5 µl antarktische Phosphatase-Puffer und 1 µl antarktische Phosphatase zugesetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. In Abhängigkeit von der Größe der abgetrennten Sequenzen wurde der Verdau anschließend über Agarosegelelektrophorese oder mittels „Clean up“ Kit (siehe 3.2.2, 3.2.3) aufgereinigt.

3.2.5 Ligation

Bei der Ligation werden zwei mit Restriktionsenzymen verdaute DNA-Fragmente unter Bildung einer Phosphodiesterbindung miteinander verknüpft. Im Zuge einer Klonierung ist es mittels Ligation möglich, ein gewünschtes Gen in einen geeigneten Vektor einzufügen. Voraussetzung ist, dass der Vektor und das zu inserierende DNA-Fragment durch Restriktionsendonucleasen so vorbereitet wurden, dass die Überhänge beider Moleküle kompatibel sind.

Für alle durchgeführten Ligationen wurde die T4 DNA-Ligase mit entsprechendem Puffer von New England Biolabs Inc. verwendet. In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurden in der Regel 100 ng Vektor mit entsprechender Menge x ng Insert mittels 0,5 µl Ligase 1 h bei 16 °C ligiert. Die optimale Menge an eingesetztem Insert ist abhängig von dessen Größe und lässt sich mit folgender Formel bestimmen:

$$x \text{ ng Insert} = \left(\frac{y \text{ ng Vektor} \cdot \text{Größe des Inserts [kb]}}{\text{Größe des Vektors [kb]}} \right) \cdot 3 \quad (3.1)$$

Der Ligationsansatz wurde ohne weitere Bearbeitung in kompetente *E. coli* Zellen transformiert (siehe 3.2.6).

3.2.6 Transformation von *E. coli*

Transformation bezeichnet die Aufnahme von freier DNA in kompetente Bakterien- bzw. Hefezellen.

Zu 100 µl kompetenten *E. coli*-Zellen wurden ca. 5 ng Plasmid oder der komplette Ligations- bzw. Mutageneseansatz gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für maximal 90 s und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde 40 min bei 37 °C und 850 rpm inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 5.000 rpm zentrifugiert (Sigma 1-16 oder VWR Galaxy) und 950 µl des Mediumüberstandes verworfen. Das Zellpellet wurde in dem verbliebenen Überstand resuspendiert und mittels eines Drigalski-Spatels auf LB-Platten, mit passendem Selektionsdruck, ausgestrichen. Die Inkubation der Platte erfolgte bei 37 °C für ca. 16 h über Nacht.

3.2.7 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetenz beschreibt die Fähigkeit Fremd-DNA aufzunehmen. Sie ist Voraussetzung einer Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA. In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchlässigkeit der Membran mit der Rubidiumchlorid-Methode erzeugt (Li, 2011).

SOB-Medium	
Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 mM
pH-Wert auf 7,0 einstellen	
Zusätze SOB-Medium	
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
MES	1 M
pH-Wert auf 6,2 einstellen mit KOH	
TFB	
MES	10 mM
RbCl	100 mM
MnCl ₂	45 mM
CaCl ₂	10 mM
[Co(NH ₃) ₆]Cl ₃	3 mM

Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurden 25 ml SOB (*super optimal broth*)-Medium mit dem gewünschten *E. coli*-Stamm über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Morgen wurde eine Großkultur aus 500 ml vorgewärmtem SOB-Medium und 36 ml 5 M NaCl-Lösung mit 2 % Übernachtskultur inokuliert und bei 30 °C und 200 rpm inkubiert bis, eine OD₆₀₀ = 0,5 erreicht war. Anschließend wurde die Kultur 15 min bei 4 °C und 4.000 rpm zentrifugiert (Beckman Coulter, Avanti J-26S XP, Rotor JLA-8.1), der Überstand verworfen und das Zellpellet vorsichtig in 50 ml eisgekühlter TFB-Lösung (*transformation buffer*) resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation folgte unter Rühren eine Zugabe von 1,75 ml DMSO. Nach weiteren 10 min Inkubation wurden jeweils 200 µl kompetente Zellen in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80 °C.

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

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse (Birnboim & Doly, 1979). In dieser Arbeit wurde ausschließlich das Kit „NucleoSpin® Plasmid“ von Macherey-Nagel verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben inklusive aller Waschschritte, jedoch ohne Vorheizen der Puffer. Eluiert wurde in der Regel in 30 µl. Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch bei 260 nm oder mittels analytischer Agarosegelelektrophorese (siehe 3.2.2) abgeschätzt.

3.2.9 Sequenzierung

Jedes klonierte oder mutagenisierte Plasmid wurde mittels Sequenzierung auf Korrektheit und Vollständigkeit geprüft. Die Bestimmung der Abfolge der Nucleotide innerhalb eines Plasmids wurde von der Firma SEQ-IT GmbH & Co. KG, Kaiserslautern nach der Methode von Sanger durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Hierzu wurde ein Reaktionsgefäß mit 5 µl DNA (Konzentration $c = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$) zusammen mit 1 µl passendem Sequenzierprimer (10 µM) eingeschickt. Mit einer Sequenzierung konnten ca. 700 – 800 Nucleotide zuverlässig bestimmt werden.

3.2.10 Gezielte Mutagenese

Mit Hilfe der gezielten Mutagenese (im engl. *site-directed mutagenesis*) ist es möglich, eine gezielte Veränderung in der Sequenz von DNA vorzunehmen. So können ein oder mehrere Nucleotide geändert, aber auch deletiert bzw. inseriert werden. Als Template dient ein Plasmid, welches den zu mutierenden Genabschnitt enthält. Des Weiteren werden die entsprechenden mutagenen Primer benötigt, welche nach Möglichkeit so gestaltet wurden, dass sie eine stille Mutation enthalten (Zheng *et al.*, 2004). Diese beinhaltet eine Schnittstelle eines Restriktionsenzym und ermöglicht so die schnelle Überprüfung des Mutageneserfolges. Nach der Amplifikation folgt ein Verdau mit *DpnI*, eine Restriktionsendonuclease mit der Fähigkeit spezifisch an Adenin methylierte DNA mit der Sequenz GATC zu schneiden, wodurch die Ausgangs-DNA abgetrennt werden kann. Diese wurde in *E. coli in vivo* synthetisiert und liegt somit methyliert vor, das mutierte PCR-Produkt hingegen ist unmethyliert.

Die Mutagenese wurde in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen durchgeführt (siehe Tabelle 3.4). Bei der ersten PCR wurde jeweils nur ein Primer eingesetzt (siehe Tabelle 3.3) und das Plasmid als Einzelstrang amplifiziert. Anschließend wurden 25 µl von Ansatz A mit 25 µl von Ansatz B vereinigt und 0,5 µl Phusion-Polymerase hinzugefügt, um in einer zweiten PCR einen Doppelstrang zu hybridisieren. Um das nicht-mutierte Template aus dem PCR-Ansatz zu entfernen, wurde ein Restriktionsverdau mit *DpnI* durchgeführt. Hierzu wurde 1 µl Enzym hinzugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die DNA gereinigt (siehe 3.2.3) und in *E. coli* transformiert (siehe 3.2.6). Am nächsten Tag wurden 6 ml LB-Medium mit einer Transformationskolonie inokuliert und für 16 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die daraus isolierte Plasmid-DNA (siehe 3.2.8) wurde, wenn möglich, durch Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese auf Richtigkeit geprüft, in jedem Fall aber durch Sequenzierung (siehe 3.2.9) kontrolliert.

Tabelle 3.3: Pipettierschema gezielte Mutagenese

Ansatz	A	B
H ₂ O _{dd}	35 µl	35 µl
HF-Puffer	10 µl	10 µl
Forward Primer	2,5 µl	-
Reverse Primer	-	2,5 µl
Plasmid (10-fach verd.)	1 µl	1 µl
dNTPs	1 µl	1 µl
Phusion-Polymerase	0,5 µl	0,5 µl

Tabelle 3.4: PCR-Programm gezielte Mutagenese

PCR 1		
Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
98 °C	30 s	1 Zyklus
98 °C	15 s	
55 °C	30 s	8 Zyklen
72 °C	3 min 30 s	
4 °C	∞	
PCR 2		
Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
98 °C	30 s	1 Zyklus
98 °C	15 s	
55 °C	30 s	18 Zyklen
72 °C	3 min 30 s	
72 °C	10 min	1 Zyklus
4 °C	∞	

3.2.11 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient der schnellen Überprüfung einer homologen Rekombination oder Klonierung ohne vorherige Isolation der DNA. Auf diese Weise ist es möglich, eine größere Anzahl an Klonen auf das gewünschte inserierte bzw. deletierte Gen zu untersuchen.

Für eine analytische PCR wurde eine minimale Menge einer *E. coli*- oder *S. cerevisiae*-Kolonie mittels einer 10 µl-Pipettenspitze in 36 µl H₂O_{dd} überführt, resuspendiert und 10 min bei 95 °C und 550 rpm erhitzt. Im Anschluss diente die freigesetzte DNA als Template für die PCR (siehe Tabelle 3.5 & Tabelle 3.6), deren Erfolg mittels Agarosegelelektrophorese überprüft wurde.

Tabelle 3.5: Pipettierschema Kolonie-PCR

PCR-Ansatz	
Hitze-behandelte Zellen	36 μ l
Thermopol-Puffer	5 μ l
Forward Primer	2,5 μ l
Reverse Primer	2,5 μ l
dNTPs	1 μ l
DMSO (optional)	2,5 μ l
Taq-Polymerase	0,5 μ l
H ₂ O _{dd}	ad 50 μ l

Tabelle 3.6: PCR-Programm Kolonie-PCR

Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
95 °C	3-5 min	1 Zyklus
95 °C	30s	
X °C	30 s	35 Zyklen
68 °C	1 min/kb	
68 °C	5 min	1 Zyklus
4 °C	∞	

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Transformation von *S. cerevisiae* und homologe Rekombination

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode (Ito *et al.*, 1983; Gietz *et al.*, 1992) und wurde angewandt, um Plasmide einzuführen, Plasmide in Hefe zu klonieren oder lineare DNA-Fragmente in das Hefegenom zu integrieren.

LiAc-Lösung	
Lithiumacetat-Dihydrat	100 mM
Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM
sterilfiltriert	
Lachssperma-DNA	10 mg/ml
PEG 4000	40 % in LiAc-Lösung
sterilfiltriert	

Hierzu wurden 50 ml YP-Medium mit einer YP-Übernachtskultur auf eine $OD_{600} = 0,25$ inokuliert und bei 30 °C und 150 rpm kultiviert, bis eine $OD_{600} = 0,8-1,2$ erreicht war. Mittels Zentrifugation (5 min, RT (Raumtemperatur), 3.500 rpm, Eppendorf 5810 R Rotor A-4-62) wurden die Zellen geerntet, das Pellet mit 10 ml H_2O_{dd} gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml LiAc-Puffer resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 7.000 rpm für 2 min zentrifugiert (Sigma 1-16 oder VWR Galaxy). Das daraus resultierende Pellet wurde in dem der OD_{600} entsprechenden Volumen (0,8-1,2 ml) LiAc-Lösung aufgenommen. Lachssperma-DNA wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die zu transformierende DNA (1-5 µg) bzw. verdünntes Plasmid (2 µl) wurden mit 2,5 µl der Lachssperma-DNA und 100 µl Zellsuspension sowie 700 µl PEG-Lösung versetzt und 30 min bei 30 °C und 550 rpm inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C bei einer Plasmid-Transformation für 15 min, bei einer Hefeklonierung für 30 min und bei einer homologen Rekombination für 45 min. Im Falle einer homologen Rekombination erfolgte nach dem Hitzeschock eine Erholungsphase, indem die Zellen pelletiert, in 1 ml YP Medium aufgenommen und 2-3 h bei 30 °C und 550 rpm inkubiert wurden. Im Anschluss wurde der Transformationsansatz bei 3.000 rpm für 3 min zentrifugiert (Sigma 1-16 oder VWR Galaxy), das Pellet mit 1 ml H_2O_{dd} gewaschen und erneut zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen in 100 µl H_2O_{dd} resuspendiert und auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsdruck ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C. Nach 2-4 Tagen wurden einzelne Kolonien auf eine frische Platte überimpft.

3.3.2 DNA-Isolation aus *S. cerevisiae*

Sorbitol-Puffer	
Sorbitol	0,9 M
EDTA	0,1 M
KPi (Kaliumphosphat-Puffer) pH 7,4	10 mM
Zymolyase	2 mg/ml
TE-Puffer	
Tris pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM
ETS-Puffer	
EDTA	0,28 M
Tris	0,22 M
SDS	2,2 % (w/v)
Kaliumacetat	5 M

Die Isolation chromosomaler Hefe-DNA erfolgte aus 10 ml Übernachtskultur. Hierzu wurde die Kultur 5 min bei RT und 3.500 rpm zentrifugiert (Eppendorf 5810 R Rotor A-4-62), das Zellpellet mit 5 ml H_2O_{dd} gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 900 µl

Sorbitol-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 100 µl Zymolyase und 1 µl β-Mercaptoethanol folgte eine Inkubation von 30 min bei 37 °C. Anschließend wurde 30 s bei 3.000 rpm zentrifugiert (ab jetzt immer VWR Micro Star 17), der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µl TE-Puffer resuspendiert. ETS-Puffer (30 µl) wurde hinzugefügt, vorsichtig invertiert und 30 min bei 60 °C inkubiert. Danach wurden 80 µl Kaliumacetatlösung zugegeben und 1 h auf Eis gekühlt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 ml EtOH gefällt, mittels Zentrifugation von 30 s bei 13.000 rpm isoliert und mit 1 ml 70 %-igem EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und die saubere DNA in 300 µl TE-Puffer gelöst. Die auf diese Weise gewonnene DNA kann in einer PCR eingesetzt werden.

3.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

S-Puffer	
Sorbitol	600 mM
Tris pH 7,5	100 mM
EDTA	20 mM
Zymolyase	2 mg/ml
RNAse A (hitzeinaktiviert)	1 mg/ml

Um ein mittels homologer Rekombination in *S. cerevisiae* ligiertes Plasmid aus der Hefezelle zu reisolieren, wurden 10 ml einer SC-Übernachtkultur in einem 2 ml Reaktionsgefäß bei 13.000 rpm pelletiert (VWR Micro Star 17), mit 1 ml H₂O_{dd} gewaschen und das Zellpellet in 500 µl S-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Zymolyase, 1 µl β-Mercaptoethanol und 25 µl RNAse A folgte eine Inkubation für 45 min bei 37 °C und 550 rpm. Anschließend wurden 500 µl Puffer A2 des Kits „NucleoSpin® Plasmid“ von Macherey-Nagel (siehe 3.2.8) zur alkalischen Lyse der genomischen DNA hinzugegeben und das Protokoll nach Herstellerangaben befolgt. Eluiert wurde die Plasmid-DNA mit 30 µl AE-Puffer und 12 µl hiervon wurden direkt in *E. coli* transformiert (siehe 3.2.6), im Folgenden kultiviert und mittels Minipräparation (3.2.8) isoliert.

3.3.4 Zellextraktpräparation von *S. cerevisiae*

Es wurden Gesamtzellextraktpräparate hergestellt, um die in Hefezellen exprimierten Proteine analysieren zu können. Um diese in ausreichender Menge zu bekommen, wurden die Zellen mechanisch mittels Glasperlen lysiert (Pierik *et al.*, 2009; Woontner & Jaehning, 1990). Nach Aufschluss der Zellen ist es notwendig die löslichen Bestandteile von den Zelltrümmern zu befreien.

TNETG-Puffer	
Tris pH 7,4	10 mM
NaCl	150 mM
EDTA pH 7,4	2,5 mM
Triton X-100	0,5 % (v/v)
Glycerin	10 % (v/v)
PMSF	0,2 M in EtOH

Für die Zellextraktpräparation wurden in der Regel 0,5 g Zellen (0,15 g bei Y2H Screen) verwendet. Hierzu wurde am Vortag eine 100 ml-Großkultur mit einer $OD_{600} = 0,1$ inokuliert. Nach Kultivierung über Nacht wurden die Zellen mittels Zentrifugation für 5 min bei RT und 3.500 rpm (Eppendorf 5810 R Rotor A-4-62) geerntet und mit H_2O_{dd} gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Nassgewicht bestimmt, welches zur Normierung der Zellmenge auf 0,5 g diente. Die entsprechende Menge resuspendierter Zellen wurde in ein 15 ml-Falcon überführt, pelletiert und entweder direkt aufgeschlossen oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um dies zu einem späteren Zeitpunkt zu tun.

Das Zellpellet wurde in der entsprechenden eisgekühlten TNETG-Puffer-Menge (bei 0,5 g Zellen 500 μ l) resuspendiert, mit 10 μ l PMSF und zwei Äquivalenten Glasperlen (meist 1 ml) versetzt. Es folgte der Aufschluss durch 60 s Vortexen „auf dem Kopf“, gefolgt von 60 s Kühlen auf Eis. Dieser Vorgang wurde stets dreimal durchgeführt. Durch Zentrifugation bei 2.000 g und 4 °C für 5 min wurden Glasperlen und nicht aufgeschlossene Zellen entfernt. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für weitere 10 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf 5810 R Rotor F-45-30-11 oder VWR Micro Star 17 R). Der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und stellt das Gesamtzellextrakt dar. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels der Micro-Biuret-Methode (siehe 3.4.4) bestimmt.

3.3.5 Mitochondrienpräparation von *S. cerevisiae*

Mittels Fraktionierung von Hefezellen können Mitochondrien isoliert werden, um deren Proteom zu analysieren (Daum *et al.*, 1982).

Mitoprep-Puffer 1	
Tris-SO ₄ pH 9,4	100 mM
DTT	10 mM
Mitoprep-Puffer 2	
Sorbitol	1,2 M
KPi pH 7,4	20 mM

2 x BB-Puffer	
Sorbitol	1,2 M
HEPES-KOH pH 7,4	40 mM
PMSF	1 mM

1 x BB-Puffer	
Sorbitol	0,6 M
HEPES-KOH pH 7,4	20 mM
PMSF	200 mM in EtOH

Damit die Mitochondrien gut ausgebildet sind, ist es wichtig, Galactose als Kohlenstoffquelle einzusetzen. Um ein Nassgewicht von 10 g Zellen zu erhalten, wurden 2l-Kulturen herangezogen. Hierfür wurde zwei Tage zuvor eine 20 ml-Kleinkultur inokuliert. Diese wurde einen Tag später in zweimal 100 ml-Vorkulturen überimpft. Die 2l-Kultur wurde mit der vorhandenen Zellmenge inokuliert und über Nacht kultiviert. Die Wachstumszeit ist von dem jeweiligen Hefestamm abhängig. Geerntet wurden die Zellen bei einer $OD_{600} = 1,2-1,5$. Hierzu wurde die Kultur 7 min bei RT und 1.600 g zentrifugiert (Beckman Coulter, Avanti J-26SXP, Rotor JLA-8.1), das Pellet mit 200 ml H_2O_{dd} gewaschen und unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Nassgewicht des Zellpellets bestimmt und hiervon 0,5 g Zellen für Kontrollexperimente entnommen. Die übrigen Zellen wurden in 30 ml Mitoprep-Puffer 1 resuspendiert, in ein 50 ml-Falcon überführt und 30 min bei 30 °C und 150 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation (7 min bei RT und 1.600 g; Eppendorf 5810R Rotor A-4-62) wurde das Pellet in 40 ml Mitoprep-Puffer 2 gewaschen, erneut zentrifugiert und zur Lagerung bei -20 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Um die Zellwand aufzubrechen, wurden die aufgetauten, in 40 ml Mitoprep-Puffer 2 resuspendierten Zellen mit 40 mg Zymolyase (± 4 mg/g Zellen) versetzt und 1 h bei 30 °C und 150 rpm inkubiert. Die erhaltenen Spheroplasten wurden zunächst 7 min bei RT und 1.600 g zentrifugiert (Eppendorf 5810R Rotor A-4-62), in 40 ml eisgekühltem Mitoprep-Puffer 2 resuspendiert und dann 7 min bei 4 °C und 1.600 g zentrifugiert (Eppendorf 5810R Rotor A-4-62). Dieser Waschschrift wurde wiederholt, bevor die Spheroplasten in 30 ml 2xBB-Puffer aufgenommen wurden. Das Gesamtvolumen wurde mit H_2O_{dd} , welches mit 1 mM PMSF versetzt war, auf 60 ml eingestellt. Der Aufschluss erfolgte mittels Dounce Homogenisierung. Hierzu wurde 20-mal Größe L und dreimal Größe S verwendet. Anschließend wurde die Suspension 5 min bei 4 °C und 1.950 g zentrifugiert, der Überstand in ein 50 ml-Falcon überführt und unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Aus diesem Überstand erfolgte die Separation der Zellbestandteile durch Zentrifugation für 12 min bei 2 °C und 12.000 g (Beckman Coulter, Avanti J-26SXP Rotor JA-25.50). Der generierte Überstand stellt die cytosolische Fraktion dar. Das mitochondrienhaltige Pellet wurde vorsichtig in 1 ml 1xBB-Puffer resuspendiert und mit dem gleichen Puffer auf ein Volumen von 30 ml gebracht. Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei

2 °C und 1.950 g abgetrennt. Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation, 12 min bei 2 °C und 12.000 g, aus dem Überstand erhalten. Sie wurden in 200 µl 1 x BB-Puffer aufgenommen, zur Analyse à 20 µl aliquotiert und zur Lagerung bei -80 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.3.6 Zellextraktpräparation von *E. coli*

Zur heterologen Genexpression, der Expression eines Genes eines fremden Organismus, in *E. coli* wurden Expressionsvektoren mit einem *T7lac*-Promotor verwendet. Dieser erlaubt nach Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) die Transkription des gewünschten Genes.

IPTG (1000x)	0,5 M
LEW-Puffer	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	50 mM
NaCl	300 mM
pH-Wert auf 8,0 einstellen, sterilfiltriert	

Für die Zellextraktpräparation aus *E. coli* wurde eine Großkultur (0,5 l, wenn nur das Zellextrakt von Interesse war, 2 l bei Proteinisolierung) mit 2 % einer entsprechenden BL21-Zellen-Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Für die Expression des Proteins Leu1 wurde das LB-Amp-Medium zusätzlich mit 3 % (v/v) EtOH versetzt, um unlösliche Proteinaggregate zu vermeiden (Thomas & Baneyx, 1997). Hatte die Kultur eine OD₆₀₀ = 0,5 erreicht, wurde die Temperatur auf 30 °C verringert und es erfolgte die Induktion der Expression durch 0,5 mM IPTG.

Nach Überexpression über Nacht wurde die Kultur am nächsten Morgen mittels Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 6.000 g (Beckman Coulter, Avanti J-26S XP, Rotor JLA-8.1) geerntet. Das Zellpellet wurde in 15 ml eisgekühltem LEW (Lyse-Equilibrierung-Wasch)-Puffer resuspendiert, in ein Falcon überführt und 15-30 min bei 4 °C und 4.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf 5810 R Rotor A-4-62). Anschließend wurde das Nassgewicht bestimmt und die Zellen direkt aufgeschlossen oder für eine spätere Proteinisolierung bei -20 °C eingefroren.

Das Pellet wurde in einem an die Zellmenge angepassten Volumen resuspendiert (in dem an die folgenden Aufreinigungsschritte angepassten Lysepuffer), mit DNase und 5 µl PMSF (200 mM in EtOH) pro 1 ml Zellsuspension versetzt und durch eine Kanüle gedrückt. Die Zellyse erfolgte mittels French Press bei 1000 PSI (≈ 70 bar) (Standard Pressure Cell (35 ml)). In ein Reaktionsgefäß wurde 1 ml dieses Aufschlusses überführt. Anschließend wurden die Zelltrümmer mittels Zentrifugation 2 x 15 min bei 4 °C und 14.000 rpm entfernt (Eppendorf 5810 R Rotor F-45-30-11). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß

überführt und stellt das Gesamtzellextrakt dar. Diente der Aufschluss der Proteinisolierung, wurde das komplette Lysat 70 min bei 4 °C und 30.000 rpm ultrazentrifugiert (Rotor Type 70 Ti).

3.3.7 Tüpfeltest

Mit Hilfe des Tüpfeltestes lassen sich Rückschlüsse über phänotypische Eigenschaften von Hefestämmen ziehen. So ist es in einem Deletionsstamm möglich zu untersuchen, ob mutierte Versionen des Gens von Interesse den Wachstumsphänotyp retten können.

Hierzu wurde eine Vorkultur (Stamm mit transformiertem Plasmid) ohne Regulator (Antibiotikum oder Glucose) gewaschen und in mehrere Kleinkulturen ($OD_{600} = 0,2$) mit unterschiedlichen Konzentrationen der regulierenden Substanz bzw. Kohlenstoffquelle aufgeteilt. Nach 16-stündigem Wachstum wurden die Kulturen geerntet, gewaschen und auf eine $OD_{600} = 0,5$ eingestellt. In einer Mikrotiterplatte wurde eine serielle Verdünnung (fünfmal 1:10) hergestellt (siehe Abbildung 3.1). Abschließend wurden mittels Mehrkanalpipette je 5 μ l jeder Verdünnung auf eine passende Agarplatte „getüpfelt“. Die Inkubation erfolgte für mehrere Tage bei 30 °C.

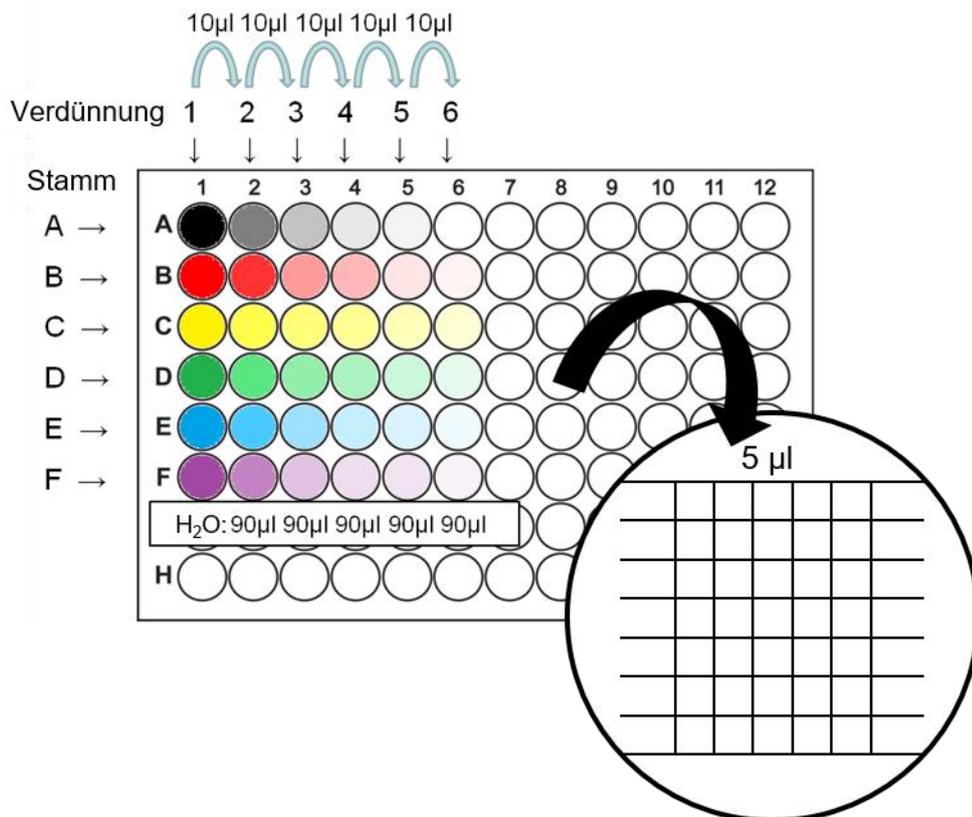


Abbildung 3.1: Pipettierschema Tüpfeltest. In einer 96-Well-Platte werden sechs Verdünnungen eines zu untersuchenden Hefestammes hergestellt. In Spalte 1 werden 100 μ l der auf $OD_{600} = 0,5$ eingestellten Vorkultur pipettiert. In den Spalten 2-6 werden jeweils 90 μ l H₂O_{dd} vorgelegt. Durch überführen von jeweils 10 μ l Zellsuspension in die folgende Spalte wird eine serielle Verdünnung hergestellt (von $OD_{600} = 0,5$ bis 1:100.000 verd.). Anschließend werden von jeder Verdünnung 5 μ l auf eine Agarplatte getüpfelt.

3.3.8 X-Gal-Methode

Das Hefe Two-Hybrid-System (Y2H) ist eine genetische Methode, um Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* zu detektieren (Fields & Song, 1989). Zwei funktionell essentielle Domänen eines Transkriptionsfaktors (Gal4) werden auf zwei separaten Plasmiden mit den zu untersuchenden Proteinen fusioniert und exprimiert. Interagieren diese zwei Proteine miteinander, sind auch die zwei Domänen des Transkriptionsfaktors indirekt miteinander verbunden und somit fähig die Transkription eines Reportergens zu aktivieren. Als Reportergen dient *lacZ* aus *E. coli*, welches die β -Galactosidase codiert. Das natürliche Substrat dieses Enzyms ist Lactose, welche in Galactose und Glucose gespalten wird. Die Aktivität der β -Galactosidase lässt sich einfach durch den Einsatz synthetischer Galactosidsubstrate beobachten. Zur qualitativen Analyse wird häufig 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) verwendet (Horwitz *et al.*, 1964). Dieses wird von der β -Galactosidase zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl hydrolysiert, welches in Gegenwart von O_2 zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo dimerisiert (siehe Abbildung 3.2). Um die Aktivität zu quantifizieren, eignet sich hingegen o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) (siehe 3.4.13).

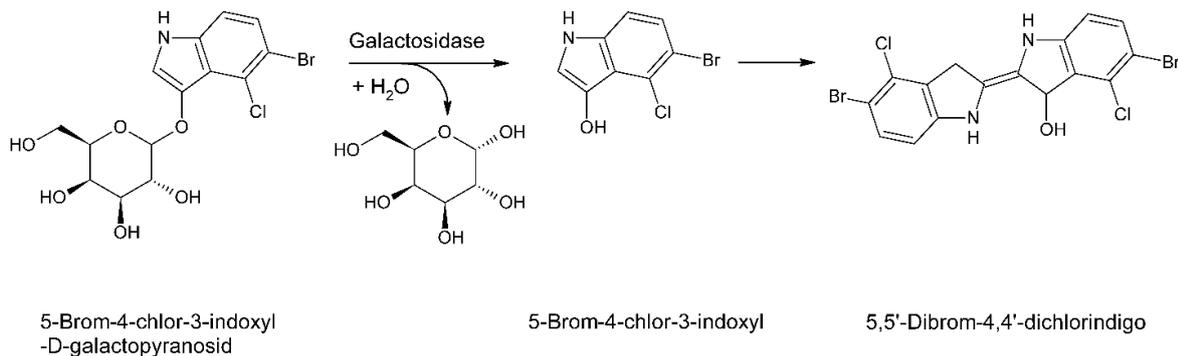


Abbildung 3.2: Die Umsetzung von X-Gal durch die β -Galactosidase. Das Spaltprodukt 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl oxidiert zu einem blauen Farbstoff.

Die X-Gal-Methode wird zur Identifikation positiver Klone auf Agarplatten durchgeführt. Die Auswertung erfolgt optisch und ist daher subjektiv. Des Weiteren ist der Übergang von negativ zu positiv fließend. Daher ist eine anschließende quantitative Analyse ratsam.

X- α -Gal 20 mg/ml in DMF

Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual. Zunächst wurde eine X- α -Gal-Stammlösung 1:10 verdünnt (DMF) und 100 μ l (bei $\varnothing = 92$ mm; 40 μ l bei $\varnothing = 60$ mm Petrischalen) gleichmäßig auf einer bereits festen

Agarplatte verteilt. Transformierte Zellen wurden in 150 µl H₂O_{dd} resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ = 10 eingestellt. Von dieser Suspension wurden 5 µl auf die vorbereitete Agarplatte getüpfelt. Die Inkubation bei 30 °C wurde nach Blaufärbung der ersten Klone beendet, in der Regel nach zwei Tagen.

3.3.9 ⁵⁵Fe-Einbau

Das Labeling mit radioaktivem ⁵⁵Fe ist eine geeignete Methode, um die *de novo* Biogenese von Fe/S-Proteinen *in vivo* zu bestimmen (Pierik *et al.*, 2009). Unter eisenarmen Bedingungen kultivierte Hefezellen werden hierbei mit ⁵⁵Fe versetzt und der Einbau in das Fe/S-Targetprotein, nach Immunpräzipitation, mittels Szintillationszähler analysiert (Kispal *et al.*, 1999). Diese Experimente wurden im Rahmen einer Labrotation, finanziert durch das DFG SPP1927, in Kooperation mit Prof. R. Lill in Marburg durchgeführt.

⁵⁵ FeCl ₃	10 µCi
Ascorbinsäure	0,1 M
Citrat-Puffer	
Natriumcitrat	50 mM
EDTA pH 7,0	0,1 mM
HEPES pH 7,4	20 mM

Zunächst wurde eine 20 ml-Vorkultur aus eisenhaltigem SC-Medium inokuliert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit H₂O_{dd} gewaschen und in eine 100 ml-Großkultur aus eisenarmem SC-Medium mit einer OD₆₀₀ = 0,1 überimpft. Am folgenden Tag wurden die Zellen 5 min bei RT und 3.500 rpm pelletiert (Eppendorf 5810 R Rotor A-4-62), mit H₂O_{dd} gewaschen und das Nassgewicht bestimmt. Jeweils 0,5g Zellen wurden in 10 ml eisenarmem SC-Medium resuspendiert und mit 10 µCi ⁵⁵FeCl₃ (gelöst in 100 µl 0,1 M Ascorbinsäure) versetzt. Es folgte eine Inkubation von 2 h bei 30 °C und 150 rpm. Anschließend wurden die radioaktiv markierten Zellen wie zuvor pelletiert, in 8 ml Citrat-Puffer resuspendiert und wieder pelletiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 20 mM HEPES wurde das Nassgewicht erneut bestimmt. Nun wurde der Zellaufschluss mittels Glasperlen durchgeführt (siehe 3.3.4). Das generierte Zellextrakt wurde wie folgt aufgeteilt:

- 5 µl zur Bestimmung der Gesamteisenaufnahme
- 2x250 µl zur Bestimmung des *de novo* Einbaus in das Zielprotein (in Duplikaten) mittels Immunpräzipitation (IP) (siehe 3.4.16)
- 25 µl für TCA-Präzipitation, um die Menge an Apoprotein mittels Western Blot zu analysieren (siehe 3.4.6 und 3.4.8)

Zur Bestimmung der Gesamteisenaufnahme wurden die 5 μl Zellextrakt mit 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ verdünnt und mit 1 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Immunpräzipitate wurden ebenfalls in 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ aufgenommen und mit Szintillationsflüssigkeit versehen. Abschließend wurde die Radioaktivität im Szintillationszähler für 5 min gemessen.

3.4 Biochemische Arbeitsmethoden

3.4.1 Reinigung von Proteinen mittels His-Tag

Polyhistidin-getagte Proteine (His_6 bzw. His_8) können schnell und einfach mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie isoliert werden. Der Polyhistidin-Tag ist C- oder N-terminal an die Proteinsequenz fusioniert. Das Prinzip basiert auf der Interaktion zwischen den Histidinen des rekombinanten Proteins und immobilisiertem Ni^{2+} (Block *et al.*, 2009). Das Metallion liegt hierbei von Liganden cheliiert vor, welche es an das Säulenmaterial Agarose oder Resin binden (siehe Abbildung 3.3). Als Ligand dient zum einen NTA (Nitrilotriessigsäure), welcher vier der sechs Bindestellen des Ni^{2+} besetzt, sodass noch zwei Koordinationsstellen für die Proteinbindung zur Verfügung stehen (Hochuli *et al.*, 1987). Zum anderen belegt der Ligand IDA (Iminodiessigsäure) drei Koordinationsstellen, die übrigen drei werden durch Wassermoleküle, welche durch Histidinreste des Proteins ausgetauscht werden können, besetzt (Porath *et al.*, 1975). Auf Grund der geringeren Valenz des IDA kommt es hier zu einem größeren Verlust an Metallionen in der Wasch- und Elutionsphase. Jedoch erleichtern die drei freien Koordinationsstellen die Proteinbindung, was zum einen eine höhere Ausbeute zur Folge hat und zum anderen einen Vorteil bei schwach bindenden Proteinen bietet. Einen Nachteil stellt die hieraus resultierende geringere Reinheit dar. Die Wahl des geeigneten Säulenmaterials ist abhängig von dem zu reinigenden Protein. In der vorliegenden Arbeit kamen sowohl Ni-NTA-Agarose als auch Ni-IDA-Resin zum Einsatz.

Mittels His-Tag isolierte Proteine müssen im Anschluss entsalzt bzw. umgepuffert werden, um eine Präzipitation der Proteine, ausgelöst durch die hohe Konzentration an Imidazol im Elutionspuffer, zu verhindern.

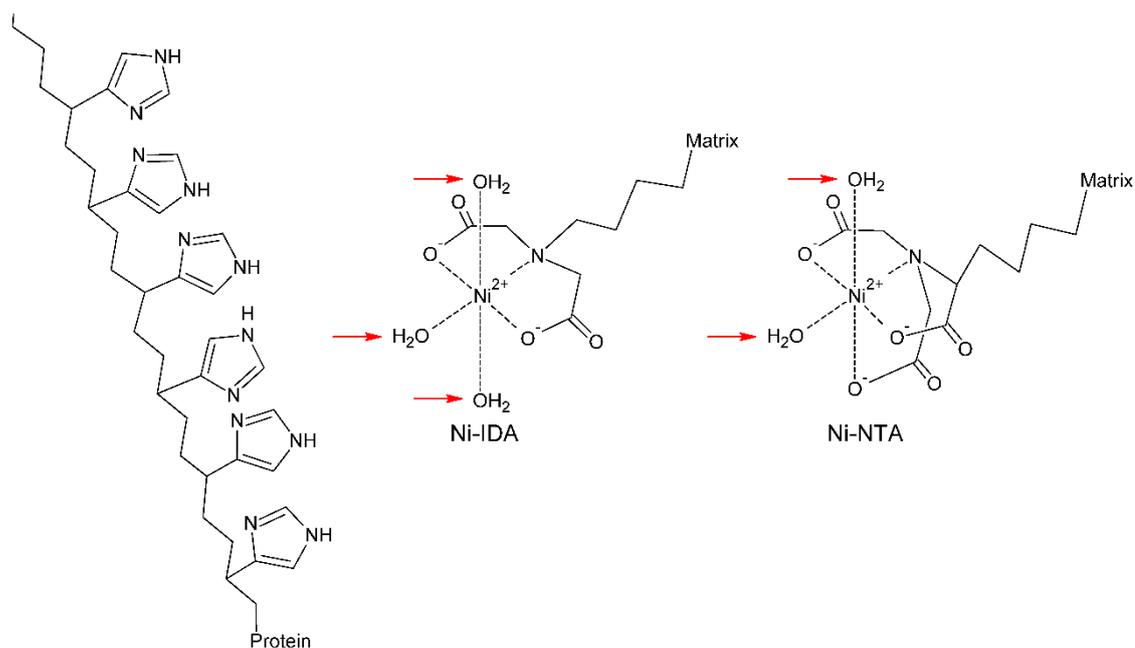


Abbildung 3.3: Vergleich der Koordination der Säulenmaterialien Ni-IDA und Ni-NTA. Die roten Pfeile markieren die freien Koordinationsstellen, an welche ein Imidazolring des His-Tags (links) binden kann. Ni-IDA (Iminodiessigsäure) verfügt über drei freie Bindestellen, Ni-NTA (Nitrilotriessigsäure) nur über zwei.

Lysepuffer		HEPES-Lysepuffer	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	50 mM	HEPES	20 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM	Imidazol	10 mM
pH-Wert auf 8,0 einstellen, sterilfiltriert		pH-Wert auf 8,0 einstellen, sterilfiltriert	
Waschpuffer		HEPES-Waschpuffer	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	50 mM	HEPES	20 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM	Imidazol	20 mM
pH-Wert auf 8,0 einstellen, sterilfiltriert		pH-Wert auf 8,0 einstellen, sterilfiltriert	
Elutionspuffer		HEPES-Elutionspuffer	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	50 mM	HEPES	20 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM	Imidazol	250 mM
pH-Wert auf 8,0 einstellen, sterilfiltriert		pH-Wert auf 8,0 einstellen, sterilfiltriert	
Entsalzungspuffer		HEPES-Entsalzungspuffer	
Tris	20 mM	HEPES	20 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
pH-Wert auf 8,0 einstellen, sterilfiltriert		pH-Wert auf 8,0 einstellen, sterilfiltriert	

8 M HET-Puffer	
Harnstoff	8 M
EDTA	5,95 mM
Tris pH 9,0	60 mM
pH-Wert mit Tris auf 9,0 einstellen, sterilfiltriert	

Der Aufreinigung von Proteinen mittels His-Tag geht die Kultivierung von BL21-*E. coli*-Zellen in einer Großkultur (siehe 3.1.1 bzw. 3.3.6) voraus. Die geernteten Zellen wurden in geeignetem Lysepuffer (angepasst an Protein, Verwendungszweck und Säulenmaterial (bei Ni-IDA immer LEW-Puffer (siehe 3.3.6))) resuspendiert, mittels French Press lysiert und anschließend ultrazentrifugiert. Alle folgenden Arbeitsschritte fanden bei 4-8 °C im Kühlraum statt.

In eine leere PD10-Säule wurden 3 ml einer 50 %-igen Suspension des Säulenmaterials gefüllt und mit 50 ml des entsprechenden Lysepuffers äquilibriert. Bei der Verwendung von Ni-NTA wurde das vorbereitete Material mit dem generierten Lysat in ein 50 ml-Falcon überführt und 1 h unter Rotation inkubiert, um eine möglichst vollständige Bindung zu gewährleisten. Anschließend wurde die Suspension zurück in die PD10-Säule gefüllt. Es folgte ein Waschschriff mit 50 ml des entsprechenden Waschpuffers. Diente Ni-IDA als Säulenmaterial, erfolgte die Bindung auf der gepackten Säule, wobei der Durchlauf ein weiteres Mal auf die Säule gegeben wurde. Als Waschpuffer wurden 50 ml LEW-Puffer eingesetzt. In beiden Fällen erfolgte die Elution in 0,5 ml Fraktionen durch 10 ml Elutionspuffer. Die Säule wurde mit 50 ml Wasch- bzw. LEW-Puffer gereinigt und in 20 %-igem EtOH bei 4 °C gelagert. Zeigten Eluatfraktionen auf Grund eines gebundenen Fe/S-Clusters braune Farbe, wurden diese vereinigt. Wurden farblose Proteine isoliert, erfolgte eine schnelle Überprüfung des Proteingehaltes mit der Methode nach Bradford (siehe 3.4.5). In diesem Fall wurden stark blaugefärbte Fraktionen vereinigt und entsalzt.

Zur Entsalzung von mittels His-Tag gereinigten Proteinen wurde eine Sephadex G-25 M PD10 Säule mit 30 ml Entsalzungspuffer äquilibriert. Bis zu 2,5 ml einer eluierten Proteinlösung wurden auf das Säulenmaterial aufgetragen und einziehen gelassen. Anschließend wurde mit 10 ml Entsalzungspuffer à 0,5 ml fraktionierend eluiert. Die Säule wurde mit weiteren 50 ml Entsalzungspuffer gereinigt und in 8 M HET-Puffer gelagert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden wie zuvor identifiziert und vereinigt. Die isolierte Proteinlösung wurde à 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Denaturierende Aufreinigung von Proteinen

Um unlösliche Proteine aus dem Pellet des Zellaufschlusses zu isolieren, wurde eine denaturierende Reinigung ausgeführt.

Harnstoff 6 M

Zunächst wurde das mittels Ultrazentrifugation generierte Pellet (siehe 3.3.6) in einem passenden Volumen 6 M Harnstoff resuspendiert und solange bei RT inkubiert, bis nahezu alles gelöst war (15 min bis 1 h). Die Lösung wurde in Reaktionsgefäße überführt und zweimal bei RT für 15 min bei 13.000 rpm (VWR Micro Star 17) zentrifugiert. Die Überstände wurden in einem frischen Falcon vereinigt und mittels Peristaltikpumpe in vorgelegten HEPES-Entsalzungspuffer (siehe 3.4.1) getropft. Um die Konzentration an Harnstoff zu reduzieren, betrug dabei das Volumen des vorgelegten Entsalzungspuffers das Zehnfache des eingesetzten Überstandes. Die Renaturierung wurde mit der kleinstmöglichen Fließgeschwindigkeit durchgeführt. Anschließend wurde die Lösung in einem Konzentrator (10 MWCO) bei 3.850 rpm (Eppendorf 5810 R Rotor A-4-62) und 4 °C aufkonzentriert.

3.4.3 Reinigung von Proteinen mittels MBP-Tag

Zur Reinigung schwer löslicher Proteine aus *E. coli* eignet sich das pMAL™ Protein Fusion & Purification System (New England Biolabs Inc.). Die codierende Sequenz der zu exprimierenden Proteine wird in den Vektor pMAL-c5X hinter (C-terminal) die Sequenz von *malE* aus *E. coli*, welche das Maltosebindeprotein (MBP) codiert, kloniert. Hieraus resultiert die Expression eines MBP-Fusionsproteins, was sich positiv auf die Löslichkeit auswirkt. Dieser MBP-Tag hat eine hohe Affinität für das Säulenmaterial Amylose-Resin. Nach der Reinigung kann das Fusionsprotein mittels Maltose von der Säule eluiert werden.

Säulen-Puffer	
HEPES	20 mM
NaCl	200 mM
EDTA	1 mM
pH-Wert auf 8,0 einstellen, sterilfiltriert	
Maltose-Elutionspuffer	
Maltose	10 mM in Säulen-Puffer
pH-Wert auf 8,0 einstellen, sterilfiltriert	

Zur Isolation überexprimierter Proteine wurden BL21-Zellen, wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben, herangezogen und aufgeschlossen. Das Lysat, der Überstand der ultrazentrifugierten Zelltrümmer, wurde auf die mit 30 ml Säulenpuffer äquilibrierte Säule (gegossen aus ca. 3 ml resuspendiertem Säulenmaterial) gegeben. Um eine bestmögliche Bindung zu erzielen, wurde dies zweimal mit dem Durchfluss wiederholt, bevor die Säule mit 50 ml Säulenpuffer gewaschen wurde. Die Elution erfolgte in 0,5 ml Fraktionen mit 10 ml Maltose-Elutionspuffer. Die Säule wurde den Herstellerangaben entsprechend regeneriert und in 20 %-igem EtOH bei 4 °C gelagert.

3.4.4 Proteinbestimmung mittels Micro-Biuret-Methode

Die quantitative Bestimmung des Proteingehaltes einer Lösung erfolgte standardmäßig kolorimetrisch mit der Micro-Biuret-Methode (Goa, 1953; Bensadoun & Weinstein, 1976). In einer Biuret-Reaktion bilden Proteine im Alkalischen mit Cu^{2+} einen blavioletten Komplex, welcher photometrisch bei $\lambda = 545 \text{ nm}$ vermessen werden kann. Die Komplexbildung erfolgt über die Stickstoffe der Peptidbindung, was den Vorteil bietet, dass die Seitenketten der Aminosäuren die Färbung nicht beeinflussen. Die gemessene Extinktion ist direkt proportional zum Proteingehalt der Lösung. Mit Hilfe einer Standardreihe mit definierter Proteinkonzentration kann so die Konzentration der zu untersuchenden Probe ermittelt werden.

BSA	2 mg/ml
DOC	0,15 % (w/v)
TCA	70 % (v/v)
NaOH	3 % (w/v)
Micro-Biuret-Reagenz	
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	588 mM
Na_2CO_3	940 mM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	69 mM

Als Standard dient das Protein BSA in einer Stammlösung von $c = 2 \text{ mg/ml}$. Die Kalibriergerade wurde nach dem in Tabelle 3.7 gezeigten Pipettierschema erstellt. Von jeder zu untersuchenden Probe wurden mindestens zwei verschiedene Verdünnungen verwendet, deren Ergebnisse zur Auswertung gemittelt wurden (bei Gesamtzellextrakt stets 10 und 20 μl Probe).

Tabelle 3.7: Pipettierschema Micro-Biuret-Methode

	Blank	Standard						Probe	
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ [μl]	1000	950	900	850	800	700	990	980	
Protein-Lösung [μl]	0	50	100	150	200	300	10	20	
Konzentration [mg/ml]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6			

Die Proben wurden zunächst mit 100 μl DOC-Lösung versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 μl TCA-Lösung hinzugefügt, gut vermischt und 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (VWR Micro Star 17 bzw. Galaxy 16 DH). Der erhaltene Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Proteinpellet in 950 μl NaOH-Lösung mittels Vortexen gelöst. Nach Zugabe von 50 μl Micro-Biuret-Reagenz folgte eine 15-minütige Inkubation

unter Ausschluss von Licht. Abschließend erfolgte die Extinktionsmessung der Proben bei $\lambda = 545 \text{ nm}$.

3.4.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Als Alternative zur Micro-Biuret-Methode wurde die Proteinbestimmung nach Bradford angewendet (Bradford, 1976). Auf Grund der hohen Empfindlichkeit dieser Methode wurde sie zur Bestimmung niedrig konzentrierter Proben, wie z. B. Mitochondrienpräparationen oder zur schnellen Überprüfung des Proteingehaltes verschiedener Eluat-Fraktionen bei der Proteinreinigung nicht-farbiger Proteine herangezogen. Der Nachweis beruht auf der unspezifischen Bindung des Triarylmethanfarbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an die Seitenketten von Proteinen. In saurer Lösung bewirkt die Bindung einen Farbumschlag, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 zu 595 nm verschiebt. Auch hier wird eine direkte Proportionalität der Extinktion zum Proteingehalt der Lösung angenommen, sodass die Konzentration über eine Standardreihe abgeschätzt werden kann.

Zur Kalibrierung dient BSA in einer Konzentration von $c = 0,1 \text{ mg/ml}$. Nach dem in Tabelle 3.8 gezeigten Pipettierschema wurde die Standardreihe angefertigt. Die Proben wurden auf geeignete Weise in $100 \mu\text{l H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ verdünnt. Jede Verdünnung wurde mit $900 \mu\text{l}$ Bradford-Reagenz versetzt und 10 min inkubiert. Detektiert wurde die Extinktion bei $\lambda = 595 \text{ nm}$.

Tabelle 3.8: Pipettierschema Bradford-Methode

	Blank	Standard					Probe		
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}} [\mu\text{l}]$	100	90	80	60	40	20	99	97,5	95
Protein-Lösung [μl]	0	10	20	40	60	80	1	2,5	5
Konzentration [mg/ml]	0	0,001	0,002	0,004	0,006	0,008			

3.4.6 TCA-Präzipitation

Die Präzipitation von Proteinproben mit Trichloressigsäure (TCA) dient der Aufkonzentration der Proteine und Abtrennung von Verunreinigungen in Vorbereitung auf den Western Blot. Hierbei werden die Proteine irreversibel denaturiert.

TCA 50% (w/v)

Zur Fällung wurden $25 \mu\text{l}$ Hefezelleextrakt in $175 \mu\text{l}$ vorgekühlte 28,6%-ige TCA-Lösung gegeben, gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proteinpräzipitate durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 13.000 rpm (Eppendorf 5810 R Rotor F-45-30-11 oder VWR Micro Star 17 R) abgetrennt und zweimal mit je $500 \mu\text{l}$ -20°C -kaltem Aceton gewaschen (Zentrifugationsbedingungen wie zuvor für 5 min). Die resultierenden Pellets wurden in $80 \mu\text{l}$ 1 x Ladepuffer (siehe 3.4.7) aufgenommen und 10 min bei 99°C denaturiert.

3.4.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine biochemische Trennmethode zur Reinheitskontrolle und Molekülmassenbestimmung von Proteinen (Laemmli, 1970). Das Prinzip beruht auf unterschiedlichen Laufeigenschaften der verschiedenen Proteine im elektrischen Feld. Damit die Wanderungsgeschwindigkeit allein von der Größe des Proteins abhängt und nicht von der Struktur beeinflusst wird, werden die Proben zuvor mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. Zudem überlagert das negativ geladene SDS die intrinsische Ladung des Proteins, was zu einer einheitlichen negativen Ladung führt. Nach Anlegen einer Spannung wandern die Proteine zur Anode, wobei das Gel als Sieb wirkt. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE ist neben dem Trenngel ein Sammelgel vorhanden, welches der Aufkonzentration der Proteine an der Gelgrenze dient und die Auftrennung positiv beeinflusst. Um das Proteingewicht zu bestimmen, wird ein Proteinmarker, ein Standard aus unterschiedlichen Proteinen bekannter Massen, als Referenz verwendet.

Ladepuffer (2x)	
Glycerin	2,17 M
SDS	139 mM
Tris	125 mM
Bromphenolblau	0,03 mM
DTT	20 mM
pH-Wert auf 6,8 einstellen	
Elektrophoresepuffer (10x)	
Glycin	1,91 M
Tris	0,25 M
SDS	1 % (w/v)
pH-Wert auf 8,6 einstellen	

Tabelle 3.9: Zusammensetzung des Trenn- & Sammelgels

	Trenngel (10%)	Trenngel (15%)	Sammelgel (4%)
Acrylamid/Bisacrylamid	3,3 ml	5 ml	0,5 ml
H ₂ O _{dd}	4 ml	2,3 ml	2,4 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,46 ml	2,46 ml	/
0,5 M Tris pH 6,8	/	/	1 ml
10 % SDS (w/v)	100 µl	100 µl	40 µl
10 % APS (w/v)	100 µl	100 µl	40 µl
TEMED	40 µl	40 µl	17 µl

Zur Untersuchung von Hefezelleextrakten wurden 10 %-ige, zur Detektion kleinerer Proteine 15 %-ige Trenngel verwendet. Das Sammelgel wurde stets 4 %-ig eingesetzt (s. Tabelle 3.9). Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde der Alkohol entfernt und das Sammelgel darüber geschichtet. Um vollständige Polymerisation zu gewährleisten, wurden die Gele zumeist einen Tag vor der Elektrophorese gegossen. Der Elektrophoresepuffer (einfach) wurde so in die Kammer gegeben, dass die Gele zumindest halb bedeckt waren. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Proben 1:2 mit Ladepuffer versetzt und 7 min bei 95 °C denaturiert. Eine Tasche wurde stets mit 20 µl Probe beladen. Je Gel wurde 5 µl Proteinmarker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 150 V durchgeführt. Die Färbung erfolgte nach Herstellerangaben mittels Instant Blue, einer auf Coomassie basierende Protein-Färbelösung. Abschließend wurden die Gele mit H₂O entfärbt und mittels Geldokumentationssystem fotografiert.

3.4.8 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, um durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine spezifisch nachzuweisen. Zur Identifizierung wird eine Antigen-Antikörperreaktion ausgenutzt. Um die Proteine den Antikörpern zugänglich zu machen, werden sie mittels *Semi-dry Blotting* auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Auf Grund ihrer negativen Ladung wandern die Protein-SDS-Komplexe zur Anode. Auf diesem Weg bleiben sie durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran haften. Gegen das gesuchte Protein wird ein Primärantikörper gerichtet, welcher wiederum von einem passenden Sekundärantikörper gebunden wird. An den Zweitantikörper ist das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, welches unter Freisetzung von Photonen mit einer Luminol-Lösung reagiert.

Blot-Puffer	
EtOH (mit Butanol vergällt)	20 % (v/v)
SDS	0,02 % (w/v)
Tris	20 mM
Glycin	150 mM
PBST	
NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	9 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Tween 20	1,5 % (w/v)
pH-Wert auf 7,0 einstellen	
BSA	5 % in PBST (w/v)
Milchpulver	5 % in PBST (w/v)

Ponceau S-Lösung		
Ponceau S		3 mM
Methanol		10 mM
Essigsäure		17 mM
ECL		
Luminol	1,4 mM in 0,1 M Tris-HCl pH 8,6	900 μ l
p-Coumarsäure	6,7 mM in DMSO	100 μ l
H ₂ O ₂	30 %	2,5 μ l

Bezüglich der Durchführung der vorangehenden SDS-PAGE siehe 3.4.7. Bei Überprüfung der Proteinzusammensetzung von Proben deren Enzymaktivität gemessen wurde, wurden stets 20 μ g Protein aufgetragen (zuvor bestimmt mittels Micro-Biuret-Methode). Bei Detektion von TCA-präzipitierten Proben, Co-IP oder biotinylierten Proben wurden 15-20 μ l in 1 x Ladepuffer resuspendierte Pellets analysiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 10-20 mA. Anschließend wurden je vier Cellulosefilter, das Gel und die Membran für 10 min in Blot-Puffer getränkt. Die Blotapparatur wurde folgendermaßen aufgebaut: Die Anodenplatte befand sich unten. Darauf wurden zwei getränkte Cellulosefilter gelegt. Darauf folgten die Nitrocellulose-Membran und das Gel, gefolgt von zwei weiteren Cellulosefiltern. Die Kathodenplatte bildete den Abschluss und wurde mit einem Gewicht beschwert. Die Übertragung der Proteine erfolgt von der Kathode zur Anode, aus dem Gel auf die Membran, bei einer konstanten Spannung von 56 mA je aufliegendem Gel für 80 min. War neben der Detektion eines spezifischen Proteins mittels Antikörper ein Überblick über die Gesamtproteinverteilung einer Probe von Interesse, wurde die Membran für wenige Minuten mit Ponceau S-Lösung inkubiert, fotografiert und durch Waschen mit PBST wieder entfärbt. Gegebenenfalls wurde die Membran zu diesem Zeitpunkt durchgeschnitten, um sie mit verschiedenen Antikörpern zu behandeln. Anschließend wurden unspezifische Bindestellen der Membran durch Inkubation für 1,5 h mit 5%-iger Milchpulverlösung blockiert (bzw. 5%-iger BSA-Lösung). Sämtliche Inkubations- und Waschschrirte wurden auf einem Wippschüttler oder Rotator durchgeführt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C (Ausnahme anti-FITC IgG-HRP-Konjugat: 1:200 verdünnt für 2 h bei RT). Der Primärantikörper stellte stets polyklonales Immuneserum aus Kaninchen dar. Antikörper wurden 1:1000 oder 1:2000 verdünnt in 5%-iger Milchpulverlösung eingesetzt. Streptavidin-Konjugat wurde 1:10.000 verdünnt in 5%-iger BSA-Lösung verwendet. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal für 15 min mit PBST gewaschen, bevor sie für 1,5-3 h bei RT mit Sekundärantikörper (goat anti-rabbit IgG-HRP 1:5000 verdünnt in 5%-iger Milchpulverlösung) inkubiert wurde. Es folgten drei weitere 15-minütige Waschschrirte mit PBST, bis die Membran mit ECL (*enhanced chemiluminescent*) entwickelt wurde. Die Aufnahme erfolgte mit Fusion SL von Vilber Lourmat über die vom Gerät vorgeschlagene Zeit.

3.4.9 Leu1-spezifische Aktivitätsmessung

Leu1 katalysiert die Umsetzung von 2-Isopropylmalat zu 3-Isopropylmalat, den zweiten Schritt der Leucinbiosynthese (Kohlhaw, 1988). Die Reaktion erfolgt unter Bildung des Intermediates Isopropylmaleat, welches eine C-C-Doppelbindung aufweist (siehe Abbildung 3.4). Dadurch entsteht ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich, sodass die Bildung UV/VIS-spektroskopisch bei $\lambda = 235 \text{ nm}$ verfolgt werden kann. Da das Reaktionsgleichgewicht die Bildung von 2-Isopropylmalat bevorzugt, wird 3-Isopropylmalat als Substrat eingesetzt (Pierik *et al.*, 2009).

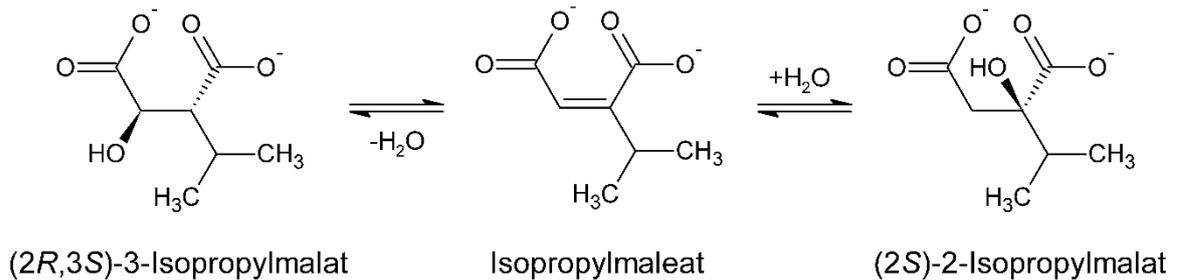


Abbildung 3.4: Die Reaktion der Isopropylmalat-Isomerase. Die IPMI katalysiert die stereospezifische Umwandlung von 3-Isopropylmalat zu 2-Isopropylmalat unter Bildung des Intermediates Isopropylmaleat.

Leu1-Puffer	
Tris pH 7,4	20 mM
NaCl	50 mM
sterilfiltriert	
3-Isopropylmalat (10x)	100 mM

Die Leu1-spezifische Aktivität wurde in Gesamtzellextraktpräparaten bestimmt. Hierzu wurden die entsprechenden Zellen mittels Glasperlen-Methode (siehe 3.3.4) bzw. French Press (siehe 3.3.6) lysiert, jedoch maximal vier Proben pro Aufschluss und Messung. In einer UV-Küvette wurden 970 μl Leu1-Puffer und 20 μl 3-Isopropylmalat (10 mM) vorgelegt, 3 μl Zellextrakt hinzugegeben, invertiert und die Reaktion über 2 min bei $\lambda = 235 \text{ nm}$ verfolgt. Jede Probe wurde in Triplikaten vermessen. Mittels folgender Formel wurde die spezifische Aktivität U berechnet:

$$U = \frac{\Delta \text{Extinktion}/\text{min}}{\varepsilon \cdot V \cdot \text{Proteingehalt}} \quad (3.2)$$

Der Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{(\text{Isopropylmaleat}, 235 \text{ nm})}$ beträgt $4.530 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Kohlhaw, 1988). V stellt das Reaktionsvolumen dar. Der Proteingehalt wird in mg/ml angegeben.

3.4.10 Direkte Aconitase-spezifische Aktivitätsmessung

Aconitase ist ein wichtiges Enzym des Citratzyklus, worin es die Bildung von Isocitrat aus Citrat katalysiert. Diese reversible Isomerisierung läuft über die Zwischenstufe *cis*-Aconitat ab (siehe Abbildung 3.5), welches dabei auf zwei verschiedene Arten an den essentiellen [4Fe-4S]-Cluster binden muss, wodurch angenommen wird, dass die Reaktion in zwei unabhängigen Teilschritten erfolgt (Beinert *et al.*, 1996). Die direkte Aconitase-spezifische Aktivitätsmessung basiert auf der Bildung einer Doppelbindung des *cis*-Aconitats, welche spektroskopisch im UV-Bereich beobachtet werden kann. In der nach Kennedy *et al.* vorgenommenen Methode fungiert DL-Isocitrat als Substrat (Kennedy *et al.*, 1983).

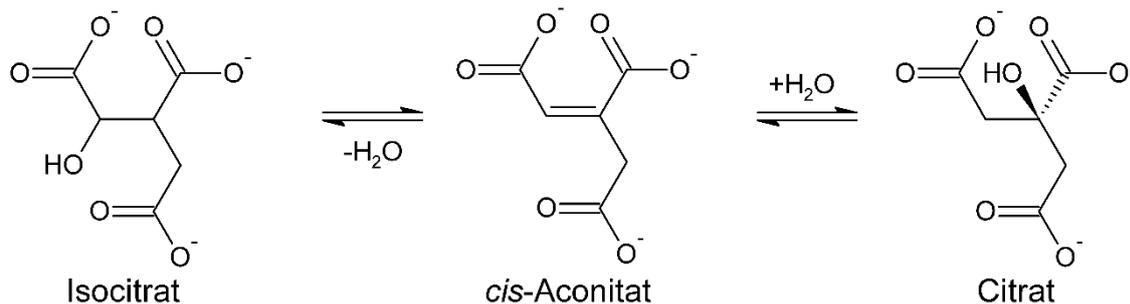


Abbildung 3.5: Die Reaktion der Aconitase. Über das Zwischenprodukt *cis*-Aconitat wird Isocitrat in Citrat umgewandelt.

Aco-Lysepuffer	
Tris pH 8,0	50 mM
KCl	50 mM
Glycerin	10 % (v/v)
Citrat	2 mM
β -Mercaptoethanol	7 mM
Aco-Puffer	
Tris pH 8,0	90 mM
DL-Isocitrat	20 mM

Auch die Aconitase-spezifische Aktivität wurde in Gesamtzellextraktpräparaten bestimmt. Um die Stabilität des Enzyms zu gewährleisten, wurde der Zellaufschluss mit Aco-Lysepuffer durchgeführt (statt TNETG) (Brown *et al.*, 1998). In einer UV-Küvette wurden zu 990 μ l Aco-Puffer 5-10 μ l Zellextrakt gegeben und invertiert. Die Extinktion wurde bei $\lambda = 240$ nm über 4 min verfolgt. Je Probe wurden drei Messungen mit unterschiedlichen Mengen an eingesetztem Zellextrakt durchgeführt. Die spezifische Aktivität U wurde nach Formel 3.2 ermittelt, mit $\epsilon_{(cis\text{-Aconitat}, 240\text{ nm})} = 3,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Kennedy *et al.*, 1983).

3.4.11 Indirekte Aconitase-spezifische Aktivitätsmessung

Auf Grund der Störanfälligkeit der direkten Aconitase-spezifischen Enzymaktivitätsmessung durch hohe Absorption von DNA und anderen Proteinen im entsprechenden UV-Wellenlängenbereich ist es ratsam, einen gekoppelten Enzymaktivitätstest, welcher in einem Wellenlängenbereich ohne Störungen detektiert werden kann, anzuschließen (Drapier & Hibbs, 1996). Eine Alternative stellt die Kopplung der Aconitase mit der Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH), dem nachfolgenden Enzym des Citratzyklus, dar (Rose & O'Connell, 1967). Die ICDH katalysiert die Umwandlung von Isocitrat in α -Ketoglutarat unter Abspaltung von CO_2 (siehe Abbildung 3.6). In dieser Reaktion dient NADP^+ als Elektronenakzeptor. Die Bildung von NADPH kann photometrisch bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ verfolgt werden. Unter der Annahme einer vollständigen Umsetzung von Isocitrat durch die ICDH, kann aus der Bildung von NADPH die Aktivität der Aconitase berechnet werden.

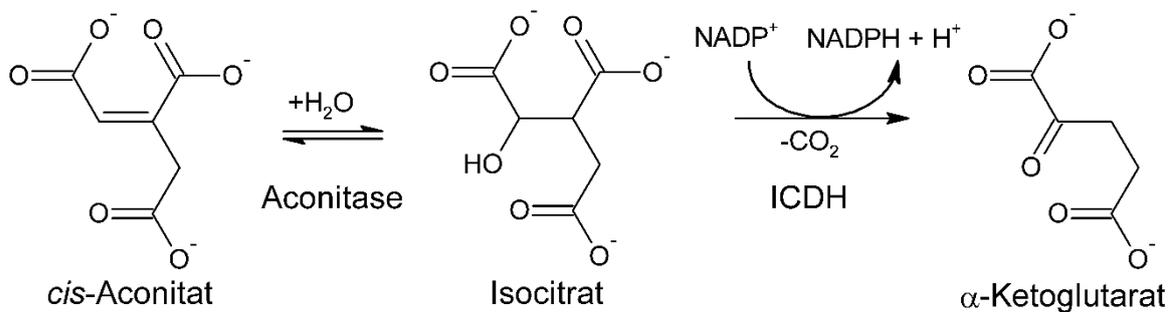


Abbildung 3.6: Die Reaktion der gekoppelten Aconitase-Aktivitätsmessung. Bei diesem Versuchsansatz dient *cis*-Aconitat als Substrat der Aconitase. Das entstehende Isocitrat, wird unter der Bildung von NADPH aus NADP^+ durch die Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH) in α -Ketoglutarat umgewandelt.

Triethanolamin-Puffer	
Triethanolamin	100 mM
pH-Wert auf 8,0 einstellen	
<i>cis</i> -Aconitat	20 mM
ICDH	40 U/ml
NADP^+	0,1 M

Zur indirekten Aconitase-spezifischen Aktivitätsbestimmung wurden die gleichen Zellextraktpräparate herangezogen, welche bereits mittels der direkten Methode vermessen wurden. Triethanolamin-Puffer (950 μl) wurde vorgelegt und nacheinander mit 12 μl 20 mM *cis*-Aconitat, 10 μl ICDH (40 U/ml), 12 μl NADP^+ (0,1 M) und 10 μl Zellextrakt versetzt und invertiert. Die Reaktion wurde spektroskopisch bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ über 4 min aufgezeichnet. Jede Probe wurde in Triplikaten untersucht. Zur Korrektur der ermittelten spezifischen Aktivität um NADP^+ -abhängige Hintergrundreaktionen wurde jede Probe einmal ohne die Zugabe von

cis-Aconitat vermessen. Nach Formel 3.2 wurde die spezifische Aktivität U berechnet, mit $\epsilon_{(\text{NADP}, 340\text{nm})} = 6.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Pierik *et al.*, 2009).

3.4.12 Succinat-Dehydrogenase-spezifische Aktivitätsmessung

Diese Enzymaktivitätsmessung wurde durchgeführt, um die Unversehrtheit von isolierten Mitochondrien (siehe 3.3.5) zu belegen. Sie basiert auf der Oxidation von Succinat durch die Succinat-Dehydrogenase (SDH), den Komplex II der Atmungskette (Robinson & Lemire, 1995). Bei intakten Mitochondrien werden die, bei dieser Reaktion frei gewordenen, Elektronen über das Coenzym Q durch die Membran zum Komplex III transportiert, welcher Cytochrom c reduziert (siehe Abbildung 3.7). Diese Reduktion kann durch Zunahme der Extinktion bei $\lambda = 550 \text{ nm}$ beobachtet werden, es tritt ein Farbumschlag von braun-orange zu pink auf. Eine Weitergabe der Elektronen zu Komplex IV wird durch Zugabe von Cyanid unterdrückt. Inhibiert wird die SDH durch Malonat, welches als Referenz für die Hintergrundaktivität herangezogen wird.

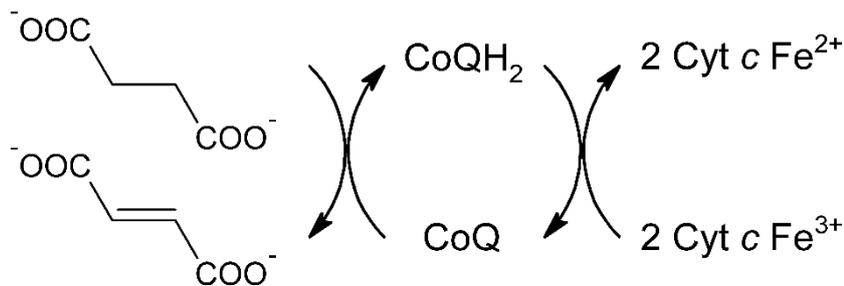


Abbildung 3.7: Vereinfachte Darstellung der SDH-basierten Cytochrom c-Reduktion. Succinat wird durch die Succinat-Dehydrogenase SDH zu Fumarat oxidiert. Die dabei gewonnenen Elektronen reduzieren Ubichinon (CoQ) zu Ubichinol (CoQH₂). Durch den Komplex III der mitochondrialen Atmungskette wird dieses wieder oxidiert, wobei Cytochrom c (Cyt c) reduziert wird.

Puffer A	
Tris pH 8,0	50 mM
NaCl	50 mM
Puffer A + KCN	
KCN	1 mM in Puffer A
Natriumsuccinat	20 % in Puffer A (w/v)
Natriummalonat	20 % in Puffer A (w/v)
Cytochrom c	20 mg/ml

Die spezifische Aktivität der SDH wurde von isolierten Mitochondrien bestimmt. In einer Referenzküvette wurden zur Bestimmung der Hintergrundaktivität 920 μl Puffer A + KCN mit 12 μl 20 % Succinat, 12 μl 20 % Malonat und 50 μl Cytochrom c vorgelegt und mit 10-20 μg

Mitochondrien versetzt und invertiert. Die Extinktion bei $\lambda = 550 \text{ nm}$ wurde über 2 min beobachtet. Anschließend wurde in einer frischen Küvette zu $920 \mu\text{l}$ Puffer A + KCN mit $12 \mu\text{l}$ 20 % Succinat und $50 \mu\text{l}$ Cytochrom *c*, die gleiche Menge Mitochondrien gegeben, gemischt und die Reaktion unter den gleichen Bedingungen verfolgt. Die Extinktionsänderung der Messung wurde um die Extinktionsänderung der Referenzmessung korrigiert. Die Auswertung erfolgte nach Formel 3.2, mit einem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{(\text{Cytochrom C}, 550 \text{ nm})} = 20.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Pierik *et al.*, 2009).

3.4.13 ONPG-Methode

Die β -Galactosidaseaktivität kann als proportional zu deren Expression in Y2H-Untersuchungen betrachtet und somit als Maß der Stärke von Protein-Protein-Interaktionen herangezogen werden. Zur quantitativen Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität eignet sich das Galactosidsubstrat ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) (siehe Abbildung 3.8). Dieses wird hydrolytisch zu Galactose und ortho-Nitrophenol gespalten. Auf Grund der gelben Farbe des Produktes lässt sich der Umsatz spektroskopisch bei $\lambda = 420 \text{ nm}$ analysieren (Miller, 1972).

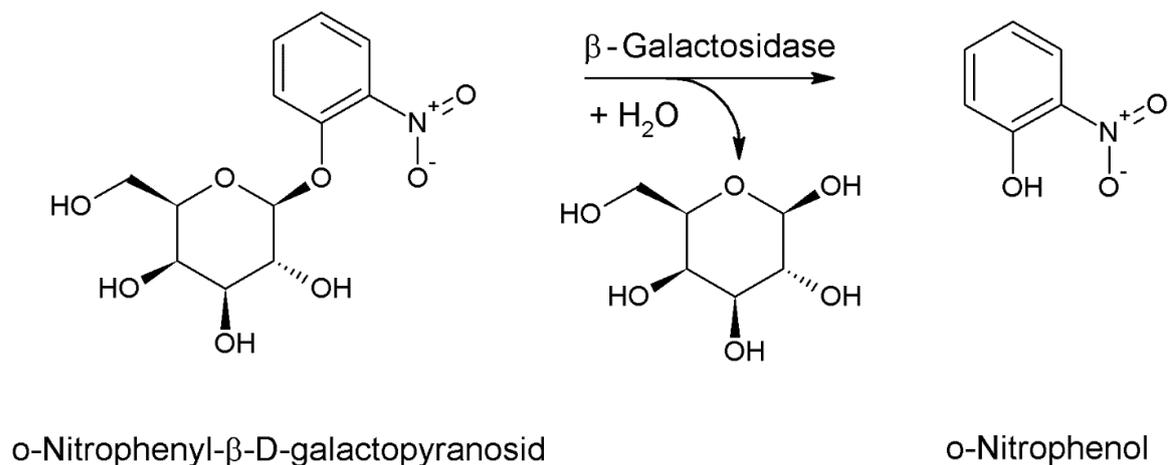


Abbildung 3.8: Die Umsetzung von ONPG durch die β -Galactosidase. Das Spaltprodukt o-Nitrophenol weist eine gelbe Farbe auf.

Die Etablierung dieser Methode erfolgte im Rahmen einer Bachelorarbeit von Herrn Hendrik Bayer unter meiner Anleitung, auf Basis der Methode nach Miller (Bayer, 2016; Miller, 1972).

Z-Puffer	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	60 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	40 mM
KCl	10 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1 mM
pH-Wert auf 7,0 einstellen	

Z-Puffer mit β -Mercaptoethanol	
β -Mercaptoethanol	38,5 mM in Z-Puffer
ONPG	4 mg/ml
Na_2CO_3	1 M

Zur quantitativen Analyse der β -Galactosidaseaktivität wurden 150 mg Hefezellen (Nassgewicht) verwendet. Diese wurden in glucosehaltigem Medium kultiviert. Zunächst wurde eine 20 ml-Kleinkultur inokuliert, welche am nächsten Tag in eine 50 ml-Großkultur überimpft wurde. Die Ernte sollte bei Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (*mid-log*) ($\text{OD}_{600} = 0,5-0,8$) erfolgen (um eine Repression des *ADH1*-Promotors, auf Plasmid pGADT7, durch Ethanol, welches durch den Hefemetabolismus im Medium akkumuliert, zu verhindern). Da das Wachstum der untersuchten Zellen stets sehr langsam war, wurde die Kultur mit $\text{OD}_{600} = 0,025-0,05$ inokuliert und über Nacht inkubiert. Schließlich wurden 150 mg Zellen in einem 2 ml-Reaktionsgefäß in 150 μl Z-Puffer resuspendiert und mit 300 μl Glasperlen lysiert (siehe 3.3.4).

Jede Probe wurde in Triplikaten gegen einen eigenen Blank (Puffer + Substrat) vermessen. Hierzu wurden 700 μl Z-Puffer mit β -Mercaptoethanol und 160 μl frisch angesetzte ONPG-Lösung vorgelegt und mit 3 μl Zellextrakt versetzt. Während der Zugabe des Zellextraktes wurde die genaue Startzeit bestimmt. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C bis eine Gelbfärbung sichtbar wurde, längstens jedoch für 24 h. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 μl 1 M Na_2CO_3 -Lösung abgestoppt und die Reaktionszeit abgelesen. Die Extinktionsmessung erfolgte bei $\lambda = 420 \text{ nm}$. Nach Analyse des Gesamtproteingehaltes mittels Micro-Biuret-Methode (siehe 3.4.4) konnte die β -Galactosidaseaktivität nach folgender Formel bestimmt werden:

$$U = \frac{\frac{\text{Absorption}}{\Delta t}}{\varepsilon \cdot V \cdot \text{Proteingehalt} \cdot 0,79365} \quad (3.3)$$

Der Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{(\text{o-Nitrophenolat}, 420 \text{ nm})}$ beträgt $5.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Soundararajan *et al.*, 2008).

3.4.14 Rekonstitution von Fe/S-Clustern

Im Zuge der Aufreinigung von Eisen-Schwefel-Proteinen, insbesondere mittels His-Tag, können diese ihren Fe/S-Cluster verlieren. Des Weiteren ist es möglich, dass der Einbau von Fe/S-Clustern bei Überexpression des Proteins in *E. coli* nicht vollständig erfolgt. So kommt es vor, dass ein Protein nach der Aufreinigung in seiner Apoform vorliegt. In diesem Fall kann durch Zugabe von Eisen- und Sulfidionen ein Cluster chemisch an dem Protein rekonstituiert werden (Malkin & Rabinowitz, 1966).

Rekonstitutionspuffer	
Tris-HCl pH 8,0	25 mM
NaCl	150 mM
DTT	100 mM
Ammoniumeisen(III)-citrat	100 mM
Li ₂ S	100 mM

Hierzu wurde das gereinigte Protein (50 µM in Rekonstitutionspuffer) in der anaeroben Kammer für 45 min mit 15 mM DTT reduziert. Anschließend wurde es erst mit fünf Äquivalenten (250 µM) an Ammoniumeisen(III)-citrat und nach Auftreten einer rötlichen Farbe mit der gleichen Menge Lithiumsulfid versetzt und für 2-4 h unter anaeroben Bedingungen inkubiert. In dieser Zeit wurde mehrfach die Leu1-spezifische Aktivität gemessen.

3.4.15 Kopplung von Immunobeads

Immunobeads werden benötigt, um spezifisch Antigene mittels (Co)Immunpräzipitation aus Gesamtzellextrakt zu isolieren. Als Trägermaterial wird Sepharose verwendet, welche mit Protein A ligiert ist. Protein A stammt ursprünglich aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* und bindet selektiv die Fc-Region von Immunglobulinen durch Interaktion mit der schweren Kette (Hjelm *et al.*, 1972). Auf diese Weise können spezifisch Antikörper an Sepharose gekoppelt werden (≙Immunobeads).

Um zu quellen, wurden zunächst 50 mg Protein A Sepharose mit 500 µl eisgekühltem TNETG-Puffer für 30 min unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Nach dem Pelletieren für 3 min bei 4 °C und 3.000 g (Eppendorf 5810 R Rotor F-45-30-11 oder VWR Micro Star 17 R) erfolgte die Kopplung mit 500 µl Antikörperserum unter Rotation bei 4 °C für 1-2 h. Anschließend wurde erneut pelletiert und die Immunobeads fünfmal mit je 500 µl TNETG-Puffer gewaschen. Zur Lagerung bei 4 °C wurden die Partikel in 500 µl TNETG-Puffer aufgenommen.

3.4.16 (Co)Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) ist eine spezielle Pulldown-Variante, welche die spezifische Isolation eines Proteins aus Gesamtzellextrakt ermöglicht. Hierbei wird das zu isolierende Antigen durch den, an ein festes Trägermaterial gekoppelten, Antikörper gebunden und mittels Zentrifugation abgetrennt (siehe Abbildung 3.9). Da dieses Protein zusammen mit seinen gebundenen Interaktionspartnern separiert wird, ist diese Methode auch als Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) *in vivo* geeignet (Coimmunpräzipitation) (Kaboord & Perr, 2008). Der Nachweis des präzipitierten Proteins und seiner Bindungspartner erfolgt mittels Western Blot (siehe 3.4.8) bzw. Szintillationszähler im Falle radioaktiv markierter Proteine (siehe 3.3.9).

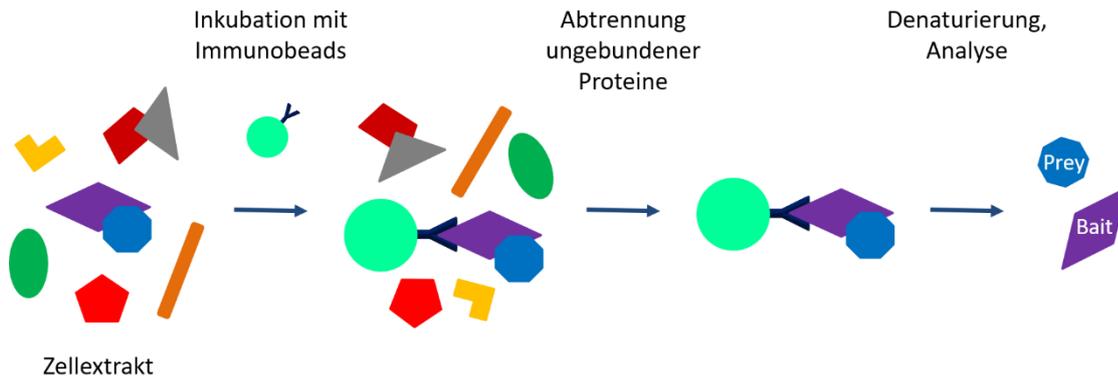


Abbildung 3.9: Prinzip der (Co)Immunpräzipitation. Aus einer Gesamtzellextraktprobe wird ein Bait-Protein mit Hilfe von Immunobeads (mittels Protein A an Trägermaterial gekoppelte Antikörper) abgetrennt. Prey-Proteine werden durch Interaktion mit dem Bait-Protein ebenfalls separiert und können nach einer Denaturierung analysiert werden.

Zur Detektion copräzipitierter Proteine wurden 40 µl Gesamtzellextrakt mit 40 µl Immunobeads (1:1 Suspension) für 1-2 h unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Im Falle der Analyse der *de novo* Biogenese von Fe/S-Proteinen mittels ⁵⁵Fe-Einbau wurden 250 µl Zellextrakt und 30 µl Immunobeads eingesetzt. Anschließend wurden die Partikel durch Zentrifugation für 3 min bei 4 °C und 3.000 g (Eppendorf 5810 R Rotor F-45-30-11 oder VWR Micro Star 17 R) separiert und dreimal mit je 500 µl TNETG-Puffer gewaschen. Zur Detektion mittels Western Blot wurde das Pellet in 120 µl 1x Ladepuffer resuspendiert und 7 min bei 95 °C denaturiert (siehe 3.4.8). Zur Analyse im Szintillationszähler wurde das Pellet in 50 µl H₂O_{dd} aufgenommen und mit 1 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt.

3.4.17 Präzipitation mittels magnetischer Beads

Mit einer Dissoziationskonstante von 10⁻¹³-10⁻¹⁵ M gehört die Biotin-Streptavidin-Bindung zu den stärksten bekannten biologischen Bindungen (Choi-Rhee *et al.*, 2004). Dies wird ausgenutzt, um biotinylierte Proteine selektiv aus Gesamtzellextrakt zu isolieren. Als Trägermaterial eignen sich hierfür magnetische Sepharosebeads besonders gut, da diese Präzipitation effizient und zeitsparend ist. Eingesetzt wird diese Methode im Rahmen von Nachbarschafts-abhängiger Biotin-Identifizierung (BioID), um die Mikroumgebung bestimmter Proteine zu analysieren. Dabei wird ein Bait-Protein mit einer prokaryotischen promiskuitiven Biotin-Ligase (BirA*) fusioniert, welche dann unspezifisch alle Proteine in der näheren Umgebung des Bait-Proteins biotinyliert (Roux *et al.*, 2012). Die präzipitierten Proteine werden anschließend mittels Western Blot (3.4.8) detektiert.

TBS-Puffer	
Tris-HCl pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
pH-Wert auf 7,5 einstellen	

TBS-Waschpuffer	
Harnstoff	2 M in TBS-Puffer
pH-Wert auf 7,5 einstellen	

Zur Präzipitation biotinylierter Proteine mittels Streptavidin magnetischer Sepharose wurde das Gesamtzellextrakt von jeweils 1 g Zellen benötigt. Bei der Kultivierung dieser Zellen wurde dem Medium 10 µM Biotin zugesetzt. Die Zellextraktpräparation erfolgte mit TBS-Puffer (nicht TNETG), um den Angaben des Herstellers zu folgen und eine Beeinträchtigung der Bindung an die Beads auszuschließen. Je Probe wurden zwei Präzipitationen mit jeweils 50 µl suspendierter Sepharose durchgeführt. Die Beads wurden zweimal mit je 250 µl TBS-Puffer gewaschen, wobei die Separation nicht durch Zentrifugation, sondern durch „Festhalten“ des magnetischen Materials an der Gefäßwand durch ein magnetisches Rack gewährleistet wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit je 300 µl Gesamtzellextrakt für 1 h unter Rotation bei 4 °C. Danach wurden die Partikel dreimal gewaschen, zweimal mit TBS-Waschpuffer und einmal mit TBS-Puffer, um eine Störung des folgenden Western Blots durch Harnstoff zu vermeiden. Zur Elution wurden die Beads mit 50 µl 1 x Ladepuffer versetzt und 10 min bei 99 °C inkubiert. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und konnte ohne weitere Behandlung für den Western Blot verwendet werden. Parallel wurden zweimal 25 µl Zellextrakt mit TCA präzipitiert, um die Anreicherung biotinylierter Proteine beurteilen zu können.

3.4.18 Fluoreszenzanisotropie

Fluoreszenzanisotropie-Messungen stellen eine geeignete Methode dar, um Protein-Peptid-Interaktionen zu beobachten. Die Fluoreszenzanisotropie kann als Maß für die Beweglichkeit eines Fluorophors angesehen werden. Trifft linear polarisiertes Licht auf eine isotrope Probe, werden vor allem Fluorophore in einer bestimmten Orientierung zur Polarisations Ebene angeregt. Aus dieser selektiven Anregung resultiert eine partielle polarisierte Emission (Lakowicz, 2006). Die Anisotropie r ist nach folgender Formel definiert:

$$r = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2G \cdot I_{\perp}} \quad (3.4)$$

wobei I_{\parallel} die Fluoreszenzintensität der parallelen Strahlung ist (bei Anregung mit vertikal polarisiertem Licht die Fluoreszenzintensität der vertikalen Polarisation) und I_{\perp} die Fluoreszenzintensität der perpendicularen Strahlung (bei Anregung mit vertikal polarisiertem Licht die Fluoreszenzintensität der horizontalen Polarisation). Der Koeffizient G wird als Gerätefaktor bezeichnet. Er stellt das Verhältnis der Sensitivität des Detektionssystems gegenüber vertikal und horizontal polarisiertem Licht dar (i_{\perp} und i_{\parallel}) und wird bestimmt durch Messungen bei Anregung mit horizontal polarisiertem Licht (Lakowicz, 2006):

$$G = \frac{i_{\parallel}}{i_{\perp}} \quad (3.5)$$

Kann sich der Fluorophor frei in der Lösung bewegen, ist die Polarisation der Emission stochastisch verteilt, die Anisotropie wird minimal. Ist die Bewegung jedoch nur langsam möglich, wird die Ausrichtung des Fluorophors (innerhalb der Fluoreszenzlebenszeit) nicht geändert (siehe Abbildung 3.10). Die Polarisation der anregenden Strahlung entspricht dann der Polarisation der emittierten Strahlung, die Anisotropie wird maximal. Dieses Prinzip wird genutzt, um Bindungsstudien durchzuführen. Ein Fluorophor (hier Fluoresceinisothiocyanat) wird kovalent an ein zu untersuchendes Molekül (in diesem Fall an den N-Terminus eines Peptides) gebunden. Nach Titration eines möglichen Interaktionspartners (Protein) nimmt im Falle einer Bindung die Anisotropie zu. Im Idealfall ergibt sich eine sigmoidale Kurve, aus welcher die Dissoziationskonstante K_D ermittelt werden kann.

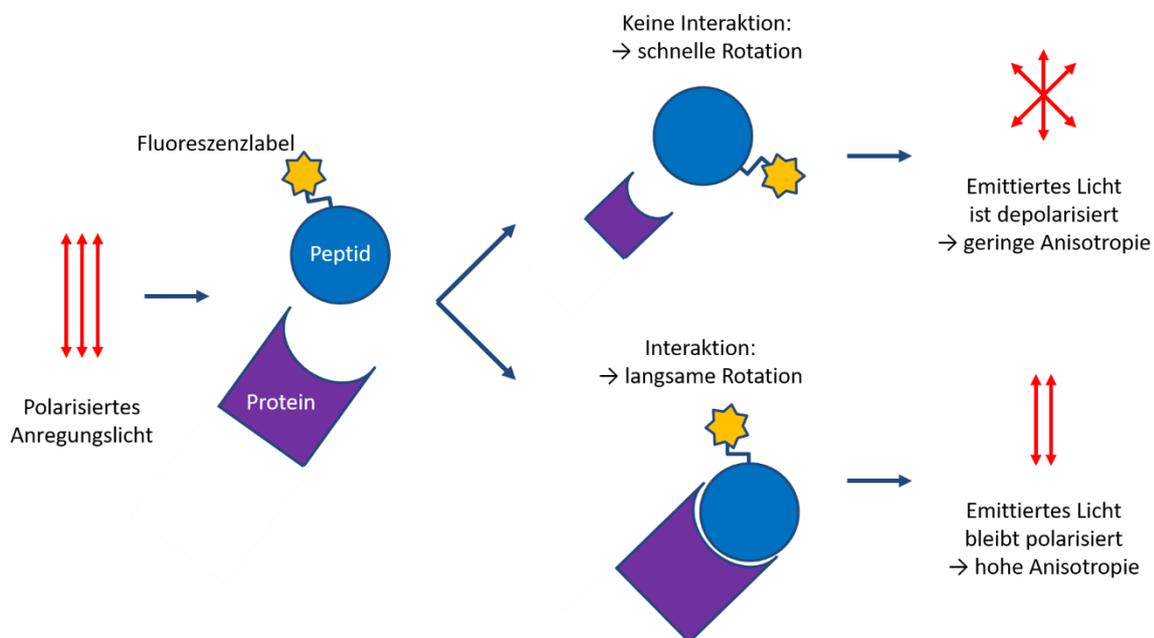


Abbildung 3.10: Prinzip der Fluoreszenzanisotropie-Messung. Eine Probe eines fluoreszenzmarkierten Peptides wird mit polarisierter Strahlung angeregt und mit einem potentiell interagierenden Protein titriert. Findet zwischen Peptid und Protein eine Interaktion statt, kann sich dieser Komplex nur langsam in Lösung bewegen. Das emittierte Licht bleibt polarisiert und es wird eine hohe Anisotropie gemessen. Findet keine Bindung statt, kann der Fluorophor schnell rotieren. In diesem Fall ist das emittierte Licht depolarisiert und nur eine geringe Anisotropie detektierbar.

Zur Messung der Fluoreszenzanisotropie wurden N-terminal FITC-gelabelte Peptide (siehe Tabelle 2.9) verwendet. Diese wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in DMSO gelöst. Hieraus wurden 10 μ M Gebrauchslösungen angefertigt. Die Messungen wurden in 1 ml HEPES-Entsalzungspuffer (siehe 3.4.1) bei 20 °C durchgeführt. Es wurde stets darauf geachtet, dass sämtliche eingesetzte Komponenten frei von Tris sind, um störende Wechselwirkungen mit DMSO zu vermeiden (Karl, 2017). Es wurde 250 nM gelöstes Peptid vorgelegt, sodass die Konzentration an DMSO in der Probe 2,5 % (v/v) betrug. Angeregt

wurde mit einem Laser der Wellenlänge $\lambda = 470 \text{ nm}$. Es wurden jeweils zwei Emissionsspektren im Bereich von 480-580 nm aufgenommen: Eines, um die parallele Intensität zu messen, mit einer Einstellung des Emissionspolarisators von 0° , und ein Zweites, um die perpendikuläre Intensität, mit einer Einstellung des Emissionspolarisators von 90° , zu verfolgen. Nach und nach wurden in HEPES-Entsalzungspuffer gelöste Proteine zutitriert mit einer Endkonzentration der Messlösung von 10 nM bis 20 μM . Nach jeder Proteinzugabe wurden zwei Emissionsspektren aufgenommen.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzanisotropie wird der Gerätefaktor G benötigt. Dieser wird durch die Anregung von frei beweglichem Fluorescein bestimmt. Hierzu wurde eine Fluoresceinlösung (250 nM in DMSO) mit horizontal polarisiertem Licht angeregt und i_{\parallel} bzw. i_{\perp} durch Aufnahme zweier Emissionsspektren bestimmt. Der Gerätefaktor G wurde mittels Formel 3.5 berechnet.

3.4.19 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ist die Methode der Wahl zur quantitativen Charakterisierung biomolekularer Interaktionen. Sie erlaubt die Bestimmung der thermodynamischen Bindeparameter (n , K_D , ΔH , ΔS) in einem einzigen Experiment (Turnbull & Daranas, 2003). In adiabatischer Umgebung befinden sich zwei Zellen: eine Probezelle mit dem zu untersuchenden Makromolekül und eine Referenzzelle. In die Probezelle wird eine Spritze inseriert, welche während eines Experimentes Aliquots eines Liganden in die Probelösung titriert (Ladbury, 2013). Bei Interaktion der zwei Substanzen (z. B. Protein und Peptid), wird, direkt proportional zum Ausmaß der Bindung, Hitze frei bzw. absorbiert. Die Methode basiert auf der Detektion von Hitze, die aufgewendet oder absorbiert werden muss, um das System bei Ligand-Zugabe bei konstanter Temperatur zu halten. So ist die direkte Messung der Bindungsenthalpie möglich. Wenn der Rezeptor (das Protein) vollständig mit Ligand (Peptid) gesättigt ist, nimmt das Signal ab. Wird nun ΔH gegen das molare Verhältnis der interagierenden Biomoleküle aufgetragen, ergibt sich bei einer Stöchiometrie von Eins eine sigmoidale Isotherme. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass sie frei von jeglicher Markierung (wie Fluoreszenzlabel) durchgeführt werden kann. Jedoch besteht eine Limitierung auf ein Affinitätsfenster von Dissoziationskonstanten (K_D) im Bereich von 1 nM - 100 μM (Krainer *et al.*, 2012).

Bei dieser Versuchsanordnung sollten beide Spezies so rein wie möglich sein und müssen in absolut gleichem Puffer vorliegen, um Verdünnungseffekte zu vermeiden. Damit die gewünschte Isotherme einen sigmoidalen Verlauf zeigt, sollte mit einem zehnfachen Überschuss an Ligand in Relation zum Makromolekül gearbeitet werden.

Zur Durchführung von ITC-Experimenten wurden unmarkierte Peptide (siehe Tabelle 2.9) eingesetzt. Diese wurden in einer Konzentration von 10 mg/ml in HEPES-Entsalzungspuffer (siehe 3.4.1) und gegebenenfalls durch minimale Zugabe von 0,3 M NaOH gelöst. Auf Grund

der bekannten Fehlerhaftigkeit der über die Einwaage kalkulierten Konzentration des gelösten synthetischen Peptides (10-40 % H₂O und/oder Salze), wurde die Konzentration spektroskopisch überprüft und korrigiert. Hierzu wurden 6 µl der gelösten Tryptophan-haltigen Peptide 1:100 in 6 M Guanidinhydrochlorid-Lösung (pH = 6,5) verdünnt und bei $\lambda = 280$ nm spektroskopisch vermessen. Mit Hilfe des *Lambert-Beerschen-Gesetzes* wurde daraus die tatsächliche Konzentration bestimmt:

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d} \quad (3.6)$$

mit E = Extinktion bei $\lambda = 280$ nm; d = 1 cm; $\varepsilon_{(\text{Tryptophan}, 280 \text{ nm})} = 5690 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Edelhoch, 1967). Da die verwendeten Peptide weder über Tyrosin- noch über Cysteinreste verfügen, kann bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm auf den Extinktionskoeffizienten von Tryptophan zurückgegriffen werden. Die nicht-Tryptophan-haltigen Peptide wurden um einen Faktor (31 %), bestimmt aus dem Mittelwert der Tryptophan-haltigen Peptidkonzentrationen, korrigiert.

Bei Messungen an der VP-ITC wurde ein Probenvolumen von 1,8 ml der Proteinlösung zur Befüllung der Zelle benötigt, sowie 500 µl Peptidlösung zur Befüllung der Spritze. Bei Verwendung der iTC₂₀₀ genügten 300 µl Proteinlösung zur Präparation der Zelle und 70 µl Peptidlösung für die Spritze. Die Konzentrationen eingesetzter Proteinlösungen variierte von 50 - 480 µM, sodass die zutitrierten Peptidlösungen auf 500 µM - 4,8 mM eingestellt wurden. Je Titration waren 19 Peptid-Injektionen vorgesehen. Die Messungen erfolgten bei einer konstanten Temperatur von 25 °C; die Rührgeschwindigkeit betrug 500 - 1.000 rpm.

3.4.20 Chemische Quervernetzung mittels EDC

Unter Crosslinking (Quervernetzung) wird das chemische Zusammenfügen zweier oder mehr Moleküle unter Ausbildung einer kovalenten Bindung verstanden. Das eingesetzte Crosslinking-Reagenz verfügt über reaktive Enden, welche spezifisch funktionelle Gruppen der zu quervernetzenden Moleküle angreifen (Thermo Scientific). 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (EDC) ist ein „Null-Längen“-Quervernetzer. Bei räumlicher Nähe wird die Addition von Carboxyresten (D oder E Seitenketten bzw. der C-Terminus von Proteinen und Peptiden) an primäre Amine (K Seitenketten bzw. der N-Terminus) ermöglicht, ohne selbst ein Teil der finalen Amidbindung zu werden. Das Carbodiimid aktiviert die Carboxygruppe zu einem *o*-Acylisoharnstoffester, was einen nucleophilen Angriff des Amins ermöglicht (siehe Abbildung 3.11) (Timkovich, 1977).

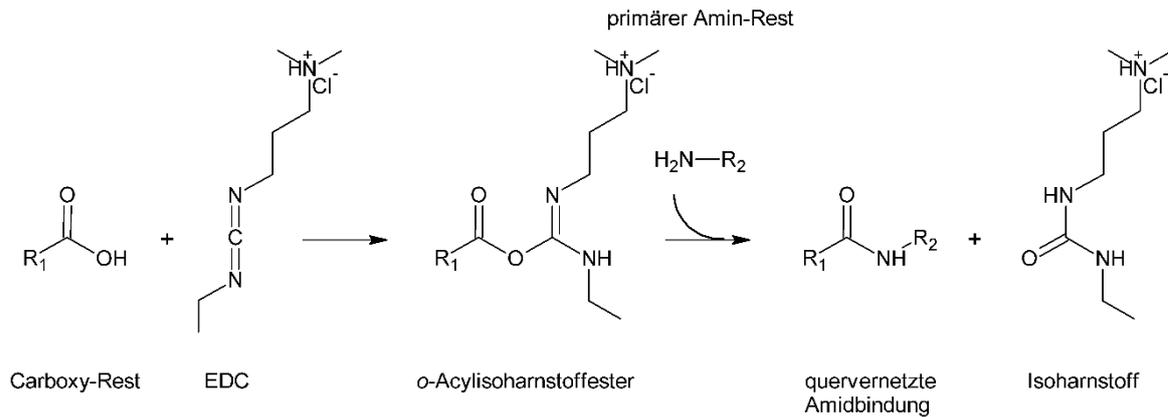


Abbildung 3.11: Quervernetzungsreaktion mittels EDC. Der Null-Längen-Quervernetzer EDC ermöglicht, durch die Aktivierung einer Carboxy-Gruppe zu einem *o*-Acylisoharnstoffester, den nucleophilen Angriff eines primärenamins, ohne selbst ein Teil der finalen Amidbindung zu werden.

Bei dieser Methode wurden FITC-markierte Peptide eingesetzt, um eine erfolgreiche Quervernetzung im Western Blot mittels Antikörper gegen FITC nachzuweisen. Zur Korrektur der Konzentration von FITC-gelabelten Peptiden wurde die Menge an gelöstem FITC spektroskopisch bestimmt. Hierzu wurden die in DMSO gelösten synthetischen Peptide 1:100 in Phosphatpuffer (pH = 7,2) verdünnt und die Extinktion bei $\lambda = 492 \text{ nm}$ ermittelt. Nach Formel 3.6 wurde mit $\epsilon_{(\text{gebundenes FITC}, 492 \text{ nm})} = 62.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für an Protein gelabeltes FITC dessen Konzentration berechnet (de Petris, 1978).

MES-Puffer	
MES pH 6,0	10 mM
NaCl	100 mM
EDC	62,5 mM in MES-Puffer
Ammoniumacetat	416 mM

Die chemische Quervernetzung eines Proteins mit einem Peptid wurde in einem 50 μl Ansatz durchgeführt. Beide Komponenten wurden in MES-Puffer ausverdünnt. Die Endkonzentration des eingesetzten Proteins betrug stets 10 μM . Die Peptidkonzentration wurde von 5 μM bis 20 μM variiert. Nach Zugabe von 4 μl EDC (Endkonzentration 5 mM) erfolgte eine einstündige Inkubation auf Eis. Die Reaktion wurde mit 6 μl Ammoniumacetat-Lösung abgestoppt (Endkonzentration 50 mM). Anschließend wurden die Proben 1:2 mit 2xLadepuffer (siehe 3.2.1) versetzt und denaturiert. Zur Detektion mittels Western Blot wurden 5 μl (gegebenenfalls weiter verdünnt) auf ein SDS-Gel aufgetragen.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zum Einfluss des C-terminalen Tryptophans

In bioinformatischen Analysen wurde festgestellt, dass 22 % der cytosolischen und nucleären Fe/S-Proteine in *S. cerevisiae* die Aminosäure Tryptophan an der extremen C-terminalen Position aufweisen (siehe 1.5). Wird bedacht, dass die Häufigkeit eines C-terminalen Tryptophans im kompletten Hefeproteom nur 1,7 % beträgt, stellt sich die Frage, warum diese Aminosäure bei Fe/S-Proteinen eine Ordnungsgröße frequenter vorkommt? Könnte es sich um eine Signalsequenz handeln? Diese Tryptophan-Hypothese wird im Folgenden an drei cytosolischen Fe/S-Proteinen untersucht.

4.1.1 Einfluss auf die Funktion von Nar1

Das zu [Fe-Fe]-Hydrogenasen homologe Protein Nar1 verbindet die frühe mit der späten CIA-Maschinerie. Obwohl die genaue Funktion auf molekularer Ebene noch nicht geklärt ist, wird Nar1 als Transporter des Fe/S-Clusters angesehen. Die Begebenheit, dass Nar1 als Bestandteil der CIA-Maschinerie zusätzlich an seiner eigenen Reifung beteiligt ist, macht es zu einem interessanten Untersuchungsobjekt.

Im Rahmen einer Doktorarbeit über das Protein Nar1 in der Arbeitsgruppe von Prof. R. Lill wurde der Einfluss des C-terminalen Restes W491 auf die Lebensfähigkeit von Zellen und die Reifung von cytosolischen Fe/S-Proteinen bereits analysiert (Urzica, 2007). Dort wurde geschlussfolgert, dass besagtes Tryptophan nicht essentiell ist. Jedoch wurde in dieser Studie, der Rettung einer centromeren Plasmid-codierten Nar1- Δ W491-Mutante in einem Gal_NAR1-Stamm, mit dem relativ starken Promotor *MET25* gearbeitet. Nar1 gehört, wie auch andere Mitglieder der CIA-Maschinerie, zu den Proteinen, welche in Hefe nur in moderater Zahl vorliegen (Paul, 2014). Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Proteine über schwache Promotoren verfügen. Um einen Einfluss des Promotors auf die Untersuchung auszuschließen, wurden in der vorliegenden Arbeit Plasmide mit verschiedenen starken Promotoren eingesetzt.

Um die Funktion des C-terminalen Tryptophans untersuchen zu können, mussten zuerst Plasmide angefertigt werden, welche dann in einen regulierbaren Hefestamm transformiert wurden. Zunächst wurden Nar1-Expressionsvektoren für *S. cerevisiae* mittels klassischer Klonierungsschritte (PCR, Aufreinigung über Agarosegelelektrophorese, Restriktionsverdau, Ligation, *E. coli*-Transformation, Plasmidisolierung aus *E. coli* und Sequenzierung; siehe 3.2.1-3.2.9) konstruiert. Zum einen wurde die codierende Sequenz (1476 bp) inklusive der Sequenzen des natürlichen Promotor- (nP, 591 bp) und Terminatorbereichs (558 bp) des *NAR1*-Gens mittels PCR aus chromosomaler DNA des *S. cerevisiae*-Stammes W303 amplifiziert und in das Shuttle-Plasmid p416 zwischen die Restriktionsschnittstellen *SacI* und

KpnI kloniert. Zum anderen wurde die codierende Sequenz und der natürliche Terminator, bei Erhalt des *MET25*-Promotors, in p416MET25 zwischen die Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *KpnI* ligiert. Des Weiteren wurde in einem dritten Vektor durch Schneiden mit *SacI* und *SpeI* der Promotor des CIA-Faktors Nbp35 (504 bp) in das Konstrukt eingesetzt. Nbp35 ist ein Protein mit einer zehnfach niedrigeren Abundanz im Vergleich zu Nar1 (Paul, 2014). Anschließend wurde in allen drei Plasmiden mittels gezielter Mutagenese (siehe 3.2.10) das TGG-Codon des C-terminalen Tryptophans W491 in ein TGA-Stopp-Codon mutiert. Diese Mutation wird im Folgenden $\Delta 1$ genannt. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich der C-Terminus von Fe/S-Proteinen von Interesse ist, wird bei gekürzten Varianten entgegen der Konvention, auf Grund der Einfachheit, an diesem Ende der Proteine angefangen zu zählen.

Da es sich bei *NAR1* um ein essentielles Gen handelt, ist es nicht möglich dieses zu deletieren. Eine Alternative zur Deletion stellt eine effektive Runterregulation des Gens dar. Hierfür geeignet ist der *GAL1-10*-Promotor (siehe 2.14.3). Dieser wurde mittels einer Kassette im Genom direkt vor dem *NAR1*-Gen platziert, sodass dieses mit Galactose bzw. Glucose reguliert werden kann (Balk *et al.*, 2004).

Die sechs konstruierten Plasmide sowie ein korrespondierendes Leerplasmid ohne Gen (\emptyset) wurden in den Hefestamm Gal_NAR1 bzw. WT (W303) transformiert. Hierbei ist zu beachten, dass der *MET25*-Promotor, im Vergleich zum *NAR1*-Promotor, ein starker Promotor (sP) und der *NBP35*-Promotor ein schwacher Promotor (wP) ist. Einzelne Kolonien wurden auf galactosehaltigen SC-Agarplatten bei 30 °C vermehrt. Nach einem Vorwachstum von 40 h in glucosehaltigem SC-Medium wurde ein Tüpfeltest (siehe 3.3.7) zur Analyse des Zellwachstums durchgeführt. Hierzu wurden die Zellsuspensionen auf eine $OD_{600} = 0,5$ eingestellt, seriell jeweils 1:10 verdünnt und auf SC-Glu-Agarplatten getüpfelt. Als Kontrolle diente das Wachstum auf galactosehaltigen Platten. Das Wachstum konnte nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C beurteilt werden.

Alle transformierten Plasmide zeigen das gleiche erwartete Wachstumsverhalten auf der Kontrollplatte, siehe Abbildung 4.1. Bei Depletion von *NAR1* ist ohne eine plasmiderzeugte Nar1-Kopie (\emptyset) nur sehr geringes Wachstum möglich. Bei Expression von Nar1 bzw. der $\Delta 1$ -Mutante unter der Kontrolle des starken Promotors wird der Wachstumsdefekt, wie bei Urzica (2007), komplementiert. Nun zeigen auch die unter der Kontrolle des eigenen und eines anderen schwachen Promotors exprimierten Gene des kompletten *NAR1* ein dem WT vergleichbares Wachstum. Die $\Delta 1$ -Mutanten sind in Kombination mit dem natürlichen bzw. einem schwachen Promotor jedoch nicht fähig, den Wachstumsdefekt vollständig zu komplementieren. Dieses Ergebnis zeigt, dass das C-terminale Tryptophan des essentiellen Gens *NAR1* bei natürlicher Kopiezahl wichtig ist für die Lebensfähigkeit von Hefezellen.

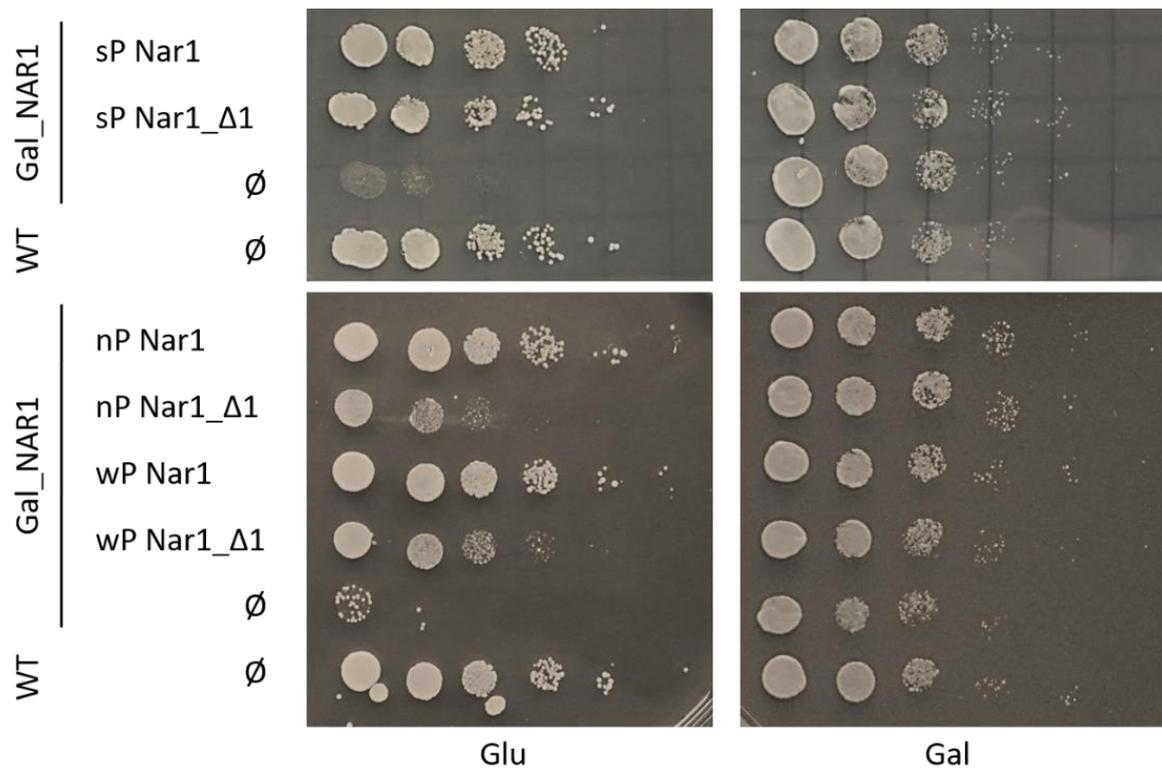


Abbildung 4.1: Tüpfeltest der C-terminalen Nar1-Mutanten: Das C-terminale Tryptophan von Nar1 ist wichtig für das Zellwachstum. Die Plasmide p416_MET25_Nar1, p416_MET25_Nar1_Δ1, p416_NP_Nar1, p416_NP_Nar1_Δ1, p416_Nbp35P_Nar1, p416_Nbp35P_Nar1_Δ1 und p416_Nbp35P (∅) wurden in den Stamm Gal_NAR1 bzw. WT transformiert. Bei dieser Studie bedeutet sP starker Promotor (*MET25*), nP natürlicher Promotor (*NAR1*) und wP schwacher Promotor (*NBP35*). Nach 40-stündigem Vorwachsen in Glucose (Glu)-haltigem SC-Medium wurde, ausgehend von OD₆₀₀ = 0,5, eine serielle Verdünnung (jeweils 1:10) auf Agarplatten mit Glucose bzw. Galactose (Gal) als Kohlenstoffquelle, aufgebracht. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 30 °C.

Des Weiteren wurde untersucht, ob das C-terminale Tryptophan wichtig ist für die Funktion des Nar1-Proteins als Bestandteil der CIA-Maschinerie. Die IPMI Leu1 ist das klassische cytosolische Referenzprotein in der Literatur, wenn die Funktionalität der CIA-Maschinerie von Interesse ist. Auf Grund des einfachen Nachweises von dessen Aktivität, welche von einem erfolgreichen [4Fe-4S]-Clustereinbau abhängig ist, wird sie auch in dieser Analyse herangezogen. Hierzu wurden die gleichen Plasmide in den Stamm Gal_NAR1 bzw. WT transformiert und einzelne Kolonien auf galactosehaltigen SC-Agarplatten bei 30 °C vermehrt. Um die chromosomal-codierte *NAR1*-Kopie zu depletieren, wurden die Zellen für 40 h in glucosehaltigem SC-Medium kultiviert. Mittels Glasperlen wurden jeweils 0,5 g Zellen lysiert (siehe 3.3.4). In diesem Gesamtzellextrakt wurde die Leu1-spezifische Aktivität ermittelt (siehe 3.4.9).

Die Depletion von *NAR1* (∅) führt gemäß Balk *et al.* (2004) zu einem Aktivitätsverlust von Leu1, siehe Abbildung 4.2. Eine plasmiderzeugte Kopie von Nar1, sowohl unter der Kontrolle eines starken, also auch des natürlichen Promotors, ist fähig, eine dem WT vergleichbare Leu1-spezifische Aktivität zu erzeugen. Bei verminderter Expression durch den schwachen

Promotor wird das WT-Niveau nur zu 75% erreicht. Die Deletion des C-terminalen Tryptophans beeinflusst den Clustereinbau in Leu1. Die nP- $\Delta 1$ -Mutante zeigt nur noch eine Aktivität von 76% und wP- $\Delta 1$ von 69%. Bei Überexpression dieser Mutante durch einen starken Promotor ist dieser Aktivitätsverlust nicht zu beobachten. Die Überexpression durch den starken *MET25*-Promotor ist im Western Blot sehr deutlich zu erkennen. Die Nar1-Proteinmengen der Extrakte aus Hefezellen mit Plasmiden mit natürlichem oder schwachem Promotor entsprechen dem WT-Niveau. Diese Daten legen nahe, dass die Aminosäure Tryptophan an C-terminaler Position des Proteins Nar1 wichtig ist für dessen Funktion innerhalb der CIA-Maschinerie, um einen Fe/S-Clustereinbau in das Targetprotein Leu1 zu ermöglichen. Jedoch kann der Defekt durch Überexpression kompensiert werden.

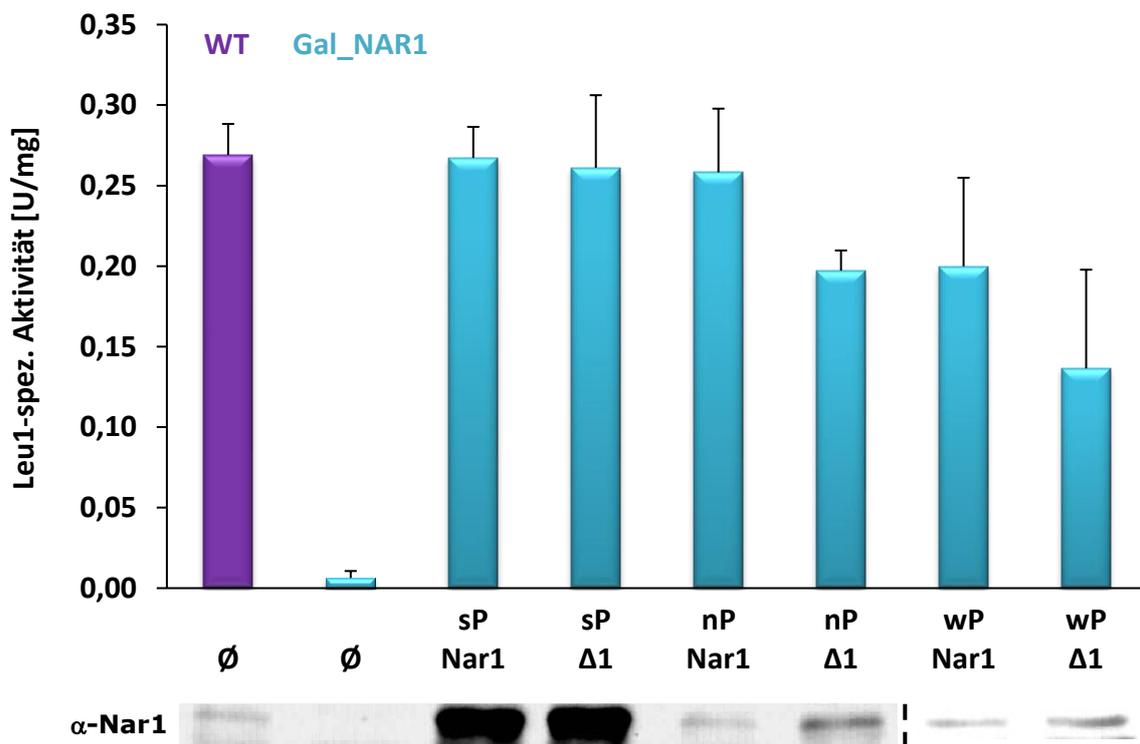


Abbildung 4.2: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der C-terminalen Nar1-Mutanten: Das C-terminale Tryptophan von Nar1 ist wichtig für den Fe/S-Clustereinbau in Leu1. Das Gen *NAR1* bzw. dessen Mutante $\Delta 1$, sowie kein Gen (\emptyset), wurden auf p416-Plasmiden unter der Kontrolle des starken Promotors (sP, *MET25*), des natürlichen Promotors (nP, *NAR1*) oder des schwachen Promotors (wP, *NBP35*) in den Stamm Gal_NAR1 (hellblau) bzw. WT (lila) transformiert. Um die chromosomale *NAR1*-Kopie zu depletieren, wurden die Zellen 40 h in glucosehaltigem SC-Medium kultiviert. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 0,5g Zellen aufgeschlossen. Für die Leu1-Aktivitätsmessung wurden jeweils 3 μ l Gesamtzellextrakt eingesetzt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten einer Messreihe wurden auf den Mittelwert der Aktivitäten der Kontrolle und nP-Nar1 normiert. Es wurden mindestens sechs einzelne Kolonien aus zwei unabhängigen Hefetransformationen analysiert (n=6). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen. Der Nachweis der Proteinmengen erfolgte durch Immundetektion unter Verwendung eines Nar1-spezifischen Antikörperserums.

4.1.2 Einfluss auf die Funktion von Apd1

Als nächstes wurde der Einfluss des C-terminalen Tryptophans von Apd1 auf das Zellwachstum analysiert. Da die Funktion des nicht essentiellen Proteins bisher nicht geklärt ist, kann ein Einfluss darauf nicht untersucht werden. Apd1 ist ein cytosolisches [2Fe-2S]-Protein einer neuartigen Proteinklasse mit zwei Histidin-Clusterliganden (Stegmaier, 2017). Da der Fe/S-Clustereinbau von der CIA-Maschinerie abhängig ist (C. Blinn, persönliche Mitteilung) und es bisher keine Informationen über einen Zusammenhang zwischen der CIA-Maschinerie und cytosolischen [2Fe-2S]-Targetproteinen gibt, stellt dieses Protein einen interessanten Untersuchungsgegenstand dar. Des Weiteren wurde Apd1 mit Hilfe der Tryptophan-Hypothese als mögliches Fe/S-Protein identifiziert und sollte deswegen dahingehend näher untersucht werden. Da das *APD1*-Gen für das Wachstum von Hefezellen auf SC- oder YP-Medium nicht essentiell und die Funktion nicht bekannt ist, war es schwer, Bedingungen zu finden, unter welchen ein Phänotyp beobachtet werden kann. $\Delta apd1$ -Zellen zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Redox-Potentiator 2,3,4-Trihydroxybenzophenon (\triangleq Gallobenzophenon, abgekürzt Gallo) (Lee *et al.*, 2014a). Im Zuge ihrer Dissertation in diesem Arbeitskreis entwickelte Frau Catharina Blinn eine Screening-Methode, um die für die [2Fe-2S]-Clusterbindung wichtigen Aminosäurereste zu identifizieren. So sind $\Delta apd1$ -Zellen nicht fähig in Medium mit einer Konzentration von 100 μ M Gallo zu wachsen. Diese synthetisch letalen Bedingungen wurden hier genutzt, um den Einfluss des C-terminalen Tryptophans zu analysieren.

Das Gen *APD1* bzw. dessen Mutanten W1A, $\Delta 1$, $\Delta 3$, und $\Delta 6$ codiert auf p416-Plasmiden unter der Kontrolle des natürlichen Promotors, sowie ein Leerplasmid (\emptyset) wurden in den $\Delta apd1$ -Stamm bzw. WT transformiert. Einzelne Kolonien wurden auf SC-Glu-Agarplatten bei 30 °C vermehrt. Nach einem Vorwachstum von 16 h in SC-Glu-Medium wurde ein Tüpfeltest (siehe 3.3.7) zur Analyse des Zellwachstums durchgeführt. Die Zellsuspensionen wurden auf eine $OD_{600} = 0,5$ eingestellt, seriell 1:10 verdünnt und auf Platten mit 100 μ M Gallo aufgetragen. Als Kontrolle diente das Wachstum auf unbehandelten SC-Glu-Agarplatten. Das Wachstum konnte nach einer Inkubationszeit von drei Tagen bei 30 °C beurteilt werden.

Abbildung 4.3 **A** verdeutlicht die synthetisch letalen Bedingungen der $\Delta apd1$ -Zellen ohne rettende Genkopie (\emptyset). Plasmid erzeugtes Apd1 ist fähig den Wachstumsdefekt auf Medium mit 100 μ M Gallo zu komplementieren. Wird durch Einführen eines Stopp-Codons der C-Terminus des Proteins verkürzt ($\Delta 1$ - $\Delta 6$), bzw. das Tryptophan durch einen Alaninrest ersetzt (W1A), ist kein Wachstum mehr möglich. Auf der unbehandelten Kontrollplatte zeigen alle Transformanten identisches Wachstum.

Weiterhin wurde das Wachstum in Flüssigkultur untersucht. Nach 16-stündigem Vorwachstum in SC-Glu-Medium wurden 20 ml-Kulturen mit $OD_{600} = 0,1$ inokuliert und mit 100 μ M Gallo versetzt. Eine mitgeführte Kontrolle blieb unbehandelt. Die Kultivierung erfolgte für 24 h bei 30 °C.

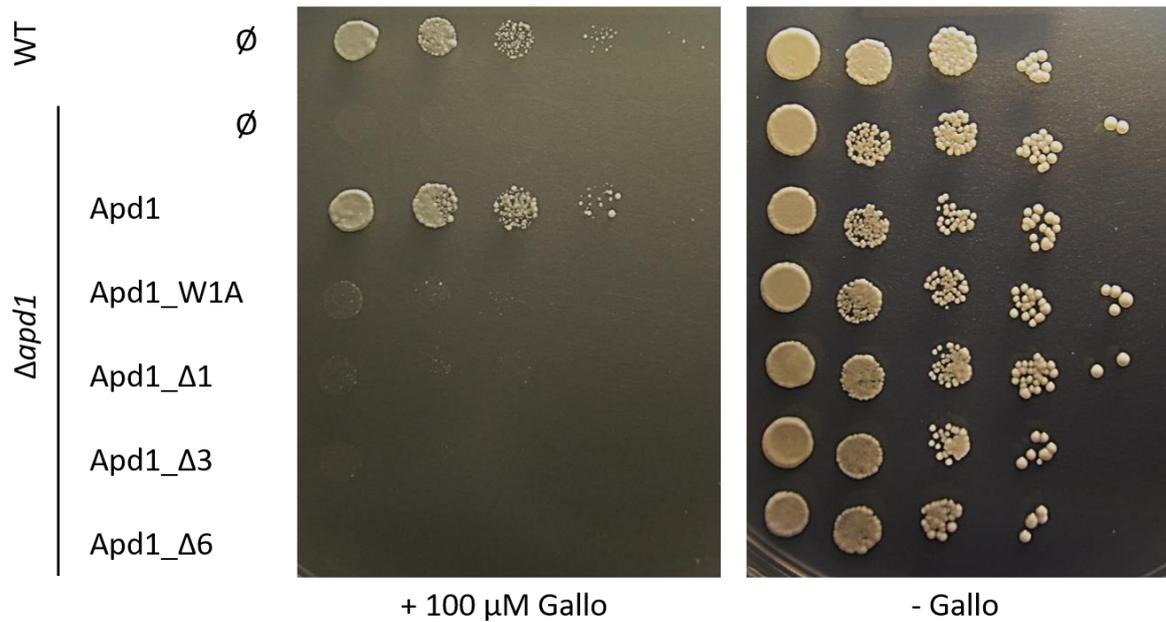
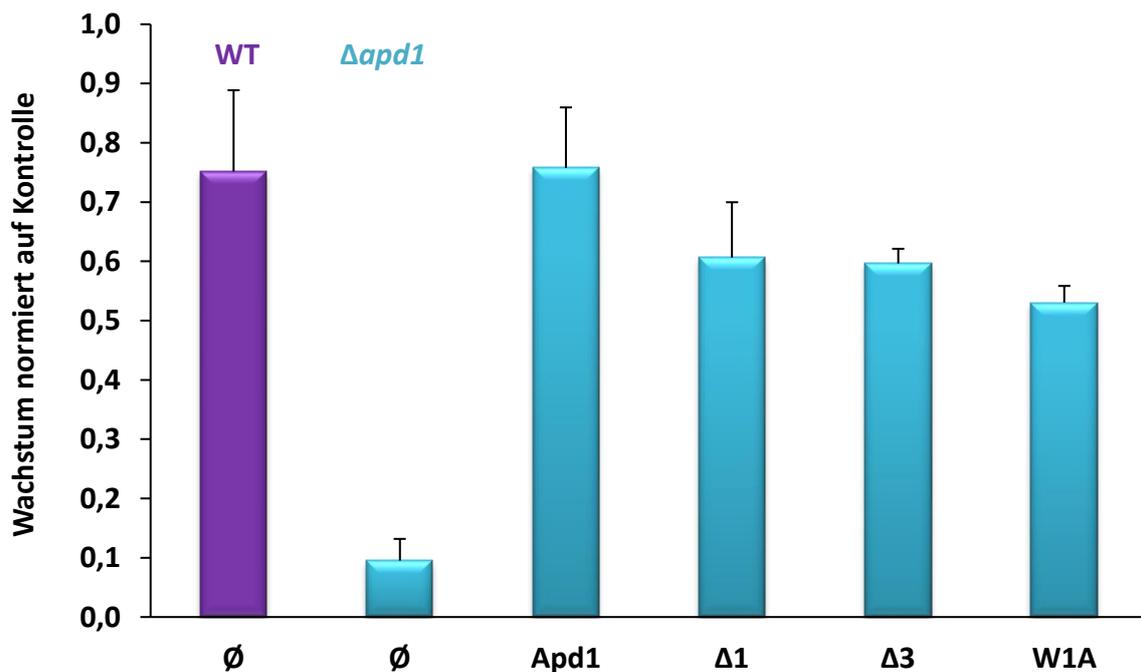
A**B**

Abbildung 4.3: Tüpfeltest und Wachstumsmessung der C-terminalen Apd1-Mutanten: Das C-terminale Tryptophan von Apd1 ist wichtig für das Zellwachstum unter synthetisch letalen Bedingungen. Das Gen *APD1* bzw. dessen Mutanten W1A, $\Delta 1$, $\Delta 3$, und $\Delta 6$, sowie kein Gen (\emptyset), wurden auf p416-Plasmiden unter der Kontrolle des natürlichen Promotors in den Stamm $\Delta apd1$ bzw. WT transformiert. **A Tüpfeltest:** Nach 16-stündigem Vorwachstum in SC-Glu-Medium wurde, ausgehend von $OD_{600} = 0,5$, eine serielle Verdünnung (jeweils 1:10) auf Agarplatten mit und ohne 100 μ M Gallo, aufgebracht. Die Inkubation erfolgte für drei Tage bei 30 °C. **B Wachstum in Flüssigkultur:** Nach 16-stündigem Vorwachstum in SC-Glu-Medium wurden 20 ml-Kulturen mit $OD_{600} = 0,1$ inokuliert und mit 100 μ M Gallo versetzt. Eine mitgeführte Kontrolle blieb unbehandelt. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C. Nach 24 h wurde die OD_{600} 1:10 verd. gemessen. Die Werte werden auf das Wachstum der jeweiligen Kontrolle ohne Zugabe von Gallo normiert dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dreier unabhängiger Messungen einzelner Kolonien (n=3).

Abbildung 4.3 **B** zeigt das Wachstum unter synthetisch letalen Bedingungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die gemessenen OD₆₀₀-Werte (1:10 verd.) sind normiert auf den Wert der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Unter unbehandelten Bedingungen ist, wie auch beim Wachstum auf Agarplatten, kein Wachstumsdefekt bei den Mutanten zu beobachten. Nach Zugabe von 100 µM Gallo ist das Wachstum aller Transformanten reduziert. Eine plasmid erzeugte Apd1-Kopie kann, wie beim WT, den Wachstumsdefekt nicht vollständig komplementieren. Die Mutanten zeigen aber eine deutliche Abnahme des Wachstums nach 24 h um 40 %. Diese Daten zeigen, dass das C-terminale Tryptophan von Apd1 einen Einfluss auf das Zellwachstum unter synthetisch letalen Bedingungen hat.

4.1.3 Einfluss auf die Funktion der IPMI

Die IPMI war und ist für die Identifikation und Untersuchungen der CIA-Maschinerie das klassische Referenzprotein für cytosolische Fe/S-Proteine. Auf Grund der Bildung des Intermediates Isopropylmaleat bei der Isomerisierung von 2-Isopropylmalat zu 3-Isopropylmalat bzw. von 3-Isopropylmalat zu 2-Isopropylmalat, kann die Aktivität des Enzyms spektroskopisch bestimmt werden. Als Mitglied der viel untersuchten Aconitase-Proteinfamilie kann es leicht mit verwandten Proteinen verglichen werden. So zeigt ein Vergleich des Aufbaus der IPMI aus verschiedenen Organismen eine C-terminale Verlängerung bei den Proteinen aus Pilzen im Gegensatz zu denen aus Pflanzen oder Prokaryoten (siehe Abbildung 1.5, Seite 13). Diese Besonderheit bei Organismen, welche die CIA-Maschinerie zum Einbau des [4Fe-4S]-Clusters benötigen, verstärkt das Interesse, das C-terminale Tryptophan dieses Proteins näher zu untersuchen. In Vorversuchen zu dieser Arbeit konnte Herr Arthur Ebert in seiner Diplomarbeit bereits zeigen, dass durch Entfernen der drei letzten Aminosäuren die spezifische Aktivität von Leu1 erheblich sinkt (Ebert, 2014).

Um die wichtigen Aminosäuren der C-terminalen Verlängerung der IPMI aus *S. cerevisiae* identifizieren zu können, wurden zunächst verschiedene Mutanten hergestellt. Auf Grundlage des Plasmides p416_Leu1, unter der Kontrolle des natürlichen *LEU1*-Promotors, wurden mittels gezielter Mutagenese (siehe 3.2.10), die in Tabelle 4.1 genannten Mutanten erzeugt. Aufgeführt sind die 35 C-terminalen Aminosäuren des *S. cerevisiae*-WT-Leu1-Proteins sowie die dem Stopp-Codon (dargestellt als „*“) folgenden fünf Aminosäuren, wenn die Nucleotidsequenz der Terminatorregion übersetzt wird. Die eingefügten Mutationen sind gelb markiert. Zunächst wurde die codierende Sequenz stückweise, ausgehend vom C-Terminus, verkürzt. Durch Einfügen eines Stopp-Codons an der letzten Position wurde die Mutante Δ1 konstruiert. Nach dem gleichen Schema wurden die Mutanten Δ2, Δ10, Δ17, Δ26 und Δ34 gestaltet. Um die codierende Sequenz zu verlängern, wurde das natürliche Stopp-Codon in einen Serinrest mutiert und nach der gewünschten Anzahl zusätzlicher Aminosäuren ein Stopp-Codon inseriert. So wurde die Mutante +3, im Vergleich zur WT-Sequenz, um drei Aminosäuren verlängert. Des Weiteren wurden gekürzte oder verlängerte Sequenzen hergestellt, welche ein Tryptophan am neugenerierten C-Terminus aufweisen (+4W,

W1G/+4W und H4W Δ 3). Um die Bedeutung der zwei letzten C-terminalen Reste D und W zu analysieren, wurden diese zu Alaninresten mutiert (W1A, D2A und D2A/W1A). Abschließend wurden die Mutanten W1F und W1Y erzeugt, um festzustellen, ob der aromatische Charakter von Tryptophan für dessen Funktion am C-Terminus wichtig ist.

Tabelle 4.1: Konstruierte Mutanten des C-Terminus des Hefe-Leu1-Proteins

Mutante	35 34 33 32 31 30 29 28 27 26 25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0+1+2+3+4+5
WT Leu1	EKYSFLEGGSKLLKFDNVPKRKAVTTTTFDKVHQDW*TVKNN
Δ 1	EKYSFLEGGSKLLKFDNVPKRKAVTTTTFDKVHQD* * TVKNN
Δ 2	EKYSFLEGGSKLLKFDNVPKRKAVTTTTFDKVHQ* W *TVKNN
Δ 3	EKYSFLEGGSKLLKFDNVPKRKAVTTTTFDKVH* D W*TVKNN
Δ 10	EKYSFLEGGSKLLKFDNVPKRKAVT* T FDKVHQDW*TVKNN
Δ 17	EKYSFLEGGSKLLKFDNV* K RKAVTTTTFDKVHQDW*TVKNN
Δ 26	EKYSFLEGG* K LLKFDNVPKRKAVTTTTFDKVHQDW*TVKNN
Δ 34	E* Y SFLEGGSKLLKFDNVPKRKAVTTTTFDKVHQDW*TVKNN
+3	EKYSFLEGGSKLLKFDNVPKRKAVTTTTFDKVHQD W S T V* N N
+4W	EKYSFLEGGSKLLKFDNVPKRKAVTTTTFDKVHQD W S T V W * N
W1G/+4W	EKYSFLEGGSKLLKFDNVPKRKAVTTTTFDKVHQD G S T V W * N
H4W Δ 3	EKYSFLEGGSKLLKFDNVPKRKAVTTTTFDKV W * D W*TVKNN
W1A	EKYSFLEGGSKLLKFDNVPKRKAVTTTTFDKVHQD A *TVKNN
D2A	EKYSFLEGGSKLLKFDNVPKRKAVTTTTFDKVHQ A W*TVKNN
D2A/W1A	EKYSFLEGGSKLLKFDNVPKRKAVTTTTFDKVHQ AA *TVKNN
W1F	EKYSFLEGGSKLLKFDNVPKRKAVTTTTFDKVHQD F *TVKNN
W1Y	EKYSFLEGGSKLLKFDNVPKRKAVTTTTFDKVHQD Y *TVKNN

Der Einfluss der Mutationen auf die Funktion der IPMI wurde durch Messungen der Leu1-spezifischen Aktivität in Gesamtzellextraktpräparaten untersucht (siehe 3.4.9). Hierfür wurden die mutierten Plasmide in den Deletionsstamm Δ leu1 transformiert. Bei diesem Stamm wurde durch homologe Rekombination das chromosomale *LEU1*-Gen durch eine *Nat*-Kassette ersetzt. Bei jeder Messreihe wurden stets drei Kontrollen mitgeführt: Der WT-Stamm und der Deletionsstamm jeweils mit transformiertem Plasmid ohne Genkopie (\emptyset), sowie der Deletionsstamm mit einer Plasmidkopie des WT-*LEU1*-Gens. Bei allen durchgeführten Leu1-Enzymaktivitätsmessungen wurde die gemessene Aktivität einer Mutante normiert auf einen Mittelwert aus WT und der Leu1-WT-Plasmidkopie der entsprechenden Messreihe. Anschließend wurden die normierten Werte der verschiedenen Messreihen (n=6) gemittelt und mit dem Mittelwert der zwei Kontrollwerte, über alle Messreihen hinweg, renormiert.

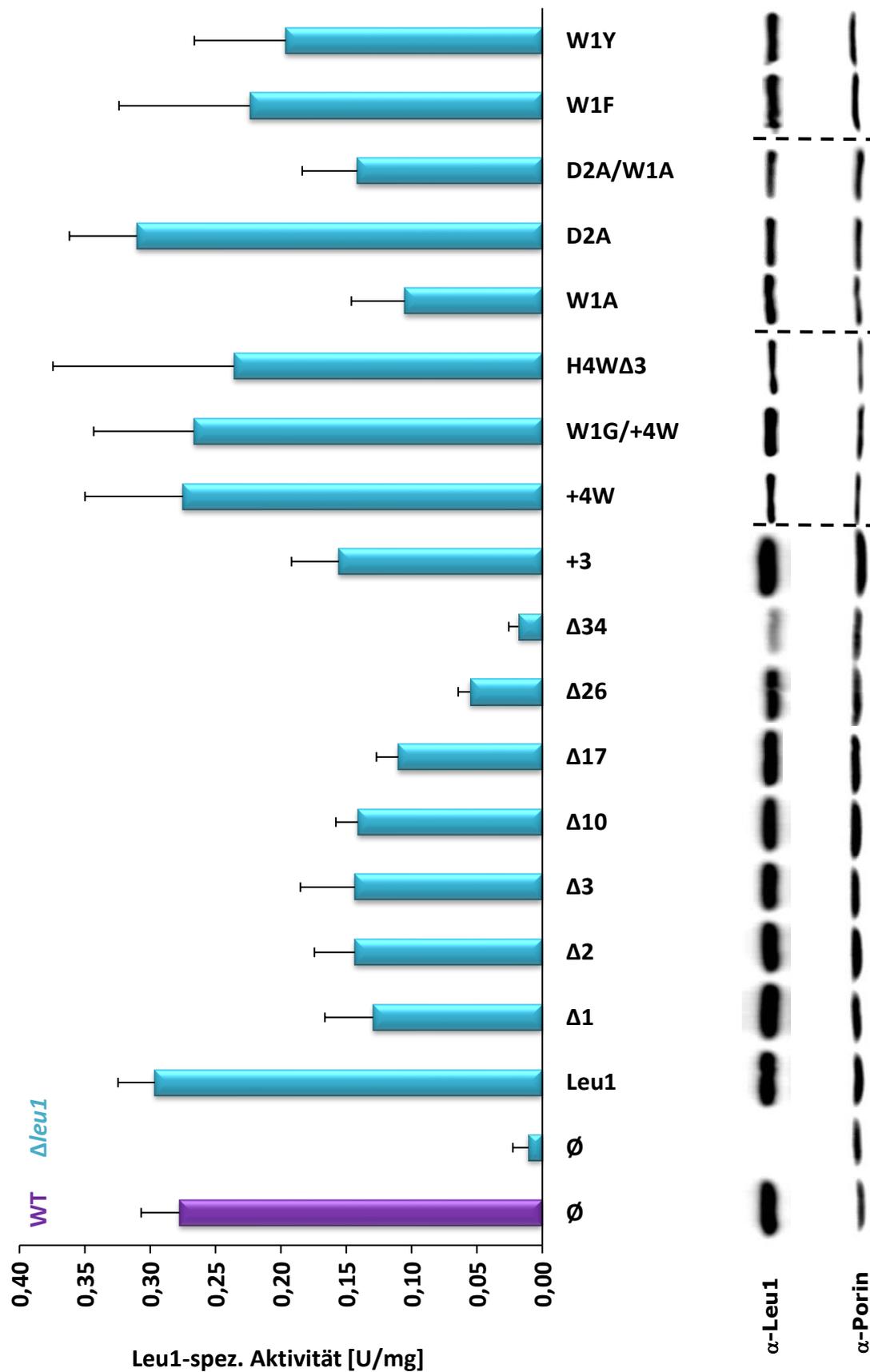


Abbildung 4.4: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der C-terminalen Leu1-Mutanten: Das C-terminale Tryptophan ist wichtig für die Aktivität der IPMI. Das Gen *LEU1* bzw. dessen

Mutanten, sowie kein Gen (\emptyset), wurden auf p416-Plasmiden unter der Kontrolle des natürlichen Promotors in den Deletionsstamm $\Delta leu1$ (hellblau) bzw. WT (lila) transformiert. Die Zellen wurden 40 h in SC-Glu-Medium kultiviert. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 0,5 g Zellen aufgeschlossen. Für die Leu1-Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 3 μ l Gesamtzellextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten einer Messreihe wurden auf den Mittelwert der Aktivitäten der WT-Kontrolle und Leu1 normiert. Es wurden mindestens sechs einzelne Kolonien aus zwei unabhängigen Hefetransformationen analysiert ($n=6$). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen. Der Nachweis der Proteinmengen erfolgte durch Immundetektion unter Verwendung eines Leu1-spezifischen Antikörperserums. Porin diente als Ladekontrolle. Es wurden stets 20 μ g Gesamtprotein aufgetragen.

Die Deletion der chromosomalen Kopie ohne rettende Plasmidkopie führt gemäß Ebert (2014) zu einem Aktivitätsverlust, siehe Abbildung 4.4. Es wird eine minimale Hintergrundaktivität von ca. $0,011 \pm 0,012$ U/mg detektiert. Eine plasmid erzeugte Leu1-Kopie ist fähig, die Deletion vollständig zu kompensieren. Dessen Aktivität von $0,296 \pm 0,028$ U/mg steht mit dem WT-Wert von $0,278 \pm 0,029$ U/mg in Relation. Wird die Sequenz nun um das C-terminale Tryptophan verkürzt ($\Delta 1$), sinkt die Aktivität um 57 % auf $0,129 \pm 0,037$ U/mg. Weitere Verkürzungen um bis zu zehn Aminosäuren führen zu vergleichbaren Aktivitätsverlusten ($\Delta 2$, $\Delta 3$ und $\Delta 10$). Darüber hinaus nimmt die Aktivität der Mutanten $\Delta 17$ und $\Delta 26$ weiter ab, bis sie durch Entfernen der C-terminalen Verlängerung von 34 Aminosäuren ($\Delta 34$) das Hintergrundniveau erreicht. Der Anteil an Leu1-Protein im Gesamtzellextrakt ist bei der $\Delta 34$ -Mutante ebenfalls geringer, wohingegen der Proteingehalt aller anderen Mutanten stabil ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass die C-terminale Verlängerung der IPMI wichtig ist für deren Aktivität.

Wird die natürliche Leu1-Sequenz nun um drei Aminosäuren verlängert (+3), sodass der Tryptophanrest nicht länger den C-Terminus bildet, nimmt die spezifische Enzymaktivität ebenfalls ab. Interessanterweise liegt die Aktivität im gleichen Bereich wie bei einer Verkürzung um bis zu zehn Aminosäuren. Wenn jedoch neben einer Verlängerung der Aminosäuresequenz auch der neuentstandene C-Terminus in ein Tryptophan mutiert wird (+4W), ist keine Abnahme der Enzymaktivität zu beobachten. Dabei ist es nicht von Bedeutung, ob das ursprüngliche C-terminale Tryptophan W1 weiterhin in der Sequenz enthalten ist oder nicht (W1G/+4W). Die Aktivitäten stimmen mit dem WT-Niveau überein. Dies gilt auch bei einer verkürzten Sequenz, wenn der neue C-Terminus ein Tryptophan ist (H4W $\Delta 3$). Obwohl die Messwerte dieser Mutante eine größere Abweichung voneinander aufweisen, als die der anderen Mutanten, kann eine vollständige Funktionalität angenommen werden. Diese Daten weisen darauf hin, dass dem C-terminalen Tryptophan die größte Bedeutung innerhalb der C-terminalen Verlängerung zukommt. In dem untersuchten Bereich (von -3 bis +4) scheint die Länge dieser zusätzlichen Sequenz bei Leu1 aus Pilzen vernachlässigbar, sofern der letzte Rest ein Tryptophan darstellt.

Um zu untersuchen, ob nur das Tryptophan oder auch der Asparaginsäurerest des in bioinformatischen Analysen identifizierten Tripeptides L(D/E)W wichtig ist, wurden diese

Reste zu Alaninen mutiert. Die Aktivität der Mutante D2A bleibt jedoch unbeeinflusst, es ist kein negativer Effekt dieser Veränderung zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigt die Mutante W1A eine Abnahme der Enzymaktivität um 65 % auf $0,105 \pm 0,041$ U/mg. Dies ist mit dem Aktivitätsverlust der $\Delta 1$ -Mutante vergleichbar. Bei Mutation beider Reste (D2A/W1A) wird die Aktivität durch das fehlende Tryptophan beeinflusst und liegt ebenfalls auf dem Niveau der $\Delta 1$ -Mutante. Diese Messungen legen nahe, dass der Asparaginsäurerest an der vorletzten Position unter den Bedingungen der hier durchgeführten Experimente keine Bedeutung für die Aktivität der IPMI hat, das C-terminale Tryptophan hingegen wichtig ist.

Bei der Betrachtung der Sequenzen der C-terminalen Aminosäuresequenzen von cytosolischen und nucleären Fe/S-Proteinen (siehe Abbildung 1.7, Seite 19) fällt auf, dass die Proteine Neverland und Rev3 in manchen Organismen an Stelle des konservierten C-terminalen Tryptophans einen Phenylalaninrest tragen. Im Folgenden wurde untersucht, ob das Tryptophan von Leu1 durch einen anderen aromatischen Rest ersetzt werden kann. Die Mutanten W1F und W1Y zeigen eine Leu1-spezifische Aktivität von $0,224 \pm 0,100$ bzw. $0,196 \pm 0,070$ U/mg, was 76 % bzw. 66 % der Aktivität des WT-Proteins (plasmid erzeugt) entspricht. Diese Werte, welche zwischen den Ergebnissen des WTs und den Δ -Mutanten liegen, deuten darauf hin, dass die Funktion des Tryptophans an der C-terminalen Position zumindest teilweise von den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin übernommen werden kann. Da die aliphatische Aminosäure Alanin (W1A $0,105 \pm 0,041$ U/mg) dazu nicht fähig ist, ist der aromatische Charakter der Aminosäuren von Bedeutung.

Die Methodologie wurde auch angewandt, um die auf Grund von Primärstrukturvergleichen vermuteten Clusterliganden von Leu1 C360, C421 und C424 (siehe 7.1) zu überprüfen. Nach dem Ersetzen dieser Cysteine durch Alanine kann kein Fe/S-Cluster mehr eingebaut werden. Die Vorgehensweise war analog zu den Untersuchungen der C-terminalen Leu1-Mutanten.

Die Werte der Aktivitäten der drei Kontrollen aus Abbildung 4.5 entsprechen den bereits in Abbildung 4.4 gezeigten Werten, da diese über alle Messreihen der verschiedenen Leu1-Mutanten gemittelt wurden. Alle vier analysierten Cystein-Mutanten (C360A, C421A, C424A und C421A/C424A) zeigen nahezu keine Aktivität. Mit einer Restaktivität von 10 % des WT-Proteins liegen diese gerade über dem Detektionsminimum von $0,011$ U/mg (4 %). Die Western Blot-Analyse bestätigt, dass durch die Mutationen nur die Enzymaktivität, nicht aber die Proteinstabilität beeinträchtigt ist. Diese Messungen zeigen, dass die aus Sequenzvergleichen abgeleiteten Cysteine C360, C421 und C424 die Clusterliganden der IPMI aus *S. cerevisiae* sind. Darüber hinaus erlauben sie die Einordnung der Bedeutung des C-terminalen Tryptophans. Ein Vergleich zwischen den 10 % Enzymaktivität der Cystein-Mutanten und den 35 % bzw. 43 % der W1A- bzw. $\Delta 1$ -Mutante weist darauf hin, dass das C-terminale Tryptophan wichtig, aber nicht essentiell ist.

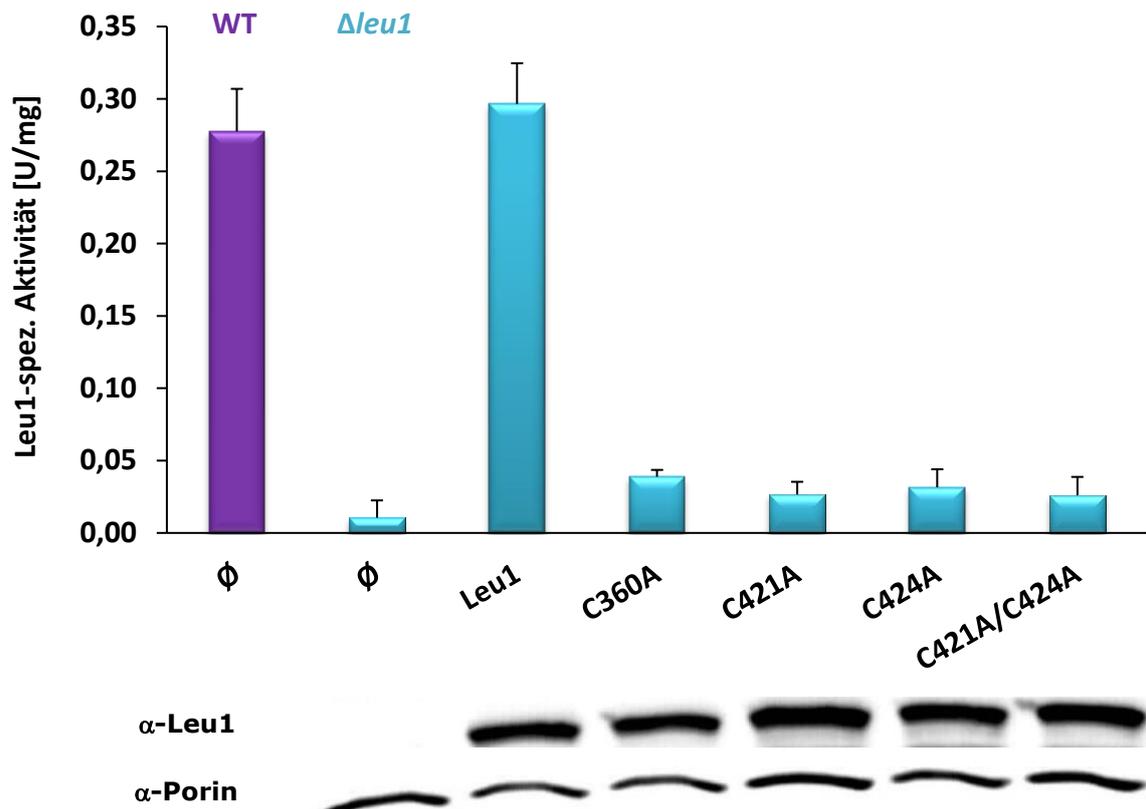


Abbildung 4.5: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der Leu1-Cluster-Cystein-Mutanten: Die Cysteine C360, C421 und C424 sind die Clusterliganden der IPMI. Vorgehensweise siehe Beschriftung von Abbildung 4.4. Es wurden drei unabhängige Messreihen aus einzelnen Kolonien analysiert (n=3). Die Normierung erfolgte analog zu den zuvor gezeigten Leu1-spez. Aktivitätsmessungen, sodass die Werte der drei Kontrollen über alle Messreihen hinweg gemittelt wurden.

Um die Ergebnisse der Leu1-spezifischen Aktivitätsmessung zu verifizieren, wurde der *de novo* Fe/S-Clustereinbau in die C-terminal verkürzten Mutanten $\Delta 1$, $\Delta 3$ und $\Delta 10$ durch Markierung mit ^{55}Fe untersucht. Hierfür wurden die mutierten Plasmide in den Deletionsstamm $\Delta leu1$ transformiert. Als Kontrollen wurden der WT-Stamm und der Deletionsstamm mit transformiertem Plasmid ohne Genkopie (\emptyset), sowie der Deletionsstamm mit einer Plasmidkopie des WT-*LEU1*-Gens mitgeführt. Diese Experimente wurden im Labor von Prof. R. Lill an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Nachdem die Zellen 16 h in eisenarmem Medium kultiviert wurden, erfolgte eine Markierung mit ^{55}Fe für 2 h. Nach einer Gesamtzellextraktpräparation wurde der Clustereinbau durch Immunpräzipitation mit Leu1-spezifischen Immunobeads und anschließender Szintillationszählung bestimmt. Die Durchführung ist in Kapitel 3.3.9 näher beschrieben. Die gemessenen Radioaktivitätswerte pro Gramm Zellen der Proben wurden um den Wert der Negativkontrolle (\emptyset) korrigiert.

Der Fe/S-Clustereinbau in plasmid erzeugtes Leu1-Protein in $\Delta leu1$ -Zellen ist mit dem Einbau in WT-Zellen vergleichbar, siehe Abbildung 4.6. Bei der um das C-terminale Tryptophan verkürzten Mutante $\Delta 1$ nimmt der ^{55}Fe -Einbau um 75 % ab. Dieser Reifungsdefekt ist auch bei den Mutanten $\Delta 3$ und $\Delta 10$ zu beobachten. Der Nachweis der Proteinmenge mittels

Western Blot bestätigt, dass durch die Mutationen die Proteinstabilität nicht beeinflusst ist. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutsamkeit des C-terminalen Tryptophans bei der Reifung der IPMI.

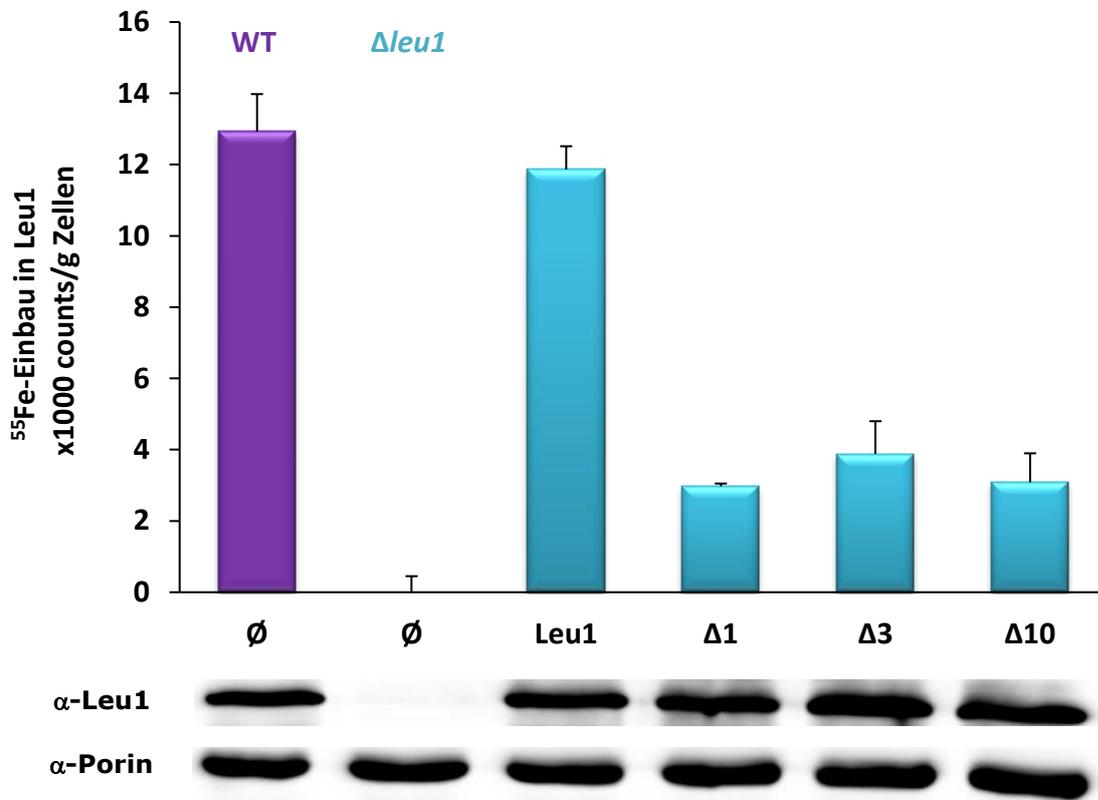


Abbildung 4.6: ⁵⁵Fe-Einbau in C-terminal verkürzte Leu1-Mutanten: Das C-terminale Tryptophan ist wichtig für den Fe-Einbau in Leu1. Das Gen *LEU1* bzw. dessen Mutanten $\Delta 1$, $\Delta 3$ und $\Delta 10$, sowie kein Gen (\emptyset), wurden auf p416-Plasmiden unter der Kontrolle des natürlichen Promotors in den Deletionsstamm $\Delta leu1$ (hellblau) bzw. WT (lila) transformiert. Die Zellen wurden 16 h in eisenarmem Medium kultiviert. Danach erfolgte eine Markierung mit ⁵⁵Fe für 2 h. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 0,5 g Zellen eingesetzt. Der *de novo* Fe/S-Clustereinbau wurde durch Immunpräzipitation mit Leu1-spezifischen Immunobeads und anschließender Szintillationszählung analysiert. Die gemessenen Radioaktivitätswerte pro g Zellen der Proben wurden um den Wert der Negativkontrolle (Hintergrundwert) korrigiert. Es wurden jeweils zwei einzelne Kolonien in Duplikaten untersucht (n=2). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen. Der Nachweis der Proteinmengen erfolgte durch Immundetektion unter Verwendung eines Leu1-spezifischen Antikörperserums. Porin diente als Ladekontrolle.

4.1.4 Einfluss auf die Reifung der Hefe-IPMI in *E. coli*

Bisher wurde der Einfluss des C-terminalen Tryptophans der *S. cerevisiae*-IPMI auf den Einbau des Fe/S-Clusters in Hefe analysiert. Um eine Aussage treffen zu können, ob dies hefespezifisch ist und möglicherweise mit der CIA-Maschinerie in Verbindung stehen könnte, wurde im Folgenden die Reifung der C-terminal verkürzten Hefe-Leu1-Mutanten in *E. coli* untersucht. In Bakterien ist keine CIA-Maschinerie vorhanden. Unter normalen Wachstumsbedingungen erfolgt der Clustereinbau in Fe/S-Proteine durch die ISC-Maschinerie.

Um die Mutanten des Hefe-Proteins heterolog in *E. coli* exprimieren zu können, wurde das Plasmid pET15b_His-Leu1 mittels gezielter Mutagenese verändert. Dieses Plasmid enthält neben einem Gen, welches ihm Ampicillinresistenz verleiht, den *T7lac*-Promotor, welcher mittels IPTG induziert werden kann. N-terminal der codierenden *LEU1*-Sequenz befindet sich die Sequenz des Polyhistidintags His₆. Analog zu den C-terminal gekürzten Varianten des Plasmides p416_Leu1 wurden die Plasmide pET15b_His-Leu1_Δ3, Δ10, Δ17 und Δ34 durch Insertion eines Stopp-Codons konstruiert. Abbildung 4.7 zeigt die erzeugten Mutanten des Hefe-Leu1-Proteins im Vergleich zur C-terminalen Aminosäuresequenz des *E. coli*-LeuD-Proteins. Die Insertion des Stopp-Codons an Position 34 (Δ34) führt zu einer Hefe-Protein-Mutante, welche kürzer ist als das *E. coli*-Protein.

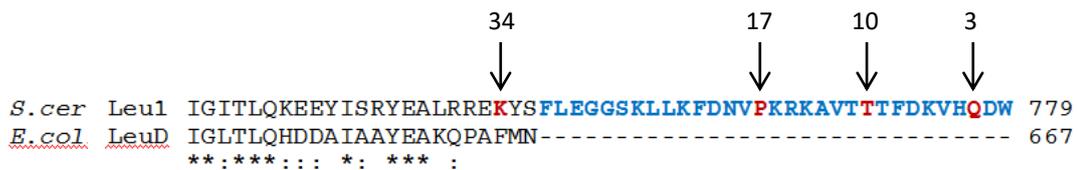


Abbildung 4.7: Mutanten des Leu1-C-Terminus im Vergleich zur *E. coli*-LeuD-Sequenz. Dargestellt ist der Sequenzvergleich der C-terminalen Reste des *S. cerevisiae*-Leu1- und des *E. coli*-LeuD-Proteins. Die mutierten Aminosäuren (Insertion eines Stopp-Codons) sind rot markiert.

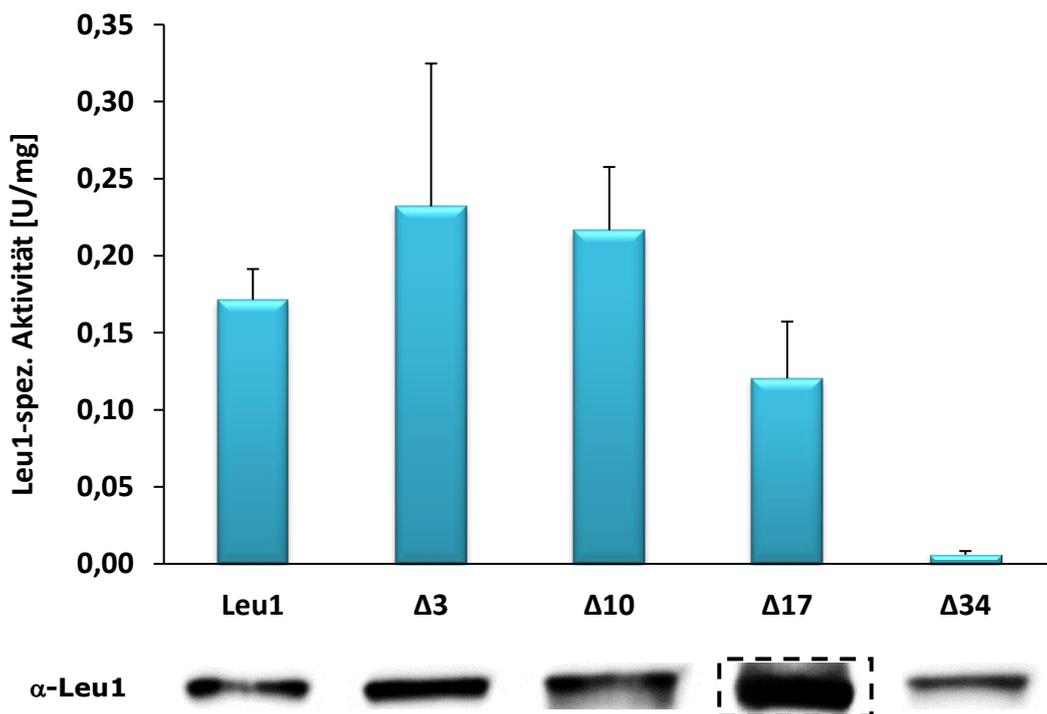


Abbildung 4.8: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der verkürzten Leu1-Mutanten in *E. coli*: Das C-terminale Tryptophan ist nicht wichtig für die Reifung der IPMI in *E. coli*. Das Gen *LEU1* bzw. dessen Mutanten wurden auf pET15b-Plasmiden in BL21-Zellen transformiert. Die Zellen wurden in 0,5 l LB-Medium versetzt mit 3 % EtOH, kultiviert. Nach Induktion bei OD₆₀₀ = 0,5 erfolgte die Expression bei 30 °C über Nacht. Die Zellyse wurde mittels French Press durchgeführt. Für die Leu1-Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 3 (bzw. 5) µl Gesamtzelleextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Es wurden vier Kulturen aus unabhängigen Transformationen analysiert (n=4). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen. Der Nachweis der Proteinmengen erfolgte durch Immundetektion mit einem Leu1-spezifischen Antikörperserum.

Das Plasmid pET15b_His-Leu1 sowie die hergestellten mutierten Varianten wurden in BL21-*E. coli*-Zellen transformiert. Eine Großkultur (LB-Medium mit 3 % EtOH versetzt) wurde bei einer $OD_{600} = 0,5$ mit 0,5 mM IPTG induziert und über Nacht bei 30 °C überexprimiert (siehe 3.3.6). Der Zellaufschluss erfolgte mittels French Press. Um die Reifung des Hefe-Proteins in Bakterien zu untersuchen, wurde die Leu1-spezifische Aktivität in *E. coli*-Gesamtzellextrakt bestimmt.

Da in prokaryotischen IPMIen die C-terminale Verlängerung der Homologe aus Fungi nicht vorhanden ist, wird angenommen, dass das Tryptophan bei der Reifung in *E. coli* keine Rolle spielt. Wie in Abbildung 4.8 zu erkennen ist, trifft dies auf die Mutanten $\Delta 3$ und $\Delta 10$ vollständig zu. Die gemessenen Aktivitäten übersteigen sogar den Wert der WT-Leu1-Kontrolle. Auch die Mutante $\Delta 17$ zeigt eine Aktivität von 70 %. Im Gegensatz dazu ist die Mutante $\Delta 34$ vollständig inaktiv. Die Western Blot-Analyse deutet jedoch nicht auf Stabilitätsprobleme dieser Mutante hin. Diese Daten legen nahe, dass das C-terminale Tryptophan des Hefe-Proteins keine Bedeutung bei der Reifung in *E. coli* hat.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die C-terminal verkürzten Mutanten chemisch rekonstituierbar sind. Dazu wurden die Proteine heterolog in *E. coli* exprimiert. Da sie über einen N-terminalen His₆-Tag verfügen, wurde das Lysat mittels Ni-Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe 3.4.1). Eine Reinigung des Leu1-Proteins mit Ni-NTA-Agarose führte, auf Grund mangelhafter Bindung des Proteins an das Säulenmaterial, nur zu einer geringen Ausbeute. Diese konnte durch einen Wechsel des Säulenmaterials zu Ni-IDA-Resin erheblich gesteigert werden, jedoch auf Kosten der Reinheit. Um eine Präzipitation der isolierten Proteine zu vermeiden, wurde das Eluat sofort durch Umpuffern entsalzt. In Abbildung 4.9 ist als Nachweis der erfolgreichen Isolation beispielhaft die SDS-PAGE des WT-Proteins (86 kDa) dargestellt.

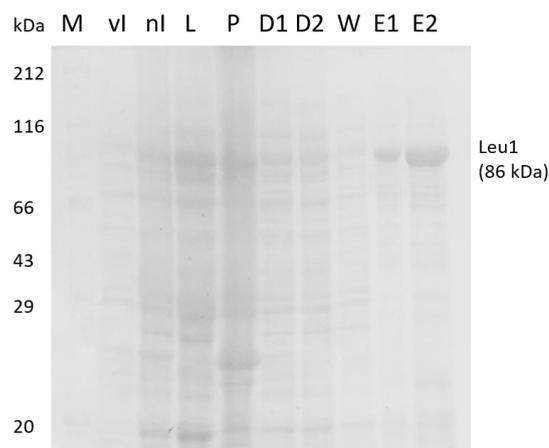


Abbildung 4.9: SDS-PAGE des Ni-IDA-gereinigten Leu1-Proteins. Auf das 10 %-ige Gel wurden neben dem Standard Protein-Marker (M) Proben aufgetragen, welche vor (vI) und nach der Induktion (nI) mit IPTG aus der Kultur entnommen wurden. Weiterhin wurden Proben, welche zu verschiedenen Zeitpunkten der Aufreinigung entnommen wurden, analysiert: Lysat (L), Pellet (P), Durchfluss 1 und 2 (D1, D2), Waschfraktion (W) und Elutionsfraktionen (E).

Werden die Proben vor und nach Induktion miteinander verglichen, fällt auf, dass eine Bande zwischen 66 und 116 kDa stärker wird, welche mit einer Molekülmasse von 86 kDa das Zielprotein darstellt. Das überexprimierte Protein ist im Lysat deutlich sichtbar, jedoch auf gleicher Höhe auch im Pellet, was auf unlösliche Proteinaggregate oder unaufgeschlossene Zellen hindeutet. Die schwachen Banden in den Durchflussfraktionen zeugen von einer unvollständigen Bindung an das Säulenmaterial Ni-IDA. Die Elutionsfraktionen zeigen, dass das Protein erfolgreich isoliert wurde.

Die in *E. coli* exprimierten und aufgereinigten Mutanten des Hefe-Leu1-Proteins wurden unter anaeroben Bedingungen chemisch rekonstituiert. Nach Reduktion mit DTT und mehrstündiger Inkubation mit fünf Äquivalenten an Ammoniumeisen(III)-citrat und Lithiumsulfid wurde die Leu1-spezifische Enzymaktivität gemessen.

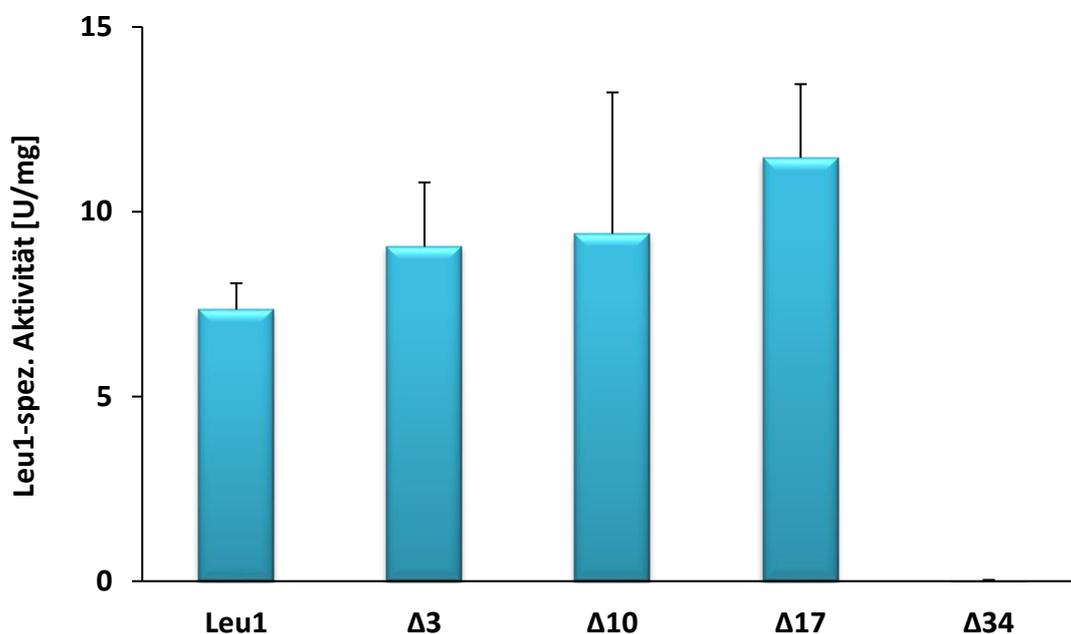


Abbildung 4.10: Leu1-spez. Aktivitätsmessung gereinigter Proteine nach Rekonstitution: In die C-terminal verkürzten Hefe-Leu1-Mutanten Δ3, Δ10 und Δ17 kann ein Fe/S-Cluster eingebaut werden. Die gereinigten Proteine wurden unter anaeroben Bedingungen mit 15 mM DTT reduziert und mit fünf Äquivalenten an Ammoniumeisen(III)-citrat und Lithiumsulfid chemisch rekonstituiert. Nach 3-4 h wurde die Leu1-spezifische Enzymaktivität gemessen (in Triplikaten jeweils 3 µl). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messwerte von drei unabhängigen Rekonstitutionen (n=3).

Abbildung 4.10 verdeutlicht, dass die Mutanten Δ3, Δ10 und Δ17 chemisch rekonstituierbar sind. Da sie spezifische Enzymaktivität zeigen, wurde ein Fe/S-Cluster erfolgreich eingebaut. Die Aktivitäten dieser Mutanten übersteigen sogar den Wert des ungekürzten Proteins. Die Mutante Δ34 hingegen zeigt keine Aktivität, hier fand kein Clustereinbau statt. Diese Messungen belegen, dass die C-terminal gekürzten Mutanten, mit Ausnahme von Δ34, fähig sind einen [4Fe-4S]-Cluster zu tragen. Daraus ist zu schließen, dass die Aktivitätsverluste in Hefezellulären mit dem Clustereinbau in Verbindung stehen.

4.2 Protein-Protein-Interaktionsstudien mit dem CIA-Targeting-Komplex

Die Untersuchungen von cytosolischen und nucleären Fe/S-Proteinen haben gezeigt, dass das C-terminale Tryptophan wichtig ist für den Einbau des Cofaktors. Innerhalb der CIA-Maschinerie ist der CIA-Targeting-Komplex für die Übertragung des Clusters auf die Targetproteine verantwortlich (Netz *et al.*, 2014). Es sollte nun geklärt werden, ob das C-terminale Tryptophan an einer Interaktion mit diesem Komplex beteiligt ist. Daher wurden Protein-Protein-Interaktionsstudien (PPI) mit den Faktoren des CIA-Targeting-Komplexes und Fe/S-Targetproteinen durchgeführt. Dabei kamen das Hefe-Two-Hybrid-System, Coimmunpräzipitation, Nachbarschafts-abhängige Biotin-Identifizierung, chemische Quervernetzung, Fluoreszenzanisotropie-Messungen sowie Isotherme Titrationskalorimetrie zum Einsatz. Daraus sollte eine geeignete Methode gewählt werden, um die Funktion des C-terminalen Tryptophans diesbezüglich untersuchen zu können. Nach erfolgreicher Detektion einer Interaktion zwischen dem CIA-Targeting-Komplex und einem Targetprotein sollte eine mögliche Interaktion der entsprechenden Proteine mit und ohne Tryptophan verglichen werden.

4.2.1 Hefe-Two-Hybrid-System

Das Hefe-Two-Hybrid-System (Y2H) ist eine allgemein angewandte Technik, um PPI *in vivo* aufzudecken. Die genetische Methode wurde 1989 von Fields und Song erarbeitet. Sie beruht auf der strukturellen Eigenschaft bestimmter Transkriptionsfaktoren (beispielsweise Gal4) aus zwei funktionell essentiellen Domänen zu bestehen, einer DNA-Bindedomäne (BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD) (Fields & Song, 1989). Die Aktivierung der Transkription ist möglich, wenn sich diese zwei Domänen in der Nähe voneinander befinden, sie müssen nicht kovalent miteinander verbunden sein. Werden nun zwei Hybridproteine auf kompatiblen Expressionsvektoren codiert, eines fusioniert mit BD und eines mit AD, kann eine Interaktion dieser zwei Proteine durch ein Reportergen nachgewiesen werden. Hierbei entspricht das Bait-Protein (Sonde), dem Protein, für welches ein potentieller Interaktionspartner gefunden werden soll. Es ist mit der Bindedomäne fusioniert. Als Prey-Protein (Beute), fusioniert mit der Aktivierungsdomäne, wird ein Protein bezeichnet, welches ein möglicher Bindungspartner sein könnte. Entsteht eine Interaktion zwischen dem Bait- und Prey-Protein gelangen BD und AD in Nachbarschaft, der Transkriptionsfaktor wird funktionell rekonstituiert, sodass die Transkription des Reportergens (β -Galactosidase) ermöglicht wird (siehe Abbildung 4.11) (Chien *et al.*, 1991). Diese transkriptionelle Methode kann in großem Maßstab angewendet werden, um in einer Plasmidbibliothek zu screenen oder in einem Kleinen, um eine vermutete Interaktion zwischen zwei bekannten Proteinen aufzuzeigen.

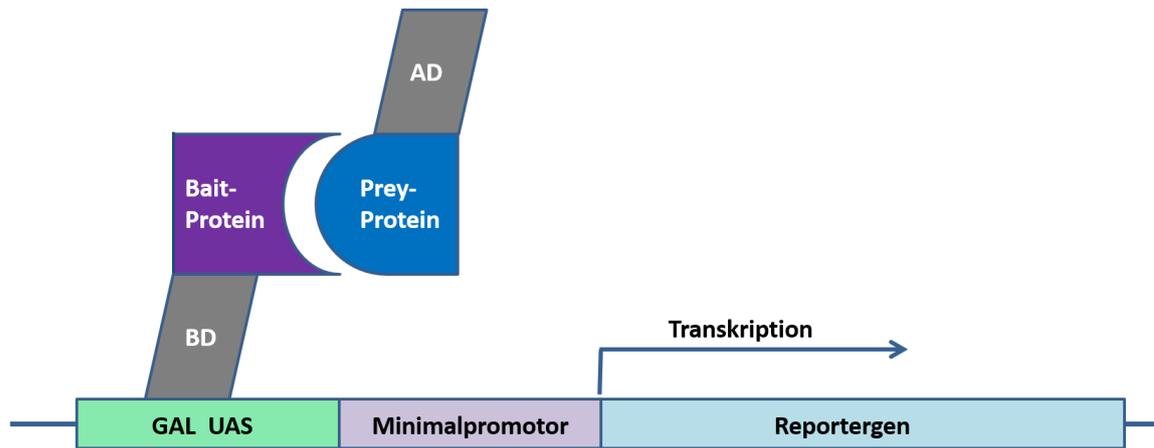


Abbildung 4.11: Prinzip des Hefe-Two-Hybrid-Systems. Ein Bait-Protein ist mit der Bindedomäne BD des Transkriptionsfaktors Gal4 fusioniert, ein Prey-Protein mit dessen Aktivator-domäne AD. Interagieren Bait- und Prey-Proteine, gelangen BD und AD in Nachbarschaft, der Transkriptionsfaktor wird funktionell rekonstituiert und kann somit die Transkription eines Reportergens aktivieren. Quelle: eigene Darstellung, nach Clontech Laboratories.

Der Transkriptionsfaktor Gal4 aus *S. cerevisiae* ist ein natürlicher Regulator des Galactosestoffwechsels (siehe 2.14.3) (Johnston, 1987). Um Wechselwirkungen mit endogenen Regulatorproteinen zu vermeiden, sind im verwendeten Hefestamm Y187 die Gene *GAL4* und *GAL80* deletiert (Harper *et al.*, 1993). Im Genom von Y187 sind, an Stelle des *URA3*-Gens, dem Reportergen *lacZ* die Bindestelle von Gal4, die UAS (*upstream activation sequence*) von *GAL1*, sowie der *GAL1*-Minimalpromotor vorgeschaltet (siehe Abbildung 4.11).

In dieser Arbeit wurde das Matchmaker Two-Hybrid System 3 der Firma Clontech Laboratories Inc. genutzt. Dieses umfasst die kompatiblen Expressionsvektoren pGBKT7 und pGADT7. Beide stellen high-copy 2 μ -Plasmide dar. Das Plasmid pGBKT7 verfügt über den auxotrophen Marker *TRP1* zur Selektion in Hefe und ein Gen, welches seinem Träger Kanamycinresistenz verleiht zur Selektion in *E. coli*. Wohingegen pGADT7 den auxotrophen Marker *LEU2* aufweist und eine Resistenz gegenüber Ampicillin verleiht. In beiden Vektoren stehen die Hybridgene unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors und -Terminators. Das Bait-Protein wird in pGBKT7 mit den Aminosäuren 1-147 der DNA-Bindedomäne des Gal4-Proteins fusioniert. Dazwischen befindet sich ein c-Myc-Tag. In pGADT7 wird das Prey-Protein mit den Aminosäuren 768-881 der Aktivierungsdomäne von Gal4 hybridisiert. Diese ist mit der SV40 nucleären Lokalisierungssequenz (NLS) versehen. Um die Klonierungsarbeit zu vereinfachen, musste der auf pGADT7 vorhandene HA-Tag entfernt werden.

Die Interaktionsstudie wurde mit den Faktoren des CIA-Targeting-Komplexes Cia1, Cia2 und Met18 sowie den Targetproteinen Leu1 und Apd1 durchgeführt. Auf Grund der großen Fehleranfälligkeit und Asymmetrie des Y2H-Systems, wurden alle untersuchten Proteine sowohl als Bait als auch als Prey eingesetzt. Die codierenden Sequenzen von *CIA1* (993 bp)

und *CIA2* (696 bp) wurden aus chromosomaler DNA des *S. cerevisiae* Stammes W303 amplifiziert und jeweils zwischen die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XmaI* kloniert. Zur Klonierung von *APD1* (951 bp) wurden *NcoI* und *BamHI* verwendet. Um Interaktionsstudien der C-terminalen Domäne von *Leu1* durchzuführen, wurde die codierende Sequenz der Aminosäuren 545-779 zwischen die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *BamHI* ligiert. Nach einem Vergleich der Aminosäuresequenzen der IPMI entspricht dies der Untereinheit *LeuD* des *E. coli*-Homologs (Ebert, 2014). Im Folgenden wird dieses Konstrukt als *Leu1D* bezeichnet.

Auf Grund der Größe von 3099 bp gelang es mit der klassischen Methode nicht, *MET18* in die Vektoren pGBKT7 und PGADT7 zu klonieren. Daher wurde zur Plasmidkonstruktion durch homologe Rekombination in Hefe übergegangen. Hierbei kann ein DNA-Fragment, dessen Enden Sequenzidentität zu der Plasmid-Sequenz aufweisen, direkt *in vivo* in einen linearisierten Vektor ligiert werden (Ma *et al.*, 1987). Bei einer Co-Transformation in *S. cerevisiae* wird das geschnittene Plasmid mittels homologer Rekombination mit dem PCR-Fragment rezirkularisiert. Nur Hefezellen, welche ein vollständiges zirkuläres Plasmid tragen, sind fähig mit dessen Selektionsmarker auf dem entsprechenden Selektionsmedium zu wachsen. Eine homologe Region von 20-40 bp, welche mittels PCR-Primern an das entsprechende DNA-Fragment angefügt werden kann, ist bereits ausreichend für eine erfolgreiche Klonierung (Oldenburg *et al.*, 1997). Diese Methode erlaubt nahezu jedes Gen, oder sogar mehrere auf einmal, in einen beliebigen Vektor zu klonieren, ohne den Einsatz von Ligase oder das Vorhandensein passender Restriktionsschnittstellen (Joska *et al.*, 2014).

Zunächst wurde die codierende Sequenz von *MET18* mit Hilfe von 50 Nucleotid-langen Primern (siehe Tabelle 2.12), wovon 30 Nucleotide identisch zum Vektorgerüst und 20 Nucleotide zur Hybridisierung mit der Template-DNA sind, aus dem Plasmid pASK_IBA43_Met18 amplifiziert. Für die Klonierung von *LEU1* in pGBKT7 und pGADT7 wurde chromosomale DNA (W303) als Template-DNA verwendet. Auf Grund der Länge der Primer und damit einhergehender höherer Schmelztemperatur wurden dem PCR-Ansatz 2,5 µl DMSO hinzugefügt. Die zwei Expressionsvektoren wurden durch *EcoRI*, dessen Erkennungssequenz innerhalb der MCS (*multiple cloning site*) liegt, linearisiert und mittels NucleoSpin® Gel and PCR clean up-Kit (siehe 3.2.3) aufkonzentriert. In einer anschließenden Hefe-Transformation von *S. cerevisiae* wurden linearisierter Vektor und aufgereinigtes PCR-Produkt in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt (Oldenburg *et al.*, 1997). Dabei wurde die eingebrachte Menge an Vektor von 100 ng bis zu 1 µg variiert. Der Hitzeschock bei 42 °C wurde im Vergleich zu einer gewöhnlichen Hefe-Transformation auf 30 min ausgeweitet. Im Anschluss erfolgte eine Reisolation der klonierten Plasmide aus *S. cerevisiae* (siehe 3.3.3).

In dem verwendeten Matchmaker-System sind Kontrollplasmide enthalten. Eine Kombination der Vektoren pGBKT7-53 und pGADT7-T stellt die Positivkontrolle (+) dar. Die

Interaktion des codierten p53-Proteins aus Maus und dem großen T-Antigen des Simian-Virus 40 (SV40) in einer Y2H-Studie ist bekannt. In den folgenden Studien wurden die Vektoren pGBKT7 und pGADT7 ohne inserierte Gene als Negativkontrolle (-) verwendet. Als interne Kontrolle der durchgeführten Studie dienen die bekannten Interaktionen der Proteine des CIA-Targeting-Komplexes untereinander (Cia1 mit Cia2 sowie Cia2 mit Met18) (Uetz *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2008).

Die Kontrollvektoren sowie die sechs klonierten CIA-Targeting-Komplex-Plasmide (jeweils Bait und Prey) wurden in den möglichen Kombinationen in den Y2H-Hefestamm Y187 transformiert. Einzelne Kolonien wurden auf SC-Glu-Agarplatten bei 30 °C vermehrt. Als Maß für eine Interaktion zwischen Bait- und Prey-Protein dient die Aktivität des Reporterenzym β -Galactosidase. Das Auslesen dieser Aktivität erfolgte durch den Einsatz von Galactosidsubstraten sowohl qualitativ auf Agarplatten durch die X-Gal-Methode (siehe 3.3.8) als auch quantitativ in Gesamtzellextraktpräparationen mittels ONPG-Methode (siehe 3.4.13). Im Gegensatz zu anderen Gesamtzellextraktpräparationen wurden für die ONPG-Methode nur 150 mg Hefezellen (Nassgewicht) (aus einer 50 ml-Kultur) verwendet. Das Spaltprodukt *o*-Nitrophenol zeichnet sich durch eine gelbe Farbe aus. Die Zugabe von 1 M Na₂CO₃-Lösung ermöglicht die vollständige Ionisierung für die spektroskopische Detektion. Zur qualitativen Analyse wurden Zellsuspensionen auf eine OD₆₀₀ = 10 eingestellt und auf SC-Glu-Agarplatten mit 2 mg/ml X- α -Gal aufgebracht. Die Aktivität der β -Galactosidase konnte nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 30 °C anhand der Blaufärbung der Zellen beurteilt werden.

In Abbildung 4.12 **A** ist die qualitative Kontrollanalyse des verwendeten Systems dargestellt. Das Auftreten des blauen Indigofarbstoffes als Spaltprodukt des Galactosidsubstrates durch die β -Galactosidase dient als Nachweis einer erfolgten Interaktion zwischen den Bait- und Prey-Proteinen. Diese ist bei der Positivkontrolle (+) deutlich zu erkennen. Bei den Hefezellen 1 (Cia1 mit Cia2) und 6 (Met18 mit Cia2) ist dies ebenfalls deutlich ausgeprägt. Eine schwächere Blaufärbung tritt bei den Zellen 4 (Cia2 mit Met18) auf. Demgegenüber ist bei den Zellen 2 (Cia1 mit Met18), 3 (Cia2 mit Cia1) und 5 (Met18 mit Cia1) keine klare β -Galactosidaseaktivität ersichtlich. Dies entspricht dem Aussehen der Negativkontrolle (-). Generell ist die Bewertung dieser qualitativen Beurteilung subjektiv, da der Unterschied zwischen positiv und negativ fließend und abhängig von der Inkubationsdauer ist. Daher wurde diese Kontrollstudie quantitativ analysiert.

Diese Ergebnisse sind in Abbildung 4.12 **B** gezeigt. Die β -Galactosidaseaktivität der Positivkontrolle beträgt 227 ± 2 mU/mg. Die interne Kontrolle der bekannten Cia1-Cia2-Interaktion, mit 57 ± 21 mU/mg, wenn Cia2 als Bait fungiert (1) bzw. 21 ± 34 mU/mg bei Cia1 als Bait-Protein (3), belegt ebenfalls die Funktionalität der Untersuchungsmethode. Mit einer Aktivität von 8 ± 2 mU/mg konnte auch eine Interaktion zwischen Met18 und Cia2 (Cia2 = Bait, 6) nachgewiesen werden. Der umgekehrte Ansatz mit Cia2 als Prey (4) weist

jedoch nach dieser Methode keine Aktivität auf. Diese befindet sich wie die zwei Kombinationen von Cia1 und Met18 (2, 5) auf dem Niveau der Negativkontrolle (< 1 mU/mg). Diese Ergebnisse bestätigen, dass das System funktioniert und zur Analyse von Interaktionen zwischen dem CIA-Targeting-Komplex und Targetproteinen eingesetzt werden kann. Sie verdeutlichen jedoch auch, dass die Fusion des Proteins zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Daher ist es wichtig, jede Kombination in beide Richtungen zu untersuchen und jedes Protein sowohl als Bait als auch als Prey einzusetzen.

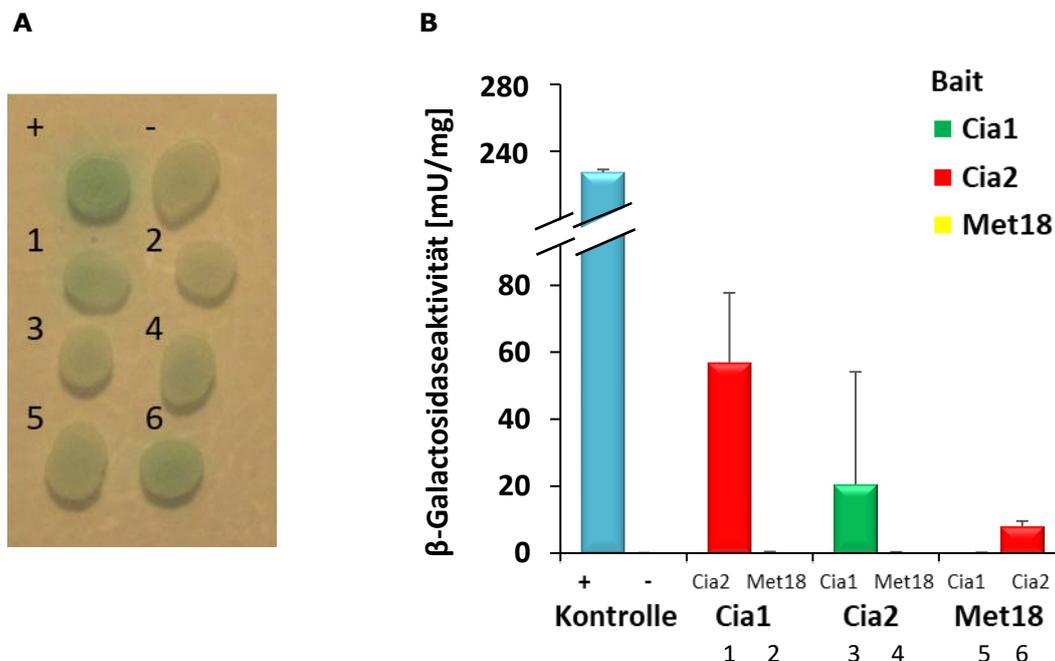


Abbildung 4.12: Positivkontrolle des Y2H-Systems. Folgende Plasmidkombinationen wurden in den Y2H-Hefestamm Y187 transformiert: +: pGADT7-T + pGBKT7-53, -: pGADT7 + pGBKT7, 1: pGADT7_Cia1 + pGBKT7_Cia2, 2: pGADT7_Cia1 + pGBKT7_Met18, 3: pGADT7_Cia2 + pGBKT7_Cia1, 4: pGADT7_Cia2 + pGBKT7_Met18, 5: pGADT7_Met18 + pGBKT7_Cia1, 6: pGADT7_Met18 + pGBKT7_Cia2. Dabei entspricht das Gen, welches auf dem Vektor pGBKT7 codiert wird, dem Bait-Protein und jenes auf Vektor pGADT7 dem Prey-Protein. **A X-Gal-Methode:** Zellsuspensionen mit $OD_{600} = 10$ wurden auf Agarplatten mit 2 mg/ml X- α -Gal aufgebracht. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 30 °C. **B ONPG-Methode:** Die Zellen wurden bis zum Erreichen von $OD_{600} = 0,5 - 0,8$ in SC-Glu-Medium kultiviert. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 150 mg Zellen aufgeschlossen. Für die Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 3 μ l Gesamtzellextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Es wurden jeweils drei einzelne Kolonien analysiert ($n=3$). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen.

Nach der erfolgreichen Detektion der Interaktionen innerhalb des CIA-Targeting-Komplexes, wurde nun die Komplexbildung mit Targetproteinen untersucht. Verwendung fand neben dem kompletten Leu1-Protein auch eine verkürzte Version Leu1D, welche der kleinen Untereinheit der prokaryotischen Homologe entspricht, sowie Apd1. Hierzu wurden die entsprechenden Plasmide, sowohl Bait als auch Prey, kombiniert mit allen sechs möglichen Plasmiden der CIA-Faktoren Cia1, Cia2 und Met18 in den Hefestamm Y187 transformiert. Als zusätzliche Negativkontrollen wurden die Plasmide des Targeting-Komplexes auch

gemeinsam mit den Vektoren ohne Gen (Leervektor) transformiert, um eine Selbstaktivierung messen zu können. Auf Grund der beschriebenen Problematik der qualitativen Analyse, erfolgte nur die aussagekräftigere quantitative Auswertung mit der ONPG-Methode in Gesamtzellextraktpräparationen.

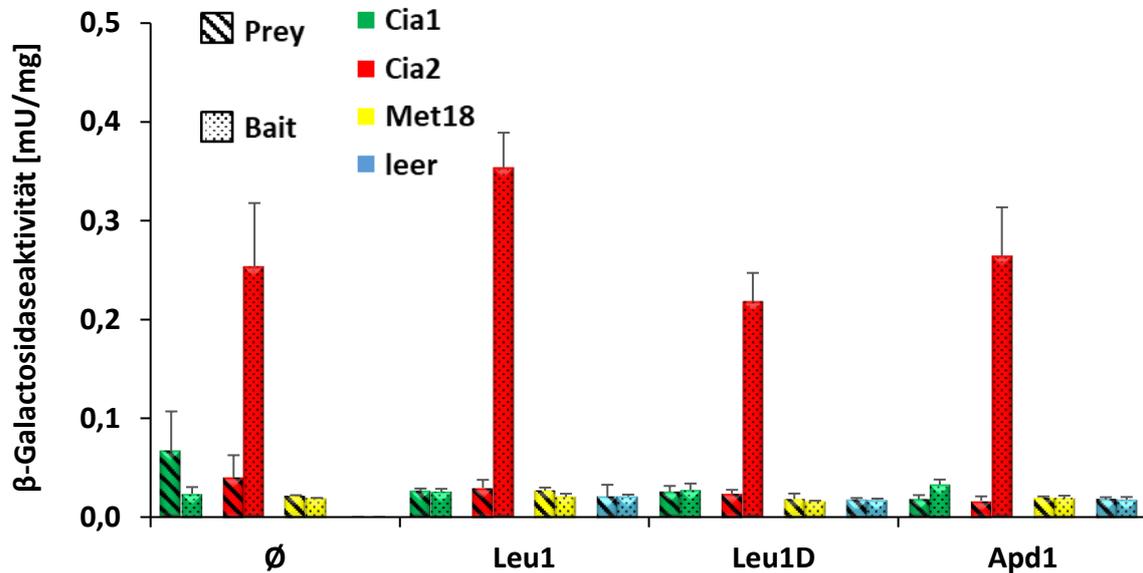


Abbildung 4.13: Y2H-Studie des Hefe-CIA-Targeting-Komplexes mit Targetproteinen: Es konnte keine Interaktion zwischen einem CIA-Faktor und Leu1 bzw. Apd1 nachgewiesen werden. Die Gene *LEU1*, *LEU1D* und *APD1* sowie kein Gen (\emptyset) wurden sowohl auf dem Vektor pGBKT7 als Bait als auch auf dem Vektor pGADT7 als Prey, in Kombination mit *CIA1*, *CIA2*, *MET18* oder keinem Gen auf dem jeweiligen korrespondierenden Vektor, in den Y2H-Hefestamm Y187 transformiert. Die Zellen wurden bis zum Erreichen von $OD_{600} = 0,5 - 0,8$ in SC-Glu-Medium kultiviert. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 150 mg Zellen aufgeschlossen. Für die Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 3 μ l Gesamtzellextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Es wurden jeweils drei einzelne Kolonien analysiert ($n=3$). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen. Die Bezeichnungen Prey (Streifen) und Bait (Punkte) beziehen sich auf die CIA-Faktoren.

Abbildung 4.13 fasst die Ergebnisse dieser Studie zusammen. Bei keiner der untersuchten Kombinationen konnte eine β -Galactosidaseaktivität gemessen werden. Die Zellextrakte, in denen Cia2 als Bait-Protein exprimiert wurde, zeigen mit Werten von $0,22 - 0,35 \pm 0,06$ mU/mg im Vergleich zu den weiteren Zellextrakten erhöhte Aktivität. In Relation zu den Messwerten der Positivkontrollen in Abbildung 4.12 scheint dies jedoch vernachlässigbar zu sein. Des Weiteren ist diese Aktivität auch bei der mitgeführten Negativkontrolle (\emptyset mit Cia2) detektierbar, sodass sie auf eine geringe Selbstaktivierung des Plasmides pGBKT7_Cia2 zurückzuführen ist. Alle weiteren Messwerte der Targetproteine liegen mit $0,02 - 0,03 \pm 0,01$ mU/mg auf dem Niveau der Negativkontrolle (-). Somit konnte durch diesen Ansatz keine Interaktion zwischen dem CIA-Targeting-Komplex und einem Targetprotein mit C-terminalem Tryptophan nachgewiesen werden.

Da bei der vermuteten Interaktion von einer transienten Bindung auszugehen ist, wurde in einem zweiten Ansatz versucht deren Dauer zu verlängern. Dieser Ansatz basiert auf einer Störung der CIA-Maschinerie. Die Herunterregulation von frühen CIA-Faktoren verhindert den Einbau eines Fe/S-Clusters in Targetproteine (Balk *et al.*, 2004; Hausmann *et al.*, 2005). In diesem Fall steht kein Fe/S-Cluster zur Verfügung, welcher transferiert werden könnte. Es wird angenommen, dass die Interaktion zwischen CIA-Targeting-Komplex und Apoprotein andauert, bis ein Cluster übertragen wurde. Daher wurden regulierbare Y2H-Hefestämme hergestellt, mit denen die durchgeführten Y2H-Studien wiederholt werden sollten. Nar1 und Nbp35 wurden als die zu depletierenden CIA-Faktoren ausgewählt.

Auf Grund der Abhängigkeit des Two-Hybrid-Systems von der β -Galactosidase und dem defizitären Wachstum des Stammes Y187 auf galactosehaltigem Medium, kann bei diesem System nicht auf den *GAL1-10*-Promotor zurückgegriffen werden. Eine Alternative stellt der *Tet*-Promotor dar (siehe 2.14.4). Ein Zielgen kann durch Zugabe des Antibiotikums Doxycyclin reguliert werden (Garí *et al.*, 1997). Diese Antibiotikumzugabe hat keinen Einfluss auf das Wachstum bzw. die Wachstumsbedingungen der Hefezellen, was als Vorteil gegenüber dem *GAL*-Promotor gewertet werden kann.

Mittels homologer Rekombination wurden in dem Y2H-Stamm Y187 die Promotoren der Gene *NAR1* bzw. *NBP35* durch den *Tet*-Promotor ersetzt (siehe 3.3.1). Dieser wurde durch eine Genkassette in die chromosomale DNA eingebracht. Die verwendete Genkassette wurde aus dem Plasmid pCM225His amplifiziert (Netz *et al.*, 2010). Sie stellt eine Kombination aus dem tetracyclinabhängigen Transaktivator und sieben Wiederholungen des Tetracyclinoperators (*TetO₇*) sowie der *HIS*-Kassette dar (Bellí *et al.*, 1998b; Wach *et al.*, 1997). Die Selektion erfolgreich rekombinierter Klone erfolgte durch Ausplattieren auf Agarplatten ohne Histidin-Supplementation. Die Insertion der Genkassette wurde mittels PCR überprüft. Anschließend wurden die Phänotypen der konstruierten Hefestämme Y187_*TetO₇*_*NAR1* und Y187_*TetO₇*_*NBP35* durch einen Tüpfeltest zur Wachstumskontrolle bei verschiedenen Antibiotikumkonzentrationen sowie Leu1-spezifische Enzymaktivitätsmessungen bestimmt. Auf Grundlage dieser Untersuchungen wurde die eingesetzte Konzentration an Doxycyclin für die Regulierbarkeit spätere Studien evaluiert.

Die Hefestämme auf Basis von Y187 sind Uracil-prototroph. Daher mussten zur Überprüfung der hergestellten Stämme p414-Plasmide (statt p416) verwendet werden. Hierzu wurde die codierende Sequenz von *NAR1* sowie dessen natürliche Promotor- und Terminatorregion zwischen die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *KpnI* des Vektors p414_*MET25* kloniert. Das Plasmid p414_*NP_Nar1* bzw. p414_*MET25_Myc_Nbp35* sowie das korrespondierende Leerplasmid (\emptyset) wurden in die Y2H-Stämme Y187_*TetO₇*_*NAR1* bzw. Y187_*TetO₇*_*NBP35* und deren WT Y187 transformiert. Nach Herunterregulation der chromosomal-codierten Kopie durch 16-stündiges Vorwachstum in SC-Glu-Medium mit variierenden Doxycyclinmengen, wurde der Einfluss der Antibiotikumkonzentration auf das Zellwachstum analysiert.

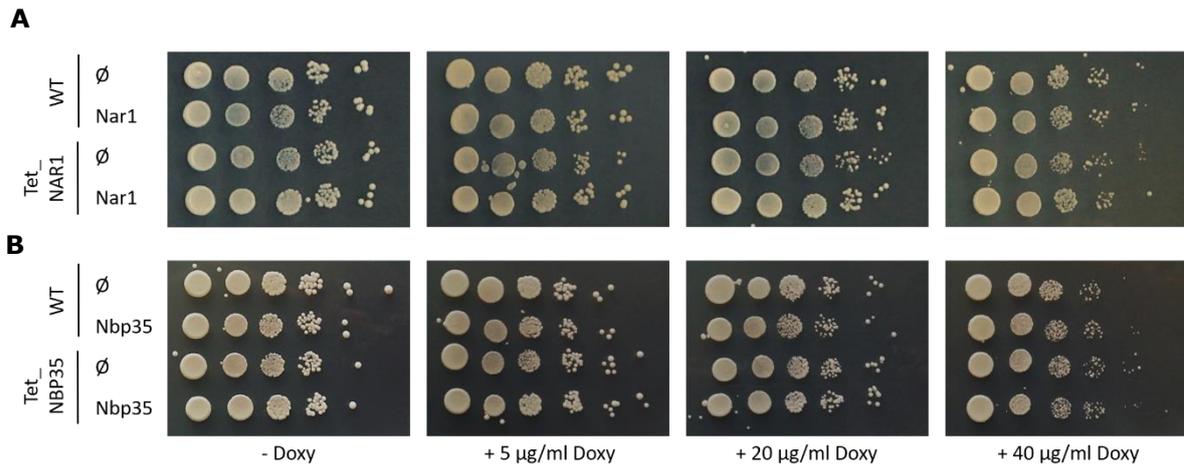


Abbildung 4.14: Tüpfeltest zur Wachstumskontrolle der regulierten Tet-Y2H-Stämme: Die Zugabe von Doxycyclin erzeugt erst bei höherer Konzentration einen geringen Wachstumsphänotyp. **A:** Das Gen *NAR1* bzw. kein Gen (\emptyset), wurden auf p414-Plasmiden unter der Kontrolle des natürlichen Promotors in den Stamm Y187 bzw. Y187_TetO₇_NAR1 transformiert. **B:** Das Gen *NBP35* bzw. kein Gen (\emptyset), wurden auf p414-Plasmiden unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors in den Stamm Y187 bzw. Y187_TetO₇_NBP35 transformiert. **A, B:** Nach 16-stündigem Vorwachsen in SC-Glu-Medium mit verschiedenen Doxycyclin (Doxy)-Konzentrationen (0, 5, 20 und 40 µg/ml), wurde ausgehend von OD₆₀₀ = 0,5 eine serielle Verdünnung (jeweils 1:10) auf Agarplatten mit Doxycyclin-Konzentrationen von 0, 5, 20 und 40 µg/ml, aufgebracht. Die Inkubation erfolgte für drei Tage bei 30 °C.

Abbildung 4.14 zeigt das Wachstum der regulierten Y2H-Stämme in Abhängigkeit von der zugesetzten Doxycyclinkonzentration. Es sind keine Defizite der Stämme Y187_TetO₇_NAR1 und Y187_TetO₇_NBP35 im Vergleich zu Y187 zu erkennen. Die Transformanten ohne Komplementation weisen keine Auffälligkeiten gegenüber den Zellen mit Plasmidkopie auf. Eine Antibiotikumkonzentration von 5 oder 20 µg/ml beeinflusst das Zellwachstum nicht. Lediglich der Einsatz von 40 µg/ml Doxycyclin erzeugt bei allen Stämmen einen geringen Wachstumsphänotyp.

Zur Evaluierung der geeigneten Doxycyclinmenge für die Y2H-Studie wurden Leu1-spezifische Aktivitätsmessungen in Gesamtzellextraktpräparationen durchgeführt. Die transformierten Zellen wurden durch 40-stündige Kultivierung in SC-Glu-Medium gegebenenfalls mit Doxycyclin-Zusatz depletiert. Anschließend wurde die Leu1-Aktivität, als Maß für die Effizienz der CIA-Maschinerie, der regulierten Hefezellen ohne Komplementationskopie (5, 20 bzw. 40 µg/ml) mit den nicht regulierten Zellen (0 µg/ml) bzw. den Zellen mit Plasmidkopie (Rettung) verglichen.

Abbildung 4.15 stellt die Ergebnisse der Aktivitätsmessung dar. Die chromosomale *NAR1*-Kopie wird bereits durch Zugabe von 5 µg/ml Doxycyclin genügend depletiert, um die Leu1-Aktivität um 84 % zu senken. Dies kann durch höhere Antibiotikumkonzentrationen (20 µg/ml bzw. 40 µg/ml) nicht weiter gesteigert werden. Im Gegensatz hierzu ist der Stamm Y187_TetO₇_NBP35 nur schwer regulierbar. Die Leu1-spezifische Aktivität nimmt bei Regulation mit 20 µg/ml bzw. 40 µg/ml nur um 25 % im Vergleich zu den zwei Kontrollen ab.

Diese Resultate führten zu der Entscheidung, die Y2H-Studie mit dem Stamm Y187_TetO₇_NAR1 und einer Doxycyclin-Konzentration von 5 µg/ml zu wiederholen.

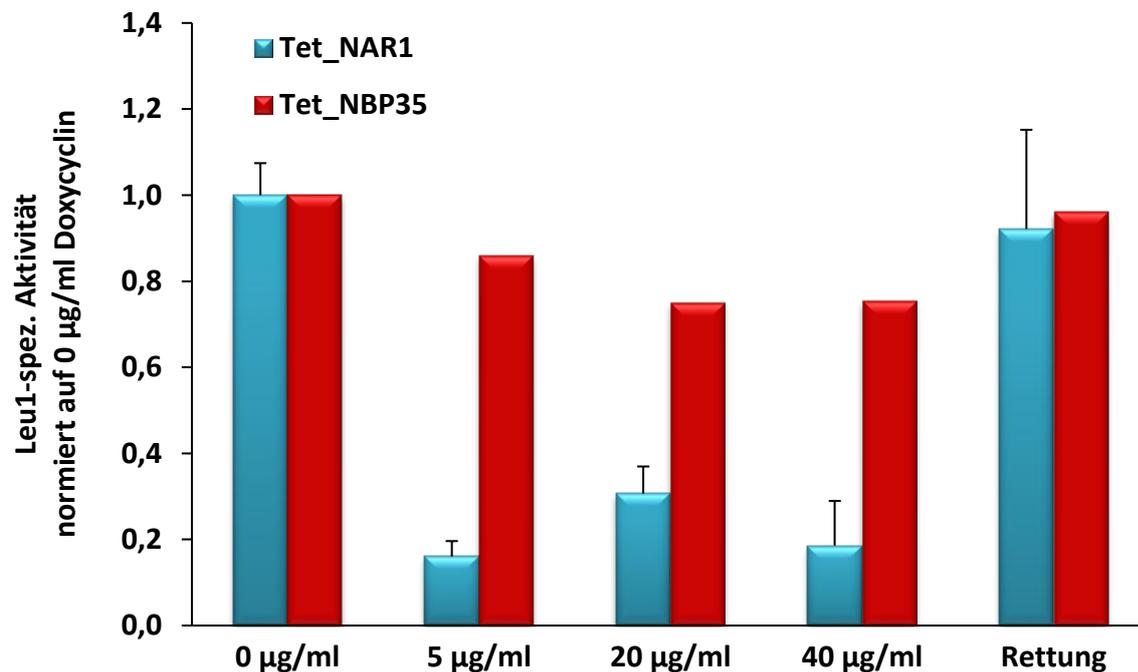


Abbildung 4.15: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der regulierten Tet-Y2H-Stämme: Der Hefestamm Y187_TetO₇_NAR1 ist gut durch Doxycyclin-Zugabe depletierbar, der Stamm Y187_TetO₇_NBP35 hingegen nicht. Das Gen *NAR1* bzw. *NBP35* sowie kein Gen wurden auf p414-Plasmiden unter der Kontrolle des natürlichen bzw. des *MET25*-Promotors in den Hefestamm Y187_TetO₇_NAR1 bzw. Y187_TetO₇_NBP35 transformiert. Um die chromosomale *NAR1*- bzw. *NBP35*-Kopie zu depletieren, wurden die Zellen 40 h in SC-Glu-Medium mit einer Doxycyclin-Konzentration von 0, 5, 20 bzw. 40 µg/ml kultiviert. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 0,5 g Zellen aufgeschlossen. Für die Leu1-Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 3 µl Gesamtzellextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen einzelner Kolonien (Nar1: n=3, Bei Nbp35 wurde nur eine Messung durchgeführt).

Mit dem Stamm Y187_TetO₇_NAR1 wurden ebenfalls die notwendigen Positivkontrollen durchgeführt. Dazu wurden die Kontrollvektoren sowie die sechs klonierten CIA-Targeting-Komplex-Plasmide (jeweils Bait und Prey) in allen möglichen Kombinationen transformiert. Die Analysen erfolgten sowohl qualitativ als auch quantitativ.

In Abbildung 4.16 **A** ist die qualitative Untersuchung mittels X-Gal-Methode zu sehen. Die Kombinationen 1, 3 und 5 weisen eine Blaufärbung vergleichbar mit der Positivkontrolle (+) auf. Die Beurteilung der Verbindungen 2, 4 und 6 ist nicht zweifelsfrei möglich. Die Zellen erscheinen stärker gefärbt als die Negativkontrolle (-), jedoch deutlich schwächer als die positiv identifizierten Transformanten.

Die quantitative Analyse mittels ONPG-Methode, dargestellt in Abbildung 4.16 **B**, liefert eine präzisere Aussage. Die Positivkontrolle weist eine β -Galactosidaseaktivität von

143 ± 14 mU/mg auf. Die bekannte Interaktion zwischen Cia1 und Cia2 konnte auch durch diesen Ansatz bestätigt werden. Diese interne Kontrolle erzeugt eine Enzymaktivität des Reporterproteins von 61 ± 53 mU/mg, wenn Cia2 als Bait fungiert (1) bzw. 52 ± 8 mU/mg bei Cia1 als Bait-Protein (3). Eine Verbindung zwischen Met18 und Cia2 (Cia2 = Bait, 6) ist mit 2 ± 3 mU/mg nur äußerst schwach zu detektieren. Der umgekehrte Ansatz mit Cia2 als Prey (4), sowie beide Kombinationen aus Cia1 und Met18 (2, 5) führen nicht zu einer Interaktion. Diese Analysen bestätigen, dass der konstruierte Hefestamm Y187_TetO₇_NAR1 dazu geeignet ist, PPI nachzuweisen.

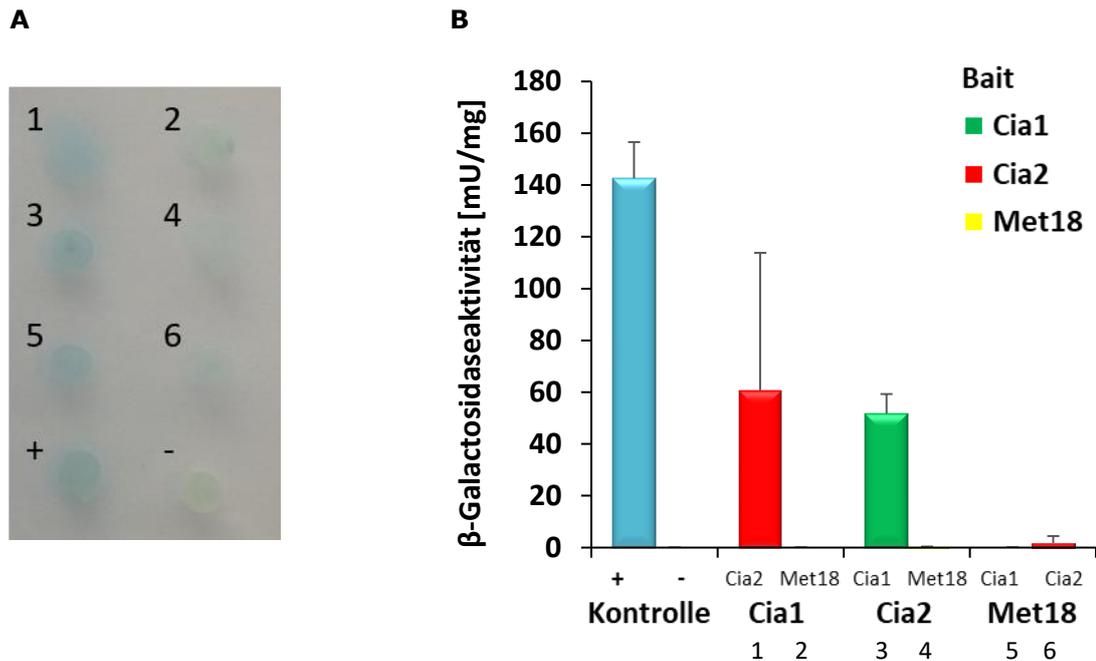


Abbildung 4.16: Positivkontrolle des Y2H-Systems in Stamm Y187_TetO₇_NAR1. Folgende Plasmidkombinationen wurden in den Y2H-Hefestamm Y187_TetO₇_NAR1 transformiert: +: pGADT7-T + pGBKT7-53, -: pGADT7 + pGBKT7, 1: pGADT7_Cia1 + pGBKT7_Cia2, 2: pGADT7_Cia1 + pGBKT7_Met18, 3: pGADT7_Cia2 + pGBKT7_Cia1, 4: pGADT7_Cia2 + pGBKT7_Met18, 5: pGADT7_Met18 + pGBKT7_Cia1, 6: pGADT7_Met18 + pGBKT7_Cia2. Dabei entspricht das Gen, welches auf dem Vektor pGBKT7 codiert wird, dem Bait-Protein und jenes auf Vektor pGADT7 dem Prey-Protein. Einzelne Kolonien wurden auf SC-Glu-Agarplatten mit 5 µg/ml Doxycyclin bei 30 °C vermehrt. **A X-Gal-Methode:** Zellsuspensionen mit OD₆₀₀ = 10 wurden auf Agarplatten mit 2 mg/ml X-α-Gal und 5 µg/ml Doxycyclin aufgebracht. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 30 °C. **B ONPG-Methode:** Die Zellen wurden bis zum Erreichen von OD₆₀₀ = 0,5-0,8 in SC-Glu-Medium mit 5 µg/ml Doxycyclin kultiviert, um die Expression von Nar1 zu reduzieren. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 150 mg Zellen aufgeschlossen. Für die Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 3 µl Gesamtzellextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Es wurden jeweils drei einzelne Kolonien analysiert (n=3). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen.

Nachfolgend wurden die Komplexbildungen von Leu1 und Apd1 zu den Faktoren des CIA-Targeting-Komplexes untersucht. Die möglichen Kombinationen zwischen Leu1, Leu1D und Apd1 mit Cia1, Cia2 und Met18 (alle jeweils als Bait- und als Prey-Plasmid) wurden in den Y2H-Stamm Y187_TetO₇_NAR1 transformiert. Die Auswertung erfolgte quantitativ in Gesamtzellextraktpräparationen. Die benötigten Negativkontrollen wurden mitgeführt.

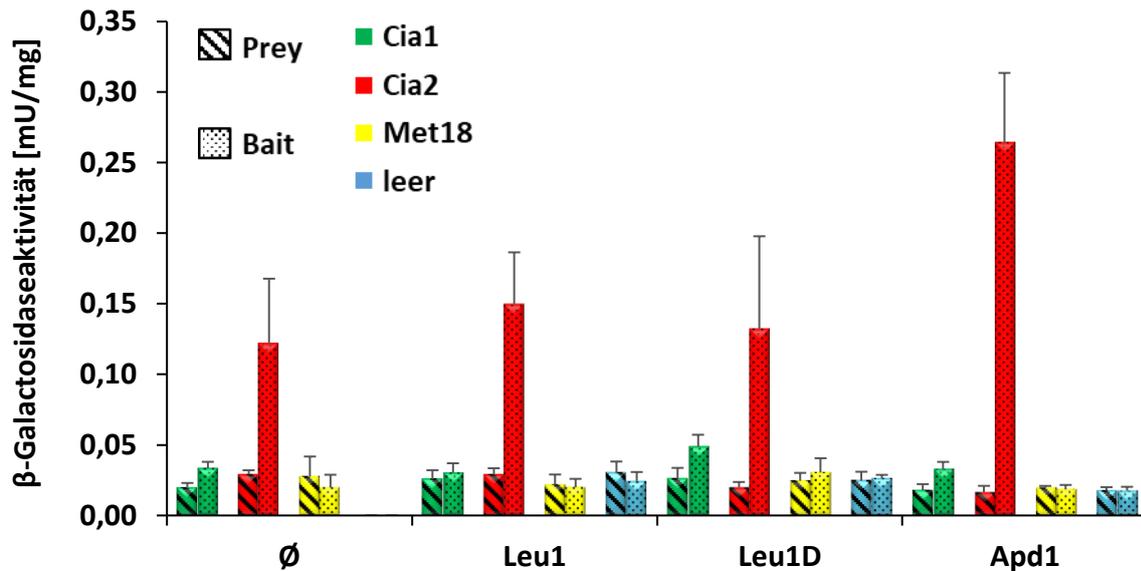


Abbildung 4.17: Y2H-Studie unter Depletion von *NAR1*: Auch bei Verminderung der Effizienz des Fe/S-Clustertransfers konnte keine Interaktion zwischen einem CIA-Faktor und *Leu1* bzw. *Apd1* nachgewiesen werden. Die Gene *LEU1*, *LEU1D* und *APD1* sowie kein Gen (\emptyset) wurden sowohl auf dem Vektor pGBKT7 als Bait als auch auf dem Vektor pGADT7 als Prey, in Kombination mit *CIA1*, *CIA2*, *MET18* oder keinem Gen auf dem jeweiligen korrespondierenden Vektor, in den Y2H-Hefestamm Y187_TetO₇_NAR1 transformiert. Einzelne Kolonien wurden auf SC-Glu-Agarplatten mit 5 µg/ml Doxycyclin bei 30 °C vermehrt. Die Zellen wurden bis zum Erreichen von OD₆₀₀ = 0,5-0,8 in SC-Glu-Medium mit 5 µg/ml Doxycyclin kultiviert, um die Expression von Nar1 zu reduzieren. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 150 mg Zellen aufgeschlossen. Für die Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 3 µl Gesamtzellextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Es wurden jeweils drei einzelne Kolonien analysiert (n=3). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen. Die Bezeichnungen Prey (Streifen) und Bait (Punkte) beziehen sich auf die CIA-Faktoren.

Abbildung 4.17 stellt die Ergebnisse dieser Untersuchung dar. Auch durch diesen Ansatz konnte keine Interaktion zwischen dem CIA-Targeting-Komplex und einem Targetprotein detektiert werden. Lediglich die Zellextrakte, in welchen Cia2 als Bait-Protein fungiert, zeigen auf Grund der bekannten Selbstaktivierung des Plasmides pGBKT7_Cia2, erhöhte β -Galactosidaseaktivitäten. Diese Werte liegen zwischen $0,12$ und $0,26 \pm 0,07$ mU/mg. Alle weiteren untersuchten Zellextrakte liefern Enzymaktivitäten von $0,02 - 0,05 \pm 0,01$ mU/mg, welche vergleichbar mit den Negativkontrollen sind. Die Depletion von *NAR1* resultierte folglich nicht in einer Verbesserung der Nachweismöglichkeit transienter Interaktionen.

Die Interaktionen zwischen der CIA-Maschinerie und deren Targets sind in Hefe möglicherweise nicht stark genug oder zu transient, um mittels Y2H nachgewiesen zu werden. In einer Tandem-Affinity-Purification-Studie mit anschließender massenspektroskopischer Auswertung zur Identifizierung von bisher unbekanntem Interaktionspartnern der CIA-Maschinerie in Hefe konnte lediglich der Komplex Lto1-Yae1-Rli1 detektiert werden (Paul *et al.*, 2015). Bei der Suche nach Interaktionspartnern des humanen MMS19-Proteins mittels Multidimensionaler-Protein-Identifizierungs-Technologie, konnten hingegen

mehrere putative Fe/S-Proteine aufgedeckt werden (Stehling *et al.*, 2012). Daraus wird geschlossen, dass die Interaktionen zwischen CIA-Targeting-Komplex und Fe/S-Targetproteinen im Menschen stabiler sein könnten als in Hefe. Auf Grund dieser Annahme wurde im Folgenden eine Y2H-Studie mit den humanen Proteinen durchgeführt.

Analog zu der Analyse der Hefe-Proteine wurden die humanen Homologe ebenfalls als Bait und Prey eingesetzt. Als Vertreter cytosolischer Fe/S-Proteine mit C-terminalem Tryptophan wurden Viperin und GPAT (Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase) ausgewählt. Zur Konstruktion der Y2H-Plasmide wurden die codierenden Sequenzen von *CIAO1*, *FAM96B*, *MMS19*, *Viperin* und *GPAT* mittels PCR aus den Vektoren pCMV-neo-Bam_CIAO1, pOTB7_CIA2B, pCR4-Topo_MMS19, pl.18_Viperin und pcDNA3-GPAT amplifiziert. Die Gene *CIAO1* und *GPAT* wurden zwischen die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *SmaI* der Vektoren pGADT7 und pGBKT7 kloniert. Die Insertion der Gene *FAM96B* und *Viperin* erfolgte zwischen den Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI*. Die Klonierung von *MMS19* wurde analog zu *MET18* mittels Plasmidkonstruktion durch homologe Rekombination in Hefe durchgeführt.

Auch bei diesem Ansatz wurden Positivkontrollen analysiert. Hierzu wurden die sechs konstruierten CIA-Targeting-Komplex-Plasmide (Bait und Prey) in den möglichen Kombinationen in den Hefestamm Y187 transformiert. Die Auswertung erfolgte sowohl mit der X-Gal- als auch mit der ONPG-Methode.

Abbildung 4.18 **A** beinhaltet die qualitative Analyse der internen Positivkontrollen. Eine Interaktion zwischen CIAO1 und FAM96B ist in beide Richtungen (1, 3) deutlich zu erkennen. Daneben weisen die Zellen mit MMS19 und FAM96B (6) eine aussagekräftige Blaufärbung auf. Diese ist bei den umgekehrten Konstrukten (4) nur schwach ausgeprägt. Bei einer Kombination aus CIAO1 und MMS19 (2, 5) ist keine Bindung ersichtlich.

Die quantitative Untersuchung belegt ebenfalls eine hohe β -Galactosidaseaktivität von 99 ± 21 mU/mg im Zellextrakt der Verbindung zwischen MMS19 und FAM96B (FAM96B = Bait, 6), dargestellt in Abbildung 4.18 **B**. Wird MMS19 als Bait eingesetzt (4), ist zwar Enzymaktivität des Reporterproteins detektierbar, sie beträgt jedoch nur 3 ± 1 mU/mg. Die interne Kontrolle der bekannten CIAO1-FAM96B-Interaktion war nur mit CIAO1 als Bait-Protein (3) positiv (13 ± 3 mU/mg). Der umgekehrte Ansatz (1) zeigte bei dieser Methode keine Aktivität. Auch mit den Kombinationen der humanen Homologe CIAO1 und MMS19 (2, 5) ist keine Interaktion nachweisbar. Diese Ergebnisse bestätigen, dass trotz nicht zufriedenstellender Unterschiede der Bait-Prey- und Prey-Bait-Experimente, auch die humanen Proteine des CIA-Targeting-Komplexes in der Y2H-Studie eingesetzt werden können, um nach Interaktionen mit Targetproteinen zu suchen.

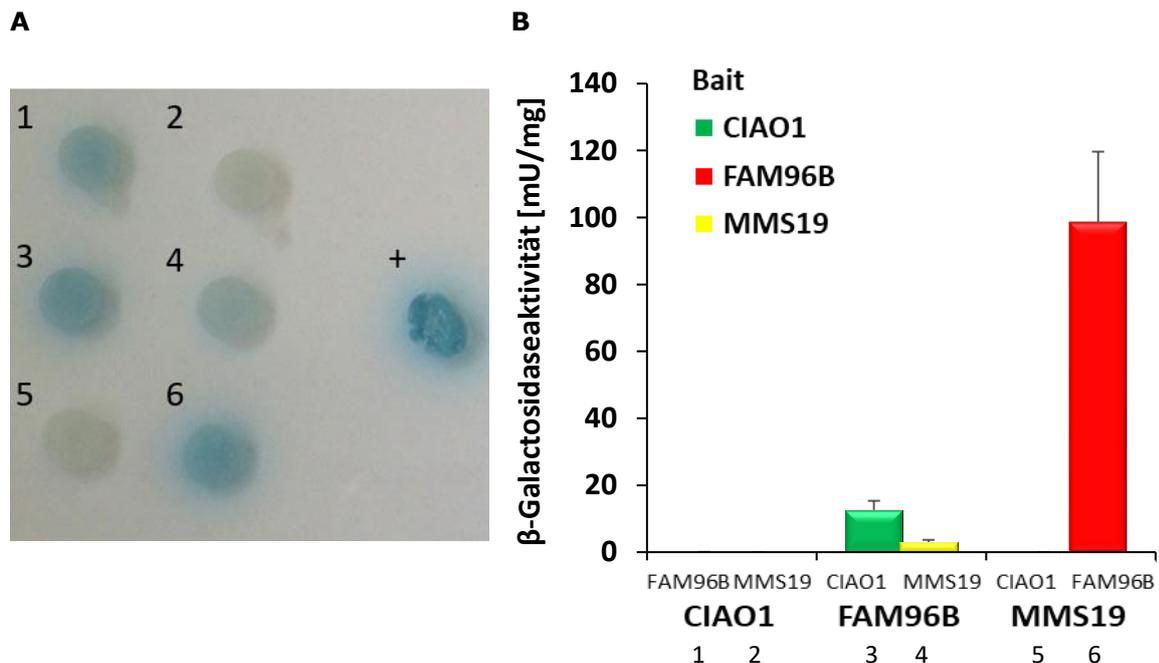


Abbildung 4.18: Positivkontrolle des Y2H-Systems mit humanen Proteinen. Folgende Plasmidkombinationen wurden in den Y2H-Hefestamm Y187 transformiert: +: pGADT7-T + pGBKT7-53, 1: pGADT7_CIAO1 + pGBKT7_FAM96B, 2: pGADT7_CIAO1 + pGBKT7_MMS19, 3: pGADT7_FAM96B + pGBKT7_CIAO1, 4: pGADT7_FAM96B + pGBKT7_MMS19, 5: pGADT7_MMS19 + pGBKT7_CIAO1, 6: pGADT7_MMS19 + pGBKT7_FAM96B. Dabei entspricht das Gen, welches auf dem Vektor pGBKT7 codiert wird, dem Bait-Protein und jenes auf Vektor pGADT7 dem Prey-Protein. **A X-Gal-Methode:** Zellsuspensionen mit $OD_{600} = 10$ wurden auf Agarplatten mit 2 mg/ml X- α -Gal aufgebracht. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 30 °C. **B ONPG-Methode:** Die Zellen wurden bis zum Erreichen von $OD_{600} = 0,5 - 0,8$ in SC-Glu-Medium kultiviert. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 150 mg Zellen aufgeschlossen. Für die Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 3 μ l Gesamtzellextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Es wurden jeweils drei einzelne Kolonien analysiert (n=3). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen.

Anschließend wurden Experimente zur Identifizierung von Interaktionen zwischen den humanen CIA-Targeting-Komplex-Proteinen und Targetproteinen durchgeführt. Hierzu wurden die *CIAO1*-, *FAM96B*- und *MMS19*-codierende Plasmide (jeweils Bait und Prey) kombiniert mit *Viperin*- bzw. *GPAT*-codierende Vektoren in den Hefestamm Y187 transformiert. In Gesamtzellextraktpräparationen erfolgte die quantitative Auswertung der β -Galactosidaseaktivität durch die ONPG-Methode. Als Negativkontrollen wurden Kombinationen mit Vektoren ohne Gen-Kopie verwendet.

Abbildung 4.19 fasst die Ergebnisse der Untersuchung der humanen Homologe zusammen. Die Negativkontrolle des FAM96B-Prey-Konstruktes weist mit $2,9 \pm 0,1$ mU/mg einen hohen Wert auf. Wird dieses Plasmid mit einem Bait-Plasmid eines Targetproteins kombiniert, ist jedoch keine β -Galactosidaseaktivität detektierbar. Wie auch die Zellextrakte, in denen Cia2 als Bait-Protein exprimiert wurde, zeigen jene mit dem humanen Homolog höhere Aktivitäten im Vergleich zu den weiteren Zellextrakten. Diese Beobachtungen mahnen zur Vorsicht bei der Bewertung möglicher Interaktionen mit FAM96B bzw. Cia2. Die Aktivitätswerte der

Targetproteine in Kombination mit CIAO1 oder MMS19 liegen zwischen 0,02 mU/mg und $0,03 \pm 0,01$ mU/mg. Somit konnte auch die Y2H-Studie mit den humanen Homologen des CIA-Targeting-Komplexes und Targetproteinen dieser Maschinerie keine Interaktion nachweisen. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass es weder mit den humanen noch mit den Hefe-Proteinen möglich war, Bindungen an die CIA-Maschinerie und deswegen den Einfluss eines C-terminalen Tryptophans mit dem Y2H-System zu untersuchen.

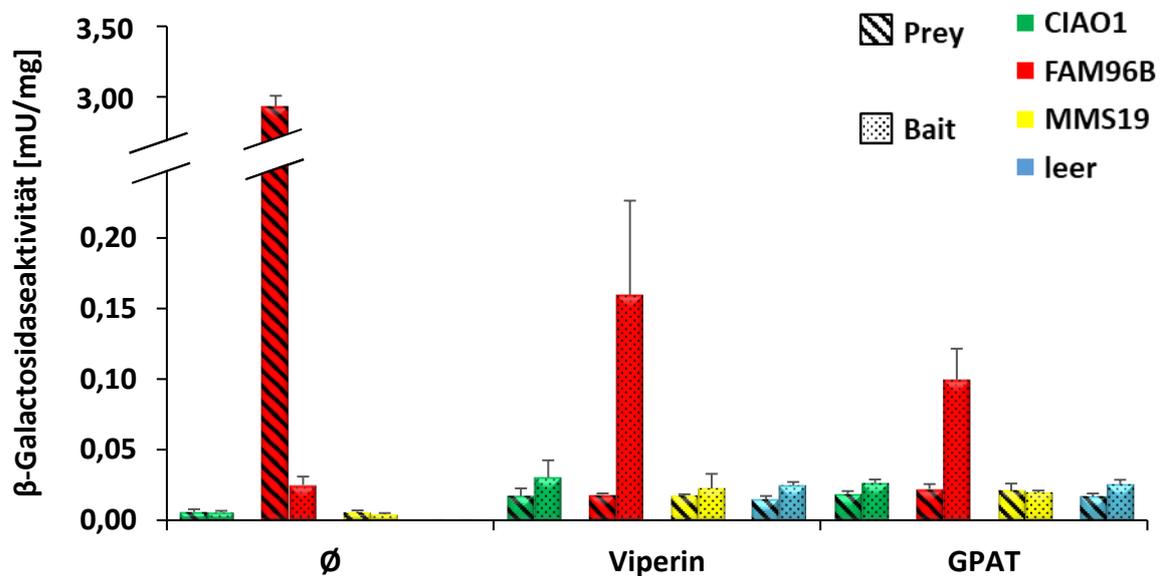


Abbildung 4.19: Y2H-Studie des CIA-Targeting-Komplexes mit humanen Proteinen: Es konnte keine Interaktion zwischen einem CIA-Faktor und Viperin bzw. GPAT nachgewiesen werden. Die Gene *Viperin* und *GPAT* sowie kein Gen (\emptyset) wurden sowohl auf dem Vektor pGBKT7 als Bait als auch auf dem Vektor pGADT7 als Prey, in Kombination mit *CIAO1*, *FAM96B*, *MMS19* oder keinem Gen auf dem jeweiligen korrespondierenden Vektor, in den Y2H-Hefestamm Y187 transformiert. Die Zellen wurden bis zum Erreichen von $OD_{600} = 0,5-0,8$ in SC-Glu-Medium kultiviert. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 150 mg Zellen aufgeschlossen. Für die Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 3 μ l Gesamtzellextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Es wurden jeweils drei einzelne Kolonien analysiert ($n=3$). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen. Die Bezeichnungen Prey (Streifen) und Bait (Punkte) beziehen sich auf die CIA-Faktoren.

Bei den durchgeführten Y2H-Studien wurde jeweils die Interaktion zwischen einem Targetprotein und einem Protein des CIA-Targeting-Komplexes analysiert. Möglicherweise findet eine solche Bindung aber nur mit dem zusammengesetzten Komplex statt. Von humanen Studien ist bekannt, dass ein Komplex aus CIAO1 und FAM96B essentiell für eine Fe/S-Clusterübertragung ist. MMS19 hingegen wird nur bei einem Teil der cytosolischen und nucleären Fe/S-Proteine für die Assemblierung benötigt (Stehling *et al.*, 2012). Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde beschlossen, ein Hefe-Three-Hybrid-System (Y3H) auszuprobieren.

Das verwendete Y3H-System erlaubt zwei Proteine als Bait einzusetzen und die Interaktion zu einem dritten Protein zu untersuchen (Tirode *et al.*, 1997). Somit wird die Detektion eines

ternären Komplexes möglich. Das Prey-Protein wird weiterhin mit der AD fusioniert auf pGADT7-Plasmiden exprimiert. Das Bait-Plasmid pGBKT7 wird durch den Y3H-Vektor pBridge ersetzt. Das Gen in der MCSI ist mit der BD fusioniert (Tirode *et al.*, 1997). Ein regulierbares Gen in der MCSII codiert ein drittes Protein, ein Linkerprotein, welches nötig sein kann, um die Bait- und Prey-Proteine zu verbinden, siehe Abbildung 4.20.

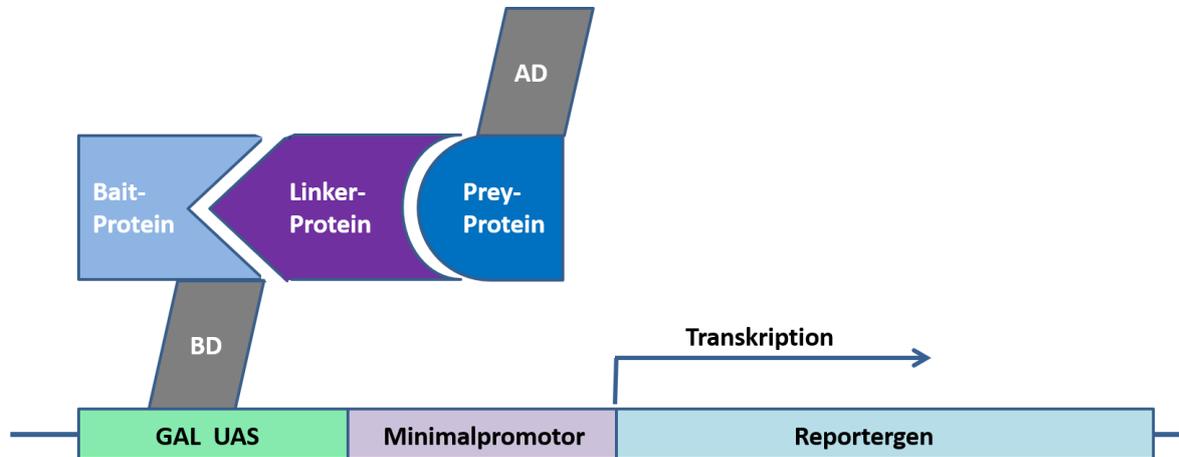


Abbildung 4.20: Prinzip des Hefe-Three-Hybrid-Systems. Neben dem mit der Bindedomäne BD des Transkriptionsfaktors Gal4 hybridisierten Bait-Protein und dem mit der Aktivator-domäne fusionierten Prey-Protein wird ein drittes Protein überexprimiert. Dieses Linker-Protein kann nötig sein, um die Interaktion zwischen Bait- und Prey-Protein zu ermöglichen.

Um die Komplexbildung zu unterstützen, wurden die Gene *CIA1* und *CIA2* bzw. *CIAO1* und *FAM96B* in den Vektor pBridge kloniert. Die Insertion der codierenden Sequenz von *CIA2* erfolgte zwischen die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *BglII* in die MCSII. Anschließend wurde die codierende Sequenz von *CIA1* zwischen *SmaI* und *SaI* der MCSI eingefügt. Die Klonierung der humanen Gene erfolgte auf umgekehrte Weise. Die codierende Sequenz von *CIAO1* wurde zwischen *NotI* und *BglII* der MCSII inseriert. Danach wurde die codierende Sequenz von *FAM96B* zwischen die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SaI* der MCSI hinzugefügt.

Die Transformation des Y2H-Stammes AH109 mit den konstruierten Plasmiden war nicht erfolgreich. Allgemein gesprochen war das Wachstum des AH109-Stammes nicht zufriedenstellend. Dieser Stamm konnte daher nicht verwendet werden, sodass auf den Y2H-Stamm Y187 zurückgegriffen werden musste. Bei dem verwendeten Vektor pBridge steht das Gen, welches in die MCSII kloniert wird, unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors. Die Expression kann durch Zugabe von Methionin im Medium herunterreguliert werden. Der verwendete Stamm Y187 ist jedoch Methionin-auxotroph. Es musste ein Kompromiss bezüglich der eingesetzten Methioninmenge zwischen einer ausreichenden Expression des Proteins und dem Wachstum gefunden werden. Zur Repression eines *MET25*-Promotor-regulierten Gens wird 0,5-1 mM Methionin benötigt (Mumberg *et al.*, 1994). Zur Komplementation der Stamm-Auxotrophie wurden üblicherweise 0,18 mM hinzugefügt. Für

diese Studie wurde die Methioninkonzentration um 75 % auf 45 μ M reduziert. Dies sollte nur einen minimalen Einfluss auf die Expression haben. Des Weiteren wurde der *MET25*-Promotor im Plasmid pBridge_Cia1_Cia2 ausgetauscht. Hierzu mussten vor und nach der Promotorregion geeignete Restriktionsschnittstellen vorhanden sein. Mittels gezielter Mutagenese wurde zunächst vor dem Promotor eine *KpnI*- und nach dem Promotor eine *SpeI*-Schnittstelle eingefügt. Dazwischen wurde der amplifizierte *TDH3*-Promotor kloniert.

Die drei konstruierten Plasmide pBridge_Cia1_Cia2, pBridge_Cia1_TDH_Cia2 und pBridge_FAM96B_CIAO1 wurden jeweils mit den Prey-Vektoren (pGADT7) Met18 (bzw. MMS19), Leu1, Leu1D, Apd1, Viperin, GPAT oder \emptyset kombiniert in den Stamm Y187 transformiert. Die β -Galactosidaseaktivität, als Maß für eine Interaktion, wurde durch die ONPG-Methode in Gesamtzellextraktpräparationen bestimmt.

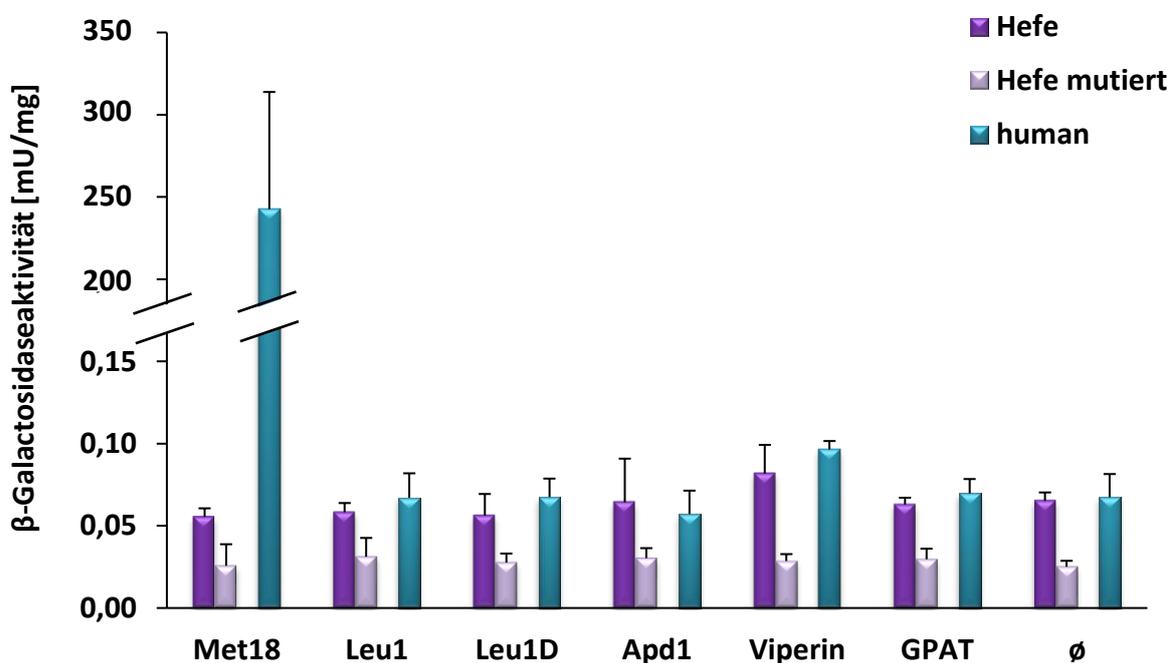


Abbildung 4.21: Y3H-Studie des CIA-Targeting-Komplexes mit Targetproteinen: Es konnte keine Interaktion zwischen dem CIA-Targeting-Komplex und den untersuchten cytosolischen Fe/S-Proteinen detektiert werden. Die Gene *MET18* (bzw. *MMS19*), *LEU1*, *LEU1D*, *APD1*, *Viperin* und *GPAT* sowie kein Gen (\emptyset) wurden auf dem Vektor pGADT7 als Prey, in Kombination mit dem Plasmid pBridge_Cia1_Cia2 (Hefe), pBridge_Cia1_TDH_Cia2 (Hefe mutiert) oder pBridge_Fam96B_Ciao1 (human) in den Y2H-Hefestamm Y187 transformiert. Einzelne Kolonien wurden auf SC-Glu-Agarplatten bei 30 °C vermehrt. Die Zellen wurden bis zum Erreichen von $OD_{600} = 0,5 - 0,8$ in SC-Glu-Medium kultiviert. Bei Verwendung der pBridge-Plasmide, bei welchen sich die MCSII unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors befindet, wurde die Methionin-Zugabe (der Stamm Y187 ist Methionin-auxotroph) auf 25 % reduziert, um eine Repression zu vermeiden. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 150mg Zellen aufgeschlossen. Für die Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 5 μ l Gesamtzellextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Es wurden jeweils drei einzelne Kolonien analysiert ($n=3$). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen.

Abbildung 4.21 fasst die Ergebnisse der Y3H-Studie zusammen. Die Kombination aus Cia1 und Cia2 mit Met18 als Prey-Protein bzw. CIAO1 und FAM96B mit MMS19 dient als Positivkontrolle. Jedoch zeigen die Hefe-Homologe, weder unter der Kontrolle des *TDH3*- noch des *MET25*-Promotors, eine erhöhte Aktivität. Dem gegenüber funktioniert die Komplexbildung der humanen Proteine, was an einer Aktivität des Reporterproteins von 243 ± 71 mU/mg zu erkennen ist. Darüber hinaus sind keine Interaktionen festzustellen. Die Ergebnisse bei Kombination mit den Targetproteinen zwischen den humanen und den Hefe-Homologen unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors sind vergleichbar. Die Werte liegen zwischen 0,06 mU/mg und $0,10 \pm 0,01$ mU/mg auf dem Niveau der Negativkontrollen (\emptyset). Die Werte der Hefe-Proteine unter der Kontrolle des *TDH3*-Promotors sind mit ca. $0,03 \pm 0,01$ mU/mg noch geringer. Daher kann eine mangelhafte Expression auf Grund der Methionin-Zugabe ausgeschlossen werden. Somit konnte auch durch die gemeinsame Expression der Cia1/Cia2-Faktoren des CIA-Targeting-Komplexes im Y3H-System keine Interaktion mit einem Targetprotein *in vivo* nachgewiesen werden.

4.2.2 (Co)Immunpräzipitation

Die (Co)Immunpräzipitation (CoIP) ist eine Schlüsseltechnik bei der Analyse von PPI. Neben der Aufdeckung unbekannter Multiproteinkomplexe wird sie häufig eingesetzt, um Y2H-Ergebnisse zu verifizieren (Kaboord & Perr, 2008). Durch Inkubation und anschließender Zentrifugation wird ein Bait-Protein (Leu1) als Antigen des eingesetzten Antikörpers (α -Leu1-Serum) aus einer Gesamtzellextraktprobe herausgezogen. Hierbei wird der Antikörper zuvor auf einem Trägermaterial (Sepharose) immobilisiert. Dies geschieht durch spezifische Interaktion zwischen der Fc-Region und einem an das Säulenmaterial kovalent gebundenen Proteins, wobei die Antigen-bindende Domäne unbeeinflusst bleibt. Auf Grund der starken Bindung zwischen IgG aus Kaninchen und Protein A, wurde dieses zur Immobilisierung eingesetzt. Diese Vorgehensweise erlaubt die einfache Anreicherung des Bait-Proteins inklusive möglicher interagierender Prey-Proteine aus der Gesamtzellextraktpräparation. Der isolierte Proteinkomplex kann anschließend mit verschiedenen Methoden untersucht werden. In dieser Arbeit erfolgte die Detektion mittels Western Blot.

Alternativ zur Y2H-Untersuchung wurde mit dieser Methode versucht, eine Interaktion zwischen einem Mitglied des CIA-Targeting-Komplexes Cia1, Cia2 und/oder Met18 und Leu1, als Referenzprotein für cytosolische Fe/S-Targetproteine, nachzuweisen. Parallel war von Interesse, ob diese Interaktion nach Deletion des C-terminalen Tryptophans von Leu1 ($\Delta 1$) weiterhin besteht. Hierfür wurde eine Plasmid-Kopie von Leu1 bzw. einer C-terminal mutierten Variante in den Deletionsstamm $\Delta leu1$ transformiert. Als Kontrollen wurden der WT-Stamm und der Deletionsstamm jeweils mit transformiertem Plasmid ohne Genkopie (\emptyset) mitgeführt. Die CoIP wurde in Gesamtzell-extraktpräparationen analysiert (siehe 3.4.16). Um die Proteinmenge im Zellextrakt nachzuweisen, wurden stets TCA-gefällte Proben zum Vergleich mit aufgetragen (siehe 3.4.6).

In Abbildung 4.22 ist eine Kontrolle der verwendeten Antikörperseren gegen die Proteine Cia2, Met18 und Cia1 gezeigt. Cia2 zeigt auf Grund seiner vielen negativ geladenen Aminosäurereste ein außerordentliches Laufverhalten in der SDS-PAGE. Das 26 kDa große Protein weist eine apparente Molekülmasse ca. 35 kDa auf. Die Met18-Bande wird erwartungsgemäß bei 118 kDa detektiert. Die Qualität des zur Verfügung stehenden Cia1-Antikörperserums ist für die Ansprüche dieser Untersuchung nicht zufriedenstellend. In der Western Blot-Analyse von Zellextrakten des regulierbaren Hefestammes Gal_CIA1 ist nach einer Kultivierung über 64 h kein Unterschied zwischen dem Wachstum auf Glucose und Galactose zu erkennen. Die mit diesem Antikörper durchgeführten Nachweise sind daher nicht verlässlich. Bei Detektion von rekombinant aufgereinigtem Cia1-Protein liegt die Position der Cia1-Bande bei 37 kDa.

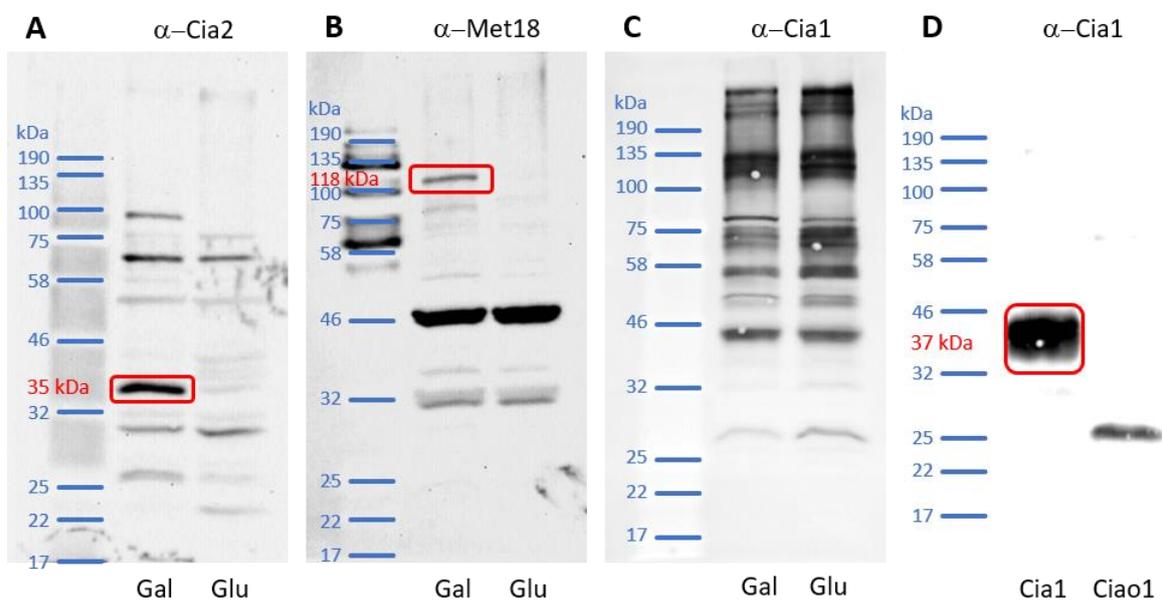


Abbildung 4.22: Kontrolle der CIA-Targeting-Komplex-Faktoren-spez. Antikörperseren. A, B, C: Die regulierbaren Stämme Gal_CIA2, Gal_MET18 und Gal_CIA1 wurden für 40 h (Cia2 und Met18) bzw. für 64 h (Cia1) parallel in YP-Gal- und YP-Glu-Medium kultiviert. Die resultierenden Gesamtzellextraktpräparate wurden zur Qualitätskontrolle der vorhandenen spezifischen Antikörperseren (α -Cia2, α -Met18 und α -Cia1) mittels Western Blot genutzt (jeweils 20 μ g Protein). **D:** Zur Detektion der spezifischen Cia1-Bande wurde zusätzlich rekombinant isoliertes Protein aufgetragen (Cia1 aus *S. cerevisiae* im Vergleich zu Cia1 aus *H. sapiens*; jeweils 5 μ g).

Abbildung 4.23 zeigt die Nachweise der Immunpräzipitate der untersuchten Leu1-Proteine mittels Western Blot. Die Expression der Leu1-Plasmidkopien ist stabil bei 86 kDa (**A**). In den Zellextrakten liegen vergleichbare Proteinmengen vor. Die Analyse der Gesamtprotein-konzentration der Zellextrakte mittels Micro-Biuret-Methode ergab relativ konstante Werte von 27 ± 2 mg/ml. Somit sind Unterschiede in der Intensität der Banden der präzipitierten Proteine durch eine Beeinflussung einer möglichen Interaktion und nicht durch die Expression zu erklären. Die Präzipitation der Leu1-Proteine mittels Leu1-spezifischer Immunobeads war bei allen Mutanten erfolgreich. Sowohl in den Zellextraktkontrollen als

auch in den IP-Fraktionen sind Abbaubanden des Proteins unterhalb der Hauptbande zu sehen. Hierbei könnte es sich möglicherweise um Protein ohne die C-terminale Verlängerung bzw. um die zu LeuC homologen Domänen 1-3 nach Abspaltung der zu LeuD homologen Domäne 4 handeln. Die Immundetektion mit Leu1- wie auch mit Met18-Antikörperserum lässt präzipitiertes, nicht aufgetrenntes Protein an der Trenngelgrenze der IP-Fraktionen erkennen (**A**, **B**). Des Weiteren führt sowohl der Einsatz von Cia1- als auch von Cia2-Antiserum zu heftigen Kreuzreaktionen mit der schweren Kette der bei der IP eingesetzten Immunglobuline (**C**, **D**). Hierdurch wird die Beurteilung der Copräzipitation von Cia1 gestört. Die Zellextraktkontrollen belegen die Expression der zwei CIA-Targeting-Komplex-Proteine Cia2 und Met18 (**D**, **B**). Jedoch ist in allen Untersuchungen keine Coimmunpräzipitation (d.h. Anreicherung) des Targetproteins Leu1 festzustellen. Somit konnte keine stabile Interaktion nachgewiesen werden.

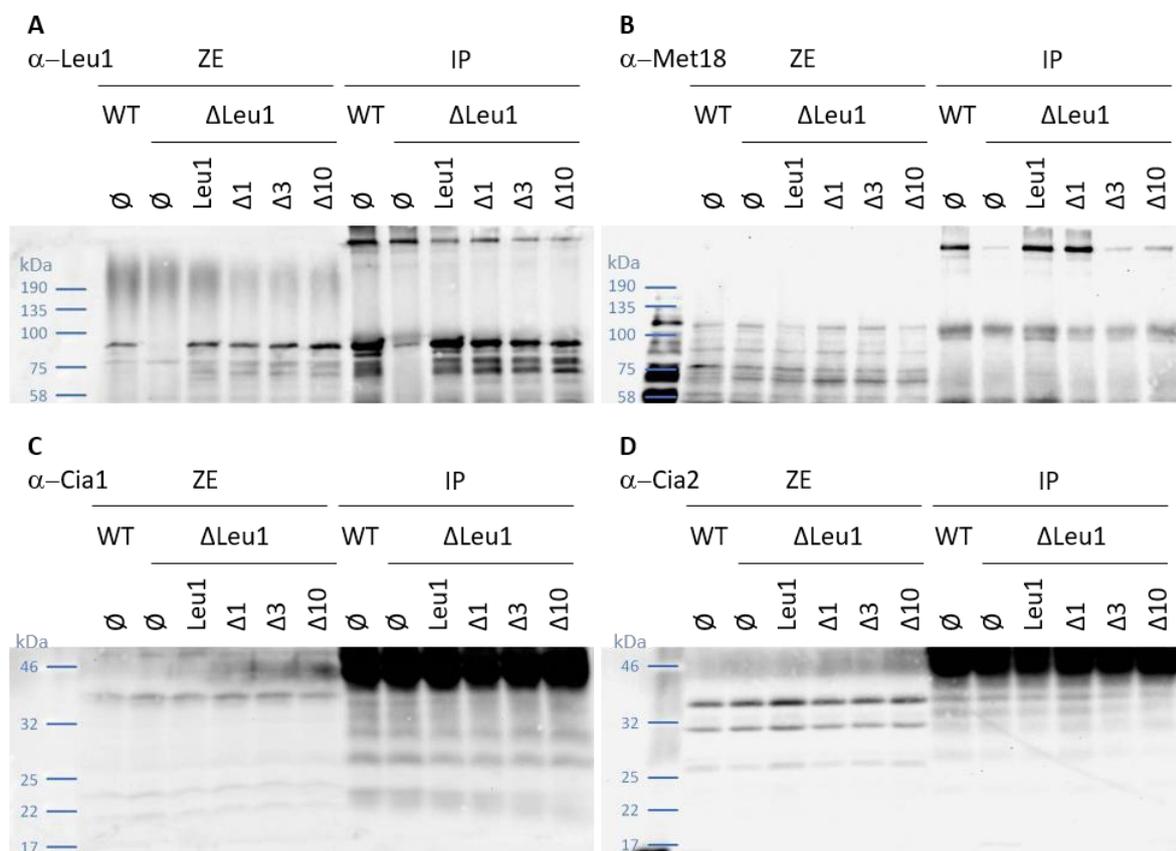


Abbildung 4.23: CoIP der C-terminalen Leu1-Mutanten: Es konnte keine Interaktion zwischen Leu1 und dem CIA-Targeting-Komplex detektiert werden. Das Gen *LEU1* bzw. dessen Mutanten Δ 1, Δ 3 und Δ 10, sowie kein Gen (\emptyset), wurden auf p416-Plasmiden unter der Kontrolle des natürlichen Promotors in den Deletionsstamm Δ leu1 bzw. WT transformiert. Die Zellen wurden 40 h in SC-Glu-Medium kultiviert. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 0,5 g Zellen aufgeschlossen. Als Kontrolle der Proteinmenge wurden 25 μ l Zellextrakt (ZE) mit TCA gefällt. Die IP erfolgte mit 40 μ l Zellextrakt und 40 μ l einer 1:1 Suspension von Leu1-Immuno beads für 1-2 h unter Rotation bei 4 °C. Jede Analyse wurde in Duplikaten mit Immuno beads aus zwei verschiedenen Antikörperseren (5. bzw. 8. Blutung) durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Es wurden jeweils zwei einzelne Kolonien analysiert (n=4). Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Immundetektion nach SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörperseren: **A**: α -Leu1-; **B**: α -Met18-; **C**: α -Cia1-; **D**: α -Cia2-Antikörperserum.

Da es in der Literatur bisher keinen Nachweis einer direkten Bindung von Leu1 an die CIA-Maschinerie gibt, wird angenommen, dass diese Interaktion transient und sehr kurzlebig ist. Um die Dauer der postulierten Bindung zu erhöhen, wurden die Cysteinreste C421 und C424, welche den [4Fe-4S]-Cluster koordinieren, zu Alaninresten mutiert (CCAA). Da diese Mutante nicht fähig ist, den Cofaktor zu tragen und somit der Cluster nicht übertragen werden kann, sollte die Interaktion verlängert und die Maschinerie blockiert werden. Die vorangegangene IP-Analyse wurde mit den Mutanten C421A/C424A und C421A/C424A_Δ1 wiederholt.

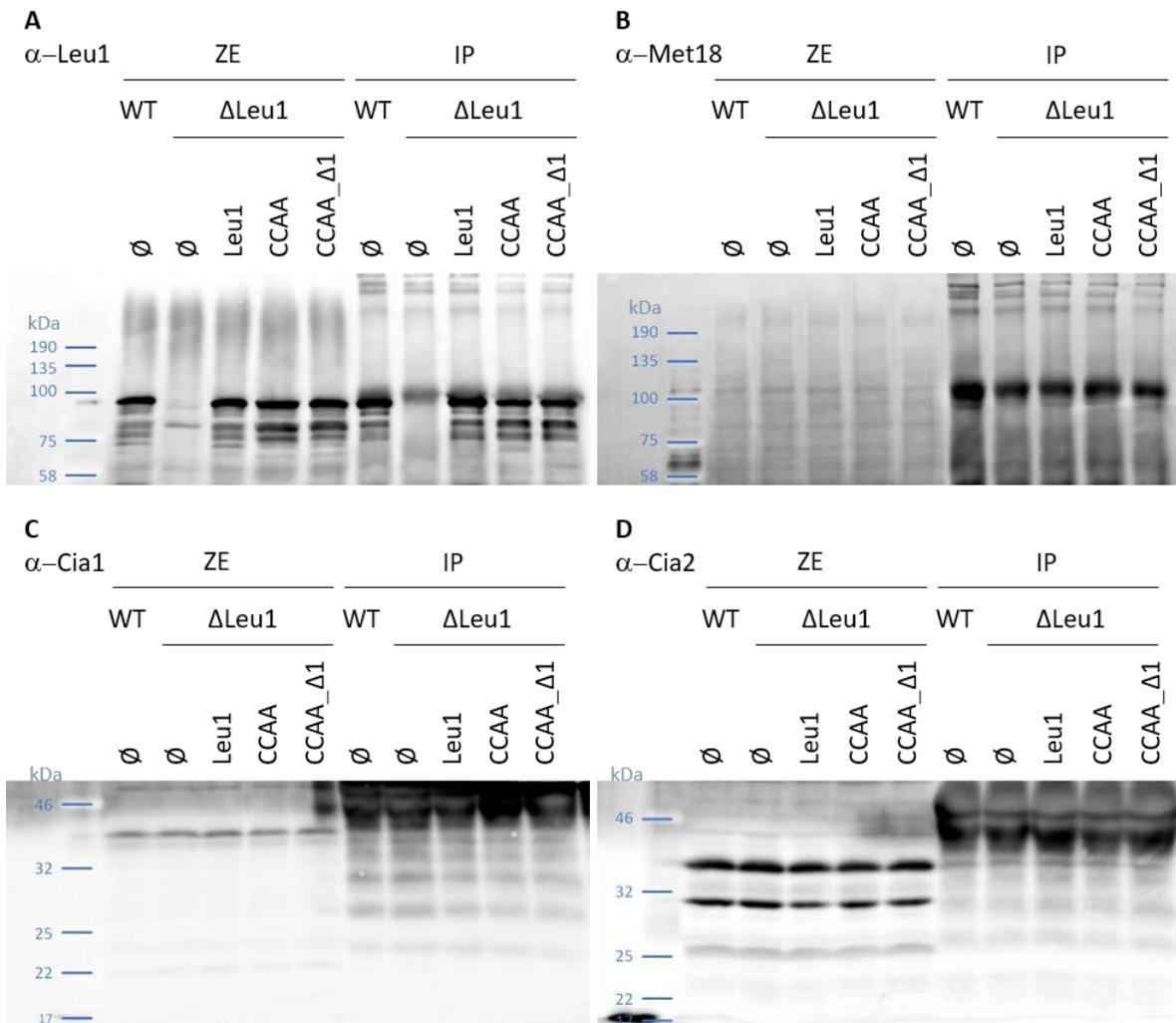


Abbildung 4.24: CoIP der Leu1-Clustermutante: Es konnte keine Interaktion zwischen Leu1 und dem CIA-Targeting-Komplex detektiert werden. Das Gen *LEU1* bzw. dessen Mutanten C421A/C424A (CCAA) und C421A/C424A_Δ1, sowie kein Gen (\emptyset), wurden auf p416-Plasmiden unter der Kontrolle des natürlichen Promotors in den Deletionsstamm Δ leu1 bzw. WT transformiert. Die Vorgehensweise erfolgte analog zur Beschriftung der Abbildung 4.23. **A:** α -Leu1-; **B:** α -Met18-; **C:** α -Cia1-; **D:** α -Cia2-spezifisches Antikörperserum.

Die Gesamtproteinkonzentration lag in allen analysierten Zellextrakten mit 25 ± 2 mg/ml auf einem einheitlichen Niveau. Die Western Blot-Analyse der Zellextraktkontrollen in Abbildung

4.24 belegt die stabile Expression aller vier untersuchten Proteine. Neben Leu1 sind auch ausgeprägte Abbaubanden von Cia2 zu erkennen (**A**, **D**). Die Präzipitation der Leu1-Clustermutanten mittels Leu1-spezifischer Immunobeads war erfolgreich (**A**). Die Mutation der Cysteinreste führte jedoch nicht zu einer stabileren Interaktion zwischen Leu1 und den Proteinen des CIA-Targeting-Komplexes. Weder Cia1 noch Cia2 oder Met18 waren selektiv in der IP-Fraktion angereichert. Die dicken Banden bei ca. 100 kDa bei Detektion mit Met18-spezifischem Antikörperserum (**B**) entsprechen nicht der Met18-Bande der Zellextraktkontrolle und dürfen nicht mit einer erfolgreichen Copräzipitation verwechselt werden. Sie sind ähnlich zu der Kreuzreaktion bei Cia1 und Cia2 auf eine Hintergrundreaktion des Serums zurückzuführen. Auch durch Blockieren des Fe/S-Clustereinbaus konnte keine Interaktion mit dem Targetprotein festgestellt werden.

Damit die postulierte schwache Interaktion besser untersucht werden kann, wurde in einem weiteren Ansatz die Menge der CIA-Faktoren erhöht. Um eine größere Anzahl an Molekülen des CIA-Targeting-Komplexes in der Zelle vorliegen zu haben, wurden alle drei am Komplex beteiligten Proteine gleichzeitig überexprimiert.

Hierfür wurde das Plasmid p424_Cia2_Gal1-10_Met18 konstruiert. Die Grundlage lieferte der Vektor p424_TDH_Met18, in welchen die codierende Sequenz für *CIA2* und der *GAL1-10*-Promotor mittels des NEBuilder HiFi DNA Assembly Kits kloniert wurden. Diese Klonierungsmethode ist eine Weiterentwicklung der Methode nach Gibson und erlaubt die Integration mehrerer DNA-Fragmente in einem Schritt ohne den Einsatz von Restriktionsenzymen (Gibson *et al.*, 2009). Die amplifizierte DNA, welche zum Vektor komplementäre Bereiche enthält, wird im Verhältnis 2:1 mit linearisiertem Vektor und einem Master Mix versetzt und 1 h bei 50 °C inkubiert. Die im Master Mix enthaltene 5'-Exonuclease erzeugt einen einzelsträngigen Überhang am 3'-Ende, welcher mit dem komplementären Bereich eines zu fusionierenden DNA-Fragmentes hybridisiert. Eine DNA-Polymerase und eine DNA-Ligase verschließen anschließend die entstandenen Lücken zum fertigen Produkt. Das Reaktionsgemisch wurde direkt in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. In dem konstruierten Plasmid liegt *CIA2* in *reverse complement* vor, sodass beide Gene des Vektors unter der Kontrolle des *GAL1-10*-Promotors stehen und divergent exprimiert werden. Um die korrekte Expression sicher zu stellen, wurde die vollständige Sequenz zwischen den Genen *GAL1* und *GAL10* aus chromosomaler DNA des Stammes W303 (668 bp) amplifiziert und als *GAL1-10*-Promotor bezeichnet, anstatt auf verkürzte Varianten der Gen-Kassetten (z. B. der PCR-Toolbox) zurückzugreifen.

Das hergestellte Plasmid wurde in den Hefestamm Gal_CIA1_Δ*leu1* transformiert. Die Überexpression von Cia1 erfolgte durch Kultivierung der Zellen unter Zugabe von Galactose. Diente Galactose als alleinige Kohlenstoffquelle, war kein Wachstum der Transformanten möglich. Da eine zu hohe Konzentration an Cia2 in der Zelle tödlich ist, wurde die Expression zunächst durch den Einsatz von SC-Glu-Agarplatten unterdrückt (Prof. A. J. Pierik,

persönliche Mitteilung). Als bestmöglichen Kompromiss zwischen einer deutlichen Überexpression der gewünschten Gene und hinlänglichem Zellwachstum wurden Kulturbedingungen mit 1,5% Galactose und 0,5% Glucose im Medium gewählt. Anschließend wurde die CoIP in Gesamtzellextraktpräparationen durchgeführt.

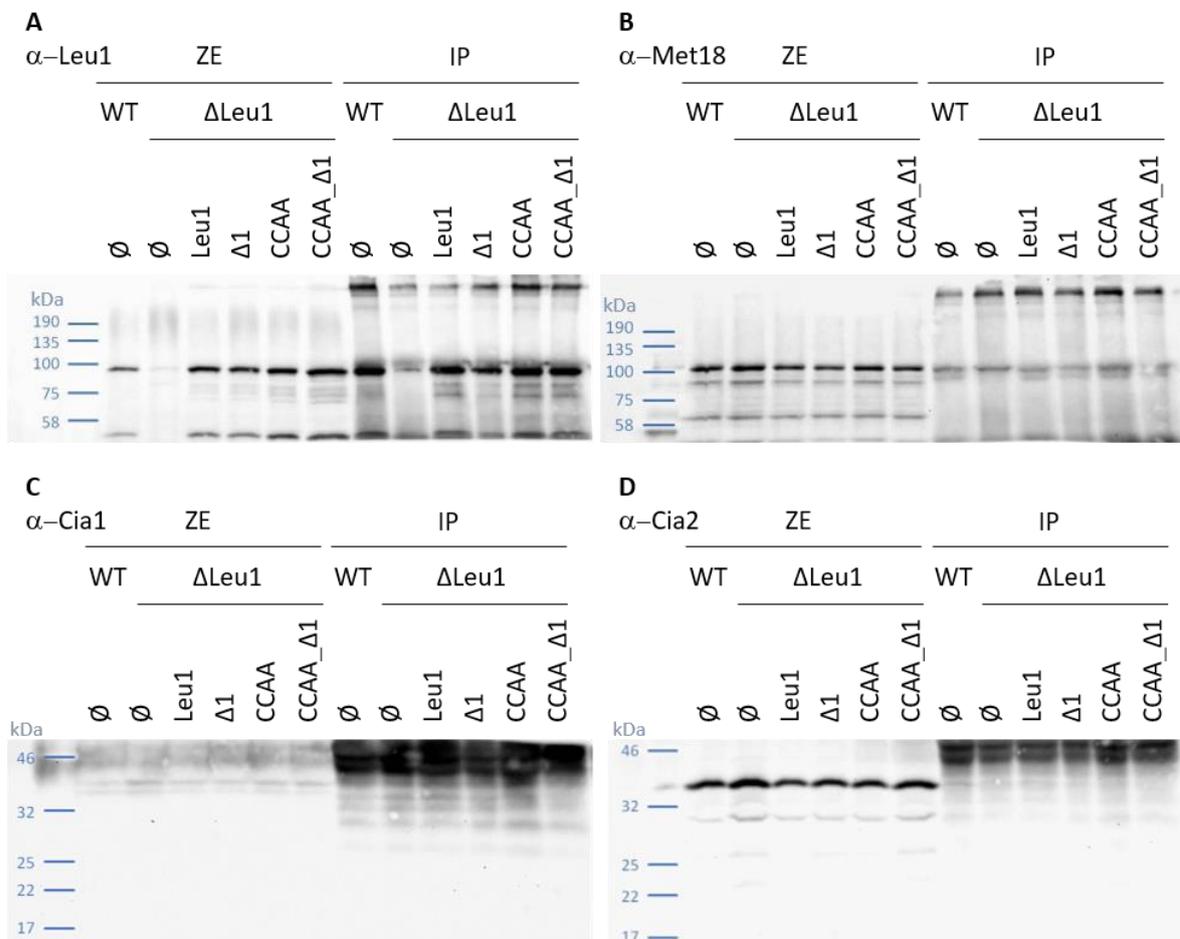


Abbildung 4.25: CoIP nach Überexpression der CIA-Targeting-Komplex-Faktoren: Es konnte keine Interaktion zwischen Leu1 und dem CIA-Targeting-Komplex detektiert werden. Das Gen *LEU1* bzw. dessen Mutanten $\Delta 1$, C421A/C424A und C421A/C424A_Δ1, sowie kein Gen (\emptyset), wurden auf p416-Plasmiden unter der Kontrolle des natürlichen Promotors gemeinsam mit dem Plasmid p424_Cia2_Gal1-10_Met18 in den Deletionsstamm Gal_CIA1_Δ*leu1* bzw. WT transformiert. Einzelne Kolonien wurden auf glucosehaltigen SC-Agarplatten bei 30 °C vermehrt. Die Zellen wurden 40 h in SC-Medium mit 1,5% Galactose und 0,5% Glucose kultiviert. Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog zur Beschriftung der Abbildung 4.23. **A:** α-Leu1-; **B:** α-Met18-; **C:** α-Cia1-; **D:** α-Cia2-spezifisches Antikörperserum.

Die vorgenommenen Änderungen hatten auch in diesem Fall keine Auswirkung auf die Expression und IP von Leu1 mit Leu1-spezifischen Immunobeads, siehe Abbildung 4.25 (**A**). Die Zellextraktpräparationen weisen eine vergleichbare Gesamtproteinkonzentration von 18 ± 2 mg/ml auf. Die Überexpression von Met18 und Cia2 in dieser Analyse ist im Vergleich zu den zwei vorhergehenden Studien (Abbildung 4.23 bzw. Abbildung 4.24) deutlich zu erkennen (**B**, **D**). Die Expression von Cia1 kann auf Grund des schwachen α-Cia1-Antikörpers nicht beurteilt werden (**C**). Die schwächere Bande könnte sowohl auf eine verringerte

Antikörperbindung, als auch auf eine verminderte Expression wegen der notwendigen Glucose-Zugabe zurückzuführen sein. Die gleichzeitige Überexpression der drei Proteine des CIA-Targeting-Komplexes scheint zu einer Stabilisierung der Proteine zu führen. Die Intensität der Abbaubanden in Relation zur Hauptproteinbande hat vor allem bei Cia2 deutlich abgenommen. Trotz der erfolgreichen Stärkung des CIA-Targeting-Komplexes, konnte auch in dieser Studie keine Copräzipitation mit Leu1 und folglich keine Interaktion nachgewiesen werden. Mangels des Belegs einer direkten Bindung des Targetproteins, kann der Einfluss des C-terminalen Tryptophans nicht erörtert werden.

4.2.3 Nachbarschafts-abhängige Biotin-Identifizierung (BioID)

Um transiente PPI oder die Mikroumgebung eines Proteins festzustellen, eignet sich die Methode der Nachbarschafts-abhängigen Biotin-Identifizierung (BioID). Bei diesem Ansatz wird ein Bait-Protein mit einer prokaryotischen, substratunspezifischen Biotin-Ligase (BirA*) fusioniert (Roux *et al.*, 2012). Bei Kultivierung der entsprechend transformierten Zellen werden alle Proteine in der näheren Umgebung des Bait-Proteins biotinyliert (siehe Abbildung 4.26). Diese kovalente Modifizierung ermöglicht eine einfache Identifizierung der Target-Proteine, zum einen wegen des geringen Hintergrundes natürlich biotinylierter Proteine und zum anderen auf Grund der selektiven Isolierbarkeit mittels Streptavidin.

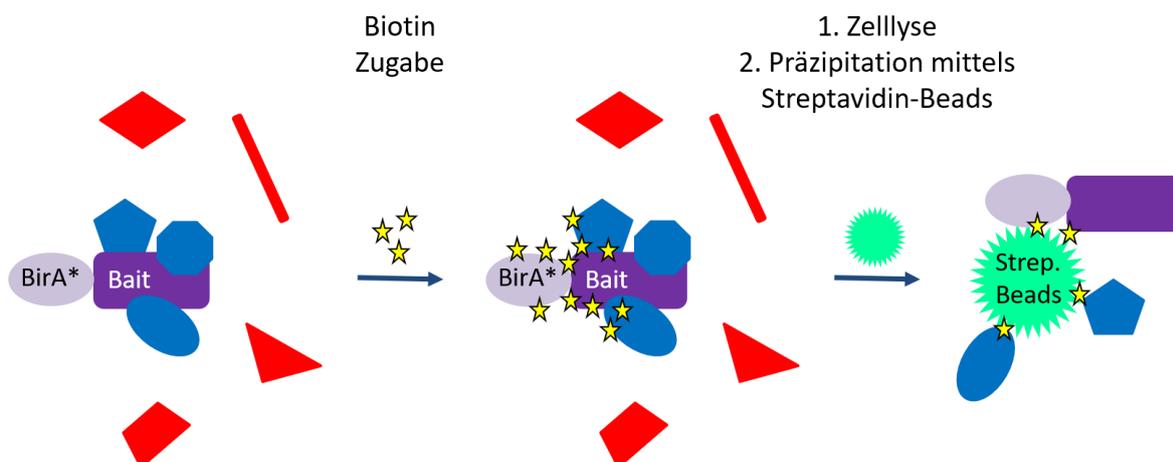


Abbildung 4.26: Prinzip der BioID. Ein Fusionsprotein aus Bait-Protein und promiskuitiver Biotin-Ligase BirA* wird in Hefezellen überexprimiert. Die Kultivierung erfolgt unter Supplementation von Biotin. Die fusionierte BirA* biotinyliert alle Proteine in Reichweite, somit auch Interaktionspartner des Bait-Proteins. Nach einer Zelllyse werden die biotinylierten Proteine mittels Streptavidin-Beads aus dem Gesamtzellextrakt präzipitiert und können anschließend identifiziert werden.

Eine Biotinylierungsreaktion läuft in zwei Schritten ab. Im Ersten erfolgt die Bildung von Biotinyl-5'-AMP aus Biotin und ATP. Dieses aktivierte Biotin reagiert im zweiten Schritt unter Abspaltung des AMPs mit einem Aminrest eines Lysins des Zielproteins (Lane *et al.*, 1964; Chapman-Smith & Cronan, 1999). Bei einer nativen Biotin-Ligase verbleibt das aktivierte Biotin bis zur Reaktion mit dem Substrat im aktiven Zentrum. Wird aber eine mutierte Form

eingesetzt, wird Biotinyl-5'-AMP freigesetzt und biotinyliert promiskuitiv Lysinreste in der nächsten Umgebung (Choi-Rhee *et al.*, 2004). Bei Anwendung der promiskuitiven BirA* (R118G) aus *E. coli* in humanen HEK293-Zellen wurde der Labelingradius *in vivo* mit ca. 10 nm bestimmt, gemessen an einem stabilen Proteinkomplex als Maßstab (Kim *et al.*, 2014). Dieser Radius kann durch den Einsatz eines flexiblen Linkers aus repetitiven GSS-Sequenzen vergrößert werden. Eine weitere Verbesserung der Methode stellt die Verwendung der Biotin-Ligase aus *Aquifex aeolicus* dar. Die Struktur, der mit 233 AS kleinsten bekannten Biotin-Ligase, zeigt große Ähnlichkeit zum *E. coli*-Homolog, jedoch fehlt die in dieser Anwendung nicht benötigte DNA-Bindedomäne (Tron *et al.*, 2009). Die Mutation R40G, welche der R118G-Mutation der *E. coli*-BirA* entspricht, führt zu Substrat-unspezifischer Biotinylierung. Der Einsatz dieser Variante bietet neben der kleineren Größe Vorteile bezüglich der Kultivierungsbedingungen und Labelingeffizienz (Kim *et al.*, 2016).

Bei den gelabelten Proteinen kann es sich um direkte oder indirekte Interaktionspartner handeln, oder nur um benachbarte Proteine. Auf Grund der hohen Affinität von Biotin an Streptavidin ($K_D = 10^{-13}$ - 10^{-15} M) (Choi-Rhee *et al.*, 2004), können diese biotinylierten Proteine in einer Präzipitation mittels Streptavidin-Beads angereichert und anschließend mittels Western Blot oder massenspektrometrisch analysiert werden.

Nach meinem Kenntnisstand sind zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit keine Studien mittels BioID in Hefe peer-reviewed publiziert. Vorgestellt wurde diese Methode zur Untersuchung in *S. cerevisiae* von dem Labor von Oliver Valerius (Smolinski & Valerius, 2016). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit fand die promiskuitive Biotin-Ligase R40G (BirA*) aus *Aquifex aeolicus* Verwendung. Es wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Erstens wurde BirA* mit den 30 Aminosäuren des Leu1-C-Terminus fusioniert, um diesen auf eine Interaktion mit dem CIA-Targeting-Komplex hin zu untersuchen. Zweitens wurde Cia1 als Bait-Protein eingesetzt, zum einen als Positivkontrolle dieser Methode, zum anderen zur Identifizierung von Targets der CIA-Maschinerie bzw. neuer Fe/S-Proteine. Als Kontrolle wurde einerseits unfusionierte Biotin-Ligase eingesetzt, um die Biotinylierung unabhängig vom Bait-Protein festzustellen. Andererseits wurde das Bait-Protein nichtfusioniert exprimiert, um eine unspezifische Bindung an Streptavidin auszuschließen. Ein identifiziertes Protein gilt als benachbart, wenn die Biotinylierungsrate 30 % höher ist als in der Kontrolle (Smolinski & Valerius, 2016).

Amplifiziert wurde *BirA* inklusive einem zwölf Aminosäuren-umfassenden GSS-Linker aus einem synthetischen Gen, welches von Thermo Fisher Scientific bezogen und für die Expression in *S. cerevisiae* Codon-optimiert wurde. Um eine deutliche Überexpression zu generieren, wurde das Gen zunächst in die Vektoren p426_FBA und p426_FBA_Leu1CT zwischen die Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *XhoI* kloniert und mutagenisiert. Anschließend wurde die codierende Sequenz von *CIA1* zwischen den Restriktionsschnittstellen *SmaI* und *XhoI* C-terminal an den Linker fusioniert, um das Plasmid

p426_FBA_BirA*_Cia1 zu erzeugen. Damit die benötigten Kontrollen durchgeführt werden konnten, wurde die codierende *CIA1*-Sequenz auch zwischen die Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *XhoI* der Vektoren p426_FBA und p424_FBA kloniert.

Jedoch konnten weder mit dem BirA*_Cia1-Plasmid, noch mit der Leu1-C-Terminus-Variante der p426_FBA-Serie stabile Hefetransformanten kultiviert werden. Um die Expression der Biotin-Ligase besser steuern zu können, wurde in den vorliegenden Plasmiden der *FBA*-Promotor gegen den schwächeren *MET25*-Promotor ausgetauscht (durch Restriktion mit *SacI* und *SpeI*). Doch auch die Transformation mit diesen Konstrukten auf Methionin-haltigem Medium war nicht erfolgreich. Schließlich wurden Plasmide der p416- bzw. p414_MET25-Serie hergestellt (Cia1-Plasmide durch Restriktionsverdau mit *SpeI* und *XhoI*, Leu1-C-Terminus-Plasmide mittels *SpeI* und *KpnI*), um die Expression durch die Kopiezahl der Plasmide 20-30-fach zu drosseln und weitere cytotoxische Effekte zu vermeiden. Die Transformation dieser Plasmide in *S. cerevisiae* bei einer Herunterregulation der BirA*-Expression durch Methionin-haltiges Medium war erfolgreich.

Zur Nachbarschafts-abhängigen Untersuchung (Expression der Biotin-Ligase) erfolgte die Kultivierung der Zellen ohne Methionin-Zugabe in Medium mit zusätzlich 10 μ M Biotin. In Gesamtzellextraktpräparationen wurde die Präzipitation mit magnetischen Streptavidin-Beads (*Pulldown* (PD)) durchgeführt (siehe 3.4.17). Zur Kontrolle der Proteinmenge im Zellextrakt, wurden stets TCA-gefällte Proben zum Vergleich parallel analysiert.

Abbildung 4.27 zeigt die Untersuchung der Nachbarschaft des C-terminalen Leu1-Peptides. Die Ponceau S-Färbung belegt, dass durch den PD mit Streptavidin-Beads einige wenige Proteine selektiv präzipitiert wurden (**A**). Jedoch sticht keine Bande beim Fusionskonstrukt, im Vergleich zur Kontrolle, hervor. Die Anreicherung biotinylierter Proteine in der PD-Fraktion wird durch die Detektion mit Streptavidin-Konjugat untermauert (**B**). Dies bestätigt eine erfolgreiche Präzipitation. Neben starken Hintergrundbanden ist die Anreicherung des Fusionsproteins bei ca. 28 kDa deutlich zu erkennen. Die Anreicherung wird auch durch Leu1-spezifisches Antiserum bestätigt. Der C-terminale Teil des Leu1-Proteins stellt womöglich ein gutes Epitop dar (**C**). Die Detektion der 28 kDa-Bande ist auch durch eine unspezifische Antikörperreaktion auf Grund der erhöhten Proteinmenge zu erklären. Die Zellextraktkontrollen bestätigen eine vergleichbare Expression der Proteine des CIA-Targeting-Komplexes Cia1, Cia2 und Met18 zwischen der Fusionsprobe und der Kontrolle (**D-F**). Die Proteine Cia1 und Met18 wurden scheinbar nicht biotinyliert. Sie sind in der PD-Fraktion nicht nachweisbar (**D, F**). Cia2 hingegen wurde präzipitiert (**E**). Auch wenn die Bande beim Fusionskonstrukt intensiver erscheint, ist eine Selektivität gegenüber der Kontrolle nicht zweifelsfrei gegeben. Um dies zu klären, sollten sensitivere Nachweismethoden angewendet werden. Diese Analyse erlaubt keine klare Aussage über eine mögliche Interaktion zwischen dem Leu1-C-Terminus und dem CIA-Targeting-Komplex.

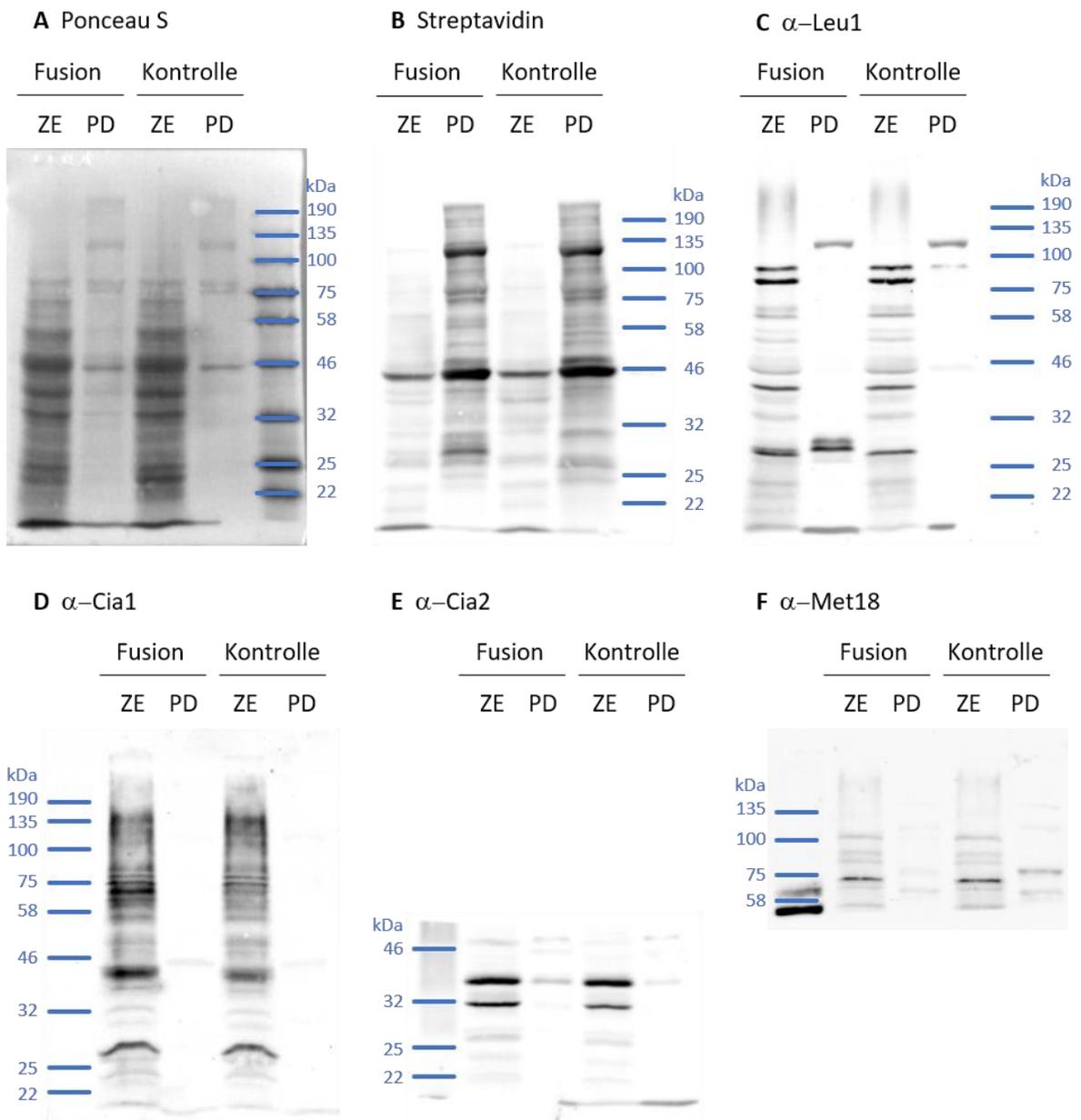


Abbildung 4.27: BioID mit fusioniertem Leu1-C-Terminus: Es konnte keine Nachbarschaft zwischen dem Leu1-C-Terminus und dem CIA-Targeting-Komplex nachgewiesen werden. Das Gen der promiskuitiven Biotin-Ligase *BirA** aus *Aquifex aeolicus* wurde auf p416-Plasmiden unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors zum einen mit fusioniertem *LEU1*-C-Terminus in Kombination mit einem korrespondierenden Plasmid ohne Gen und zum anderen in Kombination mit dem *LEU1*-C-Terminus auf einem p414-Plasmid in den Deletionsstamm $\Delta leu1$ transformiert (Fusion: p416_MET25_BirA*_Leu1CT + p414_MET25; Kontrolle: p416_MET25_BirA*_Stopp + p414_MET25_TAP_Leu1CT). Die Zellen wurden 40 h in SC-Glu-Medium mit 10 μ M Biotin kultiviert. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurde 1 g Zellen aufgeschlossen. Als Kontrolle der Proteinmenge wurden 25 μ l Zellextrakt (ZE) mit TCA gefällt. Die Präzipitation erfolgte mit 300 μ l Zellextrakt und 50 μ l suspendierter magnetischer Streptavidin-Sepharose-Beads für 1 h unter Rotation bei 4 °C. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Es wurden jeweils drei einzelne Kolonien analysiert (n=3). Der Nachweis der Proteine erfolgte **A:** mittels Ponceau S-Färbung, bzw. durch Immundetektion nach SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper: **B:** Streptavidin-HRP-Konjugat; **C:** α -Leu1-; **D:** α -Cia1-; **E:** α -Cia2-; **F:** α -Met18-Antikörperserum.

Als Positivkontrolle der mit dem Leu1-C-Terminus durchgeführten BioID-Methode sollte die Fusion der promiskuitiven Biotin-Ligase mit Cia1 dienen. Des Weiteren wäre dieser Ansatz gut geeignet, um mögliche unbekannte Fe/S-Proteine zu identifizieren. Auf Grund der Struktur eines WD40-Proteins, wird Cia1 eine Funktion als Interaktionsplattform zugesprochen (Srinivasan *et al.*, 2007). WD40-Domänen sind sehr häufig an der Vermittlung von PPI beteiligt. Sie dienen etwa als Gerüstprotein oder der kooperativen Assemblierung und Regulierung von dynamischen Komplexen mit mehreren Untereinheiten (Stirnemann *et al.*, 2010). Hotspots bezeichnen Reste an der Proteinoberfläche von WD40-Proteinen, welche für die PPI wichtig sind. Bei Cia1 und CIAO1 könnten diese mit Aminosäureresten mit einer aromatischen Seitenkette wie F, Y oder W interagieren (Wu *et al.*, 2012).

Abbildung 4.28 stellt die Ergebnisse dieser Studie dar. Die Ponceau S-Färbung und die Detektion mit Streptavidin-Konjugat zeigen die Präzipitation biotinylierter Proteine (**A**, **B**). Dennoch ist weder in Bild **A** noch in Bild **B** das präzipitierte Fusionskonstrukt bei ca. 60 kDa zu erkennen (Vgl. Abbildung 4.27 **B**). Die Hintergrundbiotinylierung erscheint zu stark zu sein. Der Nachweis mit Cia1-spezifischem Antikörperserum detektiert zwar das Hybridprotein, jedoch ist dieses in der PD-Fraktion nicht angereichert (**D**). Auf Grund der eingesetzten Proteinmengen sollte diese Bande deutlich intensiver sein. Des Weiteren ist das nicht fusionierte Cia1-Protein der Kontrolle ebenfalls in der PD-Fraktion präzipitiert. Dies deutet auf eine mangelhafte Funktionalität der Biotin-Ligase hin. Weiterhin ist keine Copräzipitation und somit eine Biotinylierung der bekannten Interaktionspartner Cia2 und Met18 sichtbar (**E**, **F**). Die Zellextraktkontrolle schließt ein Fehlen dieser Proteine im PD wegen schwacher Expression aus. Da die Cia1-Komplexpартner nicht markiert wurden, ist eine Biotinylierung des Targetproteins Leu1 noch weniger wahrscheinlich. Dieses wurde in Relation zur starken Expression in geringem Maße präzipitiert, wenn auch sowohl in der Fusionsprobe als auch in der Kontrolle (**C**). Somit konnten erneut keine Hinweise auf eine Interaktion zwischen Cia1 und Leu1 gewonnen werden. In Anbetracht dieser Ergebnisse kann dieses Hybridprotein nicht als Positivkontrolle der BioID-Methode eingesetzt werden. Dies widerlegt aber nicht automatisch die Funktionalität der Methode bzw. die Resultate der Untersuchung des Leu1-C-Terminus.

Die Überexpression der Biotin-Ligase aus *Aquifex aeolicus* durch die Verwendung von 2- μ -Plasmiden störte das Zellwachstum der Hefezellen dermaßen, dass keine Transformation möglich war. Eine hohe Konzentration des promiskuitiven Enzyms in der Zelle scheint toxisch zu sein. Die BioID mit Cia1 war auf Grund der unselektiven Streptavidin-Präzipitation nicht erfolgreich. Um eine Beeinflussung der Funktionalität von Cia1 durch die Fusion mit BirA* als mögliche Ursache auszuschließen, wurde ein Tüpfeltest durchgeführt. Hierzu wurden das Fusionskonstrukt sowie die Kontrollplasmide in Gal_CIA1-Zellen transformiert. Nach Depletion der chromosomalen CIA1-Kopie durch 40-stündige Kultivierung in glucosehaltigem Medium wurde der Einfluss der Plasmid-Kopie auf das Zellwachstum analysiert.

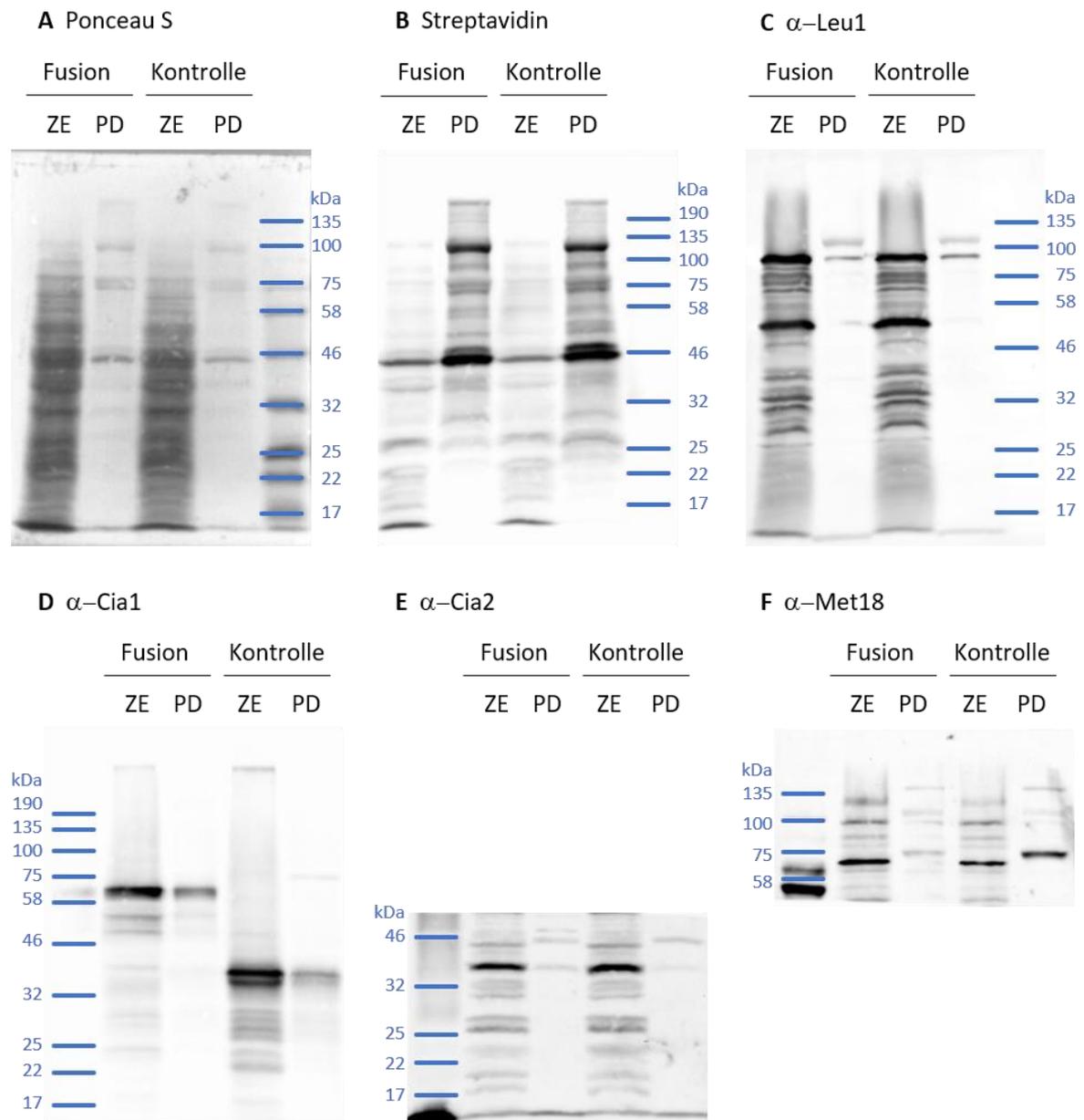


Abbildung 4.28: BioID mit fusioniertem Cia1: Es konnte keine Nachbarschaft zwischen Cia1 und Leu1 nachgewiesen werden. Das Gen der promiskuitiven Biotin-Ligase *BirA** aus *Aquifex aeolicus* wurde auf p416-Plasmiden unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors zum einen mit dem fusionierten Gen *CIA1* in Kombination mit einem korrespondierenden Plasmid ohne Gen und zum anderen in Kombination mit dem Gen *CIA1* auf einem p414-Plasmid unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors in den regulierbaren Stamm Gal_ *CIA1* transformiert (Fusion: p416_ *MET25*_ *BirA**_ *Cia1* + p414_ *MET25*; Kontrolle: p416_ *MET25*_ *BirA**_ Stopp + p414_ *MET25*_ *Cia1*). Die Vorgehensweise erfolgte analog zur Beschriftung der Abbildung 4.27. **A:** Ponceau S-Färbung; **B:** Streptavidin-HRP-Konjugat; **C:** α-*Leu1*-; **D:** α-*Cia1*-; **E:** α-*Cia2*-; **F:** α-*Met18*-Antikörperserum.

Abbildung 4.29 verdeutlicht, dass das mit der Biotin-Ligase fusionierte *Cia1*-Protein fähig ist den Wachstumsdefekt der Hefezellen ohne *CIA1*-Kopie (∅) zu komplementieren. Die Anwesenheit von *BirA** stört die Funktion von *Cia1* nicht. Sowohl die Zellen mit Fusionsplasmid als auch diese mit einem parallel transformierten *BirA**-Plasmid zeigen ein vergleichbares Wachstum zu den Zellen ohne Biotin-Ligase-Kopie, sowie zur Galactose-

Kontrolle. Somit sind die negativen Resultate der mit Cia1 durchgeführten BioID nicht auf eine Funktionsstörung von Cia1 zurückzuführen.

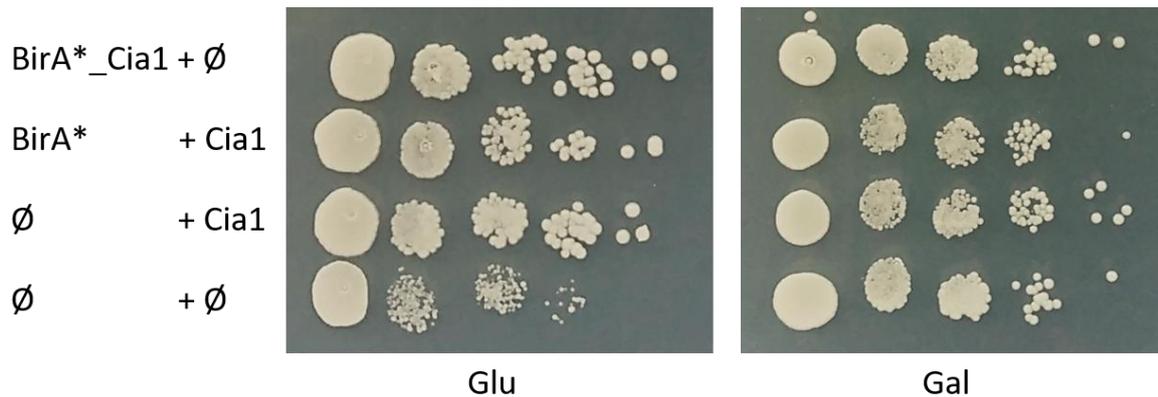


Abbildung 4.29: Tüpfeltest des Biotin-Ligase-Cia1-Fusionskonstruktes: Das BirA*-Cia1-Hybridprotein ist fähig den Wachstumsdefekt des Gal_CIA1-Stammes zu komplementieren. Das Gen *CIA1* bzw. dessen Fusionskonstrukt mit der promiskuitiven Biotin-Ligase *BirA** sowie kein Gen (\emptyset), wurden auf p414- bzw. p416-Plasmiden unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors in den Stamm Gal_CIA1 transformiert. Nach 40-stündigem Vorwachstum in SC-Glu-Medium mit $10 \mu\text{M}$ Biotin wurde, ausgehend von $\text{OD}_{600} = 0,5$, eine serielle Verdünnung (jeweils 1:10) auf Agarplatten mit Glu bzw. Gal als Kohlenstoffquelle aufgebracht. Die Inkubation erfolgte für drei Tage bei 30°C .

4.2.4 Fluoreszenzanisotropie-Messungen

Auf Grund der Vergleichbarkeit der Lebenszeit von Fluorophoren mit dem Zeitraum der Rotationsdiffusion von Biomolekülen, kann die Fluoreszenzanisotropie für Protein-Protein bzw. Protein-Peptid-Bindungsstudien herangezogen werden (Lakowicz, 2006). Da die Fluoreszenzanisotropie ein Maß für die Beweglichkeit von Fluorophoren darstellt, lassen sich aus deren Änderung Rückschlüsse über die Umgebung des Fluorophors ziehen. Wird ein Fluorophor kovalent an ein Peptid gebunden und mit einem Protein titriert, kann daraus im Idealfall die Bindekonstante K_D der Protein-Peptid-Interaktion bestimmt werden. Gatto *et al.* setzten N-terminal mit Lissaminsulfonamid gelabelte Pentapeptide ein, um die Bindung des C-terminalen peroxisomalen Targeting-Signals 1 (PTS1) an den Rezeptor PEX5 zu zeigen (Gatto *et al.*, 2000). Diese Interaktion wird in dieser Arbeit als Positivkontrolle der durchgeführten Methode verwendet. Des Weiteren nutzten Aggarwal *et al.* N-terminal FITC-markierte Oktapeptide für Interaktionsstudien zwischen Peptid-Pheromonen aus *Streptococcus pyogenes* und Transkriptionsfaktoren der Rgg Rezeptorfamilie (Aggarwal *et al.*, 2014). Ein weiteres Beispiel stellt die Entwicklung eines High-Throughput-Screenings auf Grundlage eines Fluoreszenzpolarisations-basierten kompetitiven Peptidbindeassays zur Identifizierung von als Impfstoff geeigneten Peptiden, die mit MHC Klasse 1 Proteinen interagieren dar. Dazu wurden neun bis zehn Aminosäuren lange Peptide verwendet, welche an internen Lysinresten FITC-modifiziert waren (Buchli *et al.*, 2005).

Damit eine mögliche Interaktion eines C-terminalen Tryptophans cytosolischer und nucleärer Fe/S-Proteine mit einem Protein des CIA-Targeting-Komplexes untersucht werden kann, wurden verschiedene Peptide kommerziell für diese Arbeit synthetisiert (Firma Sulfotools GmbH). Um einen Kompromiss zwischen 1.) eine Bindung erhalten (möglichst lange Peptide) und 2.) einen Propellereffekt vermeiden (möglichst kurze Peptide) einzugehen, wurden Heptapeptide eingesetzt. Auf Grund der bekannten Interaktion zwischen dem C-terminalen W des humanen Proteins Viperin und CIAO1, wurden die sieben C-terminalen Aminosäuren von Viperin als erstes Peptid ausgewählt (Upadhyay *et al.*, 2014). Da der C-Terminus der katalytischen Untereinheit Pol3 der Polymerase δ die interessante Sequenz LDW beinhaltet (siehe 1.5), stellt dieses Protein die Grundlage des nächsten Peptides als Vertreter eines nucleären Proteins dar. Wegen des Stellenwertes dieses Proteins in der vorliegenden Arbeit, wurden die sieben C-terminalen Aminosäuren der IPMI aus *S. cerevisiae* als weiteres Peptid gewählt. Die drei ausgewählten Peptide wurden sowohl in ihrer natürlichen Sequenz als auch mit Änderung des C-terminalen Tryptophans in einen Alaninrest hergestellt. Alle sechs Peptide wurden N-terminal mit FITC gelabelt, wobei der Fluorophor über einen β -Alaninrest als Linker kovalent an das Heptapeptid gebunden ist. Sofern eine Interaktion detektiert werden kann, können die parallel synthetisierten unmarkierten Peptide für Konkurrenzexperimente herangezogen werden.

Titriert werden sollte mit den Proteinen des CIA-Targeting-Komplexes, sowohl einzeln als auch in allen möglichen Kombinationsvarianten. Für Studien der Peptide, welche aus Viperin und POL δ abgeleitet sind, wurden zunächst Organismus-abhängig die humanen Proteine CIAO1, FAM96B und MMS19 eingesetzt, wohingegen das Peptid auf Grundlage der IPMI in Gegenwart der Hefe-Homologe untersucht wurde.

Zunächst wurden die humanen Gene *CIAO1* und *FAM96B* in den Vektor pET28aHisTEV kloniert. Um dies zu erleichtern, wurde die im ursprünglichen Vektor enthaltene Restriktionsschnittstelle der MCS *NdeI* durch zielgerichtete Mutagenese in die Erkennungssequenz des Enzyms *KpnI* verändert. Anschließend erfolgte die Insertion der codierenden Sequenzen von *CIAO1* und *FAM96B* zwischen die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *SalI*. Dadurch wird das Protein N-terminal mit einem His₆-Tag fusioniert, welcher, falls notwendig, durch Einsatz der TEV-Protease proteolytisch abgespalten werden könnte. Auf Grund der Größe von MMS19 (113 kDa) erschien eine erfolgreiche heterologe Expression in *E. coli* äußerst schwierig, weshalb sich dazu entschieden wurde nur einen Teil des Proteins zu exprimieren. Die C-terminale Domäne des Proteins ist für dessen Funktion essentiell (Hatfield *et al.*, 2006). Die Interaktion mit Fe/S-Targetproteinen erfolgt durch HEAT-Repeats, welche in dieser Region vorliegen (van Wietmarschen *et al.*, 2012). Es wurden zwei unterschiedlich große Proteinfragmente konstruiert, welche beide diese C-terminale Region miteinschließen. Zum einen wurde die codierende Sequenz der C-terminalen 360 Aminosäurereste und zum anderen die der 590 Reste ebenfalls zwischen die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *SalI* kloniert.

Anschließend wurden die Proteine heterolog in *E. coli* exprimiert. Da sie N-terminal mit einem His₆-Tag fusioniert sind, war eine Aufreinigung des Lysates mittels Ni-Affinitätschromatographie vorgesehen (siehe 3.4.1). Dies war jedoch nur im Falle von CIAO1 möglich. Abbildung 4.30 **A** zeigt durch eine SDS-PAGE den Nachweis der erfolgreichen Isolation des Proteins bei 40,5 kDa. Das Protein FAM96B und die Fragmente 360 (41,9 kDa) und 590 (67,0 kDa) von MMS19 waren unlöslich und aggregierten nach der Zellyse im Pellet, siehe Abbildung 4.30 **B** und Abbildung 4.31 **A** und **B**. Auch die Kultivierung unter veränderten Expressionsbedingungen (Zusatz von EtOH, Variation der Temperatur) führte zu Proteinaggregation. Das präzipitierte FAM96B konnte durch Resuspendieren des Pellets in 6 M Harnstoff gelöst und anschließend renaturiert werden. Durch diese Vorgehensweise konnte das Protein (20,3 kDa) isoliert werden, jedoch mit deutlichen Verunreinigungen (K). Es konnte kein Detergenz gefunden werden, um die Proteine MMS19-360 und MMS19-590 in Lösung zu bringen. Daher wurde eine Expression eines Fusionskonstruktes mit MBP versucht (siehe 3.4.3). Hierzu wurden die codierenden Sequenzen von *MMS19-360* bzw. *-590* zwischen die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *SaI* des Expressionsvektors pMal_c5X kloniert. Die N-terminale Fusion mit dem Maltosebindepotein soll die Löslichkeit positiv beeinflussen. Dieses hat eine hohe Affinität für Amylose, was in der chromatographischen Reinigung ausgenutzt wird. Doch auch bei diesem Ansatz konnte keine der zwei MMS19-Proteinvarianten in löslicher Form erhalten werden.

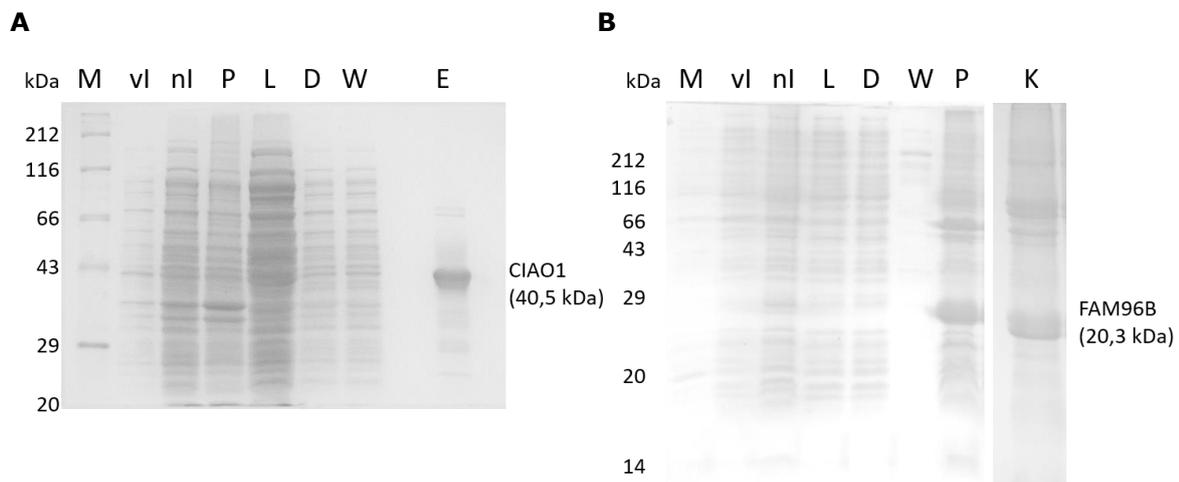


Abbildung 4.30: SDS-Page des gereinigten CIAO1- bzw. FAM96B-Proteins. A CIAO1: Auf das 10 %-ige Gel wurden neben dem Standard Protein-Marker (M) Proben aufgetragen, welche vor (vI) und nach der Induktion (nI) mit IPTG aus der Kultur entnommen wurden. Weiterhin wurden Proben, welche zu verschiedenen Zeitpunkten der Aufreinigung mittels Ni-NTA entnommen wurden, analysiert: Pellet (P), Lysat (L), Durchfluss (D), Waschfraktion (W) und Elutionsfraktion (E). **B FAM96B:** Neben dem Standard Protein-Marker (M) wurden folgende Proben auf das 10 %-ige Gel aufgetragen: vor (vI) und nach der Induktion (nI) mit IPTG, Lysat (L), Durchfluss (D), Waschfraktion (W) und Pellet (P). Spur K zeigt das aufkonzentrierte Protein nach denaturierender Aufreinigung aus dem Pellet.

In einem weiteren Ansatz wurde versucht das vollständige MMS19- bzw. Met18-Protein aus Hefe zu isolieren. Dazu wurden p426_His₈TEV-Expressionsplasmide unter der Kontrolle des

starken *FBA*-Promotors konstruiert. Zur Klonierung der relativ großen Gene wurde erneut auf eine homologe Rekombination in Hefe zurückgegriffen. Der Vektor p426_FBA_His₈TEV_Apd1 (C. Blinn) wurde durch einen Restriktionsverdau mit *Hind*III und *Sa*I linearisiert. Die Amplifikation der codierenden Sequenzen erfolgte durch, der Methode entsprechend, lange homologe Primer. In den hergestellten Plasmiden ist eine Okta-His-Tag-codierende Sequenz N-terminal an die Gensequenz ligiert. Zur Kontrolle der Genexpression wurden Gesamtzellextraktpräparate mittels SDS-PAGE analysiert, siehe Abbildung 4.31 **C**. Diese zeigen eine Expression der entsprechenden Proteine bei 116 kDa (Met18) bzw. 121 kDa (MMS19) im Vergleich zur Negativkontrolle, jedoch keine ausgeprägte Überexpression. Nach Zellyse mittels French Press, Ultrazentrifugation und chromatographischer Aufreinigung über Ni-IDA konnte keine ausreichende Menge an Protein isoliert werden (**D**). Somit waren keine *in vitro* Interaktionsstudien mit dem Protein MMS19 bzw. Met18 möglich.

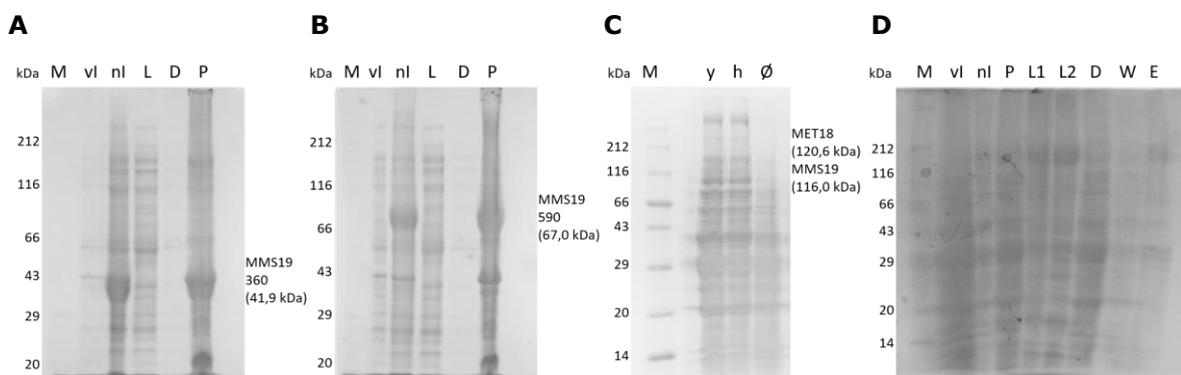


Abbildung 4.31: SDS-PAGE der Reinigungsversuche von MMS19. A MMS19-360, B MMS19-590: Neben dem Standard Protein-Marker (M) wurden folgende Proben auf die 10 %-igen Gele aufgetragen: vor (vI) und nach der Induktion (nI) mit IPTG, Lysat (L), Durchfluss (D) und Pellet (P). **C Expressionskontrolle der Konstrukte in Hefe:** Auf das 10 %-ige Gel wurden neben dem Standard Protein-Marker (M) Gesamtzellextraktproben aufgetragen (jeweils 5 µl): y: Met18 aus *S. cerevisiae*, h: MMS19 aus *H. sapiens*, ø: Kontrolle ohne Überexpression. **D Met18:** Neben dem Marker (M) wurde Folgendes aufgetragen: Proben, welche vor (vI) und nach der Induktion (nI) mit IPTG aus der Kultur entnommen wurden. Weiterhin wurden Proben, welche zu verschiedenen Zeitpunkten der Aufreinigung mittels Ni-NTA entnommen wurden, analysiert: Pellet (P), Lysat 1 und 2 (L1, L2), Durchfluss (D), Waschfraktion (W) und Elutionsfraktion (E).

Für die Untersuchungen mit dem Peptid der IPMI aus Hefe wurden die Proteine Cia1 und Cia2 aus *S. cerevisiae* benötigt. Die codierende Sequenz von *CIA1* wurde zwischen die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sa*I des Vektors pET28aHisTEV kloniert. Die Aufreinigung des heterolog in *E. coli* exprimierten Proteins erfolgte analog zu CIAO1 über eine Ni-NTA-Säule (Größe des His₆-getaggtten Proteins: 41,4 kDa). Das Protein Cia2 ist schwer zu isolieren. Persönlichen Erfahrungen zu Folge ist es nicht stabil und wird zwischen den Aminosäuren P101 und D102 gespalten (Prof. A. J. Pierik, persönliche Mitteilung). Daher wurde beschlossen, nur den konservierteren C-terminalen Teil zu verwenden. Es wurde die codierende Sequenz der C-terminalen 130 Aminosäuren, inklusive einem Start-ATG, in den Vektor pET28aHisTEV zwischen die Schnittstellen *Kpn*I und *Sa*I inseriert. Das

Proteinfragment (Größe 17,2 kDa) wurde durch heterologe Genexpression in *E. coli* hergestellt und analog zu FAM96B durch denaturierende Reinigung mit anschließender Renaturierung isoliert.

Das für das Kontrollexperiment benötigte humane Pex5-Protein wurde von Herrn Lucas Karl im Rahmen seiner Masterarbeit unter meiner Anleitung gewonnen. Die Amplifikation der codierenden Sequenz erfolgte aus einem synthetischen Gen, welches Codon-optimiert für die Expression in *E. coli* hergestellt worden war. Diese wurde durch klassische Klonierungsschritte zwischen die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *SalI* des Vektors pET28aHisTEV eingefügt. Das N-terminal His₆-getaggte Protein wurde Ni-Affinitätschromatographisch aufgereinigt.

Zur Durchführung der Protein-Peptid-Bindungsstudien wurden die Peptide 250 nM (gelöst in HEPES-Puffer mit 2,5% DMSO) vorgelegt. Stufenweise wurde diese Lösung mit den entsprechenden CIAO1 (Cia1)- oder bzw. und FAM96B (Cia2)-Proteinen (10 nM - 20 µM) titriert. Nach jeder Proteinzugabe wurde die Fluoreszenzanisotropie bestimmt (siehe 3.4.18).

In Abbildung 4.32 sind die Ergebnisse dieser Messungen zusammengestellt. Als Positivkontrolle dient die bekannte Interaktion zwischen dem humanen Pex5-Rezeptor und der PTS1-Sequenz SKL (**A**). Die Fluoreszenzanisotropie zeigt in Abhängigkeit von der zugegebenen Proteinmenge einen sigmoidalen Verlauf. Durch Fitten der ermittelten Messwerte kann die Dissoziationskonstante K_D mit einem Wert von 0,17 µM angegeben werden. Folglich sind unter den gegebenen Bedingungen Protein-Peptid-Interaktionsstudien möglich. Bei Titration der zu untersuchenden Targetpeptide mit den CIA-Faktoren CIAO1 und FAM96B ist jedoch keine sigmoidale Kurve zu erkennen (**B-D**). Die Zugabe von FAM96B zeigt weder mit Peptid 1 (Viperin) noch mit Peptid 3 (POLδ) einen Einfluss auf die gemessene Anisotropie (**C**). Im hohen Konzentrationsbereich ist bei Titration mit CIAO1 bzw. beiden Faktoren gemeinsam, ein leichter Anstieg der Anisotropie ersichtlich. Dieser Effekt ist bei den Peptiden 1 und 3 etwas stärker ausgeprägt als bei Peptid 2 (Viperin ohne W). Mittels Fitten kann eine Dissoziationskonstante von > 0,25 mM bzw. > 0,10 mM abgeschätzt werden (**B, D**). Die Ergebnisse bei Verwendung der Hefe-Proteine sind mit den Resultaten der humanen Proteine vergleichbar (**E**). Die Titration von Peptid 5 (IPMI) mit Cia1 bzw. Cia1 und Cia2 gemeinsam, weist bei Zugabe von 20 µM Protein einen minimalen Anstieg der Anisotropie auf. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit dieser Methode im günstigsten Fall nur eine sehr schwache Bindung der C-terminalen Peptide mit Cia1/CIAO1 nachzuweisen war.

Alternativ zu den Fluoreszenzanisotropie-Messungen wurde die isotherme Titrationskalorimetrie eingesetzt, um die Protein-Peptid-Bindungen zu quantifizieren. Diese Untersuchungen wurden mit den unmarkierten synthetischen Peptiden (siehe 2.9) und den rekombinant gereinigten Proteinen Cia1 und CIAO1 durchgeführt. In diesem Fall wurde das Protein in einer ITC-Zelle vorgelegt und die Peptidlösung (zehnfach konzentriert) zutitriert (siehe

3.4.19). Der Einsatz von 50 μM Protein ergab nur eine flache, keine sigmoide Isotherme. Die Erhöhung der eingesetzten Proteinkonzentration auf 240 μM bzw. 480 μM führte im Laufe der Messung zu einer Präzipitation des Proteins innerhalb der Zelle. Auf Grund dieser Probleme konnte diese Methode nicht eingesetzt werden, um eine mögliche Protein-Peptid-Interaktion zu quantifizieren.

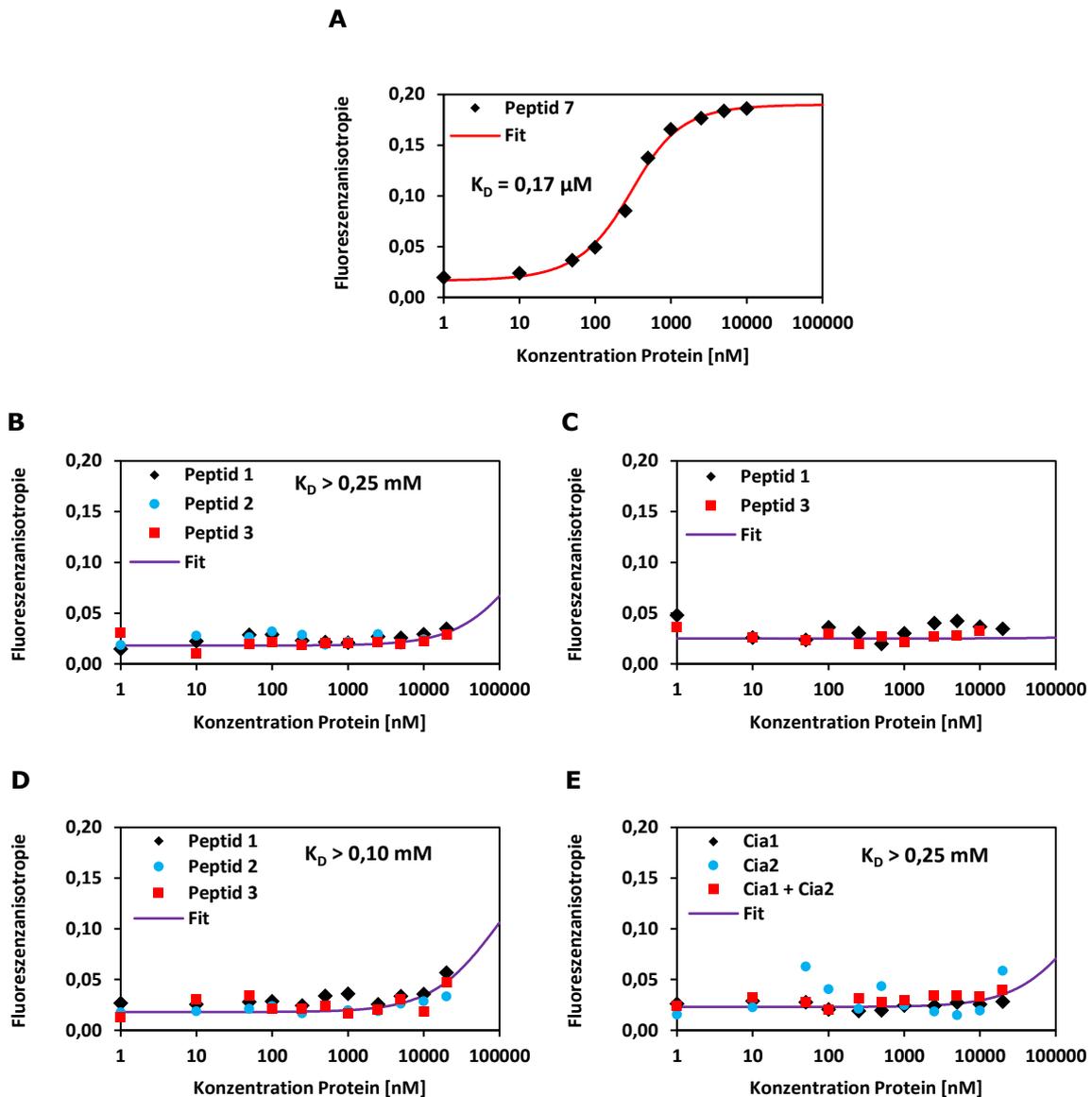


Abbildung 4.32: Fluoreszenzanisotropie-Messungen der Protein-Peptid-Bindestudie: Es konnte kein eindeutiger Nachweis einer Interaktion zwischen Peptiden mit einem C-terminalen Tryptophan und den Proteinen des CIA-Targeting-Komplexes erbracht werden. Gelöste FITC-markierte Heptapeptide (250 nM in HEPES-Puffer mit 2,5% DMSO) wurden mit rekombinant gereinigtem Protein titriert (10 nM - 20 μM). Die Fluoreszenzanisotropie wurde mit einem Fluoreszenz-Lifetime-Spektrometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 514 \text{ nm}$ (Emissionsspektrum im Bereich von 480 - 580 nm) bestimmt (Anregungswellenlänge: $\lambda = 470 \text{ nm}$). Verwendete Peptide: Peptid 1: Viperin mit W, Peptid 2: Viperin ohne W, Peptid 3: POL δ mit W, Peptid 5: IPMI mit W, Peptid 7: PTS1. Eingesetzte Proteine: **A:** *H. sapiens*-Pex5, **B:** *H. sapiens*-CIAO1, **C:** *H. sapiens*-FAM96B, **D:** *H. sapiens*-CIAO1 und -FAM96B, **E:** *S. cerevisiae*-Cia1 und bzw. oder -Cia2 mit Peptid 5.

4.2.5 Chemische Quervernetzung mittels EDC

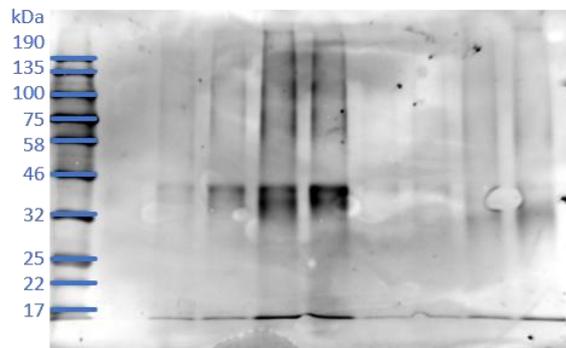
Die chemische Quervernetzung stellt eine Möglichkeit zum Nachweis schwacher Bindungen dar. Eine transiente Interaktion kann durch Bildung einer kovalenten Bindung „festgefroren“ werden (Berggård *et al.*, 2007). Hier fand der „Null-Längen“-Quervernetzer EDC Verwendung, welcher die Addition von Carboxyresten an primäre Amine ermöglicht, ohne selbst ein Teil der finalen Amidbindung zu werden.

Als Ergänzung zu den durchgeführten Fluoreszenzanisotropie-Messungen wurde diese Methode eingesetzt, um eine Interaktion zwischen Cia1 (37,2 kDa) bzw. CIAO1 (37,8 kDa) und den synthetischen Peptiden mit einem C-terminalen Tryptophan zu untersuchen. Als Negativkontrollen wurden die Proteine Lactat-Dehydrogenase (LDH) (36,5 kDa) und die Entner-Doudoroff-Aldolase (EDA) (22,3 kDa) aus *E. coli* verwendet (beide von Frau Monika Schneider zur Verfügung gestellt). Die aus *E. coli* rekombinant gereinigten Proteine (10 µM) wurden mit verschiedenen Peptid-Konzentrationen (5, 10, 15 und 20 µM) und dem „Null-Längen“-Quervernetzer EDC für eine Stunde inkubiert (siehe 3.4.20). Der Nachweis der quervernetzten Protein-Peptid-Komplexe erfolgte durch Immundetektion der FITC-Markierung der eingesetzten Peptide.

Abbildung 4.33 stellt die Ergebnisse der durchgeführten Studie dar. Die Detektion einer Bande bei ca. 40 kDa legt eine Interaktion zwischen CIAO1 aus *H. sapiens* und Peptid 1 (Viperin mit W) nahe (**A**). Nur bei einer erfolgreichen Quervernetzung ist das Protein mit einem FITC-spezifischen Antikörper nachweisbar. Die Negativkontrolle (∅) ohne Peptidzugabe lässt keine Bande erkennen. Dahingegen wird die detektierte Bande mit steigender Peptidmenge von 5 bis 20 µM deutlich intensiver. Im Gegensatz dazu ist bei Einsatz des Peptides 2 (Viperin ohne W) die Interaktion wesentlich schwächer. Lediglich bei den Peptidkonzentrationen 15 und 20 µM ist eine leichte Bande zu sehen. Dies deutet auf eine selektive Interaktion zwischen CIAO1 und einem C-terminalen Tryptophan hin. Das selbe Ergebnis konnte mit dem Protein Cia1 aus *S. cerevisiae* und Peptid 5 (IPMI mit W) beobachtet werden (**B**). Jedoch ist hier die Differenz der Intensitäten zwischen Peptid 5 und 6 (IPMI ohne W) nicht so stark ausgeprägt wie bei **A**. Relativiert werden diese Resultate jedoch durch die Untersuchung von Proteinen, welche in keiner Beziehung zu den verwendeten Peptiden stehen. Sowohl die LDH aus *E. coli* als auch die EDA aus *E. coli* zeigen eine Quervernetzung mit den FITC-markierten Peptiden (**C-F**). Im Fall der LDH erzeugt der Einsatz der Peptide 1 und 5 im Vergleich zu 2 und 6 ebenfalls intensivere Banden (**C, D**). Dies ist bei der EDA nicht so stark ausgeprägt. Hier unterscheiden sich die Ergebnisse der verwendeten Peptide mit und ohne W nur minimal (**E, F**). Die Kombination aus EDA und den Peptiden der IPMI zeigt nur eine geringe Quervernetzung, wie sie als Negativkontrolle erwartet wurde. Zusammenfassend kann diese Studie keine selektive spezifische Interaktion zwischen Cia1/CIAO1 und Peptiden mit einem C-terminalen W belegen. Die scheinbar positiven Resultate werden durch den Vergleich mit zwei Kontrollproteine relativiert.

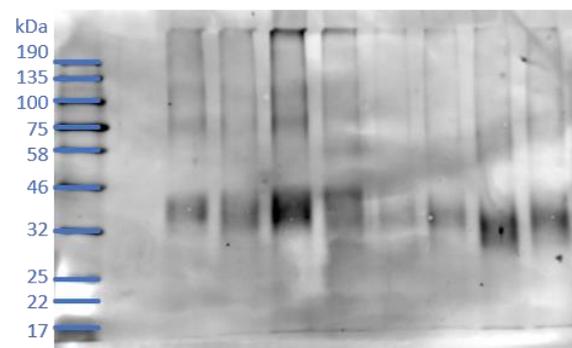
A CIAO1 *H. sapiens*

Peptid: \emptyset 1 2
 [μM] - 5 10 15 20 5 10 15 20



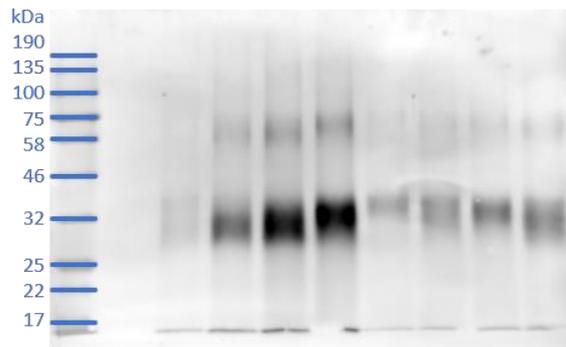
B Cia1 *S. cerevisiae*

Peptid: \emptyset 5 6
 [μM] - 5 10 15 20 5 10 15 20



C LDH *E. coli*

Peptid: \emptyset 1 2
 [μM] - 5 10 15 20 5 10 15 20



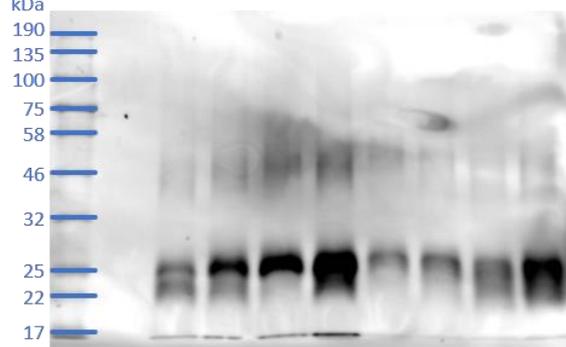
D LDH *E. coli*

Peptid: \emptyset 5 6
 [μM] - 5 10 15 20 5 10 15 20



E EDA *E. coli*

Peptid: \emptyset 1 2
 [μM] - 5 10 15 20 5 10 15 20



F EDA *E. coli*

Peptid: \emptyset 5 6
 [μM] - 5 10 15 20 5 10 15 20



Abbildung 4.33: Chemische Quervernetzung von Cia1 mit FITC-markierten Peptiden: Es konnte keine spezifische Interaktion zwischen Cia1 und Peptiden mit einem C-terminalen Tryptophan nachgewiesen werden. Die gereinigten Proteine (10 μM in MES-Puffer) wurden mit einer aufsteigenden Konzentration FITC-markierter Peptide (0, 5, 10, 15 und 20 μM in MES-Puffer) versetzt und durch Zugabe von 5 mM EDC in einer einstündigen Inkubation bei 0 °C quervernetzt. Der Nachweis der Protein-Peptid-Konjugate erfolgte durch Immundetektion (2 h, RT) nach SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung eines FITC-spezifischen IgG-HRP-Konjugates. Peptid 1 = (FITC)-β-ADLKLDW;

2 = (FITC)- β -ADLKLDA; 5 = (FITC)- β -DKVHQDW; 6 = (FITC)- β -DKVHQDA; \emptyset \triangleq kein Peptid. **A:** CIAO1 aus *H. sapiens*; **B:** Cia1 aus *S. cerevisiae*; **C, D:** Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus *E. coli*; **E, F:** Entner-Doudoroff-Aldolase (EDA) aus *E. coli*.

4.2.6 Abhängigkeit von der CIA-Maschinerie

Mit den durchgeführten *in vivo* und *in vitro* Interaktionsstudien konnte keine geeignete Methode gefunden werden, um die Interaktion des C-terminalen Tryptophans eines Targetproteins und einem Protein des CIA-Targeting-Komplexes direkt nachzuweisen. Daher wurde im Folgenden nach indirekten Hinweisen auf einen Zusammenhang des C-terminalen Restes und der CIA-Maschinerie gesucht.

Zunächst wurde analysiert, ob die CIA-Maschinerie bzw. der CIA-Targeting-Komplex durch ein Protein, welches über ein C-terminales Tryptophan verfügt, jedoch nicht fähig ist, einen Fe/S-Cluster zu tragen, gehemmt werden kann. Als Peptid dienen die 30 C-terminalen Aminosäuren des Hefe-Leu1-Proteins. Diese wurden N-terminal mit einem TAP (*tandem affinity purification*)-Protein fusioniert. Hierzu wurde die codierende Sequenz des TAP-Proteins mittels PCR aus dem Vektor pYM13 amplifiziert und durch klassische Klonierungsschritte zwischen die Schnittstellen *SpeI* und *XhoI* des Vektors p426_FBA_Leu1CT inseriert. Das konstruierte Plasmid sowie ein korrespondierendes Leerplasmid wurden in den WT-Stamm transformiert und die Leu1-spezifische Aktivität in Zellextrakten bestimmt.

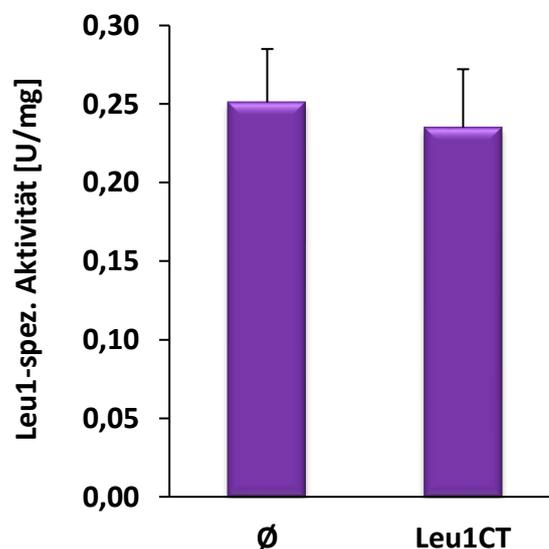


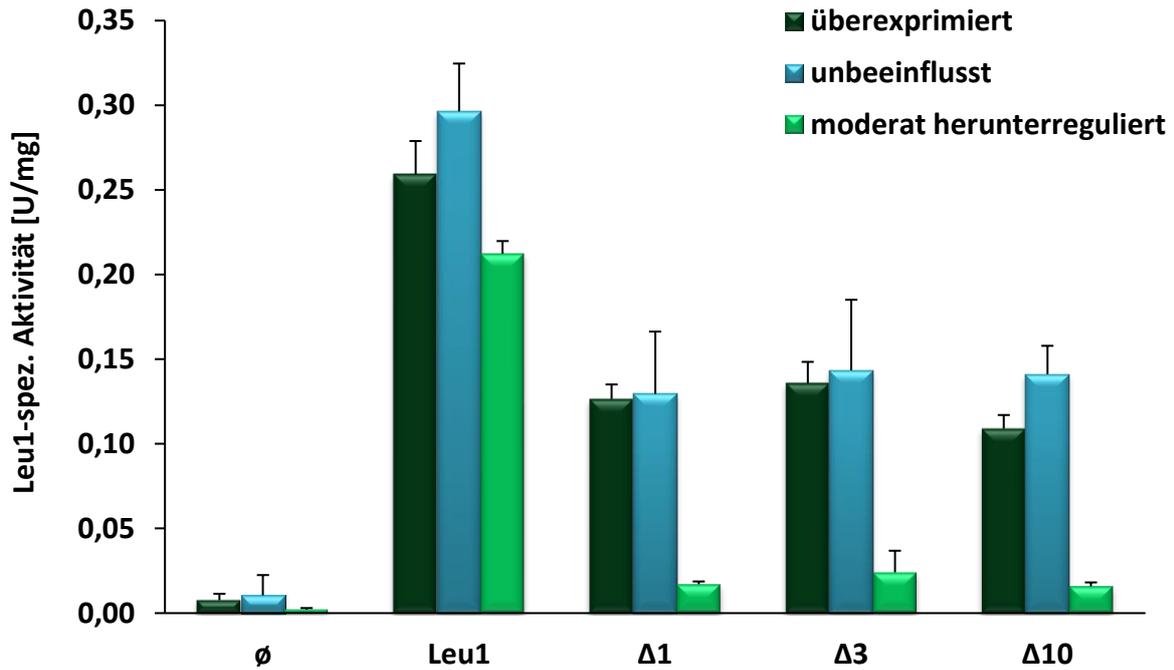
Abbildung 4.34: Leu1-spez. Aktivitätsmessung des Wildtypstammes: Die CIA-Maschinerie wird durch Expression eines Proteins mit C-terminalem Tryptophan nicht signifikant gehemmt. Die codierende Sequenz des *LEU1*-C-Terminus (30 AS) sowie kein Gen (\emptyset), wurden auf einem p426-Plasmid unter der Kontrolle des *FBA*-Promotors in den WT-Stamm transformiert. Die Zellen wurden 40 h in SC-Glu-Medium kultiviert. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 0,5 g Zellen aufgeschlossen. Für die Leu1-Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 3 μ l Gesamtzellextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Es wurden mindestens sechs einzelne Kolonien aus zwei unabhängigen Hefetransformationen analysiert (n=6). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen.

Abbildung 4.34 zeigt die Leu1-spezifische Enzymaktivität des unbeeinflussten WT-Stammes im Vergleich zum gestörten System. Durch Überexpression eines Proteins, welches keinen Fe/S-Cofaktor aufnehmen kann, nimmt die Aktivität des cytosolischen Referenzproteins nur um 7% ab. Dies deutet darauf hin, dass das Protein in geringem Maße mit der CIA-Maschinerie in Wechselwirkung tritt und die Leu1-Reifung schwach beeinflusst.

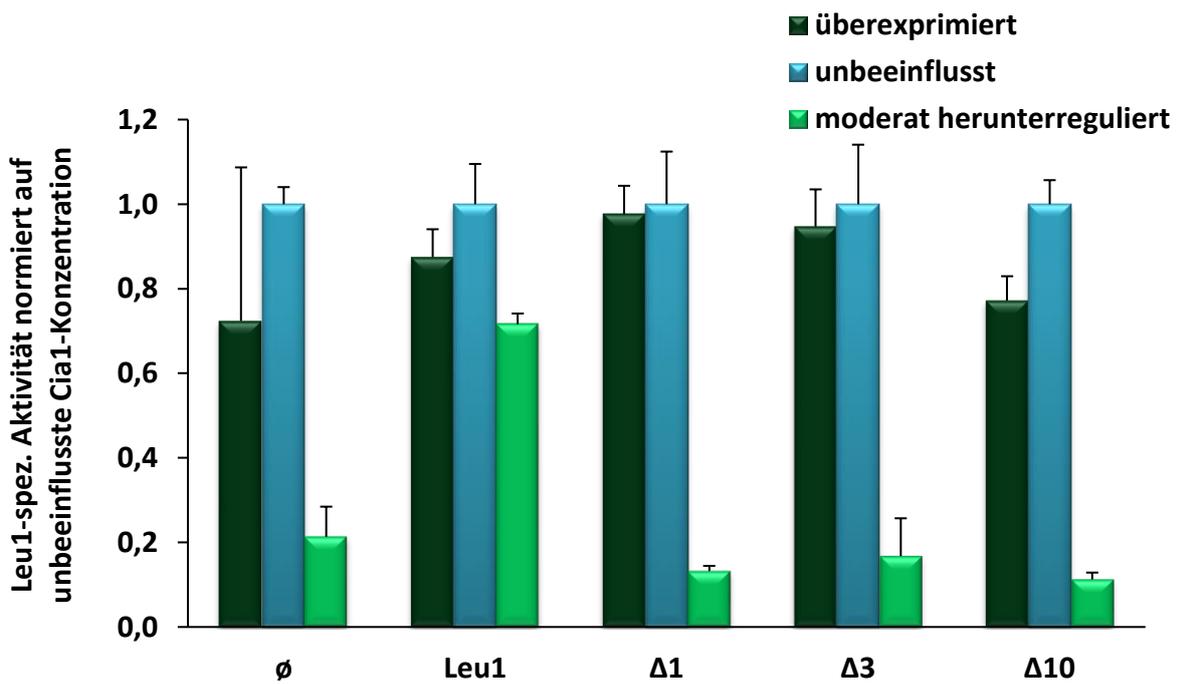
Auf Grund der Annahme (siehe 4.2.3), dass Cia1 die C-terminale Peptidsequenz erkennt und bindet, wurde eine Studie mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen an Cia1 durchgeführt. Um eine Abhängigkeit des Fe/S-Clustereinbaus von dem C-terminalen Tryptophan festzustellen, wurden eine Auswahl der C-terminalen Leu1-Mutanten (siehe 4.1.3) bei regulierter Cia1-Konzentration untersucht. Zum einen wurde durch Transformation einer zusätzlichen *CIA1*-Plasmidkopie (p424_FBA_Cia1) in den Deletionsstamm $\Delta leu1$ dieser CIA-Faktor überexprimiert. Zum anderen wurde durch Wachstum auf Glucose die Expression der chromosomalen *CIA1*-Kopie im Stamm Gal_CIA1_ $\Delta leu1$ herunterreguliert. Für die Analyse, wurde die Cia1-Konzentration nur moderat herunterreguliert. Hierzu erfolgte das Wachstum auf Glucose für 40 h. Um eine nahezu vollständige Depletion zu erreichen, ist eine Kultivierung von 64 h notwendig. Dies führt zu fehlendem Fe/S-Clustereinbau in Leu1. In Gesamtzellextraktpräparationen wurde die Leu1-spezifische Enzymaktivität bestimmt. Die Messwerte dieser zwei Ansätze werden mit den Ergebnissen der Hefezellen verglichen, bei welchen Cia1 nicht hoch- oder herunterreguliert wurde (siehe 4.1.3).

In Abbildung 4.35 **A** ist die Leu1-spezifische Aktivität bei regulierter Cia1-Konzentration in absoluten Werten dargestellt. Die Messwerte der unbeeinflussten Kontrolle (hellblau) sind bereits in Abbildung 4.4 gezeigt und werden hier wiederholt, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Die moderate Herunterregulation von *CIA1* führt zu einem Aktivitätsverlust der Plasmid-WT-Leu1-Kopie von 29%. Im Gegensatz dazu erzeugt die Überexpression von Cia1 jedoch keinen Gewinn. Die Deletion des C-terminalen Tryptophans bzw. der letzten drei oder zehn Aminosäuren resultiert in jedem Fall in einem reduzierten Fe/S-Clustereinbau. Um diesen Effekt in Abhängigkeit von der Cia1-Regulation besser beurteilen zu können, werden die Messwerte in Abbildung 4.35 **B** normiert auf die jeweilige Aktivität des Wertes der unbeeinflussten Kontrolle dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die plasmid erzeugte Cia1-Überexpression nicht zu einem gesteigerten Fe/S-Clustereinbau der Leu1-Mutanten führt. Das Aktivitätsniveau entspricht nahezu der unbeeinflussten Kontrolle. Bei der moderaten Herunterregulation des CIA-Faktors ist eine weitere Abnahme der Leu1-spezifischen Enzymaktivität ersichtlich. Der Aktivitätsverlust der $\Delta 1$ -Mutante bei physiologischem Cia1-Niveau beträgt 57%. In depletierten Hefezellen zeigt die $\Delta 1$ -Mutante einen Verlust von 92% im Vergleich zu WT-Leu1 und 87%, bezogen auf den Wert jener Mutante in unbeeinflussten Hefezellen. Dies entspricht nahezu dem Hintergrundwert. Die Aktivitäten der Mutanten $\Delta 3$ und $\Delta 10$ sind dem Wert der $\Delta 1$ -Mutante sehr ähnlich.

A



B



C

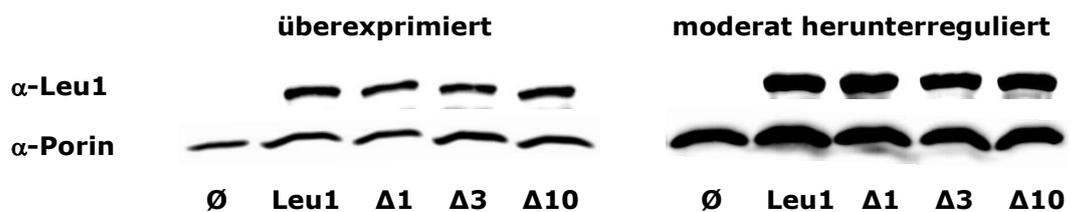


Abbildung 4.35: Leu1-spez. Aktivitätsmessung bei regulierter Cia1-Konzentration:

Das C-terminale Tryptophan ist bei Herunterregulation von CIA1 essentiell. Unbeeinflusst: Das Gen *LEU1* bzw. dessen Mutanten $\Delta 1$, $\Delta 3$ und $\Delta 10$, sowie kein Gen (\emptyset), wurden auf p416-Plasmiden unter der Kontrolle des natürlichen Promotors in den Deletionsstamm $\Delta leu1$ transformiert. Diese Ergebnisse sind bereits Teil der Abbildung 4.4 und werden hier zum direkten Vergleich dargestellt. **Überexprimiert:** Selbige Plasmide wurden in Kombination mit dem Gen *CIA1* auf p424-Plasmiden unter der Kontrolle des *FBA*-Promotors in den Deletionsstamm $\Delta leu1$ transformiert. **Moderate Herunterregulation:** Die *Leu1*-Plasmide wurden in den regulierbaren Stamm *Gal_CIA1_Δleu1* transformiert. Um die chromosomale *CIA1*-Kopie zu depletieren, wurden die Zellen 40 h in glucosehaltigem SC-Medium kultiviert. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 0,5 g Zellen aufgeschlossen. Für die *Leu1*-Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 3 μ l Gesamtzellextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. **A:** Die spezifischen Aktivitäten einer Messreihe wurden auf die Aktivität des *Leu1*-WT normiert und mit einem Mittelwert über alle Messreihen hinweg renormiert. Es wurden drei einzelne Kolonien analysiert (n=3). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen. **B:** Zum besseren Vergleich werden die Messwerte normiert auf die Aktivität der jeweiligen Mutante bei unbeeinflusster *Cia1*-Konzentration dargestellt. **C:** Der Nachweis der Proteinmengen erfolgte durch Immundetektion unter Verwendung eines *Leu1*-spezifischen Antikörperserums. Porin diente als Ladekontrolle.

Die Regulation der *Cia1*-Konzentration in der Zelle hat keinen Einfluss auf die *Leu1*-Proteinmenge bzw. dessen Stabilität. Dies verdeutlicht die Analyse mittels Western Blot, siehe Abbildung 4.35 **C**. Auf Grund der mangelhaften Qualität des vorhandenen *Cia1*-spezifischen Antikörperserums, wird auf die Darstellung der Kontrolle der *Cia1*-Menge im Zellextraktpräparat verzichtet. Diese Daten indizieren, dass das C-terminale Tryptophan bei Reduzierung der verfügbaren *Cia1*-Menge in der Zelle an Bedeutung gewinnt und bei einer Herunterregulation essentiell wird. Darüber hinaus scheinen in diesem Experiment die weiteren neun deletierten *Leu1*-C-terminalen Aminosäurereste nicht kritisch für eine Interaktion mit *Cia1* zu sein.

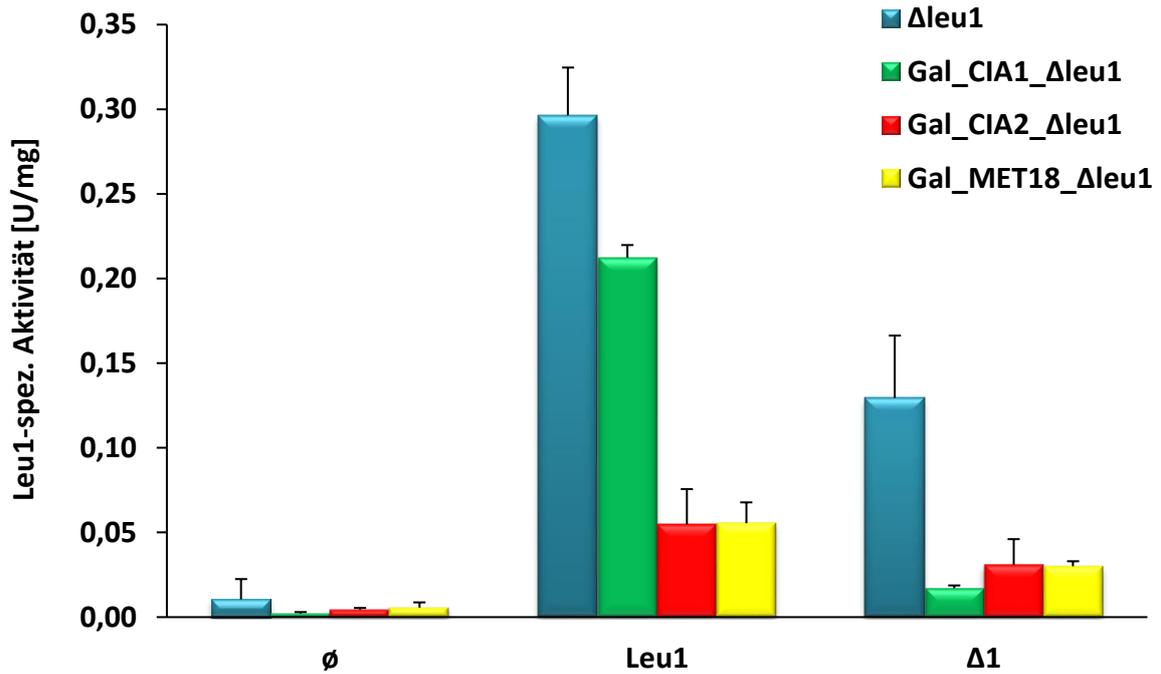
Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob dieser Effekt auch bei niedrigerer *Cia2*- bzw. *Met18*-Expression beobachtet werden kann. Hierzu mussten zunächst regulierbare $\Delta leu1$ -Deletionsstämme hergestellt werden. Der Einsatz des schwächeren *GALL*- anstatt des *GAL1-10*-Promotors soll die Herunterregulation der entsprechenden *CIA*-Komponenten erleichtern. Mittels homologer Rekombination wurde in dem regulierbaren Stamm *Gal_MET18* die chromosomale *LEU1*-Kopie durch die *Nat*-Kassette ersetzt. Diese wurde durch den Einsatz von passenden Primern aus dem Plasmid pFA6a_natNT2 amplifiziert. Die Selektion erfolgreich rekombinierter Klone erfolgte durch Ausplattieren auf Nourseothricin-haltigen Agarplatten. Die Deletion wurde mittels PCR und *Leu1*-spezifischer Enzymaktivitätsmessung überprüft. Zur Herstellung des Hefestammes *Gal_CIA2_Δleu1* wurde der natürliche *CIA2*-Promotor im Deletionsstamm $\Delta leu1$ durch den regulierbaren *GALL*-Promotor ersetzt. Da die Deletion mit Hilfe der *Nat*-Kassette durchgeführt worden war, musste der Promotor-Austausch mit einer *HIS*-Kassette erfolgen (Ebert, 2014). Hierzu wurde zunächst ein Plasmid konstruiert, welches die *HIS3MX6*-Kassette mit dem *GALL*-Promotor fusioniert. Die *HIS3MX6*-Kassette wurde aus Plasmid pYM15 amplifiziert und zwischen die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *SacI* des Plasmides pYM-N27 kloniert (Janke *et al.*, 2004). Das mit geeigneten Primern konstruierte PCR-Produkt wurde durch homologe Rekombination in den Deletionsstamm inseriert. Die Selektion erfolgreich rekombinierter

Klone erfolgte durch Wachstum auf histidinfreien Agarplatten. Die Korrektheit des konstruierten *S. cerevisiae*-Stammes wurde mittels PCR und Western Blot überprüft.

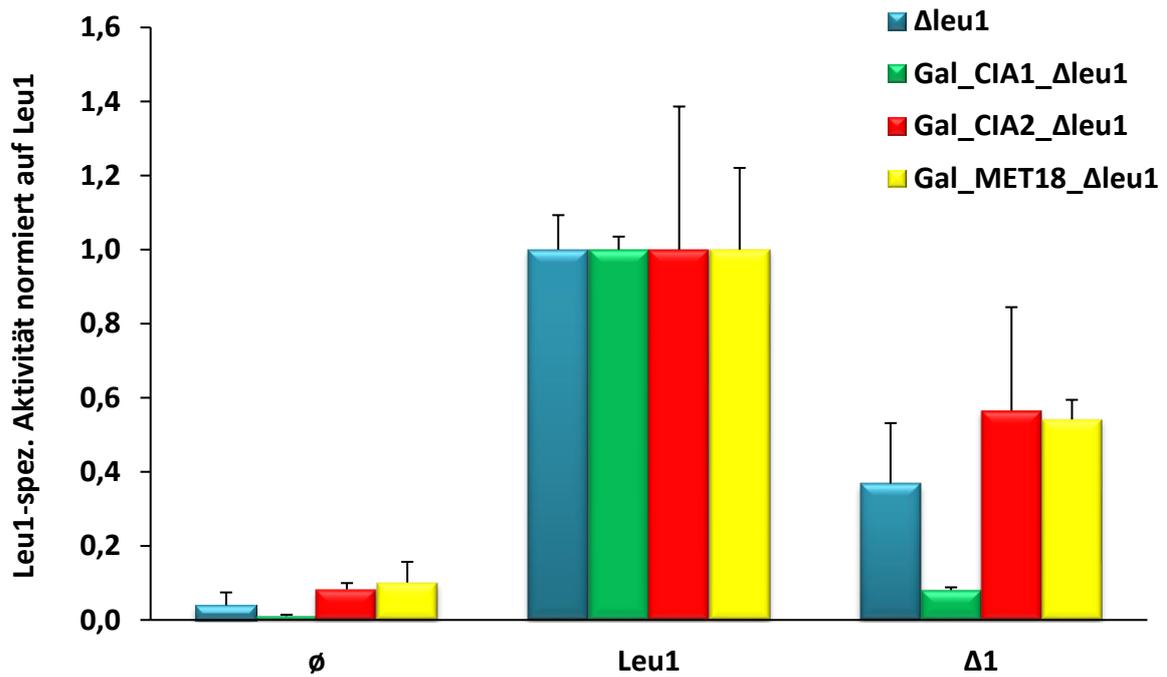
Nach Transformation der entsprechenden Plasmide in die hergestellten Hefestämme wurden die Zellen für 40 h in glucosehaltigem Medium depletiert und die Leu1-spezifische Enzymaktivität in Gesamtzellextraktpräparationen bestimmt. Auch hier werden zum direkten Vergleich sowohl die Daten ohne Regulation der CIA-Maschinerie aus Abbildung 4.4 als auch nach moderater Herunterregulation von *CIA1* aus Abbildung 4.35 zum Vergleich präsentiert.

Die Depletion von GalL_CIA2_Δ*leu1* und GalL_MET18_Δ*leu1* über 40 h resultierte in einem starken Aktivitätsverlust der WT-Leu1-Plasmidkopie von 81 % bzw. 80 % bei Cia2 bzw. Met18 im Vergleich zum unbeeinflussten Hefestamm, siehe Abbildung 4.36 **A**. Somit bewegt sich bereits die Aktivität der WT-Kontrolle auf einem geringen Niveau. Die Kultivierung der Zellen in glucosehaltigem Medium über 16 h bzw. 24 h führte jedoch nicht zu einer Herunterregulation der zu beeinflussenden Expression, sodass eine Regulation über 40 h vorgenommen werden musste. Es konnten keine Bedingungen gefunden werden, aus welchen ein Kompromiss zwischen moderater Herunterregulation und ausreichender Leu1-spezifischer Enzymaktivität hervorging. Auf Grund des geringen Aktivitätsniveaus und dem damit einhergehenden größeren relativen Fehler, sind diese Ergebnisse nicht zu 100 % aussagekräftig. Dies konnte bei der moderaten Regulation von Cia1 zufriedenstellender erreicht werden (Aktivitätsverlust von 29 %). Die Deletion des C-terminalen Tryptophans bewirkt auch in diesen regulierbaren Stämmen einen verminderten Fe/S-Clustereinbau. Zur anschaulicheren Auswertung werden auch bei dieser Analyse die Daten in Abbildung 4.36 **B** normiert auf die Aktivität des jeweiligen WT-Leu1-Wertes dargestellt. Bei einer reduzierten Cia2-Konzentration nimmt die Funktion der Leu1-Mutante Δ1 um 54 % im Vergleich zur WT-Plasmid-Kopie ab. Bei Depletion von *MET18* beträgt der Verlust 56 %. Dies steht in Relation zu den 57 % Aktivitätsverlust im nicht regulierten Deletionsstamm Δ*leu1* und liegt deutlich unter den 92 % bei verminderter Expression von Cia1. Der Nachweis der Proteinmenge mittels Immundetektion weist auch hier keine Beeinflussung durch die Depletion der CIA-Maschinerie auf, siehe Abbildung 4.36 **C**. Es ist ersichtlich, dass sowohl *CIA2*, als auch *MET18* erfolgreich herunterreguliert wurden. Diese Ergebnisse lassen keine gesteigerte Abhängigkeit des C-terminalen Tryptophans von den CIA-Targeting-Komplex-Faktoren Cia2 oder Met18 erkennen. Sie weisen vielmehr auf einen Zusammenhang der Signalsequenz mit Cia1 hin.

A



B



C

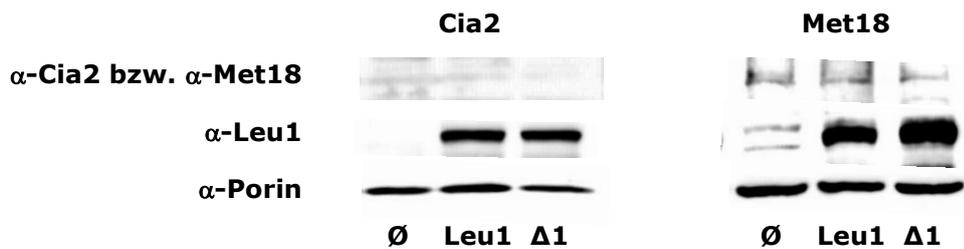


Abbildung 4.36: Leu1-spez. Aktivitätsmessung in regulierbaren CIA-Stämmen:

Das C-terminale Tryptophan ist bei Herunterregulation des CIA-Faktors *CIA1* essentiell, jedoch nicht bei *CIA2* oder *MET18*. Das Gen *LEU1* bzw. dessen Mutante $\Delta 1$, sowie kein Gen (\emptyset), wurden auf p416-Plasmiden unter der Kontrolle des natürlichen Promotors in die Deletionsstämme $\Delta leu1$, Gal_ *CIA1* $\Delta leu1$, Gal_ *CIA2* $\Delta leu1$ und Gal_ *MET18* $\Delta leu1$ transformiert. Um die chromosomale Kopie des jeweiligen CIA-Faktors zu depletieren, wurden die Zellen 40h in glucosehaltigem SC-Medium kultiviert. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 0,5g Zellen aufgeschlossen. Für die Leu1-Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 3 μ l Gesamtzellextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Die Messreihe $\Delta leu1$ ist bereits Teil der Abbildung 4.4 und wird hier zum direkten Vergleich gezeigt. Die Messreihe Gal_ *CIA1* $\Delta leu1$ ist bereits als moderat herunterreguliert in Abbildung 4.35 dargestellt. A: Die spezifischen Aktivitäten einer Messreihe wurden auf die Aktivität des Leu1-WT normiert und mit einem Mittelwert über alle Messreihen hinweg renormiert. Es wurden drei einzelne Kolonien analysiert (n=3). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen. B: Zum besseren Vergleich werden die Messwerte normiert auf die Aktivität der Leu1-Plasmidkopie dargestellt. C: Der Nachweis der Proteinmengen erfolgte durch Immundetektion unter Verwendung spezifischer Antikörperseren. Porin diente als Ladekontrolle. Gezeigt sind nur die Blots der nicht wiederholten Daten.

Des Weiteren wurde die Bedeutung der Deletion des C-terminalen Tryptophans des Targetproteins im Vergleich zu funktionsbeeinflussenden Mutanten von *Cia1* untersucht. Analog zu weiteren bekannten WD40-Proteinen wird für *Cia1* eine Funktion als Interaktionsplattform angenommen, wobei die Bindungspartner entweder an der zentralen Tunnelregion oder an einem Propellerblatt binden (Srinivasan *et al.*, 2007). Als Interaktionsgrundlage besonders geeignet dürften die Schlaufen zwischen den β -Strängen an der Proteinoberfläche sein. Im Rahmen der Dissertation von Dr. Holger Webert in der Arbeitsgruppe von Prof. R. Lill wurde eine Mutagenesestudie zur Kartierung der Interaktionsstelle von *Nar1* auf *Cia1* durchgeführt (Webert, 2011). Berücksichtigt wurden konservierte Reste mit einer großen freien Oberfläche, welche nicht für die strukturelle Integrität des Proteins verantwortlich sind. Nach Möglichkeit wurde die Ladung der Aminosäure umgekehrt, um eine größtmögliche Änderung der Proteinoberfläche zu erzielen. In Komplementationsversuchen in depletierten Gal_ *CIA1*-Zellen zeigte lediglich die Mutante R127E einen partiellen Funktionsverlust (Webert, 2011). Dieser Phänotyp konnte durch Kombination mit weiteren Aminosäuresubstitutionen gesteigert werden. Die Mutation schwächt bzw. verhindert eine *Cia1*-*Nar1*-Interaktion, während *Cia2* und *Met18* weiterhin stabil gebunden bleiben. Die Doppelmutante R127E_Y173A zeigt einen stärkeren Leu1-Enzymaktivitätsverlust als die Einzelmutante, jedoch keinen vollständigen, sodass diese Mutante für die folgende Studie ausgewählt wurde.

Zunächst wurde die codierende Sequenz von *CIA1* inklusive der natürlichen Promotor (500 kb)- und Terminatorregion (484 kb) in einer klassischen Klonierung zwischen die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *KpnI* des Plasmides p414_ *MET25* kloniert. Anschließend wurden mittels gezielter Mutagenese nacheinander die Punktmutationen R127E und Y173A eingefügt. Die drei konstruierten Plasmide wurden jeweils in Kombination mit den Vektoren p416_ *NP_Leu1* bzw. p416_ *NP_Leu1* $\Delta 3$ in den Hefestamm Gal_ *CIA1* $\Delta leu1$ transformiert. Nach Depletion für 40 h unter glucosehaltigen Kulturbedingungen wurde die Leu1-spezifische Enzymaktivität in Gesamtzellextraktpräparationen analysiert.

In Abbildung 4.37 ist die gemessene Leu1-spezifische Aktivität der Cia1-Mutanten im Vergleich zur Leu1- Δ 3-Mutante zu sehen. Der Aktivitätsverlust der Mutante Δ 3 in Relation zum Leu1-WT von 60 % bei Expression einer plasmid erzeugten Cia1-WT-Kopie stimmt mit den Ergebnissen in anderen untersuchten Systemen (zum Vergleich siehe Abbildung 4.4) überein. Die Mutation R127E führt zu einem um 40 %-geringeren Fe/S-Clustereinbau in WT-Leu1. Der Aktivitätsverlust wird durch die Doppelmutation R127E_Y173A auf 53 % gesteigert. Die Leu1-spezifische Aktivität der Δ 3-Mutante zeigt bei Anwesenheit der partiell funktionsunfähigen Cia1-Mutante R127E einen Wert von 29 % bezogen auf den WT. Die Kombination mit der Doppelmutante resultiert in einer Restaktivität von Δ 3 von 16 %. Diese Messungen belegen erneut die Bedeutung des Tryptophans am C-terminalen Ende des Targetproteins Leu1 und die kritische Rolle des Cia1-Proteins.

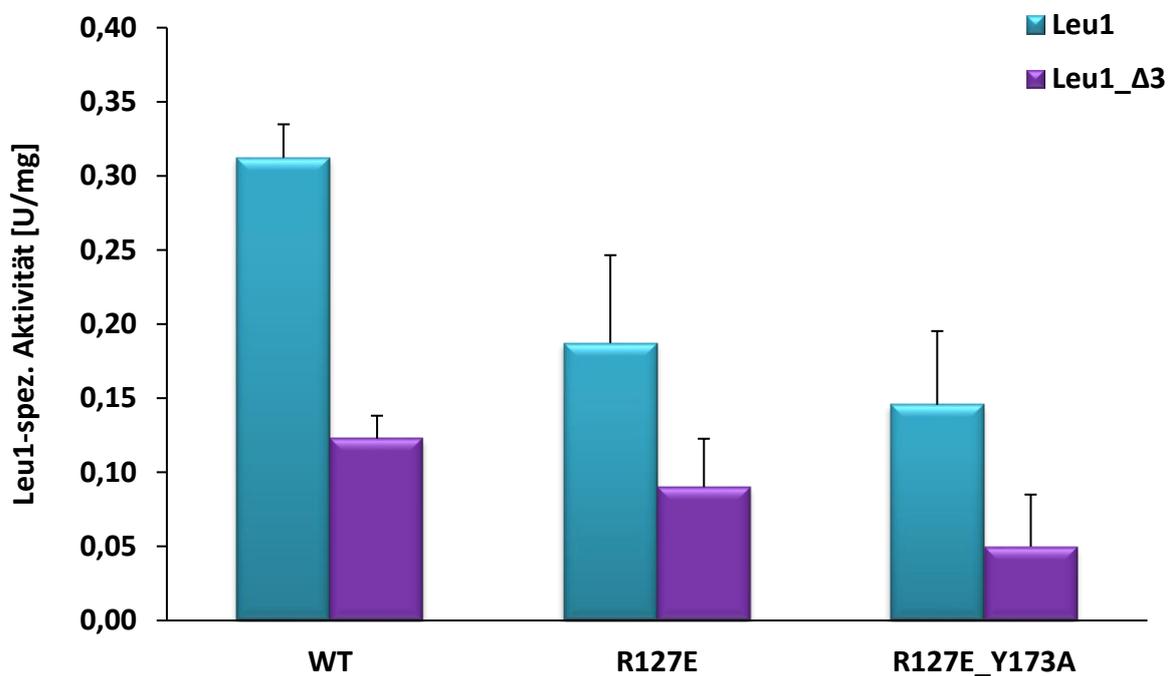


Abbildung 4.37: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der Cia1-Mutanten: Die Deletion des C-terminalen Tryptophans hat einen größeren Einfluss auf den Fe/S-Clustereinbau als die Nar1-Cia1-Interaktion. Das Gen *LEU1* bzw. dessen Mutante Δ 3 wurden auf p416-Plasmiden unter der Kontrolle des natürlichen Promotors in Kombination mit dem Gen *CIA1* bzw. dessen Mutanten R127E und R127E_Y173A auf p414-Plasmiden unter der Kontrolle des natürlichen Promotors in den Deletionsstamm *Gal_CIA1_Δleu1* transformiert. Um die chromosomale *CIA1*-Kopie zu depletieren, wurden die Zellen 40h in glucosehaltigem SC-Medium kultiviert. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 0,5g Zellen aufgeschlossen. Für die Leu1-Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 3 μ l Gesamtzellextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtprotein-konzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung mindestens dreier unabhängiger Messungen einzelner Kolonien (n=3).

4.3 Biotechnologische Anwendung der Tryptophan-Hypothese

Die durchgeführten Mutagenesestudien haben gezeigt, dass ein Tryptophanrest am C-Terminus von cytosolischen Fe/S-Proteinen wichtig ist für deren Clustereinbau in Hefe. Hefe ist ein wichtiger Organismus in der biotechnologischen Produktion von beispielsweise Ethanol (Benisch & Boles, 2014). Um die Produktion zu steigern, werden durch metabolisches Engineering Biosynthesewege in heterologe Organismen implementiert. Versuche, prokaryotische Synthesewege, an welchen Fe/S-Proteine beteiligt sind, in Hefe funktionell zu exprimieren, scheitern an einem ineffizienten Einbau des Cofaktors. Es wird vermutet, dass der CIA-Targeting-Komplex die prokaryotischen Apoproteine nicht erkennt. Im Folgenden wurde untersucht, ob durch Anhängen eines C-terminalen Tryptophans der Fe/S-Clustereinbau in bakterielle Enzyme im Cytosol von Hefezellen gesteigert werden kann.

4.3.1 Expression einer *E. coli*-Aconitase in *S. cerevisiae*

Aconitase katalysiert die Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat. Ein Eisenion des [4Fe-4S]-Clusters fungiert hierbei als Lewis-Säure (Beinert *et al.*, 1996). *E. coli* verfügt über zwei Aconitase-Enzyme. AcnB ist das Hauptenzym im Citratzyklus in der exponentiellen Wachstumsphase (Jordan *et al.*, 1999). AcnA wird als Überlebensenzym in der stationären Phase angesehen, welches durch oxidativen Stress induziert wird. AcnA gilt im Vergleich zu AcnB als stabiler, hat eine höhere Affinität für das Substrat und arbeitet über einen weiten pH-Wert-Bereich optimal. Diese Eigenschaften befürworten die Wahl, AcnA im folgenden Experiment einzusetzen. Der ausschlaggebende Grund war jedoch der strukturelle Aufbau beider Homologe. Die Struktur von AcnA entspricht dem Aufbau der meisten Mitglieder der Aconitase-Enzymfamilie (siehe 1.4.4) (Prodromou *et al.*, 1992). Sie beinhaltet drei dicht gepackte N-terminale Domänen sowie eine vierte Domäne, welche durch einen Linker assoziiert ist, kurz 1-2-3-Linker-4. AcnB weist jedoch eine andere Organisation der Domänen auf. Die C-terminale Domäne 4 von AcnA stellt die N-terminale Domäne von AcnB dar. Diese ist direkt mit Domäne 1 verbunden, ein Linkerpeptid fehlt hier. Somit lässt sich der strukturelle Aufbau von AcnB als 4-1-2-3 beschreiben (Bradbury *et al.*, 1996). Da für die geplanten Experimente der C-Terminus von Interesse ist, welcher sich hier „in der Mitte“ befindet, wurde dieses Homolog nicht weiter berücksichtigt.

Die Aconitase AcnA aus *E. coli* zeigt 20-21% Identität zu Isopropylmalat-Isomerasen aus Bakterien und Pilzen (Prodromou *et al.*, 1992). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Biogenese auf gleichen Wegen erfolgen könnte. Durch Anhängen des Leu1-C-Terminus an die AcnA aus *E. coli* wurde untersucht, ob eine Aktivitätssteigerung im Hefecytosol möglich ist.

Um die Detektion der Enzymaktivität des heterologen Proteins in Hefezelleextrakt zu erleichtern, wurde das Gen überexprimiert. Es wurde ein 2 μ -Plasmid mit dem starken *FBA*-

Promotor und -Terminator gewählt (Bechtel, 2015; Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Das aus chromosomaler *E. coli*-DNA amplifizierte *acnA*-Gen wurde mittels homologer Rekombination in Hefe zwischen die Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *XhoI* kloniert. Die Fusion mit dem Leu1-C-Terminus erfolgte durch eine analoge Klonierung in den Vektor p426_FBA_Leu1CT, welcher bereits die Nucleotidsequenz, codierenden für die 30 C-terminalen Aminosäuren der IPMI aus *S. cerevisiae*, enthielt.

Δ *aco1* entspricht einem Aconitase-Deletionsstamm. Zwar verfügt *S. cerevisiae* über zwei Aconitasen, *Aco1* und *Aco2*, jedoch ist *Aco1* das Hauptenzym des Citratzyklus. *Aco2* ist ausschließlich an der Lysinbiosynthese beteiligt und katalysiert die Umwandlung von Homocitrat in Homoaconitat. Es hat nur eine geringe Affinität für Aconitat, die spezifische Enzymaktivität mit Homoaconitat ist 950-fach höher (Fazius *et al.*, 2012). Daher konnte dieses Enzym in der folgenden Versuchsreihe vernachlässigt werden. *Aco1* hingegen katalysiert die gleiche Reaktion wie die *AcnA* aus *E. coli*, die Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat. Um eine funktionelle Expression der *E. coli*-*AcnA* untersuchen zu können, muss das hefeeigene *ACO1*-Gen deletiert oder depletiert sein. Es ist jedoch zu beachten, dass die Hefe-*Aco1* in den Mitochondrien lokalisiert ist, wohingegen die *E. coli*-*AcnA* im Cytosol analysiert wird.

Die zwei konstruierten Plasmide sowie ein korrespondierendes Leerplasmid ohne Gen (\emptyset) wurden in den Hefestamm Δ *aco1* bzw. WT transformiert. Da ein Aconitase-Deletionsstamm bei Wachstum auf Glucose Glutamat-auxotroph ist, wurde das Medium mit Glutaminsäure (E) supplementiert (Gangloff *et al.*, 1990). Die Zellen wurden für 40 h in SC-Glu-E-Medium kultiviert. Anschließend wurde ein Tüpfeltest zur Analyse des Zellwachstums durchgeführt. Hierzu wurden die Zellsuspensionen auf eine $OD_{600} = 0,5$ eingestellt, seriell jeweils 1:10 verdünnt und auf SC-Glu-Agarplatten aufgebracht. Wenn ein Fe/S-Cluster in das Enzym eingebaut wird, ist dieses fähig seine Funktion der Isocitratbildung im Cytosol zu erfüllen, sodass die Zellen ohne Glutamatzugabe lebensfähig sind. Als Kontrolle diente das Wachstum auf mit E supplementierten Platten. Das Wachstum konnte nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen bei 30 °C beurteilt werden.

In Abbildung 4.38 ist deutlich zu erkennen, dass die *AcnA* aus *E. coli* nicht fähig ist, die Deletion des *ACO1*-Gens in *S. cerevisiae* zu komplementieren. Unter Supplementation mit Glutaminsäure (Kontrollplatte +E) kann der Deletionsstamm wachsen, jedoch wesentlich langsamer als der WT-Stamm. Daher wurde eine Inkubationszeit von fünf Tagen gewährt, auch wenn dies für den WT zu lange erscheint. Ohne Zugabe von Glutaminsäure und Transformation einer Plasmidkopie (\emptyset) ist kein Wachstum möglich. Bei Überexpression der *AcnA* aus *E. coli* ist lediglich ein minimales Wachstum sichtbar. Durch Anhängen des C-Terminus der Hefe-IPMI kann das Zellwachstum nicht gesteigert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die fusionierte C-terminale Verlängerung der Hefe-IPMI keinen Einfluss auf den Fe/S-Clustereinbau in die bakterielle *AcnA* hat.

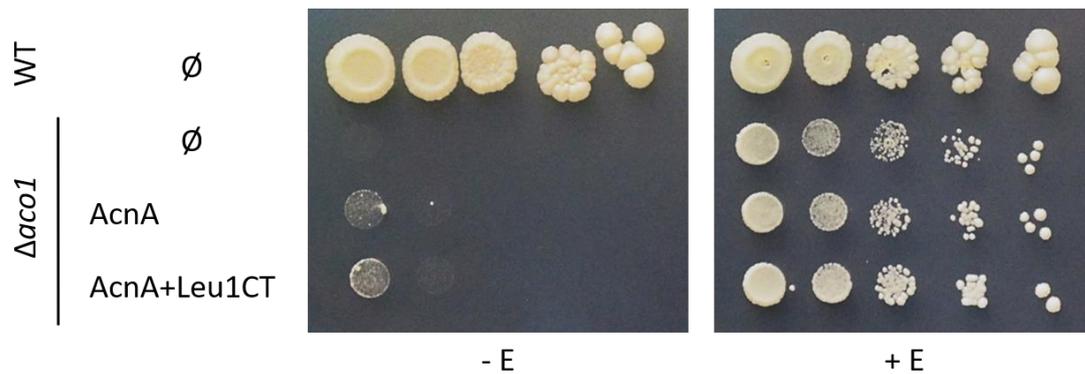


Abbildung 4.38: Tüpfeltest der AcnA aus *E. coli*: Die Fusion des Hefe-Leu1-C-Terminus steigert das Zellwachstum unter Glutamat-auxotrophen Bedingungen nicht. Das Gen *acnA* mit und ohne fusionierten *LEU1*-C-Terminus, sowie kein Gen (\emptyset), wurden auf p426-Plasmiden unter der Kontrolle des *FBA*-Promotors in den Deletionsstamm $\Deltaaco1$ bzw. WT transformiert. Nach 40-stündigem Vorwachstum in SC-Glu-E-Medium wurde, ausgehend von $OD_{600} = 0,5$, eine serielle Verdünnung (jeweils 1:10) auf Agarplatten mit und ohne Glutaminsäure-Supplementation aufgebracht. Die Inkubation erfolgte für fünf Tage bei 30 °C.

Des Weiteren wurde die Funktion der AcnA durch Messungen der Aconitase-spezifischen Aktivität in Hefegesamtzellextraktpräparaten untersucht. Die Kultivierung der verwendeten Zellen erfolgte in Anwesenheit von Glutaminsäure. Die Messungen wurden nach zwei verschiedenen Methoden durchgeführt. Bei der direkten Methode dient DL-Isocitrat als Substrat. Dabei wird die Bildung der Doppelbindung des Intermediates *cis*-Aconitat spektroskopisch verfolgt (siehe 3.4.10). Um Störungen durch andere Absorptionen im gemessenen Wellenlängenbereich auszuschließen, wurde der direkten Aconitase-spezifischen Aktivitätsmessung ein gekoppelter Enzymaktivitätstest angeschlossen. Dieser basiert auf der Kopplung mit der Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH), wobei die Bildung von NADPH photometrisch beobachtet werden kann (siehe 3.4.11). Bei allen durchgeführten Enzymaktivitätsmessungen wurde die gemessene Aktivität auf den jeweiligen Wert der mitgeführten WT-Kontrolle normiert.

Die Deletion der chromosomalen Kopie ohne rettende Plasmidkopie führt zu einem Aktivitätsverlust, siehe Abbildung 4.39. Mit der direkten Messmethode (hell dargestellt) ist keinerlei Aktivität detektierbar. Bei der indirekten Messung (dunkel dargestellt) liefert eine NADP⁺-abhängige Reaktion einen Hintergrundwert von 15 %. Mit der direkten Methode wird eine *E. coli*-AcnA-Aktivität von $0,026 \pm 0,007$ U/mg, mit der indirekten Methode von $0,037 \pm 0,004$ U/mg gemessen. Auch das AcnA-Enzym mit der C-terminalen Leu1-Verlängerung zeigt Enzymaktivität. Jedoch ergibt sich durch die Fusion mit dem Leu1-C-Terminus keine weitere Steigerung. Die Messwerte der zwei AcnA-Varianten stimmen sowohl bei der direkten, als auch bei der gekoppelten Enzymaktivitätsmessung überein. Diese Daten sprechen nicht für einen Funktionstransfer des C-terminalen Tryptophans von cytosolischen Hefeproteinen auf das heterolog exprimierte bakterielle Protein.

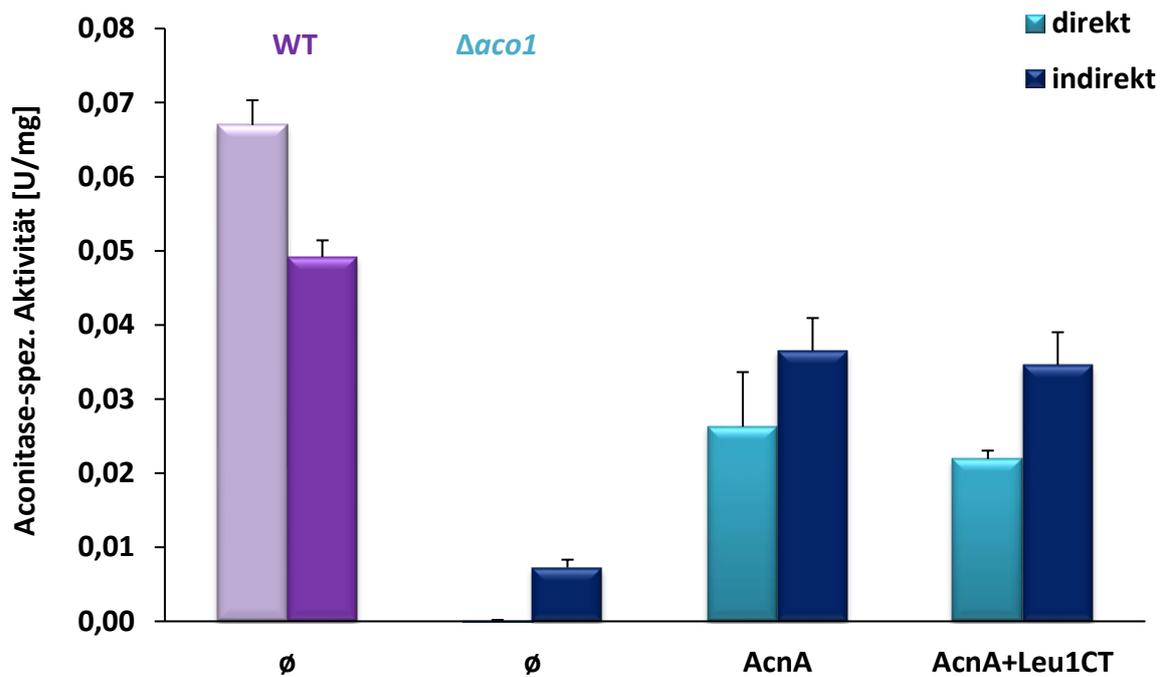


Abbildung 4.39: Aconitase-spez. Aktivitätsmessung der *E. coli*-AcnA in Hefezelleextrakt: Der Leu1-C-Terminus bringt keine Aktivitätssteigerung des bakteriellen Enzyms in Hefe. Das Gen *acnA* mit und ohne fusioniertem *LEU1*-C-Terminus, sowie kein Gen (\emptyset), wurden auf p426-Plasmiden unter der Kontrolle des *FBA*-Promotors in den Deletionsstamm $\Deltaaco1$ (blau) bzw. WT (lila) transformiert. Die Zellen wurden 40 h in SC-Glu-Medium unter Supplementation von E kultiviert. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 0,5 g Zellen aufgeschlossen. Für die direkte Aconitase-spezifische Enzymaktivitätsmessung wurden 5-10 μ l Gesamtzellextrakt eingesetzt; für die indirekte Messung jeweils 10 μ l. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten einer Messreihe wurden auf die Aktivität der WT-Kontrolle normiert. Es wurden drei einzelne Kolonien analysiert ($n=3$). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen.

4.3.2 Expression der *E. coli*-IPMI in *S. cerevisiae*

Als nächstes wurde untersucht, ob ein Hybrid, bestehend aus der IPMI aus *E. coli* und der C-terminalen Verlängerung der IPMI aus *S. cerevisiae*, funktionell in Hefe exprimiert werden kann. In Prokaryoten setzt sich das Enzym aus zwei Untereinheiten zu einem Heterodimer zusammen (Fultz & Kemper, 1981). Die Sequenzähnlichkeit zur strukturell charakterisierten Aconitase impliziert, dass die größere Untereinheit LeuC den [4Fe-4S]-Cluster trägt. Diese Untereinheit ist homolog zu den Domänen 1-3 der Aconitase-Proteinfamilie. Eine kleinere Untereinheit LeuD repräsentiert Domäne 4 und ist wichtig für die Substraterkennung (Yasutake *et al.*, 2004). Die Gene *leuC* und *leuD* werden gemeinsam mit den Genen *leuA* und *leuB* als *leu*-Operon transkribiert (Somers *et al.*, 1973).

Zunächst wurden die zwei Gene *leuC* und *leuD* in zwei verschiedene Plasmide kloniert, welche parallel in Hefe transformiert werden können (*URA3* bzw. *TRP1* Marker). Um beide Gene gleichermaßen überexprimieren zu können, mussten zuerst der *FBA*-Promotor und -Terminator, analog zu dem Plasmid p426_FBA, zwischen die Restriktionsschnittstellen

KpnI und *SacI* des Plasmides p424_TDH kloniert werden. Anschließend wurde das aus *E. coli*-DNA amplifizierte *leuC*-Gen in das Plasmid p424_FBA zwischen die Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *XhoI* kloniert. Die Klonierung von *leuD* erfolgte analog in das Plasmid p426_FBA_Leu1CT. Um ein Kontrollplasmid ohne fusionierten Leu1-C-Terminus zu erzeugen, wurde in dieses Konstrukt mittels gezielter Mutagenese ein Stopp-Codon am Ende des Gens eingefügt.

Eine Kombination des Plasmides p424_FBA_LeuC mit jeweils einer der zwei LeuD-Varianten sowie die zwei korrespondierenden Leerplasmide ohne Gen (\emptyset) wurden in den Hefestamm $\Delta leu1$ bzw. WT transformiert. Die Leu1-spezifische Aktivität wurde in Gesamtzellextraktpräparaten bestimmt. Jedoch konnte weder mit noch ohne fusionierten C-Terminus des Hefeproteins eine Aktivität detektiert werden. Da die Untereinheiten in *E. coli* gemeinsam in einem Operon exprimiert werden, wird vermutet, dass die individuelle Expression auf zwei verschiedenen Plasmiden ein Problem darstellt.

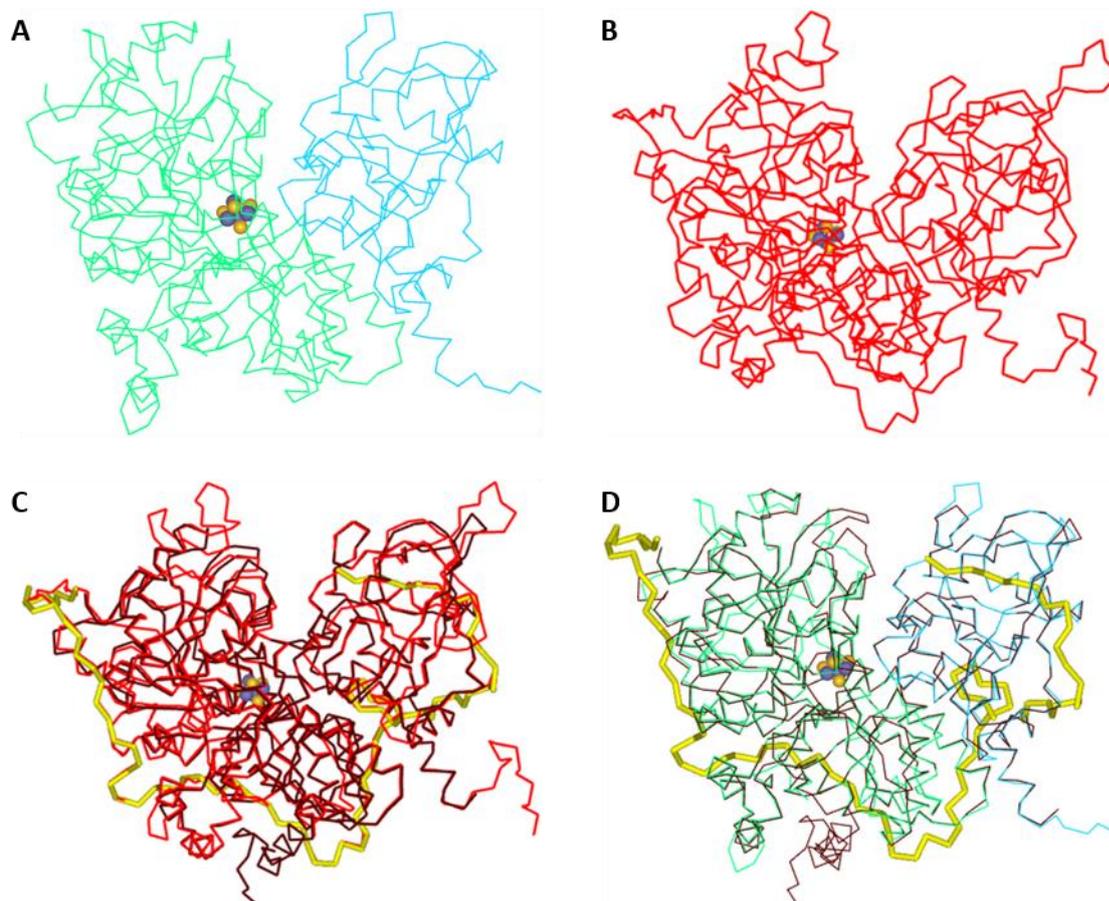


Abbildung 4.40: Strukturmodellierung der IPMI. Auf Grundlage der Kristallstruktur PDB Code: 1C96 der mitochondrialen Aconitase aus Schweineherz wurde die Struktur der IPMI aus *E. coli* und aus *S. cerevisiae* mittels Accelrys Discovery Studio modelliert. **A:** Struktur der IPMI aus *E. coli*. Die Untereinheit LeuC ist grün dargestellt, die Untereinheit LeuD hellblau. **B:** Struktur der IPMI aus *S. cerevisiae*. **C:** Struktur der IPMI aus *S. cerevisiae* (rot) im Vergleich zur Struktur der mitochondrialen Aconitase (braun). Die gelbmarkierte Sequenz (F486-K562) entspricht dem fehlenden Teil der *E. coli*-IPMI. **D:** Struktur der IPMI aus *E. coli* (LeuC grün; LeuD hellblau) im Vergleich zur Struktur der mitochondrialen Aconitase (braun).

Um dieses Problem zu beheben, wurden beide Untereinheiten fusioniert auf einem Plasmid kloniert. Damit eine korrekte Faltung gewährleistet werden konnte, wurden die zwei Gene durch einen Linker miteinander verbunden. Um die Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur nicht zu beeinträchtigen, wurde die Länge dieses Linkers an der Hefe-IPMI orientiert. Anstelle eines Glycin-Serin-Linkers, wurde sich dazu entschlossen, auf die Linkersequenz des Homologs aus *S. cerevisiae* zurückzugreifen (siehe Abbildung 1.5, Seite 13). Bisher gibt es in PDB keine Strukturdaten einer monomeren IPMI (Berman *et al.*, 2000). Daher muss auf eine Kristallstruktur der mitochondrialen Aconitase aus Schweineherz zurückgegriffen werden (PDB Code 1C96) (Lloyd *et al.*, 1999). Eine Kristallstruktur der [3Fe-4S]-Cluster-Form identifiziert die Reste 514-537 als Linkerpeptid zwischen den Domänen 3 und 4 (Robbins & Stout, 1989b). Auf Grundlage dieser Daten wurden sowohl die Struktur der IPMI aus *E. coli* als auch aus *S. cerevisiae* mittels Accelrys Discovery Studio modelliert. Domäne 3 entspricht hierbei dem C-terminalen Teil von LeuC und Domäne 4 entspricht LeuD. Abbildung 4.40 stellt die modellierten Strukturen der IPMI aus *E. coli* und *S. cerevisiae* dar. Es fällt auf, dass sich der Linker, welcher die zwei Untereinheiten in einem monomeren Protein verknüpft, einmal um das Protein herum windet (gelbe Markierung **C**, **D**). Mit Hilfe dieser Erkenntnis wurde sich dazu entschieden, die Aminosäuren 481-543 der IPMI aus *S. cerevisiae* als Linker zwischen LeuC und LeuD einzusetzen.

Um die *E. coli*-Gene *leuC* und *leuD* auf einem Plasmid mit der Sequenz der Aminosäuren 481-541 der IPMI aus *S. cerevisiae* zu hybridisieren, wurde auf das Plasmid p426_FBA_LeuD_Leu1CT zurückgegriffen. Da dieses Plasmid zwischen dem Promotor und dem Gen LeuD lediglich über die Restriktionsschnittstelle *SpeI* verfügt, wurde zur Klonierung die Methode der Overlap Extension angewandt. Diese Methode stellt eine Weiterentwicklung einer üblichen Mutagenese-Reaktion dar und kann auch zum Klonieren ganz ohne Restriktion eingesetzt werden (Geiser *et al.*, 2001; Bryksin & Matsumura, 2010). Overlap Extension ist eine PCR-basierte Methode, um DNA-Sequenzen zu fusionieren (Horton *et al.*, 1990). Es werden vier DNA-Primer benötigt: zwei „Endprimer“ analog derer zur klassischen Klonierung und zwei chimere Oligonucleotide, deren 5'-Ende der Sequenz des zu verknüpfenden Gens entspricht. Beide Gene werden separat voneinander mit den entsprechenden Oligonucleotiden amplifiziert, wodurch an einem Ende jedes Produktes eine Sequenz entsteht, welche dem zweiten Gen entspricht. In einer zweiten PCR werden die beiden aufgereinigten PCR-Produkte ohne Zugabe von Oligonucleotiden kombiniert. Hierbei hybridisiert der Leitstrang des einen PCR-Produktes mit dem Folgestrang des anderen (Overlap), was einen großen Primer darstellt, sodass die Produkte der ersten PCR um die Sequenz des zweiten Gens verlängert werden (Extension) (Matsumura, 2013). In einer dritten PCR wird das Fusionsgen der zweiten PCR mit den zwei Endprimern erneut amplifiziert, um eine ausreichende Menge sauberen Produktes zu generieren. Hier wurde diese Methode durchgeführt, um LeuC und den Leu1-Linker zu fusionieren und an der *SpeI*-Restriktionsschnittstelle in das Plasmid p426_FBA_LeuD_Leu1CT zu integrieren. Dabei war

es wichtig in der zweiten PCR eine äquimolare Menge der beiden ersten PCR-Produkte einzusetzen. Um eine Selbstligation des Vektors zu verhindern, wurde dieser nach dem Restriktionsverdau mit Antarctic Phosphatase behandelt. Auch in dieses Konstrukt wurde mittels gezielter Mutagenese ein Stopp-Codon am Ende des *leuD*-Gens inseriert.

Die zwei Plasmide (mit und ohne Leu1-C-Terminus) wurden in den $\Delta leu1$ -Stamm transformiert und die Leu1-spezifische Aktivität in Gesamtzellextraktpräparaten bestimmt. Das fusionierte Konstrukt (-) zeigt im Vergleich zur individuellen Expression der zwei *E. coli*-Untereinheiten eine geringe Enzymaktivität in Hefezellextrakt von $0,033 \pm 0,008$ U/mg, siehe Abbildung 4.41. Durch Anhängen der C-terminalen Verlängerung des *S. cerevisiae*-Homologs (nAS₂₇+QDW) kann diese Aktivität mehr als sechsfach (nach Abzug des Hintergrundes) auf $0,115 \pm 0,011$ U/mg gesteigert werden.

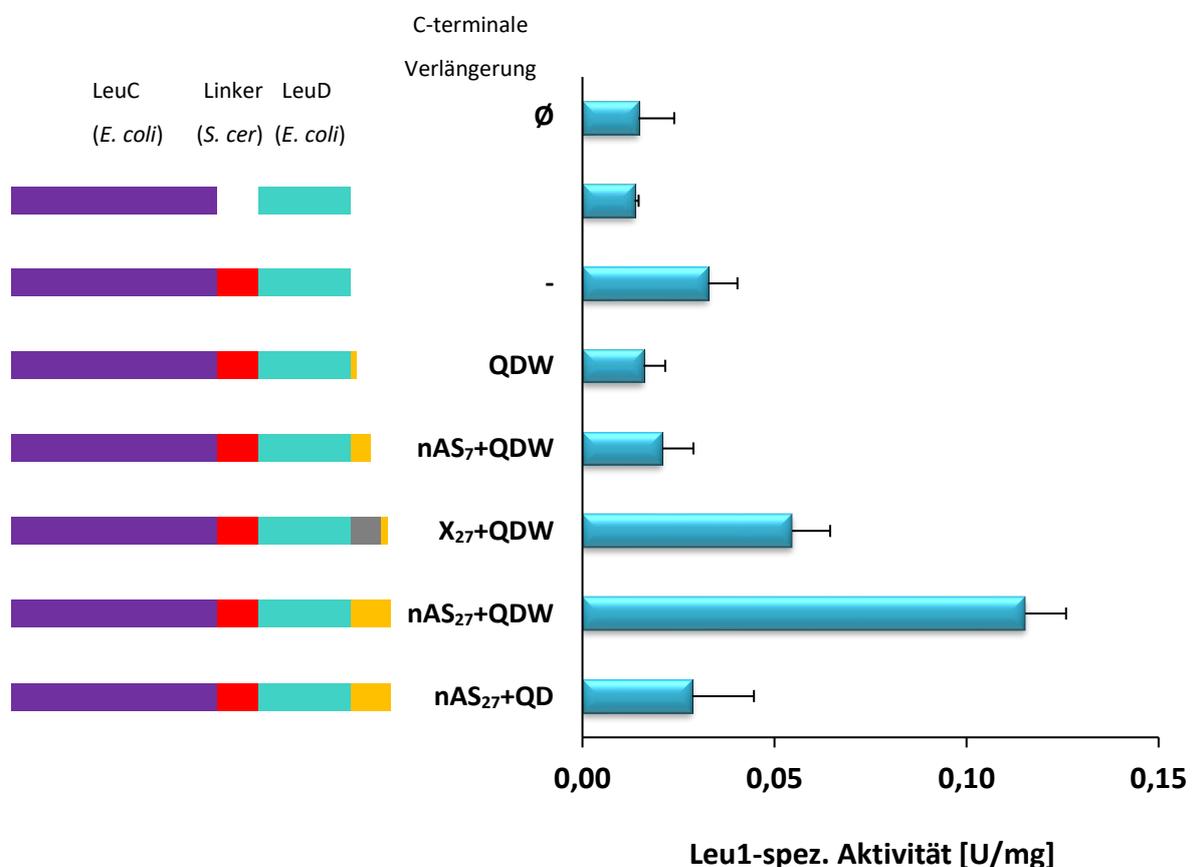


Abbildung 4.41: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der *E. coli*-IPMI in Hefezellextrakt: Das Anhängen des Leu1-C-Terminus führt zu einer sechsfachen Steigerung der Enzymaktivität.

Die auf einem Plasmid durch einen Linker (*S. cerevisiae*-Leu1 AS 481-543) verbundenen *E. coli*-Gene *leuC* und *leuD* mit verschiedenen C-terminalen Verlängerungen, wurden auf p426-Plasmiden unter der Kontrolle des *FBA*-Promotors in den Deletionsstamm $\Delta leu1$ transformiert. Die Zellen wurden 40 h in SC-Glu-Medium kultiviert. Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 0,5 g Zellen aufgeschossen. Für die Leu1-Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 3 μ l Gesamtzellextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten einer Messreihe wurden auf die Aktivität des Zellextraktes mit dem transformierten Plasmid p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_Leu1CT normiert. Es wurden mindestens sechs einzelne Kolonien aus zwei unabhängigen Hefetransformationen analysiert (n=6). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messreihen.

Nachdem das Anfügen der 30 Aminosäuren die Enzymaktivität so bedeutend verbessern konnte, wurde im Folgenden analysiert, welche dieser Reste für diesen Anstieg essenziell sind. Es wurde untersucht, ob bereits eine Verlängerung um das C-terminale Tripeptid ausreicht, um den Clustereinbau zu optimieren oder ob die Länge von 30 Aminosäuren eine Rolle spielt. Zum einen wurde ein Plasmid konstruiert, bei dem lediglich die drei Reste QDW an den C-Terminus von LeuD fusioniert wurden (QDW). Mittels gezielter Mutagenese erfolgte der Einbau der drei Aminosäuren sowie eines anschließenden Stopp-Codons in den Vektor p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_Leu1CT. Zum anderen wurde ein Plasmid kloniert, welches eine Verlängerung des Fusionsproteins um die zehn C-terminalen Aminosäuren des *S. cerevisiae*-Leu1 beinhaltet (nAS₇+QDW). Hierzu wurde der Vektor p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_Leu1CT mit Primern amplifiziert, welche eine *Xho*I-Schnittstelle an beiden Enden des PCR-Produktes erzeugen. Dieses Produkt wurde verdaut und wieder ligiert, wodurch ein neues Plasmid erzeugt wurde, bei welchem die Sequenz für 20 der 30 Aminosäuren des Leu1-C-Terminus fehlen. Als drittes Untersuchungsobjekt diente ein Plasmid mit einer C-terminalen Verlängerung von 30 Aminosäuren, wobei diese nicht der Sequenz des Hefe-Leu1-C-Terminus entsprechen (X₂₇+QDW). Ein synthetisches Gen, codierend für eine Sequenz von 25 Aminosäuren aus Glycin- und Serinresten (GSS-Linker), die drei Aminosäuren QDW und den *FBA*-Terminator wurde so gestaltet, dass es zwischen die Restriktionsschnittstellen des Vektors p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_Leu1CT kloniert werden konnte.

Diese drei Plasmide wurden ebenfalls in den Δ *leu1*-Stamm transformiert und die Leu1-spezifische Aktivität in Hefezelleextrakt analysiert. Die Konstrukte QDW und nAS₇+QDW zeigen deutlich weniger Enzymaktivität als das Fusionsprotein ohne eine C-terminale Verlängerung. Die Messwerte entsprechen dem Hintergrundniveau. Durch Anhängen einer beliebigen Linker-Sequenz und dem C-terminalen Tripeptid (X₂₇+QDW) konnte die Aktivität wiederum auf $0,055 \pm 0,010$ U/mg gesteigert werden. Dies entspricht dem Dreifachen des einfachen Fusionsproteins und der Hälfte der Enzymaktivität des besten Konstruktes mit dem vollständigen *S. cerevisiae*-Leu1-C-Terminus.

Es ist auffällig, dass die Konstrukte QDW und nAS₇+QDW im Vergleich zu der Variante ohne jegliche Verlängerung, keine Aktivität zeigen. Um ein Übergehen des Stopp-Codons des Plasmides ohne Verlängerung (Leu1-C-Terminus ist durch ein TAA-Stopp-Codon abgetrennt (LeuD_Stop_nAS₂₇QDW_Stop)) auszuschließen, was eine Expression des vollständigen C-Terminus bedeuten würde, wurden als Kontrolle zwei weitere TAG-Stopp-Codons mittels gezielter Mutagenese in 3'-Richtung des ersten Stopp-Codons inseriert. Die Aktivitäten dieser zwei Plasmide (ein bzw. drei Stopp-Codons) sind identisch, sodass die Werte beider gemittelt wurden und als ein Balken (-) in Abbildung 4.41 zu sehen sind. Somit kann ein Read-through als Grund für die höhere Aktivität dieses Plasmides im Vergleich zu dem Anhängen von drei bzw. zehn Aminosäuren ausgeschlossen werden.

Um auch hier die Bedeutung des C-terminalen Tryptophans zu prüfen, wurde dieses durch gezielte Mutagenese in Plasmid p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_Leu1CT deletiert (nAS₂₇+QD). Die Leu1-spezifische Aktivitätsmessung in Zellextrakt der mit diesem Plasmid transformierten $\Delta leu1$ -Zellen zeigt eine Abnahme um 75 % auf $0,029 \pm 0,016$ U/mg. Somit geht ein Großteil des Aktivitätsgewinns der Fusion des Leu1-C-Terminus durch Mutation einer einzigen Aminosäure wieder verloren. Diese Ergebnisse belegen, dass durch Fusion der C-terminalen Verlängerung des Homologs aus *S. cerevisiae* an die *E. coli*-IPMI der Fe/S-Clustereinbau um das Sechsfache gesteigert werden kann. Somit ist ein Funktionstransfer dieser Sequenz von cytosolischen Hefeproteinen auf zumindest dieses prokaryotische Protein möglich. Dabei ist das C-terminale Tryptophan der Sequenz essentiell. Dieses Experiment zeigt auch, dass der Abstand zwischen dem natürlichen C-Terminus des bakteriellen Fe/S-Proteins und dem angefügten Tryptophan von Bedeutung ist.

Im Folgenden musste geklärt werden, ob der Funktionsgewinn durch Anhängen des Leu1-C-Terminus im Zusammenhang zur CIA-Maschinerie steht. Hierzu wurde als erstes überprüft, ob die Expression der *E. coli*-IPMI im Cytosol stattfindet oder ob das Hybridprotein möglicherweise in die Mitochondrien importiert wird. Um die Lokalisation des Proteins zu analysieren, wurde eine Mitochondrienpräparation durchgeführt. Die mit dem Plasmid p426_FBA_LeuC_Leu1LK_LeuD_Leu1CT transformierten $\Delta leu1$ -Zellen wurden in einer galactosehaltigen 2I-Kultur herangezogen (siehe 3.3.5). Nach der Ernte wurden 0,5 g Zellen als Kontrolle des Gesamtzellextraktes entnommen. Aus den übrigen Zellen wurden die Mitochondrien isoliert. Die cytosolische Fraktion wurde ebenfalls separiert. Die Lokalisation des Enzyms in den Fraktionen wurde durch Leu1-spezifische Aktivitätsmessung untersucht.

Die Gesamtzellextraktpräparation der vor der Mitochondrienpräparation entnommenen Zellen dient als Kontrolle (es wurden Triton X-100-freie Puffer verwendet). Diese zeigt Leu1-spezifische Aktivität, siehe Abbildung 4.42 **A**, sodass die Expression des Enzyms in den für die Lokalisation verwendeten Zellen belegt ist. Die etwas geringere Leu1-Aktivität des Fusionskonstruktes von $0,084 \pm 0,010$ U/mg bei dieser Kontrolle im Vergleich zu den $0,115 \pm 0,011$ U/mg der Gesamtzellextraktpräparation von Zellen, welche nach der üblichen Methode geerntet wurden, lässt sich durch die veränderten Wachstums- und Erntebedingungen der Hefezellen erklären (z. B. andere Puffer). Die isolierten (geplatzen) Mitochondrien hingegen weisen nur $0,004 \pm 0,004$ U/mg Leu1-Enzymaktivität auf. Um die Unversehrtheit der isolierten Mitochondrien zu demonstrieren, wurde die SDH-spezifische Aktivität gemessen (siehe 3.4.12). Der hohe Messwert von $0,282 \pm 0,042$ U/mg deutet auf erfolgreiche Anreicherung der Mitochondrien hin. Diese Messungen verdeutlichen, dass das prokaryotische Enzym nicht in die Mitochondrien importiert wurde.

Als Kontrolle der Fraktionierung wurde eine Immundetektion mittels Western Blot durchgeführt. Die Proteine Mia40 (*mitochondrial intermembrane space Import and Assembly*), Cia1 und SOD1 (Superoxid-Dismutase) wurden dabei als Marker für die

verschiedenen Kompartimente verwendet. Mia40 stellt ein Protein des mitochondrialen Intermembranraums dar, wo es am Import und der Assemblierung von Proteinen beteiligt ist. Bei einer SDS-PAGE und somit auch im Western Blot läuft das Protein untypisch, sodass die Bande anstatt bei 44 kDa bei einem Molekulargewicht von 58 kDa detektiert wird. Entsprechend der Erwartung wurde Mia40 ausschließlich in der mitochondrialen Fraktion beobachtet, siehe Abbildung 4.42 **B**. Als Marker der cytosolischen Fraktion wurde auf Cia1 zurückgegriffen. Auf Grund des geringen Expressionsniveaus sind nur schwache Banden in der cytosolischen Fraktion, sowie in der Zellextrakt-Kontrolle zu sehen. Das Superoxid-detoxifizierende Enzym SOD1 ist hauptsächlich im Cytosol aber auch in den Mitochondrien lokalisiert. Im Western Blot ist es somit in allen drei analysierten Fraktionen mit einer Bande bei ca. 16 kDa vertreten. Diese Analyse bestätigt die korrekte Fraktionierung.

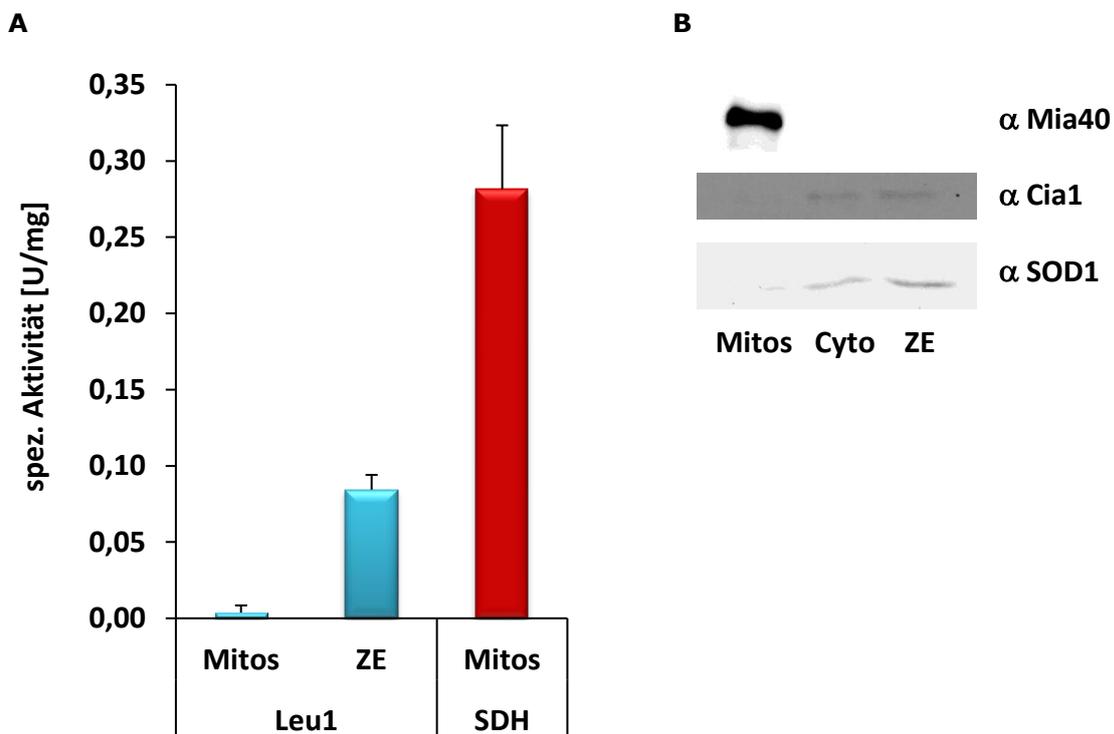


Abbildung 4.42: Leu1- und SDH-spez. Aktivitätsmessung isolierter Mitochondrien: Die IPMI aus *E. coli* ist im Cytosol von Hefezellen lokalisiert. A Enzymaktivitätsmessung: Die Leu1-spezifische Enzymaktivität wurde sowohl in (geplatzen) isolierten Mitochondrien (in Triplikaten jeweils 10 μ l) als auch in einer Gesamtzellextraktpräparation gemessen (in Triplikaten jeweils 3 μ l). Von isolierten Mitochondrien wurde auch die SDH-spezifische Enzymaktivität bestimmt (in Triplikaten jeweils 10-20 μ g). Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Bradford-Methode in Triplikaten bestimmt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der gemittelten Messwerte von zwei unabhängigen Mitochondrienpräparationen (n=2). **B Western Blot:** Die Kontrolle der Fraktionierung erfolgte durch Immundetektion unter Verwendung spezifischer Antikörperseren gegen Mia40 (44 kDa, bei SDS-PAGE lokalisiert bei 58 kDa, Mitochondrien), Cia1 (37 kDa, Cytosol) und SOD1 (16 kDa, Mitochondrien und Cytosol). Abkürzungen: Mitos = Mitochondrien, ZE = Zellextrakt, Cyto = Cytosol. Die cytosolische Fraktion wurde zum Aufkonzentrieren mit TCA gefällt.

Als zweites wurden Δ leu1-Deletionsstämme hergestellt, in welchen die CIA- bzw. ISC-Faktoren *CFD1*, *NAR1* und *CIA1* bzw. *NFS1* durch Zugabe von Glucose depletiert werden

können. Diese Stämme wurden unter meiner Anleitung im Rahmen einer Bachelorarbeit von Frau Stephanie Akua Dittrich-Motzki erzeugt (Dittrich-Motzki, 2016). Mittels homologer Rekombination wurde die chromosomale *LEU1*-Kopie in den Hefestämmen Gal_NFS1, Gal_CFD1, Gal_NAR1 und Gal_CIA1 durch die *Nat*-Kassette ersetzt. Durch Zugabe von Nourseothricin konnten die erfolgreich rekombinierten Klone selektiert werden. Die Korrektheit der hergestellten Hefestämme wurde mittels PCR, Leu1-spezifischer Aktivitätsmessung und Wachstumskontrolle unter verschiedenen Bedingungen überprüft (siehe Dittrich-Motzki, 2016).

Das *E. coli* LeuCD-Fusionskonstrukt wurde mit und ohne C-terminale Verlängerung in die regulierbaren $\Delta leu1$ -Stämme transformiert. Einzelne Kolonien wurden auf galactosehaltigen SC-Agarplatten bei 30 °C vermehrt. Die Depletion der chromosomalen CIA-Faktoren erfolgte durch Kultivierung der Zellen für 40 h in glucosehaltigem SC-Medium. Um den ISC-Faktor *NFS1* herunterzuregulieren, war eine Kultivierung in glucosehaltigem SC-Medium von 16 h ausreichend. Die Leu1-spezifische Aktivität wurde in Gesamtzellextraktpräparaten bestimmt.

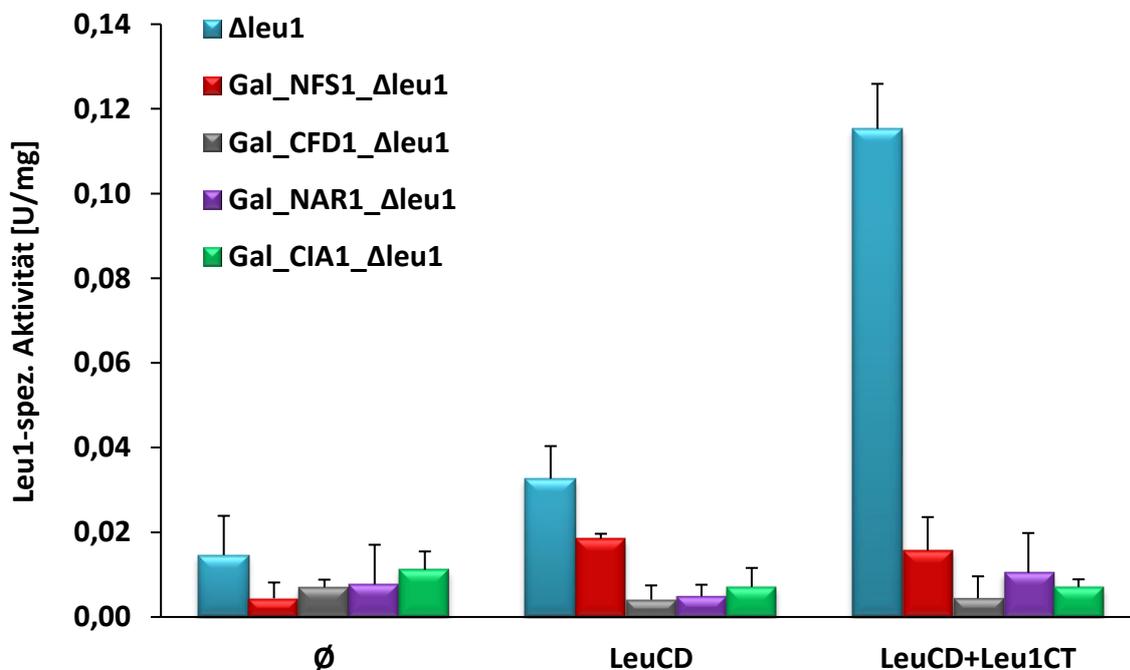


Abbildung 4.43: Leu1-spez. Aktivitätsmessung der *E. coli*-IPMI bei CIA-Depletion: Der Fe/S-Clustereinbau in die *E. coli*-IPMI ist abhängig von der CIA-Maschinerie. Die auf einem Plasmid durch einen Linker (*S. cerevisiae* Leu1 AS 481-543) verbundenen *E. coli*-Gene *leuC* und *leuD* mit und ohne fusionierten *LEU1*-C-Terminus, sowie kein Gen (Ø), wurden auf p426-Plasmiden unter der Kontrolle des *FBA*-Promotors in die Deletionsstämme $\Delta leu1$, Gal_NFS1_Δleu1, Gal_CFD1_Δleu1, Gal_NAR1_Δleu1 und Gal_CIA1_Δleu1 transformiert. Um die chromosomale Kopie des jeweiligen CIA-Faktors zu depletieren, wurden die Zellen 40 h in glucosehaltigem SC-Medium kultiviert (Gal_NFS1_Δleu1 16 h). Zur Gesamtzellextraktpräparation wurden 0,5 g Zellen aufgeschossen. Für die Leu1-Enzymaktivitätsmessung wurden jeweils 3 μl Gesamtzellextrakt eingesetzt. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels Micro-Biuret-Methode in Duplikaten bestimmt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dreier unabhängiger Messungen einzelner Kolonien (n=3).

Abbildung 4.43 stellt die gemessenen Enzymaktivitäten in den verschiedenen regulierbaren Stämmen dar. Die Werte des Deletionsstammes $\Delta leu1$ wurden bereits in Abbildung 4.41 gezeigt und werden hier wiederholt, um einen einfachen Vergleich mit den weiteren Stämmen zu ermöglichen. Das Protein Nfs1 ist als Bestandteil der ISC-Maschinerie an der Assemblierung aller Fe/S-Proteine in Eukaryoten beteiligt. Die Cystein-Desulfurase generiert die Schwefel-Spezies, aus welcher die Fe/S-Cluster aufgebaut sind. Das Ausschalten dieses Gens blockiert sowohl die mitochondriale ISC- als auch die cytosolische CIA-Maschinerie und dient hier als Kontrolle. Erwartungsgemäß führt die Depletion dieses Gens zu einem Aktivitätsverlust der *E. coli*-IPMI. Um nun einen Zusammenhang zur CIA-Maschinerie herstellen zu können, muss auch die Depletion von Bestandteilen dieser Maschinerie in einem Aktivitätsverlust resultieren. Mit *CFD1* wurde ein Faktor der frühen Maschinerie, mit *CIA1* der späteren Maschinerie und mit *NAR1* der Faktor, welcher die zwei Abschnitte verbindet, ausgewählt. Die individuelle Herunterregulation aller drei Gene hat einen Funktionsverlust der *E. coli*-IPMI zur Folge. Die Messwerte liegen im Bereich des Hintergrundwertes. Diese Resultate zeugen von der Abhängigkeit des Fe/S-Clustereinbaus in die *E. coli*-IPMI, sowohl mit als auch ohne fusionierten Leu1-C-Terminus, durch die CIA-Maschinerie.

5. Diskussion und Ausblick

5.1 Ist L(D/E)W eine C-terminale Signalsequenz?

Protein-Protein-Interaktionen (PPI) sind entscheidend auf allen Ebenen der zellulären Funktion (Brückner *et al.*, 2009). Ein Netzwerk aus interagierenden Proteinen (das Interaktom) bildet die Grundlage der Zellarchitektur, für den Metabolismus, Signalwege und die Verfügbarkeit zellulärer Energie. Spezifische physikalische Interaktionen regulieren alle physiologischen Prozesse, von der Zellteilung bis zum Zelltod (van Roey *et al.*, 2014). Schätzungsweise erfüllen über 80% aller Proteine ihre Funktion nicht alleine, sondern in Komplexen (Berggård *et al.*, 2007). Betrachtungen des Interaktoms von *S. cerevisiae* zeigen eine durchschnittliche Anzahl von neun Interaktionspartnern je Protein (Russell *et al.*, 2004).

PPI werden in der Literatur, abhängig von deren Eigenschaften, in verschiedene Typen unterteilt (Nooren & Thornton, 2003). Werden sie auf Grund ihrer Zusammensetzung beurteilt, wird zwischen homo- und heterooligomeren Verbindungen unterschieden. Erfolgt die Einteilung nach Stabilität, wird zwischen obligaten Komplexen, deren Interaktionspartner alleine nicht stabil sind und nicht-obligaten Komplexen, welche auch unabhängig voneinander existieren können, differenziert. Als drittes Merkmal wird die Persistenz herangezogen: Permanente Interaktionen bilden einen stabilen Komplex, wohingegen transiente Bindungen assoziieren und wieder dissoziieren (Nooren & Thornton, 2003).

Die K_D -Werte biologischer Prozesse überspannen zwölf Größenordnungen (Vaynberg & Qin, 2006; Perkins *et al.*, 2010; Nooren & Thornton, 2003). Schwache, transiente Interaktionen weisen eine Lebensdauer von Sekunden und eine Dissoziationskonstante im mikromolaren Bereich auf. Permanente Interaktionen haben eine K_D im nanomolaren Bereich (Perkins *et al.*, 2010).

Die Kommunikation innerhalb dieses Netzwerkes wird durch Bindemotive vermittelt, welche in der Proteinsequenz eingebettet sind (van Roey *et al.*, 2014). Lange wurde angenommen, dass große strukturelle Domänen für eine PPI nötig sind. Es gibt zwar einen Zusammenhang zwischen der Größe des Bindemotives und der Stärke der Interaktion, aber das Spektrum des Interaktoms reicht von globulären Domänen über intrinsisch ungeordnete Regionen zu kurzen Peptidmotiven (zwei bis sieben Aminosäuren). Die Anzahl bekannter PPI mit einer Schnittstelle ohne gut ausgebildete Tertiärstruktur nimmt immer weiter zu (Davey *et al.*, 2012). Eine konservative Schätzung gelangt zu einer Größenordnung von 132.000 möglichen Peptidbindemotiven im humanen Proteom (Tompa *et al.*, 2014). Für 15%-40% aller Interaktionen könnten *Short linear motifs* (SLiMs) verantwortlich sein (Perkins *et al.*, 2010).

Bindemotive sind definiert als kleine, autonome Einheiten, die durch Interaktion mit einem anderen Biomolekül eine regulatorische, enzymatische oder Erkennungs-Funktion ausführen

(van Roey *et al.*, 2014). SLiMs (auch bezeichnet als ELMs (*eukaryotic linear motifs*) oder MoRFs (*molecular recognition features*)) sind durchschnittlich sechs bis sieben Aminosäuren lang, jedoch sind nur drei bis vier dieser Positionen essentiell für die Bindung (Tompa *et al.*, 2014). Das Motiv befindet sich oft in ungeordneten Regionen des Proteins, erst nach Bindung an den Interaktionspartner wird eine Sekundärstruktur ausgebildet. Dies wird durch sekundäre Kontakte der flankierenden Reste des Peptidmotives unterstützt (Perkins *et al.*, 2010). Funktionelle SLiMs zeigen ein höheres Maß an Konservierung als die umgebenden Reste. Auf Grund der kleinen Anzahl beteiligter Reste, bzw. benötigter Mutationen, neigen sie zu konvergenter Evolution. Sie können evolutionär *de novo* schnell erscheinen oder auch wieder verschwinden (Davey *et al.*, 2012). Im Vergleich zu globulären Domänen sind Peptidmotive zwischen den Spezies weniger konserviert. Trotzdem übernehmen SLiMs eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse. Damit einhergehend können Dysfunktionen und Mutationen in den Peptidsequenzen auch zu Krankheiten führen (van Roey *et al.*, 2014). Auf Grund der begrenzten Bindungsfläche, bilden SLiMs die Klasse mit den schwächsten PPI. Die Interaktionen sind transient mit einer geringen Affinität (van Roey *et al.*, 2014).

SLiMs werden auf Basis ihrer Funktion in zwei Gruppen eingeteilt. Zum einen vermitteln sie als Ligand-Motiv eine Bindung, zum anderen dienen sie als Erkennungssequenz für posttranslationale Modifizierungen (PTM) (van Roey *et al.*, 2014). Des Weiteren können Ligand-Motive in Docking-, Degradations-, Transport-, Verankerungs- und Komplex-Assemblierungs-Motive unterteilt werden. PTM-Motive wiederum unterscheiden sich in Additions-, Spaltungs- und strukturelle Modifikations-Motive.

Könnte das in bioinformatischen Studien von Prof. A. J. Pierik identifizierte C-terminale Tripeptid L(D/E)W (siehe 1.5) ein SLiM zur Erkennung cytosolischer Fe/S-Proteine sein? Wie reguliert eine eukaryotische Zelle, bei einem Vorkommen von 6.000 - 30.000 Genen, den Clustereinbau in 25 - 40 cytosolische und nucleäre Fe/S-Proteine? Heute gibt es einen guten Einblick in die Funktionsweise der Fe/S-Clusterbiogenese. Es sind bereits über 30 Komponenten der verschiedenen Maschinerien in Eukaryoten identifiziert (17 Mitglieder der ISC-, drei der ISC-Export- und elf der CIA-Maschinerie), das grundlegende Prinzip wird allgemein akzeptiert (Lill *et al.*, 2015b). Die Frage nach der Erkennung der Apoproteine durch die jeweilige Maschinerie bleibt jedoch weitestgehend unbeantwortet.

Einen ersten Schritt, um Licht ins Dunkel zu bringen, machten Maio *et al.* 2014, indem sie eine Verbindung zwischen der mitochondrialen ISC-Maschinerie und einem konservierten LYR-Motiv (LYRM) in Targetproteinen herstellten (Lane *et al.*, 2014; Maio *et al.*, 2014). Proteine mit dem Tripeptid Leucin-Tyrosin-Arginin nahe dem N-Terminus werden in der LYRM-Proteinfamilie zusammengefasst (Punta *et al.*, 2012). Auf der Grundlage von bioinformatischen Analysen wurde das Motiv als ein Tripeptid, bestehend aus einer aliphatischen hydrophoben, gefolgt von einer aromatischen und einer positiv geladenen

Aminosäure definiert (Maio & Rouault, 2015). Nach ca. 25 Aminosäureresten folgt ein konserviertes Phenylalanin, dessen Rolle jedoch kontrovers diskutiert wird (Angerer, 2015). Proteine dieser Familie kommen ausschließlich in Eukaryoten vor und dort hauptsächlich in den Mitochondrien. Im humanen Genom sind elf Mitglieder bekannt. Darunter sind LYRM3 und LYRM6 als Untereinheiten des Komplexes I der Atmungskette oder ISD11 (LYRM4), ein Faktor der Fe/S-Clusterbiogenese, welcher mit der Cystein-Desulfurase ISCS (in Hefe Nfs1) einen stabilen Komplex bildet (Angerer, 2013; Shi *et al.*, 2009). In einem Y2H-Screening konnten LYR-Proteine als Bindungspartner des Cochaperons HSC20 der mitochondrialen Fe/S-Clusterbiogenese nachgewiesen werden (Maio *et al.*, 2014). Es wird angenommen, dass das Tripeptid als molekulare Erkennungssequenz für die Bindung dient und somit die Übertragung des Fe/S-Clusters von dem Gerüstprotein ISCU ermöglicht. Auf diese Weise ließe sich auch die Notwendigkeit zweier Assemblierungsfaktoren Sdh6 und Sdh7 (beides LYR-Proteine) für die Reifung der Untereinheit Sdh2 (enthält drei Fe/S-Cluster) der Succinat-Dehydrogenase erklären (Na *et al.*, 2014). Trotzdem steht die Bedeutung des LYR-Motives auf Grund der sehr hohen Frequenz in eukaryotischen Zellen noch zur Diskussion. Von 20.213 humanen Proteinen haben 10.478 eine [ILPV]-[FY]-[KR]-Sequenz. In Hefe (6.002 Proteine) kommt dieses Motiv 3.362-mal vor (Prof. A. J. Pierik, persönliche Mitteilung).

Die Komponenten der ISC- und CIA-Maschinerie sind strukturell nicht verwandt. Jedoch verläuft die Biogenese nach ähnlichen Prinzipien (Lill, 2009). Wenn bei der mitochondrialen ISC-Maschinerie der Fe/S-Clustereinbau in Apoproteine mit deren SLiM LYR in Verbindung steht, ist solch eine Erkennungssequenz auch bei der CIA-Maschinerie denkbar.

Die auffällige Sequenz L(D/E)W befindet sich am äußersten C-Terminus mehrerer cytosolischer und nucleärer Fe/S-Proteine. Dies stellt einen Hinweis auf eine regulatorische oder erkenntungsdienliche Funktion dar, da die Zusammensetzungen der N- und C-Termini von Polypeptidketten nicht zufällig sind (Berezovsky *et al.*, 1999). Früher wurden den C-Termini von Proteinen allgemein eine Bedeutung bei der Translation zugesprochen. Es wurde angenommen, dass die letzten Aminosäuren der Polypeptidketten während der Termination mit Freisetzungsfaktoren interagieren (Björnsson *et al.*, 1996). Heute ist bekannt, dass die Carboxy-Termini von Proteinen sehr gut geeignet sind, um biologisch wichtige Funktionen, wie die Regulation der Proteinsortierung oder posttranslationaler Modifizierungen, zu erfüllen (Austin *et al.*, 2007). Als einzigartige Erkennungssequenzen vermitteln sie statische oder dynamische Interaktionen mit anderen Proteinen oder weiteren Biomolekülen (Chung *et al.*, 2002). Die Bindung einer kurzen, extremen C-terminalen Sequenz ermöglicht einem Gerüstprotein oder Rezeptor die Interaktion mit einem Targetprotein ohne dessen Struktur oder Funktion zu stören (Ye & Zhang, 2013).

Das bekannteste C-terminale Peptidmotiv ist das peroxisomale Targeting-Signal 1 (PTS1(SKL)). Für den Transport von nucleär codierten und cytosolisch synthetisierten Proteinen in Organellen wie Mitochondrien, Chloroplasten oder Peroxisomen sind spezielle

Import-Maschinerien nötig (Panigrahi *et al.*, 2015). Die posttranslationale Translokation durch die Organellmembran wird durch Signalsequenzen innerhalb der Aminosäuresequenz der Polypeptidkette vermittelt. Diese Zielsequenzen sind häufig N-terminal eines Proteins zu finden und interagieren mit einem Rezeptor an der Organelloberfläche (Kunze & Berger, 2015). Gould *et al.* identifizierten mit Genfusionsexperimenten ein peroxisomales Targeting-Signal am C-Terminus peroxisomaler Proteine aus verschiedenen eukaryotischen Organismen (Gould *et al.*, 1988). Dabei fungiert das Tripeptid Serin-Lysin/Histidin-Leucin (SKL) als das essentielle Element. Dieses wird durch die TPR (*tetratricopeptid repeat*)-Domäne des Rezeptors Pex5 (Peroxin) erkannt (Brocard *et al.*, 1994; Gatto *et al.*, 2000). Interaktionsstudien mit Pex5 und einem seiner Targetproteine Pcs60 (Oxalyl-CoA-Synthetase) weisen auf einen zweistufigen Bindungsmodus hin. Auf den ersten Kontakt durch das Tripeptid mit hoher Affinität folgt ein zweiter Kontakt mit geringerer Affinität durch angrenzende Aminosäuren, sodass die Stärke der Bindung erhöht wird (Hagen *et al.*, 2015). Auf Grund des Einflusses der Aminosäuren aufwärts des C-terminalen Tripeptides sollte PTS1 als Dodekamer angesehen werden (Brocard & Hartig, 2006; Neuberger *et al.*, 2003). Die Translokation in Peroxisomen weist im Vergleich zu dem Import in andere Organellen zwei große Unterschiede auf. Zum einen sind peroxisomale Proteine bereits vor dem Transport durch die Membran fertig gefaltet, gegebenenfalls mit Cofaktoren beladen und zu oligomeren Komplexen formiert. Zum anderen binden die Rezeptoren die Zielproteine bereits im Cytosol (Kim & Hettema, 2015). Der Import von peroxisomalen Matrixproteinen kann in vier Schritte eingeteilt werden: 1. Die Erkennung des Targets durch den Rezeptor im Cytosol, 2. Das Andocken des Rezeptor-Target-Komplexes an die peroxisomale Membran, 3. Die Translokation des Proteins und 4. Das Recycling des Rezeptors (Kim & Hettema, 2015). Der SKL-vermittelte peroxisomale Import ist in Eukaryoten evolutionär konserviert (Brocard & Hartig, 2006). Auch wenn eine große Mehrheit der peroxisomalen Matrixproteine über die PTS1 verfügt, gibt es auch wenige Proteine mit einer PTS2. Deren Konsensussequenz ist definiert als (R/K)(L/V/I)₅(H/Q)(L/A) und befindet sich im Gegensatz zur PTS1 am N-Terminus (Petřiv *et al.*, 2004). Diese Signalsequenz wird von Pex7, einem Mitglied der WD40-Proteinfamilie erkannt (Marzioch *et al.*, 1994). In Pflanzen gibt es darüber hinaus Beispiele interner Targeting-Signale. So weist die Catalase aus Kürbis eine interne PTS1- oder TLP (*Transthyretin-like protein*) aus *Arabidopsis* eine interne PTS2-Sequenz auf (Oshima *et al.*, 2008; Reumann *et al.*, 2007).

Kürzlich wurden C-terminale End-Degrone identifiziert, welche einen Abbau durch die Ubiquitin-Ligase CRL2 (*Cullin-RING ligase*) bzw. CRL4 ermöglichen (Lin *et al.*, 2018; Koren *et al.*, 2018). CRL2 ist ein wichtiges Enzym bei der Entsorgung fehlerhafter Proteine. Es nutzt die sechs bis zehn C-terminalen Positionen als ein Indikator der Proteinqualität. Die erkannte Sequenz variiert zwischen den beteiligten korrespondierenden BC-Box-Proteinen, welche als Substratrezeptor fungieren. Jedoch ist der letzte C-terminale Rest des abzubauenen Substrates immer ein Glycin oder Alanin (Lin *et al.*, 2018).

Tabelle 5.1 zeigt eine Aufstellung 20 bekannter eukaryotischer C-terminaler SLiMs. Diese Beispiele sind der Datenbank „*The Eukaryotic Linear Motif*“ (ELM) entnommen (Dinkel *et al.*, 2016). Es wurden Degradierungs (DEG)-, Docking (DOG)-, Ligand (LIG)-, PTM (MOD)- und Transport (TRG)-Motive gefunden. Die Nomenklatur der Peptidmotive erfolgt nach Aasland *et al.* im ASCII-Format (Aasland *et al.*, 2002).

Tabelle 5.1: Bekannte eukaryotische C-terminale SLiMs. Die Auflistung ist an den Typ des Motives angepasst. Verwendete Abkürzungen: DEG = Degradierung, DOG = Docking, LIG = Ligand, MOD = posttranslationale Modifizierung, TRG = Transport; fn = *flanking N-terminal amino acids*, x = beliebiger Rest, # = aliphatischer Rest, [-] = negativ geladener Rest, [S:po] = phosphorylierter Rest (Serin), (^) = ausgeschlossener Rest, {} = Anzahl folgender beliebiger Reste.

Typ	Konsensussequenz	Beschreibung	Referenz
DEG	fnIR	Bindemotiv von Co-Aktivatoren, Untereinheiten und Substraten der APC/C (<i>anaphase aromoting complex or cyclosome</i>)-E3 Ubiquitin-Ligase für direkte Interaktion mit TPR-Domäne	Vodermaier <i>et al.</i> , 2003
DOG	fnFxxF	Docking-Motiv von AGC-Kinasen, welches intramolekular mit der PIF (<i>PDK1 interacting fragment</i>)-Tasche interagiert, sodass die Kinase autoaktiviert wird	Pearce <i>et al.</i> , 2010
DOG	fnFEMDI	TOS (<i>TOR signalling motif</i>) ist konserviert in 4E-BP Translationsinitiationsfaktoren und interagiert mit dem WD-40 Adapterprotein Raptor, welches an die TOR-Kinase bindet	Schalm & Blenis, 2002
LIG	fnR(^[-]) {0,3}[S/T: po]	Die 14-3-3-Proteinfamilie erkennt Phosphoserin/-threonin-Peptidmotive ihrer Interaktionspartner	Coblitz <i>et al.</i> , 2006
LIG	fn[S:po]xxY	Eine Phosphoserinsequenz wird spezifisch von der BRCD-Domäne von MDC1 (<i>mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>) erkannt	Lee <i>et al.</i> , 2005
LIG	fnEE(Y/F)	Aromatische Peptidsequenz, welche mit der CAP-Gly (<i>cytoskeleton-associated protein-glycine-rich</i>)-Domäne von mikrotubuliinteragierenden Proteinen interagiert	Weisbrich <i>et al.</i> , 2007
LIG	fnWxxGCY	Semiaromatische Sequenz der SLAIN-Untergruppe von mikrotubuliassoziierten Proteinen, welche an eine CAP-Gly-Domäne bindet	van der Vaart <i>et al.</i> , 2011
LIG	fn(S/T)x#	Bindemotiv von Targetproteinen der PDZ (Akronym der Proteine: PSD95, Dlg1, Zo-1)-Domäne von regulatorischen Proteinen	Wang <i>et al.</i> , 1998
LIG	fn(V/Y/F)x#	Alternative Bindesequenz von Targetproteinen der PDZ-Domäne von regulatorischen Proteinen	Marfatia <i>et al.</i> , 1997
LIG	fn[-]x#	Ein weiteres Erkennungsmuster der PDZ-Domäne von regulatorischen Proteinen	Stricker <i>et al.</i> , 1997
LIG	fnLxCxE	Bindemotiv zur Interaktion mit der Retinoblastom-Proteinfamilie	Dahiya <i>et al.</i> , 2000

LIG	fnEEVD	Motiv von Hsp70- und Hsp90-Proteinen, welches die Bindung von Cochaperonen über deren TPR-Domäne ermöglicht	Scheufler <i>et al.</i> , 2000
LIG	fnWRPW	Die Interaktion zwischen der WD40-Domäne der TLE (<i>transducin-like enhancer-of-split</i>)-Proteinfamilie und Transkriptionsrepressoren wird durch diese Tryptophan-haltige Sequenz vermittelt	Jennings <i>et al.</i> , 2006
MOD	fnC##x	Signalsequenz zur Prenylierung von Proteinen zur Verankerung in der Plasmamembran	Wang & Casey, 2016
TRG	fnQVxPA	Die Zielsequenz vermittelt den Transport von Proteinen vom trans-Golgi-Netzwerk zur Zilienmembran durch Mitglieder der Arf (<i>ADP-ribosylation factor</i>)-Familie	Mazelova <i>et al.</i> , 2009
TRG	fnKx{0,1}Kx{2,3}	Das Di-Lysin-Motiv von Typ1 ER-Membranproteinen ermöglicht die Rückführung aus dem Golgi-Netzwerk durch das COPI-Coatomer	Andersson <i>et al.</i> , 1999
TRG	fn(K/H)DEL	Sequenz löslicher ER-ansässiger Proteine, welche nach Erkennung durch den KDEL-Rezeptor mittels COPI-Vesikel vom Golgi-Apparat zurückgeführt werden	Munro & Pelham, 1987
TRG	fnQx{6}FFx{6,7}	Das ER-Exportsignal ermöglicht Mitgliedern der p24-Rezeptorfamilie die Bindung an COPII und somit den Transport vom ER zum Golgi-Apparat	Fiedler <i>et al.</i> , 1996
TRG	fnDxxLLx{1,2}	Die Zielsequenz von Typ 1-Transmembranproteinen des trans-Golgi-Netzwerks interagiert mit der VHS-Domäne von Adapterproteinen, welche den Einbau in Vesikel erlauben, um die Ladung zu Lysosomen und Endosomen zu transportieren	Tikkanen <i>et al.</i> , 2000
TRG	fnSKL	Die Translokation in Peroxisomen wird durch Interaktion des PTS1 (<i>peroxisomal targeting signal</i>) mit der TPR-Domäne des Pex5-Rezeptors ermöglicht	Gatto <i>et al.</i> , 2000

Als Beispiel eines PTM-Motivs ist die Sequenz CaaX zu nennen, wobei "a" eine aliphatische Aminosäure darstellt. Dieses Sequenzmotiv bewirkt eine Prenylierung der viertletzten Aminosäure Cystein (Zhang & Casey, 1996). Prenylierung stellt eine Klasse der Lipid-modifizierung dar und ermöglicht die Membranverankerung der modifizierten Proteine. In Abhängigkeit der extremen C-terminalen Position X wird entweder durch die Farnesyltransferase (FTase) ein Farnesyl- (15 Kohlenstoffatome) oder durch die Geranylgeranyltransferase I (GGTase I) ein Geranylgeranyl (20 Kohlenstoffatome)-Isoprenoid angehängt (Wang & Casey, 2016). Anschließend werden die drei C-terminalen Aminosäuren aaX durch die CaaX-Endopeptidase I abgespalten und die Carboxygruppe durch die Isoprenylcystein-Carboxymethyltransferase in einer SAM-Reaktion methyliert, um einen hydrophoben C-Terminus zu generieren. Das Motiv ist in Eukaryoten konserviert und ist auf Grund seines Vorkommens in Protein-Kinasen und G-Proteinen in der Signaltransduktion von Bedeutung (Zhang & Casey, 1996). In manchen Fällen ist eine Prenylierung auch wichtig für PPI.

Des Weiteren ist die Peptidsequenz EEVD ein bekanntes Beispiel zur Assemblierung von Multiproteinkomplexen. Sie ist an den C-terminalen Polypeptidenden der Chaperone Hsp70 und Hsp90 zu finden (Allan & Ratajczak, 2011). Erkannt wird diese Sequenz durch das Adapterprotein Hop (*Hsp70 and Hsp90 organizing protein*), welches die zwei Chaperone miteinander verbindet (Zeytuni & Zarivach, 2012). Die Sequenz des Cochaperons weist neun TPR-Motive auf, welche in zwei Domänen organisiert sind. Die N-terminale Domäne von Hop TPR1 interagiert mit Hsp70, wohingegen die C-terminale Domäne TRP2a die Signalsequenz von Hsp90 erkennt. Kristallstrukturen zeigen eine „extended coil“-Konformation der Peptide; die Interaktionen beruhen auf elektrostatischen Wechselwirkungen (Scheufler *et al.*, 2000). Hydrophobe Interaktionen mit flankierenden Resten scheinen wichtig für die Spezifikation zu sein.

Die Signalsequenz KDEL bzw. HDEL am C-Terminus von löslichen ER-Proteinen dient als Beispiel einer Transportsequenz. Innerhalb des sekretorischen Transportweges muss der Verkehrsfluss zwischen den individuellen intrazellulären Kompartimenten präzise koordiniert sein, um strukturelle und funktionelle Störungen des Systems zu vermeiden (Sallese *et al.*, 2009). Proteine, welche permanent im Lumen des ER verbleiben sollen, müssen von neu synthetisierten Proteinen, auf ihrem Weg aus der Zelle hinaus, unterschieden werden. Die C-terminale Signalsequenz sorgt für die Rückführung dieser Proteine aus dem Golgi-Apparat zum ER (Munro & Pelham, 1987). Eine Deletion des Signals führt zur Sekretion. Die Sequenz wird durch KDEL-Rezeptoren (z. B. ERD2) in der Golgi-Membran erkannt, welche wiederum das COPI-Coatomer rekrutieren, sodass der retrograde Vesikeltransport erfolgt (Sallese *et al.*, 2009). Auf ähnliche Weise erfolgt der Rücktransport von ER-Membranproteinen mit einem dibasischen-Motiv wie KKxx (Teasdale & Jackson, 1996). Auf Grund des Fehlens der Rückführungssequenzen in einigen permanenten ER-Proteinen müssen alternative Mechanismen existieren.

Könnte die auffällige Sequenz L(D/E)W am C-Terminus von Fe/S-Proteinen ein SLiM darstellen? In bioinformatischen Studien zur Vorhersage C-terminaler Peptidmotive wurde das Tripeptid L(D/E)W bisher nicht registriert (Gatto & Berg, 2003; Chung *et al.*, 2003; Austin *et al.*, 2007). Gatto & Berg untersuchten in vollständigen Genomen ausgewählter Archaea, Bakterien und Eukaryoten die Häufigkeit des Auftretens C-terminaler Tripeptide (Gatto & Berg, 2003). Während die Zusammensetzungen bei Archaea und Bakterien zufällig erscheinen, zeigen eukaryotische Genome Tripeptide, welche statistisch überrepräsentiert sind. Dazu gehören neben bekannten Signalsequenzen und ORF-Homologen auch mögliche bisher unidentifizierte Erkennungsmotive. Chung *et al.* analysierten die letzten acht C-terminalen Aminosäurereste aller Proteine von *S. cerevisiae* mit mehr als 50 Aminosäuren (Chung *et al.*, 2003). Bei Betrachtung der C-terminalen Tetrapeptidsequenz wurde festgestellt, dass 83 % aller untersuchten Proteine eine einzigartige Sequenz aufweisen. 12 % der Proteine besitzen ein Tetrapeptid, welches noch in einem weiteren Protein auftaucht und nur 5 % der Proteine verfügen über eine C-terminale Sequenz, die identisch zu mehreren

Proteinen ist. Unter den Ergebnissen mit den am häufigsten vorkommenden C-terminalen Sequenzen finden sich die bekannten Motive HDEL, EEVD und SKL. Jedoch sind die am häufigsten vorkommenden Tri- und Tetrapeptide in weniger als 0,2% aller Proteine des Proteoms vertreten. Mit *ab initio* Methoden suchten Austin *et al.* in sieben verschiedenen eukaryotischen Organismen nach statistisch überrepräsentierten C-terminalen Tripeptiden (SOCTs (*statistically over-represented C-terminal tripeptides*)) (Austin *et al.*, 2007). Innerhalb der letzten 15 - 20 Tripeptidpositionen der C-Termini wurden die meisten SOCTs an den Positionen -3 bis -5 identifiziert.

Dass das Tripeptid L(D/E)W in bioinformatischen Untersuchungen bisher nicht aufgefallen ist, lässt sich durch das geringe Vorkommen der Sequenz erklären. Wenn das humane Genom 70 Fe/S-Proteine codiert, entspricht dies lediglich 0,35% aller humanen Gene (Andreini *et al.*, 2016). Davon wiederum sind nur 38 Proteine im Cytosol lokalisiert. Des Weiteren ist die mögliche Erkennungssequenz nur bei einem Teil der cytosolischen Fe/S-Proteine zu finden (siehe Tabelle 1.2). So ist es nicht verwunderlich, wenn die Sequenz bei der Betrachtung des Proteoms eines oder weniger eukaryotischer Organismen nicht heraussticht. Jedoch können weniger häufige Motive genauso wichtig sein wie häufiger vorkommende – sie sind hoch spezifisch, vor allem, wenn sie in Homologen verschiedener Spezies konserviert sind (Chung *et al.*, 2003). Diese Tatsache trifft auf L(D/E)W zu. Abbildung 1.7 (siehe Seite 19) verdeutlicht die Konservierung des Motivs bei den Proteinen IPMI, GPAT, Neverland, Viperin, Nir1 und Rev3 über eine große Anzahl an Spezies. Noch deutlicher ausgeprägter ist diese Konservierung, wenn nur das C-terminale Tryptophan betrachtet wird. Die Weblogos zeigen, dass, wenn ein cytosolisches oder nucleäres Fe/S-Protein über ein C-terminales W verfügt, dieses in nahezu allen Homologen der untersuchten Spezies konserviert ist. Besonders deutlich wird dies, wenn die restliche untersuchte Sequenz (die letzten 20 C-terminalen Aminosäuren), nicht sehr konserviert ist. Beispiele hierfür sind Pol3 oder Cmo1.

Tryptophan ist die proteinogene Aminosäure mit dem geringsten Vorkommen im kompletten Proteom (UniProt Consortium, 2017). Die Häufigkeit von Tryptophan in allen ORFs beträgt im Menschen 1,2%, in *S. cerevisiae* 1,05% (Gatto & Berg, 2003; Chung *et al.*, 2003). Eine Motivsuche nach einem C-terminalen Tryptophan im kompletten Proteom von *S. cerevisiae* zeigte 106 Treffer von 6.002 untersuchten Proteinen (MOTIF Search). Dies entspricht 1,77%. Das gleiche Vorgehen bei einer Analyse des humanen Proteoms lieferte 232 Tryptophanhaltige C-Termini bei 20.338 untersuchten Proteinen, was einem Anteil von 1,14% entspricht. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit publizierten Werten von 1,67% bzw. 1,7% bei *S. cerevisiae* und 1,4% beim Menschen überein (Chung *et al.*, 2003; Gatto & Berg, 2003). Wird nun in Betracht gezogen, dass es sich bei mehreren der Proteine mit C-terminalem Tryptophan um Fe/S-Proteine handelt, wird ein Zusammenhang sichtbar (siehe Tabelle 1.2 Seite 17). Im Menschen zeigen 13% der identifizierten nicht mitochondrialen Fe/S-Proteine ein C-terminales Tryptophan (fünf von 38 Proteinen). In

S. cerevisiae sind es 22 %. Es ist schwer vorstellbar, dass dieser Unterschied von 1,7 % zu 22 % Tryptophan-haltiger C-Termini ein Zufall ist. Es deutet vielmehr darauf hin, dass dieses C-terminale Tryptophan Teil einer wichtigen Erkennungssequenz ist. Dafür spricht auch, dass bei SLiMs aromatische Aminosäuren an „für die Bindung wichtigen Positionen“ stark bevorzugt sind (Davey *et al.*, 2012). Generell ist Tryptophan, ebenso wie Tyrosin, in Protein-Interaktions-Hotspots vermehrt zu finden (Wass *et al.*, 2011).

Die weiteren Aminosäuren des möglichen Sequenzmotivs L(D/E)W liefern keine weiteren Hinweise. Leucin ist die am häufigsten vorkommende Aminosäure, sowohl mit 9,59 % in allen ORFs des *S. cerevisiae*-Genoms, als auch mit 9,9 % des humanen Genoms (Chung *et al.*, 2003; Gatto & Berg, 2003; UniProt). In *S. cerevisiae* kommt sie bei 10,27 % aller Proteine an drittletzter Position (-3) vor; beim Menschen bei 9,2 %. Das Vorkommen von Asparaginsäure (5,79 % in *S. cerevisiae* bzw. 4,9 % im Menschen) und Glutaminsäure (6,50 % in *S. cerevisiae* bzw. 7,1 % im Menschen) ist durchschnittlich (UniProt; Chung *et al.*, 2003; Gatto & Berg, 2003). An der vorletzten C-terminalen Position entspricht deren Auftreten 5,22 % bzw. 5,78 % in Hefe und 5,0 % bzw. 6,9 % im Menschen.

Bisher sind in PDB keine Daten zur Struktur der IPMI aus *S. cerevisiae* oder verwandten Hefen vorhanden (Berman *et al.*, 2000). Ein Sequenzvergleich der Aconitaseproteinfamilie zeigt eine C-terminale Verlängerung der IPMIen aus Pilzen, im Vergleich zu pflanzlichen oder prokaryotischen Proteinen (siehe 1.4.2 und Abbildung 1.5). In Bezug auf die Sequenz von LeuC bzw. LeuD aus *E. coli* umfasst diese bei *S. cerevisiae* 28 Aminosäuren. Auch in mitochondrialen Aconitasen ist diese Verlängerung nicht vorhanden. Daher ist aus einer Simulation der Struktur der IPMI aus *S. cerevisiae* auf Grundlage der bekannten Kristallstruktur 1C96 (siehe Abbildung 4.40) kein Rückschluss auf die Sekundärstruktur dieses C-Terminus möglich (Lloyd *et al.*, 1999). Um dennoch eine Vorstellung des räumlichen Aufbaues zu erhalten, können Sekundärstruktur-Vorhersageprogramme eingesetzt werden. Die Webserver SPIDER² und APSSP sagen eine zufällige Struktur (*random coil*) für die C-terminalen 33 bzw. 22 Reste der *S. cerevisiae* IPMI voraus (siehe Anhang 7.2) (Heffernan *et al.*, 2016; Raghava, 2000). Nach der Kalkulation des Servers SOPMA könnten die Reste -7 bis -3 jedoch auch α -helikal angeordnet sein (Geourjon & Deléage, 1995). Eine Vorhersage ungeordneter Regionen beschreibt die C-terminalen 30 Reste als „HOT-LOOP“, ein Loop mit einem hohen Grad an Mobilität (Linding *et al.*, 2003).

Aus theoretischer Sicht könnte die Sequenz L(D/E)W ein SLiM sein. Sie befindet sich am C-Terminus in einer intrinsisch ungeordneten Region und vor allem das C-terminale Tryptophan ist bei 22 % cytosolischer und nucleärer Fe/S-Proteine über viele eukaryotische Spezies konserviert. Diese Proteine stehen in keinem strukturellen oder funktionellen Zusammenhang. Bei dem vergleichsweise geringen Vorkommen von Tryptophan generell und insbesondere am C-Terminus kann dies kein Zufall sein.

Doch warum ist dieses Motiv nur bei 22 % der cytosolischen und nucleären Fe/S-Proteine zu finden? Zum einen existieren bei zellulären Prozessen oftmals verschiedene Mechanismen, welche zum gleichen Ergebnis führen. Das propagierte Peptidmotiv LYR, welches mit dem Einbau von Fe/S-Clustern in mitochondriale Proteine in Zusammenhang gebracht wird, ist ebenfalls nicht in allen Targetproteinen zu finden. 55 % der humanen Fe/S-Proteine weisen dieses interne Tripeptidmotiv auf (Andreini *et al.*, 2016). Dabei wird es nicht nur in mitochondrialen Proteinen detektiert, auch 81 % der nucleären und 50 % der cytosolischen Fe/S-Proteine beinhalten dieses Motiv. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass das Auftreten dieses Motives in Fe/S-Proteinen, gegenüber dem gesamten humanen Proteom, nicht statistisch aussagekräftig ist. Lediglich das Vorkommen der Sequenz LFR ist zweifach erhöht (Andreini *et al.*, 2016). Weiterhin sind die oben aufgeführten Beispiele C-terminaler SLiMs auch nicht exklusiv für das Ereignis, welches sie vermitteln, verantwortlich. Zwar besitzt ein Großteil der peroxisomalen Proteine die PTS1 SKL, daneben gibt es aber weitere Mechanismen des Imports. Der Rezeptor Pex7 erkennt die N-terminale PTS2 oder Proteine ohne PTS können gemeinsam mit PTS-tragenden Proteinen als Komplex importiert werden (Kim & Hettema, 2015). Des Weiteren verfügt beispielsweise die humane Catalase nicht über das allgemeine Motiv SKL, sondern über eine C-terminale Sequenz KANL, welche nicht den Kriterien der PTS1 entspricht (Purdue & Lazarow, 1996). Diese wird ebenfalls von dem Rezeptor Pex5 erkannt und analog zu PTS1 importiert. Das CaaX-Motiv dient der Verankerung membranständiger Proteine durch Prenylierung mittels FTase oder GGTase I. Alternativ erkennt eine GGTase II eine CC oder CxC-Sequenz (Zhang & Casey, 1996). Bei diesem Beispiel ist es jedoch möglich, das Auftreten des jeweiligen Motivs den verschiedenen Proteinfamilien zuzuordnen. Die Rückführungssequenzen löslicher und membranständiger ER-Proteinen (K/H)DEL bzw. KKxx sind ebenfalls nicht in allen permanenten Proteinen vorhanden. Auch hier müssen alternative Mechanismen existieren (Teasdale & Jackson, 1996). Wenn weitere Erkennungssequenzen in alternierenden Mechanismen beteiligt sind, sind diese möglicherweise noch nicht identifiziert. SLiMs vermitteln in der Regel schwache Bindungen (van Roey *et al.*, 2014). Diese sind experimentell schwerer zu untersuchen. Auf Grund der geringen Anzahl an Fe/S-Proteinen im gesamten Proteom ist auch die bioinformatische Detektion nicht einfach. Zum anderen könnte sich das Peptidmotiv anstatt am C-Terminus an einer internen Position befinden. So sind beispielsweise bezüglich des peroxisomalen Imports in Pflanzen Ausnahmen von der C- bzw. N-terminalen Position der PTS1 bzw. PTS2 bekannt (Reumann *et al.*, 2007; Oshima *et al.*, 2008). Dahingehend sollte die Bedeutung interner Tryptophanreste cytosolischer Fe/S-Proteine ohne C-terminales Tryptophan analysiert werden. Hierbei wären Kristallstrukturen der Proteine hilfreich, um in Frage kommende Tryptophanreste an der Proteinoberfläche zu identifizieren.

Eine weitere Erklärung, dass das Motiv L(D/E)W nur in 22 % der cytosolischen Fe/S-Proteine auftaucht, stellt die Evolution dar. SLiMs sind im Gegensatz zu globulären Domänen evolutionär konvergent (Davey *et al.*, 2012). Die geringe Länge und kleine Anzahl beteiligter

Reste vereinfacht es aus einer zufälligen Peptidsequenz *de novo* zu entstehen. So kann aus einer schwachen Interaktion mit geringer Affinität durch eine Punktmutation ein evolutionärer Druck entstehen, wenn diese z. B. durch Ausbildung einer Sekundärstruktur, die Interaktion verstärkt und / oder die Affinität erhöht. Bei einer Vielzahl an SLiMs gibt es Belege dieser konvergenten Evolution bei zwei oder mehr nicht verwandten Proteinen (van Roey *et al.*, 2014). Folglich könnte die Signalsequenz bei weiteren cytosolischen Proteinen in der Zukunft erst entstehen.

Des Weiteren könnten kryptische Signalsequenzen eine Rolle spielen. Die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und die 3-Phosphoglycerat-Kinase (PGK) aus verschiedenen Pilzen zeigen kryptische PTS1 (Freitag *et al.*, 2012). Die codierenden Sequenzen dieser Enzyme weisen keine Signalsequenzen auf. Durch alternatives Splicen und translationales Readthrough entstehen jedoch PTS1-haltige verlängerte Isoformen. Das Motiv befindet sich in der mRNA-Sequenz *downstream* des eigentlichen Stopp-Codons. Readthrough oder programmiertes Frameshifting können eingesetzt werden, um die Genexpression zu regulieren (Baranov *et al.*, 2002). Solch ein Recoding könnte auch bei weiteren Peptidmotiven von Bedeutung sein. Jedoch wurde bei der Analyse der DNA-Sequenzen der 3'-Seite des Stopp-Codons von den 78% der Hefe-Proteine ohne C-terminales Tryptophan kein TGG- gefolgt von einem Stopp-Codon gefunden (Prof. A. J. Pierik, persönliche Mitteilung).

Zum anderen können Adapterproteine die Funktion des Tripeptides übernehmen. Der Komplex aus Lto1 und Yae1 vermittelt den Fe/S-Clustereinbau in das ABC-Protein Rli1 (Paul *et al.*, 2015). Lto1 selbst ist kein Fe/S-Protein, verfügt aber über ein C-terminales Tryptophan, welches essentiell für die Interaktion mit der CIA-Maschinerie ist. Vielleicht ist der Adapterproteinkomplex auch an der Assemblierung weiterer cytosolischer Fe/S-Proteine beteiligt. Auch wäre es möglich, dass es andere Adapterproteine gibt, welche eine Interaktion mit dem CIA-Targeting-Komplex herstellen.

Nachdem ausführlich diskutiert wurde, dass das C-terminale Tryptophan aus theoretischer Sicht von Bedeutung sein könnte, werden nun die praktischen Erkenntnisse näher betrachtet. Die Bedeutung des C-terminalen Tryptophans wurde anhand dreier cytosolischer Fe/S-Proteine untersucht. Zunächst wurde der CIA-Faktor Nar1 mutiert und der Einfluss auf das Zellwachstum sowie den Clustereinbau in das Targetprotein Leu1 analysiert. In einer Doktorarbeit über das Protein Nar1 war der Rest W491 bereits Gegenstand einer Studie über die Lebensfähigkeit von Zellen und die Reifung von cytosolischen Fe/S-Proteinen (Urzica, 2007). Dort wurde der starke Promotor *MET25* verwendet. In Übereinstimmung mit jenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass unter diesen Bedingungen das C-terminale Tryptophan nicht essentiell ist. Da die natürliche Expression dieses Proteins jedoch gering ist, in einem WT Hefestamm liegen nur wenige Kopien pro Zelle vor, erscheint dieses Expressionssystem der falsche Weg zu sein, um den physiologischen Effekt einer

Aminosäureveränderung zu untersuchen (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Wird der *MET25*-Promotor durch den natürlichen *NAR1*- oder den *NBP35*-Promotor ersetzt, ergibt sich ein anderes Bild. Die plasmid erzeugte $\Delta 1$ -Mutante ist weder unter der Kontrolle des natürlichen, noch des ebenfalls schwachen *NBP35*-Promotors fähig, den durch Depletion der chromosomalen *NAR1*-Kopie ausgelösten Wachstumsdefekt vollständig zu komplementieren (siehe Abbildung 4.1). Ebenso vermindert die Deletion des C-terminalen Tryptophans den Clustereinbau in das Targetprotein Leu1, dies ist belegt durch einen Aktivitätsverlust des Enzyms um 24 % bzw. 31 % (siehe Abbildung 4.2). Diese Resultate indizieren, dass unter Versuchsbedingungen, welche den natürlichen Begebenheiten näher kommen, das C-terminale Tryptophan sehr wohl wichtig ist.

Ähnliche Erkenntnisse lassen sich durch die Verkürzung des Proteins Apd1 gewinnen. Da dieses Gen nicht essentiell ist und nur unter synthetisch letalen Bedingungen untersucht werden kann, lassen sich die Wachstumsanalysen von Gal_*NAR1* und Δ *apd1* nicht direkt vergleichen. Unter den erzeugten Bedingungen nimmt das Zellwachstum der Mutanten in Flüssigkultur um 40 % ab, sodass auch bei Apd1 das C-terminale Tryptophan wichtig für das Überleben der Zellen ist (siehe Abbildung 4.3). Ein Vergleich mit mutierten Clusterliganden, welche einen größeren Wachstumsdefekt aufweisen, legt nahe, dass das Tryptophan wichtig, aber nicht essentiell ist (C. Blinn, persönliche Mitteilung).

Als drittes Protein wurde die IPMI betrachtet. In Vorversuchen zu dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass das Entfernen der drei C-terminalen Aminosäuren zu einem Aktivitätsverlust von 69 % führt (Ebert, 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde, unter Verwendung des gleichen Systems, ein Aktivitätsverlust von 57 % für diese Mutante beobachtet (siehe Abbildung 4.4). Diese Abweichung ist durch die Bildung eines Mittelwertes aus mehreren unabhängigen Messreihen (verschiedene Klone) zu erklären. Während in der Diplomarbeit von A. Ebert alle Messwerte gemittelt wurden ohne einen Nachweis zu erbringen, dass das Leu1-Protein tatsächlich exprimiert wurde, wurden der Proteingehalt in der vorliegenden Arbeit mittels Western Blot kontrolliert. Messungen mit keiner bzw. geringer Aktivität oder Proben, bei denen eine Bande im Western Blot fehlte, flossen nicht in das Ergebnis mit ein. Durch diese Vorgehensweise wird eine Verfälschung der Messwerte durch „leere Klone“ verhindert. „Leere Klone“ treten bei ca. 1 - 5 % der Transformanten, bei welchen Uracil bzw. das *URA3*-Gen (Orotidine-5'-phosphat-Decarboxylase) als Selektionsmarker dient, auf (Prof. A. J. Pierik, persönliche Mitteilung). Die *ura3-1*-Mutation der verwendeten Hefestämme ist lediglich eine G-zu-A-Punktmutation an Position 701 (Yim *et al.*, 2014). Die Reversion dieser Punktmutation gibt dem Stamm die Fähigkeit zurück Uracil selbstständig zu synthetisieren. Das transformierte Plasmid wird dadurch überflüssig und nicht transformiert oder geht verloren. Die geringe Aktivität eines solchen Klones spiegelt somit nicht die tatsächliche Enzymaktivität der zu untersuchenden Mutante wieder und muss aussortiert werden.

Des Weiteren sind die von A. Ebert ermittelten spezifischen Aktivitätswerte (auch die der Kontrollen) über 50 % geringer als in der vorliegenden Arbeit. Möglicherweise wurden die Proben nur unzulänglich gekühlt. In der Literatur sind ebenfalls höhere Werte über 300 mU/mg für den WT-Stamm W303 zu finden (Paul *et al.*, 2015; Netz *et al.*, 2016). Auf Grund der Messmethode und der Störanfälligkeit in dem gemessenen UV-Bereich ist davon auszugehen, dass geringere Aktivitätswerte fehleranfälliger sind als höhere.

Bedingt durch diese möglichen Störungen (wie DNA oder RNA) ist der Messwert der Negativkontrolle (Deletionsstamm ohne Leu1-Plasmidkopie) nicht null (siehe Abbildung 4.4). Es ist eine geringe Hintergrundaktivität vorhanden. Dazu könnten auch die verwandten Enzyme Aco1 oder Lys4 beitragen, deren Substrate dem eingesetzten 3-Isopropylmalat ähnlich sind. Es ist nicht ausgeschlossen, dass diese Enzyme in geringen Mengen das verwendete Substrat umsetzen können.

Die Deletion des C-terminalen Tryptophans führt zu einer um 57 % verringerten Aktivität. Eine Substitution durch Alanin zeigt einen Aktivitätsverlust von 65 %. Dies demonstriert die Bedeutsamkeit dieser Aminosäure. Jedoch geht die Aktivität nicht auf den Hintergrundwert der Negativkontrolle zurück. Um diese Werte besser einschätzen zu können, wurden Mutationen der mutmaßlichen Clusterliganden hergestellt und deren Aktivität untersucht. Die gemessenen Werte liegen mit 10 % spezifischer Aktivität etwas über dem Hintergrundwert der Negativkontrolle (siehe Abbildung 4.5). Die mittels Western Blot detektierten Proteinmengen zeigen keine Anzeichen für Stabilitätsprobleme der Mutanten. Ein vollständiger Aktivitätsverlust ist gleichbedeutend mit dem Fehlen des Fe/S-Clusters. Daraus lässt sich schließen, dass Mutanten mit einer höheren Aktivität als der Hintergrund tatsächlich über einen Fe/S-Cluster verfügen. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen dem mutierten C-Terminus und einer Beeinträchtigung des Clustereinbaus hin. Zudem konnte bestätigt werden, dass die aus Sequenzvergleichen mit der mitochondrialen Aconitase abgeleiteten Cysteine C360, C421 und C424 die Clusterliganden der IPMI aus *S. cerevisiae* sind.

Eine Erklärung für den Aktivitätsverlust von nur 57 %, was mit einem Clustereinbau von 43 % gleichzusetzen ist, könnte sein, dass es noch weitere Assemblierungswege gibt, bei welchen ein C-terminales Tryptophan nicht von Bedeutung ist. Schließlich wurde die untersuchte Sequenz nur bei 22 % der eukaryotischen cytosolischen und nucleären Fe/S-Proteinen gefunden. Im Vergleich zu den Clusterliganden ist das Tryptophan nicht essentiell.

Des Weiteren spielt die Anzahl der Proteine in der Zelle eine Rolle. Wie bei der Überexpression von Nar1 zu beobachten war, kann eine hohe Kopiezahl den durch die Mutation ausgelösten Defekt kompensieren. In dem verwendeten WT-Stamm (leu2-3, 112) wird die IPMI, trotz Zugabe von Leucin im Medium, sehr stark exprimiert. Da Plasmide mit dem natürlichen *LEU1*-Promotor verwendet werden, kann angenommen werden, dass die Plasmidkopien ebenso stark exprimiert werden. Dies belegen die Messwerte der Leu1-

spezifischen Aktivitätsmessung aus Zellextrakten des WTs und der plasmid erzeugten Rettung des Deletionsstammes, welche gut übereinstimmen. Möglicherweise überdeckt das hohe Expressionslevel auch hier den durch die Mutationen herbeigeführten Defekt (*high copy suppression*). Die durchgeführten Experimente könnten mit Plasmiden mit einem schwächeren Promotor wiederholt werden, um diesen Einwand auszuschließen. Jedoch müsste dann die Anreicherung von Leu1 aus dem Zellextrakt oder eine empfindlichere gekoppelte Aktivitätsmessung mit der 3-Isopropylmalat-Dehydrogenase etabliert werden.

Sowohl die Kürzung um bis zu zehn Aminosäuren, als auch die Verlängerung um drei Reste führt zu mit der $\Delta 1$ -Mutante vergleichbaren Aktivitäten. Dies impliziert, dass vor allem das endständige Tryptophan den kritischen Faktor darstellt. Diese Schlussfolgerung wird durch die Effizienz der Mutanten, welche verkürzt oder verlängert wurden, aber trotzdem ein C-terminales Tryptophan tragen, unterstützt. Diese Mutanten lassen einen nahezu vollständigen Clustereinbau erkennen. Dies gilt auch für die Substitution des vorletzten Asparaginsäurerestes durch Alanin. Somit kommt der Asparaginsäure aus der möglichen Signalsequenz L(D/E)W, zumindest bei der IPMI, keine Bedeutung bei.

Die Mutanten W1F und W1Y zeigen eine Aktivität von 76 % bzw. 66 %. Da diese Werte im Vergleich zu der $\Delta 1$ - bzw. W1A-Mutante deutlich größer sind, ist der Phenylalanin bzw. Tyrosinrest fähig, die Funktion des Tryptophans zumindest teilweise zu übernehmen. Daraus kann eine Bedeutsamkeit des aromatischen Ringes an der endständigen Position abgeleitet werden. Diese Erkenntnis steht mit einer Mutagenesestudie des humanen Proteins Viperin in Einklang. Bei Mutation des C-terminalen Tryptophans zu F oder Y blieb die antivirale Funktion, gemessen an der relativen Koloniebildungseffizienz, vermindert erhalten. Wurde dagegen ein A, D oder P inseriert, ging die Funktion vollständig verloren (Jiang *et al.*, 2008).

Eine weitere Verkürzung über zehn Aminosäuren hinaus führt zu einem gesteigerten Aktivitätsverlust. Sichtbar bei der $\Delta 26$ -Mutante aber noch deutlicher bei der Mutante $\Delta 34$ ist die Aktivität auf das Niveau des Hintergrundes reduziert. Jedoch zeigt der Nachweis der Proteinmenge durch Immundetektion bei dieser Mutante ($\Delta 34$) eine schwächere Bande. Dies könnte auf Stabilitätsprobleme hindeuten. Die Sequenz dieser Mutante wurde weiter gekürzt als die C-terminale Verlängerung der IPMI aus Fungi im Vergleich zu Prokaryoten lang ist. Daneben weist diese Mutante auch keine Aktivität in *E. coli*-Zellextrakt auf. Sie kann auch nicht chemisch rekonstituiert werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Mutante $\Delta 34$ nicht fähig ist einen Fe/S-Cluster zu tragen und die Reifung somit nicht für diesen Defekt verantwortlich ist. Möglicherweise findet durch die zu große Verkürzung eine Konformationsänderung statt.

Die Daten der Leu1-spezifischen Aktivitätsmessungen in Hefezellextrakt haben gezeigt, dass das C-terminale Tryptophan wichtig ist für den Fe/S-Clustereinbau. Wurde die Aktivität der gleichen Mutanten in *E. coli*-Zellextrakt bestimmt, konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 4.8). Dort spielt die Abwesenheit des Tryptophans und der

C-terminalen Sequenz bis zu 17 Aminosäuren keine Rolle. Dieser Unterschied zwischen Hefe- und *E. coli*-Zellextrakt ist durch die verschiedenen Maschinerien des Fe/S-Clustereinbaus in diesen Organismen zu erklären. Es unterstützt die Vermutung, dass ein Zusammenhang zwischen der CIA-Maschinerie und dem C-terminalen Tryptophan besteht, da diese in Bakterien nicht vorhanden ist.

Die Feststellung, dass die aus *E. coli* gereinigten und chemisch rekonstituierten Mutanten und vor allem Leu1 in den *E. coli*-Zellextrakten fähig sind einen Fe/S-Cluster zu tragen (siehe Abbildung 4.10), widerspricht einem Aktivitätsverlust in Hefezellextrakt auf Grund mangelnder Stabilität. Es unterstützt vielmehr die Hypothese eines insuffizienten Clustereinbaus in Hefe.

Die durch Leu1-spezifische Aktivitätsmessungen gewonnenen Daten konnten durch ⁵⁵Fe-Einbau-Experimente verifiziert werden. Bei der Mutante Δ1 nimmt der Fe-Einbau um 75 % ab (siehe Abbildung 4.6). Der ausgeprägtere Effekt im Vergleich zu den 57 % der Aktivitätsmessung lassen sich durch die höhere Sensitivität dieser Methode erklären.

Um diese Ergebnisse weiter zu untermauern, könnten zukünftig zusätzliche Methoden eingesetzt werden, welche ebenfalls die Bedeutung des C-terminalen Tryptophans für den Fe/S-Clustereinbau in Apoproteine belegen. So könnte die Markierung mit ⁵⁵Fe ebenfalls mit den Nar1- und Apd1-Mutanten bzw. mit weiteren Leu1-Mutanten durchgeführt werden. Des Weiteren sollten die Mutanten mittels ESR-Spektroskopie untersucht werden. Mit einer von Dominique Bechtel und Catharina Blinn etablierten Methode kann der Clustereinbau in Hefezellextrakt untersucht werden. Besonders geeignet hierfür ist das cytosolische Protein Apd1, welches auf Grund der Detektion des [2Fe-2S]-Clusters bei 77 K untersucht werden kann. Da eine deutliche Überexpression der Proteine für diese Anwendung benötigt wird, ist ein 2 μ-Plasmid in Kombination mit einem starken Promotor empfehlenswert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Apd1-Mutanten auf Grundlage des p426_FBA_Apd1-Plasmides bereits konstruiert. Die ESR-Untersuchungen werden momentan von Catharina Blinn durchgeführt. Nach Herstellung von p426_FBA_Leu1- oder p426_FBA_Nar1-Plasmiden und deren Mutanten könnte auch versucht werden, z. B. mit ESR-Spektroskopie in Zellextrakten bei 10 K, Unterschiede im Einbau der [4Fe-4S]-Cluster festzustellen.

Von Nar1 und Apd1 könnten weitere Mutanten erzeugt und mit den bekannten Methoden analysiert werden. Analog zu den Wachstumsuntersuchungen der Nar1-Mutante könnten beispielsweise auch Tüpfeltests mit der essentiellen Pol3 durchgeführt werden, welche ebenfalls ein C-terminales Tryptophan besitzt. Dieses Thema wird von Frau Julia Golinski in ihrer Masterarbeit erforscht.

Interessant wäre es auch den Zusammenhang mit Histidin-koordinierten Fe/S-Proteinen zu studieren. Bisher ist nicht geklärt, wie die Assemblierung von [2Fe-2S]-Clustern im Cytosol erfolgt. Untersuchungen des Proteins Apd1 von Catharina Blinn und in der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass ein Zusammenhang zu der CIA-Maschinerie besteht (C. Blinn,

persönliche Mitteilung). Interessanterweise besitzen alle identifizierten cytosolischen Fe/S-Proteine mit einem C-terminalen Tryptophan und einem [2Fe-2S]-Cluster zwei Histidin-Clusterliganden (Apd1, Neverland, Cmo1 und Nir1). Es sollte untersucht werden, ob es sich hierbei um einen Zufall handelt und ob das C-terminale Tryptophan auch hier von Bedeutung ist. Weiterhin sollte geklärt werden, ob der Clustereinbau in diese Proteine ebenso verläuft wie in die bereits besser untersuchten [4Fe-4S]-Proteine wie Leu1. Mit Hilfe der Tryptophan-Hypothese wurde Apd1 als Fe/S-Protein identifiziert und von Kathrin Stegmaier charakterisiert (Stegmaier, 2017). Neverland, Cmo1 und Nir1 sind bisher wenig untersucht. Diese könnten ebenfalls gereinigt und vollständig spektroskopisch charakterisiert werden, was notwendig ist für ESR-spektroskopische Analysen von Zellextrakten.

5.2 Interaktionen mit dem CIA-Targeting-Komplex

Die C-Termini von Polypeptidketten interagieren oft mit Signal-Gerüstproteinen, welche PPI vermitteln (Chung *et al.*, 2002). Bekannte Interaktionspartner von C-terminalen Peptidsequenzen sind oftmals PDZ- oder TPR-Domänen (siehe 5.1).

Der Name der Protein-Interaktionsdomäne PDZ ist ein Akronym aus den ersten drei identifizierten Proteinen mit diesem Strukturelement: aus PSD95 (*postsynaptic density protein* 95 kDa), dem *Drosophila* Tumorsuppressorprotein Dlg1 (*discs large* 1) und dem Tight-Junction-Protein Zo-1 (*zonula occludens* 1) (Ye & Zhang, 2013). Die aus ca. 90 Aminosäuren aufgebaute Domäne ist von Bakterien über Pflanzen zu höheren Säugetieren konserviert und gehört zu den am häufigsten vorkommenden Proteindomänen. Durch das Vermitteln von spezifischen PPI spielt sie eine bedeutende Rolle bei der Bildung makromolekularer Komplexe, dem Proteintransport, der Regulation der Genexpression oder der Organisation der Signaltransduktion (Chung *et al.*, 2002). Die Struktur besteht aus sechs β -Faltblättern und zwei α -Helices, welche zusammen ein sechs-strängiges Sandwich bilden (Hung & Sheng, 2002). Die Targetproteine werden spezifisch anhand deren C-terminaler Peptidsequenz erkannt. Diese bindet als antiparalleler β -Strang in einer Bindetasche zwischen einer α -Helix und den β -Strängen. Für die richtige Koordination sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einem konservierten GLGF-Motiv der Domäne und der Carboxygruppe essentiell. Die hydrophobe Bindetasche bevorzugt hydrophobe Aminosäuren an der C-terminalen Position (Hung & Sheng, 2002). PDZ-Domänen weisen unterschiedliche Peptid-Bindesepezifitäten auf (Stricker *et al.*, 1997). Auf Grundlage der bevorzugten Peptidsequenz werden sie in drei Klassen eingeteilt (siehe Tabelle 5.1, Seite 173). Entscheidend ist, ob die drittletzte Position phosphoryliert werden kann, eine hydrophobe oder eine negativ geladene Aminosäure ist. Die Bindetasche präferiert Interaktionen mit drei bis vier Aminosäureresten, jedoch können weitere *upstream*-Positionen die Bindung verstärken (Hung & Sheng, 2002). PDZ-Proteine beinhalten oftmals mehrere PDZ-Domänen oder Kombinationen mit anderen bekannten Interaktionsdomänen, wodurch die Assemblierung

von Proteinkomplexen durch die gleichzeitige Bindung mehrerer Partner ermöglicht wird (Ye & Zhang, 2013). Sie haben in der Regel keine katalytische Funktion, sie dienen nur als C-Termini-Interaktionsgerüst.

Eine TPR (*tetratricopeptid repeat*)-Domäne ist wie eine PDZ-Domäne ein häufig vorkommendes Interaktionsmodul und Vermittler von Multiproteinkomplexen. Sie reguliert ebenfalls verschiedenste zelluläre Prozesse in allen Domänen des Lebens (Allan & Ratajczak, 2011). Eine Domäne setzt sich aus mehreren Repeats zusammen, wobei ein Repeat aus 34 Aminosäuren, einer Konsensussequenz aus kleinen und großen hydrophoben Resten, besteht. Hierbei erzeugt ein Repeat zwei α -Helices, welche ein Helix-Turn-Helix-Motiv bilden. So formen mehrere Repeats durch eine Serie benachbarter, sich wiederholender antiparalleler α -Helices eine rechtsgedrehte Superhelix mit konvexen und konkaven Oberflächen (Zeytuni & Zarivach, 2012). Es sind Proteine, bestehend aus drei bis 16 Wiederholungen bekannt (Allan & Ratajczak, 2011). Im Vergleich zu anderen Interaktionsplattformen zeigen TPR-Gruppierungen verschiedene Arten der Ligand-Bindung und besitzen keine allgemeine Bindetasche (Andrade *et al.*, 2001). Trotzdem ist eine Bindung meist hoch spezifisch. Die Sekundärstruktur der Liganden variiert zwischen einer „*extended coil*“ und einer α -helikalen Konformation (Zeytuni & Zarivach, 2012). Diese maximieren die Bindungsoberfläche. Als Liganden dienen oftmals C-terminale Peptidsequenzen.

Protein-Repeats sind Proteinsequenzen mit signifikanter Sequenzsimilarität. Sie werden definiert durch deren Multiplizität innerhalb eines Proteins und unterscheiden sich von Domänen und Motiven, welche auch alleine auftreten können (Andrade *et al.*, 2001). Die Größe der Repeats variiert von kurzen Aminosäure-Sequenzen bis hin zu multiplen Domänen. Die internen Wiederholungen entstanden evolutionär durch intragenetische Duplikation und Rekombination. Sie sind vor allem in eukaryotischen Proteinen vorhanden. Die sich wiederholenden Sequenzen entwickeln eine reguläre Sekundärstruktur und bilden somit die Grundlage als Interaktionsplattform. Oftmals sind die Repeats linear oder superhelikal angeordnet, sodass es keine sterische Begrenzung gibt.

Auf Grund vergleichbarer Eigenschaften können neben den PDZ- und TPR-Domänen auch andere (verwandte) Bindungsdomänen mit Peptidsequenzen in Kontakt treten. Als mögliche Interaktionspartner der C-terminalen Sequenz cytosolischer und nucleärer Fe/S-Proteine kommen die Proteine des CIA-Targeting-Komplexes in Betracht. Met18 ist ein HEAT-Repeat-Protein. Die Bezeichnung HEAT stellt ein Akronym aus den vier eukaryotischen Proteinen dar, in welchen die Repeats zuerst entdeckt wurden: Huntingtin, dem Elongationsfaktor EF3, der regulatorischen Untereinheit der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) und der Signalkinase TOR1 (Andrade & Bork, 1995). HEAT-Repeats sind strukturell ähnlich zu den TPRs. Anhand der Primärstruktur sind die Motive schwer zu identifizieren, aber die Sekundär- und Tertiärstruktur ist hoch charakteristisch und stark konserviert (Yoshimura & Hirano, 2016). Es handelt sich um eine repetitive Abfolge von 30 - 40 Aminosäure-langen Motiven. Ein HEAT-

Repeat-Protein besitzt durchschnittlich 15-50 Wiederholungen. Bezüglich der Domänen-Organisation lassen sich die Proteine mit diesem Strukturmotiv in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe bilden Proteine mit einer konsekutiven Wiederholung des Motives ohne erkennbare andere Strukturen. In der zweiten Gruppe treten die HEAT-Repeats in Blöcken auf, wohingegen die Mitglieder aus Gruppe drei über weitere definierte strukturelle oder funktionelle Domänen verfügen (Yoshimura & Hirano, 2016). Eine Wiederholung bildet zwei antiparallele α -Helices aus, strukturell ein Helix-Turn-Helix-Motiv. Die parallele Stapelung der Wiederholungen bildet eine Spulenstruktur mit einer konvexen und einer konkaven Oberfläche (Bindungsfurche) (Andrade *et al.*, 2001). Beide Helices sind amphipatisch, jedoch sind die hydrophoben Oberflächen durch die intramolekularen Helix-Helix-Interaktionen verborgen. Diese Anordnung ist sehr flexibel, bei Interaktion mit den Bindungspartnern oder als Antwort auf intrazelluläre Bedingungen können elastische Konformationsänderungen möglich sein (Yoshimura & Hirano, 2016). Alle bekannten Mitglieder der HEAT-Proteinfamilie scheinen überdurchschnittlich groß zu sein (Andrade & Bork, 1995). Sie treten oft als Teil eines Multiproteinkomplexes auf. Viele sind an cytosolischen Transportprozessen beteiligt.

Met18 weist mindesten neun HEAT-Repeat-Motive auf (van Wietmarschen *et al.*, 2012). In jeder der drei Domänen des Proteins (A, B und C) ist mindestens eine Wiederholung vorhanden. Die wichtige Domäne C scheint ausschließlich aus HEAT-Repeats zu bestehen (Hatfield *et al.*, 2006). Auf Grund dieser Strukturelemente besitzt Met18 die Fähigkeit mit mehreren Proteinen in Kontakt zu treten und einen Komplex zu bilden. Eine Interaktion mit der C-terminalen Peptidsequenz wäre möglich.

Daneben dienen auch β -Propeller-Proteine als Interaktionsplattform. WD40-Proteine gehören zu den Hauptinteraktionsdomänen im eukaryotischen Genom. In Prokaryoten kommen sie nur vereinzelt vor (Stirnemann *et al.*, 2010). Beispielsweise sind sie an der Signaltransduktion, dem vesikulären Transport, der Assemblierung des Cytoskelettes, der Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptose und der Regulation der Transkription beteiligt (Xu & Min, 2011). Die Hauptfunktion ist dabei eine Interaktionsgrundlage als Gerüstprotein. Sie dienen als Substratrezeptor, welcher durch Substratselektivität mit verschiedenen Targets interagieren kann. Es sind Bindungen von großen globulären Proteinen, kurzen Peptiden oder Nucleinsäuren bekannt. Ein WD40-Protein ist aus mehreren WD40-Repeats aufgebaut. Dabei besteht eine Wiederholung aus ca. 40 Aminosäuren (tatsächlich 44 - 60 Reste, in der Mitte kann eine variable, nicht konservierte Schleife auftreten) inklusive einem hoch-konservierten Tryptophan-Asparaginsäure-Dipeptid am C-Terminus (WD40) (Stirnemann *et al.*, 2010). Ein Repeat repräsentiert vier antiparallel angeordnete β -Stränge. Vier β -Stränge bilden ein Rotorblatt des Propellers, jedoch stimmen die Aminosäuren eines Motives nicht mit einem Blatt überein. Die drei inneren Stränge eines Blattes entspringen dem ersten Motiv und werden mit dem äußeren Strang des nächsten Motives kombiniert (Interaktionen zwischen N- und C-terminalen Repeats). Zwischen den β -Strängen gibt es starke hydrophobe

Interaktionen (Xu & Min, 2011). Die β -Blätter sind hoch symmetrisch radial um eine zentrale Achse angeordnet. Strukturell sind sieben Blätter (Wiederholungen) ideal und am häufigsten im Proteom vertreten, bekannt sind Proteine mit vier bis acht Wiederholungen. Die Bindungspräferenz von WD40-Proteinen stellt die Propellerachse dar. Die molekulare Erkennung wird zumeist durch die kleinere Proteinoberseite vermittelt, jedoch ist auch eine Bindung an der Unterseite bzw. den Rotoraußenflächen möglich (Xu & Min, 2011). Für Interaktionen über die Proteinoberseite sind Aminosäurereste der Loops zwischen den β -Strängen von Bedeutung (Wu *et al.*, 2012). Generell werden mindestens drei Reste für die Erkennung eines Peptides benötigt.

Das CIA-Targeting-Komplex-Protein Cia1 ist ein β -Propeller-Protein mit WD40-Repeats. Auf Grund der bekannten Funktion dieser Proteinfamilie besitzt Cia1 vermutlich die Fähigkeit reversibel mit anderen Proteinen zu interagieren (Balk *et al.*, 2005b). Wahrscheinlich dient das Protein wie alle bekannten WD40-Proteine als Plattform, auf der sich Proteinkomplexe zusammen lagern können. In der Kristallstruktur des Cia1-Proteins aus Hefe sind sieben Propellerblätter zu erkennen, welche pseudosymmetrisch um eine zentrale Achse angeordnet sind (Srinivasan *et al.*, 2007). Der zentrale Kanal hat einen Durchmesser von 12 Å und ist vorwiegend mit geladenen Aminosäureresten ausgekleidet. Die Struktur wird durch ein ausgeprägtes Wasserstoffbrückennetzwerk stabilisiert. Cia1 besteht aus einer einzelnen WD40-Domäne. Somit kommen als Bindungsstellen nur die zentrale Tunnelregion oder die Schlaufen zwischen den β -Strängen in Betracht. Es wird erwartet, dass die für eine Interaktion wichtigen Aminosäurereste zwischen den Organismen konserviert sind (Webert, 2011). Konservierte Reste treten vermehrt an der Proteinoberseite sowie seitlich an den Propellerblättern zwei und drei auf. In einer Mutagenesestudie wurde der Rest R127 als wichtig für die Funktion des Proteins innerhalb der CIA-Maschinerie identifiziert (Srinivasan *et al.*, 2007).

In einer Studie zur Identifizierung von „Hotspots“ (Aminosäurereste, welche für PPI wichtig sind) auf der Proteinoberseite von WD40-Proteinen wurden vorhandene Kristallstrukturdaten ausgewertet und miteinander verglichen (Wu *et al.*, 2012). Auf dieser Grundlage wird spekuliert, dass Cia1 und CIAO1 mit aromatischen Seitenketten von Phenylalanin-, Tyrosin- oder Tryptophanresten eine π -Interaktion eingehen könnten. Aus struktureller Sicht stellt Cia1 somit den favorisierten potentiellen Bindungspartner der C-terminalen Tryptophan-haltigen Peptidsequenz dar.

Des Weiteren wurden bereits zwei Interaktionen zwischen Cia1 bzw. CIAO1 und Proteinen mit einem C-terminalen Tryptophan beschrieben. Die Bindung von Viperin an CIAO1 wurde mittels Tandem-Affinity-Purification und Massenspektrometrie gezeigt. Nach Kürzung des C-Terminus von Viperin war die Bindung nicht mehr detektierbar (Upadhyay *et al.*, 2014). In Coimmunpräzipitationen des Adapterproteins Lto1, welches im Zusammenspiel mit Yae1 zur Reifung von Rli1 benötigt wird, konnten die Proteine des CIA-Targeting-Komplexes

nachgewiesen werden. Hier war der C-terminale Tryptophanrest von Lto1, welches selbst keinen Fe/S-Cluster bindet, kritisch (Paul *et al.*, 2015).

Daneben sind weitere Beispiele bekannt, in welchen eine Interaktion zu einem WD40-Protein über einen Tryptophanrest vermittelt wird. Für die Bindung des UbE (*ubiquitin-dependent endocytosis*)-Motivs des GH (*growth hormone*)-Rezeptors an das WD40-Protein β TrCP (*β -transducin repeat-containing protein*) im Rahmen der Endocytose des Rezeptors, sind die aromatischen internen Reste W324 und P327 des Substrates wichtig (da Silva Almeida *et al.*, 2013). Das Protein Amphiphysin weist neben dem typischen Clathrin-Box-Motiv eine weitere Bindestelle auf, um mit der N-terminalen β -Propeller-Domäne des Vesikel-Proteins Clathrin zu interagieren. Die W-Box genannte interne Sequenz PWXXW bindet in einer kompakten helikalen Struktur an der Proteinoberseite in einer Bindetasche (Miele *et al.*, 2004). Des Weiteren interagiert das C-terminale Motiv WRPW von basischen Helix-Loop-Helix-Proteinen (bHLH) wie Hairy oder Runx (Transkriptionsfaktoren) mit der WD40-Domäne der TLE (*transducin-like enhancer-of-split*)-Proteinfamilie von Corepressoren (Jennings *et al.*, 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass ein Tryptophanrest am C-terminalen Ende von cytosolischen Fe/S-Proteinen wichtig ist (siehe 4.1 und 5.1). Die Funktion auf molekularer Ebene ist jedoch noch unklar. Ein Zusammenhang mit der Reifung der betroffenen Proteine wird vermutet. Hinweise aus der Struktur der potentiellen Bindungspartner bzw. aus der Literatur deuten auf eine Interaktion mit dem CIA-Targeting-Komplex hin. Um über die Identifikation eines Interaktionspartners Rückschlüsse auf die Funktion des Tryptophans ziehen zu können, wurden verschiedene Bindungsstudien durchgeführt.

Zunächst wurde das Y2H-System eingesetzt, um Interaktionen *in vivo* nachweisen zu können. Als interne Positivkontrollen wurden hierfür die Interaktionen der Proteine des CIA-Targeting-Komplexes untereinander herangezogen. In Tabelle 5.2 sind die Verbindungen aufgelistet, welche in proteomweiten High-Throughput-Untersuchungen aufgedeckt werden konnten. Mit dem Y2H-System waren dies Cia1 mit Cia2 sowie Met18 mit Cia2 in *S. cerevisiae* (Uetz *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2008). Im Menschen konnten alle drei Proteine miteinander in Verbindung gebracht werden (Yu *et al.*, 2011; Rolland *et al.*, 2014).

Diese Verbindungen konnten auch im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.12, Abbildung 4.16 und Abbildung 4.18). Es ist zu betonen, dass es von erheblicher Bedeutung ist, welches Protein als Bait und welches als Prey eingesetzt wird. Auch in den aufgeführten Analysen des kompletten Proteoms wurde nur in einem Fall eine Interaktion sowohl mit dem Bait als auch mit dem Prey Protein bestätigt (Cia1 mit Cia2) (Ito *et al.*, 2001).

Tabelle 5.2: PPI des Targeting-Komplexes, identifiziert in High-Throughput-Studien

	Bait	Prey	Methoden	Referenz
Hefe	Cia1	Cia2	Y2H	Uetz <i>et al.</i> , 2000
	Cia1	Cia2	Y2H	Ito <i>et al.</i> , 2001
	Cia2	Cia1	Y2H	Ito <i>et al.</i> , 2001
	Cia1	Met18	MS	Ho <i>et al.</i> , 2002
	Cia2	Cia1	MS	Krogan <i>et al.</i> , 2006
	Cia2	Met18	MS	Krogan <i>et al.</i> , 2006
	Met18	Cia2	Y2H	Yu <i>et al.</i> , 2008
	Cia2	Met18	PCA	Tarassov <i>et al.</i> , 2008
Mensch	FAM96B	CIAO1	Y2H	Yu <i>et al.</i> , 2011
	MMS19	CIAO1	Y2H	Yu <i>et al.</i> , 2011
	MMS19	CIAO1	MS	Stehling <i>et al.</i> , 2012
	MMS19	FAM96B	MS	Stehling <i>et al.</i> , 2012
	CIAO1	FAM96B	Y2H	Rolland <i>et al.</i> , 2014
	CIAO1	MMS19	Y2H	Rolland <i>et al.</i> , 2014
	CIAO1	FAM96B	Y2H	Rual <i>et al.</i> , 2005
	MMS19	CIAO1	MS	Huttlin <i>et al.</i> , 2015; Huttlin <i>et al.</i> , 2017
	MMS19	FAM96B	MS	Huttlin <i>et al.</i> , 2015; Huttlin <i>et al.</i> , 2017

In den drei Studien der Positivkontrollen (Stamm Y187 mit Hefe-Proteinen, Stamm Y187_TetO₇_NAR1 mit Hefe-Proteinen und Stamm Y187 mit humanen Proteinen) stimmten in allen Fällen die Ergebnisse der qualitativen Methode mittels X-Gal und der quantitativen Methode mittels ONPG nicht überein. Beispielsweise konnte mit den Hefe-Proteinen in Stamm Y187 qualitativ eine schwache Interaktion zwischen Cia2 als Prey- und Met18 als Bait-Protein beobachtet werden. Diese zeigte mit der ONPG-Methode keine Aktivität. Wurde Cia2 als Prey- eingesetzt und Cia1 als Bait-Protein, verhielt es sich umgekehrt. Diese Diskrepanzen werden der Ungenauigkeit der qualitativen Methode zugeschrieben. Auf Grund der Subjektivität der Beurteilung wurde diese nicht für die Untersuchung der Targetproteine verwendet. Die Ergebnisse der quantitativen Methode sind, auch wegen der größeren Fallzahl (n = 3), verlässlicher. Die Resultate der Kontrollen in Stamm Y187 in Relation zu Stamm Y187_TetO₇_NAR1 stimmten gut überein. Die Aktivitätswerte der β -Galactosidase bewegten sich bei den positiven Interaktionen in der gleichen Größenordnung.

In der Y2H-Studie mit den Targetproteinen Leu1 bzw. Leu1D und Apd1 konnten keine Interaktionen festgestellt werden (siehe Abbildung 4.13). Erhöhte Aktivitätswerte des Reporterproteins bei Kombinationen, in welchen Cia2 als Bait-Protein verwendet wurde, lassen sich auf eine gewisse Selbstaktivierung des Plasmides pGBKT7_Cia2 zurückführen.

Um die Dauer einer möglichen Interaktion zu verlängern, wurden die regulierbaren Hefestämme Y187_TetO₇_NAR1 und Y187_TetO₇_NBP35 konstruiert. Eine Herunterregulation der frühen CIA-Maschinerie soll den Einbau des Fe/S-Cofaktors in Targetproteine verhindern und so die Stabilität des nachzuweisenden Komplexes stärken. Die Depletion des frühen CIA-Faktors *NBP35* führte bereits in einer Bindungsstudie mittels Affinity-Purification zur Detektion von Interaktionspartnern des Yae1-Lto1-Komplexes zu erhöhter Copräzipitation der späten CIA-Proteine (Paul *et al.*, 2015). Der Y2H-Stamm Y187_TetO₇_NAR1 zeigte sich gut depletierbar mit 5 µg/ml Doxycyclin. Y187_TetO₇_NBP35 hingegen nicht, sodass auf den Einsatz dieses Stammes in einem Y2H-Screening verzichtet wurde (siehe Abbildung 4.15). Dieser Ansatz führte jedoch auch nicht zu einem Nachweis einer Interaktion zwischen einem Protein des CIA-Targeting-Komplexes und einem Targetprotein (siehe Abbildung 4.17). Die Depletion von *NAR1* stellte bei dieser Anwendung somit keine Verbesserung der Methode dar.

Bis heute (Stand 9/2018) ist in der Datenbank BioGRID keine Interaktion zwischen Leu1 oder Apd1 und einem Protein des CIA-Targeting-Komplexes aufgeführt (Stark *et al.*, 2006; Chatr-Aryamontri *et al.*, 2017). In *S. cerevisiae* sind bisher überhaupt nur vier physische Interaktionen zwischen dem CIA-Targeting-Komplex und cytosolischen bzw. nucleären Fe/S-Proteinen in der Datenbank gelistet: eine Interaktion zwischen Cia2 und Dna2 (Gavin *et al.*, 2002) sowie drei Interaktionen mit Met18: Dna2, Rli1 und Rad3 (Stehling *et al.*, 2012; Gavin *et al.*, 2002; Gavin *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2002). Im menschlichen Proteom konnte bereits ca. die Hälfte der identifizierten Fe/S-Proteine mit CIAO1, FAM96B oder MMS19 in Verbindung gebracht werden. Diese Nachweise sind in Tabelle 5.3 zusammengestellt. An der Aufklärung dieser Verbindungen waren hauptsächlich zwei Studien beteiligt, worin mittels Multidimensionaler-Protein-Identifikations-Technologie (MudPIT)-basierter Massenspektroskopie speziell nach Interaktionspartnern des CIA-Targeting-Komplexes gesucht wurde (Stehling *et al.*, 2012; Stehling *et al.*, 2013).

Eine ähnliche Studie innerhalb des Hefe-Proteoms führte nicht zu dem gewünschten Erfolg (Paul *et al.*, 2015). Ein Vergleich der Anzahl an nachgewiesenen Interaktionen von drei Targetproteinen bei Hefe zu 22 beim Menschen deutet darauf hin, dass die Bindung an den CIA-Targeting-Komplex beim Menschen stabiler ist. Die Durchführung einer Y2H-Studie mit den humanen Homologen und den ausgewählten Targetproteinen Viperin und GPAT resultierte jedoch auch nicht in positiven Interaktionsnachweisen (siehe Abbildung 4.19).

Tabelle 5.3: Bekannte PPI zwischen CIAO1, FAM96B & MMS19 mit Fe/S-Proteinen

	CIAO1		FAM96B		MMS19
ABCE1	Stehling <i>et al.</i> , 2013	ABCE1	Stehling <i>et al.</i> , 2013	ABCE1	Stehling <i>et al.</i> , 2012
CDKAL1	Stehling <i>et al.</i> , 2013; Huttlin <i>et al.</i> , 2017	CDKAL1	Stehling <i>et al.</i> , 2013	CDKAL1	Stehling <i>et al.</i> , 2012; Huttlin <i>et al.</i> , 2017
DNA2	Stehling <i>et al.</i> , 2013; Huttlin <i>et al.</i> , 2017	DNA2	Stehling <i>et al.</i> , 2013	DNA2	Stehling <i>et al.</i> , 2012; Huttlin <i>et al.</i> , 2017
-		-		DPH1- DPH2	Stehling <i>et al.</i> , 2012
ELP3	Stehling <i>et al.</i> , 2013	ELP3	Stehling <i>et al.</i> , 2013	ELP3	Stehling <i>et al.</i> , 2012
-		-		FANCI	Stehling <i>et al.</i> , 2012
GPAT	Stehling <i>et al.</i> , 2013	GPAT	Stehling <i>et al.</i> , 2013	GPAT	Stehling <i>et al.</i> , 2012
GRX3- GRX4	Stehling <i>et al.</i> , 2013	GRX3- GRX4	Stehling <i>et al.</i> , 2013	GRX3- GRX4	Stehling <i>et al.</i> , 2012
IOP1	Stehling <i>et al.</i> , 2013	IOP1	Stehling <i>et al.</i> , 2013	IOP1	Stehling <i>et al.</i> , 2012
-		-		IOP2	Stehling <i>et al.</i> , 2012
IREB2	Stehling <i>et al.</i> , 2013	IREB2	Stehling <i>et al.</i> , 2013		
MAK16	Stehling <i>et al.</i> , 2013	MAK16	Stehling <i>et al.</i> , 2013	MAK16	Stehling <i>et al.</i> , 2012
-		-		MUTYH	Stehling <i>et al.</i> , 2012
-		NTHL1	Stehling <i>et al.</i> , 2013	NTHL1	Stehling <i>et al.</i> , 2012
POLA1	Stehling <i>et al.</i> , 2013	-		POLA1	Stehling <i>et al.</i> , 2012
POLD1	Stehling <i>et al.</i> , 2013	POLD1	Stehling <i>et al.</i> , 2013	POLD1	Stehling <i>et al.</i> , 2012
POLE1	Stehling <i>et al.</i> , 2013	POLE1	Stehling <i>et al.</i> , 2013	POLE1	Stehling <i>et al.</i> , 2012
PRIM2	Stehling <i>et al.</i> , 2013	PRIM2	Stehling <i>et al.</i> , 2013	PRIM2	Stehling <i>et al.</i> , 2012
RTEL1	Stehling <i>et al.</i> , 2013	RTEL1	Stehling <i>et al.</i> , 2013	RTEL1	Stehling <i>et al.</i> , 2012
TYW1	Stehling <i>et al.</i> , 2013	TYW1	Stehling <i>et al.</i> , 2013	TYW1	Stehling <i>et al.</i> , 2012
Viperin	Upadhyay <i>et al.</i> , 2014	-		-	
XPD	Stehling <i>et al.</i> , 2013	XPD	Stehling <i>et al.</i> , 2013	XPD	Stehling <i>et al.</i> , 2012

Um die Methode weiter an diesen speziellen Anwendungsfall anzupassen, wurde im Zuge eines Y3H-Systems ein weiteres Protein in das System eingebracht. Die Verwendung des Plasmides pBridge ermöglichte die parallele Expression von Cia1 und Cia2. Möglicherweise findet eine Bindung des Targetproteins nur an kombinierte Proteine des CIA-Targeting-Komplexes statt. Auf Grund von Wachstumsdefiziten des Stammes AH109 musste auf den Methionin-auxotrophen Stamm Y187 zurückgegriffen werden. Da das Gen in der MCSII unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors steht, musste die zugegebene Methioninmenge abgewägt werden. Durch Zugabe von Methionin nimmt die Expression eines regulierten Gens exponentiell ab (Mumberg *et al.*, 1994). Daher wurde die zur Komplementation der Stamm-Auxotrophie zugesetzte Menge um 75 % auf 45 μ M verringert. Dies führt nach Mumberg *et al.* zu einer *MET25*-Promotor-Restaktivität von ca. 85 %. Die Positivkontrolle, eine

Kombination des vollständigen CIA-Targeting-Komplexes aus pBridge_Cia1_Cia2 und pGADT7_Met18, zeigte jedoch keine Enzymaktivität des Reporterproteins. Ein Austausch des *MET25-* gegen den *TDH3*-Promotor änderte dies nicht. Da bereits die bekannte Interaktion mit Met18 nicht nachgewiesen werden konnte, ist es nicht verwunderlich, dass auch in diesem System keine Bindung eines Targetproteins detektiert wurde. Möglicherweise ist die Reihenfolge der Gene auf dem Plasmid pBridge von Bedeutung. Im Gegensatz zu den Hefe-Homologen (CIA1 in MCSI und CIA2 in MCSII) wurde basierend auf den möglichen Restriktionsschnittstellen zur Klonierung des Plasmides, die Reihenfolge bei den humanen Genen geändert (CIAO1 in MCSII und FAM96B in MCSI). Die Positivkontrolle dieses Systems (pBridge_FAM96B_CIAO1 mit pGADT7_MMS19) zeigt mit einer Aktivität von 243 mU/mg den höchsten Wert, welcher mit der ONPG-Methode im Verlauf aller Y2H-Analysen bestimmt wurde (siehe Abbildung 4.21). Die gleichzeitige Expression von CIAO1 neben FAM96B und MMS19 scheint die Interaktion deutlich zu stabilisieren. Die Aktivität ist um das 2,5-fache erhöht, im Vergleich zu pGBKT7_FAM96B mit pGADT7_MMS19 (99 mU/mg). Diese Steigerung hat jedoch keinen Effekt auf die Interaktionen zu den Targetproteinen. Auch mit dem Y3H-System konnte keine Bindung eines Fe/S-Proteins mit einem C-terminalen Tryptophan an ein Protein des CIA-Targeting-Komplexes nachgewiesen werden.

In einer zukünftigen Untersuchung könnte die Reihenfolge der Hefe-Gene *CIA1* und *CIA2* auf dem Vektor pBridge geändert werden. Des Weiteren sollten die humanen Homologe in dem regulierbaren Stamm Y187_TetO₇_NAR1 untersucht werden.

Einen großen Vorteil des Y2H-Systems stellt die native Konformation der untersuchten Proteine dar, da die Detektion *in vivo* erfolgt (Snider *et al.*, 2015). Das System ist sensitiv genug, um für die Interaktion kritische Reste zu identifizieren. Es ist gut skalierbar und erlaubt sowohl High-Throughput-Screenings einer Library als auch einen kleinen Maßstab. Die Methode ist einfach und kostengünstig etablierbar. Jedoch ermöglicht sie vor allem die Untersuchung binärer Interaktionen (Berggård *et al.*, 2007). Des Weiteren werden die überexprimierten Proteine zum Auslesen in den Nucleus transportiert. Dies entspricht für viele Proteine nicht der natürlichen Umgebung, sodass mögliche weitere Interaktionspartner nicht zur Verfügung stehen. Dieses Problem wird als die größte Schwachstelle der durchgeführten Studien ausgemacht, da der vollständige CIA-Targeting-Komplex für eine positive Bindung benötigt werden könnte (Dennis Winge, persönliche Mitteilung). Neben vielen falsch-positiven Ergebnissen, ausgelöst durch intrinsische DNA-Bindung oder Fähigkeiten die Transkription des Reporterproteins zu aktivieren (Cia2 als Bait-Protein), werden nicht alle Interaktionen detektiert. Gründe hierfür sind eine falsche Faltung oder mangelnde Stabilität des Fusionsproteins. Dies kann für die Konstrukte des CIA-Targeting-Komplexes, belegt durch die internen Positivkontrollen, ausgeschlossen werden. Darüber hinaus können bei der Expression von menschlichen Proteinen für die Interaktion wichtige posttranslationale Modifikationen oder weitere Bindungspartner in Hefezellen fehlen.

Um den Nachteil der Lokalisierung im Nucleus im klassischen Two-Hybrid-System zu umgehen, wurden verschiedene Y2H-Methoden für speziellere Anwendungen entwickelt, damit PPIs in deren nativer Umgebung aufgedeckt werden können (Brückner *et al.*, 2009). Im Folgenden werden Varianten erläutert, welche für cytosolische Proteine und damit zur Analyse des CIA-Targeting-Komplexes geeignet sind. Die Auslesung der Interaktion erfolgt anstatt transkriptional im Nucleus, mittels cytosolischer Signalkaskaden oder durch Split-Protein-Konstrukte. Zum einen kann das SRS (*Sos recruitment system*) sowohl für cytosolische Proteine, als auch für Membranständige verwendet werden. Etabliert, um auch Transkriptionsfaktoren untersuchen zu können, basiert es auf der komplementären Rettung eines temperatursensitiven *cdc25-2* Stammes durch das humane Homolog hSos (Aronheim *et al.*, 1997). Hierbei wird eine C-terminal gekürzte Version von hSos ohne Membranlokalisierung mit einem Protein X fusioniert (Bait). Auf einem zweiten Plasmid wird ein Protein Y mit einem Membrananker (z. B. Myristoylierungs-Signal) versehen (Prey). Nur bei einer Interaktion zwischen den Proteinen X und Y gelangt hSos zur Membran und ist fähig den Austausch von GDP zu GTP des G-Proteins Ras zu aktivieren und so mittels Auslösen des MAPK-Signalwegs den *cdc25-2* Phänotyp zu umgehen. Positive Klone sind in der Lage bei 36 °C zu wachsen. Eine Weiterentwicklung dieses Systems stellt das RRS (*Ras recruitment system*) dar (Broder *et al.*, 1998). In diesem Fall wird ein Protein X direkt mit einer cytosolischen konstitutiv aktivierten Mutante eines Säugetier-Ras-Homologs fusioniert (Bait), sodass kein GTP-Austauschfaktor (Cdc25, SOS) benötigt wird. Das Prey-Protein Y wird ebenfalls mit einer Membranlokalisierungssequenz versehen. Interagieren X und Y miteinander, wird mRas an der Membran lokalisiert und die Signalkaskade gestartet, wodurch *cdc25-2* komplementiert wird und Wachstum bei 36 °C möglich ist. Eine weitere Methode um PPIs in deren natürlichem Kompartiment innerhalb der Zelle zu detektieren, stellt das Split-Ubiquitin-System dar (Johnsson & Varshavsky, 1994). Das Protein Ubiquitin liegt hierbei in zwei unabhängigen Fragmenten vor. Der C-terminale Teil (C_{UB}) ist zum einen an ein beliebiges Reporterprotein gekoppelt und zum anderen mit einem Protein X fusioniert. Um spontane Selbstassemblierung zu verhindern, wird eine punktmutierte (I13G oder I13A) Version des N-terminalen Teils (N_{UB}) eingesetzt und mit einem Protein Y hybridisiert. Durch Interaktion der Proteine X und Y gelangen die zwei Ubiquitinfragmente in räumliche Nähe und sind dann fähig, sich zu einem quasi-nativen Ubiquitin zusammensetzen. Dieses wird wiederum von Ubiquitin-spezifischen-Proteasen (USP) erkannt und das C-terminal gekoppelte Reporterprotein wird freigesetzt. Das Split-Trp-System wurde entwickelt, um ein direktes Auslesen der Interaktion zu ermöglichen. Ein Enzym der Tryptophanbiosynthese, Trp1 (N-(5'-Phosphoribosyl)-anthranilatisomerase) aus *S. cerevisiae*, kann sich ebenfalls aus zwei unabhängig voneinander exprimierten Fragmenten N_{TRP} und C_{TRP} rekonstituieren, wenn diese durch eine PPI X-Y in räumliche Nähe gebracht werden (Tafelmeyer *et al.*, 2004). Dies erlaubt es *trp1*-defizienten Hefestämmen auf Minimalmedium ohne Zusatz von Tryptophan zu wachsen.

Die vorgestellten Varianten weisen durch Lokalisation im Cytosol den Vorteil auf, dass weitere benötigte Proteine, wie z. B. für posttranslationale Modifikationen, zur Verfügung stehen. In wie weit diese Ansätze bei der Detektion von Multiproteinkomplexen helfen, muss experimentell bestimmt werden. Werden zur Bindung von Targetproteinen durch den CIA-Targeting-Komplex alle drei Proteine Cia1, Cia2 und Met18 benötigt, so wären sie bei diesen Y2H-Varianten am Ort der Interaktion verfügbar. Jedoch könnten die angekoppelten Fusionsteile des Systems die Interaktion stören, sodass auch hier keine Komplexbildung zustande kommt.

Als zweite Methode zur Untersuchung einer Interaktion zwischen dem cytosolischen Fe/S-Referenzprotein Leu1 und dem CIA-Targeting-Komplex fand die CoIP Verwendung. Diese Methode dient hauptsächlich der Verifizierung bereits identifizierter PPI (Berggård *et al.*, 2007). Sie ist ohne den Einsatz von Tags möglich und erlaubt so die Detektion endogener Protein-Komplexe. Zur Präzipitation wurden Leu1-spezifische Immunobeads eingesetzt. Ein großes Defizit dieser Studie stellt die mangelhafte Qualität des Cia1-Antikörperserums dar. Es wird empfohlen, die vorhandenen Proben mit einem neuen Antiserum erneut zu analysieren. Die Antikörperseren gegen Cia2 bzw. Met18 lieferten verlässlichere Ergebnisse, auch wenn Cia2 (26 kDa) nicht genau bei der berechneten molekularen Masse detektiert wurde. Cia2 ist ein saures Protein mit einer großen Zahl an negativen Ladungen (kalkulierter isoelektrischer Punkt: 4,29 (Cherry *et al.*, 2012)). Dies führt zu einem untypischen Laufverhalten in der SDS-PAGE, sodass die Laufgeschwindigkeit nicht optimal mit der theoretischen Proteingröße korreliert. Da weniger SDS gebunden werden kann, ist die Gesamtladung des Komplexes nicht so negativ wie bei neutralen Proteinen. Wenn keine chemische Modifizierung (z. B. Glykosylierung) des Proteins vorliegt, kann aus der Aminosäurezusammensetzung das in der SDS-PAGE-angezeigte Molekulargewicht prognostiziert werden (Guan *et al.*, 2015). Mit Hilfe einer linearen Gleichung kann aus dem prozentualen Anteil der sauren Aminosäuren D und E die durchschnittliche Abweichung pro Rest ermittelt werden. Der Anteil dieser Aminosäuren beträgt bei Cia2 19,5%, sodass eine Abweichung von ca. 6 kDa vorausgesagt wird. Beobachtet wurde eine Abweichung von 9 kDa.

Die IP von Leu1 zeigte keine Copräzipitation von Cia1, Cia2 oder Met18 (siehe Abbildung 4.23). Der Versuch, die Dauer der postulierten Bindung durch Mutation der Clusterliganden C421 und C424 zu verlängern, resultierte ebenfalls nicht in einem Nachweis einer Interaktion (siehe Abbildung 4.24). Die gleichzeitige Überexpression der späten CIA-Faktoren konnte den CIA-Targeting-Komplex zwar deutlich stabilisieren, dies hatte aber keinen Einfluss auf Leu1 (siehe Abbildung 4.25). Da in den drei durchgeführten Studien keine spezifische Bindung zwischen Leu1 und den vermuteten Interaktionspartnern nachgewiesen werden konnte, kann eine Rolle des C-terminalen Tryptophans nicht beurteilt werden. Es ist anzunehmen, dass eine mögliche Interaktion zu Targetproteinen sehr transient ist. Eine solch schwache Bindung könnte im Verlauf der Aufreinigung in den Waschschrritten gelöst worden sein.

Die gleichzeitige Überexpression der drei Proteine des CIA-Targeting-Komplexes wurde durch die Transformation eines divergent regulierbaren 2 μ -Plasmides in einen regulierbaren Hefestamm ermöglicht, sodass alle drei Gene unter der Kontrolle des *GAL1-10*-Promotors standen. Hierbei lag die *CIA1*-Kopie chromosomal vor und *CIA2* und *MET18* auf dem Plasmid. Diese Kombination führte zu einem Wachstumsdefizit, wenn Galactose (als Induktor der Expression) als alleinige Kohlenstoffquelle diente. Dies ist auf eine zu starke Expression von Cia2 zurückzuführen, welches in hoher Konzentration toxisch für die Zelle ist. Durch Zugabe von Glucose konnte das Wachstum gesteigert werden, jedoch zulasten der Expression der zwei weiteren Gene. In einer weiteren Studie könnte *CIA2* auf dem verwendeten Plasmid p424_Cia2_Gal1-10_Met18 gegen eine *CIA1*-Kopie ausgetauscht und das neue Konstrukt p424_Cia1_Gal1-10_Met18 in den Stamm GalL_CIA2_Δ*leu1* transformiert werden. Der *GALL*-Promotor ist nicht so stark wie der bei dem Stamm Gal_CIA1_Δ*leu1* verwendete *GAL1-10*-Promotor, sodass dieser Ansatz ein besseres Wachstum bei Überexpression der drei Faktoren ermöglichen könnte.

Die durchgeführte Variante der Co-IP in Kombination mit WB birgt den Nachteil, dass bei der Denaturierung der Proben die schweren und leichten Ketten der Antikörper ebenfalls vom Säulenmaterial abgetrennt werden und den folgenden Western Blot verunreinigen. Die leichte Kette weist ein Molekulargewicht von ca. 28 kDa auf, die schwere Kette von ca. 60 kDa (Qoronfleh *et al.*, 2003). Diese Verunreinigung lässt sich umgehen, indem nicht nur die spezifische Bindung zwischen Protein A und der Fc-Region des Antikörpers ausgenutzt wird, sondern diese durch eine chemische Quervernetzung fixiert wird. Alternativ kann der Antikörper auch direkt kovalent ohne Protein A oder G an Trägermaterial gekoppelt werden. Eine kovalente Fixierung verhindert das Lösen der Antikörper vom Trägermaterial bei der Detektion präzipitierter Proteinkomplexe (Qoronfleh *et al.*, 2003). Diese Modifizierung wäre jedoch vor allem bei positiven Resultaten von Interesse, um die Ergebnisse sauberer darzustellen.

Den Nachteil der CoIP, dass schwache Bindungen im Zuge der Aufreinigung verloren gehen, könnte durch chemische Quervernetzung behoben werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode nur in Verbindung mit rekombinant gereinigtem Protein und FITS-markierten Peptiden eingesetzt. Synthetische Peptide, abgeleitet von cytosolischen und nucleären Fe/S-Proteinen, mit und ohne ein C-terminales Tryptophan wurden durch den „Null-Längen“-Quervernetzer EDC mit Cia1 bzw. CIAO1 verbunden. Die detektierten Banden waren bei den Peptiden mit Tryptophan deutlich intensiver als bei den Peptiden mit einem C-terminalen Alaninrest (siehe Abbildung 4.33). Dies deutet auf eine spezifische Interaktion des Tryptophans hin. Jedoch war diese Reaktion nicht Cia1 bzw. CIAO1-spezifisch. Die Intensitätsverhältnisse waren bei den zwei Kontrollproteinen LDH und EDA ähnlich ausgeprägt. Möglicherweise interagieren die Peptide mit einem C-terminalen Tryptophan in dieser Methode stärker durch hydrophobe Interaktionen und führen zu vermehrter Quervernetzung.

Darüber hinaus sollte eine Studie in Zellextrakten bzw. in lebenden Zellen durchgeführt werden. Chemische Quervernetzung ermöglicht die Etablierung strukturell definierter Interaktionen durch kovalente Verbindung von funktionellen Gruppen innerhalb eines Proteins (Sinz *et al.*, 2015). Zunächst müsste ein passendes Verlinkungsreagenz evaluiert werden. Einen großen Einfluss auf den Erfolg des Experiments hat hierbei die eingesetzte Spacerlänge des Reagenzes. Beispielsweise könnten die Amin-reaktiven Imidoester DMP (Dimethylpimelimidat, Spacerarm von sieben Atomen) oder DMS (Dimethylsuberimidat, Spacerarm von acht Atomen) oder das *N*-Hydroxysuccinimidester (NHS)-Reagenz DSS (Disuccinimidylsuberat, Spacerarm von acht Atomen) ausgetestet werden. Diese Reagenzien reagieren mit primären Aminseitenketten wie Lysin, welche sich auf Grund der positiven Ladung oft an der Proteinoberfläche befinden und daher einfach zu vernetzen sind (Thermo Scientific). Imidoester reagieren mit Aminen zu Amidinen, diese Reaktion läuft bevorzugt im Basischen ab (pH = 10). Die Reaktion von NHS-Estern mit Aminen zu Amidinen findet unter milderen Bedingungen (pH = 7-8,5) statt und führt zu stabileren Bindungen. Das optimale Quervernetzungsreagenz sollte dann auf frisch präparierte Gesamtzellextrakte gegeben werden, um die Proteinkomplexe *ex vivo* vor der IP zu fixieren. Alternativ könnten frisch geerntete Hefezellen 30 min mit dem Reagenz inkubiert und anschließend aufgeschlossen werden. Dieses Vorgehen verhindert das Lösen schwacher PPI während der Zellyse und Verdünnung. Erfolgt die Analyse der copräzipitierten, quervernetzten Proteine mittels Western Blot, könnten spaltbare Quervernetzungsreagenzien eingesetzt werden. DSP (Dithiobis(succinimidylpropionat), Lomant's Reagenz) ist äquivalent zu DSS oder DTBT (Dimethyldithiobispropionimidat, Wang und Richard's Reagenz) zu DMS. Sie verfügen jedoch über eine Spaltstelle innerhalb des Spacerarms. In diesem Fall sind Disulfidbrücken in dem Molekül vorhanden, welche reduktiv (durch Zugabe von DTT oder β -Mercaptoethanol) gespalten werden können. Somit können die verknüpften Bindungen wieder gelöst werden, um die vernetzten Proteine leichter nachzuweisen. Beispielsweise kann eine Probe zum Teil unter reduzierenden und zum Teil unter nicht reduzierenden Bedingungen auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Banden anschließend miteinander verglichen werden.

Eine sensitivere Methode zur Detektion copräzipitierter Proteine wäre eine Kombination mit Massenspektrometrie (MS) (Sinz *et al.*, 2015). Die Verknüpfung von chemischer Quervernetzung mit Massenspektrometrie ist gut geeignet, um Proteinkomplexe zu untersuchen. Die Quervernetzung setzt eine physische Nähe von zwei Proteinen voraus. Die Analyse der MS-Daten ermöglicht die genaue Lokalisierung der Quervernetzung (Leitner *et al.*, 2016). Dadurch können die an der Interaktion beteiligten Reste bestimmt werden. Diese Methode wurde in den vergangenen Jahren erfolgreich eingesetzt, um Strukturen molekularer Maschinen, welche an den meisten essentiellen zellulären Prozessen beteiligt sind, aufzudecken.

Als weitere *in vivo* Methode wurde die Nachbarschafts-abhängige Biotin-Identifizierung eingesetzt. Der Vorteil dieser Methode in Relation zum Y2H-System besteht darin, dass die

untersuchten Proteine im richtigen Kompartiment und somit ihrem natürlichen zellulären Kontext vorliegen. Die Biotinligase erreicht auch schwache und transiente Interaktionspartner, sodass die komplette Mikroumgebung des Bait-Proteins detektiert werden kann, inklusive indirekter Bindungspartner, welche sich in der Nähe des Proteins befinden. Einen Nachteil der Methode stellt die Cytotoxizität der promiskuitiven BirA* dar. Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit zum Problem, sodass verschiedene Plasmidarten und Promotoren ausgetestet werden mussten. Letztlich führte eine mäßige Expression auf Vektoren der Plasmidserie p41x unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors zu einem stabilen Wachstum. Des Weiteren kann die relativ große Hybriddomäne die Faltung des Proteins beeinflussen oder gar eine Interaktion sterisch verhindern (Snider *et al.*, 2015).

In dieser Arbeit fand die promiskuitive Biotin-Ligase BirA* (R40G) aus *Aquifex aeolicus* Verwendung. Dieses Enzym zeichnet sich auf Grund seiner geringen Größe (die nicht benötigte DNA-Bindedomäne fehlt) mit einer höheren Biotinylierungseffizienz aus als die vergleichbare Biotin-Ligase aus *E. coli* (Tron *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2016). Um eine stabile Expression des bakteriellen Proteins in *S. cerevisiae* zu gewährleisten, wurde die Sequenz des Gens bei der Synthese Codon-optimiert. Diese Vorgehensweise verhindert negative Effekte bei der heterologen Genexpression auf Grund unterschiedlicher t-RNA-Level in den Organismen oder störender regulatorischer Elemente (Gustafsson *et al.*, 2004).

Als natürlicher Hintergrund sind in *S. cerevisiae* sechs Proteine bekannt, welche mit Streptavidin interagieren. Neben den typischen biotinylierten Carboxylasen, den zwei Isoformen der Acetyl-CoA-Carboxylase (cytosolisches Acc1 (250 kDa) und mitochondriales Hfa1 (242 kDa)), der Urea-Amidolyase Dur1,2 (202 kDa) und den Pyruvat-Carboxylasen 1 und 2 Pyc1 und Pyc2 (beide ca. 120 kDa) entspricht eine Bande im Western Blot bei 45 kDa dem tRNA-Bindeprotein Arc1 (*aminoacyl-tRNA synthetase cofactor*) (Brewster *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2004; Pirner & Stolz, 2006). Die Pulldown-Fractionen mit Streptavidin-magnetischen Beads zeigen deutlich intensivere Banden bei 45 kDa und 120 kDa im Western Blot, welcher mit Streptavidin-Konjugat entwickelt wurde, im Vergleich zu den Gesamtzell-extraktproben (siehe Abbildung 4.27 und Abbildung 4.28). Dies bestätigt die erfolgreiche Präzipitation biotinylierter Proteine. Das Leu1-C-Terminus-BirA*-Hybridprotein konnte ebenfalls erfolgreich angereichert werden, das Cia1-Fusionsprotein hingegen nicht.

Möglicherweise stört hier die zusätzliche Domäne die korrekte Proteinfaltung. In beiden Fällen erfolgte die Fusion N-terminal des zu untersuchenden Proteins. Wie beim Anhängen eines Tags kann auch hier die Position der fusionierten Ligase von Bedeutung sein. In einem weiteren Experiment sollte BirA* C-terminal von Cia1 angefügt und die Expression bzw. Anreicherung mittels Streptavidin-Präzipitation untersucht werden. Eine weitere Stell-schraube dieser Versuchsreihe stellt der eingefügte GSS-Linker dar. Bisher wurden vier Wiederholungen der Sequenz GSS eingesetzt. Dies soll die räumliche Flexibilität des Enzyms gewährleisten (Smolinski & Valerius, 2016). Der Einsatz längerer flexibler Linker kann den

intrinsischen Biotinylierungsradius der Ligase vergrößern, um weitere Mitglieder eines Proteinkomplexes zu erreichen (Kim *et al.*, 2016). Neben der Länge des Linkers kann die Flexibilität durch Variation der Anzahl an Glycin- und Serinresten beeinflusst werden. Eine Verringerung der Anzahl an Glycinresten hat eine Erhöhung der Steifheit zur Folge (van Rosmalen *et al.*, 2017).

Des Weiteren könnte die Biotin-Konzentration im Medium ein kritischer Faktor der Methode sein. In humanen HEK293-Zellen wird mit 50 μM Biotin supplementiert (Roux *et al.*, 2012). Jedoch wird bei Verwendung der Biotin-Ligase aus *Aquifex aeolicus* weniger Biotin benötigt. Die maximale Biotinylierungsrate wurde bis zu einer Konzentration von nur 3,2 μM Biotin erreicht (Kim *et al.*, 2016). In Hefezellen ist bei Vorlage eines Hochkopiezahl-Plasmides mit einem *MET25*-Promotor der Zusatz von 10 μM Biotin im Medium optimal (Oliver Valerius, persönliche Mitteilung; Smolinski & Valerius, 2016). In Evaluationsversuchen der Kultivierungsbedingungen mit dem Leu1-C-Terminus-Hybrid konnte kein Vorteil einer größeren Menge an Biotin beobachtet werden, sodass mit einer Konzentration von 10 μM gearbeitet wurde. Vielleicht sollten die Bedingungen für jede Untersuchung erneut evaluiert werden.

Das Nichtgelingen der Methode bei der Suche nach unbekanntem Fe/S-Proteinen durch Fusion von Cia1 mit BirA* darf nicht als Beleg angesehen werden, dass diese Methode in Hefe nicht funktioniert. Es besagt auch nicht, dass die Analyse des Leu1-C-Terminus nicht erfolgreich sein kann. Auf Grund der unterschiedlichen Anreicherung der Fusionsproteine in den PD-Frakturen sollten die zwei Untersuchungen unbedingt getrennt voneinander bewertet werden. Erklärungen, weshalb das Cia1-Experiment misslang und mögliche Verbesserungsvorschläge wurden bereits aufgeführt. Ein Funktionsverlust von Cia1 durch die Fusion mit der Biotin-Ligase konnte hier in einem Komplementationsversuch ausgeschlossen werden. In der Versuchsreihe des Leu1-C-Terminus scheint die Biotin-Ligase funktionsfähig zu sein. Jedoch konnten auch in diesem Fall keine Interaktionspartner eindeutig identifiziert werden. Die Proteine Cia1 und Met18 wurden nicht biotinyliert. Um die im Western Blot detektierte Bande, welche Cia2 zugeordnet werden kann, zu verifizieren, sollte ein sensitiverer Nachweis erbracht werden.

Hierzu sollte die Massenspektrometrie eingesetzt werden. Diese Analyse könnte in Kooperation mit Prof. M. Schroda durchgeführt werden. Die Präzipitate sollten tryptisch-verdaut und die resultierenden Peptide beispielsweise durch LC-MS untersucht werden (Sommer *et al.*, 2014; Heide *et al.*, 2009). Die Identifikation der Fragmente würde durch Abgleich mit einer Referenzsequenz-Datenbank erfolgen. Anschließend muss die relative Häufigkeit der detektierten Proteine bestimmt und mit dem Bait-Protein verglichen werden.

Um die massenspektrometrische Analyse quantitativ zu vergleichen, kann sie mit SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) kombiniert werden (Ong *et al.*, 2002). Hierbei wird eine zu untersuchende Kultur mit Isotop-markierten Aminosäuren versetzt,

welche in alle Proteine gleichmäßig eingebaut werden. Anschließend wird die markierte Kultur mit der unmarkierten Kontrollkultur gemischt, als eine Probe aufgeschossen und massenspektrometrisch untersucht. Diese Vorgehensweise verhindert Artefakte durch ungleiche Probenaufarbeitung. Das Verhältnis von Isotop-markierter Aminosäure zu natürlicher Aminosäure jedes identifizierten Proteins gibt Aufschluss über dessen Anreicherung im Vergleich zum Kontrollstamm. Voraussetzung ist eine Auxotrophie des verwendeten Hefestammes gegenüber den eingesetzten markierten Aminosäuren. Gut geeignet sind z. B. ^{13}C - oder ^{15}N -markiertes L-Lysin oder L-Arginin, welche in den Stamm YPH499_Δarg4 eingebaut werden können (Bode *et al.*, 2015). Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurden bereits auf Grundlage dieses Stammhintergrundes die Stämme YPH499_Δarg4_Δleu1 und YPH499_Δarg4_Gal_Cia1 angefertigt.

Die Interaktion des Rezeptors PEX5 mit der C-terminalen Signalsequenz von Proteinen, welche in Peroxisomen importiert werden sollen, wurde durch Fluoreszenzanisotropie-Messungen nachgewiesen (Gatto *et al.*, 2000). Dabei wurden mit Lissaminsulfonamid gelabelte Pentapeptide verwendet. Diese Methode wurde übernommen, um die Interaktion von Peptiden mit einem C-terminalen Tryptophan und den Proteinen des CIA-Targeting-Komplexes *in vitro* zu untersuchen. Da ein Kompromiss zwischen einer möglichst stabilen Bindung und der Vermeidung des sogenannten „Propellereffektes“ (hohe Beweglichkeit des Fluorophors trotz Bindung) gefunden werden musste, wurden N-terminal FITC-markierte Heptapeptide verwendet.

Zunächst sollten sowohl die humanen, als auch die Hefe-Homologe der Proteine Cia1, Cia2 und Met18 heterolog exprimiert und gereinigt werden. Lediglich Cia1 bzw. CIAO1 konnten in zufriedenstellender Reinheit mittels His-Tag isoliert werden. FAM96B bzw. die C-terminale Domäne von Cia2 konnten mit Verunreinigungen durch denaturierende Reinigung aus dem unlöslichen Protein-Pellet (*inclusion bodies*) gewonnen werden. Diese Präparation erschien ausreichend, um die Methode zu etablieren. Im Falle positiver Ergebnisse sollte das angewendete Protokoll modifiziert werden, um sauberes Protein zu erhalten. Auch in der bisher einzigen Veröffentlichung zur Charakterisierung des Cia2-Proteins aus Hefe gelang es nicht, lösliches Protein zu exprimieren (Vo *et al.*, 2017). Dort wurde ebenfalls aus *inclusion bodies* isoliertes, renaturiertes Protein eingesetzt. Zur Isolation von Met18 bzw. MMS19 wurden mehrere Versuche durchgeführt. Dazu gehörten die Reinigung C-terminaler Fragmente mittels His- bzw. MBP-Tag (unlöslich im Pellet) sowie die Reinigung des vollständigen Proteins aus Hefe (zu geringe Expression bzw. proteolytischer Abbau), wodurch keiner dieser Ansätze eine ausreichende Menge des Proteins lieferte. Odermatt & Gari hatten ebenfalls Probleme die C-terminale Domäne aus vier HEAT-Repeats zu exprimieren (Odermatt & Gari, 2017). Die zentrale Region des Proteins musste dem Fragment hinzugefügt werden, um Experimente durchführen zu können. In der Arbeitsgruppe von D. Perlstein gelang, nach vielen Optimierungen (Prof. A. J. Pierik, persönliche Mitteilung), die Reinigung von Met18 durch einen N-terminalen SUMO-Tag und Autoinduktions-

Expressionsbedingungen (Vo *et al.*, 2018). Verunreinigungen konnten durch den Einsatz eines doppelt-getaggtten Konstruktes (N-terminal His-Tag und C-terminal StrepII-Tag) und Tandem-Affinity-Purification abgetrennt werden. Daher sollte für weitere Untersuchungen versucht werden, das komplette Met18-Protein aus *E. coli* zu reinigen. Solch ein großes Plasmid könnte durch die Methode nach Gibson kloniert werden oder durch homologe Rekombination in Hefe bei zusätzlicher Verwendung eines Hefe-Ori (*origin of replication*) (Gibson *et al.*, 2009; Joska *et al.*, 2014).

Als Positivkontrolle diente die bekannte SKL-PEX5-Interaktion. Es konnte eine Dissoziationskonstante K_D von $0,17 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Diese ist ca. zweifach höher als der Literaturwert von $0,07 \pm 20 \mu\text{M}$ (Gatto *et al.*, 2000). Die Abweichung lässt sich durch die Verwendung eines anderen Fluoreszenzsystems (Peptid-Markierung) erklären. Sie bestätigt die Eignung der Methode zur Untersuchung von Protein-Peptid-Bedingungen. Die Fluoreszenzanisotropie-Messungen der Proteine des CIA-Targeting-Komplexes mit den Peptiden von Fe/S-Proteinen lieferte jedoch keine erwartete sigmoidale Bindungskurve (siehe Abbildung 4.32). Lediglich im hohen Konzentrationsbereich konnte ein leichter Anstieg der Anisotropie bei der Untersuchung von CIAO1 bzw. CIAO1 in Kombination mit FAM96B detektiert werden. Daraus kann eine Dissoziationskonstante von $> 0,25 \text{ mM}$ bis $> 0,10 \text{ mM}$ abgeschätzt werden. Dies sollte durch Wiederholungen der durchgeführten Experimente validiert werden. Der Anstieg der Anisotropie wäre neben einer Bindung des Peptides aber auch durch Präzipitation des Proteins im höheren Konzentrationsbereich zu erklären.

Die Interaktion der eingesetzten Peptide mit Cia1 ist zu schwach, um in dieser Methode detektiert zu werden. Möglicherweise findet eine Bindung an Cia1 nur in Anwesenheit des vollständigen CIA-Targeting-Komplexes statt. Ein weiterer Grund für den fehlenden Anstieg der Anisotropie könnte die Länge der synthetischen Peptide sein. Diese wurde vielleicht zu kurz gewählt, um einen stabilen Komplex mit dem β -Propeller-Protein auszubilden. Es sind Literaturbeispiele vorhanden, worin die Länge der eingesetzten Peptide den kritischen Faktor dieser Methode darstellt bzw. worin der Einsatz deutlich längerer Peptide zum Nachweis von Bindungen führte. So konnten Inoyama *et al.* einen Kompetitionsassay zur Identifizierung von Inhibitoren der Bindung zwischen dem Redoxsensorprotein KeapI und Fluorophormarkierten Nonapeptiden, abgeleitet aus dem Transkriptionsfaktor Nrf2, etablieren. Bei der Optimierung dieses Ansatzes setzten sie acht bis 16 Aminosäure-lange Peptide ein, wobei das Oktapeptid auf Grund mangelnder Bindung nicht genutzt werden konnte. Die Bindeaffinität war bei dem 16er-Peptid am größten, dieses zeigte jedoch auch den größten Propellereffekt. Die besten Bedingungen für Wettbewerbsexperimente wurden mit einem Nonamer erzielt (Inoyama *et al.*, 2012). Dies verdeutlicht die Schwierigkeiten bei der Wahl der geeigneten Peptidlänge. In einer Studie zur Detektion von Molekülen, welche die Interaktion zwischen dem Replikationsprotein A RPA70N und dem Kontrollpunktprotein ATRIP stören, wurden 15 Aminosäure-lange FITC-markierte Peptide verwendet (Souza-Fagundes *et al.*, 2012). Bei der Untersuchung der Substratselektivität der WD40-Domäne

der E3-Ubiquitin-Ligase COP1 wurden 19 Aminosäure-lange FITC-markierte Peptide, Mutanten des Trib1-Bindemotivs, in einer Fluoreszenzanisotropie-Kompetitionsanalyse eingesetzt (Uljon *et al.*, 2016).

Alternativ könnte beispielsweise mittels NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Spektroskopie die Bindung unmarkierter und somit kostengünstigerer Peptide untersucht werden. Nach der Evaluation der optimalen Peptidlänge könnten diese Fluoreszenz-markiert und anschließend über Anisotropie-Messungen die Dissoziationskonstante bestimmt werden. Des Weiteren könnte dann durch Variation der Proteine gezeigt werden, dass diese Interaktion Teil eines spezieübergreifenden Mechanismus ist. So könnte das Peptid der Hefe-IPMI mit dem humanen Homolog CIAO1 titriert werden bzw. die humanen Viperin- und POLδ-Peptide mit Hefe-Cia1.

Als weitere *in vitro* Methode zur Quantifizierung der Protein-Peptid-Bindungen wurde die isotherme Titrationskalorimetrie eingesetzt. Bei diesem Ansatz wurde die Interaktion zwischen Cia1 bzw. CIAO1 und den unmarkierten synthetischen Peptiden untersucht. ITC-Experimente liefern zuverlässige Ergebnisse in einem Affinitätsfenster von $K_D = 1 \text{ nM} - 100 \text{ } \mu\text{M}$ (Krainer *et al.*, 2012). Darüber hinaus kann die Bestimmung thermodynamischer Parameter fehlerbehaftet sein. Die Form der Isotherme gibt Aufschluss über die Genauigkeit der ermittelten Dissoziationskonstante. Bei geringer Affinität ergibt sich eine flache, keine sigmoidale Kurve. Dies erlaubt keine sichere Ableitung von K_D . Als Maß der Zuverlässigkeit der erhaltenen Isotherme, bei Auftragung von ΔH gegen das molare Verhältnis der beiden Interaktionspartner, kann der sogenannte „C-Wert“ herangezogen werden (Ladbury, 2013). Der dimensionslose Parameter C ist definiert als das Produkt der Assoziationskonstante K_A und der Konzentration des Makromoleküls in der Probenzelle $[M]_t$:

$$c = K_A \cdot [M]_t = \frac{[M]_t}{K_D} \quad (3.7)$$

(Wiseman *et al.*, 1989). Ein Fit liefert „fehlerfreie“ Ergebnisse bei einem C-Wert = 10 - 500 (Turnbull & Daranas, 2003). C-Werte < 10 ergeben eine flache, keine sigmoidale Kurve; C-Werte > 1000 zeigen eine eckige Kurve auf Grund zu schneller Sättigung. Für Systeme mit geringer Affinität, wie in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, empfiehlt sich daraus der Einsatz hochkonzentrierter Substanzen. Bei Protein – Ligand-Interaktionen gestaltet sich dies mitunter schwierig. Beispielsweise gelang es bei der Charakterisierung der Interaktion von Ycf48, einem Faktor der frühen Assemblierung des Photosystem-II-Komplexes aus Cyanobakterien und Rotalgen, mit dem Precursor-Protein D1 nicht, eine durch Cokristallisation nachgewiesene Bindung von acht bzw. 16 Aminosäure-langen Peptiden mittels ITC zu bestätigen (Yu *et al.*, 2018). Da keine passenden Bedingungen für eine Analyse gefunden werden konnten, war keine Mutagenesestudie möglich, um die essentiellen Aminosäurereste zu identifizieren. Unter Berücksichtigung des C-Wertes (0,2) führte der Einsatz von für diese Methode üblichen Konzentration von $50 \text{ } \mu\text{M}$ Protein zu einer

flachen, nicht zu einer sigmoidalen Kurve. Auch eine fünf- bzw. zehnfache Erhöhung der eingesetzten Proteinkonzentration brachte keine Ergebnisse. Im Laufe der Messungen präzipitierte das Protein innerhalb der Zelle. Die Bildung von Proteinaggregaten konnte durch Dynamische Lichtstreuung (DLS) bestätigt werden. Es war nicht möglich, einen Kompromiss zwischen einer ausreichend großen Proteinmenge und dazu passenden Versuchsbedingungen (Temperatur und Rührgeschwindigkeit) zu finden. Löslichkeitsprobleme sind ein verbreitetes Problem bei derartigen ITC-Versuchen (Turnbull & Daranas, 2003). Daher scheint diese Methode nicht geeignet zu sein, um eine mögliche Interaktion zwischen Cia1 und Tryptophan-haltigen Peptiden zu quantifizieren.

Biochemische Prozesse werden durch dynamische, nicht kovalent assoziierte Multiprotein-komplexe vermittelt, welche höchst effiziente chemische Maschinerien darstellen (Michnick, 2003). Die Proteine bilden ein Netzwerk dynamischer Assemblierung und Disassemblierung. Dieses Netzwerk zu entschlüsseln ist eine der Hauptherausforderungen der modernen Biochemie (Snider *et al.*, 2015). Bisher ist nur ein kleiner Teil des vermuteten Interaktoms aufgeklärt. Neben experimentellen Methoden sollten vermehrt auch Computer-gestützte Vorhersage-Methoden eingesetzt werden (Wass *et al.*, 2011). Dies könnte auch im vorliegenden Fall hilfreich sein. Um eine PPI aufzudecken, gibt es nicht „die“ Methode. Vielmehr ist ein Nachweis von den Eigenschaften, hauptsächlich der Stärke, einer Bindung abhängig. Interessanterweise konnte nur eine kleine Anzahl der bekannten Interaktionen mit mehr als einer Methode nachgewiesen werden (Berggård *et al.*, 2007). Dies verdeutlicht die Schwierigkeit, die geeignete Untersuchungsmethode zu finden. Die Interaktionen mit bekannten C-terminalen Peptidmotiven konnten beispielsweise mit Fluoreszenzanisotropiemessungen (SKL) oder ITC (EEVD) *in vitro* gezeigt werden (Gatto *et al.*, 2000; Scheufler *et al.*, 2000). Diese SLiMs vermitteln jedoch stabile Proteinkomplexe mit einer hohen Lebensdauer. Es wird angenommen, dass die Interaktion zwischen einem Fe/S-Protein und dem CIA-Targeting-Komplex transient und kurzlebig ist. Womöglich ist sie zu kurzlebig, um mit den verwendeten Methoden aufgedeckt zu werden. Möglicherweise verliert das Fe/S-Targetprotein nach der Übertragung des Clusters sogar seine Affinität für den CIA-Targeting-Komplex. Generell sind SLiM-vermittelte PPI schwer zu identifizieren (Perkins *et al.*, 2010; Gibson *et al.*, 2015). Auf Grund der geringen Größe eines Peptidmotives (zwei bis sieben Aminosäuren), ist auch die Bindungsoberfläche klein, sodass die Interaktion deutlich schwächer ist. Daneben sind die Bedingungen, unter welchen eine transiente Interaktion untersucht wird, besonders kritisch, vor allem bei kurzen SLiMs (Perkins *et al.*, 2010). Ein weiteres Hindernis stellt die Konzentration der zu untersuchenden Proteine dar. Die Mitglieder der CIA-Maschinerie gehören zu den Proteinen, welche in der Zelle nur in geringer Kopiezahl vorliegen (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Dies erschwert die Nachweismöglichkeit *in vivo*. Eine Überexpression der entsprechenden Proteine erleichtert möglicherweise eine Detektion, birgt aber das Risiko von falsch-positiven Resultaten oder Toxizität, wie in dieser Arbeit für Cia2 beobachtet wurde.

Neben den eingesetzten *in vivo* Methoden Y2H und BioID könnte als Alternative eine Proteinfragment-Komplementationsuntersuchung PCA (*protein fragment complementation assay*) durchgeführt werden. Diese Methode kann neue PPI sowie chemische und physikalische Störungen von Interaktionen aufdecken (Michnick, 2003). Sie beruht auf der Trennung eines Enzyms oder fluoreszierenden Proteins in zwei Teile, welche dann an zwei Proteine fusioniert werden, die untersucht werden sollen. Durch eine Interaktion der zwei Testproteine kann das Reporterenzym seine korrekte Faltung einnehmen und die Aktivität wird rekonstituiert (Tarassov *et al.*, 2008). Übliche Reporterproteine sind das grün fluoreszierende Protein GFP oder die Luziferase. Im Vergleich zum Y2H-System erfolgt das Auslesen direkt, nicht durch eine sekundäre Aktion und die zu untersuchenden Proteine liegen in ihrem nativen Zellkompartiment vor (Michnick, 2003).

Als alternatives *in vitro* Verfahren könnte versucht werden, Cia1 gemeinsam mit einem Tryptophan-haltigen Peptid zu kristallisieren. Die strukturelle Charakterisierung einer Interaktion stellt den bestmöglichen Nachweis dar. Die Röntgenstrukturanalyse der Kristalle könnte in Kooperation mit Prof. H. Dobbek und Dr. B. Martins an der Humboldt Universität in Berlin durchgeführt werden. Die bekannten Kristallisationsbedingungen des Proteins Cia1 stellen eine gute Basis für solche Versuche dar (Srinivasan *et al.*, 2007). Sollte die Cokristallisation nicht gelingen, könnte ein „Soaking“ der synthetischen Peptide in vorhandene Cia1-Kristalle ausprobiert werden.

Neben der Röntgenstrukturanalyse kann die Struktur von Proteinen bzw. auch von Protein-Protein-Komplexen mittels NMR-Spektroskopie analysiert werden (O'Connell *et al.*, 2009). Ein großer Vorteil stellt die Tatsache dar, dass keine Kristalle benötigt werden, Proteine können in Lösung vermessen werden. Benötigt werden ¹³C und oder ¹⁵N-markierte Proteine. Für Interaktionsstudien könnten diese mit ebenfalls Isotop-gelabelten Peptiden titriert werden. Diese Methode ist auch für schwache PPI geeignet (Zuiderweg, 2002; Vaynberg & Qin, 2006). In Kooperation mit der Forschungsgruppe von Prof. L. Banci könnten solche Experimente zukünftig am Magnetische-Resonanz-Zentrum CERM in Florenz durchgeführt werden. Des Weiteren verfügt diese Einrichtung über die Mittel und das Know-how der *in cell* NMR-Spektroskopie. Diese erlaubt es, Proteine auf atomarer Ebene innerhalb ihrer physiologischen Umgebung zu studieren (Luchinat & Banci, 2016). So können Proteinfaltung, Interaktionen oder posttranslationale Modifikationen innerhalb einer lebenden Zelle analysiert werden. Mit Hilfe dieser Methode konnten Banci *et al.* den kompletten posttranslationalen Reifeprozess der humanen Superoxiddismutase 1 verfolgen (Banci *et al.*, 2013). Es wäre ein Meilenstein, wenn auf ähnliche Weise der Transport des Fe/S-Clusters entlang der Proteine der CIA-Maschinerie bzw. der Cluster-Einbau in Targetproteine nachverfolgt werden könnte.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass keine direkte Interaktion zwischen Leu1 und einem Protein des CIA-Targeting-Komplexes detektiert werden konnte. Wahrscheinlich ist

die Interaktion zu transient, um mit den eingesetzten Methoden nachgewiesen zu werden. Eine weitere Erklärung wäre, dass zwischen den untersuchten Proteinen kein Kontakt besteht. Möglicherweise wird, vergleichbar mit der Reifung von Rli1, ein Adapterprotein benötigt (Paul *et al.*, 2015). Vielleicht existieren auch weitere, bisher unbekannte CIA-Faktoren, welche den Clustereinbau unterstützen. In der Arbeitsgruppe von D. Perlstein konnte mit einer *in vitro* Co-Reinigungsmethode mit rekombinant gereinigten Proteinen nur eine schwache Interaktion mit dem CIA-Targeting-Komplex nachgewiesen werden, jedoch nur in Anwesenheit aller drei Proteine (Vo *et al.*, 2018). Der Einsatz der einzelnen Proteine sowie der binären Komplexe zeigte keine Interaktion. Dies ist jedoch kein Beleg für eine direkte Bindung *in vivo*.

Sollte die C-terminale Verlängerung cytosolischer Fe/S-Proteine nicht für eine Interaktion mit den Reifungsfaktoren verantwortlich sein, könnte sie der Kontrolle der Proteinkonformation oder der vollständigen Translation des Proteins am Ribosom dienen. [NiFe]-Hydrogenasen sind Redoxenzyme, welche die reverse Reaktion von molekularem Wasserstoff zu Protonen und Elektronen oxidieren. Die Heterodimere sind aus einer großen katalytischen Untereinheit, welche einen NiFe(CN)₂CO-Cofaktor tragen und einer kleinen Untereinheit mit drei Fe/S-Clustern, welche für den Elektronentransport wichtig sind, aufgebaut (Senger *et al.*, 2017; Lubitz *et al.*, 2014). Die große Untereinheit wird mit einer C-terminalen Verlängerung synthetisiert. Nach der Insertion des Cofaktors wird das 15 Aminosäure-lange Peptid proteolytisch entfernt. Danach kann erst die Heterodimerisierung erfolgen, um das katalytisch aktive Enzym zu bilden. Eine vorzeitige Abspaltung verhindert den Cofaktoreinbau (Senger *et al.*, 2017). Es wird angenommen, dass die Funktion des C-terminalen Peptides darin besteht, die adäquate Konformation des Apoproteins auszubilden, um die Insertion des NiFe-Cofaktors zu ermöglichen (Thomas *et al.*, 2015). Das Peptid fungiert nicht als spezifische Bindestelle, um die Hyp-Maschinerie (*hydrogenase pleiotropy*, Assemblierungsmaschinerie) zu rekrutieren. Die Abspaltung der C-terminalen Verlängerung bewirkt eine Konformationsänderung in der Sekundär- und Tertiärstruktur der großen Untereinheit (Senger *et al.*, 2017). Dadurch könnte das aktive Zentrum geschlossen werden. Möglicherweise ist die Kontrolle der Proteinkonformation durch kurze C-terminale Peptide auch in anderen molekularen Prozessen verbreitet (Thomas *et al.*, 2015). So wird die Aktivität des Kinesin-13-Motorproteins MCAK, bei der Microtubulidepolymerisation durch eine Konformationsänderung des C-Terminus gesteuert (Talapatra *et al.*, 2015). Des Weiteren ist ein konserviertes Peptid am C-Terminus der schweren Kette von IgM wichtig, um die korrekte Geometrie bei dem Zusammenbau des Antikörperkomplexes zu schaffen (Pasalic *et al.*, 2017). Bisher gibt es keine Erkenntnisse über eine Konformationsänderung nach einem Fe/S-Clustereinbau durch die CIA-Maschinerie. Da die Insertion in Apoproteine mittels CIA-Targeting-Komplex auf molekularem Niveau nicht verstanden ist, darf diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden. Ebenso gibt es bislang keine Hinweise auf eine proteolytische Abspaltung der C-terminalen Verlängerung der IPMI.

Ohne ausführliche Analyse ist jedoch auch dies nicht auszuschließen. Hierzu könnten Zellextrakte passender Hefestämme mit N-terminal markierten Proteinen nach Immunpräzipitation massenspektrometrisch untersucht werden.

Auf molekularer Ebene ist sehr wenig über den CIA-Targeting-Komplex bekannt. Er setzt sich zusammen aus Cia1, Cia2 und Met18 (Gari *et al.*, 2012; Stehling *et al.*, 2012). Da die Proteinmengen der Komplexpartner in Abwesenheit einer Komponente deutlich abnehmen, wird angenommen, dass sich die Proteine gegenseitig stabilisieren (Stehling *et al.*, 2013; Gari *et al.*, 2012; Lev *et al.*, 2013). CoIP-Experimente lieferten widersprüchliche Ergebnisse über die Interaktionen innerhalb der späten CIA-Maschinerie. Van Wietmarschen *et al.* konnten Interaktionen zwischen CIAO1 und FAM96B sowie CIAO1 und MMS19 detektieren, jedoch nicht zwischen FAM96B und MMS19 (van Wietmarschen *et al.*, 2012).

Seki *et al.* wiesen Interaktionen zwischen CIAO1 und FAM96B sowie FAM96B und MMS19 nach, aber keine zwischen CIAO1 und MMS19 (Seki *et al.*, 2013). Beide stimmten darin überein, dass NAR1 kein stabiles Mitglied des CIA-Targeting-Komplexes ist und nur transient bindet, vergleichbar mit den Interaktionen von Fe/S-Targetproteinen (van Wietmarschen *et al.*, 2012; Seki *et al.*, 2013). Die neuesten Erkenntnisse bezüglich des CIA-Targeting-Komplexes, welche im Verlauf dieser Arbeit publiziert wurden, gehen in Übereinstimmung mit Seki *et al.* von einer verbrückenden Funktion von Cia2 aus (Seki *et al.*, 2013; Odermatt & Gari, 2017; Vo *et al.*, 2018). Die Interaktionen zwischen CIAO1 und FAM96B sowie CIAO1 und MMS19 konnten bestätigt werden, jene zwischen CIAO1 und MMS19 hingegen nicht (Odermatt & Gari, 2017; Vo *et al.*, 2018). Diese Ergebnisse stimmen mit den Y2H-Untersuchungen in dieser Arbeit und den Resultaten aus High-Throughput-Studien überein (siehe Tabelle 5.2, Seite 189). MMS19 bindet an den C-Terminus von FAM96B. Diese Interaktion verhindert einen proteasomalen Abbau von FAM96B (Odermatt & Gari, 2017). Die N-terminale Domäne von Cia2 hat keine Bedeutung für die Interaktionen *in vitro*, könnte jedoch bei der Regulation des Proteins wichtig sein (Vo *et al.*, 2017). Die Mutation E208G des Hefeproteins Cia2 verhindert eine Bindung zu Met18 (Lev *et al.*, 2013) bzw. zu Cia1 (Vo *et al.*, 2017). Es wird vermutet, dass Cia2 neben der Verbrückung von Cia1 und Met18 eine weitere biochemische Funktion besitzt. Auf Grund der aktiven Rolle von verwandten DUF59-Domänen in Prokaryoten im Clustertransfer, beispielsweise Nfu oder SuFT aus *Staphylococcus aureus*, wäre eine Funktion bei der Insertion des Fe/S-Clusters denkbar (Vo *et al.*, 2017; Mashruwala & Boyd, 2018). Diese Hypothese wird durch die neuesten Studien des humanen Cia2-Homologs FAM96A unterstützt. NMR-Untersuchungen zeigen, dass zwei FAM96A-Proteine mit einem CIAO1 einen heterotrimeren Komplex bilden (Maione *et al.*, 2018). Dieser Komplex ist fähig, einen [4Fe-4S]-Cluster zu tragen und diesen auf die cytosolische Aconitase zu übertragen. Der konservierte Cysteinrest C90 konnte als Clusterligand identifiziert werden. Die Bindung von CIAO1 und FAM96B an MMS19 erfolgt an den C-terminalen HEAT-Repeats (Odermatt & Gari, 2017). Eine stabile Interaktion zwischen MMS19 und CIAO1 findet nur über FAM96B statt, jedoch wird eine schwache Wechselwirkung

vermutet. Die Bindung von Fe/S-Targetproteinen an MMS19 erfolgt an anderer Stelle als die CIA-Faktoren (van Wietmarschen *et al.*, 2012). Jedoch scheinen auch hier die C-terminalen HEAT-Repeats wichtig zu sein. Die Erkennung eines Targetproteins bleibt in der Literatur nach wie vor ungeklärt. Die einzige bisher untersuchte Gemeinsamkeit der Substrate, das Cys-Motiv, stellt kein Erkennungsmerkmal dar (Vo *et al.*, 2018). Des Weiteren variiert die Zusammensetzung des CIA-Targeting-Komplexes bei verschiedenen Targetproteinen (Stehling *et al.*, 2012; Vo *et al.*, 2018). Cia1, Cia2 und Met18 bilden binäre Subkomplexe, welche dynamisch miteinander interagieren. Nicht für die Reifung aller Proteine werden alle drei CIA-Faktoren benötigt, jedoch weist der vollständige Komplex das größte Substratspektrum auf (Paul & Lill, 2015; Odermatt & Gari, 2017). Beispielsweise erfolgt der Fe/S-Clustereinbau in GPAT ohne Beteiligung von MMS19, wohingegen FAM96B nicht wichtig ist bei POL δ . MMS19 ist möglicherweise zuständig für den Antransport von Targetproteinen, hauptsächlich jenen, welche in Zusammenhang mit der genomischen Integrität stehen (Seki *et al.*, 2013). In einer Studie zur Untersuchung der Gesamtgröße des Komplexes wurde mittels Größenausschlusschromatografie eine Stöchiometrie von einem Met18- im Verhältnis zu zwei Cia1- und vier Cia2-Proteinen abgeschätzt (Vo *et al.*, 2018). Untersuchungen der DNA-Helikase XPD belegen, dass die Inkorporation des Fe/S-Clusters in das Targetprotein abgeschlossen ist, bevor das Fe/S-Protein seine zelluläre Funktion ausführen kann (Vashisht *et al.*, 2015). Einen ersten Einblick in die posttranslationale Regulation der CIA-Maschinerie konnte durch die Beobachtung der Ubiquitinierung und des Abbaus von MMS19 durch die E3 Ubiquitin-Ligase MAGE-F1-NSE1 gewährt werden (Weon *et al.*, 2018). Eine Überexpression des Enzyms verringert den Fe/S-Clustereinbau in Enzyme wie POLD1, XPD oder RTEL1, welche wichtig für die Reparatur von DNA-Schäden sind. Dies korreliert mit einer Herunterregulation von *MMS19* und einer Hochregulation von *MAGE-F1* in Krebszellen. Diese Feststellung stellt eine Erklärung einer höheren Genom-Instabilität bei Tumoren mit einer hohen Amplifikationsrate dar und zeigt einen ersten Zusammenhang zwischen der CIA-Maschinerie und der Tumorgenese (Weon *et al.*, 2018).

Da in den durchgeführten Interaktionsstudien keine Bindung eines cytosolischen oder nucleären Fe/S-Proteins an ein Mitglied des CIA-Targeting-Komplexes nachgewiesen werden konnte, war es nicht möglich, mit den zur Verfügung stehenden Methoden, die Bedeutung des C-terminalen Tryptophans für eine solche Interaktion zu untersuchen. Um einen Zusammenhang mit einem potentiellen Bindungspartner herstellen zu können, wurde *in vivo* der Einfluss des Tryptophans am Beispiel der IPMI aus Hefe in Abhängigkeit von der CIA-Maschinerie untersucht.

Die Überexpression des Leu1-C-Terminus, ein Peptid aus 30 Aminosäuren, welches nicht fähig ist einen Fe/S-Cluster zu tragen, führte nur zu einem Aktivitätsverlust des Referenzproteins Leu1 im WT-Stamm um 7% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (siehe Abbildung 4.34). Die Abnahme der Enzymaktivität des Fe/S-Proteins deutet darauf

hin, dass das Tryptophan-haltige Peptid mit der CIA-Maschinerie in schwache Wechselwirkung tritt und diese in geringem Maße blockiert.

Um den kritischen Faktor des CIA-Targeting-Komplexes zu identifizieren, wurden *CIA1*, *CIA2* und *MET18* getrennt voneinander moderat herunterreguliert und die Funktionalität C-terminaler Leu1-Mutanten analysiert. Moderat herunterreguliert bedeutet, dass die Expression des jeweiligen Proteins durch Einsatz des *GAL1-10*- bzw. *GALL*-Promotors und Wachstum auf Glucose-haltigem Medium blockiert wurde, jedoch über einen kürzeren Zeitraum (bis ein Effekt sichtbar war) als dies zur vollständigen Depletion mit Wachstumsdefekt benötigt wird. Bei der Regulation von *CIA1* kam der *GAL1-10*-Promotor zum Einsatz. Die moderate Herunterregulation bewirkte einen Aktivitätsverlust des WT-Proteins von 29%. Der *GALL*-Promotor ist im Vergleich zum *GAL1-10*-Promotor schwächer (siehe 2.14.3) (Mumberg *et al.*, 1994). Die Verwendung des schwächeren Promotors soll die Regulation der konstruierten Hefestämme Gal_CIA2_Δ*leu1* und Gal_MET18_Δ*leu1* erleichtern. Die Kultivierung dieser Stämme in Glucose-haltigem Medium über 40 h (vergleichbar zu Cia1) führte zu Aktivitätsverlusten des WT-Leu1-Proteins von 81% bei Cia2 bzw. 80% bei Met18 im Vergleich zum nicht regulierten Hefestamm Δ*leu1*. Ein Kompromiss der Wachstumsbedingungen zwischen einer moderaten Herunterregulation und einem höheren Aktivitätsniveau der WT-Kontrolle konnte nicht gefunden werden, da eine Verkürzung der Wachstumszeit (16 h bzw. 24 h) nicht in geringerer Leu1-Aktivität resultierte. Für diese spezielle Fragestellung, eine moderate Herunterregulation anstatt einer größtmöglichen Depletion, wäre der *GAL1-10*-Promotor möglicherweise besser geeignet gewesen. Um die aus dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse zu validieren, sollten die Hefestämme Gal_CIA2_Δ*leu1* bzw. Gal_MET18_Δ*leu1* (Austausch des *GAL*-Promotors) hergestellt und die durchgeführten Untersuchungen wiederholt werden. Auf Grund des geringen Aktivitätsniveaus und dem damit einhergehenden größeren relativen Fehler, sind die Resultate der Untersuchungen mit den Stämmen Gal_CIA2_Δ*leu1* und Gal_MET18_Δ*leu1* nicht zu 100% verlässlich.

Bei Normierung der Leu1-spezifischen Enzymaktivität auf den Wert der WT-Leu1-Plasmidkopie führte die verminderte zelluläre Cia1-Konzentration zu einem Verlust der Δ1-Mutante von 92% im Vergleich zu WT-Leu1. Somit ist das C-terminale Tryptophan bei Depletion von *CIA1* nahezu essentiell. Im Gegensatz hierzu bewirkte eine Überexpression von Cia1 keinen Funktionsgewinn der Leu1-Mutanten (siehe Abbildung 4.35). Bei einer Herunterregulation von *CIA2* nahm die Funktion der Δ1-Mutante um 54% ab, im Fall von *MET18* um 56%. Die Aktivitätswerte bei regulierter Cia2- bzw. Met18-Konzentration stimmten sehr gut mit den 57% Verlust im nicht regulierten Deletionsstamm Δ*leu1* überein (siehe Abbildung 4.36). Diese Ergebnisse legen einen Zusammenhang des C-terminalen Tryptophans mit Cia1 nahe, jedoch nicht mit Cia2 oder Met18.

Um den Zusammenhang zwischen Cia1 und dem C-terminalen Tryptophan zu bekräftigen, wurde die Deletion des C-terminalen Tryptophans mit funktionsbeeinflussenden Mutanten von Cia1 verglichen. In einer Mutagenesestudie in depletierten Gal_CIA1-Zellen weist die Mutante R127E einen Wachstumsdefekt auf. Darüber hinaus beträgt die Leu1-spezifische Enzymaktivität nur noch 28%, der *de novo* ⁵⁵Fe-Einbau in Leu1 ist signifikant um 35% reduziert (Srinivasan *et al.*, 2007). Dieser Phänotyp ist in der Doppelmutante R127E_Y173A noch stärker ausgeprägt. Der Quotient aus verminderter Leu1-Enzymaktivität zu konstanter Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität beträgt ca. 40%, normiert auf den WT (Webert, 2011). Der Funktionsverlust des Cia1-Proteins wird einer geschwächten Cia1-Nar1-Interaktion zugesprochen. Die reduzierte Leu1-spezifische Aktivität der Cia1-Einzel- und Doppelmutante konnte hier mit einem Verlust von 40% bzw. 53% bestätigt werden. Nach Deletion des Tryptophan-haltigen Tripeptides betrug die Aktivität nur noch 29% bzw. 16% (siehe Abbildung 4.37). Diese Resultate zeigen, dass eine Interaktion zwischen Cia1 und Leu1 bzw. die Anwesenheit des Tryptophans für einen erfolgreichen Fe/S-Clustertransfer wichtiger ist, als die Interaktion zwischen Cia1 und Nar1.

Auch wenn keine direkte Interaktion zwischen dem C-terminalen Tryptophan der IPMI und einem Protein des CIA-Targeting-Komplexes gezeigt werden konnte, konnte durch Depletionsstudien ein Zusammenhang mit Cia1 hergestellt werden. In Übereinstimmung mit dem Fe/S-Protein Viperin bzw. dem Adapterkomplex Lto1-Yae1-Rli1 konnte auch hier Cia1 als kritischer Faktor des Targeting-Komplexes identifiziert werden (Upadhyay *et al.*, 2017). Es ist bereits bekannt, dass für die Erkennung der unterschiedlichen Fe/S-Targetproteine verschiedene Faktoren des CIA-Targeting-Komplexes wichtig sind (Paul & Lill, 2015). Auf Grund dieser Erkenntnisse sowie den gegebenen strukturellen Voraussetzungen wird postuliert, dass die Erkennung der cytosolischen und nucleären Fe/S-Proteine mit einem C-terminalen Tryptophan über Cia1 erfolgt.

5.3 Biotechnologische Anwendung

Metabolisches Engineering hat das Ziel, den Metabolismus einer Zelle neu zu schreiben, um die Produktion nativer Metabolite zu steigern, bzw. um ihr die Fähigkeit zu verleihen, neue Produkte herzustellen (Nielsen & Keasling, 2016; Lian *et al.*, 2018). Anwendungsgebiete sind die Produktion von Kraftstoffen, Chemikalien, Nahrungsmitteln und Arzneistoffen. In Zeiten eines steigenden Interesses an „grünen“ Methoden bekommen Mikroorganismen, als zelluläre Fabriken, eine immer größer werdende Bedeutung (Tashiro *et al.*, 2015). Die biologische Produktion basiert auf nachwachsenden Rohstoffen, welche aus pflanzlichem Material (Biomasse) gewonnen werden, wie Cellulose, Zucker und Stärke (Nielsen & Keasling, 2016). Zum einen werden spezielle Mikroorganismen gezüchtet, welche das gewünschte Produkt bereits natürlich herstellen. Zum anderen werden biosynthetische Wege in heterologe Organismen transferiert oder Enzyme mit neuen Eigenschaften kreiert.

Biotechnologisch eingesetzte Organismen müssen den harschen industriellen Bedingungen wie, hohe Osmolarität, variierende Temperaturen, geringer pH-Wert und hohe Produktkonzentrationen, welche toxisch sein können, widerstehen können. Es werden robuste Zellen benötigt, welche nicht nur überleben, sondern auch unter diesen Anforderungen fähig sind, das gewünschte Produkt zu generieren (Nielsen & Keasling, 2016). Auf Grund seiner Eigenschaften stellt *S. cerevisiae* den bevorzugten Organismus bei biotechnologischen Produktionsprozessen dar (Benisch & Boles, 2014). Erstens wird er generell als sicher angesehen und zweitens ist er als eukaryotischer Modellorganismus eingehend molekular- und zellbiologisch untersucht (Lian *et al.*, 2018). Des Weiteren existieren vielfältige Möglichkeiten der genetischen Manipulation. Nachteilig für diese Anwendung kann bewertet werden, dass der Metabolismus stark reguliert ist. Daher kann es oftmals nötig sein, die Überexpression spezifischer Enzyme mit der Deregulation von metabolischen Wegen zu kombinieren, um eine hohe Flussrate zu erzielen (Nielsen & Keasling, 2016).

Ein häufiges Problem bei der Maximierung der Effizienz (Titer, Flussrate und Ausbeute) ist ein Ungleichgewicht benötigter Cofaktoren (Lian *et al.*, 2018). So können auch Enzyme, welche Fe/S-Cluster enthalten, die Etablierung heterologer Synthesewege verkomplizieren (Benisch & Boles, 2014). Betroffene Proteine sind zwar mitunter hoch exprimiert, zeigen aber auf Grund eines fehlenden Clustereinbaus keine Aktivität. Es wird angenommen, dass, bei Expression im Cytosol, die CIA-Maschinerie die bakteriellen Apoproteine nicht erkennt.

Tabelle 5.4 fasst Problemen bei der heterologen Expression bakterieller metabolischer Wege in *S. cerevisiae* auf Grund mangelhaftem Clustereinbau in Fe/S-Proteinen zusammen.

Tabelle 5.4: Probleme durch Fe/S-Enzyme bei metabolischem Engineering

Stoffwechselweg	Produkt	Referenz
Entner-Doudoroff	Ethanol	Benisch & Boles, 2014
Entner-Doudoroff	Isobutanol	Morita <i>et al.</i> , 2017
Mosaik	Isobutanol	Milne <i>et al.</i> , 2016
Dahms (D-Xylose-Oxidation)	Ethylenglycol	Salusjärvi <i>et al.</i> , 2017
Weimberg	α -Ketoglutarat	Wasserstrom <i>et al.</i> , 2018
2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP)	Isoprenoide	Partow <i>et al.</i> , 2012
2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP)	Isoprenoide	Carlsen <i>et al.</i> , 2013
1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP)	Isoprenoide	Kirby <i>et al.</i> , 2016

Wegen einer besseren Produktivität und Energiebilanz sollte der hefeeigene Mevalonat (MVA)-Weg zur Synthese von Isoprenoiden durch einen synthetischen bakteriellen 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP)-Weg ersetzt werden. Der Versuch scheiterte an der fehlenden Aktivität verschiedener Homologe der Fe/S-Proteine IspG und IspH (Partow *et al.*, 2012). Auch die Coexpression von Fe/S-Transportproteinen sowie eines bakteriellen

Elektronentransfersystems führte nicht zum Erfolg. Ebenso wenig half es in einer davon unabhängigen Studie die komplette ISC-Maschinerie aus *E. coli* zusätzlich zu exprimieren (Carlsen *et al.*, 2013). Schließlich konnte durch Kombination eines IspG-Homologs aus *Bacillus subtilis* mit einem korrespondierenden Flavodoxin eine minimale Flussrate erzielt werden (Kirby *et al.*, 2016).

D-Xylose ist der am zweithäufigsten vorkommende Zucker in der Natur und dadurch eine verbreitete Kohlenstoffquelle (Wasserstrom *et al.*, 2018). *S. cerevisiae* verfügt jedoch nicht über die Enzyme diesen zu fermentieren. Durch Integration der Enzyme des Weimberg-Weges aus *Caulobacter crescentus* könnte D-Xylose zu α -Ketoglutarat oxidiert und Biomasse ökonomischer verwendet werden (Wasserstrom *et al.*, 2018). Ein Hindernis stellt dabei das Fe/S-Protein D-Xylonat-Dehydratase XylD, ein Mitglied der IlvD/EDD-Proteinfamilie, dar. Eingesetzte Homologe aus verschiedenen Organismen wurden zwar translatiert und gefaltet, jedoch nicht mit einem Fe/S-Cluster beladen. In einer weiteren Studie wurde die D-Xylose-Oxidation des Dahms-Weges genutzt, um Ethylenglycol oder Glycolsäure zu erzeugen (Salusjärvi *et al.*, 2017). Hier konnte die geringe Aktivität von XylD durch Deletion von *FRA2*, einem Regulator der Eisen-Regulon-Transkription, gesteigert werden. Eine weitere Verbesserung wurde durch den Einsatz einer in die Mitochondrien importierten Dehydratase erzielt, die Ausbeute an Ethylenglycol blieb jedoch gering.

Ein Ansatz zur Steigerung der Ethanolproduktion in *S. cerevisiae* beschreibt den Austausch der Glykolyse mittels Embden-Meyerhof-Weg durch den phosphorylativen Entner-Doudoroff-Weg, da hierbei keine überschüssige Energie erzeugt wird, welche in die Erzeugung zusätzlicher Biomasse einfließt (Benisch & Boles, 2014). Hierzu wurden verschiedene bakterielle 6-Phospho-D-gluconat-Dehydratasen (EDD, ein [4Fe-4S]-haltiges Enzym) und 2-Dehydro-3-deoxy-D-gluconat-6-phosphat-Aldolasen (EDA, ohne Cofaktoren) in Hefe exprimiert, jedoch war nur die Aldolase funktionell aktiv. Da eine Codon-Optimierung keine gesteigerte Aktivität der Dehydratase ergab und die fehlende Erkennung des bakteriellen Fe/S-Apoproteins durch die CIA-Maschinerie als Ursache ausgemacht wurde, wurde eine mitochondriale Targeting-Sequenz eingefügt, um die, der bakteriellen ISC-Maschinerie ähnliche, Mitochondriale zu bedienen. Dies, wie auch der Versuch die Eisenverfügbarkeit innerhalb der Zelle zu steigern oder das Enzym N- oder C-terminal durch eine Fusion mit der Hefe-IPMI mit der CIA-Maschinerie in Kontakt zu bringen, scheiterte (Benisch & Boles, 2014). In einer ähnlichen Studie sollte der Entner-Doudoroff-Weg in *S. cerevisiae* implementiert werden, um die Generierung von NADPH zu steigern, was wiederum die Isobutanolproduktion fördern soll (Morita *et al.*, 2017). Auch wenn ein geringer metabolischer Fluss des ED-Weges festgestellt werden konnte, waren die Aktivitäten zu gering, um die Isobutanolbiosynthese zu beeinflussen. Bei dem Ansatz einen komplett im Cytosol lokalisierten, Cofaktor-ausbalancierten Isobutanol-Syntheseweg aus einem Mosaik aus bakteriellen Enzymen in Hefe zu etablieren, stellt die Fe/S-Cluster-haltige Dihydroxysäure-Dehydratase (DHAD/IlvD) ein Hindernis dar (Milne *et al.*, 2016). Es kam zu einer

signifikanten Akkumulation von 2,3-Dihydroxyisovalerat. Bei der biosynthetischen Produktion von Isoamylalkohol konnte dieses Problem gelöst werden (Yuan *et al.*, 2017). So wurde die Hefe-eigene DHAD im Cytosol exprimiert und mit dem folgenden Enzym Isopropylmalat-Synthase fusioniert, um die Enzyme in Verbindung zu bringen und die Akkumulation von Intermediaten zu verhindern.

Im Gegensatz zu Benisch & Boles gelang die Kompartimentalisierung eines komplett mitochondrialen Weges der Isobutanolproduktion, womit deutlich höhere Ausbeuten erzielt werden konnten (Avalos *et al.*, 2013). Jedoch ist hierbei zu beachten, dass *S. cerevisiae* über eine natürliche, in den Mitochondrien lokalisierte, DHAD verfügt. So mag es zwar unter Umständen besser sein, einen Syntheseweg mitochondrial zu lokalisieren, generell wird es jedoch bevorzugt im Cytosol zu produzieren, da dies den Export des Endproduktes vereinfacht. Dies erleichtert die Isolation und Aufreinigung der gewünschten Komponente, wodurch die Produktionskosten erheblich gesenkt werden (Nielsen & Keasling, 2016). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die heterologe Expression eines metabolischen Weges, bei dem Fe/S-Proteine beteiligt sind oder Enzyme, welche in Eukaryoten nicht existieren, zum metabolischen Engineering in *S. cerevisiae* wohl überlegt sein sollte (Morita *et al.*, 2017).

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass ein Tryptophanrest am C-terminalen Ende eines cytosolischen Fe/S-Proteins wichtig ist für den Einbau des Cofaktors. Auf Grund dieser Erkenntnis wurde versucht, die heterologe Expression von prokaryotischen Fe/S-Proteinen in *S. cerevisiae* zu verbessern. Durch Anhängen der 30 Aminosäuren-umfassenden C-terminalen Verlängerung der Hefe-IPMI sollte die Erkennung als Targetprotein der CIA-Maschinerie ermöglicht werden. Als erstes Versuchsobjekt wurde die Aconitase AcnA aus *E. coli* ausgewählt. Bedingt durch die nahe Verwandtschaft der Aconitase mit der IPMI wurde vermutet, dass die Biogenese im Cytosol ähnlich verlaufen könnte. Ein Versuch, die Glutamat-Auxotrophie in Δaco1 -Zellen durch das Pasmid p426_FBA_AcnA_Leu1CT zu komplementieren, gelang aber nicht. Entgegen der Erwartung infolge der beschriebenen Beispiele mit Problemen der funktionellen Expression von bakteriellen Fe/S-Proteinen, zeigt die AcnA aus *E. coli* jedoch Enzymaktivität in Hefezellextraktpräparationen. Die Aktivitätswerte, welche durch die direkte Messmethode ermittelt wurden, zeigen 40 % der *S. cerevisiae*-Aco1-WT-Aktivität, Messungen nach der indirekten Methode sogar 75 % (siehe Abbildung 4.39). Diese Werte konnten durch Fusion des Leu1-C-Terminus nicht weiter gesteigert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Biogenese dieses Proteins im Hefecytosol nicht analog zur IPMI erfolgt. Da nur 22 % der cytosolischen und nucleären Fe/S-Proteine ein C-terminales Tryptophan tragen, werden weitere Erkennungsmechanismen des CIA-Targeting-Komplexes vermutet (siehe 5.1). Eine weitere Möglichkeit stellt der Import des *E. coli*-Proteins in Mitochondrien und somit einen Einbau, vermittelt durch die ISC-Maschinerie dar. Diese Überlegung könnte durch eine Lokalisierungsstudie überprüft werden. Mittels Mitochondrienpräparation und anschließender Aconitase-spezifischer Aktivitäts-

messung der separierten Fraktionen könnte das betreffende Kompartiment lokalisiert werden. Weiterhin ist durch Transformation eines regulierbaren Δaco1 -Stammes, beispielsweise Gal_CIA1_Δaco1, mit dem Plasmid p426_FBA_AcnA_Leu1CT und anschließender Enzymaktivitätsmessung der depletierten Zellextrakte, die Abhängigkeit dieses Konstruktes von der CIA-Maschinerie festzustellen.

Um die Tryptophan-Hypothese einsetzen zu können, wird ein prokaryotisches Fe/S-Protein benötigt, welches in Hefe nur eine geringe Funktionalität aufweist. Als zweites Untersuchungsobjekt diente die IPMI aus *E. coli*. Hierbei war das Problem, dass das prokaryotische Homolog aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist. Zunächst wurden die zwei Gene *leuC* und *leuD* individuell auf zwei kompatiblen Plasmiden exprimiert. Dieser Ansatz lieferte jedoch keine Leu1-spezifische Enzymaktivität. Es wird vermutet, dass es auf Grund der an unterschiedlichen Ribosomen stattfindenden Translation nicht möglich ist, die zwei Untereinheiten zu einem funktionellen Protein zusammensetzen (Shiber *et al.*, 2018; Mayr, 2018).

Im Rahmen von Versuchen, den bakteriellen MEP-Weg zur Isoprenoidsynthese in *S. cerevisiae* heterolog zu exprimieren, konnten Carlsen *et al.* mit der Expression von *leuC* und *leuD* kombiniert auf einem Plasmid, Leu1-Auxotrophie komplementieren (Carlsen *et al.*, 2013). Da es ihnen nicht möglich war, die [4Fe-4S]-Cluster-Proteine IspG und IspH funktionell zu exprimieren, wurde versucht, dies mit einem beliebigen anderen [4Fe-4S]-Protein aus *E. coli* zu vollführen. Die entsprechenden Gene wurden in den Vektor pESC-URA in zwei verschiedene MCS kloniert und in den Hefestamm JAY20 (*leu1* auxotroph) transformiert. Das Wachstum auf galactosehaltigen Agarplatten ermöglichte die Expression beider Gene mittels divergenter Transkription durch den *GAL1-10*-Promotor. So konnte gezeigt werden, dass der Fe/S-Clustereinbau in ein bakterielles Protein in *S. cerevisiae* prinzipiell möglich ist. Jedoch wurde nur die Komplementation des Wachstums eines Δleu1 -Stammes gezeigt, aber nicht die Synthese eines erheblich aktiven LeuCD-Proteins.

In Bakterien werden *leuC* und *leuD* gemeinsam mit den Genen *leuA* und *leuB* als *leu*-Operon transkribiert (Somers *et al.*, 1973). Dies führt zu einer multicistronischen mRNA. Eine Studie zum Proteinzusammenbau der Luziferase in Bakterien hat gezeigt, dass der Zusammenbau der zwei Untereinheiten LuxA und LuxB im *E. coli*-Cytosol nahe dem Ort der Translation erfolgt (Shieh *et al.*, 2015). Die Effizienz des Zusammenbaus nimmt deutlich ab, wenn die Untereinheiten aus verschiedenen mRNAs synthetisiert werden. Die Komplexbildung ist direkt an den Translationsprozess gekoppelt. Dies belegt auch eine Studie zur funktionellen Komplexbildung des DrrAB-Exportsystems (Pumpe zum Export der Antikrebsmedikamente Doxorubicin und Daunorubicin aus *Streptomyces peucetius*) (Pradhan *et al.*, 2009). Die Expression der zwei Gene *drrA* und *drrB* muss in räumlicher und zeitlicher Nähe stattfinden, um die Coassemblierung zu ermöglichen. Das Problem, wonach Untereinheiten zusammenbleiben müssen, um richtig gefaltet und zusammengebaut zu werden, lösen Prokaryoten

durch translationale Kopplung. In Eukaryoten löste die Evolution dieses Problem durch Fusion der Domänen zu einem großen Protein. Dies trifft vermutlich auch auf die IPMI zu (Skala *et al.*, 1991). Des Weiteren zeigt eine aktuelle Studie aus Hefe, dass auch in eukaryotischen Zellen die Cotranslation bei der Assemblierung von Proteinkomplexen von Bedeutung ist (Shiber *et al.*, 2018). Diese Cotranslation läuft gerichtet ab, das heißt eine erste Untereinheit muss vollständig gefaltet sein, bevor sie die Faltung einer zweiten, in der Entstehung begriffenen Untereinheit unterstützt (Mayr, 2018). An Abwesenheit des Bindungspartners tendieren die entstehenden Polypeptidketten zur Aggregation oder Degradation (Shiber *et al.*, 2018). Wie die zwei mRNAs zueinander gebracht werden, ist jedoch noch ungeklärt.

Im Folgenden wurden die zwei Gene *leuC* und *leuD* auf einem Plasmid fusioniert. Anstatt einen Glycin-Serin-Linker einzusetzen, wurde sich dazu entschlossen, die zwei Untereinheiten durch einen Linker aus dem Hefe-Homolog zu verbinden. Eine Modellierung der Sekundärstruktur von Leu1 sowie von LeuC und LeuD, auf Grundlage einer Kristallstruktur der mitochondrialen Aconitase aus Schweineherz, führte zu der Entscheidung, die Aminosäurereste 481-543 der IPMI aus *S. cerevisiae* als Linker zu verwenden. Dieser Ansatz führte im Vergleich zur individuellen Expression zu einer geringen Leu1-spezifischen Aktivität (siehe Abbildung 4.41). Diese konnte durch Anhängen der 30 Aminosäuren des Leu1-C-Terminus (nAS₂₇+QDW) um mehr als das Sechsfache gesteigert werden. Mittels Mitochondrienpräparation und Hefestämmen, in welchen die CIA-Faktoren (Cfd1, Nar1 und Cia1) reguliert werden können, konnte demonstriert werden, dass dieser Aktivitätsgewinn von der CIA-Maschinerie abhängig ist (siehe Abbildung 4.42 und Abbildung 4.43). Die Unversehrtheit der isolierten Mitochondrien wurde durch Enzymaktivitätsmessung der membrangebundenen SDH bewiesen. Zusätzlich sollte dies noch durch ein Membran-unabhängiges Matrixprotein, wie z. B. die mitochondriale Aconitase, untermauert werden.

Wird das C-terminale Tryptophan dieser Sequenz durch die Insertion eines Stopp-Codons deletiert (nAS₂₇+QD), nimmt die Enzymaktivität um 75 % ab. Diese Abnahme entspricht dem verminderten Einbau von ⁵⁵Fe in die Mutante Δ1 des Hefehomologs Leu1 und übersteigt die 57 % Verlust der Leu1-spezifischen Aktivitätsmessung jener Mutante (siehe 5.1). Diese Werte verdeutlichen erneut den Stellenwert eines Tryptophanrestes am C-terminalen Ende eines Fe/S-Proteins im Hefecytosol. Die Daten belegen auch, dass ein Funktionstransfer dieser Sequenz von einem Hefeprotein auf ein bakterielles Protein generell möglich ist.

Das Anhängen verschieden langer Sequenzen an den natürlichen LeuD-C-Terminus (QDW, nAS₇+QDW und X₂₇+QDW) hat gezeigt, dass die Länge dieser C-terminalen Verlängerung ebenfalls von Bedeutung ist. Die Fusion von drei bzw. zehn Aminosäuren erzeugte keinen Funktionsgewinn. Im Vergleich mit dem nicht verlängerten Protein ist gar eine geringere Aktivität festzustellen. Dieses ungewöhnliche Ergebnis ist nicht durch einen Read-through-Mechanismus zu erklären (siehe 4.3.2). Das Anfügen einer Linker-Sequenz aus 27 beliebigen Resten in Kombination mit den drei C-terminalen Resten QDW resultiert hingegen in einer

um das Dreifache gesteigerten Enzymaktivität. Als Linker wurde eine Folge von Glycin- und Serinresten gewählt. Diese Kombination verhindert die Ausbildung einer Sekundärstruktur und beeinflusst die Faltung und Funktion der Proteindomäne nicht (van Rosmalen *et al.*, 2017). Der Aktivitätsgewinn dieses Konstruktes bezeugt die Wichtigkeit der Länge von 30 Aminosäuren. Da die Zunahme jedoch nur der Hälfte der Steigerung durch Anhängen des ganzen Leu1-C-Terminus entspricht, ist anzunehmen, dass nicht nur der Abstand der globulären Domäne zur Signalsequenz eine Rolle spielt, sondern auch weitere, bisher nicht identifizierte Aminosäurereste.

Zukünftig sollte geklärt werden, wo innerhalb dieser Sequenz weitere Information steckt. Mit einer Mutagenesestudie, bei welcher jede der 30 Aminosäuren des Leu1-C-Terminus nacheinander mutiert wird, bevorzugt mit großer chemischer Änderung, beispielsweise durch Umkehren der Ladung der Aminosäure, sollen wichtige Reste mittels Leu1-spezifischer Aktivitätsmessung identifiziert werden. Des Weiteren könnte, falls es durch neue Experimente möglich ist eine Bindung *in vitro* zu zeigen, eine Bindungsstudie mit solchen Mutanten durchgeführt werden. Zum Beispiel könnten mittels SPOT-Technologie 30 Aminosäurereste-lange Peptide (mit jeweils einer Punktmutation) auf eine Membran aufgebracht werden (Volkmer, 2009). Diese würde mit dem rekombinant aufgereinigten Interaktionspartner inkubiert werden, sodass ein Auslesen mittels Antikörper-basierendem Immunoblotting möglich wäre (Bode *et al.*, 2015). Diese Studie könnte in Kooperation mit Prof. R. Zimmermann bzw. Prof. M. Jung von der Universität des Saarlandes umgesetzt werden.

Diese weitere in der Leu1-C-terminalen Sequenz versteckte vermutete Information könnte möglicherweise an der Ausbildung einer Sekundärstruktur mit dem Interaktionspartner beteiligt sein. Vergleichbar zu den flankierenden Aminosäuren der eigentlichen Signalsequenz bei anderen C-terminalen SLiMs wäre eine stabilisierende Funktion auf die Interaktion mit dem Bindepartner vorstellbar. Bei der PTS1 sind beispielsweise neben dem essentiellen Tripeptid SKL neun weitere Reste wichtig, um die Stärke der Rezeptorbindung zu erhöhen (Brocard & Hartig, 2006; Hagen *et al.*, 2015; Neuberger *et al.*, 2003). Des Weiteren sind bei der Komplexbildung der Chaperone Hsp70 und Hsp90 mit dem Adapterprotein Hop die Aminosäuren N-terminal des EEVD-Motives neben der Verstärkung der Interaktion wichtig für die Spezifikation (Scheufler *et al.*, 2000).

Durch eine Analyse verfügbarer Kristallstrukturen von verschiedenen WD40-Proteinen konnten Wu *et al.* sogenannte Hotspots, Reste an der Proteinoberfläche, welche für PPI wichtig sind, identifizieren (Wu *et al.*, 2012). Diese könnten bei Cia1 und CIAO1 mit Aminosäureresten mit einer aromatischen Seitenkette wie F, Y oder W eine π -Interaktion eingehen. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse könnten mittels quantenmechanischen Methoden mögliche interagierende Reste genauer verifiziert werden. Dabei sollte die Plausibilität der möglichen Signalsequenz L(D/E)W geklärt werden. Diese *ab initio*

Berechnungen könnten einen weiteren Hinweis auf eine Interaktion zwischen dem C-terminalen Tryptophan und Cia1 geben. Im Idealfall sollte die bevorzugte Sequenz des C-Terminus vorausgesagt werden. Dadurch wären möglicherweise auch Rückschlüsse auf wichtige flankierende Reste möglich, welche die Interaktion stabilisieren.

Es stellt sich die Frage, ob neben der IPMI weitere cytosolische oder nucleäre Proteine mit endständigem Tryptophan über eine solch deutlich ausgeprägte C-terminale Verlängerung bei Eukaryoten verfügen. Erste bioinformatische Analysen mittels einer BLAST-Suche zeigen eine ähnlich lange C-terminale Verlängerung des Proteins Cmo1 aus Fungi im Vergleich zu verwandten Proteinen aus nicht eukaryotischen Organismen. Ein Sequenzvergleich von Nar1, NARF und NARFL mit prokaryotischen [Fe-Fe]-Hydrogenasen deutet auch hier auf eine C-terminale Verlängerung von mehreren Aminosäuren hin (Prof. A. J. Pierik, persönliche Mitteilung). Ein Vergleich von sechs Viperin-Sequenzen, jeweils zwei aus Fungi, Metazoa und Archaea, weist deutliche Unterschiede am C-Terminus auf (Chakravarti *et al.*, 2018). Im Gegensatz zu den Homologen aus Archaea haben die Proteine aus Eukaryoten ein endständiges Tryptophan am Ende einer C-terminalen Verlängerung. Auffällig ist, dass die Verlängerung sowohl bei Nar1 als auch bei Viperin reich an Glycin- und Serinresten zu sein scheint. Diese Aminosäurenreste könnten wichtig sein, um die Ausbildung einer Sekundärstruktur zu stören und somit die Verfügbarkeit des Peptidmotives für die Erkennung durch Interaktionspartner zu gewähren. Diese Beobachtung bestätigt auch, dass die Verwendung eines GSS-Linkers eine gute Wahl ist, um die Anzahl der benötigten C-terminalen Aminosäuren des *E. coli*-LeuCD-Fusionsproteins weiter zu untersuchen. Das Auftreten einer C-terminalen Verlängerung in Kombination mit einem C-terminalen Tryptophan bei eukaryotischen Fe/S-Proteinen sollte zukünftig mit bioinformatischen Analysen genauer untersucht werden.

Da verschiedene Erkennungsmechanismen des CIA-Targeting-Komplexes mit Targetproteinen postuliert werden, sollten weitere bakterielle Fe/S-Proteine mit C-terminalen Sequenzen fusioniert werden. Da die Länge dieser Sequenz womöglich eine Bedeutung hat, sollten proteinspezifisch verschiedene Varianten untersucht werden.

Ziel der biotechnologischen Anwendung der Tryptophan-Hypothese soll es sein, die Etablierung heterologer Biosynthesewege in Hefe zu ermöglichen. Im Rahmen seiner Diplomarbeit konnte Herr Dominique Bechtel bereits eine 2,5-fache Aktivitätssteigerung der DHAD aus *E. coli* ([4Fe-4S]-Cluster-Enzym) mit fusioniertem Hefe-Leu1-C-Terminus vorweisen (Bechtel, 2015). Die DHAD ist ein Mitglied der IlvD/EDD-Proteinfamilie und an der Biosynthese von BCAA beteiligt (Flint & Allen, 1996). Das *E. coli*-Enzym besitzt einen [4Fe-4S]-Cluster, wohingegen die Homologe aus Spinat oder *Streptococcus mutans* über einen [2Fe-2S]-Cluster verfügen. Diese Unterschiede wurden im Arbeitskreis von Prof. A. J. Pierik von Frau Dr. Thérèse Albert untersucht. Das verwandte Protein EDD ist Thema der Doktorarbeit von Frau Monika Schneider. Die Dehydratase-Proteinfamilie lässt sich in sechs

Untergruppen unterteilen. Allen gemein sind zwei konservierte Cysteine, ein Drittes ist Untergruppen-spezifisch (Andberg *et al.*, 2016). Neben den zwei DHAD- und der EDD-Untergruppe wird eine Untergruppe von den D-Xylonat-Dehydratasen gebildet. Die Proteinfamilie ist auf Grund der Beteiligung an bereits erfolglosen Versuchen der heterologen Expression metabolischer Wege in *S. cerevisiae* (siehe Tabelle 5.4) von zukünftigem Interesse.

Ein weiterer Schritt der Anwendung der Tryptophan-Hypothese könnte die Etablierung des Entner-Doudoroff-Weges in *S. cerevisiae* sein. Dabei soll an den Ansatz von Benisch & Boles angeknüpft werden. Deren Versuch, eine für die Expression in *S. cerevisiae* Codon-optimierte EDD-Variante durch Fusion mit dem kompletten Leu1-Protein, sowohl N- als auch C-terminal, mit der CIA-Maschinerie in Verbindung zu bringen, scheiterte (Benisch & Boles, 2014). Die 6-Phospho-D-gluconat-Dehydratase blieb mangels Fe/S-Clustereinbau funktionslos. Anstelle des kompletten Leu1-Proteins sollte die Fusion mit der C-terminalen Verlängerung bzw. dem Tripeptid wiederholt werden. Auf Grund der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten stellt dies einen vielversprechenden Ansatz dar. Ebenso könnte, möglicherweise in Zusammenarbeit, die weiteren in Tabelle 5.4 aufgelisteten negativen Beispiele des metabolischen Engineerings auf diese Hypothese hin untersucht und wiederholt werden. In Kombination hierzu sollte versucht werden, den Fe/S-Clustereinbau durch eine gesteigerte Fe/S-Clusterbiosynthese zu verbessern. Dies könnte durch eine verstärkte Eisenaufnahme im Zuge einer Aktivierung der Transkription eines oder mehrere Gene des Fe-Regulons vollzogen werden. Als erfolgsversprechend bei [2Fe-2S]-Clusterproteinen hat sich hierbei die Deletion von GRX3 oder FRA2, einem negativen Regulator der Transkription des Fe-Regulons, gezeigt (Flint *et al.*, 2013). So könnte durch metabolisches Engineering von Genen, welche am Eisenmetabolismus beteiligt sind, die Aktivität eines Fe/S-Proteins im Cytosol gesteigert werden.

Das finale Ziel stellt die funktionelle Expression komplexer prokaryotischer Enzyme dar. Ein langfristiger Meilenstein wäre die Expression einer aktiven Nitrogenase oder Hydrogenase im Hefecytosol. Diese Arbeit liefert, durch die Identifizierung des C-terminalen Tryptophans als Signalsequenz cytosolischer und nucleärer Fe/S-Proteine, einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Erkennung der Targetproteine durch die CIA-Maschinerie.

6. Literaturverzeichnis

Aasland, R., et al. (2002) Normalization of nomenclature for peptide motifs as ligands of modular protein domains. *FEBS Lett.* **513**, 141–144.

Aggarwal, C., Jimenez, J.C., Nanavati, D. & Federle, M.J. (2014) Multiple length peptide-pheromone variants produced by *Streptococcus pyogenes* directly bind Rgg proteins to confer transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* **289**, 22427–22436.

Allan, R.K. & Ratajczak, T. (2011) Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell Stress Chaperones* **16**, 353–367.

Andberg, M., et al. (2016) Characterization and mutagenesis of two novel iron-sulphur cluster pentonate dehydratases. *App. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 7549–7563.

Andersson, H., Kappeler, F. & Hauri, H.P. (1999) Protein targeting to endoplasmic reticulum by dilysine signals involves direct retention in addition to retrieval. *J. Biol. Chem.* **274**, 15080–15084.

Andrade, M.A. & Bork, P. (1995) HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat. Genet.* **11**, 115–116.

Andrade, M.A., Perez-Iratxeta, C. & Ponting, C.P. (2001) Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J. Struct. Biol.* **134**, 117–131.

Andreini, C., Banci, L. & Rosato, A. (2016) Exploiting bacterial operons to illuminate human iron-sulfur proteins. *J. Proteome Res.* **15**, 1308–1322.

Angerer, H. (2013) The superfamily of mitochondrial Complex1_LYR motif-containing (LYRM) proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 1335–1341.

Angerer, H. (2015) Eukaryotic LYR proteins interact with mitochondrial protein complexes. *Biology* **4**, 133–150.

Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S.J. & Karin, M. (1997) Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3094–3102.

Arragain, S., et al. (2010) Identification of eukaryotic and prokaryotic methylthiotransferase for biosynthesis of 2-methylthio-*N*⁶-threonylcarbamoyladenine in tRNA. *J. Biol. Chem.* **285**, 28425–28433.

Askree, S.H., et al. (2004) A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 8658–8663.

Austin, R.S., Provart, N.J. & Cutler, S.R. (2007) C-terminal motif prediction in eukaryotic proteomes using comparative genomics and statistical over-representation across protein families. *BMC Genom.* **8**, 191.

- Avalos, J.L., Fink, G.R. & Stephanopoulos, G. (2013)** Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols. *Nat. Biotechnol.* **31**, 335–341.
- Ayala-Castro, C., Saini, A. & Outten, F.W. (2008)** Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 110–125.
- Baichwal, V.R., Cunningham, T.S., Gatzek, P.R. & Kohlhaw, G.B. (1983)** Leucine biosynthesis in yeast. *Curr. Genet.* **7**, 369–377.
- Bak, D.W. & Elliott, S.J. (2014)** Alternative FeS cluster ligands: tuning redox potentials and chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**, 50–58.
- 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. *EMBO J.* **23**, 2105–2115.
- Balk, J., Pierik, A.J., Netz, D.J.A., Mühlenhoff, U. & Lill, R. (2005a)** Nar1p, a conserved eukaryotic protein with similarity to Fe-only hydrogenases, functions in cytosolic iron-sulphur protein biogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 86–89.
- Balk, J., Netz, D.J.A., Tepper, K., Pierik, A.J. & Lill, R. (2005b)** The essential WD40 protein Cia1 is involved in a late step of cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10833–10841.
- Balk, J. & Pilon, M. (2011)** Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends Plant Sci.* **16**, 218–226.
- Banci, L., et al. (2013)** Atomic-resolution monitoring of protein maturation in live human cells by NMR. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 297–299.
- Baranov, P.V., Gesteland, R.F. & Atkins, J.F. (2002)** Recoding: translational bifurcations in gene expression. *Gene* **286**, 187–201.
- Barton, R.M. & Worman, H.J. (1999)** Prenylated prelamin A interacts with Narf, a novel nuclear protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 30008–30018.
- Bayer, H. (2016)** *Analysen von Target-Proteinen an die CIA-Maschinerie mittels Two-Hybrid-System.* Bachelorarbeit. Fachbereich Chemie, TU Kaiserslautern.
- Bechtel, D.F. (2015)** *Studie zur Optimierung der Dihydroxysäure-Dehydratase-Expression in S. cerevisiae.* Diplomarbeit. Fachbereich Chemie, TU Kaiserslautern.
- Beilschmidt, L.K. & Puccio, H.M. (2014)** Mammalian Fe-S cluster biogenesis and its implication in disease. *Biochimie* **100**, 48–60.
- Beinert, H. & Lee, W. (1961)** Evidence for a new type of iron containing electron carrier in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **5**, 40–45.

- Beinert, H. & Kennedy, M.C. (1993)** Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. *FASEB J.* **7**, 1442–1449.
- Beinert, H., Kennedy, M.C. & Stout, C.D. (1996)** Aconitase as iron-sulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein. *Chem. Rev.* **96**, 2335–2374.
- Beinert, H., Holm, R.H. & Münck, E. (1997)** Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**, 653–659.
- Bellí, G., Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M. & Herrero, E. (1998a)** An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **26**, 942–947.
- Bellí, G., Garí, E., Aldea, M. & Herrero, E. (1998b)** Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast* **14**, 1127–1138.
- Benisch, F. & Boles, E. (2014)** The bacterial Entner-Doudoroff pathway does not replace glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* due to the lack of activity of iron-sulfur cluster enzyme 6-phosphogluconate dehydratase. *J. Biotechnol.* **171**, 45–55.
- Bensadoun, A. & Weinstein, D. (1976)** Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**, 241–250.
- Ben-Shimon, L., et al. (2018)** Fe-S cluster coordination of the chromokinesin KIF4A alters its subcellular localization during mitosis. *J. Cell Sci.* **131**.
- Berezovsky, I.N., Kilosanidze, G.T., Tumanyan, V.G. & Kisselev, L.L. (1999)** Amino acid composition of protein termini are biased in different manners. *Protein Eng.* **12**, 23–30.
- Berggård, T., Linse, S. & James, P. (2007)** Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* **7**, 2833–2842.
- Berman, H.M., et al. (2000)** The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242.
- Biederbick, A., et al. (2006)** Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5675–5687.
- Bigelis, R. & Umbarger, H.E. (1975)** Purification of yeast α -isopropylmalate isomerase. High ionic strength hydrophobic chromatography. *J. Biol. Chem.* **250**, 4315–4321.
- Bigelis, R. & Umbarger, H.E. (1976)** Yeast α -isopropylmalate isomerase. Factors affecting stability and enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **251**, 3545–3552.
- Binder, S., Knill, T. & Schuster, J. (2007)** Branched-chain amino acid metabolism in higher plants. *Physiol. Plant.* **129**, 68–78.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1523.

- Björnsson, A., Mottagui-Tabar, S. & Isaksson, L.A. (1996)** Structure of the C-terminal end of the nascent peptide influences translation termination. *EMBO J.* **15**, 1696–1704.
- Blinn, C.M. (2014)** *Die Thioredoxin-artigen Ferredoxine Aim32 und Apd1 der Bäckerhefe*. Diplomarbeit. Fachbereich Chemie, TU Kaiserslautern.
- Block, H., et al. (2009)** Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods Enzymol.* **463**, 439–473.
- Blombach, F., et al. (2015)** Archaeal TFE α/β is a hybrid of TFIIE and the RNA polymerase III subcomplex hRPC62/39. *eLife* **4**, e08378.
- Bode, M., et al. (2015)** Redox-regulated dynamic interplay between Cox19 and the copper-binding protein Cox11 in the intermembrane space of mitochondria facilitates biogenesis of cytochrome *c* oxidase. *Mol. Biol. Cell* **26**, 2385–2401.
- Botstein, D. & Fink, G.R. (2011)** Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* **189**, 695–704.
- Bradbury, A.J., Gruer, M.J., Rudd, K.E. & Guest, J.R. (1996)** The second aconitase (AcnB) of *Escherichia coli*. *Microbiology* **142**, 389–400.
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Brewster, N.K., Val, D.L., Walker, M.E. & Wallace, J.C. (1994)** Regulation of pyruvate carboxylase isozyme (PYC1, PYC2) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and nonfermentative growth. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 62–71.
- Brocard, C., Kragler, F., Simon, M.M., Schuster, T. & Hartig, A. (1994)** The tetratricopeptide repeat-domain of the PAS10 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for binding the peroxisomal targeting signal-SKL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 1016–1022.
- Brocard, C. & Hartig, A. (2006)** Peroxisome targeting signal 1: is it really a simple tripeptide? *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1565–1573.
- Broderick, J.B., Duffus, B.R., Duschene, K.S. & Shepard, E.M. (2014)** Radical S-adenosylmethionine enzymes. *Chem. Rev.* **114**, 4229–4317.
- Broder, Y.C., Katz, S. & Aronheim, A. (1998)** The ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions. *Curr. Biol.* **8**, 1121–1124.
- Brown, N.M., et al. (1998)** Novel role of phosphorylation in Fe-S cluster stability revealed by phosphomimetic mutations at Ser-138 of iron regulatory protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 15235–15240.

- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. & Schlattner, U. (2009)** Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 2763–2788.
- Bryksin, A.V. & Matsumura, I. (2010)** Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *BioTechniques* **48**, 463–465.
- Buchli, R., et al. (2005)** Development and validation of a fluorescence polarization-based competitive peptide-binding assay for HLA-A*0201 - a new tool for epitope discovery. *Biochemistry* **44**, 12491–12507.
- Burns, R.O., Calvo, J., Margolin, P. & Umbarger, H.E. (1966)** Expression of the leucine operon. *J. Bacteriol.* **91**, 1570–1576.
- Camire, E.J., Grossman, J.D., Thole, G.J., Fleischman, N.M. & Perlstein, D.L. (2015)** The yeast Nbp35-Cfd1 cytosolic iron-sulfur cluster scaffold is an ATPase. *J. Biol. Chem.* **290**, 23793–23802.
- Carlsen, S., et al. (2013)** Heterologous expression and characterization of bacterial 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 5753–5769.
- Chakravarti, A., et al. (2018)** Reconstitution and substrate specificity for isopentenyl pyrophosphate of the antiviral radical SAM enzyme viperin. *J. Biol. Chem.* **293**, 14122–14133.
- Chapman-Smith, A. & Cronan, J.E. (1999)** Molecular biology of biotin attachment to proteins. *J. Nutr.* **129**, 477S–484S.
- Chatr-Aryamontri, A., et al. (2017)** The BioGRID interaction database: 2017 update. *Nucleic Acids Res.* **45**, D369–D379.
- Chen, K.E., et al. (2012)** The mammalian DUF59 protein Fam96a forms two distinct types of domain-swapped dimer. *Acta Crystallogr. Sect. D* **68**, 637–648.
- Cherry, J.M., et al. (2012)** Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **40**, D700–D705.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. & Fields, S. (1991)** The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 9578–9582.
- Chin, K.C. & Cresswell, P. (2001)** Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 15125–15130.
- Choi-Rhee, E., Schulman, H. & Cronan, J.E. (2004)** Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. *Protein Sci.* **13**, 3043–3050.
- Chung, J.J., Shikano, S., Hanyu, Y. & Li, M. (2002)** Functional diversity of protein C-termini: more than zipcoding? *Trends Cell Biol.* **12**, 146–150.

- Chung, J.-J., Yang, H. & Li, M. (2003)** Genome-wide analyses of carboxyl-terminal sequences. *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 173–181.
- Clontech Laboratories**, Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries user manual.
- Coblitz, B., Wu, M., Shikano, S. & Li, M. (2006)** C-terminal binding: an expanded repertoire and function of 14-3-3 proteins. *FEBS Lett.* **580**, 1531–1535.
- da Silva Almeida, A.C., Hocking, H.G., Boelens, R., Strous, G.J. & van Rossum, A.G.S.H. (2013)** β TrCP interacts with the ubiquitin-dependent endocytosis motif of the GH receptor in an unconventional manner. *Biochem. J.* **453**, 291–301.
- Dahiya, A., Gavin, M.R., Luo, R.X. & Dean, D.C. (2000)** Role of the LXCXE binding site in Rb function. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6799–6805.
- Daum, G., Bohni, P.C. & Schatz, G. (1982)** Import of proteins into mitochondria. Cytochrome *b*₂ and cytochrome *c* peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 13028–13033.
- Davey, N.E., et al. (2012)** Attributes of short linear motifs. *Mol. Biosyst.* **8**, 268–281.
- de Petris, S. (1978)** Immunoelectron microscopy and immunofluorescence in membrane biology. *Methods Membr. Biol.* **9**, 1–201.
- Dinkel, H., et al. (2016)** ELM 2016-data update and new functionality of the eukaryotic linear motif resource. *Nucleic acids research* **44**, D294-D300.
- Dittrich-Motzki, S.A. (2016)** *Analyse von ISC/CIA-regulierbaren Δ Leu1-Hefestämmen.* Bachelorarbeit. Fachbereich Chemie, TU Kaiserslautern.
- Dong, M., et al. (2014)** Dph3 is an electron donor for Dph1-Dph2 in the first step of eukaryotic dipthamide biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 1754–1757.
- Dos Santos, P.C., Dean, D.R., Hu, Y. & Ribbe, M.W. (2004)** Formation and insertion of the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. *Chem. Rev.* **104**, 1159–1173.
- Drapier, J.C. & Hibbs, J.B. (1996)** Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Methods Enzymol.* **269**, 26–36.
- Drevland, R.M., Waheed, A. & Graham, D.E. (2007)** Enzymology and evolution of the pyruvate pathway to 2-oxobutyrate in *Methanocaldococcus jannaschii*. *J. Bacteriol.* **189**, 4391–4400.
- Dupuy, J., et al. (2006)** Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase. *Structure* **14**, 129–139.
- Duschene, K.S. & Broderick, J.B. (2010)** The antiviral protein viperin is a radical SAM enzyme. *FEBS Lett.* **584**, 1263–1267.

Ebert, A. (2014) *Die Signalwirkung des C-Terminus auf die Reifung der Isopropylmalat-Isomerase*. Diplomarbeit. Fachbereich Chemie, TU Kaiserslautern.

Edelhoch, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* **6**, 1948–1954.

Engstrom, L.M., et al. (2014) A zinc linchpin motif in the MUTYH glycosylase interdomain connector is required for efficient repair of DNA damage. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 7829–7832.

Entian, K.D., et al. (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol. Gen. Genet.* **262**, 683–702.

Exley, G.E., Colandene, J.D. & Garrett, R.H. (1993) Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of nit-6, the structural gene for nitrite reductase in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **175**, 2379–2392.

Fazius, F., Shelest, E., Gebhardt, P. & Brock, M. (2012) The fungal α -aminoadipate pathway for lysine biosynthesis requires two enzymes of the aconitase family for the isomerization of homocitrate to homoisocitrate. *Mol. Microbiol.* **86**, 1508–1530.

Feldmann, H. (2012) *Yeast. Molecular and Cell Biology*. 2nd ed.: Wiley.

Fiedler, K., Veit, M., Stamnes, M.A. & Rothman, J.E. (1996) Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* **273**, 1396–1399.

Fields, S. & Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245–246.

Filetici, P., Martegani, M.P., Valenzuela, L., González, A. & Ballario, P. (1996) Sequence of the *GLT1* gene from *Saccharomyces cerevisiae* reveals the domain structure of yeast glutamate synthase. *Yeast* **12**, 1359–1366.

Fitzgerald, K.A. (2011) The interferon inducible gene: Viperin. *J. Interferon Cytokine Res.* **31**, 131–135.

Flint, D.H. & Allen, R.M. (1996) Iron–sulfur proteins with nonredox functions. *Chem. Rev.* **96**, 2315–2334.

Flint, D.H., Paul, B.J. & Ye, R.W. (2013) Activity of Fe-S cluster requiring proteins, Patent US 2014/0038268 A1.

Freitag, J., Ast, J. & Bölker, M. (2012) Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature* **485**, 522–525.

Fultz, P.N. & Kemper, J. (1981) Wild-type isopropylmalate isomerase in *Salmonella typhimurium* is composed of two different subunits. *J. Bacteriol.* **148**, 210–219.

Gangloff, S.P., Marguet, D. & Lauquin, G.J. (1990) Molecular cloning of the yeast mitochondrial aconitase gene (*ACO1*) and evidence of a synergistic regulation of expression by glucose plus glutamate. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 3551–3561.

- Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M. & Herrero, E. (1997)** A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 837–848.
- Gari, K., et al. (2012)** MMS19 links cytoplasmic iron-sulfur cluster assembly to DNA metabolism. *Science* **337**, 243–245.
- Gatto, G.J., Geisbrecht, B.V., Gould, S.J. & Berg, J.M. (2000)** Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **7**, 1091–1095.
- Gatto, G.J. & Berg, J.M. (2003)** Nonrandom tripeptide sequence distributions at protein carboxyl termini. *Genome Res.* **13**, 617–623.
- Gavin, A.-C., et al. (2002)** Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141–147.
- Gavin, A.-C., et al. (2006)** Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**, 631–636.
- Geiser, M., Cèbe, R., Drewello, D. & Schmitz, R. (2001)** Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase. *BioTechniques* **31**, 88–92.
- Geourjon, C. & Deléage, G. (1995)** SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.* **11**, 681–684.
- Ghaemmaghami, S., et al. (2003)** Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737–741.
- Gibson, D.G., et al. (2009)** Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**, 343–345.
- Gibson, T.J., Dinkel, H., van Roey, K. & Diella, F. (2015)** Experimental detection of short regulatory motifs in eukaryotic proteins: tips for good practice as well as for bad. *Cell Commun. Signal.* **13**, 42.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A. & Schiestl, R.H. (1992)** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1425.
- Goa, J. (1953)** A micro biuret method for protein determination; determination of total protein in cerebrospinal fluid. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **5**, 218–222.
- Goffeau, A., et al. (1996)** Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563–7.
- Goldstein, A.L. & McCusker, J.H. (1999)** Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 1541–1553.

- Gossen, M. & Bujard, H. (1992)** Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 5547–5551.
- Gould, S.J., Keller, G.A. & Subramani, S. (1988)** Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J. Cell Biol.* **107**, 897-905.
- Grandoni, J.A., Switzer, R.L., Makaroff, C.A. & Zalkin, H. (1989)** Evidence that the iron-sulfur cluster of *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase determines stability of the enzyme to degradation *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **264**, 6058–6064.
- Gross, S.R., Jungwirth, C. & Umbarger, E. (1962)** Another intermediate in leucine biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**, 5–9.
- Gross, S.R., Burns, R.O. & Umbarger, H.E. (1963)** The biosynthesis of leucine. II. The enzymatic isomerization of β -Carboxy- β -Hydroxyisocaproate and α -Hydroxy- β -Carboxyisocaproate. *Biochemistry* **2**, 1046–1052.
- Gruer, M.J., Artymiuk, P.J. & Guest, J.R. (1997)** The aconitase family: three structural variations on a common theme. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 3–6.
- Guan, Y., et al. (2015)** An equation to estimate the difference between theoretically predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide. *Sci. Rep.* **5**, 13370.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J. (2004)** Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.* **22**, 346–353.
- Hagen, S., et al. (2015)** Structural insights into cargo recognition by the yeast PTS1 receptor. *J. Biol. Chem.* **290**, 26610–26626.
- Hänzelmann, P., et al. (2004)** Characterization of MOCS1A, an oxygen-sensitive iron-sulfur protein involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 34721–34732.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S.J. (1993)** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805–816.
- Hartmann, T., et al. (2012)** The impact of single nucleotide polymorphisms on human aldehyde oxidase. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 856–864.
- Hatfield, M.D., et al. (2006)** Identification of MMS19 domains with distinct functions in NER and transcription. *DNA repair* **5**, 914–924.

- Hausmann, A., et al. (2005)** The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: an essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 3266–3271.
- Hausmann, A., Samans, B., Lill, R. & Mühlenhoff, U. (2008)** Cellular and mitochondrial remodeling upon defects in iron-sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* **283**, 8318–8330.
- He, Y., Chen, B., Pang, Q., Strul, J.M. & Chen, S. (2010)** Functional specification of *Arabidopsis* isopropylmalate isomerases in glucosinolate and leucine biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **51**, 1480–1487.
- Heffernan, R., et al. (2016)** Highly accurate sequence-based prediction of half-sphere exposures of amino acid residues in proteins. *Bioinformatics* **32**, 843–849.
- Heide, H., et al. (2009)** Application of quantitative immunoprecipitation combined with knockdown and cross-linking to *Chlamydomonas* reveals the presence of vesicle-inducing protein in plastids 1 in a common complex with chloroplast HSP90C. *Proteomics* **9**, 3079–3089.
- Hjelm, H., Hjelm, K. & Sjöquist, J. (1972)** Protein A from *Staphylococcus aureus*. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins. *FEBS Lett.* **28**, 73–76.
- Ho, Y., et al. (2002)** Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**, 180–183.
- Hochuli, E., Döbeli, H. & Schacher, A. (1987)** New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* **411**, 177–184.
- Honarmand Ebrahimi, K., et al. (2017)** The radical-SAM enzyme Viperin catalyzes reductive addition of a 5'-deoxyadenosyl radical to UDP-glucose *in vitro*. *FEBS Lett.* **591**, 2394–2405.
- Horton, R.M., Cai, Z.L., Ho, S.N. & Pease, L.R. (1990)** Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *BioTechniques* **8**, 528–535.
- Horwitz, J.P., et al. (1964)** Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-Indolyl- β -D-Glycopyranosides. *J. Med. Chem.* **7**, 574–575.
- Hsu, Y.P. & Schimmel, P. (1984)** Yeast *LEU1*. Repression of mRNA levels by leucine and relationship of 5'-noncoding region to that of *LEU2*. *J. Biol. Chem.* **259**, 3714–3719.
- Hung, A.Y. & Sheng, M. (2002)** PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J. Biol. Chem.* **277**, 5699–5702.

Huttlin, E.L., et al. (2015) The BioPlex network: a systematic exploration of the human interactome. *Cell* **162**, 425–440.

Huttlin, E.L., et al. (2017) Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature* **545**, 505–509.

Imhof, J., et al. (2014) The small subunit 1 of the *Arabidopsis* isopropylmalate isomerase is required for normal growth and development and the early stages of glucosinolate formation. *PLoS ONE* **9**, e91071.

Inoyama, D., et al. (2012) Optimization of fluorescently labeled Nrf2 peptide probes and the development of a fluorescence polarization assay for the discovery of inhibitors of Keap1-Nrf2 interaction. *J. Biomol. Screen.* **17**, 435–447.

Irvin, S.D. & Bhattacharjee, J.K. (1998) A unique fungal lysine biosynthesis enzyme shares a common ancestor with tricarboxylic acid cycle and leucine biosynthetic enzymes found in diverse organisms. *J. Mol. Evol.* **46**, 401–408.

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

Ito, S., et al. (2010) MMXD, a TFIIH-independent XPD-MMS19 protein complex involved in chromosome segregation. *Mol. Cell* **39**, 632–640.

Ito, T., et al. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 4569–4574.

Janke, C., et al. (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947–962.

Jennings, B.H., et al. (2006) Molecular recognition of transcriptional repressor motifs by the WD domain of the Groucho/TLE corepressor. *Mol. Cell* **22**, 645–655.

Jensen, R.A. (1976) Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annu. Rev. Microbiol.* **30**, 409–425.

Jeyakanthan, J., et al. (2010) Substrate specificity determinants of the methanogen homoaconitase enzyme: structure and function of the small subunit. *Biochemistry* **49**, 2687–2696.

Jiang, D., et al. (2008) Identification of three interferon-inducible cellular enzymes that inhibit the replication of hepatitis C virus. *J. Virol.* **82**, 1665–1678.

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

Johnsson, N. & Varshavsky, A. (1994) Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 10340–10344.

- Johnston, M. & Davis, R.W. (1984)** Sequences that regulate the divergent *GAL1-GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1440–1448.
- Johnston, M. (1987)** A model fungal gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **51**, 458–476.
- Johnstone, R.W., et al. (1998)** Ciao 1 is a novel WD40 protein that interacts with the tumor suppressor protein WT1. *J. Biol. Chem.* **273**, 10880–10887.
- Johnstone, R.W., Tommerup, N., Hansen, C., Vissing, H. & Shi, Y. (1999)** Structural organization, tissue expression, and chromosomal localization of Ciao 1, a functional modulator of the Wilms' tumor suppressor, WT1. *Immunogenetics* **49**, 900–905.
- Jordan, P.A., Tang, Y., Bradbury, A.J., Thomson, A.J. & Guest, J.R. (1999)** Biochemical and spectroscopic characterization of *Escherichia coli* aconitases (AcnA and AcnB). *Biochem. J.* **344**, 739–746.
- Joska, T.M., Mashruwala, A., Boyd, J.M. & Belden, W.J. (2014)** A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile. *J. Microbiol. Methods* **100**, 46–51.
- Kaboord, B. & Perr, M. (2008)** Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol. Biol.* **424**, 349–364.
- Karl, L.D.C. (2017)** *Cia1 Bindungsstudien mit C-terminalen Peptiden zytosolischer Fe/S-Proteine*. Masterarbeit. Fachbereich Chemie, TU Kaiserslautern.
- Kater, L., et al. (2017)** Visualizing the assembly pathway of nucleolar pre-60S ribosomes. *Cell* **171**, 1599–1610.
- Kennedy, M.C., Emptage, M.H., Dreyer, J.L. & Beinert, H. (1983)** The role of iron in the activation-inactivation of aconitase. *J. Biol. Chem.* **258**, 11098–11105.
- Keseler, I.M., et al. (2011)** EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Res.* **39**, D583–D590.
- Kim, D.I., et al. (2014)** Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, E2453–E2461.
- Kim, D.I., et al. (2016)** An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol. Biol. Cell* **27**, 1188–1196.
- Kim, H.S., Hoja, U., Stolz, J., Sauer, G. & Schweizer, E. (2004)** Identification of the tRNA-binding protein Arc1p as a novel target of *in vivo* biotinylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**, 42445–42452.
- Kim, P.K. & Hetteema, E.H. (2015)** Multiple pathways for protein transport to peroxisomes. *J. Mol. Biol.* **427**, 1176–1190.

- King, T.E. (1964)** Stoichiometry of labile sulfide, nonheme iron and flavin in reconstitutively active succinate dehydrogenase from heart mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **16**, 511–515.
- Kirby, J., et al. (2016)** Engineering a functional 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* **38**, 494–503.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. & Lill, R. (1999)** The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* **18**, 3981–3989.
- Kispal, G., et al. (2005)** Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO J.* **24**, 589–598.
- Klinge, S., Hirst, J., Maman, J.D., Krude, T. & Pellegrini, L. (2007)** An iron-sulfur domain of the eukaryotic primase is essential for RNA primer synthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 875–877.
- Knill, T., Reichelt, M., Paetz, C., Gershenzon, J. & Binder, S. (2009)** *Arabidopsis thaliana* encodes a bacterial-type heterodimeric isopropylmalate isomerase involved in both Leu biosynthesis and the Met chain elongation pathway of glucosinolate formation. *Plant Mol. Biol.* **71**, 227–239.
- Kohlhaw, G.B. (1988)** Isopropylmalate dehydratase from yeast. *Methods Enzymol.* **166**, 423–429.
- Kohlhaw, G.B. (2003)** Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 1–15.
- Koren, I., et al. (2018)** The eukaryotic proteome is shaped by E3 ubiquitin ligases targeting C-terminal degrons. *Cell* **173**, 1622–1635.
- Kou, H., Zhou, Y., Gorospe, R.M.C. & Wang, Z. (2008)** Mms19 protein functions in nucleotide excision repair by sustaining an adequate cellular concentration of the TFIIH component Rad3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 15714–15719.
- Krainer, G., Broecker, J., Vargas, C., Fanghänel, J. & Keller, S. (2012)** Quantifying high-affinity binding of hydrophobic ligands by isothermal titration calorimetry. *Anal. Chem.* **84**, 10715–10722.
- Krogan, N.J., et al. (2006)** Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**, 637–643.
- Krügel, H., Fiedler, G., Smith, C. & Baumberg, S. (1993)** Sequence and transcriptional analysis of the nourseothricin acetyltransferase-encoding gene *nat1* from *Streptomyces noursei*. *Gene* **127**, 127–131.
- Kunze, M. & Berger, J. (2015)** The similarity between N-terminal targeting signals for protein import into different organelles and its evolutionary relevance. *Front. Physiol.* **6**, 259.

- Ladbury, J.E. (2013)** Thermodynamics of biomolecular interactions. In: Roberts, G.C.K. (Hg.): *Encyclopedia of Biophysics*, S. 2589–2606. Springer.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lakowicz, J.R. (2006)** *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed.: Springer.
- Landgraf, B.J., McCarthy, E.L. & Booker, S.J. (2016)** Radical S-adenosylmethionine enzymes in human health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 485–514.
- Landry, A.P. & Ding, H. (2014)** The N-terminal domain of human DNA helicase Rtel1 contains a redox active iron-sulfur cluster. *Biomed Res. Int.* **2014**, 285791.
- Lane, D.J.R., Merlot, A.M. & Richardson, D.R. (2014)** The lure of a LYR: The logistics of iron sulfur cluster delivery. *Cell Metab.* **19**, 348–350.
- Lane, M.D., Rominger, K.L., Young, D.L. & Lynen, F. (1964)** The enzymatic synthesis of holotranscarboxylase from apotranscarboxylase and (+)-biotin. II. Investigation of the reaction mechanism. *J. Biol. Chem.* **239**, 2865–2871.
- Lauder, S., et al. (1996)** Dual requirement for the yeast *MMS19* gene in DNA repair and RNA polymerase II transcription. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6783–6793.
- Lee, A.Y., et al. (2014a)** Mapping the cellular response to small molecules using chemogenomic fitness signatures. *Science* **344**, 208–211.
- Lee, E.H., Cho, Y.W. & Hwang, K.Y. (2012)** Crystal structure of LeuD from *Methanococcus jannaschii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **419**, 160–164.
- Lee, E.H., Lee, K. & Hwang, K.Y. (2014b)** Structural characterization and comparison of the large subunits of IPM isomerase and homoaconitase from *Methanococcus jannaschii*. *Acta Crystallogr. Sect. D* **70**, 922–931.
- Lee, M.S., Edwards, R.A., Thede, G.L. & Glover, J.N.M. (2005)** Structure of the BRCT repeat domain of MDC1 and its specificity for the free COOH-terminal end of the γ -H2AX histone tail. *J. Biol. Chem.* **280**, 32053–32056.
- Leitner, A., Faini, M., Stengel, F. & Aebersold, R. (2016)** Crosslinking and mass spectrometry: an integrated technology to understand the structure and function of molecular machines. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 20–32.
- Lev, I., et al. (2013)** Reverse PCA, a systematic approach for identifying genes important for the physical interaction between protein pairs. *PLoS Genet.* **9**, e1003838.
- Li, H., et al. (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, X. (2011)** RbCl super competent cells. *Bio Protoc.* **1**, e76.

- Lian, J., Mishra, S. & Zhao, H. (2018)** Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: New tools and their applications. *Metabolic engineering*.
- Lill, R. & Mühlenhoff, U. (2006)** Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 457–486.
- Lill, R., et al. (2006)** Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 652–667.
- Lill, R. (2009)** Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**, 831–838.
- Lill, R., Broderick, J.B. & Dean, D.R. (2015a)** Special issue on iron-sulfur proteins: Structure, function, biogenesis and diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1251–1252.
- Lill, R., et al. (2015b)** The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **94**, 280–291.
- Lin, H.-C., et al. (2018)** C-terminal end-directed protein elimination by CRL2 ubiquitin ligases. *Mol. Cell* **70**, 602–613.
- Linder, T. (2014)** *CMO1* encodes a putative choline monooxygenase and is required for the utilization of choline as the sole nitrogen source in the yeast *Scheffersomyces stipitis* (syn. *Pichia stipitis*). *Microbiology* **160**, 929–940.
- Linding, R., et al. (2003)** Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure* **11**, 1453–1459.
- Link, T.A. (1999)** The structures of Rieske and Rieske-type proteins. *Advances in Inorganic Chemistry*. 47. Aufl.: Elsevier.
- Link, T.A. (2006)** Fe-S Rieske center. *Handbook of Metalloproteins*. 1. Aufl.: Wiley.
- Lloyd, S.J., Lauble, H., Prasad, G.S. & Stout, C.D. (1999)** The mechanism of aconitase: 1.8 Å resolution crystal structure of the S642A: citrate complex. *Protein Sci.* **8**, 2655–2662.
- Lubitz, W., Ogata, H., Rüdiger, O. & Reijerse, E. (2014)** Hydrogenases. *Chem. Rev.* **114**, 4081–4148.
- Luchinat, E. & Banci, L. (2016)** A unique tool for cellular structural biology: In-cell NMR. *J. Biol. Chem.* **291**, 3776–3784.
- Lukeš, J. & Basu, S. (2015)** Fe/S protein biogenesis in trypanosomes - A review. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1481–1492.
- Luo, D., Bernard, D.G., Balk, J., Hai, H. & Cui, X. (2012)** The DUF59 family gene *AE7* acts in the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway to maintain nuclear genome integrity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 4135–4148.
- Ma, H., Kunes, S., Schatz, P.J. & Botstein, D. (1987)** Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* **58**, 201–216.

- Maio, N., et al. (2014)** Cochaperone binding to LYR motifs confers specificity of iron sulfur cluster delivery. *Cell Metab.* **19**, 445–457.
- Maio, N. & Rouault, T.A. (2015)** Iron-sulfur cluster biogenesis in mammalian cells: New insights into the molecular mechanisms of cluster delivery. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1493–1512.
- Maione, V., Cantini, F., Severi, M. & Banci, L. (2018)** Investigating the role of the human CIA2A-CIAO1 complex in the maturation of aconitase. *Biochim. Biophys. Acta* **1862**, 1980–1987.
- Makaroff, C.A., Paluh, J.L. & Zalkin, H. (1986)** Mutagenesis of ligands to the [4 Fe-4S] center of *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase. *J. Biol. Chem.* **261**, 11416–11423.
- Makarova, A.V. & Burgers, P.M. (2015)** Eukaryotic DNA polymerase ζ . *DNA repair* **29**, 47–55.
- Malkin, R. & Rabinowitz, J.C. (1966)** The reconstitution of clostridial ferredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 822–827.
- Manikandan, K., Geerlof, A., Zozulya, A.V., Svergun, D.I. & Weiss, M.S. (2011)** Structural studies on the enzyme complex isopropylmalate isomerase (LeuCD) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteins* **79**, 35–49.
- Marfatia, S.M., Morais-Cabral, J.H., Kim, A.C., Byron, O. & Chishti, A.H. (1997)** The PDZ domain of human erythrocyte p55 mediates its binding to the cytoplasmic carboxyl terminus of glycophorin C. Analysis of the binding interface by *in vitro* mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **272**, 24191–24197.
- Margolin, P. (1963)** Genetic fine structure of the leucine operon in *Salmonella*. *Genetics* **48**, 441–457.
- Martelli, A., et al. (2007)** Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2651–2658.
- Marzioch, M., Erdmann, R., Veenhuis, M. & Kunau, W.H. (1994)** PAS7 encodes a novel yeast member of the WD-40 protein family essential for import of 3-oxoacyl-CoA thiolase, a PTS2-containing protein, into peroxisomes. *EMBO J.* **13**, 4908–4918.
- 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. *Curr. Genet.* **64**, 9–16.
- Masselot, M. & de Robichon-Szulmajster, H. (1975)** Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Genetical analysis of auxotrophic mutants. *Mol. Gen. Genet.* **139**, 121–132.

Matsumura, I. (2013) A quarter century of reaping what we SOE. *BioTechniques* **54**, 127-128.

Mattijssen, S. & Pruijn, G.J.M. (2012) Viperin, a key player in the antiviral response. *Microbes Infect.* **14**, 419–426.

Mayr, C. (2018) Protein complexes assemble as they are being made. *Nature* **561**, 186-187.

Mazelova, J., et al. (2009) Ciliary targeting motif VxPx directs assembly of a trafficking module through Arf4. *EMBO J.* **28**, 183–192.

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

Michnick, S.W. (2003) Protein fragment complementation strategies for biochemical network mapping. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 610–617.

Miele, A.E., Watson, P.J., Evans, P.R., Traub, L.M. & Owen, D.J. (2004) Two distinct interaction motifs in amphiphysin bind two independent sites on the clathrin terminal domain β -propeller. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 242–248.

Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Milne, N., Wahl, S.A., van Maris, A.J.A., Pronk, J.T. & Daran, J.M. (2016) Excessive by-product formation: A key contributor to low isobutanol yields of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metab. Eng. Commun.* **3**, 39–51.

Morita, K., et al. (2017) Heterologous expression of bacterial phosphoenol pyruvate carboxylase and Entner-Doudoroff pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for improvement of isobutanol production. *J. Biosci. Bioeng.* **124**, 263–270.

MOTIF Search. URL: <http://www.genome.jp/tools/motif/MOTIF2.html>.

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

Mühlenhoff, U., et al. (2004) Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**, 36906–36915.

Mühlenhoff, U., et al. (2010) Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab.* **12**, 373–385.

Mumberg, D., Müller, R. & Funk, M. (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5767–5768.

- Mumberg, D., Müller, R. & Funk, M. (1995)** Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**, 119–122.
- Munro, S. & Pelham, H.R. (1987)** A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899–907.
- Na, U., et al. (2014)** The LYR factors SDHAF1 and SDHAF3 mediate maturation of the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase. *Cell Metab.* **20**, 253–266.
- Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Stümpfig, M., Mühlhoff, U. & Lill, R. (2007)** The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 278–286.
- Netz, D.J.A., et al. (2010)** Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 758–765.
- Netz, D.J.A., et al. (2011)** Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 125–132.
- Netz, D.J.A., et al. (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. *J. Biol. Chem.* **287**, 12365–12378.
- Netz, D.J.A., et al. (2014)** Maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Trends Cell Biol.* **24**, 303–312.
- Netz, D.J.A., et al. (2016)** The conserved protein Dre2 uses essential [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters for its function in cytosolic iron-sulfur protein assembly. *Biochem. J.* **473**, 2073–2085.
- Neuberger, G., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Hartig, A. & Eisenhaber, F. (2003)** Prediction of peroxisomal targeting signal 1 containing proteins from amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **328**, 581–592.
- Nicolet, Y., Cavazza, C. & Fontecilla-Camps, J.C. (2002)** Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution. *J. Inorg. Biochem.* **91**, 1–8.
- Nielsen, J. & Keasling, J.D. (2016)** Engineering cellular metabolism. *Cell* **164**, 1185–1197.
- Nishida, H., et al. (1999)** A prokaryotic gene cluster involved in synthesis of lysine through the amino adipate pathway: a key to the evolution of amino acid biosynthesis. *Genome Res.* **9**, 1175–1183.
- Noma, A., Kirino, Y., Ikeuchi, Y. & Suzuki, T. (2006)** Biosynthesis of wybutosine, a hyper-modified nucleoside in eukaryotic phenylalanine tRNA. *EMBO J.* **25**, 2142–2154.
- Nooren, I.M.A. & Thornton, J.M. (2003)** Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J.* **22**, 3486–3492.

- O'Connell, M.R., Gamsjaeger, R. & Mackay, J.P. (2009)** The structural analysis of protein-protein interactions by NMR spectroscopy. *Proteomics* **9**, 5224–5232.
- Odermatt, D.C. & Gari, K. (2017)** The CIA targeting complex is highly regulated and provides two distinct binding sites for client iron-sulfur proteins. *Cell Rep.* **18**, 1434–1443.
- Oldenburg, K.R., Vo, K.T., Michaelis, S. & Paddon, C. (1997)** Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast. *Nucleic Acids Res.* **25**, 451–452.
- Ong, S.E., et al. (2002)** Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 376–386.
- Oshima, Y., et al. (2008)** Plant catalase is imported into peroxisomes by Pex5p but is distinct from typical PTS1 import. *Plant Cell Physiol.* **49**, 671–677.
- 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. *J. Biol. Chem.* **288**, 23358–23367.
- Panigrahi, R., Kubiszewski-Jakubiak, S., Whelan, J. & Vrielink, A. (2015)** The design and structure of outer membrane receptors from peroxisomes, mitochondria, and chloroplasts. *Structure* **23**, 1783–1800.
- Paraskevopoulou, C., Fairhurst, S.A., Lowe, D.J., Brick, P. & Onesti, S. (2006)** The elongator subunit Elp3 contains a Fe₄S₄ cluster and binds S-adenosylmethionine. *Mol. Microbiol.* **59**, 795–806.
- Partow, S., Siewers, V., Daviet, L., Schalk, M. & Nielsen, J. (2012)** Reconstruction and evaluation of the synthetic bacterial MEP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS one* **7**, e52498.
- Pasalic, D., et al. (2017)** A peptide extension dictates IgM assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E8575–E8584.
- Paul, V.D. (2014)** *Identifizierung und Charakterisierung neuer Faktoren der zytosolischen Fe-S Proteinbiogenese*. Dissertation. Fachbereich Medizin, Philipps-Universität Marburg.
- Paul, V.D. & Lill, R. (2015)** Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1528–1539.
- Paul, V.D., et al. (2015)** The deca-GX₃ proteins Yae1-Lto1 function as adaptors recruiting the ABC protein Rli1 for iron-sulfur cluster insertion. *eLife* **4**, e08231.
- Pearce, L.R., Komander, D. & Alessi, D.R. (2010)** The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 9–22.
- Pellett, S. & Tracy, J.W. (2006)** Mak16p is required for the maturation of 25S and 5.8S rRNAs in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 495–506.

- Perkins, J.R., Diboun, I., Dessailly, B.H., Lees, J.G. & Orengo, C. (2010)** Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties. *Structure* **18**, 1233–1243.
- Petriv, O.I., Tang, L., Titorenko, V.I. & Rachubinski, R.A. (2004)** A new definition for the consensus sequence of the peroxisome targeting signal type 2. *J. Mol. Biol.* **341**, 119–134.
- Pierik, A.J., Netz, D.J.A. & Lill, R. (2009)** Analysis of iron-sulfur protein maturation in eukaryotes. *Nat. Protoc.* **4**, 753–766.
- Pirner, H.M. & Stolz, J. (2006)** Biotin sensing in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a conserved DNA element and requires the activity of biotin-protein ligase. *J. Biol. Chem.* **281**, 12381–12389.
- 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 Res.* **40**, 7821–7830.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975)** Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598–599.
- Pradhan, P., Li, W. & Kaur, P. (2009)** Translational coupling controls expression and function of the DrrAB drug efflux pump. *J. Mol. Biol.* **385**, 831–842.
- Prakash, L. & Prakash, S. (1977)** Isolation and characterization of MMS-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **86**, 33–55.
- Prakash, L. & Prakash, S. (1979)** Three additional genes involved in pyrimidine dimer removal in *Saccharomyces cerevisiae*: *RAD7*, *RAD14* and *MMS19*. *Mol. Gen. Genet.* **176**, 351–359.
- Prindle, M.J. & Loeb, L.A. (2012)** DNA polymerase delta in DNA replication and genome maintenance. *Environ. Mol. Mutagen.* **53**, 666–682.
- Prodromou, C., Artymiuk, P.J. & Guest, J.R. (1992)** The aconitase of *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the aconitase gene and amino acid sequence similarity with mitochondrial aconitases, the iron-responsive-element-binding protein and isopropylmalate isomerases. *Eur. J. Biochem.* **204**, 599–609.
- Prohl, C., Kispal, G. & Lill, R. (2000)** Branched-chain-amino-acid transaminases of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **324**, 365–375.
- Punta, M., et al. (2012)** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **40**, D290–D301.

- Purdue, P.E. & Lazarow, P.B. (1996)** Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence. *J. Cell. Biol.* **134**, 849–862.
- Qoronfleh, M.W., Ren, L., Emery, D., Perr, M. & Kaboord, B. (2003)** Use of immunomatrix methods to improve protein-protein interaction detection. *J Biomed. Biotechnol.* **2003**, 291–298.
- Queimado, L., et al. (2001)** Cloning the human and mouse *MMS19* genes and functional complementation of a yeast *mms19* deletion mutant. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1884–1891.
- Raghava, G. (2000)** Protein secondary structure prediction using nearest neighbor and neural network approach. *CASP 4*, 75–76.
- Rees, D.C. & Howard, J.B. (2003)** The interface between the biological and inorganic worlds: iron-sulfur metalloclusters. *Science* **300**, 929–931.
- Reiter, V., et al. (2012)** The CDK5 repressor CDK5RAP1 is a methylthiotransferase acting on nuclear and mitochondrial RNA. *Nucleic Acids Res.* **40**, 6235–6240.
- Reumann, S., et al. (2007)** Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *Plant Cell* **19**, 3170–3193.
- Robbins, A.H. & Stout, C.D. (1989a)** Structure of activated aconitase: formation of the [4Fe-4S] cluster in the crystal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 3639–3643.
- Robbins, A.H. & Stout, C.D. (1989b)** The structure of aconitase. *Proteins* **5**, 289–312.
- Robinson, K.M. & Lemire, B.D. (1995)** Flavinylation of succinate: ubiquinone oxidoreductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **260**, 34–51.
- Roche, B., et al. (2013)** Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 455–469.
- Rolland, T., et al. (2014)** A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell* **159**, 1212–1226.
- Rose, I.A. & O'Connell, E.L. (1967)** Mechanism of aconitase action. I. The hydrogen transfer reaction. *J. Biol. Chem.* **242**, 1870–1879.
- Rouault, T.A. (2006)** The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 406–414.
- Rouault, T.A. (2012)** Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Dis. Model. Mech.* **5**, 155–164.
- Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M. & Burke, B. (2012)** A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* **196**, 801–810.

- Roy, A., Solodovnikova, N., Nicholson, T., Antholine, W. & Walden, W.E. (2003)** A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. *EMBO J.* **22**, 4826–4835.
- Rual, J.-F., et al. (2005)** Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* **437**, 1173–1178.
- 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. *Mol. Cell* **23**, 801–808.
- Russell, R.B., et al. (2004)** A structural perspective on protein-protein interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 313–324.
- Rutherford, J.C., et al. (2005)** Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 10135–10140.
- Ryan, E.D., Tracy, J.W. & Kohlhaw, G.B. (1973)** Subcellular localization of the leucine biosynthetic enzymes in yeast. *J. Bacteriol.* **116**, 222–225.
- Saiki, R.K., et al. (1985)** Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350–1354.
- Sallese, M., Giannotta, M. & Luini, A. (2009)** Coordination of the secretory compartments via inter-organelle signalling. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 801–809.
- Salusjärvi, L., et al. (2017)** Production of ethylene glycol or glycolic acid from D-xylose in *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 8151–8163.
- Samaniego, F., Chin, J., Iwai, K., Rouault, T.A. & Klausner, R.D. (1994)** Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein, iron regulatory protein 2. Structure, function, and post-translational regulation. *J. Biol. Chem.* **269**, 30904–30910.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463–5467.
- Satyanarayana, T., Umbarger, H.E. & Lindgren, G. (1968)** Biosynthesis of branched-chain amino acids in yeast: regulation of leucine biosynthesis in prototrophic and leucine auxotrophic strains. *J. Bacteriol.* **96**, 2018–2024.
- Schalm, S.S. & Blenis, J. (2002)** Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr. Biol.* **12**, 632–639.
- Scharf, S.J., Horn, G.T. & Erlich, H.A. (1986)** Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* **233**, 1076–1078.
- Scheufler, C., et al. (2000)** Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**, 199–210.

- Schnackerz, K.D., Dobritzsch, D., Lindqvist, Y. & Cook, P.F. (2004)** Dihydropyrimidine dehydrogenase: a flavoprotein with four iron-sulfur clusters. *Biochim. Biophys. Acta* **1701**, 61–74.
- Schneider, T.D. & Stephens, R.M. (1990)** Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6097–6100.
- Seki, M., Takeda, Y., Iwai, K. & Tanaka, K. (2013)** IOP1 protein is an external component of the human cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA) machinery and functions in the MMS19 protein-dependent CIA pathway. *J. Biol. Chem.* **288**, 16680–16689.
- Senger, M., Stripp, S.T. & Soboh, B. (2017)** Proteolytic cleavage orchestrates cofactor insertion and protein assembly in [NiFe]-hydrogenase biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **292**, 11670–11681.
- Seo, J.-Y., Yaneva, R. & Cresswell, P. (2011)** Viperin: a multifunctional, interferon-inducible protein that regulates virus replication. *Cell Host Microbe* **10**, 534–539.
- Seroz, T., et al. (2000)** Cloning of a human homolog of the yeast nucleotide excision repair gene *MMS19* and interaction with transcription repair factor TFIIH via the XPB and XPD helicases. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4506–4513.
- Sharma, A.K., Pallesen, L.J., Spang, R.J. & Walden, W.E. (2010)** Cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA) system: factors, mechanism, and relevance to cellular iron regulation. *J. Biol. Chem.* **285**, 26745–26751.
- Shaveta, G., Shi, J., Chow, V.T.K. & Song, J. (2010)** Structural characterization reveals that viperin is a radical *S*-adenosyl-*L*-methionine (SAM) enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1390–1395.
- Sheftel, A., Stehling, O. & Lill, R. (2010)** Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 302–314.
- Sherman, F. (1991)** Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **194**, 3–21.
- Shi, Y., Ghosh, M.C., Tong, W.-H. & Rouault, T.A. (2009)** Human ISD11 is essential for both iron-sulfur cluster assembly and maintenance of normal cellular iron homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 3014–3025.
- Shiber, A., et al. (2018)** Cotranslational assembly of protein complexes in eukaryotes revealed by ribosome profiling. *Nature* **561**, 268–272.
- Shieh, Y.-W., et al. (2015)** Operon structure and cotranslational subunit association direct protein assembly in bacteria. *Science* **350**, 678–680.
- Shimberg, G.D., et al. (2016)** Cleavage and polyadenylation specificity factor 30: An RNA-binding zinc-finger protein with an unexpected [2Fe-2S] cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 4700–4705.

- Sievers, F., et al. (2011)** Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539.
- Singh, A., et al. (2014)** Trypanosome MKT1 and the RNA-binding protein ZC3H11: interactions and potential roles in post-transcriptional regulatory networks. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4652–4668.
- Sinz, A., Arlt, C., Chorev, D. & Sharon, M. (2015)** Chemical cross-linking and native mass spectrometry: A fruitful combination for structural biology. *Protein Sci.* **24**, 1193–1209.
- Skala, J., Capieaux, E., Balzi, E., Chen, W.N. & Goffeau, A. (1991)** Complete sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* *LEU1* gene encoding isopropylmalate isomerase. *Yeast* **7**, 281–285.
- Smith, J.L., et al. (1994)** Structure of the allosteric regulatory enzyme of purine biosynthesis. *Science* **264**, 1427–1433.
- Smith, J.L. (1998)** Glutamine PRPP amidotransferase: snapshots of an enzyme in action. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 686–694.
- Smolinski, N. & Valerius, O. (2016)** Nachbarschaftsstudien am Ribosom. *Proximity dependent biotin identification. BIOSpektrum* **22**, 134–136.
- Snider, J., et al. (2015)** Fundamentals of protein interaction network mapping. *Mol. Syst. Biol.* **11**, 848.
- Sofia, H.J., Chen, G., Hetzler, B.G., Reyes-Spindola, J.F. & Miller, N.E. (2001)** Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1097–1106.
- Somers, J.M., Amzallag, A. & Middleton, R.B. (1973)** Genetic fine structure of the leucine operon of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **113**, 1268–1272.
- Sommer, F., Mühlhaus, T., Hemme, D., Veyel, D. & Schroda, M. (2014)** Identification and validation of protein-protein interactions by combining co-immunoprecipitation, antigen competition, and stable isotope labeling. *Methods Mol. Biol.* **1188**, 245–261.
- Song, D. & Lee, F.S. (2008)** A role for IOP1 in mammalian cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* **283**, 9231–9238.
- Soundararajan, M., Bailey, C.P. & Markwell, J. (2008)** Use of a laboratory exercise on molar absorptivity to help students understand the authority of the primary literature. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **36**, 61–64.
- Souza-Fagundes, E.M., et al. (2012)** A high-throughput fluorescence polarization anisotropy assay for the 70N domain of replication protein A. *Anal. Biochem.* **421**, 742–749.

Sparks, J.L., et al. (2012) Human exonuclease 5 is a novel sliding exonuclease required for genome stability. *J. Biol. Chem.* **287**, 42773–42783.

Srinivasan, V., et al. (2007) Structure of the yeast WD40 domain protein Cia1, a component acting late in iron-sulfur protein biogenesis. *Structure* **15**, 1246–1257.

Stark, C., et al. (2006) BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res.* **34**, D535–D539.

Stegmaier, K. (2017) *Spektroskopische und elektrochemische Studien der neuartigen Clusterkoordination in Proteinen mit C-terminaler Thioredoxin-Ferredoxin-Domäne*. Dissertation. Fachbereich Chemie, TU Kaiserslautern.

Stehling, O., et al. (2012) MMS19 assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity. *Science* **337**, 195–199.

Stehling, O., et al. (2013) Human CIA2A-FAM96A and CIA2B-FAM96B integrate iron homeostasis and maturation of different subsets of cytosolic-nuclear iron-sulfur proteins. *Cell Metab.* **18**, 187–198.

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

Stehling, O., et al. (2018) Function and crystal structure of the dimeric P-loop ATPase CFD1 coordinating an exposed [4Fe-4S] cluster for transfer to apoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

Stejskal, F., Slapeta, J., Ctrnáctá, V. & Keithly, J.S. (2003) A *Narf*-like gene from *Cryptosporidium parvum* resembles homologues observed in aerobic protists and higher eukaryotes. *FEMS Microbiol. Lett.* **229**, 91–96.

Stirnemann, C.U., Petsalaki, E., Russell, R.B. & Müller, C.W. (2010) WD40 proteins propel cellular networks. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 565–574.

Strassman, M., Locke, L.A., Thomas, A.J. & Weinhouse, S. (1956) A study of leucine biosynthesis in *Torulopsis utilis*. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1599–1602.

Stricker, N.L., et al. (1997) PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences. *Nat. Biotechnol.* **15**, 336–342.

Swamy, U., et al. (2005) Structure of spinach nitrite reductase: implications for multi-electron reactions by the iron-sulfur:siroheme cofactor. *Biochemistry* **44**, 16054–16063.

Tafelmeyer, P., Johnsson, N. & Johnsson, K. (2004) Transforming a (β/α)₈-barrel enzyme into a split-protein sensor through directed evolution. *Chem. Biol.* **11**, 681–689.

Talapatra, S.K., Harker, B. & Welburn, J.P.I. (2015) The C-terminal region of the motor protein MCAK controls its structure and activity through a conformational switch. *eLife* **4**, e06421.

- Tamakoshi, M., Yamagishi, A. & Oshima, T. (1998)** The organization of the *leuC*, *leuD* and *leuB* genes of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Gene* **222**, 125–132.
- Tang, H.-M.V., et al. (2015)** Loss of *APD1* in yeast confers hydroxyurea sensitivity suppressed by Yap1p transcription factor. *Sci. Rep.* **5**, 7897.
- Tarassov, K., et al. (2008)** An *in vivo* map of the yeast protein interactome. *Science* **320**, 1465–1470.
- Tashiro, Y., Rodriguez, G.M. & Atsumi, S. (2015)** 2-Keto acids based biosynthesis pathways for renewable fuels and chemicals. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 361–373.
- Teasdale, R.D. & Jackson, M.R. (1996)** Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 27–54.
- Tettelin, H., et al. (1997)** The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VII. *Nature* **387**, 81–84.
- Thermo Scientific**, Crosslinking-reagents-handbook.
- Thomas, B.J. & Rothstein, R. (1989)** Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**, 619–630.
- Thomas, C., Muhr, E. & Sawers, R.G. (2015)** Coordination of synthesis and assembly of a modular membrane-associated [NiFe]-hydrogenase is determined by cleavage of the C-terminal peptide. *J. Bacteriol.* **197**, 2989–2998.
- Thomas, J.G. & Baneyx, F. (1997)** Divergent effects of chaperone overexpression and ethanol supplementation on inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **11**, 289–296.
- Tikkanen, R., et al. (2000)** The dileucine motif within the tail of MPR46 is required for sorting of the receptor in endosomes. *Traffic* **1**, 631–640.
- Timkovich, R. (1977)** Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins. *Anal. Biochem.* **79**, 135–143.
- Tirode, F., et al. (1997)** A conditionally expressed third partner stabilizes or prevents the formation of a transcriptional activator in a three-hybrid system. *J. Biol. Chem.* **272**, 22995–22999.
- Tompa, P., Davey, N.E., Gibson, T.J. & Babu, M.M. (2014)** A million peptide motifs for the molecular biologist. *Mol. Cell* **55**, 161–169.
- Tong, W.H. & Rouault, T.A. (2007)** Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: role of iron-sulfur cluster biogenesis. *Biometals* **20**, 549–564.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350–4354.

Tron, C.M., et al. (2009) Structural and functional studies of the biotin protein ligase from *Aquifex aeolicus* reveal a critical role for a conserved residue in target specificity. *J. Mol. Biol.* **387**, 129–146.

Tsaousis, A.D., Gentekaki, E., Eme, L., Gaston, D. & Roger, A.J. (2014) Evolution of the cytosolic iron-sulfur cluster assembly machinery in *Blastocystis* species and other microbial eukaryotes. *Eukaryot. Cell* **13**, 143–153.

Turnbull, W.B. & Daranas, A.H. (2003) On the value of *c*: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14859–14866.

Uetz, P., et al. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623–627.

Uljon, S., et al. (2016) Structural basis for substrate selectivity of the E3 ligase COP1. *Structure* **24**, 687–696.

UniProt, UniProtKB/Swiss-Prot release 2018_02 statistics.

UniProt Consortium, T. (2017) UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **45**, D158-D169.

Upadhyay, A.S., et al. (2014) Viperin is an iron-sulfur protein that inhibits genome synthesis of tick-borne encephalitis virus via radical SAM domain activity. *Cell. Microbiol.* **16**, 834–848.

Upadhyay, A.S., et al. (2017) Cellular requirements for iron-sulfur cluster insertion into the antiviral radical SAM protein viperin. *J. Biol. Chem.* **292**, 13879–13889.

Urzica, E. (2007) *Biochemical analysis of essential components involved in mitochondrial and cytosolic iron-sulfur protein biogenesis in Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.

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.

van der Vaart, B., et al. (2011) SLAIN2 links microtubule plus end-tracking proteins and controls microtubule growth in interphase. *J. Cell. Biol.* **193**, 1083–1099.

van Roey, K., et al. (2014) Short linear motifs: ubiquitous and functionally diverse protein interaction modules directing cell regulation. *Chem. Rev.* **114**, 6733–6778.

van Rosmalen, M., Krom, M. & Merckx, M. (2017) Tuning the flexibility of glycine-serine linkers to allow rational design of multidomain proteins. *Biochemistry* **56**, 6565–6574.

van Wietmarschen, N., Moradian, A., Morin, G.B., Lansdorp, P.M. & Uringa, E.-J. (2012) The mammalian proteins MMS19, MIP18, and ANT2 are involved in cytoplasmic iron-sulfur cluster protein assembly. *J. Biol. Chem.* **287**, 43351–43358.

Vashisht, A.A., Yu, C.C., Sharma, T., Ro, K. & Wohlschlegel, J.A. (2015) The association of the Xeroderma Pigmentosum Group D DNA helicase (XPD) with transcription factor IIH is regulated by the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway. *J. Biol. Chem.* **290**, 14218–14225.

Vaynberg, J. & Qin, J. (2006) Weak protein-protein interactions as probed by NMR spectroscopy. *Trends Biotechnol.* **24**, 22–27.

Vo, A.T., et al. (2017) Defining the domains of Cia2 required for its essential function *in vivo* and *in vitro*. *Metallomics* **9**, 1645–1654.

Vo, A.T., et al. (2018) Identifying the protein interactions of the cytosolic iron-sulfur cluster targeting complex essential for its assembly and recognition of apo-targets. *Biochemistry* **57**, 2349–2358.

Vodermaier, H.C., Gieffers, C., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, F. & Peters, J.-M. (2003) TPR subunits of the anaphase-promoting complex mediate binding to the activator protein CDH1. *Curr. Biol.* **13**, 1459–1468.

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

Volkmer, R. (2009) Synthesis and application of peptide arrays: quo vadis SPOT technology. *Chembiochem* **10**, 1431–1442.

Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. & Philippsen, P. (1997) Heterologous *HIS3* marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1065–1075.

Wächtershauser, G. (2007) On the chemistry and evolution of the pioneer organism. *Chem. Biodivers.* **4**, 584–602.

Wallander, M.L., Leibold, E.A. & Eisenstein, R.S. (2006) Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 668–689.

Wang, M. & Casey, P.J. (2016) Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 110–122.

Wang, S., Raab, R.W., Schatz, P.J., Guggino, W.B. & Li, M. (1998) Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett.* **427**, 103–108.

Wass, M.N., David, A. & Sternberg, M.J.E. (2011) Challenges for the prediction of macromolecular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 382–390.

- Wasserstrom, L., et al. (2018)** Exploring *D*-xylose oxidation in *Saccharomyces cerevisiae* through the Weimberg pathway. *AMB Expr.* **8**, 33.
- Webert, H. (2011)** *Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Komponenten der eukaryotischen Eisen-Schwefel-Cluster-Biogenese-Maschinerie*. Dissertation. Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg.
- Weerapana, E., et al. (2010)** Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* **468**, 790–795.
- Weisbrich, A., et al. (2007)** Structure-function relationship of CAP-Gly domains. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 959–967.
- Weon, J.L., Yang, S.W. & Potts, P.R. (2018)** Cytosolic iron-sulfur assembly is evolutionarily tuned by a cancer-amplified ubiquitin ligase. *Molecular cell* **69**, 113–125.
- White, M.F. & Dillingham, M.S. (2012)** Iron-sulphur clusters in nucleic acid processing enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 94–100.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F. & Lin, L.N. (1989)** Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131–137.
- Wittmaack, N. (2018)** *Spektroskopische Charakterisierung der Homo sapiens Mak16 und Mak16-like Proteine von Loki- und Heimdallarchaen*. Masterarbeit. Fachbereich Chemie, TU Kaiserslautern.
- Wontner, M. & Jaehning, J.A. (1990)** Accurate initiation by RNA polymerase II in a whole cell extract from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**, 8979–8982.
- Wu, X.-H., Wang, Y., Zhuo, Z., Jiang, F. & Wu, Y.-D. (2012)** Identifying the hotspots on the top faces of WD40-repeat proteins from their primary sequences by β -bulges and DHSW tetrads. *PLoS ONE* **7**, e43005.
- Wu, Y., et al. (2010)** Fanconi anemia group J mutation abolishes its DNA repair function by uncoupling DNA translocation from helicase activity or disruption of protein-DNA complexes. *Blood* **116**, 3780–3791.
- Xu, C. & Min, J. (2011)** Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell* **2**, 202–214.
- Xu, H., Andi, B., Qian, J., West, A.H. & Cook, P.F. (2006)** The α -amino adipate pathway for lysine biosynthesis in fungi. *Cell Biochem. Biophys.* **46**, 43–64.
- Yamaguchi, Y., Matsumura, T., Ichida, K., Okamoto, K. & Nishino, T. (2007)** Human xanthine oxidase changes its substrate specificity to aldehyde oxidase type upon mutation of amino acid residues in the active site: roles of active site residues in binding and activation of purine substrate. *J. Biochem.* **141**, 513–524.

- Yang, H.L. & Kessler, D.P. (1974)** Genetic analysis of the leucine region in *Escherichia coli* B/r: gene-enzyme assignments. *J. Bacteriol.* **117**, 63–72.
- Yasutake, Y., Yao, M., Sakai, N., Kirita, T. & Tanaka, I. (2004)** Crystal structure of the *Pyrococcus horikoshii* isopropylmalate isomerase small subunit provides insight into the dual substrate specificity of the enzyme. *J. Mol. Biol.* **344**, 325–333.
- Ye, F. & Zhang, M. (2013)** Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. *Biochem. J.* **455**, 1–14.
- Yim, E., O'Connell, K.E., St Charles, J. & Petes, T.D. (2014)** High-resolution mapping of two types of spontaneous mitotic gene conversion events in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **198**, 181–192.
- Yocum, R.R., Hanley, S., West, R., JR & Ptashne, M. (1984)** Use of *lacZ* fusions to delimit regulatory elements of the inducible divergent *GAL1-GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1985–1998.
- Yoshimura, S.H. & Hirano, T. (2016)** HEAT repeats - versatile arrays of amphiphilic helices working in crowded environments? *J. Cell Sci.* **129**, 3963–3970.
- Yoshiyama-Yanagawa, T., et al. (2011)** The conserved Rieske oxygenase DAF-36/Neverland is a novel cholesterol-metabolizing enzyme. *J. Biol. Chem.* **286**, 25756–25762.
- You, H.J., Swanson, R.L. & Doetsch, P.W. (1998)** *Saccharomyces cerevisiae* possesses two functional homologues of *Escherichia coli* endonuclease III. *Biochemistry* **37**, 6033–6040.
- Yu, H., et al. (2008)** High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science* **322**, 104–110.
- Yu, H., et al. (2011)** Next-generation sequencing to generate interactome datasets. *Nat. Methods* **8**, 478–480.
- Yu, J., et al. (2018)** Ycf48 involved in the biogenesis of the oxygen-evolving photosystem II complex is a seven-bladed beta-propeller protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- Yuan, J., Mishra, P. & Ching, C.B. (2017)** Engineering the leucine biosynthetic pathway for isoamyl alcohol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 107–117.
- Zeytuni, N. & Zarivach, R. (2012)** Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module. *Structure* **20**, 397–405.
- Zhang, F.L. & Casey, P.J. (1996)** Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 241–269.
- Zhang, Y., et al. (2008)** Dre2, a conserved eukaryotic Fe/S cluster protein, functions in cytosolic Fe/S protein biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 5569–5582.

Zheng, L., Andrews, P.C., Hermodson, M.A., Dixon, J.E. & Zalkin, H. (1990) Cloning and structural characterization of porcine heart aconitase. *J. Biol. Chem.* **265**, 2814–2821.

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

Zheng, L., 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., Baumann, U. & Reymond, J.-L. (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* **32**, e115.

Zhu, H., Cong, J.P. & Shenk, T. (1997) Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 13985–13990.

Zuiderweg, E.R.P. (2002) Mapping protein–protein interactions in solution by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **41**, 1–7.

7. Anhang

7.1 Sequenzvergleich

Der folgende Sequenzvergleich, durchgeführt mit Clustal Ω , verdeutlicht die Homologie zwischen der IPMI und der Aconitase (Sievers *et al.*, 2011). S.c = *S. cerevisiae*, E.c = *E. coli*, B.t = *Bos taurus*. Die drei Fe/S-Cluster-tragenden, konservierten Cysteine sind gelb markiert.

S.c_Leu1	-----	0
E.c_LeuCD	-----	0
E.c._AcnA	-----MSSTLREASKDTLQAKDKTYHYYSPLAAKSLGDIT--RLPKS	41
B.t_mAC	-----RAKVAMSHFEPHEYIRYDLLE--KNIDIVRKRLNRP	34
S.c_Aco1	MLSARSAIKRPPIVRLATVSNLTRDSKVNQNLLLEDHSFINYKQNV--ETLDIRKRLNRP	58
S.c_Leu1	-----MVY-----TPSKGPRTLYDKVFDHAVVHQDENGSTFL-LYIDRHLVHEVTSPQ	46
E.c_LeuCD	-----MAKTLYEKLFDAHVVEAENETPL-LYIDRHLVHEVTSPQ	39
E.c._AcnA	LKVLLENLLRWQDGNVTEEDIHALAGWLKNAH-----ADREIAYRPARVLMQDFTGVP	95
B.t_mAC	LT--LSE-----KIVYGHLDDEPANQEIERGKTYLRLRPDRVAMQDATAQM	77
S.c_Aco1	FT--YAE-----KILYGHLDDEPHGQDIQRGVSYLKLRLPDRVACQDATAQM	101
	: : : : : * : : *	
S.c_Leu1	AFEGLNAGRKVRVDCTLATV-----DHNIPTESRKNFKSLDTFIKQTD SRLQV	96
E.c_LeuCD	AFDGLRAHGRPVRQPGKTFATM-----DHNVSTQTKDIN-----ACGEMARIQM	83
E.c._AcnA	AVVDLAAMREAVKRLGGDTAKVNPLSPVDLVIDHSVTVDVRFGDDEAFEENVRLEMERNHE	155
B.t_mAC	AMLQFISSG-----LPK--VAVPSTIHCDHLEAQ-LGG----EKDLRRAKDINQE	121
S.c_Aco1	AILQFMSAG-----LPQ--VAKPVTVHCDHLIQAQ-VGG----EKDLKRAIDLNKE	145
	*. : ** : .:	
S.c_Leu1	KTLENNVKQFGVPYFGMSDARQGIVHTIGPEE-----GFTLPGTTVVCGDSH	143
E.c_LeuCD	QELIKNCKEFGVELYDLNHPYQGIVHVMGPEQ-----GVTLPGMTIVCGDSH	130
E.c._AcnA	RYVFLKWKQAFSRFSVVPVPGTGIHQVNLLEYLGKAVWSELQDGEWIAYP-DTLVGTDSH	214
B.t_mAC	VYNFLATAGAKY-GVGFWRPGSGI IHQII LENY-----AYPGVLLIGTDSH	166
S.c_Aco1	VYDFLASATAKY-NMGFWKPGSGI IHQIVLENY-----AFP GALLIGTDSH	190
	.. ** * : * : * : : **	
S.c_Leu1	TSTHGAFGSLAFGIGTSEVEHVLATQTIIQAKSKNMRITVNGKLSPGITSKDLILYIIGL	203
E.c_LeuCD	TATHGAFGALAFGIGTSEVEHVLATQTLKQGRAKTMKIEVQGKAAPGITAKDIVLAIIGK	190
E.c._AcnA	TTMINGLVGLGWVGGIEAEAAMLGQPVSMLIPDVVGFKLTGKLRREGITATDLVLTVTQM	274
B.t_mAC	TPNGGGLGGICIGVGGADAVDVMAGIPWELKCPKVIGVKTGSLSGWTS PKDVI LKVAGI	226
S.c_Aco1	TPNAGGLQQLAIGVGGADAVDVMAGRPWELKAPKILGVKLTGKMNWTS PKDII LKLAGI	250
	* ..* : *:* .. : : . : : * . : .*: * :	
S.c_Leu1	IGTAGGTGCVIEFAGEAIEALSMEARMSMCNMAIEAGARAGMIKPEDETTFQYTKGRPLAP	263
E.c_LeuCD	TGSAGGTGHVVEFCGEAIRDLMEGRMTLCNMAIEMGAKAGLVAPDETTFNYVKGRLHAP	250
E.c._AcnA	LRKHGVVGGKVFVEFYGDGLDSLPLADRATIANMSPEYGATCGFFPIDAVTLDMRLSGRSE	334
B.t_mAC	LTVKGGTGAIVEYHGPVDSISCTGMATICMGAIEGATTSVFPYNHRMKKYL SKTGRAD	286
S.c_Aco1	TTVKGGTGKIVEYFGDGVDTFSATGMGTICMGAIEGATTSVFPFNKSMIEYLEATGRGK	310
	* .* .*: * .. : : : :*. * ** ... : .*	

Anhang

S.c_Leu1	KG----AEWEKAVAYWKTTLKTDEGAKFDHEINIEAVDVIPTITWGTSPQDALPITGSVPD	319
E.c_LeuCD	KG----KDFDDAVAYWKTTLQTDGATFDTVVTLQAEEIISPQVWGTNPGQVIVSNDNIPD	306
E.c._AcnA	DQVELVEKYAKAQGMW--RNPGEPIFTSTLELDMNDVEASLAGPKRPQDRVALPDVP-K	391
B.t_mAC	IA-NLADEFKD---H---LVPDPGCHYDQVIEINLSELKPHINGPFTPDLAHPVAEVG-S	338
S.c_Aco1	IA-DFAKLYHK---DL--LSADKDAEYDEVEIDLNTLEPYINGPFTPDLATPVSKMK-E	363
	: . . : : : : : * : .	
S.c_Leu1	PKNVTDPIKKS---GMERALAYMGLPNTPLKSIKVDKVFISCTNNGRIEDLRSAAAVVR	376
E.c_LeuCD	PASFADPVERA---SAEKALAYMGLKPGIPLTEVAIDKVFIGSCTNSRIEDLRAAEIAK	363
E.c._AcnA	AFAASNELEVNATHKDRQPVYVMNGHQYQLPDGAVVIAAITSCTNTSNPSVLMAAGLLA	451
B.t_mAC	VA-----EKEGWPL-----DIRVGLIGSCTNSSYEDMGRSA-AVA	372
S.c_Aco1	VA-----VANNWPL-----DVRVGLIGSCTNSSYEDMSRSA-SIV	397
	: : * **** .: :*	
S.c_Leu1	GQKLASNIA----LAMVVPGSGLVKQAEAEGLDKIFQEAGFEWREAGCSICLGMPDI	431
E.c_LeuCD	GRKVAPGVQ-----ALVVPGSGPVKAQAEAEGLDKIFIEAGFEWRLPGCSMCLAMNDR	417
E.c._AcnA	KKAVTLGLKRQPVWKASLAPGSKVSDYLAKAKLTPYLDELGFNLVGYGCTTCIGNSGPL	511
B.t_mAC	KQALAHGLKCKS--QFTITPGSEQIRATIERDGYAQLRVDVGGIVLANACGPGIGQWDRK	430
S.c_Aco1	KDAAAHGLKSKT--IFTVTPGSEQIRATIERDQGLETFKEFGGIVLANACGPGIGQWDRR	455
	: .:: :.*** : : : * .* **:.	
S.c_Leu1	LDAYE-----RCASTSNRNFEGRQGALSRTTH--LMSPAMAAAAGIAGHFVDIREF	479
E.c_LeuCD	LNPGE-----RCASTSNRNFEGRQGRGRTTH--LVSPAMAAAAVTGHFADIRNI	465
E.c._AcnA	PDPIETAIKKSDLTVGAVLSGNRNFEGRIHPLVK--TNWLASPLLVAYALAGNMNINLAS	570
B.t_mAC	-----DIKKGK--KNTIVTSYRNFTGRNDANPETHAFVTSPEIVTALAIAAGTLKFPET	483
S.c_Aco1	-----DIKKGK--KNTIVTSYRNFTSRNDGNPQTHAFVASPELVTAFAIAGDLRFNPLT	508
	. : **** .* . : ** :..* .:.* :	
S.c_Leu1	EYKDQDQSSPKV--EVTSEDEKELESAAAYDHAEVPQPEDAPQ--DIANDELKDI PVKSDDT	536
E.c_LeuCD	KMA-----	468
E.c._AcnA	EPIGHRKGDVPVYLKDIWPSAQEIIARAVEQVSTEMFRKEYAEVFEGTAEWKGINVTRSDT	630
B.t_mAC	DFLTG-KDGKKFKLE--APDADELPRAEFDPGQDTYQHP-----PKDSSGQ-----	526
S.c_Aco1	DKLLK-KDGNEFMLK--PPHGDLPLQRGYDAGENTYQAP-----PADRSTV-----	551
	.	
S.c_Leu1	PA---KPSSSGMKPFLTLEGISAPLD-----KANVDTDAIIPKQFLKT-	576
E.c_LeuCD	-----EKFIKHTGLVPLD-----AANVDTDAIIPKQFLQK-	499
E.c._AcnA	YGWQEDSTYIRLSPPFDEMQA----TPAPVEDIHGARILAMLGDSVTTDHI SPAGSIKPD	686
B.t_mAC	-----RVAVSPTSQRLQLLEPFDKWDGKLEDLQILIKVKGKCTTDHISAAGP----	574
S.c_Aco1	-----EVKVSPTSQRLQLLEPFDKWDGKDAKMPILIKAVGKT'TTDHISMAGP----	599
	. ** *	
S.c_Leu1	-----IKRTGLKKGLFYEW-----RFRKDDQG-----KDQETD	604
E.c_LeuCD	-----VTRTGFGAHLFNDW-----RFLD-EKG-----QQPNPD	526
E.c._AcnA	SPAGRYLQGRGVERKDFNSYGSRRGNHEVMMRGTGANIRIRNEMVPGVEGGMTRHLPDSD	746
B.t_mAC	-----WLKFRGHLDNISNNL-----LIGA---INIENRKAN-----SVRNAVTQE	611
S.c_Aco1	-----WLKYRGHLENISNNY-----MIGA---INAENKKAN-----CVKNVYTGE	636
	: * . . . : :	

S.c_Leu1	F-----VLNVEPWREAEILVVTGDNFGCGSSREHAPWALKDFGIKSIIAPSYGDIFYNN	658
E.c_LeuCD	F-----VLNFPQYQGASILLAR-ENFGCGSSREHAPWALTDYGFVKVVIAPSFADIFYGN	579
E.c._AcnA	VVSIYDAAMRY-KQEQTPLAVIAGKEYGSGSSRDWAAKGRLLGIRVVI AESFERIHRSN	805
B.t_mAC	FGPVPDTARYY-KQHGIRWVVGIDENYEGASREHSALEPRHLGGRAIITKSFARIHETN	670
S.c_Aco1	YKGVDPDTARDY-RDQGIKWVVGIDENFGEGSSREHAALPRFLGGFAIITKSFARIHETN	695
	. . : .:* **:* : * :*: *: *. *	
S.c_Leu1	SFKNGLLPIRLDQQIIIDKLIP-I-----ANKGGKLCVDLPNQKILSDGNVL-	705
E.c_LeuCD	SFNQQLLPVKLSDAEVDLDELFAVK-----ANPGIHFVDVLEAQEVKA---GEK-	624
E.c._AcnA	LIGMGILPLEFPQGVTRKTLGLTGEEKIDIGDLQNLQPGATVPVTLTR-----ADGSQEV	860
B.t_mAC	LKKQGLLPLTFADPADYNK--IHPVDKLTIQGLKDFAPGKPLKCIKH-----PNGTQET	723
S.c_Aco1	LKKQGLLPLNFKNPADYDK--INPDDRIDLGLAELAPGKPVMTMRVHP-----KNGKPWD	748
	:**: : : . * . :	
S.c_Leu1	-V--D----HFEIEPFRKHCLVNLGLDDIGITLQKEEYISRYEALRREKYSFLEGGSKLLK	758
E.c_LeuCD	-T--Y----RFTIDAFRRHCMMNGLDSIGLTLQHDDAIAAYEAKQPAFMN-----	667
E.c._AcnA	VPCRCRIDTATELTYQNDGILHYVIRN-----MLK-----	891
B.t_mAC	ILLNHTFN-ETQIEWFRAGSALNRMKEL-----QOK-----	753
S.c_Aco1	AVLTHTFN-DEQIEWFKYGSALNKIKAD-----EKK-----	778
	: : : : :	
S.c_Leu1	FDNVPKRKAVTTTFDKVHQDW	779
E.c_LeuCD	-----	667
E.c._AcnA	-----	891
B.t_mAC	-----	753
S.c_Aco1	-----	778

7.2 Sekundärstrukturvorhersage des Leu1-C-Terminus

Vorhersage mittels SPIDER² (Heffernan *et al.*, 2016):

```
SEQ : 701 DGNVLVDHFEIEPFRKHCLVNLGLDDIGITLQKEEYISRYEALRREKYSFL 750
SS : 701 ---EEE-----HHHHHHHH-----HHHHH--HHHHHHHHHHHHHH----- 750
rASA: 701 74542254061441242012321331221244463146124325752322 750
```

```
SEQ : 751 EGGSKLLKFDNVPKRKAVTTTFDKVHQDW 779
SS : 751 ----- 779
rASA: 751 44343335366345665554646645342 779
```

Vorhersage mittels DisEMBL (Linding *et al.*, 2003):

```
MVYTPSKGPR TLYdkvfdah vvhqdengsf llyidrhlvh evtsPQAFEG LENAGRKVRr vdctLATVDH NIPTESRKNF
KSltdfikqt dsrlqvktle nnvkqfgvpy fgmsdarqgi vhtigpeegf tlpgttvvcg dshtsthgaf gslafgigts
evhvlatqt iiQAKSKNMR ITVNGKLSPG ITskdlilyi igligtaggt gcviefagea iealsmearm smcnmaieag
aragmikpde ttfqyTKGRP LAPKGAEWek avaywktlkt degakfdhei nieavdvipt itwgtspqda LPITGSVPDP
KNVTDPIkks gmeralaymg LEPNTPLKSI Kvdkvfigsc tngriedlrs aaavvrgqkl asniklamvv psgslvkkqa
eaegldkifq eagfewreag csiclgmnpd ildayercas tsnrnfegrq galsrthlms pamaaaagia ghfvdirefE
YKDQDQSSPK VEvtsedeke leSAAYDHAE PVQpedapqd iandelkdip vksddtpakp sssgmkpflt legisapldk
aNVDTDAIIP KQFLKTIKRT GLKKGLFYEW RFRKDDQGKD QETDfvlvne pwreaeilvv tgdnfgcgss rehapwalkd
fgiksiaps ygdifynnsf knglpirl d qqiidklip iankggklev dlpnqkilds dgnvlvdhfe iepfrkhclv
nglddigitl qkeeyisrye alrrekysfL EGGSKLLKFD NVPKRKAVTT TFDKVBHQDW
```

Vorhersage mittels APSSP

Vorhersage mittels SOPMA

(Raghava, 2000):

(Geourjon & Deléage, 1995):

L H 0.9	H 1303 1186 599 1057 L
E H 0.8	H 1237 937 953 1023 E
G C 0.5	T 1084 729 1358 1046 G
G C 0.7	T 1525 1000 1744 1734 G
S C 0.5	C 1570 1218 1283 1678 S
K H 0.5	H 2136 2014 1332 1939 K
L H 0.5	E 2066 2322 1397 1755 L
L H 0.5	E 1877 2247 1250 2004 L
K C 0.6	C 1957 2286 1612 2938 K
F C 0.6	C 1931 1912 2425 2871 F
D C 0.7	C 1884 1656 2870 2847 D
N C 0.6	C 1829 1541 2569 2933 N
V C 0.7	C 1707 1629 1875 3089 V
P C 0.6	C 1726 1729 1936 2677 P
K C 0.6	C 1683 1817 1996 2249 K
R C 0.8	C 1656 1917 1442 1990 R
K C 0.8	C 1542 1818 1256 1874 K
A C 0.8	E 1392 1683 1004 1674 A
V C 0.8	E 1253 1446 1148 1356 V
T C 0.9	C 1147 1108 1018 1231 T
T C 0.8	C 1248 1081 951 1411 T
T C 0.7	C 1028 892 891 1205 T
F C 0.6	C 879 739 671 956 F
D C 0.8	H 979 786 889 910 D
K C 0.8	H 775 630 690 642 K
V C 0.6	H 547 468 340 525 V
H C 0.8	H 493 398 320 508 H
Q C 0.8	H 572 356 515 544 Q
D C 0.9	C 321 188 354 358 D
W C 1.0	T 138 103 157 120 W

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich beim Anfertigen meiner Dissertation unterstützt und zu deren Erfolg beigetragen haben.

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Antonio J. Pierik Danke sagen, dass ich meine Dissertation über dieses spannende Thema verfassen konnte. Ich bedanke mich für die fortwährende Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen in meine Person und meine Arbeit. Für die Möglichkeiten, mir solch ein breites Methodenspektrum aneignen zu können, als auch nationale und internationale Konferenzen zu besuchen, bin ich sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. Johannes Herrmann danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens sowie die zur Verfügungstellung von Antikörperseren.

Für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Werner Thiel.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Roland Lill und seine Mitarbeiter für die freundliche Kooperation und die Möglichkeit, die Experimente des ^{55}Fe -Einbaus im Rahmen einer Laborrotation durchführen zu können. Insbesondere gilt mein Dank Martin Stümpfig, der diese Versuche mit mir gemeinsam durchführte. Des Weiteren bedanke ich mich für die Überlassung von Antikörpern, Plasmiden und Hefestämmen.

Herrn Prof. Dr. Sandro Keller spreche ich meinen Dank für die anregenden Diskussionen und die Unterstützung im Rahmen der Peptid-basierten *in vitro* Versuche sowie die Bereitstellung der benötigten Geräte aus. Für die freundliche Hilfe bei den Fluoreszenzanisotropie-Messungen danke ich Herrn Erik Frotscher und Herrn Florian Mahler für die Durchführung der ITC-Experimente.

Für die Anfertigung zahlreicher Western Blots und die Unterstützung bei mancher Klonierungsarbeit möchte ich unserer technischen Assistentin Frau Doreen Knochenhauer Danke sagen.

Bei meinen fleißigen Korrekturlesern bedanke ich mich sehr herzlich, allen voran Kathrin Stegmaier, meiner Schwester Julia und Rebecca.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Dominique Bechtel für die wunderbare Arbeitsatmosphäre in unserem roten Labor. Auch Catharina Blinn, Kathrin Stegmaier und Monika Schneider haben mir den Laboralltag sehr erleichtert. Ihr standet mir alle immer mit Ratschlägen und Tipps zur Seite. Aus der Diskussion freudiger und skurriler Ergebnisse sind viele Ideen entstanden, die mich immer wieder ein Stück weitergebracht haben. Ihr habt einen großen Anteil daran, dass ich Spaß an der Arbeit hatte und mich hier immer wohl

gefühlt habe. Ich danke euch für die lustige, kameradschaftliche Zeit. Ihr seid auch außerhalb des Labors zu Freunden geworden!

Frau PD Dr. Daili J. A. Netz danke ich für interessante Diskussionen rund um die CIA-Maschinerie und die Hilfsbereitschaft bei allerlei Fragen während der Etablierung neuer Methoden.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Praktikanten bzw. Bachelor-Studenten Florian Belitz, Jannik Zimmermann, Julian Oestreicher, Janina Laborenz, Tim Diederichs und Stephanie Dittrich-Motzki für die zielführende Unterstützung.

Des Weiteren danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Biochemie für die gute Zusammenarbeit. Allen voran Frau Carolin Fluck, Doreen Knochenhauer und Herrn Dr. Reinhard Philipp für jegliche Hilfe bei organisatorischen Aufgaben, Verwaltungsfragen und Bestellungen. Sie trugen stets zum guten Klima im Labor bei.

Für die Finanzierung des Projektes im Rahmen des Schwerpunktprogrammes 1927 „*Iron-sulfur for Life: Cooperative function of Iron-Sulfur Centes in Assembly, Biosynthesis, Catalysis and Disease*“ danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Insbesondere die Gewährung eines Reisestipendiums, um meine Forschungsergebnisse auf einem internationalen Kongress präsentieren zu können, ermöglichte mir eine sehr lehrreiche Erfahrung.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie und meinem Freund, die mich finanziell unterstützt hat, motivierend zur Seite standen und mir immer ein Zuhause bieten.

Danke!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Carina Greth

Akademische Ausbildung

- 04/2014 - 10/2018 **Promotion**
Technische Universität Kaiserslautern Fachbereich Chemie,
Fachrichtung Biochemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. J. Pierik
Titel: „Funktion des C-terminalen Tryptophans cytosolischer
Eisen-Schwefel-Proteine bei deren Assemblierung“
Gesamtnote: „Sehr gut“
- 10/2007 - 09/2012 **Diplomstudium Chemie**
Technische Universität Kaiserslautern
Schwerpunkt: Life Sciences in Chemistry
Thema der Diplomarbeit: „Chemische Spaltung des Glykoproteins
Clusterin und dessen biochemische Aktivitäten“ (1,0)
Gesamtnote: 1,0 „Mit Auszeichnung“

Schulbildung

- 1998 - 2007 Integrierte Gesamtschule Rockenhausen
03/2007 Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife
Gesamtnote: 1,7

Berufserfahrung

- 01/2013 - 03/2014 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie des
Universitätsklinikums Heidelberg

Publikationen

Greth, C., Blinn, C.M., Netz, D.J.A., Pierik, A.J. (2018) *Molecular determinants for cytosolic iron-sulfur cluster insertion*. Manuskript in Vorbereitung.

Stegmaier, K., Blinn, C.M., Bechtel, D.F., **Greth, C.**, Auerbach, H., Müller, C., Jacob, V., Netz, D.J.A., Schünemann, V., Pierik, A.J. (2018) *Apd1 and Aim32 are prototypes for native bis-histidiny-coordinated non-Rieske [2Fe-2S] cluster proteins*. J. Am. Chem. Soc. eingereicht.

Hesse, E., Freudenberg, U., Niemietz, T., **Greth, C.**, Weisser, M., Hagmann, S., Binner, M., Werner, C. & Richter, W. (2017) *Peptide-functionalized starPEG/heparin hydrogels direct mitogenicity, cell morphology and cartilage matrix distribution in vitro and in vivo*. J. Tissue Eng. Regen. Med. **12**: 229-239.

Lorenz, J., Seebach, E., Hackmayer, G., **Greth, C.**, Bauer, R.J., Kleinschmidt, K., Bettenworth, D., Böhm, M., Grifka, J. & Grässel, S. (2014) *Melanocortin 1 receptor-signaling deficiency results in an articular cartilage phenotype and accelerates pathogenesis of surgically induced murine osteoarthritis*. PLoS One **9**: e105858.

Konferenzbeiträge

Greth, C. & Pierik, A. J. (2018) *Molecular determinants for cytosolic iron-sulfur cluster insertion*. 39. Steenbock Symposium: Iron-Sulfur Proteins—Biogenesis, Regulation and Function, Madison (WI), USA: Vortrag und Posterbeitrag.

Greth, C. & Pierik, A. J. (2018) *Molecular determinants for cytosolic iron-sulfur cluster insertion*. 2. Iron-Sulfur for Life Meeting: Cooperative function of Iron-Sulfur Centers in Assembly, Biosynthesis, Catalysis and Disease, DFG Schwerpunktprogramm 1927, Potsdam: Vortrag und Posterbeitrag.

Greth, C. & Pierik, A. J. (2017) *Two-hybrid analysis of CIA-targeting complex proteins and their clients*. Iron-Sulfur for Life Summer School, DFG Schwerpunktprogramm 1927, Leipzig: Posterbeitrag.

Greth, C. & Pierik, A. J. (2016) *Molecular determinants for cytosolic iron-sulfur cluster insertion*. Iron-Sulfur for Life Meeting: Cooperative function of Iron-Sulfur Centers in Assembly, Biosynthesis, Catalysis and Disease, DFG Schwerpunktprogramm 1927, Potsdam: Vortrag.

Greth, C., Bechtel, D.F., & Pierik, A. J. (2016) *Molecular determinants for cytosolic iron-sulfur cluster insertion*. Gordon Research Conference: Inorganic Components of Nature that Drive Metabolism, Easton (MA), USA: Posterbeitrag.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**„Funktion des C-terminalen Tryptophans cytosolischer
Eisen-Schwefel-Proteine bei deren Assemblierung“**

selbstständig und ohne unerlaubte Zuhilfenahme Dritter und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die aufgeführten Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe. Diese Arbeit wurde weder in dieser, noch in einer ähnlichen Form, einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Kaiserslautern, im September 2018

Carina Greth